



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

“Desenvolvimento de métodos espectrométricos (UHPLC-MS/MS e MS/MS) para a determinação de peptídeos β -amilóides em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com a Doença de Alzheimer”.

Caroline Fernandes Grecco

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

RIBEIRÃO PRETO -SP

2023

CAROLINE FERNANDES GRECCO

“Desenvolvimento de métodos espectrométricos (UHPLC-MS/MS e MS/MS) para a determinação de peptídeos β -amilóides em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com a Doença de Alzheimer”.

VERSÃO CORRIGIDA

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur

RIBEIRÃO PRETO -SP

2023

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Grecco, Caroline Fernandes

Desenvolvimento de métodos espectrométricos (UHPLC-MS/MS e MS/MS) para a determinação de peptídeos β -amilóides em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com a Doença de Alzheimer –SP. Ribeirão Preto, 2023.

117 p.: il.; 30cm

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

Orientadora: Nassur, Maria Eugênia Queiroz

1. UHPLC-MS/MS. 2. In-tube SPME. 3. Fase monolítica orgânica. 4. Extração em ponteiras descartáveis 5. Peptídeos A β . 6 Líquido cefalorraquidiano. 7. Doença de Alzheimer.

GRECCO, C.F. Desenvolvimento de métodos espectrométricos (UHPLC-MS/MS e MS/MS) para a determinação de peptídeos β -amilóides em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com a Doença de Alzheimer. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP. 2023.

Aprovado em: 01/09/2023

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur – USP/FFCLRP

Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal – USP/FCFRP

Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira– USP/FFCLRP

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo – UNIFAL

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Maria Eugênia**, pela orientação, confiança e ensinamentos ao longo desses anos de pós-graduação.

À minha banca de qualificação: **Profa. Dra. Cristiane** e **Prof. Dr. Eduardo Figueiredo** pelas sugestões e críticas que enriqueceram este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Vitor Tumas** e seus alunos pelo auxílio com as amostras biológicas.

À **Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto** e seus funcionários pelo apoio institucional e instalações necessárias para a realização deste trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** – processos nº 2019/04386-7, 2017/02147-0 e 2020/00126-8 – pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** – código de financiamento 001) e ao **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM)** – processo 465458/2014-9.

Ao meu marido **Mateus** por toda paciência, companheirismo, amor, apoio, incentivo e confiança em mim depositados.

Aos meus pais **Luiz e Cibele** por todo amor, carinho e ensinamentos, se fazendo presentes em todos os momentos de minha vida e me incentivando na busca dos meus objetivos.

Aos colegas de laboratório (**Israel, Igor, Larissa e Priscila**), de graduação e pós-graduação pela companhia ao longo de todos esses anos.

À todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À **Deus** por me guiar, proteger, e colocar em minha vida as pessoas que mais amo.

RESUMO

GRECCO, C.F. **Desenvolvimento de métodos espectrométricos (UHPLC-MS/MS e MS/MS) para a determinação de peptídeos β -amilóides em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com a Doença de Alzheimer.** 2023. 117 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, 2023.

A Doença de Alzheimer (DA) é uma demência neurodegenerativa progressiva que afeta cerca de 50 milhões de pessoas ao redor do mundo. A DA é caracterizada patologicamente pela presença de placas senis e de novos neurofibrilares no cérebro, causadas pelo acúmulo extracelular dos peptídeos β -amilóides ($A\beta$) e da proteína tau, respectivamente. O diagnóstico conclusivo da DA tem sido eminentemente clínico e, nesses casos, a neurodegeneração já se instalou no cérebro do paciente. Portanto, esforços têm sido realizados para encontrar um biomarcador molecular para a identificação de pacientes em risco de desenvolver a DA, bem como para o diagnóstico precoce e acompanhamento da progressão das neurodegenerações. Neste projeto, os métodos empregando as técnicas de microextração em fase sólida no capilar (*in-tube Solid Phase Microextraction, in-tube SPME*) associada à cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (*Ultra High Performance Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry, UHPLC-MS/MS*) e a microextração em ponteiros descartáveis (*Disposable Pipette Extraction, DPX*) associada à MS/MS foram desenvolvidos e validados para a determinação de peptídeos $A\beta$ em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com a DA. Durante o desenvolvimento do método *in-tube SPME UHPLC-MS/MS*, diferentes colunas cromatográficas e composições de fases móveis foram avaliadas. A coluna cromatográfica em fase reversa Acquity UPLC Peptide BEH C18 (150 mm \times 2.1 mm e 1,7 μ m) com a fase móvel constituída de (A) água + 0,3% hidróxido de amônio e (B) acetonitrila e temperatura de 35°C apresentou picos simétricos e menor tempo de análise. Uma fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos foi sintetizada no interior do capilar de sílica fundida (6 cm \times 530 μ m d.i.) como fase extratora para a técnica *in-tube SPME* e caracterizada através das técnicas microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia vibracional da região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As condições otimizadas para a síntese da fase monolítica foram: 1-propanol (0,65 mL) e água (0,52 mL) como solventes porogênicos; 3-sulfopropil metacrilato de potássio (SPM) como monômero funcional (0,3306 g); etileno glicol dimetacrilato (EDMA) como agente reticulante (0,2 mL); 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador radicalar (0,016 g); e polimerização por 24 horas à 60°C. As variáveis *in-tube SPME* (pH e volume de amostra, solvente e volume para a limpeza da fase e solvente e volume para a eluição dos analitos) foram avaliadas e otimizadas. O método *in-tube SPME UHPLC-MS/MS* apresentou linearidade adequada com concentrações que variaram de LIQ – 10 ng mL⁻¹ com coeficientes de determinação (R^2) maiores que 0,99. Os valores de exatidão (EPR) e precisão (CV) variaram de -11,7 a 14,3% e 1,0 a 18,9%, respectivamente. O método *in-tube SPME UHPLC-MS/MS* foi aplicado na determinação de peptídeos $A\beta$, em seis amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer. O método DPX MS/MS utilizou ponteiros DPX (1 mL) contendo 60 mg de fase comercial Oasis MCX®, conectadas a uma seringa de polipropileno. A otimização das variáveis DPX (pH da amostra, tempo de equilíbrio de sorção, volume de amostra/número de ciclos e solução de eluição/número de ciclos) favoreceu a sensibilidade e seletividade do método e o emprego de pequenos volumes de amostra biológica e de solventes orgânicos. 5 μ L do extrato final evaporado e reconstituído em 50 μ L de fase móvel foram injetados no sistema MS/MS com a fase móvel constituída de

(A) água contendo 0,3% hidróxido de amônio e (B) acetonitrila, com vazão de 0,05 mL min⁻¹; e infusão direta de uma solução de metanol contendo 10% de hidróxido de amônio concentrado para favorecer a detectabilidade. O método DPX MS/MS apresentou linearidade adequada com concentrações que variaram do LIQ – 1,5 ng mL⁻¹ com coeficientes de determinação (R²) maiores que 0,99. Os valores de exatidão (EPR) e de precisão (CV) variaram de -13,6 a 13,2 e 0,3 a 12,7%, respectivamente. Portanto, segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, o método DPX MS/MS poderá ser empregado para a determinação de peptídeos A β em amostras de LCR de pacientes com DA.

Palavras chave: UHPLC-MS/MS, In-tube SPME, Fase monolítica orgânica, Extração em ponteiros descartáveis, Peptídeos A β , Líquido cefalorraquidiano, Doença de Alzheimer.

ABSTRACT

GRECCO, C.F. **Development of spectrometric methods (UHPLC-MS/MS and MS/MS) for the determination of β -amyloid peptides in cerebrospinal fluid samples from patients with Alzheimer's Disease** 2023. 117 f. Thesis (Ph.D. – Degree). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, 2023.

Alzheimer's Disease (AD) is a progressive neurodegenerative dementia that affects about 50 million people around the world. AD is pathologically characterized by the presence of senile plaques and neurofibrillary tangles in the brain, caused by the extracellular accumulation of β -amyloid peptides ($A\beta$) and tau protein, respectively. The conclusive diagnosis of AD has been eminently clinical and, in these cases, neurodegeneration has already taken root in the patient's brain. Therefore, efforts have been made to find a molecular biomarker for identifying patients at risk of developing AD, as well as for early diagnosis and monitoring of the progression of neurodegenerations. In this project, the methods employing in-tube solid phase microextraction (in-tube SPME) associated with ultra-efficiency liquid chromatography coupled with sequential mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) and Disposable Pipette Extraction (DPX) associated with MS/MS were developed and validated for the determination of $A\beta$ peptides in cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with AD. During the development of the in-tube SPME UHPLC-MS/MS method, different chromatographic columns and mobile phase compositions were evaluated. The Acquity UPLC Peptide BEH C18 reverse phase analytical column (150 mm \times 2.1 mm and 1.7 μ m) with the mobile phase consisting of (A) water + 0.3% ammonium hydroxide and (B) acetonitrile and temperature of 35 $^{\circ}$ C presented adequate chromatographic resolution, symmetrical peaks and shorter analysis time. An organic monolithic phase with sulfonic groups was synthesized inside the fused silica capillary (6 cm \times 530 μ m i.D.) as an extractor phase for the in-tube SPME technique and characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The optimized conditions for monolithic phase synthesis were: 1-propanol (0.65 mL) and water (0.52 mL) as porogenic solvents; 3-sulfopropyl methacrylate potassium salt (SPM) as functional monomer (0.3306 g); ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as crosslinking agent (0.2 ml); 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) as radical initiator (0.016 g); and polymerization time (24 hours) and temperature (60 $^{\circ}$ C). The in-tube SPME variables (pH and sample volume, wash conditions, and elution conditions) were evaluated and optimized. The in-tube SPME UHPLC-MS/MS method presented adequate linearity with concentrations ranging from LOQ – 10 ng mL $^{-1}$ with coefficients of determination (R^2) greater than 0.99. Accuracy (EPR) and precision (CV) values ranged from -11.7 to 14.3% and 1.0 to 18.9%, respectively. The in-tube SPME UHPLC-MS/MS method was applied to determine $A\beta$ peptides in six CSF samples from patients with Alzheimer's disease. The DPX MS/MS method used DPX tips (1 mL) containing 60 mg of Oasis MCX $^{\circ}$ commercial phase, connected to a polypropylene syringe. The optimization of the DPX variables (sample pH, sorption equilibrium time, sample volume/number of cycles and elution solution/number of cycles) favored the sensitivity and selectivity of the method and the use of small volumes of biological sample and of organic solvents. 5 μ L of the final evaporated extract and reconstituted in 50 μ L of mobile phase were injected into the MS/MS system with the mobile phase consisting of (A) water containing 0.3% ammonium hydroxide and (B) acetonitrile, with a flow rate of 0.05 ml min $^{-1}$; and direct infusion of a methanol solution containing 10% concentrated ammonium hydroxide to enhance detectability. The DPX-MS/MS method showed adequate linearity with concentrations ranging from LOQ – 1.5 ng mL $^{-1}$ with coefficients

of determination (R^2) greater than 0.99. Accuracy (EPR) and precision (CV) values ranged from -13.6 to 13.2 and 0.3 to 12.7%, respectively. Therefore, according to the analytical validation parameters evaluated, the DPX MS/MS method can be used to determine A β peptides in CSF samples from patients with AD.

Keywords: UHPLC-MS/MS, In-tube SPME, Organic monolithic phase, Disposable Pipette Extraction, A β peptides, Cerebrospinal fluid, Alzheimer's Disease

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos peptídeos A β estudados neste trabalho.	3
Figura 2. Via amiloidogênica (esquerda) e via não-amiloidogênica.....	4
Figura 3. Avaliação da influência da vazão (mL/min) da fase móvel (água + 0,1% hidróxido de amônio: acetonitrila, 90:10, v/v) nas condições UHPLC-MS/MS.....	28
Figura 4. Avaliação da influência da concentração de hidróxido de amônio na fase móvel.	29
Figura 5. Cromatograma de íons totais (TIC) dos peptídeos AB nas condições cromatográficas otimizadas.	29
Figura 6. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura. Avaliação das diferentes condições de síntese: (a) Fase monolítica 1.0; (b) Fase monolítica 6.0; (c) Fase monolítica 8.0; (d) Fase monolítica 6.2; (e) Fase monolítica 6.3; (f) Fase monolítica 6.4; (g) Fase monolítica 6.7; (h) Fase monolítica 6.9; (i) Fase monolítica 6.10; (j) Fase monolítica 6.11.	31
Figura 7. Etapas de ativação (esquerda) e derivatização (direita) das paredes internas do capilar de sílica fundida previamente tratado.	32
Figura 8. Avaliação da capacidade de extração das diferentes fases monolíticas sintetizadas.	36
Figura 9. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura da fase monolítica poli (SPM-co-EDMA): (a) Mag = 170X; (b) 10 kX.	37
Figura 10. Espectro FTIR da fase monolítica poli (SPM-co-EDMA).	38
Figura 11. Avaliação da porcentagem de plasma de rato adicionado à matriz de LCR sintético.	39
Figura 12. Avaliação da solução ácida utilizada na diluição da amostra de LCR sintético.	41
Figura 13. Avaliação da influência do volume de amostra na eficiência de extração. ...	42
Figura 14. Avaliação da influência da solução de limpeza na eficiência de extração. ...	43
Figura 15. Avaliação da influência do volume da solução de limpeza na eficiência de extração.	44
Figura 16. Avaliação da influência da solução de eluição na eficiência de extração. ...	45
Figura 17. Avaliação da influência do comprimento do capilar monolítico na eficiência de extração.....	46
Figura 18. Resumo da otimização das variáveis in-tube SPME.....	46
Figura 19. Cromatograma de infusão pós-coluna para avaliação do efeito matriz do método in-tube SPME UHPLC-MS/MS.....	49
Figura 20. Cromatograma da amostra de LCR sintético enriquecida com os analitos na concentração do LSQ (preto) e das amostras de LCR sintético branco de referência (vermelho) após análise do LSQ.....	49
Figura 21. Esquema de uma ponteira DPX.	55
Figura 22. Representação da fase comercial Oasis MCX.	55
Figura 23. Esquema das etapas envolvidas na DPX.....	56

Figura 24. Avaliação da influência da temperatura da coluna cromatográfica nas condições UHPLC-MS/MS. Fase móvel constituída por (A) água + hidróxido de amônio e (B) acetonitrila.	62
Figura 25. Avaliação da influência da porcentagem de hidróxido de amônio adicionado como aditivo na fase móvel nas condições UHPLC-MS/MS.	63
Figura 26. Avaliação da influência do volume de amostra injetado no sistema UHPLC-MS/MS.	64
Figura 27. Avaliação da vazão da fase móvel (mL/min) no método DPX MS/MS.	65
Figura 28. Avaliação da influência da infusão direta no método DPX-MS/MS: (a) adição da etapa de infusão direta; (b) solução de infusão direta.	66
Figura 29. Representação dos picos dos peptídeos A β nas condições MS/MS otimizadas.	67
Figura 30. Avaliação da influência do tipo de material plástico utilizado durante o desenvolvimento do método DPX.	68
Figura 31. Avaliação da adição de agente desnaturante no pré-preparo da amostra.	69
Figura 32. Avaliação da influência do tempo de equilíbrio entre os os analitos e o material sorvete na eficiência de extração.	70
Figura 33. Avaliação da influência do volume de amostra na eficiência de extração.	71
Figura 34. Avaliação da influência do número de ciclos aspirar/dispensar na eficiência de extração.	72
Figura 35. Avaliação da influência do solvente de eluição na eficiência de extração.	73
Figura 36. Avaliação da influência da solução de eluição na eficiência de extração.	73
Figura 37. Avaliação da influência do (a) número de ciclos aspirar/dispensar e (b) volume da solução de eluição (metanol/hidróxido de amônio, 90:10, v/v) na eficiência de extração.	74
Figura 38. Resumo da otimização das variáveis DPX.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Transições MS/MS (SRM), voltagem do cone (DP), energia de colisão (CE) e tempo de retenção (tR) dos analitos.....	20
Tabela 2. Intervalo linear, equação de regressão linear, coeficiente de determinação (R^2) e limite inferior de quantificação (LIQ) para o método in-tube SPME UHPLC-MS/MS.	47
Tabela 3. Parâmetros de validação analítica para o método in-tube SPME UHPLC-MS/MS.	48
Tabela 4. Test T para comparação da inclinação das retas obtidas em diferentes matrizes	48
Tabela 5. Transições MS/MS (SRM), voltagem do cone (DP) e energia de colisão (CE).	59
Tabela 6. Intervalo linear, equação de regressão linear, coeficiente de determinação (R^2) e limite inferior de quantificação (LIQ) para o método DPX-MS/MS.	75
Tabela 7. Parâmetros de validação analítica para o método DPX MS/MS.	76
Tabela 8. Comparação dos diferentes métodos analíticos na determinação dos peptídeos A β em amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AIBN	2,2'-azobisisobutironitrilo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BET	Brunauer, Emmet e Teller
BJH	Barret, Joyner e Halenda
CE	<i>Collision Energy</i> (Energia de colisão)
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CV	Coefficiente de Variação
DA	Doença de Alzheimer
DP	<i>Declustering Potential</i> (Voltagem do cone)
DVB	Divinilbenzeno
EDMA	Etileno glicol dimetacrilato
EPR	Erro Padrão Relativo
ESI	<i>Electrospray Source Ionization</i> (Fonte de ionização por eletrospray)
FTIR	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier
HCl	Ácido clorídrico
UHPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)
<i>In-tube</i> SPME	<i>Solid Phase Micro Extraction</i> (Micro extração em fase sólida no capilar)

KBr	Brometo de potássio
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LSQ	Limite Superior de Quantificação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MS/MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas sequencial)
NaOH	Hidróxido de sódio
PEGDA	Polietileno glicol dimetacrilato
PI	Padrão Interno
SPM	Sulfo-propil metacrilato de potássio
SRM	<i>Selected Reaction Monitored</i> (Monitoramento de Reações Seleccionadas)
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i> (Cromatograma de íons totais)
t_R	Tempo de retenção dos analitos
VTMS	Vinil trimetoxissilano

SUMÁRIO

I. Introdução Geral	2
I.1. Doença de Alzheimer	2
I.2. Biomarcadores	5
I.3. Líquido cefalorraquidiano (LCR)	5
I.4. Metodologias analíticas para a determinação de peptídeos A β em amostras biológicas	6
1. CAPÍTULO 1	9
1.1. Microextração em fase sólida no capilar (<i>in-tube</i> SPME)	9
1.1.2. Fase monolítica	10
1.1.3. Caracterização morfológica e química das fases monolíticas.....	14
1.2. Objetivos	17
1.2.1. Objetivo Geral.....	17
1.2.2. Objetivos Específicos	17
1.3. Materiais e Métodos.....	18
1.3.1. Materiais e Reagentes	18
1.3.2. Soluções padrão e estoque	18
1.3.3. Preparo da matiz biológica sintética	18
1.3.4. Pré-tratamento da amostra biológica.....	19
1.3.5. Condições UHPLC-MS/MS	19
1.3.6. Síntese da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos	20
1.3.7. Caracterização morfológica e química da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos.....	21
1.3.8. Condições <i>in-tube</i> SPME offline	22
1.3.9. Validação analítica do método <i>in-tube</i> SPME UHPLC-MS/MS	22
1.3.10. Análise das amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer .	24
1.4. Resultados e Discussão.....	25
1.4.1. Avaliação das condições MS/MS	25

1.4.2.	Avaliação das condições cromatográficas	25
1.4.3.	Síntese da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos	30
1.4.4.	Caracterização da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos	36
1.4.5.	Avaliação da etapa de pré-tratamento da amostra.....	38
1.4.6.	Avaliação das condições <i>in-tube</i> SPME <i>offline</i>	39
1.4.7.	Validação analítica do método <i>in-tube</i> SPME UHPLC-MS/MS	47
1.5.	Aplicação do método <i>in-tube</i> SPME UHPLC-MS/MS.....	51
1.6.	Conclusão	52
2.	CAPÍTULO 2	54
2.1.	Microextração em ponteira descartável.....	54
2.2.	Objetivos	57
2.2.1.	Objetivo Geral.....	57
2.2.2.	Objetivos Específicos	57
2.3.	Materiais e Métodos.....	58
2.3.1.	Pré-tratamento da amostra biológica.....	58
2.3.2.	Condições UHPLC-MS/MS	58
2.3.3.	Condições MS/MS.....	59
2.3.4.	Condições DPX	59
2.3.5.	Validação analítica do método DPX MS/MS	60
2.4.	Resultados e Discussão.....	62
2.4.1.	Avaliação das condições UHPLC-MS/MS	62
2.4.2.	Avaliação das condições MS/MS	65
2.4.3.	Avaliação da etapa de pré-preparo da amostra.....	67
2.4.4.	Avaliação das condições DPX.....	69
2.4.5.	Validação analítica do método DPX MS/MS	75
2.5.	Aplicação do método DPX MS/MS	77
2.6.	Conclusão	77

2.7. Comparação dos métodos <i>in-tube</i> SPME UHPLC-MS/MS e DPX MS/MS com os trabalhos da literatura.....	78
3. CONCLUSÃO FINAL.....	81
4. REFERÊNCIAS.....	83

INTRODUÇÃO GERAL

I.Introdução Geral

I.1.Doença de Alzheimer

A demência pode ser definida como o desenvolvimento de sintomas cognitivos ou comportamentais associados ao declínio do nível prévio do desempenho, envolvendo vários domínios cognitivos como aprendizado, memória, linguagem, atenção, cognição social [1].

Atualmente, a doença de Alzheimer (DA), principal demência neurodegenerativa, afeta cerca de 50 milhões de pessoas ao redor do mundo [2]. De forma geral, a DA de acometimento precoce mostra recorrência familiar e tem incidência em indivíduos com idade próxima aos 40 anos, enquanto que a DA de acometimento tardio ocorre de forma esporádica e tem incidência ao redor de 60 anos de idade [3]. À medida que a expectativa de vida da população se torna mais elevada, prevê-se que a demência atinja cerca de 81 milhões de pessoas nos próximos vinte anos [4,5]. O óbito dos pacientes acometidos pela doença de Alzheimer, costuma ocorrer entre 6 a 12 anos após o diagnóstico, normalmente por uma complicação da imobilidade ou por embolia pulmonar e pneumonia [6].

A DA, responsável por 60-70% dos casos de demência [4], caracteriza-se por uma neurodegeneração severa e neuroinflamação, levando à perda progressiva das aptidões cognitivas e perda irreversível dos neurônios, manifestando-se inicialmente por défices de memória episódica [2,7-9]. Com o progresso da doença, outras habilidades também são comprometidas, como a capacidade de usar objetos e ferramentas que fazem parte do cotidiano da pessoa acometida pela doença [9,10].

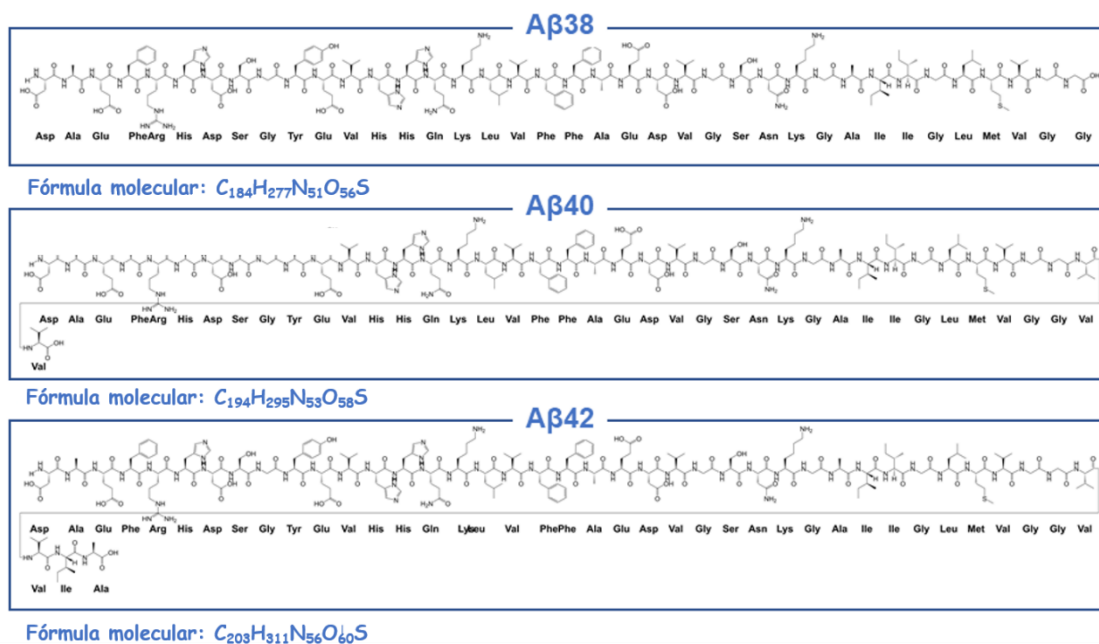
O primeiro estudo descrevendo a DA foi apresentado por Alois Alzheimer em 1906 [11]. Os sintomas relatados incluíam falhas na memória recente, paranoia e problemas comportamentais e de linguagem. Além disso, imagens de exames *post-mortem* mostraram cérebro atrófico e com sinais de deposições proteicas anômalas, as quais foram posteriormente denominadas placas senis eovelos neurofibrilares.

Do ponto de vista neuropatológico, é observado no cérebro de indivíduos com DA, atrofia cortical difusa, degeneração neurovascular, perda neuronal e sináptica e presença de grande número de placas senis (formadas pela acumulação extracelular dos peptídeos β -amilóide) e deovelos neurofibrilares (formados pela acumulação intracelular da proteína tau hiperfosforilada) [3,4]. Acredita-se também que a

concentração das placas senis esteja relacionada ao grau de demência nos indivíduos afetados.

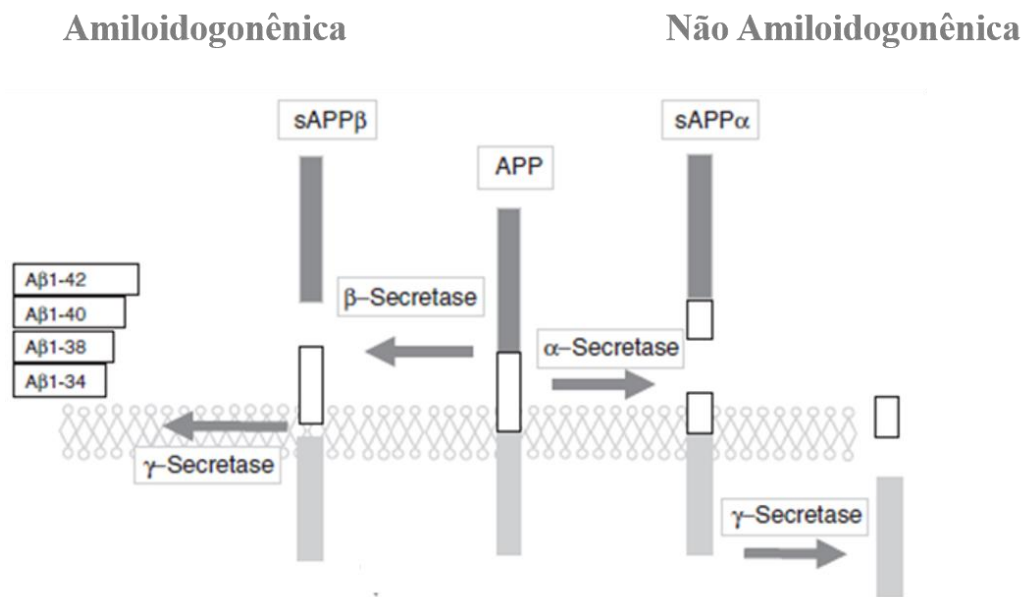
Os peptídeos β -amilóide ($A\beta$) são constituídos por cadeias de aminoácidos e originam-se da proteólise da proteína precursora de amiloide (APP) – Figura 1. Esse processo pode ocorrer por duas vias: a via amiloidogênica e a via não-amiloidogênica (Figura 2). Na primeira, a clivagem da APP através da ação das enzimas β -secretase e γ -secretase gera fragmentos de peptídeos $A\beta$ de diferentes tamanhos, com 38, 40 e 42 resíduos, $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$ respectivamente. Destes peptídeos, o mais frequente é o $A\beta_{40}$ enquanto que o $A\beta_{42}$ é a forma mais hidrofóbica e a que apresenta maior tendência em formar agregados insolúveis, predominante nas placas senis e envolvido na toxicidade neuronal devido à polimerização da forma monomérica [12]. Se a produção e agregação superaram a capacidade de degradação destes peptídeos, eles irão se acumular e levar à formação de placas senis, resultando em morte celular [4,9]. Na via não amiloidogênica, a APP sofre clivagem sequencial das enzimas α -secretase e γ -secretase, que ao contrário da enzima β -secretase, clivam a APP dentro do domínio amiloide prevenindo a formação do peptídeo $A\beta$, liberando ao meio extracelular o fragmento solúvel $sAPP\alpha$, considerado neuroprotetor [13].

Figura 1. Estrutura dos peptídeos $A\beta$ estudados neste trabalho.



Fonte: Adaptado de Souza et al. [14]

Figura 2. Via amiloidogênica (esquerda) e via não-amiloidogênica.



Fonte: Adaptado de Bros [15].

A maioria dos fármacos desenvolvidos para o tratamento da DA procuram reduzir a produção, evitar a agregação e/ou promover a eliminação de peptídeos β -amilóide [8]. A diminuição da formação desses peptídeos pode ser feita através da modulação enzimática, inibindo as enzimas β -secretase e γ -secretase ou através da estimulação da via não amiloidogênica do metabolismo de APP estimulando a enzima α -secretase [8]. A fim de evitar a agregação de peptídeos β -amilóide, alguns fármacos ligam-se aos monômeros de β -amilóide, evitando a sua agregação e posterior deposição cerebral [16].

A farmacoterapia disponível atua no modo sintomático melhorando principalmente os sintomas cognitivos [8]. Para tratamento dos sintomas comportamentais e psiquiátricos são utilizados antidepressivos, ansiolíticos e antiepiléticos [8].

Estudos reportados na literatura mostraram que o nível do peptídeo $A\beta_{42}$ começa a mudar cerca de 10 a 15 anos antes do aparecimento dos sintomas da Doença de Alzheimer [17,18]. Dessa forma, torna-se fundamental o desenvolvimento de métodos de diagnóstico que permitam identificar a doença em uma fase mais precoce.

Diversos estudos evidenciaram a avaliação promissora de peptídeos $A\beta$ como biomarcadores na abordagem de indivíduos com história familiar de DA e/ou com sinais e sintomas clínicos de distúrbios cognitivos sugestivos da doença [19].

I.2. Biomarcadores

Os biomarcadores, substâncias que podem ser medidas e avaliadas como indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica, são parte essencial do tratamento de doenças pois monitoram o efeito da intervenção terapêutica e a progressão da doença, e, são essenciais para o diagnóstico, pois detectam o início precoce e evitam diagnósticos falsos [20–22]. Um biomarcador ideal deve (1) ser altamente específico, (2) prever o curso da doença com precisão e (3) refletir o grau de resposta ao tratamento [20,23].

Os biomarcadores da Doença de Alzheimer incluem os peptídeos β -amilóides ($A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$) e a proteína tau. Diversos trabalhos reportados na literatura [14,24–29] exemplificam a determinação desses biomarcadores em amostras biológicas como líquido cefalorraquidiano (LCR) e plasma.

I.3. Líquido cefalorraquidiano (LCR)

Embora a coleta de plasma sanguíneo seja minimamente invasiva, mais fácil e de menor custo quando comparada com a coleta de LCR, do ponto de vista analítico, o sangue apresenta-se como uma matriz complexa e mais desafiadora para a determinação de biomarcadores relacionados com a Doença de Alzheimer. Além disso, a determinação de peptídeos β -amilóide em plasma é um desafio porque a albumina sérica humana (HSA) se liga a 95% dos peptídeos no plasma sanguíneo inibindo a formação de placas no tecido periférico. Assim, a concentração total desses biomarcadores no sangue é aproximadamente 100 vezes menor do que a concentração encontrada no LCR [30,31].

O LCR é considerado um plasma ultrafiltrado que está presente nos ventrículos do cérebro e nos espaços subaracnóides do crânio e da coluna vertebral. Por isso, muitas proteínas cerebrais presentes no espaço extracelular do cérebro podem ser detectadas no LCR, sendo esta matriz a mais rica fonte de biomarcadores para a DA [20,32].

Embora seja uma matriz mais limpa, o LCR possui vários componentes interferentes endógenos (proteínas e fosfolipídios) que podem suprimir a ionização dos analitos na fonte ESI, coeluir com os analitos durante a separação cromatográfica ou adsorver de forma irreversível junto à coluna cromatográfica, diminuindo o tempo de vida útil da coluna e modificando o tempo de retenção dos analitos [33]. Dessa maneira, o preparo de amostra é uma etapa imprescindível no desenvolvimento de métodos

analíticos, pois elimina grande parte dos componentes endógenos da matriz biológica e pré-concentra os analitos quase sempre presentes em níveis de traços.

I.4. Metodologias analíticas para a determinação de peptídeos A β em amostras biológicas

As técnicas baseadas em imuno ensaios como ELISA [34–39] e INNO-BIA [36,40–43] são muito utilizadas na determinação de biomarcadores relacionados com a Doença de Alzheimer. Embora apresentem uma metodologia simples, tais técnicas têm elevado custo e necessitam de anticorpos altamente específicos. Além disso, a especificidade das interações pode ser comprometida pela presença de outras proteínas nas amostras biológicas, como por exemplo, a albumina sanguínea e imunoglobulina [44].

Métodos analíticos baseados em espectrometria de massas, como por exemplo a LC-MS/MS têm sido amplamente utilizados na determinação de peptídeos A β em amostras biológicas [14,24–29]. A LC-MS/MS apresenta alta resolução, seletividade, detectabilidade, robustez, rapidez nas análises e gera resultados com alto grau de confiabilidade.

Na espectrometria de massas sequencial (MS/MS), o analisador do tipo triplo quadrupolo (constituído por três quadrupolos em série) tem sido utilizado para análise de peptídeos A β em amostras biológicas complexas [45–47]. Quando o analisador triplo quadrupolo é operado no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM), o íon precursor é selecionado no primeiro quadrupolo, fragmentado no segundo quadrupolo, e por fim os fragmentos obtidos são selecionados no terceiro quadrupolo e posteriormente focalizados para o detector do espectrômetro de massas para quantificação [48]. Através do par de fragmento selecionado no terceiro quadrupolo, define-se o íon de quantificação e o íon de confirmação com base na intensidade do sinal e a relação sinal/ruído, o que irá conferir alta sensibilidade ao método analítico [48–51]. Além da alta detectabilidade, a alta seletividade desse equipamento permite a análise simultânea de vários analitos em uma única corrida cromatográfica, uma vez que os analitos são monitorados em canais distintos tornando possível a quantificação de compostos mesmo quando há analitos com tempo de retenção coincidentes.

Apesar dos recentes avanços no desenvolvimento de métodos analíticos baseados em MS/MS, a quantificação dos peptídeos A β ainda é um desafio devido a sua baixa

concentração endógena, tendência em formar agregados e ligações não específicas, além do efeito matriz durante a ionização por electrospray (ESI). Assim, o desenvolvimento de novas metodologias que permitam a exclusão das macromoléculas endógenas da matriz biológica e a pré-concentração dos analitos de interesse é de grande interesse. Neste contexto podemos destacar as técnicas de microextração em fase sólida no capilar (*in-tube* SPME) e a microextração em ponteiras descartáveis (DPX).

No Capítulo 1 discutimos a síntese e caracterização de uma fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos que foi utilizada como fase extratora no sistema *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS. As condições cromatográficas (UHPLC-MS/MS) e as variáveis *in-tube* SPME foram otimizadas visando a melhor eficiência de extração. O método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS foi padronizado, validado e aplicado na determinação de peptídeos A β em amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer.

No Capítulo 2 discutimos o desenvolvimento do método DPX MS/MS, o qual fez uso da fonte de ionização de baixa vazão e avaliou o acoplamento direto no sistema de espectrometria de massas sequencial sem a etapa de separação cromatográfica. Este método foi padronizado e validado para a determinação de peptídeos A β em amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer.

CAPÍTULO 1

In-tube SPME associada à UHPLC-MS/MS para análise de peptídeos A β
em amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer

1. CAPÍTULO 1

1.1. Microextração em fase sólida no capilar (*in-tube* SPME)

A microextração em fase sólida no capilar (*in-tube* SPME) foi inicialmente proposta em 1997 por Eisert e Pawliszyn [52] como uma variante da técnica SPME com fibras (1ª geração) e tinha como objetivo contornar as limitações inerentes à técnica, por exemplo, baixa capacidade de sorção para substâncias pouco voláteis e possibilitar o acoplamento da SPME com o sistema HPLC, permitindo assim a redução do volume de amostra utilizada, solventes e resíduos gerados [53].

A técnica *in-tube* SPME utiliza como dispositivo de extração uma coluna capilar com diferentes configurações: (a) com fase extratora líquida ou (b) fase monolítica quimicamente ligada à parede interna, (c) com partículas sólidas ou (d) fibras SPME recheando seu interior [54]. Os capilares com fases ligadas, quando comparados aos recheados apresentam menor pressão no sistema analítico [55].

Na técnica *in-tube* SPME, os analitos de interesse são extraídos da matriz biológica e pré-concentrados na fase extratora com base no equilíbrio de partição (transferência de massas) dos analitos presentes na amostra com a fase extratora. Por se tratar de uma técnica de extração não exaustiva (ou seja, realiza a extração de apenas uma fração dos analitos presentes na amostra), depois que o equilíbrio de partição é atingido, o aumento do tempo de extração não favorece a eficiência de extração [56].

O tempo requerido para atingir o equilíbrio de partição do soluto entre as fases durante o processo *in-tube* SPME pode ser expresso segundo a Equação 1. Onde L representa o comprimento do capilar, K_a é o coeficiente de partição, V_f é o volume da fase extratora do capilar, V_v é o volume livre do capilar, e μ é a velocidade linear da amostra. Durante as extrações, as variáveis: L , V_f , V_v e o valor K_a são fixos; desta forma, o tempo de extração depende da velocidade linear da amostra.

$$t_e = L \left[1 + K_a \mu \left(\frac{V_f}{V_v} \right) \right] / m \quad (\text{Equação 1})$$

O processo de sorção da amostra na fase extratora pode ser realizado de duas maneiras: (1) de forma contínua, no qual a amostra passa através do capilar continuamente em uma única direção; ou (2) através de ciclos aspirar/dispensar, no qual

a amostra é repetidamente aspirada e dispensada no capilar [57–59]. Já no modo aspirar/dispensar, o capilar é conectado entre a agulha do injetor automático e o loop do LC, ou no lugar do loop do LC junto à válvula de múltiplos pórticos. O volume de amostra, número de ciclos aspirar/dispensar, vazão da amostra são otimizados [60]. Posteriormente, os analitos são eluídos da fase extratora com a passagem de um solvente adequado.

A capacidade e a eficiência de extração dos analitos na técnica *in-tube* SPME estão relacionadas com a fase extratora utilizada. Apesar da grande variedade de fases extradoras disponíveis comercialmente, pesquisas recentes têm sido direcionadas para o desenvolvimento de novas fases extradoras na busca por aumento na seletividade, capacidade de sorção, sensibilidade e robustez dos métodos analíticos. Dentre as fases extradoras mais comumente empregadas na técnica *in-tube* SPME, podemos citar os polímeros molecularmente impressos (MIP) [61,62], materiais monolíticos orgânicos [63] ou a base de sílica híbrida [64–66], materiais de acesso restrito (RAM) [67,68], líquidos iônicos [14,25,69], entre outros [54,59,70].

Neste trabalho, uma fase monolítica orgânica trocadora de cátions foi sintetizada no interior de um capilar de sílica fundida e utilizada como fase extratora no método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS para a determinação de peptídeos A β em amostras de LCR.

1.1.2. Fase monolítica

Uma fase monolítica é um meio contínuo de separação/sorção que possui uma estrutura altamente porosa, de pequenos domínios e canais relativamente grandes que fornecem alta permeabilidade e capacidade de sorção superior às colunas capilares abertas, permitindo análises a altas vazões e baixa pressão [71]. Os macroporos (maiores que 50 nm) garantem alta permeabilidade à estrutura monolítica permitindo a percolação de soluções sem implicar no aumento considerável de pressão [72]. Enquanto que os mesoporos (2 a 50 nm) fornecem alta área superficial [72,73].

As fases monolíticas podem ser classificadas em orgânica, inorgânica ou híbrida, de acordo com a natureza dos precursores de síntese [74]. As fases monolíticas baseadas em polímeros orgânicos apresentam como vantagens: (a) alta estabilidade em ampla faixa de pH, (b) fácil preparação, (c) síntese *in-situ*; (d) não requer o uso de *frit*; (e) alta

compatibilidade para análise de biomoléculas e (f) disponibilidade abundante de monômeros [74].

Características como eficiência, área superficial e a porosidade deste tipo de fase monolítica podem ser influenciadas através da mudança na composição da mistura de polimerização (monômero funcional, agente reticulante, iniciador radicalar e solvente porogênico) ou nas condições de reação (temperatura e tempo de polimerização) [75,76].

a) Suporte

Os monolitos orgânicos podem ser preparados por polimerização *in situ*, ou seja, diretamente no interior de uma coluna de aço inoxidável ou no interior de capilar de sílica fundida. Quando preparado no interior do capilar de sílica fundida, inicialmente o capilar é lavado com uma base forte para que os grupos siloxanos da superfície interna do capilar sejam hidrolisados, aumentando a densidade de grupos silanóis que, por sua vez, servirão como âncoras para as reações subsequentes. Em seguida, o capilar é preenchido com um agente silanizante bifuncional, vedado e deixado por um tempo, com ou sem aquecimento, para que a reação ocorra. Após a silanização, os resíduos são removidos do interior do capilar pela passagem de um solvente apropriado. Este tratamento faz com que sejam formadas ligações entre as paredes do capilar e os grupos provenientes do agente silanizante, os quais estarão disponíveis para posterior fixação do monolito à parede do capilar durante a etapa de polimerização [71,77].

Após o tratamento do capilar, uma mistura constituída de monômero funcional, agente reticulante, iniciador de radical e solventes porogênicos é sonicada em banho de ultrassom e posteriormente purgada com nitrogênio para remoção do oxigênio dissolvido. Em seguida, essa mistura reacional é inserida no interior do capilar de sílica com uma das extremidades vedadas, fechando-se a outra após o preenchimento [71,78]. Por fim, o dispositivo (seja a coluna de aço inox ou capilar de sílica) contendo a mistura reacional em seu interior é levado para polimerização até a formação do monolito.

b) Monômeros

A funcionalização ou derivatização da fase monolítica consiste na modificação de grupos reativos da superfície do monolito com reagentes específicos, ou pela inserção de monômeros funcionais na superfície dos poros [71].

A funcionalização da fase monolítica é realizada simultaneamente à etapa de preparação do monolito com a adição de um monômero funcional adequado à mistura de polimerização [71]. As fases monolíticas orgânicas têm utilizado poliacrilamida (AAm) [79], estireno [80,81], alquil metacrilatos, glicidil metacrilato (GMA) [82–86] e grupos trocadores de cátions [77,87] como monômeros funcionais e etileno dimetacrilato (EDMA) ou divinilbenzeno (DVB) como agente reticulante [78,88,89].

Ambas as fases monolíticas que fazem uso de metacrilato ou estireno como monômeros funcional, apresentam boa estabilidade em separações cromatográficas que utilizam fase móvel de caráter ácido ou básica [90]. Monolitos a base de metacrilato são estáveis na faixa de pH de 2-12 [91], enquanto que monolitos a base de estireno são estáveis na faixa de pH de 2-14 [92]. Os trocadores catiônicos apresentam grupos carregados negativamente, como os grupos sulfônicos, ligados à sua superfície interna do monolito. Esses grupos são capazes de reter compostos ionizados positivamente (compostos básicos) através de interações eletrostáticas.

Outro fator que afeta a porosidade da fase monolítica é o grau de intercrossamento do polímero, ou seja, quanto maior a porcentagem de agente reticulante na mistura de polimerização, menor será o tamanho dos poros na fase monolítica [71,93]. No entanto, a redução da quantidade de agente reticulante na mistura produz uma fase monolítica com maiores tamanhos de poros, o que pode levar à perda da estrutura monolítica [94].

c) Solvente porogênico

Os solventes porogênicos (sejam eles uma solução aquosa ou uma mistura de solventes orgânicos) devem solubilizar totalmente o monômero funcional, agente reticulante e iniciador radicalar resultando em uma mistura reacional homogênea.

A porosidade de uma fase monolítica orgânica é controlada pelos solventes porogênicos, ou seja, quanto maior a porcentagem de solventes porogênicos na mistura de polimerização maior será a porosidade da fase monolítica [71].

Na mistura de polimerização podem ser adicionados um, dois ou até três desses solventes, no entanto, monolitos preparados com um único solvente porogênico apresentam perda na estrutura dos poros e baixa estabilidade mecânica [94,95]. Dessa forma, um sistema binário de solventes porogênicos têm sido frequentemente utilizados na síntese de monólitos orgânicos. Nesse sistema, os solventes macro porogênicos são

responsáveis pela formação dos macroporos. Enquanto os solventes micro porogênicos resultam na formação de poros menores [94].

d) Iniciador radicalar

Tem como principal função iniciar as reações de polimerização quando a mistura reacional é colocada em aquecimento ou sob luz UV. A quantidade adicionada de iniciador radicalar à mistura reacional irá afetar diretamente a velocidade com que a reação ocorre e conseqüentemente o tamanho dos poros formados. A velocidade de polimerização é lenta quando utilizada baixas quantidades de iniciador radicalar, enquanto que seu uso em excesso aumenta a velocidade de polimerização [94].

e) Polimerização

A polimerização pode ser iniciada por aquecimento, em temperaturas que variam de 50° a 80°C [96–102], luz UV [93,103,104], reações de poli condensação [83] ou polimerização por metástase por abertura de anel [105,106].

A principal vantagem da polimerização iniciada por luz UV é a polimerização local do monolito. No entanto, neste tipo de polimerização é necessário a utilização de materiais de recobrimento transparentes para os capilares. Além disso, esses materiais são menos resistentes e flexíveis que os capilares recobertos com poliimida [71].

Por outro lado, a polimerização iniciada termicamente permite a utilização de capilares de sílica fundida revestidos com uma camada de poliimida, o que fornece uma maior resistência e flexibilidade. Porém, alguns trabalhos na literatura reportam certa dificuldade de se preparar fases monolíticas dentro de um espaço restrito como o capilar de sílica fundida [71].

Durante a etapa de polimerização, radicais são formados a partir do iniciador radicalar. Os polímeros em crescimento produzem núcleos (precipitados) que aumentam de tamanho e levam à formação de clusters, que por sua vez se unem levando à formação da fase monolítica [72]. Após o término da polimerização, um solvente é percolado através da fase monolítica para remoção dos resíduos e dos solventes porogênicos [71].

A temperatura de polimerização controla a distribuição de poros na fase monolítica, afetando a formação da estrutura porosa e a área superficial. O uso de altas temperaturas reduz a permeabilidade da fase monolítica. Por outro lado, quando a

temperatura de polimerização é muito baixa, a velocidade de reação é lenta e a reação pode não ocorrer [94].

O tempo de polimerização afeta de forma significativa a estrutura interna da fase monolítica. Longos tempos de polimerização resultam em reações tardias do monômero, o que reduz o tamanho dos poros e diminui a porosidade da fase monolítica [94]. Em contrapartida, as reações de polimerização podem ocorrer de forma incompletas em tempos de polimerização curtos.

1.1.3. Caracterização morfológica e química das fases monolíticas

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é capaz de fornecer informações morfológicas da estrutura do material. Esta técnica se baseia na incidência de um feixe de elétrons sobre a amostra, que permanece fixa num suporte metálico. A interação entre este feixe (primário) e a amostra, emite elétrons secundários, retro espelhados, raios-X e outros. Apenas elétrons secundários e retro espelhados são monitorados com um arranjo de detectores do equipamento e utilizados para a confecção da imagem da superfície da amostra. Fases monolíticas orgânicas são caracterizadas através da técnica MEV mediante o recobrimento metálico e de carbono devido a sua baixa condutividade elétrica [107]. A técnica MEV tem sido empregada para comparar a superfície de fases monolíticas sintetizadas em diferentes condições avaliar a interconectividade dos poros e a homogeneidade radial das sínteses realizadas *in situ* [74,108–112].

A Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é comumente utilizada na identificação de grupos funcionais incorporados nas amostras. A identificação é baseada na medida da radiação (na região do infravermelho) absorvida pela amostra submetida a um feixe. Geralmente os grupos funcionais absorvem radiação entre 400 e 4000 cm^{-1} . A absorção em cada comprimento de onda está relacionada com um modo normal de vibração dos grupos químicos.

Os ensaios de adsorção/dessorção são baseados na adsorção de gases, que se caracterizam pelo enriquecimento da concentração do adsorbato na superfície da amostra [113]. A amostra é inserida em uma câmara que é preenchida com uma quantidade conhecida de nitrogênio. A temperatura da câmara é mantida constante, enquanto a pressão no sistema é registrada em intervalos de tempos regulares. À medida que o gás

vai se adsorvendo na amostra, a pressão da câmara diminui. Os dados são coletados e utilizados na confecção de isotermas que relacionam a quantidade de gás adsorvido em função da pressão relativa (P/Po). O tipo de isoterma revela informações a respeito da porosidade do material sintetizado [114]. Os métodos BET [115] e BJH [116] são utilizados no tratamento dos dados obtidos pelas isotermas de adsorção. O primeiro é empregado na obtenção da área superficial dos adsorventes porosos, enquanto o segundo método é empregado na determinação dos tamanhos dos mesoporos.

1.1.4. Colunas cromatográficas utilizadas em cromatografia líquida

A eficiência das separações cromatográficas, expressa pela altura do prato (H, μm) tem sido descrita pela equação de Van Deemter (Equação 2).

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (\text{Equação 2})$$

O termo A refere-se ao alargamento dos picos devido aos múltiplos caminhos seguidos pelas moléculas dos analitos. Esses caminhos são dependentes do tamanho das partículas bem como sua morfologia. O termo B está relacionado à difusão longitudinal ou difusão do soluto na fase móvel e este termo pode ser minimizado com o uso de altas velocidades lineares de fase móvel. A difusão ocorre das regiões centrais (maior concentração) para as regiões axiais (menor concentração). O termo C é descrito pela transferência de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária. Portanto, o uso das colunas com partículas pequenas (sub 2 μm) resulta em rápida difusão dos analitos entre as fases, em razão da menor profundidade de poros [117–119].

Estudos têm sido direcionados para a obtenção de separações cromatográficas rápidas, com alta eficiência, alta resolução e baixa pressão do sistema cromatográfico. Nesse contexto, atualmente existe uma grande variedade de colunas cromatográficas disponíveis comercialmente com diferentes tecnologias e diferentes tamanhos de partículas de fases estacionárias totalmente porosas e superficialmente porosas.

As colunas BEH possuem a tecnologia de partículas híbridas de pontes de etileno (BEH) que oferece muitas vantagens em relação às partículas convencionais à base de sílica, incluindo a capacidade de controlar a atividade do silanol para oferecer melhor

reprodutibilidade, formato de pico e eficiência. Além disso, essas partículas são mecanicamente fortes, resistentes a ampla faixa de pH (1 – 12) e altamente estáveis

As colunas CSH possuem partículas híbridas de superfície carregada e são capazes de incorporar uma carga superficial de baixo nível que melhora a capacidade de carga da amostra e a assimetria do pico em fases móveis de baixa força iônica, enquanto mantem a estabilidade mecânica e química. Estas colunas fornecem picos de alta qualidade para compostos básicos.

As colunas CORTECS possuem partículas de núcleo sólido recoberto por uma camada porosa o que permite o aumento na eficiência da coluna e contra pressões mais baixas em comparação com as colunas recheadas de partículas totalmente porosas.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo Geral

- Desenvolver e validar o método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS para a determinação de peptídeos A β em amostras de LCR de pacientes com a doença de Alzheimer.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar a fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos (polimerização *in situ* no interior de um capilar de sílica).
- Otimizar e validar o método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS para a determinação de peptídeos A β em amostras de LCR de pacientes com a doença de Alzheimer.
- Determinar as concentrações dos peptídeos A β em amostras de LCR de pacientes com a doença de Alzheimer utilizando o método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS otimizado e validado.

1.3. Materiais e Métodos

1.3.1. Materiais e Reagentes

Os padrões analíticos dos peptídeos A β 38, A β 40 e A β 42 e os padrões analíticos dos peptídeos marcados isotopicamente com isótopo de nitrogênio-15 (15N51-A β 38, 15N53-A β 40 e 15N55-A β 42) foram adquiridos da empresa AnaSpec (Fremont, CA, USA).

A água utilizada no preparo das soluções padrão (estoque e diluídas) e na fase móvel foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). Os solventes grau HPLC acetonitrila (ACN), isopropanol, metanol (MeOH), e outros solventes como, ácido fosfórico (H₃PO₄), hidróxido de amônio (NH₄OH), ácido clorídrico (HCl) e 1-propanol (99%) foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Os reagentes vinil trimetoxissilano (VTMS, 98%), 2,2-azo-bisisobutironitrilo (AIBN, 98%), 3-sulfopropil metacrilato de potássio (SPM, 98%) e etileno glicol dimetacrilato (EDMA, 98%) foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

As ponteiros LoRetention® e tubo Eppendorf Protein LoBind® foram adquiridos da Eppendorf (Hamburgo, Alemanha).

1.3.2. Soluções padrão e estoque

As soluções padrão estoque dos analitos foram preparadas em solução aquosa de 1% de hidróxido de amônio e acetonitrila contendo 1% de hidróxido de amônio (80:20 v/v). As soluções estoque foram preparadas separadamente (uma para cada analito) na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e armazenadas a -80°C em Eppendorf de 1,5 mL (LoBind). As soluções padrão diluídas contendo todos os analitos foram preparadas, diariamente, a partir da solução estoque (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e armazenadas no sample manager a 10°C .

1.3.3. Preparo da matriz biológica sintética

Durante o desenvolvimento do método analítico, o LCR sintético foi utilizado como matriz substituta ao LCR humano pois os peptídeos A β são substâncias endógenas. Além disso, há na literatura diversos trabalhos que reportam a utilização de LCR sintético como uma matriz substituta ao LCR humano para o desenvolvimento de métodos analíticos [29,120,121]. A compatibilidade entre ambas as matrizes (sintética e humana)

foi avaliada através da infusão pós coluna e o Test T para comparação da inclinação das retas obtidas nas diferentes matrizes.

O preparo do LCR sintético foi baseado em trabalhos da literatura [122]. Para isso foi preparada uma solução contendo: 122 mM de cloreto de sódio (NaCl); 3 mM de cloreto de potássio (KCl); 0,4 mM de fosfato monopotássico (KH₂PO₄); 1,3 mM de cloreto de cálcio (CaCl₂); 25 mM de bicarbonato de sódio (NaHCO₃); 1,2 mM de sulfato de magnésio (MgSO₄) e 0,15% de albumina de soro bovino (BSA). O LCR sintético foi armazenado a - 20°C.

1.3.4. Pré-tratamento da amostra biológica

Em um frasco de eppendorf® LoBind, uma alíquota de 200 µL de LCR sintético contendo 5% plasma de rato foi enriquecida com 40 µL da solução estoque dos analitos, resultando na concentração final de 100 ng mL⁻¹. Em seguida, o Eppendorf foi agitado em vórtex por 60 s e a amostra diluída com 200 µL de uma solução aquosa de ácido fórmico 10%. Após este procedimento, as amostras foram submetidas à técnica in-tube SPME.

1.3.5. Condições UHPLC-MS/MS

As análises UHPLC-MS/MS foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida (Waters Acquity UPLC H-Class) acoplado a espectrometria de massas sequencial triplo quadrupolo (Xevo TQ-D®) - (Waters, Milford, MA, USA), equipado com fonte de ionização por electrospray (ESI) operando em modo positivo.

A separação cromatográfica dos analitos foi realizada utilizando a coluna de fase reversa Acquity UPLC Peptide BEH C18 (150 mm × 2,1 mm × 1,7 µm) mantida a 35°C e com eluição no modo gradiente. A fase móvel da separação cromatográfica foi composta por: (A) solução aquosa contendo 0,3% de hidróxido amônio e (B) acetonitrila, na vazão de 0,2 mL min⁻¹. As determinações quantitativas UHPLC-MS/MS foram realizadas por padronização interna, empregando padrões isotópicos.

As análises MS/MS foram realizadas no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM), em razão da alta seletividade e detectabilidade. A otimização da detecção MS/MS foi feita através de infusão direta de soluções padrão dos analitos preparados em água contendo 0,5% de hidróxido de amônio: acetonitrila contendo 0,5%

de hidróxido de amônio (50:50, v/v). As soluções padrão dos analitos foram preparados isoladamente na concentração de 10 µg mL⁻¹. As condições de ionização estabelecidas foram as seguintes: voltagem do capilar = 3.50kV; temperatura da fonte de ionização = 500°C; gás do cone = 100 L.h⁻¹ (N₂, pureza de 99,9%); gás de dessolvatação = 1000 L.h⁻¹ e 500°C (N₂, pureza de 99,9%); gás de colisão = argônio (pureza 99,9999%). O *dwell time* foi estabelecido automaticamente para cada transição.

Os íons produto de quantificação e confirmação, a energia do cone e a energia de colisão foram determinadas separadamente para cada analito e os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 1. Todos os dados foram adquiridos utilizando o software MassLynx V4.1.

Tabela 1. Transições MS/MS (SRM), voltagem do cone (DP), energia de colisão (CE) e tempo de retenção (tR) dos analitos.

Analito	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	DP (V)	CE (V)	t _R (min)
Aβ38	1033.2	1000.3	45	23	6.68
¹⁵ N ₅₁ -Aβ38 ^b	1046.3	1012.1	45	22	6.68
Aβ40	1082.5	1053.5	55	25	6.91
¹⁵ N ₅₃ -Aβ40 ^b	1096.3	1066.6	45	23	6.91
Aβ42	1128.5	1078.2	55	26	7.07
¹⁵ N ₅₅ -Aβ42 ^b	1142.9	1090.7	50	24	7.07

^a Precursor [M+H]⁴⁺; ^b padrão interno;

1.3.6. Síntese da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos

O procedimento de síntese *in situ* da fase monolítica no interior do capilar de sílica fundida (530 µm de d.i. × 6 cm de comprimento) pode ser dividida em três etapas: (I) ativação dos grupos silanóis; (II) funcionalização da parede interna do capilar; (III) síntese *in situ*.

I. Ativação dos grupos silanóis: o capilar de sílica fundida foi lavado com solução de HCl (0,2 mol L⁻¹), seguido de água ultrapura, solução de NaOH (1 mol L⁻¹), água ultrapura e metanol. Por último, o capilar foi purgado com nitrogênio e seco em estufa a 160 °C por 3 horas.

II. Derivatização da parede interna do capilar: o capilar foi preenchido com uma solução de vinil trimetoxissilano (VTMS), as extremidades do capilar foram seladas com

septo de silicone e o capilar aquecido à 85°C por 2 horas. Posteriormente, o capilar foi lavado com metanol e purgado com nitrogênio [123].

III. Síntese *in situ*: A síntese da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos foi baseada em trabalhos da literatura [87,108] com modificações e otimização das condições de síntese. Os reagentes/solventes utilizados no procedimento de síntese otimizado foram: SPM (monômero funcional), EDMA (agente reticulante), 1-propanol e água (solventes porogênicos) e AIBN (iniciador radicalar).

Em um tubo Eppendorf® de 2,0 mL foram adicionados 0,3306 g de 3-sulfopropil metacrilato (SPM), seguido de 650 µL de 1-propanol, 520 µL de água, 200 µL de etilenodimetacrilato (EDMA) e 16 mg de 2,2'azobisisobutironitrilo (AIBN). Após agitação em vortex por 30 segundos, a mistura reacional foi purgada com nitrogênio por 2 minutos. Com o auxílio de uma microsseringa, a mistura foi inserida no interior do capilar de sílica fundida previamente tratado e purgado com nitrogênio. As extremidades do capilar foram vedadas com septo de silicone e o capilar foi mantido a 60°C por 24 horas para polimerização. Posteriormente, o capilar sintetizado foi lavado com 2 mL de metanol para remoção dos possíveis resíduos de síntese.

1.3.7. Caracterização morfológica e química da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos

A caracterização morfológica foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do Departamento de Química da FFCLRP-USP. Primeiramente, os materiais foram recobertos como ouro e carbono por 120 s em equipamento Bal-Tec SCD 050 Sputter e posteriormente analisados em microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO 50 (Cambridge, UK) e Shimadzu SS-550. Diferentes magnitudes (170X e 10kX) foram avaliadas para melhor elucidar a superfície morfológica do monolito.

A caracterização química foi realizada por espectroscopia vibracional da região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). O espectro de FTIR foi obtido em um equipamento Shimadzu-IR-Prestige-21 com leituras de 400 a 4000 cm⁻¹, utilizando pastilhas de KBr e coletando um ponto a cada 2 cm⁻¹ a 32 varreduras.

O experimento de adsorção/dessorção de nitrogênio foi realizado a 77 K em um analisador Micrometics ASAP 2010. O tratamento dos dados foi realizado pelo método BET [124].

1.3.8. Condições *in-tube* SPME offline

As condições finais do sistema *in-tube* SPME offline que resultaram em extrações com maiores taxas de eficiência foram: uma alíquota de 200 μL de LCR sintético contendo 5% de plasma de rato previamente enriquecida com a solução padrão dos analitos na concentração final de 100 ng mL^{-1} e diluída na proporção 1:1 com solução aquosa de ácido fórmico 10% foi percolada pela fase monolítica para pré-concentrar os analitos. Em seguida, 200 μL da solução de limpeza constituída por $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$, (95:5, v/v) foi percolada para remoção dos interferentes endógenos da matriz biológica. Para a eluição dos analitos, 100 μL da solução constituída por $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH}$ (75:15:10, v/v/v) foi percolada pela fase monolítica. O extrato obtido foi evaporado, reconstituído em 50 μL de fase móvel e 10 μL foram injetados no sistema UHPLC-MS/MS. Por fim, a fase monolítica foi lavada com uma alíquota de 200 μL de solução constituída por $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH}$ (75:15:10, v/v/v) e recondicionada com 200 μL da solução aquosa de ácido fórmico 10% para a próxima análise.

1.3.9. Validação analítica do método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS

A validação analítica do método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS foi realizada segundo as normas da preconizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Resolução RDC N° 27 de 17 de maio de 2012 e RDC N° 166 de 24 de julho de 2017.

Os parâmetros de validação analítica (linearidade, limite de quantificação, precisão intra e intercorridas, exatidão intra e intercorridas, efeito residual e efeito matriz) foram avaliados com amostras de LCR sintético enriquecidas com solução padrão dos analitos em diferentes concentrações e padrões internos marcados isotopicamente, com exceção do efeito residual que utilizou amostras de LCR sintético branco.

As curvas analíticas, sendo uma para cada analito, foram plotadas em diferentes intervalos de concentração (LIQ – 10 ng mL^{-1}). Todas as curvas analíticas foram geradas em quintuplicata, plotando a razão entre as áreas (analito/PI) em função da concentração de cada analito.

As curvas analíticas foram aprovadas para as análises quantitativas, quando o coeficiente de variação (CV) – equação 3 – do calibrador correspondente à concentração nominal no limite inferior de quantificação (LIQ) apresentou valor menor ou iguais a 20%

e quando o CV foi menor que 15% em relação à concentração nominal para os outros calibradores, incluindo o limite superior de quantificação (LSQ).

$$CV = \left[\frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \right] \times 100 \quad (3)$$

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

A exatidão foi determinada em ensaios conduzidos no mesmo dia (exatidão intracorridas) e em ensaios conduzidos em três dias consecutivos (exatidão intercorridas). A exatidão, expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR) – equação 4 – foi avaliada em quintuplicata, sendo que não foram admitidos valores superiores a $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitiu valores superiores a $\pm 20\%$ do valor nominal.

$$EPR = \left[\frac{(\text{Conc. média experimental} - \text{Valor nominal})}{\text{Valor nominal}} \right] \times 100 \quad (4)$$

A avaliação do efeito residual foi realizada com três injeções da mesma amostra branco de referência (amostras de LCR sintético não enriquecidas com a solução padrão dos analitos), sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra de LCR enriquecida com os analitos na concentração correspondente ao LSQ. Segundo as normas da ANVISA, os picos interferentes, nos tempos de retenção dos analitos, devem possuir valores de área inferiores a 20% das áreas correspondentes ao LIQ e inferior a 5% das áreas apresentadas pelo PI [125].

O efeito matriz foi avaliado pelo método de infusão pós-coluna. Nessa análise, a amostra de LCR branco de referência é injetada no sistema cromatográfico (via UHPLC) e ao mesmo tempo, via infusão direta (via MS/MS) um mix de solução padrão contendo todos os analitos. No cromatograma obtido é possível avaliar a influência dos

interferentes da matriz biológica no tempo de retenção dos analitos [125]. O efeito matriz também foi determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares de seis curvas de calibração, sendo 3 curvas construídas em LCR sintético enriquecidas com os analitos e 3 curvas construídas em LCR humano enriquecidas com os analitos. As curvas foram construídas utilizando a mesma faixa linear adotada para os ensaios de linearidade. O paralelismo das retas foi avaliado empregando o Test-t a nível de significância de 0,05.

O fator de enriquecimento foi calculado pela razão entre a quantidade de analitos extraídos pelo capilar (C_{ext}) e a quantidade total de analitos (C_i) injetado no sistema cromatográfico. Onde C_i foi determinado utilizando o método UHPLC-MS/MS e C_{ext} foi determinado utilizando o método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS.

1.3.10. Análise das amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer

Para avaliar a aplicabilidade do método, amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer foram coletadas no Ambulatório de Doenças Extrapiramidais e Neurologia Comportamental do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto sob responsabilidade do Prof, Dr. Vitor Tumas, docente da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Um total de seis amostras foram analisadas pelo método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS. A coleta destas amostras biológicas foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

1.4. Resultados e Discussão

1.4.1. Avaliação das condições MS/MS

O modo de ionização a ser utilizado depende dos tipos de sítios (ácidos ou básicos) que os analitos a serem estudados apresentam. Os peptídeos A β contêm vários resíduos de aminoácidos ácidos, neutros e básicos e apresentam um ponto isoeletrico de aproximadamente 5,2. Portanto, os peptídeos A β podem ionizar-se negativa ou positivamente e produzir espécies com cargas múltiplas. Considerando isso, a fonte de ionização ESI foi avaliada em ambos os modos positivo e negativo, assim como a adição de hidróxido de amônio e ácido fórmico no preparo das soluções padrão de infusão de cada peptídeo. Os espectros de massas obtidos através da infusão direta de solução padrão dos analitos preparados em água contendo 0,5% de hidróxido de amônio: acetonitrila contendo 0,5% de hidróxido de amônio (50:50, v/v) mostraram que a fonte de ionização operando em modo positivo produziu transições mais intensas e por isso a ionização no modo positivo $[M+H]^+$ foi escolhida, assim como reportado por Lame et al. [24]. As transições $[M+4H]$ dos peptídeos A β_{1-38} , A β_{1-40} e A β_{1-42} foram escolhidas para quantificação com base na intensidade do sinal produzido.

Os parâmetros de calibração do espectrômetro de massas foram configurados como segue: Low Mass Resolution 1 = 5.3; High Mass Resolution 1 = 10.0; Low Mass Resolution 2 = 11.4; High Mass Resolution 2 = 10.0; Ion Energy 1 = 0.3; Ion Energy = 0.5; Collision Energy = 5.0.

A distância e altura entre o capilar da fonte ESI e o cone de extração também foram avaliadas para obter maiores sinais analíticos. Foi observado que a uma distância de 5,38 mm e altura de 0,5 mm houve aumento do sinal analítico.

1.4.2. Avaliação das condições cromatográficas

As condições cromatográficas (coluna cromatográfica e fase móvel) foram otimizadas para obtenção de picos simétricos e análise em curto espaço de tempo. Para essas avaliações, foram utilizadas soluções padrão contendo mix dos analitos na concentração de 100 ng mL⁻¹ preparadas na fase móvel.

(a) Fase estacionária

Foram avaliadas um total de sete diferentes colunas cromatográficas com diferentes tecnologias e características físicas (comprimento, diâmetro interno e tamanho de partícula). São elas: (a) Acquity UPLC BEH C18 ($2,1 \times 50$ mm e $1,7 \mu\text{m}$), (b) Acquity UPLC BEH C4 ($2,1 \times 50$ mm e $1,7 \mu\text{m}$), (c) Acquity UPLC CSH C18 ($2,1 \times 100$ mm e $1,7 \mu\text{m}$), (d) XSelect CSH C18 ($2,1 \times 100$ mm e $2,5 \mu\text{m}$), (e) Cortecs C18+ ($2,1 \times 100$ mm e $2,7 \mu\text{m}$), (f) Acquity UPLC BEH Amide ($2,1 \times 100$ mm e $1,7 \mu\text{m}$) e (g) Acquity UPLC Peptide BEH C18 ($2,1 \times 150$ mm e $1,7 \mu\text{m}$). A temperatura da coluna e as composições de fase móvel foram avaliadas respeitando as orientações de cada fabricante.

Para fins de comparação entre as colunas com diferentes comprimentos e tamanhos de partículas, utilizamos a equação de Van Deemter (equação 2, item 1.1.4).

Quando comparadas com as partículas totalmente porosas (XSelect CSH C18 – $2,1 \times 100$ mm e $2,5 \mu\text{m}$), as partículas superficialmente porosas (Cortecs C18+ – $2,1 \times 100$ mm e $2,7 \mu\text{m}$) apresentam maior densidade, e conseqüentemente uma maior homogeneidade da estrutura do leito cromatográfico, resultando em uma diminuição do termo A da equação de Van Deemter e também na menor pressão do sistema cromatográfico [126]. Além do melhor empacotamento, as partículas superficialmente porosas possuem número reduzido de poros, diminuindo o comprimento do caminho de difusão e reduzindo a contribuição do termo C, devido a transferência de massas mais rápida.

Os termos A e C da equação de Van Deemter dependem diretamente do diâmetro da partícula. De modo que quando comparamos duas colunas totalmente porosas com diferentes tamanhos de partículas (Acquity UPLC CSH C18 – $2,1 \times 100$ mm e $1,7 \mu\text{m}$; e XSelect CSH C18 – $2,1 \times 100$ mm e $2,5 \mu\text{m}$) a redução do tamanho da partícula aumentou a eficiência de separação. Em contrapartida, a coluna empacotada com partículas menores apresentou menor permeabilidade e conseqüentemente maiores pressões no sistema cromatográfico.

Quando comparamos duas colunas de fase reversa contendo cadeias alquílicas de diferentes tamanhos (Acquity UPLC BEH C18 – $2,1 \times 50$ mm e $1,7 \mu\text{m}$; e Acquity UPLC BEH C4 – $2,1 \times 50$ mm e $1,7 \mu\text{m}$), observamos que além de maior tempo de análise, o fator de retenção também aumentou em função da maior densidade da cadeia alquila devido a maior hidrofobicidade da fase estacionária [127].

Por fim, a coluna cromatográfica mais adequada para a análise dos peptídeos A β foi a coluna Acquity UPLC Peptide BEH C18 (2,1 \times 150 mm e 1,7 μ m). Esta coluna foi especialmente desenvolvida para a separações de peptídeos, possui poro largo (300Å), é tri funcionalmente ligada e estável em ampla faixa de pH (1 – 12).

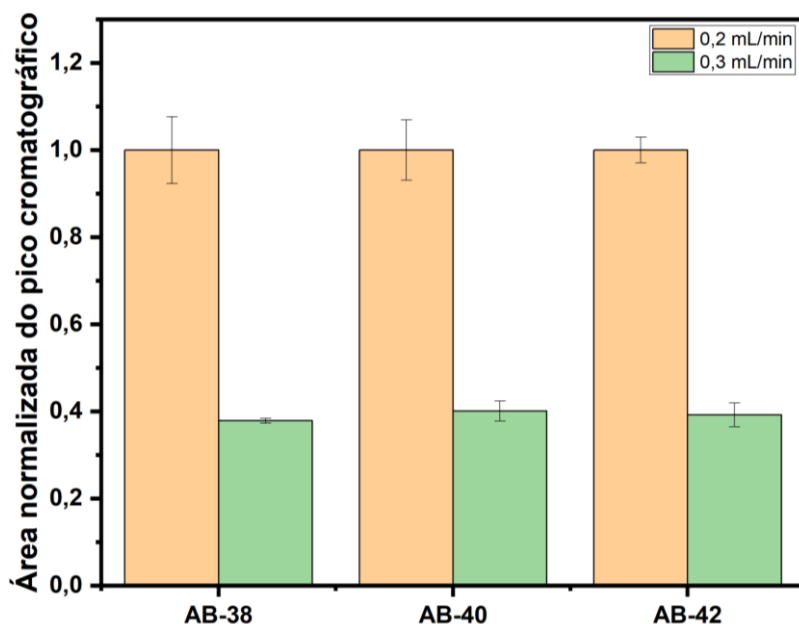
(b) Fase móvel

Para a otimização da fase móvel foi avaliada a adição de hidróxido de amônio em diferentes concentrações (0,1 a 0,3%) como aditivo, com o objetivo de favorecer o processo de ionização dos analitos (através do ajuste do pH do meio) e interações com a fase estacionária. O modo de eluição (isocrático e gradiente) e a vazão (mL min⁻¹) da fase móvel também foram parâmetros avaliados.

O primeiro parâmetro avaliado na otimização da fase móvel foi a separação dos analitos em modo isocrático e gradiente. Inicialmente foram avaliadas diferentes condições isocráticas de fase móvel composta por (A) água + 0,3% hidróxido de amônio e (B) acetonitrila nas seguintes proporções: 90:10, 80:20, 70:30, 75:35, 60:40 e 50:50 (v/v). Foi observado que em todas as condições isocráticas avaliadas os analitos foram eluídos no volume morto da coluna, ou seja, não houve retenção dos analitos na fase estacionária. Posteriormente diferentes gradientes de eluição com diferentes composições de fase móvel foram avaliados. O gradiente de eluição descrito a seguir resultou em melhor separação cromatográfica, picos mais finos e simétricos: 10%B (0-1min), 10-45%B (1-6,5 min), mantido a 45%B por 5,5 min e 45-10%B por 2 min.

Em seguida, a vazão da fase móvel foi avaliada pois este parâmetro influencia diretamente na ionização por ESI (Figura 3). O aumento da vazão de 0,2 mL min⁻¹ para 0,3 mL min⁻¹ pode dificultar o processo de formação de íons na fase gasosa diminuindo assim a sensibilidade do equipamento. Dessa forma, ficou estabelecido a vazão de 0,2 mL min⁻¹ de fase móvel.

Figura 3. Avaliação da influência da vazão (mL/min) da fase móvel (água + 0,1% hidróxido de amônio: acetonitrila, 90:10, v/v) nas condições UHPLC-MS/MS.

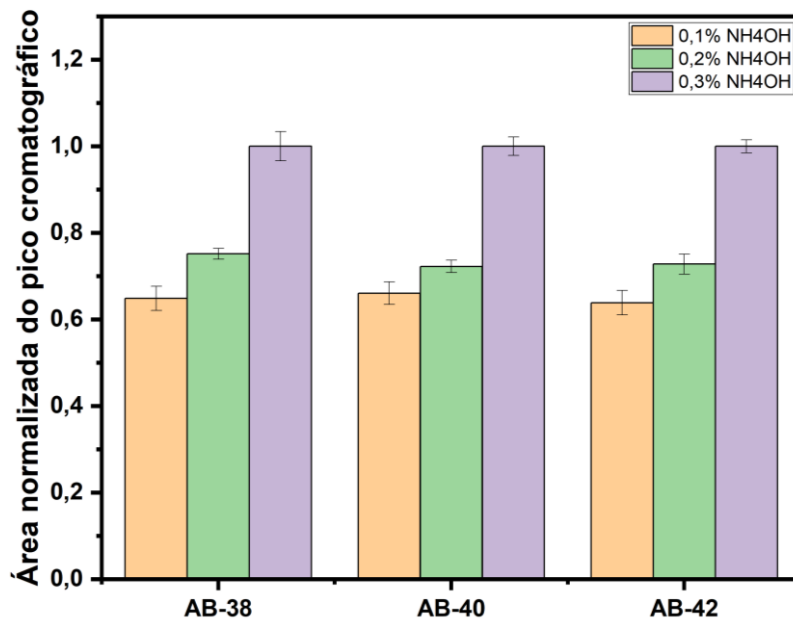


Fonte: Próprio autor.

A concentração do aditivo hidróxido de amônio (NH_4OH) na fase móvel também foi avaliada. Para determinar a melhor concentração deste aditivo foram avaliados as áreas e o formato dos picos cromatográficos dos analitos nas concentrações de 0,1 a 0,3% (Figura 4). De acordo com os valores obtidos pode-se concluir que a adição de 0,3% de hidróxido de amônio na fase móvel resultou nos maiores valores de áreas para todos os analitos.

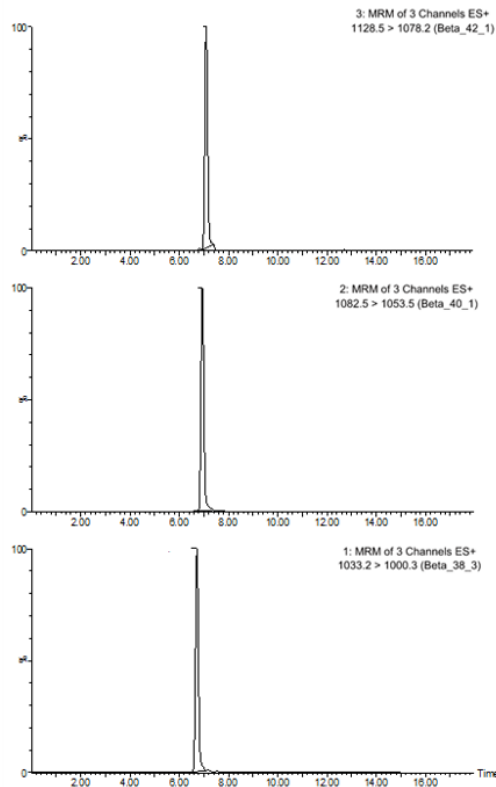
Portanto, conclui-se que a melhor condição de separação cromatográfica foi obtida utilizando a coluna cromatográfica Acquity UPLC BEH Peptide C18 ($2,1 \times 150$ mm e $1,7 \mu\text{m}$) mantida a temperatura de 35°C , fase móvel constituída por (A) água + 0,3% NH_4OH e (B) acetonitrila com vazão de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ e eluição por gradiente (Figura 5).

Figura 4. Avaliação da influência da concentração de hidróxido de amônio na fase móvel.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5. Cromatograma de íons totais (TIC) dos peptídeos AB nas condições cromatográficas otimizadas.



Fonte: Próprio autor.

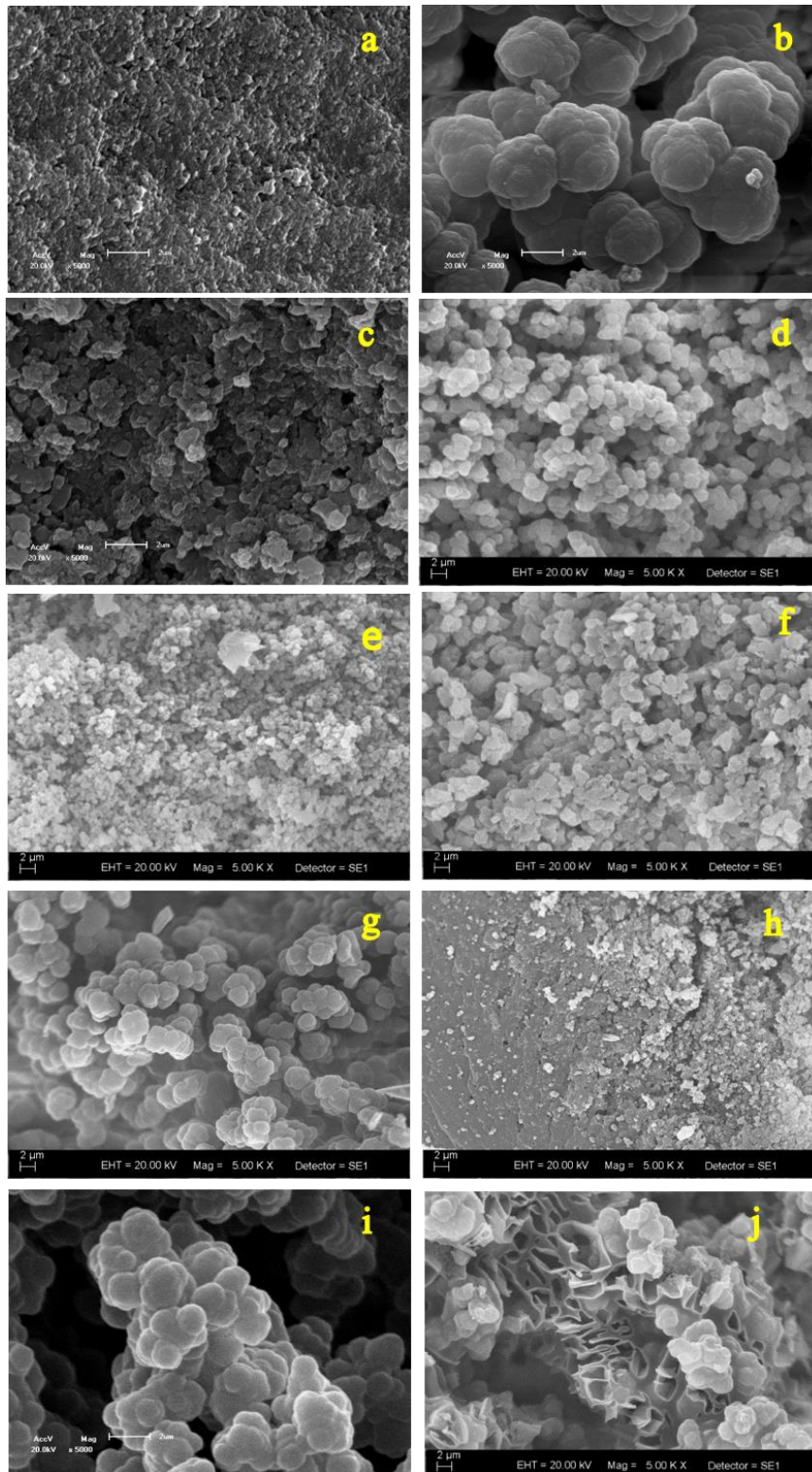
1.4.3. Síntese da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos

A otimização da síntese da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos considerou diversos parâmetros como: (a) superfície de suporte; (b) monômero funcional; (c) natureza e proporção dos solventes porogênicos; (d) tempo e temperatura de polimerização; (e) razão molar monômero funcional/agente reticulante; (f) porcentagem de solvente porogênico na mistura reacional; (g) porcentagem de iniciador radicalar; (h) agente reticulante.

A otimização da etapa de síntese avaliou a permeabilidade, a caracterização morfológica através de imagens MEV (Figura 6) e a capacidade de extração das fases monolíticas sintetizadas nas diferentes condições.

A permeabilidade está relacionada com a presença de poros na estrutura monolítica, portanto a permeabilidade das fases monolíticas sintetizadas nas diferentes condições de síntese foi avaliada a partir da pressão (psi) obtida no seguinte sistema: o capilar contendo a fase monolítica foi acoplado a válvula de injeção de um equipamento LC e com auxílio de uma bomba peristáltica, um solvente (metanol) foi percolado a uma vazão constante de $0,08 \text{ mL min}^{-1}$.

Figura 6. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura. Avaliação das diferentes condições de síntese: (a) Fase monolítica 1.0; (b) Fase monolítica 6.0; (c) Fase monolítica 8.0; (d) Fase monolítica 6.2; (e) Fase monolítica 6.3; (f) Fase monolítica 6.4; (g) Fase monolítica 6.7; (h) Fase monolítica 6.9; (i) Fase monolítica 6.10; (j) Fase monolítica 6.11.

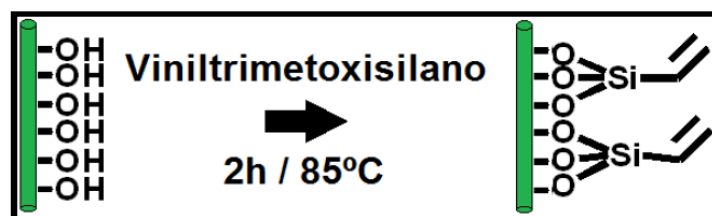


Fonte: Próprio autor.

a) Suporte

Dependendo das dimensões e da natureza química da superfície do suporte em que a síntese é realizada, ligações podem ser estabelecidas entre a estrutura do monólito e a superfície do material utilizado como suporte. No presente trabalho, a síntese da fase monolítica foi realizada *in situ*, ou seja, no interior de capilares de sílica fundida recoberto com uma camada de poliimida. A Figura 7 ilustra as etapas de ativação dos grupos silanóis (à esquerda) e a derivatização da parede interna do capilar (à direita) realizadas previamente à etapa de síntese. A primeira etapa consistiu no tratamento da superfície interna do capilar de sílica para ativação dos grupos silanóis. Na segunda etapa, moléculas do precursor viniltrimetoxissilano (VTMS) reagem com os grupos silanóis da superfície da sílica, via reações de condensação, formando ligações siloxano que servirão como pontos de ancoragem para as reações de polimerização da fase monolítica orgânica sintetizada *in situ* [123,128].

Figura 7. Etapas de ativação (esquerda) e derivatização (direita) das paredes internas do capilar de sílica fundida previamente tratado.



Fonte: Reproduzido de Marchioni (2019) [60]

b) Monômero funcional

Os monômeros funcionais mais utilizados na síntese de fases monolíticas orgânicas são a base de estireno, acrilatos, metacrilatos, acrilamidas e metacrilamidas [129]. Neste trabalho, um monômero funcional a base de metacrilato com grupos sulfônicos foi escolhido devido seu caráter de trocador de cátions.

c) Natureza e proporção dos solventes porogênicos

Os solventes porogênicos são responsáveis por gerar poros na estrutura monolítica de modo a garantir a passagem de fase móvel na fase monolítica sem o aumento

considerável da pressão do sistema. Também são responsáveis por solubilizar os reagentes de síntese e formar uma solução homogênea.

Portanto, a solubilidade do monômero funcional, agente reticulante e iniciador radical foi avaliada na presença de diferentes solventes: água, dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrila (ACN), metanol, etanol, etileno glicol, 1,4-butanodiol e 1-propanol. Testes qualitativos mostraram que os solventes DMSO, ACN e etanol não solubilizaram completamente os reagentes de síntese e por isso não seguiram nas próximas etapas de otimização.

Estudos prévios publicados na literatura demonstram que fases monolíticas preparadas com um único solvente porogênico apresentam baixa estabilidade mecânica, o que não ocorre quando um sistema binário ou terciário de solvente porogênio é utilizado [94]. Dessa maneira, o próximo parâmetro avaliado foi a influência de diferentes pares de solventes porogênicos na permeabilidade das fases monolíticas sintetizadas. Os pares de solventes etileno glicol + metanol, 1-propanol + água e etileno glicol + 1-propanol foram capazes de solubilizar completamente os reagentes de síntese e resultaram em fases monolíticas após a polimerização a 60°C por 24 horas. A fase monolítica sintetizada a partir da combinação de 1-propanol + água (fase monolítica 6.0 – Figura 6b), apresentou maior permeabilidade do que as fases monolíticas sintetizadas a partir das combinações etileno glicol + metanol (fase monolítica 1.0 – Figura 6a) e etileno glicol + 1-propanol (fase monolítica 8.0 – Figura 6c). Portanto, a combinação de 1-propanol e água (fase monolítica 6.0) foi selecionada como a melhor opção de par de solvente porogênico.

Mantendo constante a porcentagem de 1-propanol e água na mistura reacional (76% em relação a massa dos monômeros), a proporção (%m/m) de cada solvente porogênico na solução de síntese também foi avaliada pois este parâmetro afeta diretamente a porosidade da fase monolítica. Nesse caso, a água atua como um solvente macro porogênico, enquanto que o 1-propanol atua como um solvente micro porogênico. Assim, o aumento da proporção de água de 50% (fase monolítica 6.0) para 58% (fase monolítica 6.1) aumentou a permeabilidade da fase monolítica (menor pressão do sistema analítico), mas também acarretou na perda da estabilidade mecânica. Por outro lado, o aumento da proporção de 1-propanol de 50% (fase monolítica 6.0) para 58% (fase monolítica 6.2 – Figura 6d) diminuiu a permeabilidade da fase monolítica, o que conseqüentemente levou a maiores pressões no sistema analítico. Portanto, a proporção entre os solventes porogênicos 1-propanol e água ficou estabelecida em 50% m/m.

d) Condições de polimerização

O tempo e a temperatura de polimerização também foram otimizados pois estes parâmetros afetam diretamente a área superficial e a estrutura interna do monolito formado.

A diminuição do tempo de polimerização de 24h (fase monolítica 6.0) para 10h (fase monolíticas 6.3 – Figura 6e) resultou em um monolito com baixa permeabilidade pois nessa condição, as reações de polimerização ocorrem sob condições de conversão incompletas.

Duas diferentes temperaturas de polimerização também foram avaliadas. O aumento da temperatura de polimerização de 60°C (fase monolítica 6.0) para 85°C (fase monolítica 6.4 – Figura 6f) resultou na formação de um monolito com menor permeabilidade, uma vez que em temperaturas mais elevadas a velocidade de polimerização é maior e, conseqüentemente a formação de poros menores e mais densos é favorecida.

Portanto a otimização prosseguiu mantendo a polimerização por 24 h a 60°C.

e) Razão molar agente reticulante/monômero funcional

Diferentes razões molares entre o monômero funcional (SPM) e o agente reticulante (EDMA) foram avaliadas.

O aumento da razão molar entre EDMA/SPM de 1,18 para 1,58 ou 1,97 (fases monolíticas 6.0, 6.5 e 6.6, respectivamente) levou à diminuição da permeabilidade da fase monolítica. Isso ocorre porque o uso de maiores quantidades de agente reticulante produz alto grau de reticulação e conseqüentemente a diminuição da permeabilidade [74]. Por outro lado, quando a razão molar entre EDMA/SPM diminuiu de 1,18 para 0,79 ou 0,39 (fases monolíticas 6.0, 6.7 e 6.8, respectivamente) a permeabilidade da fase monolítica aumentou e a pressão do sistema analítico diminuiu. Embora alta permeabilidade e baixa pressão do sistema cromatográfico sejam fatores altamente desejáveis na síntese de fases monolíticas, baixas razões molares entre monômero funcional e agente reticulante é acompanhada pela perda de estabilidade mecânica. Dessa forma, a razão molar entre EDMA/SPM igual a 0,79 (fase monolítica 6.7 – Figura 6g) foi escolhida para dar prosseguimento na síntese pois apresentou baixa pressão e possui razão molar adequada para a sorção dos analitos sem a perda da estabilidade mecânica.

f) Porcentagem de solvente porogênico na mistura reacional

Em um segundo momento foi avaliado a influência da concentração do par de solventes porogênicos na mistura reacional. Vale ressaltar que a proporção entre os dois solventes porogênicos (água e 1-propanol) foi mantida constante (50%) como já foi discutido anteriormente.

Quando a concentração do par de solventes porogênicos foi diminuída de 76% para 53% (fase monolítica 6.9 – Figura 6h), a pressão do sistema analítico aumentou consideravelmente. Em contraste, quando a concentração do par de solventes porogênicos aumentou de 76% para 87% (fase monolítica 6.10 – Figura 6i) a permeabilidade aumentou. Dessa forma, ficou estabelecido que a concentração ideal do par de solventes porogênicos na mistura reacional é 87%.

g) Iniciador radicalar

O iniciador radicalar AIBN foi escolhido por apresentar alta eficiência nas polimerizações radicalares, baixo custo e permite o uso de condições brandas de síntese [94]. Durante esta etapa de otimização da síntese, foram avaliadas duas concentrações (1% e 3%) de iniciador radicalar em relação a massa total do monômero funcional + agente reticulante. Foi observado que a reação de polimerização não ocorreu de forma significativa se utilizado menores quantidades de AIBN (fase monolítica 6.11 – Figura 6j). Dessa maneira, ficou estabelecido o uso de 3% de AIBN na mistura reacional.

h) Agente reticulante

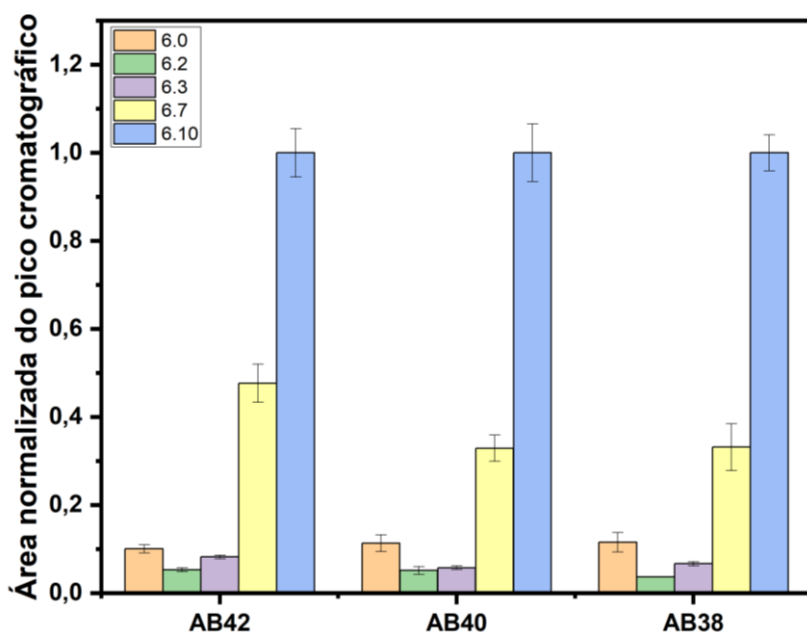
O agente reticulante é responsável por fornecer estabilidade mecânica à matriz polimérica e auxilia no controle da morfologia. A natureza do agente reticulante também influencia na estrutura química e morfológica do monolito resultante. Fases monolítica sintetizadas utilizando etilo glicol dimetacrilato (EDMA) como agente reticulante possuem um número significante de mesoporos [130].

Foram avaliados três diferentes agentes reticulantes, sendo eles EDMA, DVB e PEGDA. Foi observado que a pressão do sistema analítica foi consideravelmente menor quando EDMA foi utilizado como agente reticulante.

Dessa forma as condições finais de síntese da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos denominada poli (SPM-co-EDMA) ficaram estabelecidas da seguinte maneira: capilar com 6 cm de comprimento; monômero funcional SPM (0,3306g); iniciador radicalar AIBN (3%, 0,018g); agente reticulante EDMA (0,2 mL); água e 1-propanol como solventes porogênicos (520 μ L e 650 μ L) e polimerização a 60°C por 24 horas.

A capacidade de extração das fases monolítica 6.0, 6.2, 6.3, 6.7 e 6.10 foi avaliada (Figura 8). Algumas fases monolíticas não puderam ter sua capacidade de sorção avaliadas devido a fragilidade e/ou a baixa permeabilidade dos materiais sintetizados. A síntese que apresentou melhor desempenho (capacidade de sorção e permeabilidade) foi a fase monolítica 6.10 – poli (SPM-co-EDMA). As etapas seguintes consistiram na caracterização química e morfológica da fase poli (SPM-co-EDMA).

Figura 8. Avaliação da capacidade de extração das diferentes fases monolíticas sintetizadas.



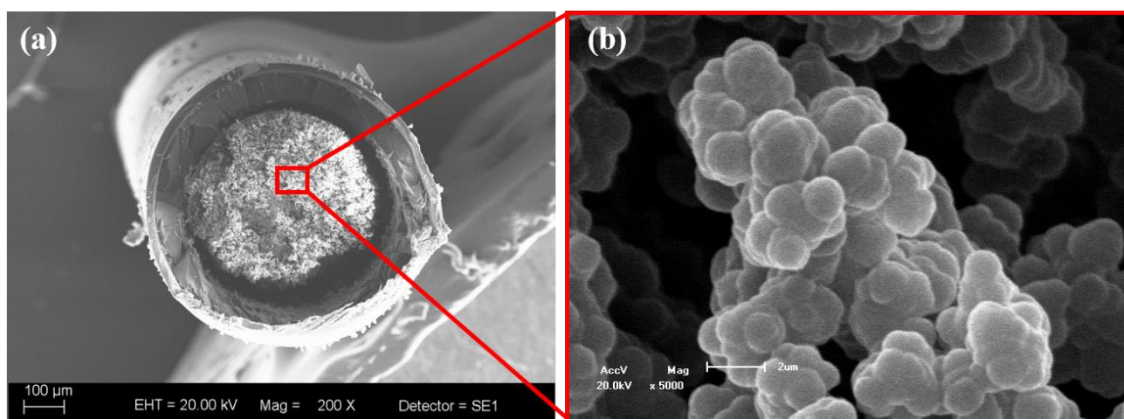
Fonte: Próprio autor.

1.4.4. Caracterização da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos

A morfologia e o encolhimento após a etapa de secagem foram avaliados através das imagens MEV abaixo. A Figura 9 ilustra o corte seccional do capilar contendo a fase monolítica poli (SPM-co-EDMA) com diferentes magnitudes de ampliação. Podemos

observar que a fase monolítica apresentou estrutura homogênea e porosa, formando uma rede contínua. Adicionalmente, a estrutura monolítica permaneceu ligada à superfície interna do capilar.

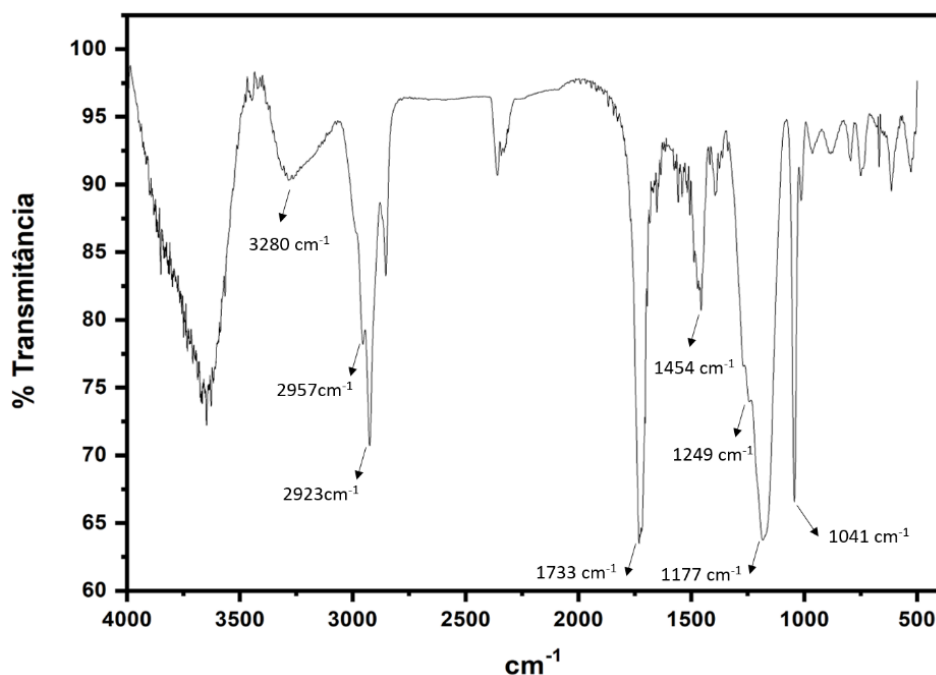
Figura 9. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura da fase monolítica poli (SPM-co-EDMA): (a) Mag = 170X; (b) 10 kX.



Fonte: Próprio autor.

A caracterização química da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos denominada Poli SPM-co-EDMA foi realizada por espectroscopia vibracional da região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Para obtenção do espectro, uma pequena porção da fase monolítica foi macerada juntamente com pastilha de KBr. A Figura 10 representa o espectro de FTIR obtido da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos. Ligações de C-O do grupo ésteres, que são provenientes do agente reticulante (EDMA) estão presentes na região de 1249 cm^{-1} (ligação simétrica) e 1177 cm^{-1} (ligação assimétrica) [60]. As bandas em 2957 cm^{-1} e 2923 cm^{-1} são referentes as ligações C-H assimétrica e simétrica, respectivamente [131–133]. A banda em 1454 cm^{-1} indica a presença de carbonos sp^3 ligados a hidrogênio [134]. A banda presente em 3280 cm^{-1} indica a presença de grupos hidroxila (O-H) proveniente de água adsorvida no material. A banda em 1733 cm^{-1} indica a presença de ligações carbonila (C=O) [134]. A banda em 1041 cm^{-1} corresponde a vibração assimétrica do grupo SO_3 proveniente do monômero funcional (SPM) [135]. Portanto, o espectro de FTIR confirmou a incorporação de ambos os monômeros, etilenoglicol dimetacrilato (EDMA) e sulfopropil metacrilato (SPM) na estrutura da fase monolítica orgânica.

Figura 10. Espectro FTIR da fase monolítica poli (SPM-co-EDMA).



Fonte: Próprio autor.

A fase monolítica poli (SPM-co-EDMA) também foi analisada através de experimentos de adsorção/dessorção de nitrogênio com o objetivo de se ter acesso a informações importantes a respeito da porosidade do material sintetizado. A área superficial (S_{BET}) foi calculada pelo método BET [124] a partir das isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e os resultados obtidos indicam que a fase monolítica possui área superficial de $8,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

1.4.5. Avaliação da etapa de pré-tratamento da amostra

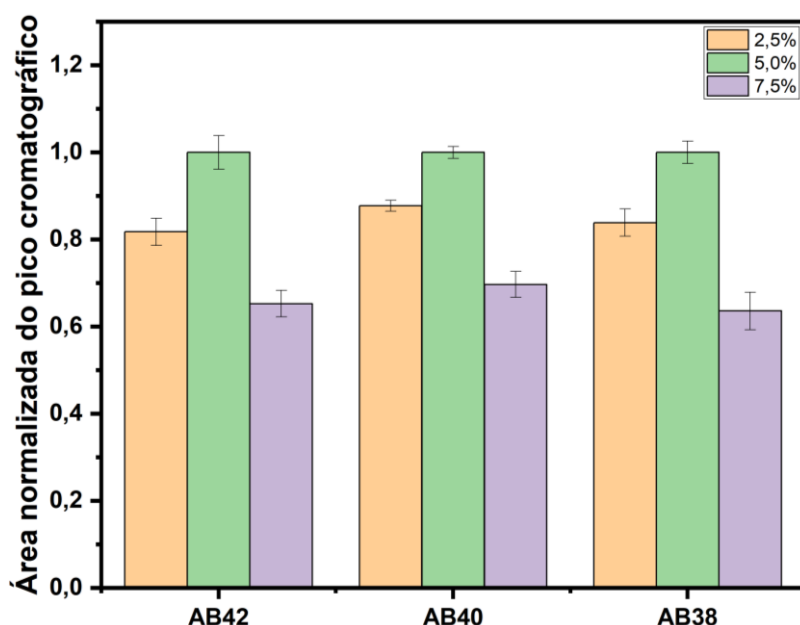
As estruturas dos peptídeos A β encontrados nos ratos (rA β 1-42) são diferentes das estruturas dos peptídeos A β dos humanos, em razão das três mutações de aminoácidos (R5G, Y10F, H13R). Dessa forma, os peptídeos rA β 1-42 não interferem nas transições MS/MS dos peptídeos A β humanos.

Na etapa de preparo de amostra avaliamos a adição de diferentes porcentagens de plasma de rato na amostra de LCR. Este procedimento favorece a ligação da albumina humana aos peptídeos presentes no plasma de rato (rA β 1-42) e diminuiu a ligação dos

peptídeos A β (humano) com albumina do LCR, deixando-os livres e favorecendo a sensibilidade do método.

A adição de diferentes porcentagens de plasma de rato à amostra de LCR sintético foi avaliada e a melhor eficiência de extração foi obtida com a adição de 5% de plasmas de rato à amostra de LCR (Figura 11).

Figura 11. Avaliação da porcentagem de plasma de rato adicionado à matriz de LCR sintético.



Fonte: Próprio autor.

1.4.6. Avaliação das condições *in-tube* SPME *offline*

O sistema *in-tube* SPME *offline* foi montado da seguinte maneira: o capilar contendo a fase monolítica orgânica sintetizada foi conectado ao injetor de um equipamento LC. Com o injetor na posição “carregar” a amostra preenche o *loop* (200 μ L), e em seguida, com a válvula na posição “injetar”, a amostra é carregada com o auxílio de uma bomba peristáltica (vazão de 0,1 mL min^{-1}) para dentro do capilar onde são realizadas as etapas de pré-concentração e eluição dos analitos.

Para a otimização das condições *in-tube* SPME, foi utilizado como fase extratora a fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos descrita no item 1.5.6 e as amostras de

LCR sintético contendo 5% de plasma de rato foram enriquecidas com a solução padrão dos analitos e diluídas 1:1 com solução ácida.

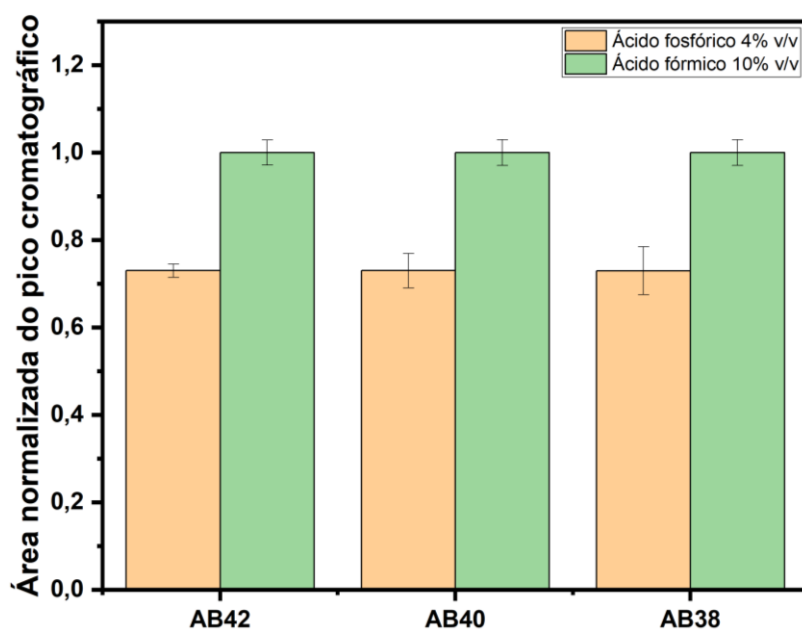
Visando a melhor eficiência de extração, as seguintes condições *in-tube* SPME foram otimizadas: (a) pH e volume de amostra; (b) limpeza da fase; (c) eluição dos analitos. Os experimentos foram avaliados de forma uni variada e as melhores condições de extração foram escolhidas de acordo com as áreas normalizadas dos picos cromatográficos obtidas durante a otimização das variáveis.

a) pH da amostra

O pH da amostra é um dos principais fatores que influenciam na ionização dos analitos. Por isso, é necessário considerar dois fatores: (1) a fase monolítica orgânica sintetizada neste trabalho é uma fase trocadora de cátions e (2) os peptídeos A β possuem ponto isoelétrico de aproximadamente 5,2 devido aos resíduos ácido, básico e neutro presentes em sua estrutura química. Dessa forma, em condições de pH ácido, os peptídeos A β estarão ionizados positivamente, podendo interagir com os grupos sulfônicos da fase extratora através das interações eletrostáticas entre os analitos carregados positivamente e os grupos sulfônicos carregados negativamente. Adicionalmente, interações hidrofílicas e hidrofóbicas também podem ocorrer.

Recentemente um artigo publicado na literatura demonstrou a baixa eficiência de extração desses analitos em meio básico ou neutro [25]. Portanto, optamos por avaliar a extração de peptídeos A β utilizando diferentes soluções ácidas (ácido fórmico 10% e ácido fosfórico 4%) na diluição da amostra. Os resultados obtidos na Figura 12 mostram que as extrações realizadas com a amostra de LCR diluída em uma solução de ácido fórmico 10% resultaram na melhor eficiência de extração.

Figura 12. Avaliação da solução ácida utilizada na diluição da amostra de LCR sintético.

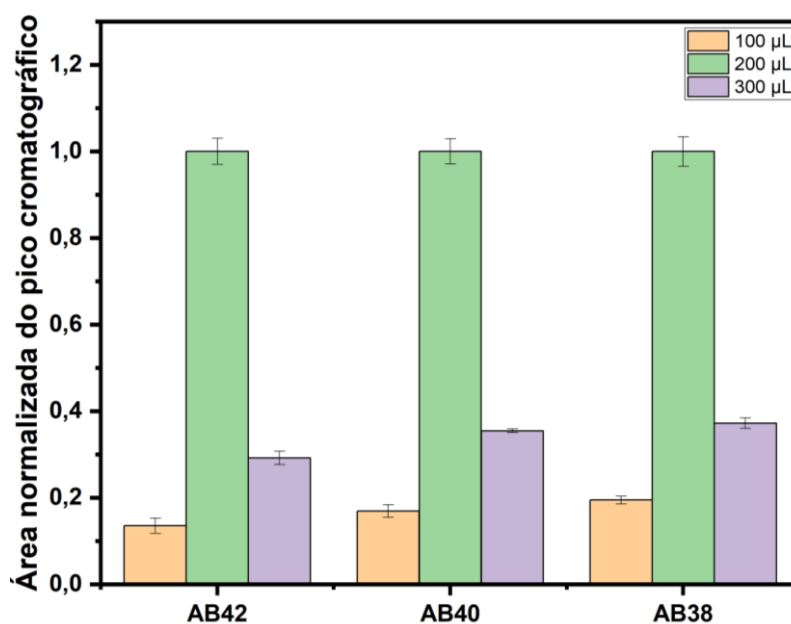


Fonte: Próprio autor.

b) Volume da amostra

Diferentes volumes de LCR sintético (100, 200 e 300 μL) diluído na proporção 1:1 com a solução de ácido fórmico 10% foram avaliados. O aumento do volume de amostra de 100 para 200 μL proporcionou maior eficiência de extração. Em contrapartida, volumes superiores a 200 μL o efeito da matriz foi mais pronunciado e a eficiência de extração prejudicada (Figura 13).

Figura 13. Avaliação da influência do volume de amostra na eficiência de extração.



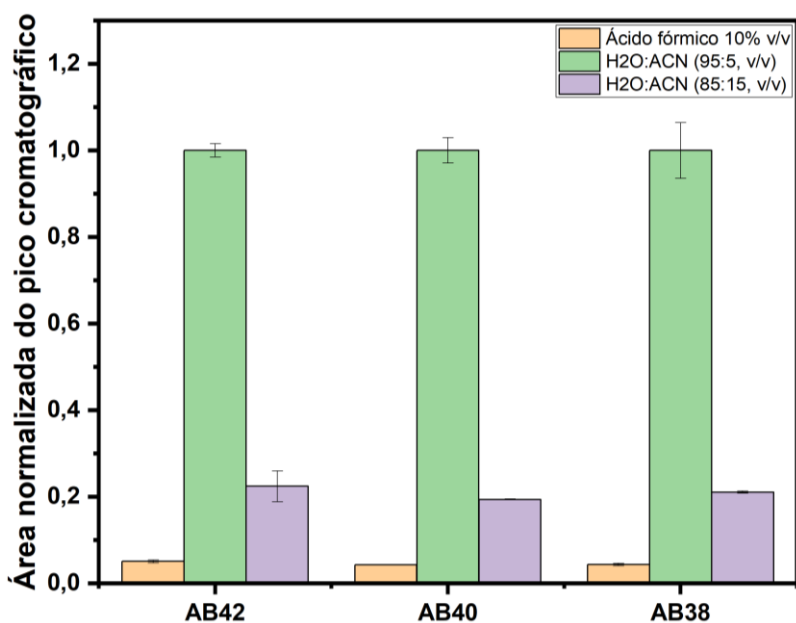
Fonte: Próprio autor.

c) Limpeza da fase extratora

A matriz biológica LCR possui interferentes endógenos (proteínas e fosfolipídios) que podem ficar retidos na fase extratora, e posteriormente coleir com os analitos, suprimindo o sinal analítico durante as análises cromatográficas. Portanto, a etapa de limpeza é necessária após a etapa de sorção dos analitos na fase extratora e antes da etapa de eluição dos analitos, para promover a exclusão dos interferentes endógenos da matriz biológica.

Dentre as diferentes soluções de limpeza avaliadas (Figura 14), a solução aquosa de ácido fórmico 10% (v/v) não foi considerada uma escolha adequada já que esta solução foi utilizada na etapa de pré-concentração dos analitos na fase monolítica. Por outro lado, o solvente orgânico acetonitrila é comumente utilizado nesta etapa de limpeza devido a sua polaridade média que promove a exclusão de macromoléculas interferentes. No entanto, neste estudo, a acetonitrila também foi usado para realizar a eluição dos analitos (parâmetro a ser discutido no próximo item). Assim, observou-se que uma solução aquosa contendo 5% de acetonitrila é capaz de reduzir as interferências da matriz sem eluir os peptídeos A β , enquanto que o aumento na porcentagem de acetonitrila na solução de limpeza promoveu a eluição parcial dos analitos na etapa de limpeza.

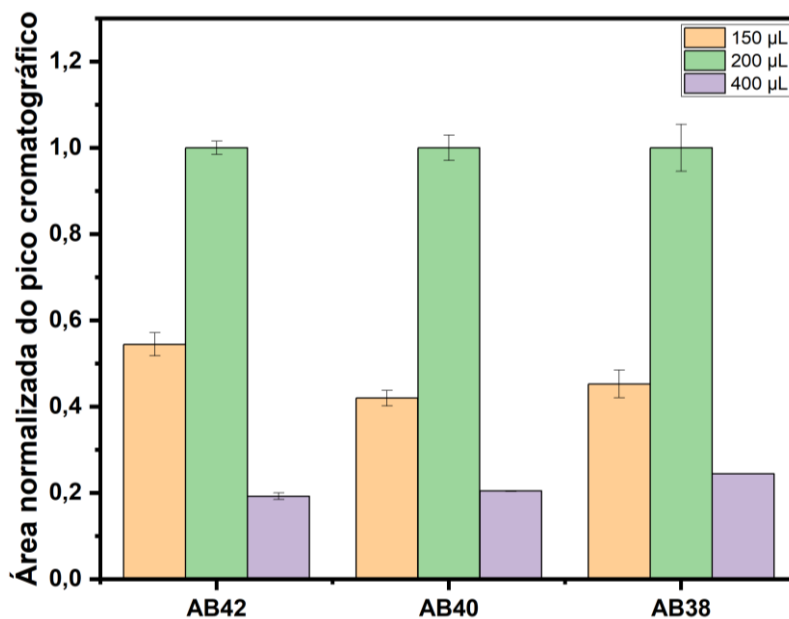
Figura 14. Avaliação da influência da solução de limpeza na eficiência de extração.



Fonte: Próprio autor.

Em seguida diferentes volumes (150, 200 e 400 μL) da solução de limpeza composta por H₂O:ACN (95:5, v/v) foram avaliados (Figura 15). O aumento do volume de solução de limpeza de 150 μL para 200 μL aumentou a eficiência de extração (maior exclusão dos interferentes). No entanto, volumes maiores favoreceram não somente eluição das macromoléculas, mas também dos analitos, diminuindo assim a eficiência de extração. Portanto, o volume de 200 μL da solução H₂O:ACN (95:5, v/v) foi selecionado para dar prosseguimento.

Figura 15. Avaliação da influência do volume da solução de limpeza na eficiência de extração.

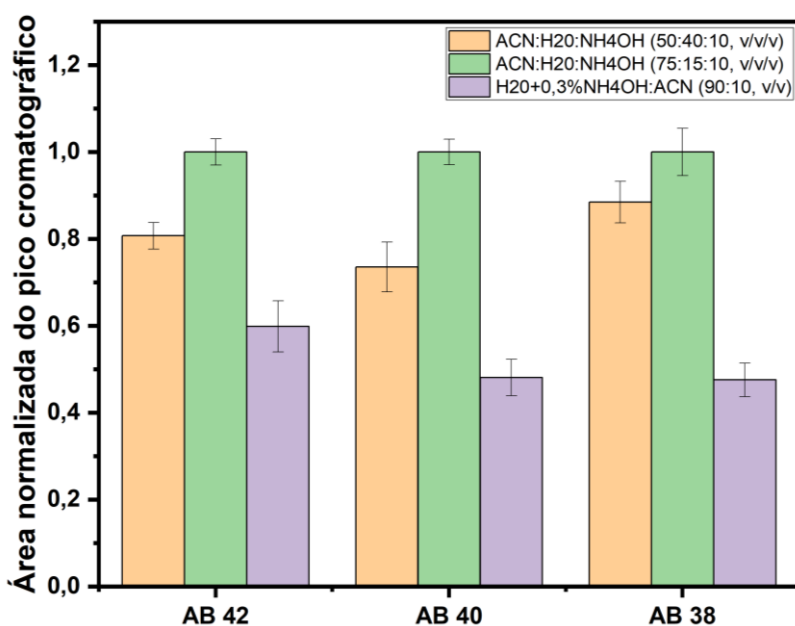


Fonte: Próprio autor.

d) Eluição dos analitos

A solução utilizada para esta etapa foi escolhida de modo a garantir a eluição quantitativa dos analitos e evitar o efeito memória. Para isso foram avaliadas três diferentes soluções de eluição: (1) água + 0,3% de hidróxido de amônio/acetoneitrila (90:10, v/v); (2) acetoneitrila/água/hidróxido de amônio concentrado (50:40:10, v/v/v) e (3) acetoneitrila/água/hidróxido de amônio concentrado (75:15:10, v/v/v). Conforme mostrado na Figura 16, a solução de eluição contendo maior porcentagem de acetoneitrila foi capaz de eluir uma maior fração dos analitos.

Figura 16. Avaliação da influência da solução de eluição na eficiência de extração.



Fonte: Próprio autor.

e) Limpeza e condicionamento

Baseado nos resultados apresentados no item anterior durante a seleção da solução de eluição dos analitos, a solução composta por ACN:H₂O:NH₄OH (75:15:10, v/v/v) foi selecionada também como solução de limpeza entre as extrações, visto que esta mistura resultou na melhor condição de eluição. Esta etapa é importante para reduzir o efeito memória entre as extrações.

A etapa de condicionamento da fase monolítica também é importante para que a fase monolítica esteja na mesma condição em que será feita a sorção dos analitos (etapa inicial da extração).

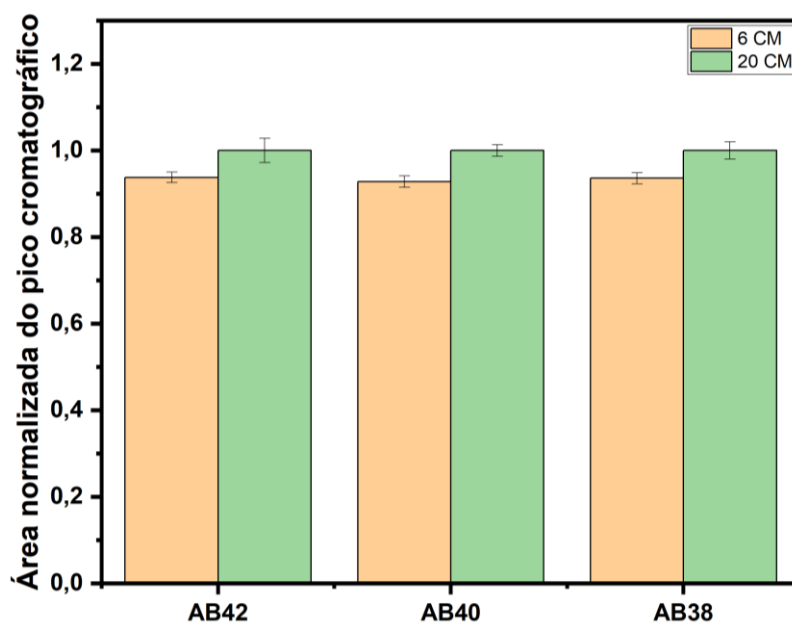
Portanto, a etapa de limpeza da fase monolítica realizada com uma alíquota de 200 µL de uma solução constituída de ACN:H₂O:NH₄OH (75:15:10, v/v/v) e condicionada com uma alíquota de 200 µL da solução de ácido fórmico 10%.

f) Comprimento do capilar

Por fim, o comprimento do capilar contendo a fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos também foi avaliado (Figura 17). O aumento no comprimento do capilar permitiu um leve aumento na capacidade de extração (devido a presença de maior

quantidade de fase estacionária), mas o tempo de extração e a pressão do sistema *in-tube* SPME também aumentaram consideravelmente. Portanto, optamos por seguir com o capilar de 6 cm de comprimento.

Figura 17. Avaliação da influência do comprimento do capilar monolítico na eficiência de extração.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 18 a seguir ilustra as condições *in-tube* SPME que apresentaram a maior eficiência de extração.

Figura 18. Resumo da otimização das variáveis *in-tube* SPME.

Sorção		Limpeza	
pH da amostra	Volume amostra	Solução	Volume amostra
Ácido fórmico 10%	200 µL	H ₂ O:ACN (95:5, v/v)	400 µL
Eluição		Limpeza e Condicionamento	
Solução	Volume amostra	Limpeza	Condicionamento
ACN:H ₂ O:NH ₄ OH (75:15:10, v/v/v)	100 µL	ACN:H ₂ O:NH ₄ OH (75:15:10, v/v/v) - 200 µL	Ácido fórmico 10% - 200 µL

Fonte: Próprio autor.

1.4.7. Validação analítica do método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS

O método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS foi validado segundo as normas preconizadas pela ANVISA e posteriormente aplicado na determinação quantitativa dos peptídeos A β 38, A β 40 e A β 42 em amostras de LCR de pacientes com Doença de Alzheimer.

a) Linearidade e LIQ

O método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS apresentou intervalos lineares que variaram do LIQ – 10 ng mL⁻¹ e coeficientes de determinação maiores que 0,99 (Tabela 2). O limite inferior de quantificação foi definido como a menor concentração determinada quantitativamente com exatidão e precisão aceitáveis.

Tabela 2. Intervalo linear, equação de regressão linear, coeficiente de determinação (R²) e limite inferior de quantificação (LIQ) para o método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS.

Analito	Intervalo linear (ng mL ⁻¹)	Equação de regressão	R ²	LIQ (ng mL ⁻¹)
A β 42	0,6 – 10,0	y = 0,2678x + 0,2654	0,9936	0,6
A β 40	0,6 – 10,0	y = 0,2648x + 0,0235	0,9988	0,6
A β 38	0,8 – 10,0	y = 0,1547x + 0,1817	0,9990	0,8

b) Exatidão e Precisão

A Tabela 3 apresenta os valores de exatidão e precisão intra e intercorridas do método desenvolvido. Os valores de EPR variaram de -10,1% a 14,3% (exatidão intracorridas) e -11,7% a 13,5% (exatidão intercorridas). A precisão do método apresentou valores de CV que variaram de 1,0% a 18,9% (precisão intracorridas) e 1,0% a 11,3% (precisão intercorridas). Todos esses valores estão em concordância com os limites estabelecidos pela ANVISA.

Tabela 3. Parâmetros de validação analítica para o método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS.

Analito	Concentração adicionada (ng mL ⁻¹)	Exatidão		Precisão	
		Intracorrida	Intercorrida	Intracorrida	Intercorrida
		(%EPR) n=5		(%CV) n=5	
Aβ42	0,6	-4,6	-4,8	18,9	0,7
	1,5	7,2	13,5	9,7	9,6
	2,0	8,7	7,9	9,9	11,3
	5,0	5,9	9,4	13,1	2,4
	10,0	-1,9	-2,9	11,5	9,6
Aβ40	0,6	14,3	11,3	9,3	3,2
	1,5	5,7	4,7	2,6	1,0
	2,0	-2,5	-1,1	11,2	1,6
	5,0	-4,6	-4,7	1,0	0,8
	10,0	1,1	-1,0	2,7	2,5
Aβ38	0,8	-10,1	-5,6	6,4	7,4
	1,5	-0,5	-11,7	10,3	11,2
	2,0	8,9	10,7	2,4	2,9
	5,0	-1,2	-5,6	3,8	2,7
	10,0	0,1	4,5	4,6	4,4

c) Efeito matriz e efeito residual

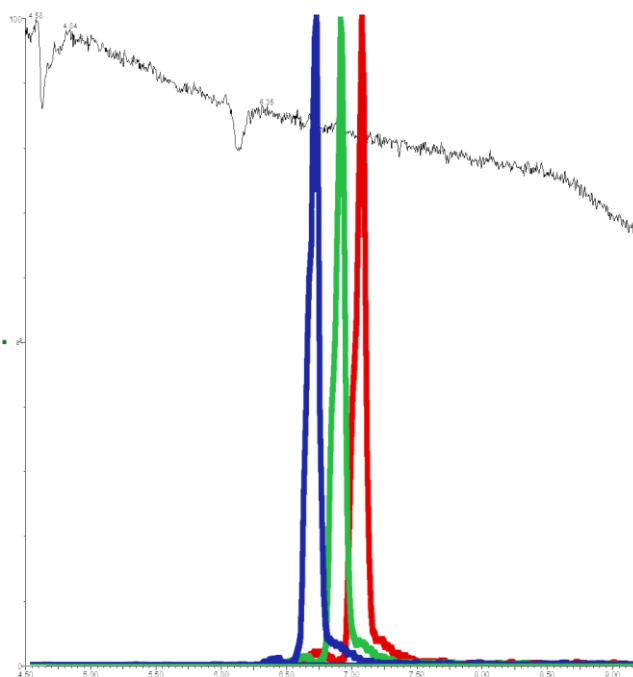
A ausência do efeito matriz foi confirmada pela infusão pós-coluna onde foi possível observar que não houve incremento ou supressão do sinal analítico no tempo de retenção dos analitos (Figura 19). O efeito matriz também foi avaliado através da comparação dos coeficientes angulares de 6 curvas de calibração. Sendo 3 curvas plotadas utilizando LCR sintético e 3 curvas utilizando LCR humano. De acordo com os resultados obtidos no teste estatístico (Test t), não há evidências (nível de significância de 0,05) de que os coeficientes angulares são diferentes. Assim, o paralelismo das retas é indicativo da ausência de efeito matriz (Tabela 4).

Tabela 4. Test T para comparação da inclinação das retas obtidas em diferentes matrizes

Analito	Coeficiente Angular LCR sintético			Coeficiente Angular LCR humano		
	Aβ42	0,2549	0,2556	0,2649	0,2472	0,2419
Aβ40	0,2465	0,2431	0,2222	0,2413	0,2199	0,2225
Aβ38	0,1652	0,1755	0,1692	0,1694	0,1606	0,1729

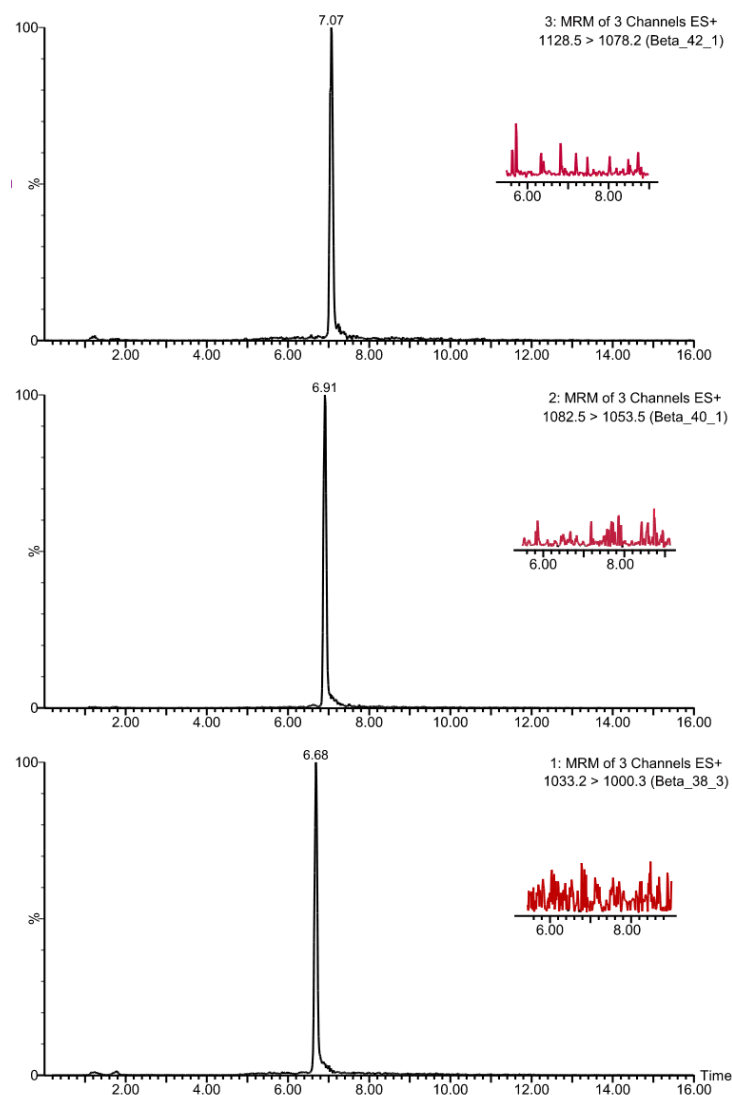
*Nível de significância de 0,05.

Figura 19. Cromatograma de infusão pós-coluna para avaliação do efeito matriz do método in-tube SPME UHPLC-MS/MS



O efeito residual (Figura 20) foi avaliado com injeções de amostras de LCR branco de referência (não enriquecidas com os analitos) antes e após a análise de amostra LCR enriquecida com os analitos na concentração correspondente ao limite superior de quantificação (LSQ). Nestas amostras branco de referência, os sinais analíticos nos tempos de retenção dos analitos e do PI ficaram abaixo de 5% dos sinais analíticos correspondentes às amostras no LIQ. Estes valores obtidos encontram-se em concordância com os limites preconizados pela ANVISA.

Figura 20. Cromatograma da amostra de LCR sintético enriquecida com os analitos na concentração do LSQ (preto) e das amostras de LCR sintético branco de referência (vermelho) após análise do LSQ.



Fonte: Próprio autor.

d) Fator de enriquecimento

Nas condições otimizadas de extração para o método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS, os fatores de enriquecimento foram calculados para os peptídeos A β na concentração corresponde ao LIQ. Para tal, foi realizada uma comparação com a injeção direta das soluções padrão dos peptídeos A β na mesma concentração no sistema UHPLC-MS/MS. Os resultados de fator de enriquecimento calculados foram de 76% (A β 42), 84% (A β 40) e 48% (A β 38).

e) Reprodutibilidade do procedimento de síntese da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos

A reprodutibilidade do procedimento de síntese da fase monolítica foi avaliada com base na eficiência de extração de fases monolíticas sintetizadas em dias diferentes e análise de amostras de LCR sintético enriquecidas com os analitos em intervalos de concentração da faixa linear (LOQ a 10 ng mL^{-1}). Os valores de CV inferiores a 8,6%, comprovaram a reprodutibilidade do procedimento de síntese.

Cada fase monolítica foi reutilizada em pelo menos 50 extrações sem variações significativas da eficiência da extração. Os valores de EPR (exatidão) e de CV (precisão) menores que 15%, obtidos na validação analítica do método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS certificam a robustez e a estabilidade (química e física) das fases monolíticas sintetizadas.

f) Estabilidade

De acordo com diferentes estudos reportados na literatura, as concentrações dos peptídeos A β em amostras de LCR são estáveis por 2 dias em temperatura ambiente, por 14 dias à 4°C e por 30 dias à -80°C [136,137].

1.5. Aplicação do método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS

O método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS foi aplicado com sucesso para determinar as concentrações dos peptídeos A β 38, A β 40 e A β 42 em seis amostras de LCR de pacientes com doença de Alzheimer. As concentrações médias de A β 38, A β 40 e A β 42 determinadas nessas amostras de LCR foram $2,2 \pm 0,3$, $7,8 \pm 0,8$ e $0,6 \pm 0,1 \text{ ng mL}^{-1}$, respectivamente. A faixa de concentração determinada está em concordância com os dados da literatura [14,24–29].

Alguns artigos publicados na literatura [14,138–140] sugerem que as razões A β 42/A β 40 e A β 42/A β 38 do LCR melhoram a distinção entre pré-demência e estágios de demência, entre DA e não-AD, e também entre demência e controles em comparação com medição de LCR A β 42 sozinho. Portanto, este método desenvolvido que determina simultaneamente as concentrações de A β 38, A β 40 e A β 42 também pode ser usado para esta finalidade.

1.6. Conclusão

A avaliação de diferentes condições cromatográficas (colunas cromatográficas com diferentes tecnologias e tamanhos e composições de fases móveis variadas) permitiu a obtenção de cromatogramas com picos estreitos, simétricos em adequado tempo de análise.

A otimização do procedimento de síntese da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos (suporte, monômero funcional, solventes porogênicos, tempo e temperatura de polimerização, razão molar monômero funcional/agente reticulante e iniciador radicalar) favoreceu a capacidade de sorção dos analitos. A fase monolítica sintetizada por polimerização *in situ* apresentou estabilidade mecânica em ampla faixa de pH, alta permeabilidade e baixa pressão no sistema *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS.

A caracterização morfológica através da técnica MEV permitiu observar a influência de alguns parâmetros de síntese na morfologia (homogeneidade e ancoramento da superfície do capilar de sílica fundida) da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos. A caracterização química através da técnica de FTIR permitiu observar a incorporação dos grupos sulfônicos à estrutura da fase monolítica.

A otimização das condições de extração *in-tube* SPME (pH e volume de amostra, limpeza e eluição dos analitos) favoreceu a detectabilidade do método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS.

A validação analítica do método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS mostrou ser adequada na faixa linear (LIQ – 10 ng mL⁻¹), com satisfatória precisão e exatidão. A robustez da fase monolítica sintetizada foi comprovada através do seu reuso em mais de 50 extrações sem perda significativa na eficiência de extração.

O método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS otimizado e validado foi aplicado na determinação dos peptídeos A β em amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer.

CAPÍTULO 2

DPX associada à MS/MS para análise de peptídeos A β em amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer

2. CAPÍTULO 2

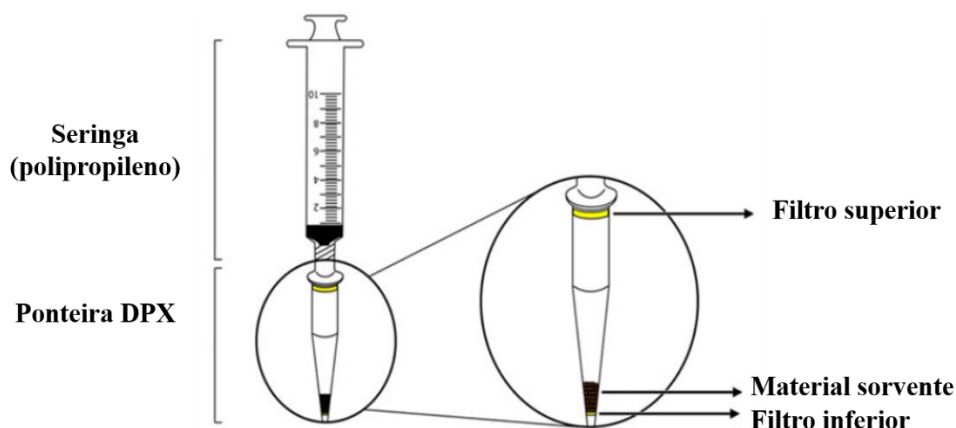
2.1. Microextração em ponteira descartável

A técnica de microextração em ponteira descartável (*Disposable Pipette Extraction*, DPX) foi desenvolvida e patenteada em 2003 por Dr. William Brewer [141]. Apesar de ser considerada uma técnica fundamentada na extração em fase sólida (SPE) convencional, a DPX não é exaustiva e baseia-se no equilíbrio de sorção do analito com o sorvente. A DPX uma técnica de preparo de amostra simples e rápida que utiliza reduzido volume de amostra e de solvente orgânico, e que pode ser automatizada permitindo assim alta frequência analítica. Quando comparada à SPE convencional, a DPX faz uso menor massa de material sorvente e dispensa a utilização de vácuo [142].

A técnica DPX tem sido reportada em diversas áreas de aplicação, como por exemplo, análise forenses [143,144], ambientais [145–150] e alimentícias [151].

O sistema de extração utilizado na técnica DPX é composto por uma ponteira convencional de pipeta (1 ou 5 mL), na qual uma pequena quantidade de material sorvente (20 – 100 mg) está contido livremente entre dois filtros (Figura 21). O primeiro filtro (de vidro sinterizado, lã de vidro, polímero poroso ou metal) tem como finalidade proporcionar uma barreira permeável que permita a passagem livre de fluidos em qualquer direção (aspirar/dispensar), na medida em que retém o sorvente. Já o segundo filtro (de vidro sinterizado, polímero poroso ou membrana semipermeável) é colocado na extremidade superior e impede a passagem de qualquer material sólido ou fluido para o interior da pipeta (ou seringa), assegurando a não contaminação da mesma e a retenção do sorvente [152]. As ponteiras DPX podem ser acopladas a uma pipeta ou uma seringa de polipropileno.

Figura 21. Esquema de uma ponteira DPX.

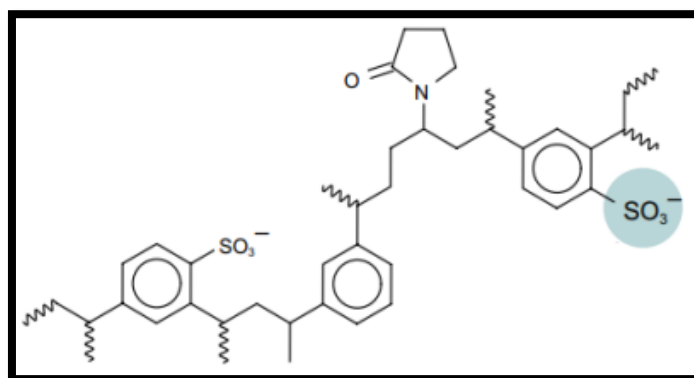


Fonte: Adaptado de Bordin et al. [152]

Atualmente uma variedade de fases comerciais DPX com diferentes mecanismos de extração disponíveis comercialmente: C18, DPX-RP (estireno divinil benzeno); DPX-CX (grupos sulfônicos), DPX-WAX (grupos poliamino), DPX-WCX (grupos policarboxilato), DPX-Si (sílica gel) e *Mono Tip* C18 (sílica monolítica). Além dos materiais disponíveis comercialmente para a técnica DPX, diversas pesquisas têm sido direcionadas para o desenvolvimento de novos sorventes como por exemplo os materiais de acesso restrito (RAM) e os polímeros molecularmente impressos (MIP) [153,154].

A fase comercial denominada Oasis MCX é um polímero de modo misto (troca catiônica forte e fase reversa) (Figura 22). A sua resistência e estabilidade em meio ácido é forte, permitindo uma faixa de pH operacional estável entre 0-14. Possui tamanho de partícula de 60 µm e os cartuchos estão disponíveis em embalagens contendo 500 mg.

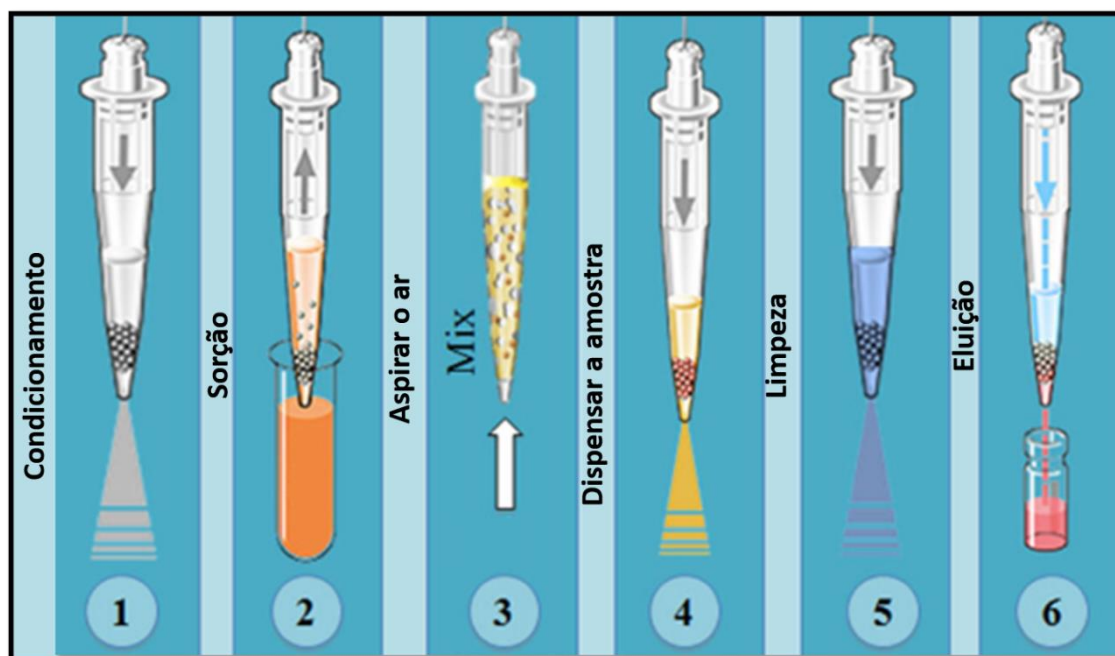
Figura 22. Representação da fase comercial Oasis MCX.



Fonte: Reproduzido de Waters Corporation [155]

Conforme ilustrado na Figura 23, o procedimento da DPX envolve quatro etapas (condicionamento, sorção dos analitos, limpeza do sorvente e eluição dos analitos), sendo todas realizadas por meio da entrada de ar, e válidas para ambos os sistemas manual e/ou automatizado. Inicialmente o material sorvente é condicionado com um solvente apropriado para ativação dos sítios das ligações. Esta etapa em alguns casos não se faz necessária. Em seguida, a amostra líquida é aspirada para o interior da ponteira e misturada dinamicamente (rápida transferência de massas) com o sorvente por meio da aspiração de ar. Essa mistura dinâmica da fase sólida dispersiva-amostra favorece o rápido equilíbrio de sorção do analito. Normalmente, após 30 s o equilíbrio é atingido. A escolha do solvente de lavagem é feita com base no tipo/natureza química do material sorvente, na natureza do analito de interesse e nos interferentes endógenos presentes na matriz. Por último, o solvente de eluição é aspirado para o interior da ponteira, seguido da aspiração de ar, várias vezes, de forma a assegurar à completa eluição dos analitos adsorvidos [156–159]. O eluato pode ser diretamente injetado no sistema cromatográfico ou evaporado e reconstituído, visando maior detectabilidade analítica.

Figura 23. Esquema das etapas envolvidas na DPX.



Fonte: Adaptado de Bordin et al. [152].

2.2.Objetivos

2.2.1. Objetivo Geral

- Desenvolver e validar o método DPX MS/MS para a determinação de peptídeos A β em amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer

2.2.2. Objetivos Específicos

- Otimizar os parâmetros da técnica DPX tais como pH e volume de amostra, tempo de equilíbrio de sorção, condições de eluição e limpeza.
- Otimizar e validar o método DPX MS/MS para a determinação de peptídeos A β em amostras de LCR de pacientes com a doença de Alzheimer.

2.3. Materiais e Métodos

2.3.1. Pré-tratamento da amostra biológica

Em um frasco de eppendorf® LoBind, uma alíquota de 150 µL de LCR sintético contendo 5% plasma de rato foi enriquecida com 30 µL da solução estoque dos analitos, resultando na concentração final de 100 ng mL⁻¹. Em seguida, o Eppendorf foi agitado em vórtex por 60 s, mantido em repouso por 30 min e então 120 µL de uma solução de Guanidina 5M foi adicionado à amostra seguido de agitação por 1 h a 37°C. Por último, a amostra enriquecida foi diluída com 150 µL de uma solução aquosa de ácido fórmico 10% resultando no volume final de 450 µL. Após este procedimento, as amostras foram extraída por DPX.

2.3.2. Condições UHPLC-MS/MS

O desenvolvimento do método DPX UHPLC-MS/MS utilizou um sistema cromatográfico Waters® UHPLC-MS/MS (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado com fonte de ionização electrospray (ESI) operando em modo positivo e utilizando o modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM) em razão da alta seletividade e detectabilidade. A separação cromatográfica dos analitos foi realizada utilizando a coluna de fase reversa Acquity UPLC Peptide BEH C18 (150 mm × 2.1 mm × 1,7 µm) mantida a 35°C e com eluição no modo gradiente. A fase móvel utilizada foi composta por: (A) solução aquosa contendo 0,3% de hidróxido amônio e (B) acetonitrila, na vazão de 0,2 mL min⁻¹. O sistema MS/MS foi operado nas seguintes condições: voltagem do capilar 3,50kV; temperatura da fonte de ionização 550°C; vazão do gás de cone 100 L/h (N₂, pureza de 99,9%); gás de dessolvatação 500°C 1000 L/h (N₂, pureza de 99,9%); gás de colisão Argônio (pureza de 99,999%). As transições específicas utilizadas para cada analito, energia do cone e energia de colisão foram otimizadas para cada analito e estão apresentadas na Tabela 5. As determinações quantitativas foram realizadas por padronização interna, empregando padrões isotópicos.

Tabela 5. Transições MS/MS (SRM), voltagem do cone (DP) e energia de colisão (CE).

Analito	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	DP (V)	CE (V)
A β 38	1033.2	1000.3	45	23
¹⁵ N ₅₁ -A β 38 ^b	1046.3	1012.1	45	22
A β 40	1082.5	1053.5	55	25
¹⁵ N ₅₃ -A β 40 ^b	1096.3	1066.6	45	23
A β 42	1128.5	1078.2	55	26
¹⁵ N ₅₅ -A β 42 ^b	1142.9	1090.7	50	24

^a Precursor [M+H]⁴⁺; ^b padrão interno;

2.3.3. Condições MS/MS

O desenvolvimento do método DPX-MS/MS utilizou um sistema de espectrometria de massas sequencial – tripo quadrupolo Xevo TQ-D® (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado com fonte de ionização electrospray de baixa vazão (*low-flow* ESI) operando em modo positivo e utilizando o modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM) em razão da alta seletividade e detectabilidade. A fase móvel utilizada foi composta por: (A) solução aquosa contendo 0,3% de hidróxido amônio e (B) acetonitrila (50:50, v/v), na vazão de 0,05 mL min⁻¹ com tempo total de análise de 2 minutos. O sistema MS/MS foi operado nas seguintes condições: voltagem do capilar 3,50kV; temperatura da fonte de ionização 550°C; vazão do gás de cone 150 L/h (N₂, pureza de 99,9%); gás de dessolvatação 350°C e 800 L/h (N₂, pureza de 99,9%); gás de colisão Argônio (pureza de 99,999%). As transições específicas utilizadas para cada analito, energia do cone e energia de colisão foram otimizadas para cada analito e estão apresentadas na Tabela 5. As determinações quantitativas foram realizadas por padronização interna, empregando padrões isotópicos.

2.3.4. Condições DPX

Ponteiras DPX (1 mL) contendo filtros nas extremidades inferior e superior foram preenchidas com 60 mg de fase comercial Oasis MCX® e conectadas a uma seringa de polipropileno de 5 mL, sendo este sistema utilizado como dispositivo para extração. Com o objetivo de avaliar a influência dos diferentes parâmetros na eficiência de extração por DPX, utilizou-se amostras de LCR sintético como descritas no item 2.3.1.

Dentre as variáveis DPX avaliadas, o procedimento descrito a seguir apresentou maior eficiência de extração (maior detectabilidade). Inicialmente, o material sorvente foi condicionado com uma alíquota 200 µL de metanol, seguido de uma alíquota 200 µL de uma solução de ácido fórmico 10% em água. Em seguida, uma alíquota de 450 µL de extrato final (enriquecida e diluída) foi aspirada e dispensada cinco vezes para a sorção dos analitos. Para a remoção dos interferentes endógenos presentes na amostra, uma alíquota de 200 µL de uma solução composta por água + 10% ácido fórmico/metanol (95:5, v/v) foi aspirada e dispensada. Para a eluição dos analitos, uma alíquota de 300 µL de uma solução contendo metanol/hidróxido de amônio (90:10, v/v) foi aspirada e dispensada uma única vez. O eluato foi evaporado e reconstituído em 50 µL da fase móvel e 5 µL foram injetados no sistema MS/MS.

2.3.5. Validação analítica do método DPX MS/MS

A validação analítica do método DPX MS/MS foi realizada segundo as normas da preconizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Resolução RDC Nº 27 de 17 de maio de 2012 e RDC Nº 166 de 24 de julho de 2017.

Os parâmetros de validação analítica (linearidade, limite de quantificação, precisão intra e intercorridas, exatidão intra e intercorridas e efeito residual) foram avaliados com amostras de LCR sintético enriquecidas com solução padrão dos analitos em diferentes concentrações e padrões internos marcados isotopicamente, com exceção do efeito residual que utilizou amostras de LCR sintético branco.

As curvas analíticas, sendo uma para cada analito, foram plotadas em diferentes intervalos de concentração (LIQ – 1,5 ng mL⁻¹). Todas as curvas analíticas foram geradas em quintuplicata, plotando a razão entre as áreas (analito/PI) em função da concentração de cada analito.

As curvas analíticas foram aprovadas para as análises quantitativas quando o coeficiente de variação (CV) – equação 5 – do calibrador correspondente à concentração nominal no limite inferior de quantificação (LIQ) apresentou valor menor ou iguais a 20% e quando o CV foi menor que 15% em relação à concentração nominal para os outros calibradores, incluindo o limite superior de quantificação (LSQ).

$$CV = \left[\frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \right] \times 100 \quad (5)$$

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

A exatidão foi determinada em ensaios conduzidos no mesmo dia (exatidão intracorridas) e em ensaios conduzidos em três dias consecutivos (exatidão intercorridas). A exatidão, expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR) – equação 6 – foi avaliada em quintuplicata, sendo que não foram admitidos valores superiores a $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitiu valores superiores a $\pm 20\%$ do valor nominal.

$$EPR = \left[\frac{(\text{Conc. média experimental} - \text{Valor nominal})}{\text{Valor nominal}} \right] \times 100 \quad (6)$$

A avaliação do efeito residual foi realizada com três injeções da mesma amostra branco de referência (amostras de LCR sintético não enriquecidas com a solução padrão dos analitos), sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra de LCR enriquecida com os analitos na concentração correspondente ao LSQ. Segundo as normas da ANVISA, os picos interferentes, nos tempos de retenção dos analitos, devem possuir valores de área inferiores a 20% das áreas correspondentes ao LIQ e inferior a 5% das áreas apresentadas pelo PI [125].

O efeito matriz foi avaliado comparando as respostas analíticas dos analitos em solução padrão aquosa com as respostas dos analitos em amostras de LCR sintético enriquecidas com os analitos em duas diferentes concentrações (CQB e CQA). Para cada concentração dos CQB e CQA calculou-se o efeito da matriz normalizado (FMN) por padrão interno – equação 7 – o qual deve apresentar valores de CV inferior a 15% para todos os analitos.

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz} / \text{Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução} / \text{Resposta do PI em solução}} \quad (7)$$

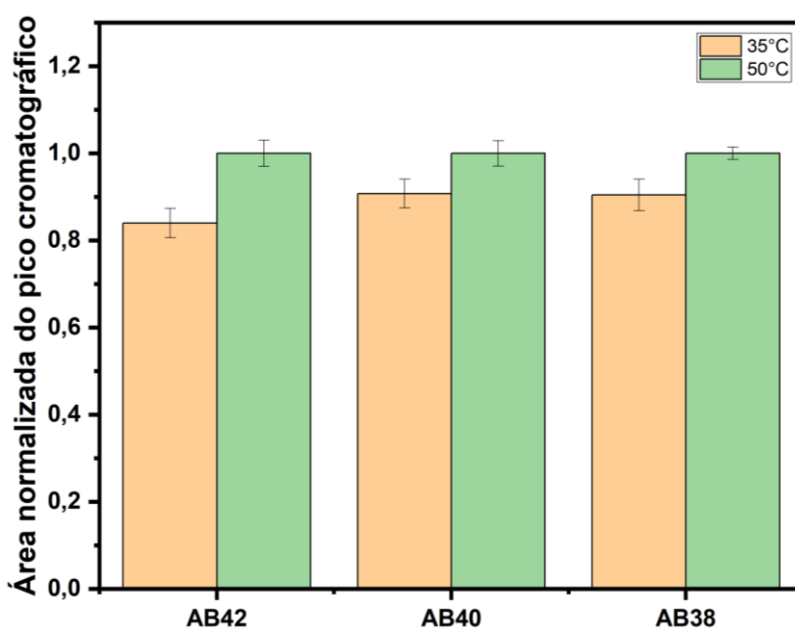
2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Avaliação das condições UHPLC-MS/MS

Durante o desenvolvimento das condições cromatográficas avaliamos diferentes parâmetros como por exemplo: temperatura da coluna (35° e 50°C), composição de fase móvel (0,1 a 0,3% de hidróxido de amônio), volume de injeção no sistema cromatográfico 5, 20 e 40 µL) e modo de varredura (SRM × SIM).

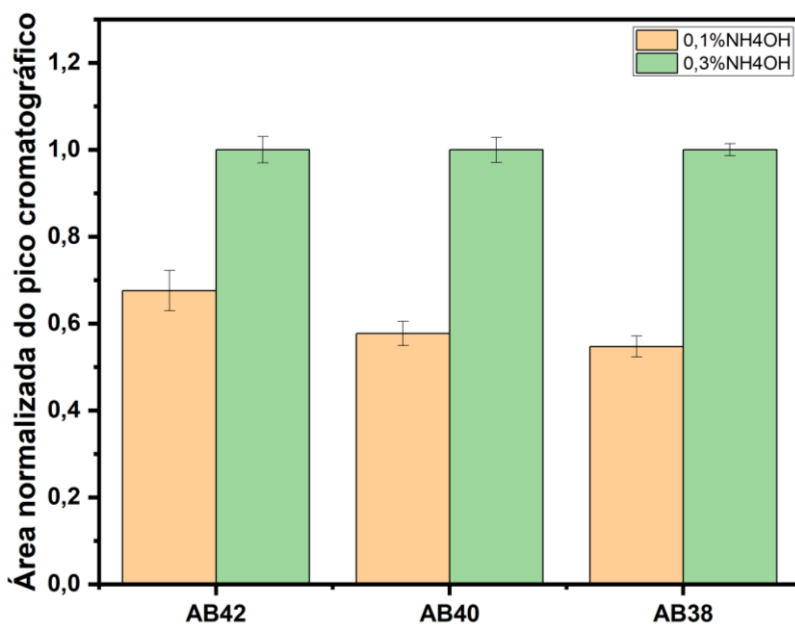
Podemos observar que aumento da temperatura e da porcentagem de hidróxido de amônio na fase móvel proporcionaram maior detectabilidade dos analitos no espectrômetro de massas (Figuras 24 e 25, respectivamente). No entanto, as recomendações descritas no manual da coluna cromatográfica UHPLC BEH C18 Peptide (150 mm × 2.1 mm × 1,7 µm) indicam que a concentração de hidróxido de amônio na fase móvel não deve exceder 10mM e a coluna cromatográfica com solução de hidróxido de amônio deve ser mantida abaixo de 35°C. Assim, nas condições otimizadas (50°C e 0,3% NH₄OH) estaríamos trabalhando em condições contraindicadas o que poderia acarretar na diminuição do tempo de vida útil da coluna cromatográfica.

Figura 24. Avaliação da influência da temperatura da coluna cromatográfica nas condições UHPLC-MS/MS. Fase móvel constituída por (A) água + hidróxido de amônio e (B) acetonitrila.



Fonte: Próprio autor.

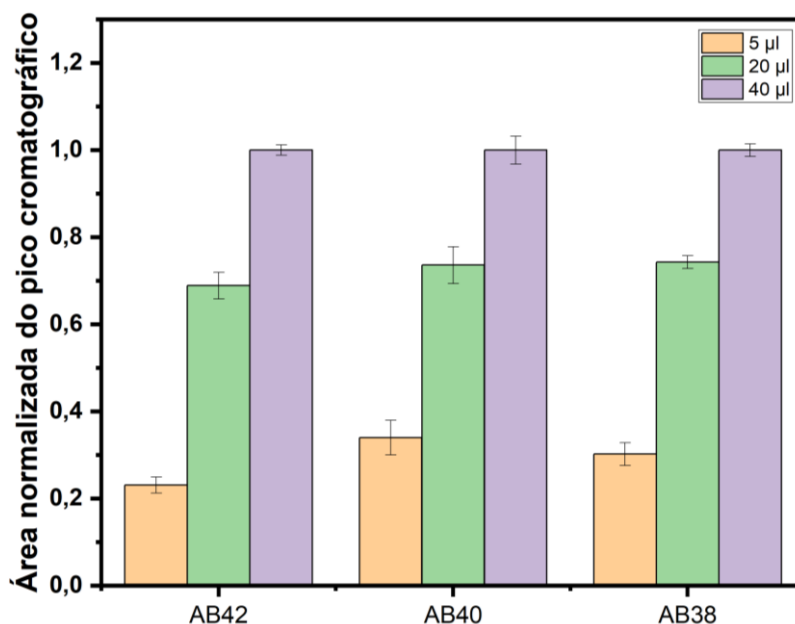
Figura 25. Avaliação da influência da porcentagem de hidróxido de amônio adicionado como aditivo na fase móvel nas condições UHPLC-MS/MS.



Fonte: Próprio autor.

Dessa forma, optamos por dar continuidade na otimização das condições UHPLC-MS/MS mantendo a temperatura da coluna cromatográfica em 30°C e a adição de 0,1% NH₄OH na fase móvel. Em seguida, avaliamos o volume de injeção de amostra no sistema UHPLC-MS/MS e os resultados obtidos (Figura 26) indicaram que o aumento no sinal (detectabilidade) acompanhou o aumento do volume de injeção da amostra. No entanto, ao injetar um volume final de 40 µL de amostra a pressão do sistema cromatográfico aumentou significativamente.

Figura 26. Avaliação da influência do volume de amostra injetado no sistema UHPLC-MS/MS.



Fonte: Próprio autor.

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade analítica do método UHPLC-MS/MS, avaliamos dois diferentes modos de varredura no sistema MS/MS: (1) monitoramento de íons selecionados (SIM) e (2) monitoramento de reações selecionadas (SRM). O modo SIM apresentou maior detectabilidade que o modo SRM, no entanto, na análise dos peptídeos (alta massa molecular), o modo SRM apresentou menor efeito da matriz, ou seja, maior seletividade nos tempos de retenção dos peptídeos A β . Além disso, no modo SIR não obtivemos linearidade na faixa de concentração adequada para as determinações quantitativas (0,1 – 1,5 ng mL⁻¹).

Com o intuito de aumentar a sensibilidade analítica do método, a próxima etapa de avaliação consistiu na avaliação das análises MS/MS diretas, ou seja, sem a etapa de separação cromatográfica. Para isso utilizamos uma conexão de aço de inox no lugar da coluna cromatográfica e também avaliamos o uso da fonte de ionização ESI de baixa vazão.

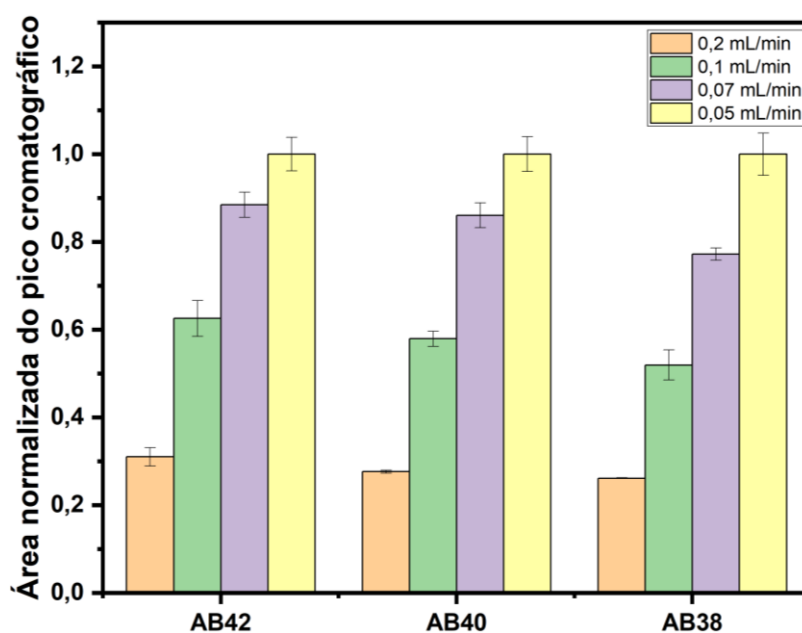
2.4.2. Avaliação das condições MS/MS

As transições $[M+4H]$ dos peptídeos $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{1-42}$ foram escolhidas para quantificação com base na intensidade do sinal produzido.

Visando aumentar a ionização dos analitos no modo ESI+, diferentes vazões de fase móvel (água + 0,3% hidróxido de amônio: acetonitrila, 90:10, v/v) foram avaliadas e também a adição da etapa de infusão direta de uma solução orgânica contendo aditivo básico no espectrômetro de massas.

Como ilustrado na Figura 27, comparamos o uso de fonte de ionização ESI de baixa vazão (0,05 a 0,07 mL min⁻¹) *versus* a fonte de ionização ESI convencional (0,1 a 0,2 mL min⁻¹). Os resultados obtidos mostraram que quanto menor a vazão da fase móvel, maior a sensibilidade do sinal analítico. Isso acontece porque a o diâmetro interno da agulha da fonte, influencia diretamente o tamanho da gota formada no cone [160]. Como a fonte ESI convencional possui diâmetro interno da agulha de 120 μm e a fonte ESI de baixa vazão possui diâmetro interno da agulha de 60 μm , a fonte ESI de baixa vazão é capaz de produzir gotas mais finas, aumentando assim a eficiência da ionização dos analitos. Portanto, podemos concluir que a fonte de ionização ESI de baixa vazão resultou em análises mais sensíveis e reprodutíveis.

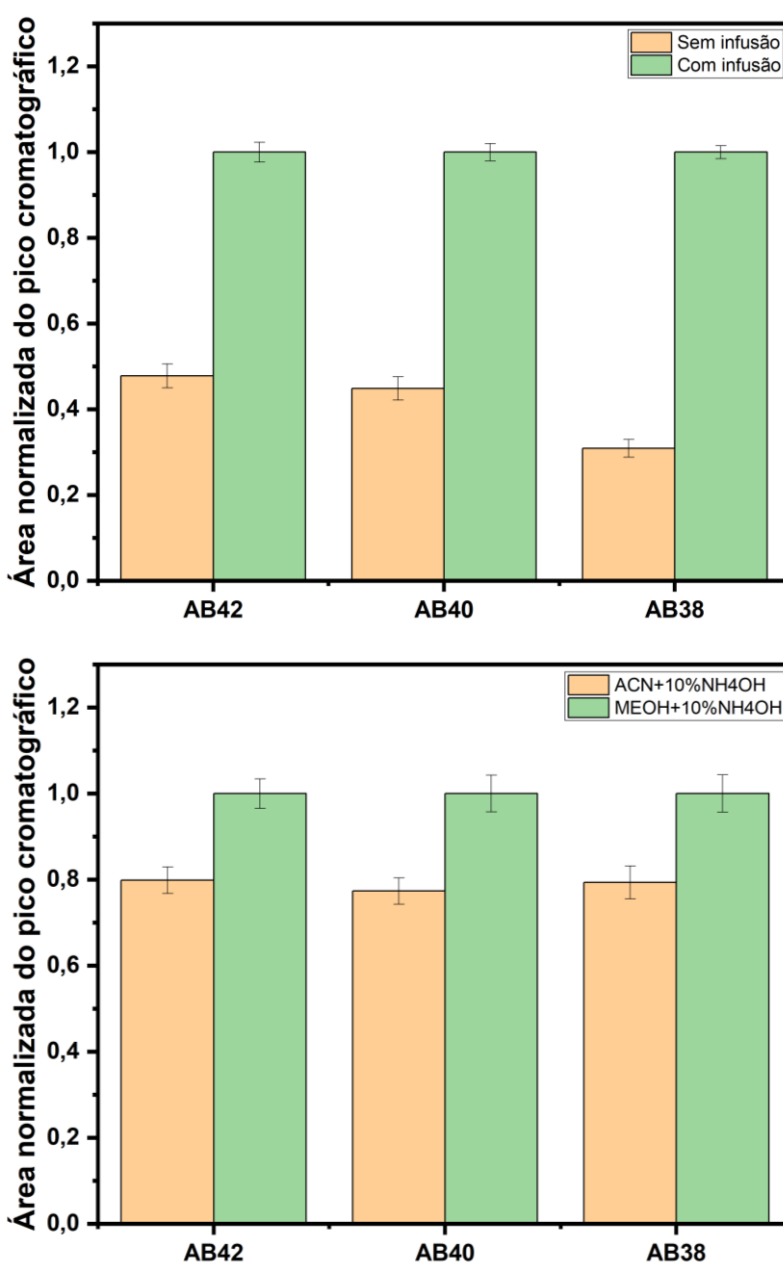
Figura 27. Avaliação da vazão da fase móvel (mL/min) no método DPX MS/MS.



Fonte: Próprio autor.

A infusão direta de acetonitrila ou metanol no espectrômetro de massas tem sido discutida na literatura como forma de aumentar o sinal analítico [161–163]. Neste sentido, a Figura 28 confirma que a utilização deste recurso favoreceu a detectabilidade em até 50% (Figura 28a). Além disso, podemos observar um aumento no sinal analítico quando metanol é utilizado como solvente na infusão direta no espectrômetro de massas em vez da acetonitrila (Figura 28b).

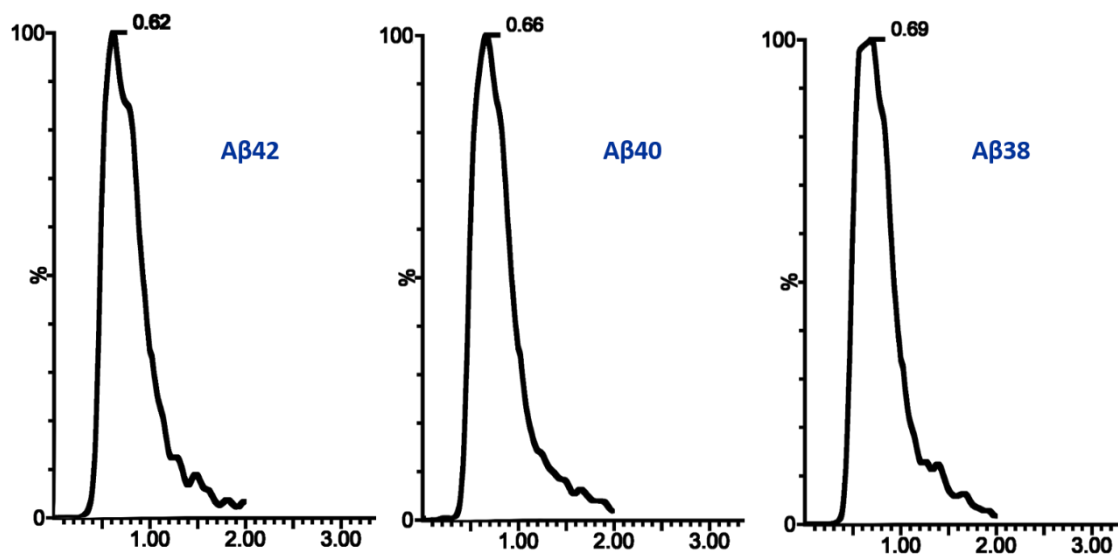
Figura 28. Avaliação da influência da infusão direta no método DPX-MS/MS: (a) adição da etapa de infusão direta; (b) solução de infusão direta.



Fonte: Próprio autor.

Portanto, conclui-se que as melhores condições MS/MS foram obtidas utilizando a fase móvel constituída por (A) água + 0,3% NH₄OH e (B) acetonitrila (50:50, v/v) com vazão de 0,05 mL min⁻¹ e infusão direta no espectrômetro de massas de uma solução de metanol + 10% hidróxido de amônio concentrado (Figura 29).

Figura 29. Representação dos picos dos peptídeos A β nas condições MS/MS otimizadas.



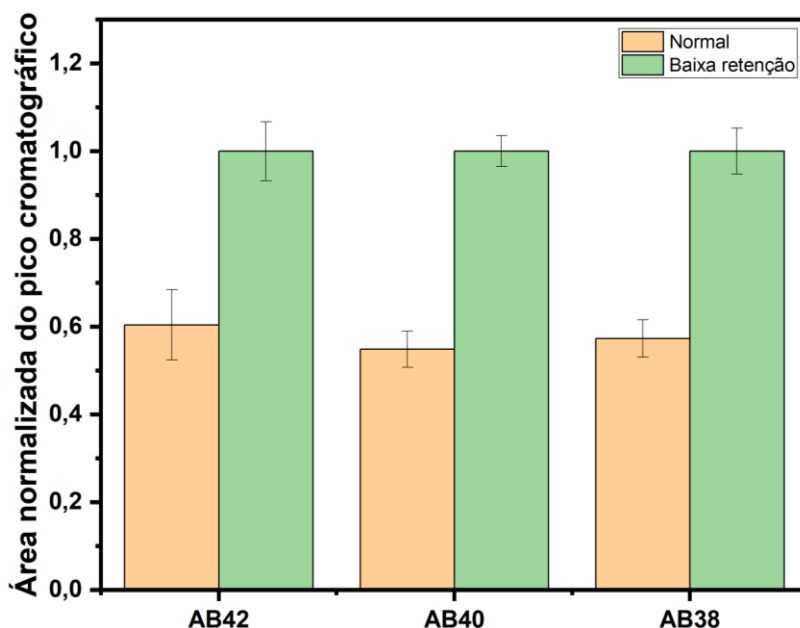
Fonte: Próprio autor.

2.4.3. Avaliação da etapa de pré-preparo da amostra

A determinação de peptídeos A β (especialmente o peptídeo A β 42) em amostras de LCR ainda é um desafio devido a sua baixa concentração na matriz biológica, baixa solubilidade em água, às ligações não específicas a outros peptídeos/proteínas ou às paredes de ponteiros/ependorfs e à sua tendência em agregar-se [29].

Por isso, a utilização de ponteiros LoRetention® e tubos Eppendorf Protein LoBind® foi importante para minimizar às ligações dos analitos de interesse (peptídeos A β) junto às paredes dos materiais plásticos durante a etapa de pré-preparo de amostra. Como podemos observar na Figura 30, o uso de materiais de baixa retenção permitem que uma fração menor dos analitos adsorva junto às paredes destes materiais e assim, podemos atingir uma maior taxa de recuperação dos analitos ao final de cada extração.

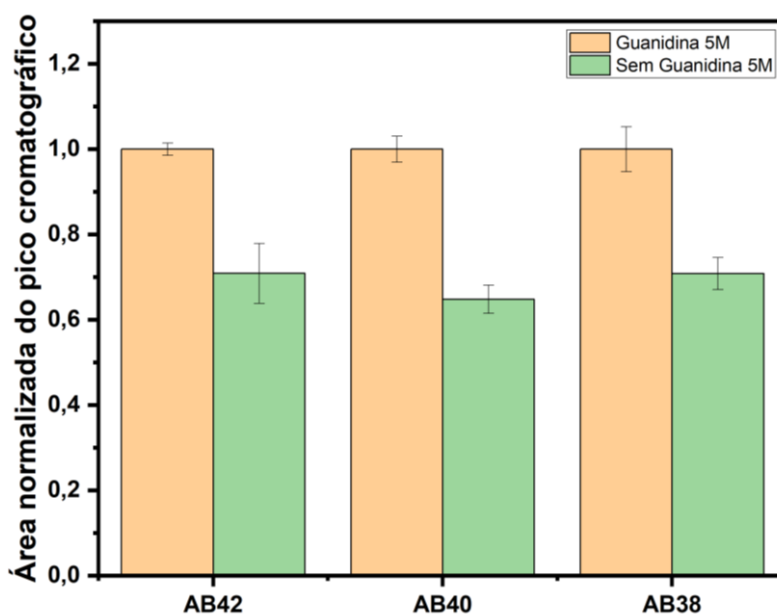
Figura 30. Avaliação da influência do tipo de material plástico utilizado durante o desenvolvimento do método DPX.



Fonte: Próprio autor.

A adição de plasma de rato e também de uma solução de guanidina concentrada (5M) à matriz biológica também foram parâmetros avaliados. Os peptídeos A β podem estar presentes em formas de agregados e formas oligoméricas e poliméricas, assim, a adição de guanidina 5M é responsável por causar a desnaturação dos peptídeos A β disponibilizando-os em sua forma monomérica (Figura 31) [29]. Já a adição de plasma de rato na amostra de LCR é responsável por diminuir a ligação dos peptídeos A β (humano) com a albumina presente no LCR, favorecendo assim a sensibilidade do método (albumina humana liga-se ao rA β) – conforme já discutido no item 1.4.5.

Figura 31. Avaliação da adição de agente desnaturante no pré-preparo da amostra.



Fonte: Próprio autor.

2.4.4. Avaliação das condições DPX

Os parâmetros da técnica DPX pH da amostra, tempo de equilíbrio de sorção entre os analitos e o material sorvente, volume de amostra/número de ciclos, condições de eluição e solução de limpeza foram avaliados. Os experimentos foram avaliados de forma uni variada e as melhores condições de extração foram escolhidas de acordo com as áreas normalizadas dos picos cromatográficos obtidas durante a otimização das variáveis.

a) pH da amostra

O pH da amostra é importante na extração de analitos que possuem grupos dissociáveis, dependentes do pH do meio. A fase comercial Oasis MCX® é um sorvente polimérico de modo misto que apresenta grupos sulfônicos em sua estrutura e que pode ser empregado na extração de compostos ionizados através do mecanismo de troca catiônica. Em condições de pH ácido, os peptídeos A β estarão ionizados positivamente e vão interagir com os grupos sulfônicos do material sorvente através das interações eletrostáticas entre os analitos carregados positivamente e os grupos sulfônicos carregados negativamente. Adicionalmente, interações hidrofílicas e hidrofóbicas também podem ocorrer. Conforme resultados já discutidos no item 1.4.6, as extrações

realizadas com a amostra de LCR diluída em uma solução de ácido fórmico 10% resultaram na melhor eficiência de extração.

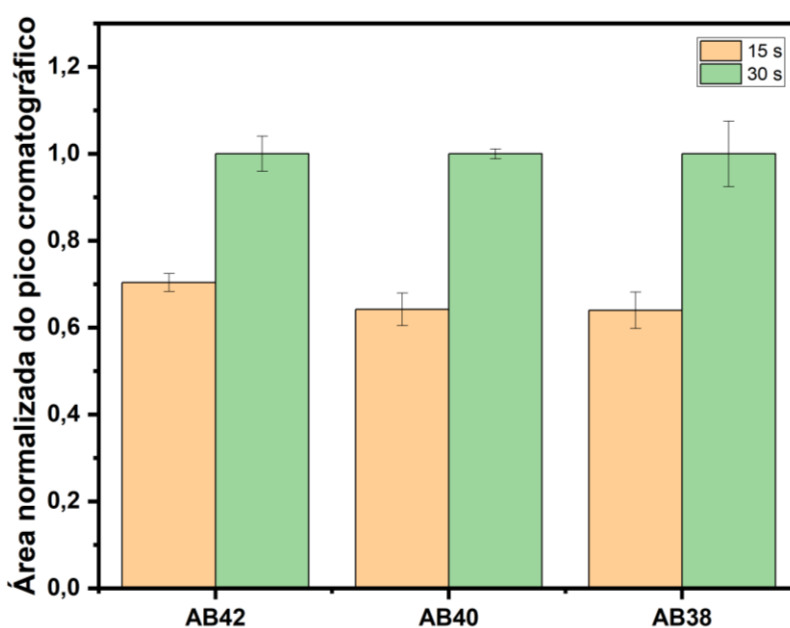
b) Condicionamento

A etapa de condicionamento do material sorvente com um solvente apropriado é importante para ativação dos sítios de ligações. Neste trabalho, o material sorvente contido no interior da ponteira DPX foi condicionado com uma alíquota de 200 μ L de metanol puro seguido de uma alíquota 200 μ L de ácido fórmico 10% em água.

c) Equilíbrio de sorção

A eficiência da extração por DPX está diretamente relacionada ao tempo de equilíbrio de sorção dos analitos com a fase extratora [164]. A fim de obter eficiência satisfatória, diferentes tempos de sorção (15 s e 30 s) foram avaliados, para a otimização do tempo de equilíbrio, na etapa de pré-concentração dos peptídeos A β na fase sorvente Oasis MCX®. Como observado na Figura 32, o aumento de tempo de contato entre os analitos e a fase extratora favoreceu a eficiência de extração. Tendo em vista que uma das vantagens da técnica DPX é a rapidez, o tempo máximo de equilíbrio avaliado foi 30 segundos, pois um aumento neste valor resultaria em um tempo de extração maior.

Figura 32. Avaliação da influência do tempo de equilíbrio entre os os analitos e o material sorvete na eficiência de extração.

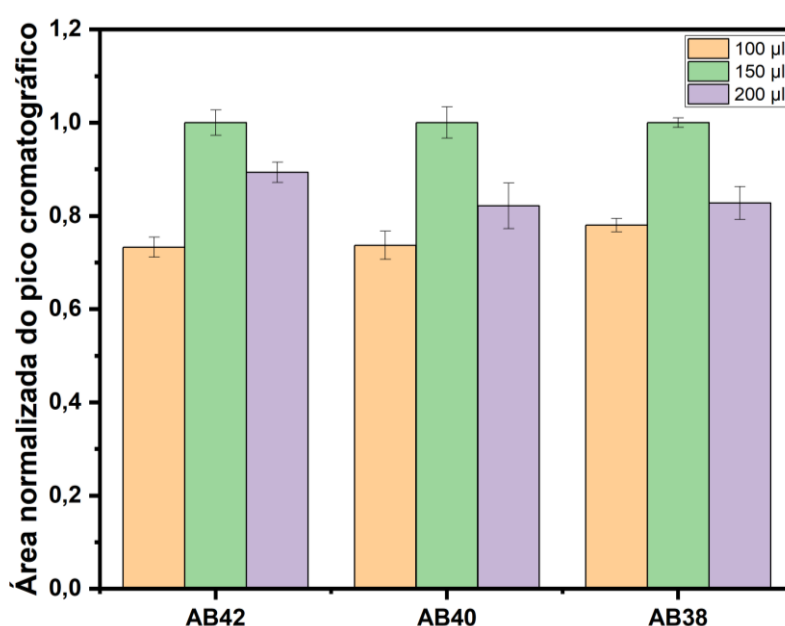


Fonte: Próprio autor.

d) Volume de amostra e números de ciclos de aspirar/dispensar

Considerando a eficiência da extração, diferentes volumes (100, 150 e 200 μL) de amostra (item 2.3.1) foram avaliados para a sorção dos analitos. Os resultados obtidos indicaram que o aumento do volume de amostra de 100 a 150 μL levou ao aumento do sinal analítico, no entanto para volumes superiores a 150 μL houve uma queda no sinal analítico (Figura 33). Isso ocorre porque com o aumento do volume de amostra aumentam-se também a concentração dos interferentes endógenos e o efeito da matriz.

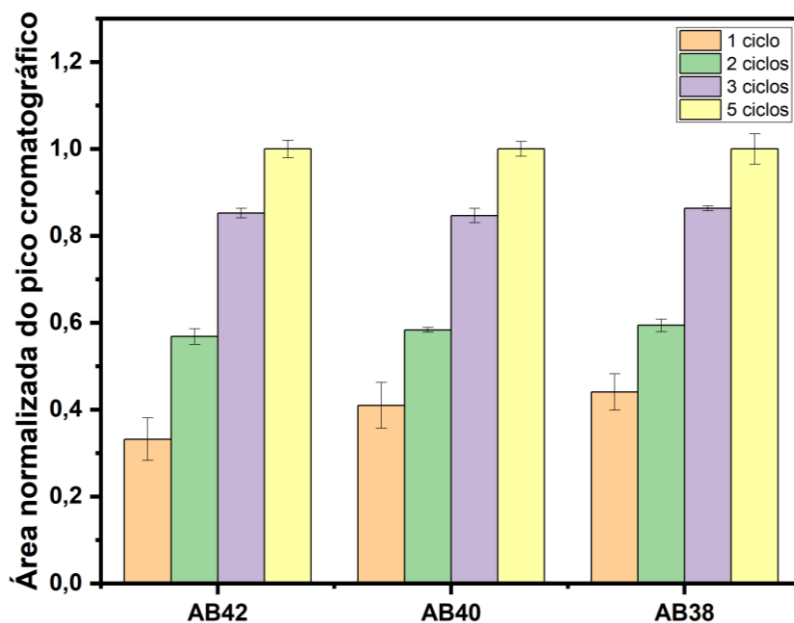
Figura 33. Avaliação da influência do volume de amostra na eficiência de extração.



Fonte: Próprio autor.

O número de ciclos aspirar/dispensar da amostra também influencia na eficiência da extração, já que o aumento da quantidade de ciclos permite que o material sorvente extraia maiores quantidades de analitos (favorece o equilíbrio de sorção). Dessa forma, tendo fixado o volume de amostra em 150 μL , a etapa seguinte consistiu na otimização do número de ciclos aspirar/dispensar. Os resultados ilustrados na Figura 34 mostram que a eficiência de extração aumentou linearmente com o aumento do número de ciclos, atingindo seu máximo no quinto ciclo ($5 \times 450 \mu\text{L}$).

Figura 34. Avaliação da influência do número de ciclos aspirar/dispensar na eficiência de extração.



Fonte: Próprio autor.

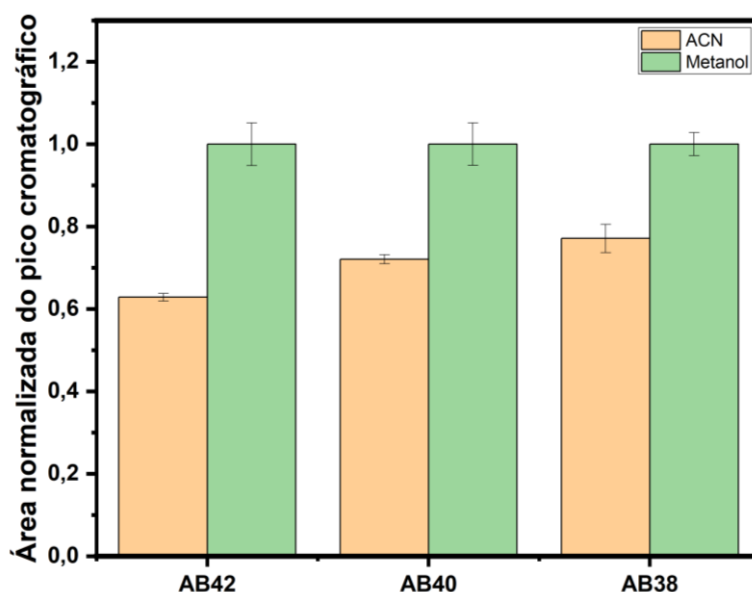
g) Limpeza do material sorvente

O LCR possui interferentes endógenos (proteínas e fosfolipídios) que podem ficar retidos na fase extratora, e posteriormente serem eluídos com os analitos, suprimindo o sinal analítico dos analitos. Portanto, a etapa de limpeza se faz necessária após a etapa de sorção dos analitos na fase extratora e antes da etapa de eluição dos analitos, para promover a exclusão dos interferentes endógenos da matriz biológica sem que haja perda significativa dos analitos de interesse. Dentre as soluções avaliadas, resultados satisfatórios foram obtidos empregando uma alíquota de 200 μ L de uma solução composta por água + 10% ácido fórmico/metanol (95:5) v/v.

f) Eluição

Considerando as características físico-químicas dos analitos e do material sorvente, a força da solução de eluição neste caso está relacionada com o seu pH, ou seja, soluções com caráter básico serão mais eficientes no processo de eluição. Empregando-se metanol e acetonitrila como solventes de eluição, uma maior eficiência de extração foi observada ao utilizar metanol (Figura 35).

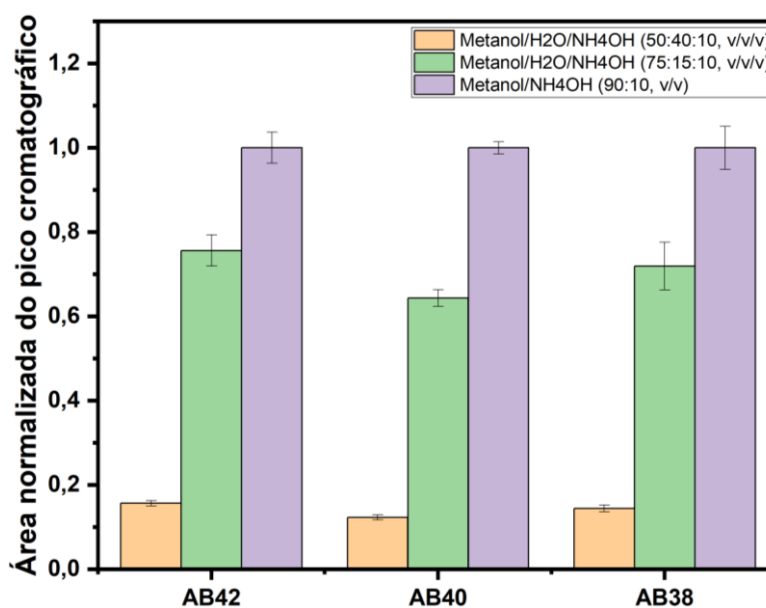
Figura 35. Avaliação da influência do solvente de eluição na eficiência de extração.



Fonte: Próprio autor.

Em seguida, a adição de hidróxido de amônio na solução de eluição também foi avaliada: (1) metanol/água/hidróxido de amônio (50:40:10, v/v/v); (2) metanol/água/hidróxido de amônio (75:15:10, v/v/v); (3) metanol/hidróxido de amônio (90:10, v/v). Conforme indicado na Figura 36, a eficiência de extração foi favorecida com o aumento da porcentagem de metanol na solução de eluição.

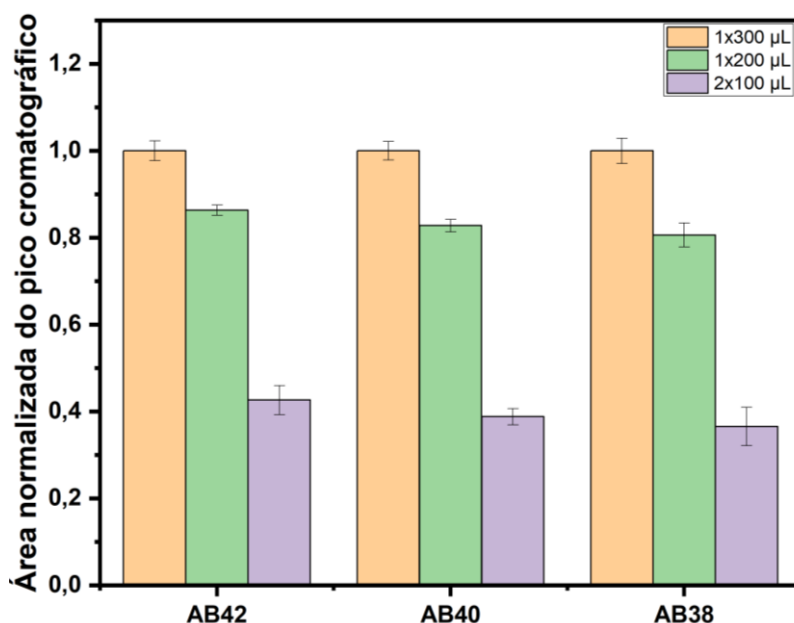
Figura 36. Avaliação da influência da solução de eluição na eficiência de extração.



Fonte: Próprio autor.

Uma vez determinado a solução de eluição, diferentes ciclos de eluição (1×300 μL , 1×200 μL e 2×100 μL) também foram avaliados. Como observado na Figura 37, o aumento do número de ciclos aspirar/dispensar não favoreceu o processo de eluição dos analitos devido as dimensões da ponteira DPX (quantidade de material sorvente). Portanto, um único ciclo de 300 μL da solução de eluição composta por metanol/hidróxido de amônio (90:10, v/v) apresentou maior eficiência de extração. Em seguida o extrato da eluição obtido foi evaporado e reconstituído em 50 μL de fase móvel composta por $\text{H}_2\text{O} + 0,3\% \text{NH}_4\text{OH} : \text{ACN}$ (90:10, v/v)

Figura 37. Avaliação da influência do (a) número de ciclos aspirar/dispensar e (b) volume da solução de eluição (metanol/hidróxido de amônio, 90:10, v/v) na eficiência de extração.



Fonte: Próprio autor.

As ponteiras DPX são descartáveis, por isso, não há necessidade de adicionar a etapa de limpeza entre as diferentes análises porque a fase extratora contida no interior das ponteiras são descartáveis. Dessa forma, o efeito memória também é eliminado. Uma vez utilizadas as ponteiras DPX, o material sorvente contido em seu interior foi descartado, e as ponteiras e filtros foram lavados com metanol e água. Depois de secos, novas ponteiras foram montadas.

A Figura 38 a seguir ilustra as condições DPX que apresentaram a maior eficiência de extração.

Figura 38. Resumo da otimização das variáveis DPX.

Condicionamento		Sorção			
Solução	Volume	pH da amostra	Volume amostra diluída	Nº de ciclos	Tempo
Metanol puro	200 µL				
Ácido fórmico 10%	200 µL	Ácido fórmico 10%	450 µL	5	30 s

Limpeza		Eluição		
Solução	Volume	Solução	Volume	Nº de ciclos
H ₂ O+10% ácido fórmico:MeOH - (95:5, v/v)	200 µL	MeOH:NH ₄ OH - (90:10, v/v)	300 µL	1

Fonte: Próprio autor.

2.4.5. Validação analítica do método DPX MS/MS

O método DPX MS/MS foi validado segundo as normas preconizadas pela ANVISA para a determinação dos peptídeos A β 38, A β 40 e A β 42 em amostras de LCR de pacientes com Doença de Alzheimer.

a) Linearidade e LIQ

O método DPX MS/MS apresentou intervalos lineares que variaram de LIQ – 1,5 ng mL⁻¹ e coeficientes de determinação maiores que 0,99 (Tabela 6). O limite inferior de quantificação foi definido como a menor concentração determinada quantitativamente com exatidão e precisão aceitáveis.

Tabela 6. Intervalo linear, equação de regressão linear, coeficiente de determinação (R²) e limite inferior de quantificação (LIQ) para o método DPX-MS/MS.

Analito	Intervalo linear (ng mL ⁻¹) ¹⁾	Equação de regressão	R ²	LIQ (ng mL ⁻¹) ¹⁾
A β 42	0,1 – 1,5	y = 0,1531x - 0,0065	0,9915	0,1
A β 40	0,1 – 1,5	y = 0,1849x - 0,0025	0,9905	0,1
A β 38	0,1 – 1,5	y = 0,1796x + 0,0013	0,9938	0,1

b) Exatidão e Precisão

A Tabela 7 apresenta os valores de exatidão e precisão intra e intercorridas do método desenvolvido. Os valores de EPR variaram de -9,6% a 13,2% (exatidão intracorridas) e -13,6% a 12,1% (exatidão intercorridas). A precisão do método

apresentou valores de CV que variaram de 0,3% a 12,7% (precisão intracorridas) e 0,6% a 11,1% (precisão intercorridas). Todos esses valores estão em concordância com os limites estabelecidos pela ANVISA.

Tabela 7. Parâmetros de validação analítica para o método DPX MS/MS.

Analito	Concentração adicionada (ng mL ⁻¹)	Exatidão		Precisão	
		Intracorrida (%EPR) n=5	Intercorrida (%EPR) n=5	Intracorrida (%CV) n=5	Intercorrida (%CV) n=5
Aβ42	0,1	5,1	9,8	6,2	7,1
	0,2	10,0	10,3	1,2	0,9
	0,5	1,5	-4,5	8,1	10,2
	0,8	-9,6	-11,9	3,0	7,1
	1,0	2,4	6,7	8,6	6,3
	1,5	5,6	4,0	7,9	11,3
Aβ40	0,1	-0,3	-0,9	0,8	10,3
	0,2	13,2	8,0	0,3	0,6
	0,5	2,6	-0,3	4,1	4,0
	0,8	-9,0	-13,6	5,8	6,7
	1,0	2,5	6,2	8,6	5,6
	1,5	8,5	0,2	12,7	11,1
Aβ38	0,1	7,0	4,6	5,8	4,4
	0,2	12,1	12,1	0,3	7,6
	0,5	-2,7	0,2	6,8	4,9
	0,8	-8,7	-11,5	3,5	5,7
	1,0	12,1	5,4	10,0	9,7
	1,5	-3,3	1,4	6,8	7,0

c) Efeito residual e efeito matriz

O efeito residual foi avaliado com injeções de amostras de LCR branco de referência antes e após a análise de amostra LCR branco de referência enriquecida com os analitos na concentração correspondente ao limite superior de quantificação (LSQ). Nestas amostras branco de referência, os sinais analíticos no tempo de eluição dos analitos e do PI ficaram abaixo de 5% dos sinais analíticos correspondentes às amostras no LIQ. Estes valores obtidos encontram-se em concordância com os limites preconizados pela ANVISA.

O efeito da matriz biológica na supressão iônica foi avaliado por meio dos valores do fator de matriz normalizado, onde os coeficientes de variação foram menores do que 15%.

2.5. Aplicação do método DPX MS/MS

Em parceria com a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, o método DPX MS/SMS será aplicado na análise de amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer para avaliar a acurácia dos peptídeos A β como biomarcadores em diferentes níveis: (1) diagnóstico precoce da DA – comprometimento cognitivo leve, (2) acompanhamento da progressão da DA e (3) identificação do estágio da demência.

2.6. Conclusão

Diferentes variáveis relacionadas à separação cromatográfica e detecção (temperatura da coluna, composição da fase móvel, volume de amostra e modo de varredura) do método DPX UHPLC-MS/MS foram avaliadas. No entanto, o método DPX UHPLC-MS/MS não apresentou valores de linearidade adequada.

As análises diretas DPX MS/MS, apresentaram parâmetros de validação analítica adequados para a determinação de peptídeos A β em amostras de LCR, em razão da alta detectabilidade e seletividade da técnica MS/MS (modo SRM). Três procedimentos analíticos favoreceram a detectabilidade do método DPX MS/MS: (a) Infusão direta (solvente orgânico + aditivo) no espectrômetro de massas, (b) O uso da fonte ESI com vazão reduzida de fase móvel e (c) A etapa de pré-preparo da amostra com a adição de plasma de rato e solução de guanidina concentrada (diminuiu o efeito da matriz biológica). A otimização das variáveis DPX (pH da amostra, tempo de equilíbrio de sorção/dessorção, volume de amostra/número de ciclos e solução de eluição/número de ciclos) favoreceu a sensibilidade do método empregando pequenos volumes de amostra biológica e de solvente orgânico. Portanto, o método DPX MS/MS poderá ser empregado com confiabilidade na determinação de peptídeos A β em amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer para diagnóstico e acompanhamento do tratamento da doença de Alzheimer.

2.7. Comparação dos métodos *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS e DPX MS/MS com os trabalhos da literatura

Os métodos *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS e DPX MS/MS quando comparados com outros métodos publicados na literatura (Tabela 8) apresentaram algumas vantagens, tais como: menor custo, redução do consumo de solvente orgânico [24,26] e menor volume de amostra de LCR, redução no tempo durante a etapa de preparo de amostra [25,27–29].

Além disso, a reutilização do capilar monolítico é outra vantagem do método proposto sobre os métodos que usam placas SPE miniaturizado; e o procedimento de síntese capilar monolítica é mais simples do que o usado para desenvolver o revestimento líquido iônico polimérico zwitteriônico [14]. Embora o método *in-tube* SPME UHPLC-MS/MS tenha apresentado valores de LIQ superiores aos publicados anteriormente, sua faixa linear é adequada para determinar o peptídeo A β em amostras de LCR de pacientes com DA. Além disso, os valores de LIQ do método também estão relacionados à sensibilidade do sistema UHPLC-MS/MS.

A associação da técnica DPX com o sistema de espectrometria de massas sequencial (MS/MS), com fonte ESI de baixa vazão, proporcionou maior sensibilidade analítica ao método desenvolvido, e conseqüentemente foi possível atingir menores valores de limites de quantificação para os peptídeos A β . Além disso, o tempo total de análise foi menor em comparação aos outros trabalhos.

Tabela 8. Comparação dos diferentes métodos analíticos na determinação dos peptídeos A β em amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer.

Analitos	Volume de amostra (μ L)	Preparo de amostra	Sistema analítico	LIQ (ng mL ⁻¹)	Referência
A β 38					
A β 40	200	Online fiber in-tube SPME	MS/MS	0,2	[14]
A β 42					
A β 38					
A β 40	200	MCX μ SPE	LC-MS/MS	0,2	[24]
A β 42					
A β 38					
A β 40	300	Offline fiber in-tube SPME	LC-MS/MS	0,3	[25]
A β 42					
A β 38					
A β 40	200	MCX μ SPE	LC-MS/MS	0,3	[26]
A β 42					
A β 38					
A β 40	218	MCX μ SPE	LC-MS/MS	0,6	[27]
A β 42					
A β 38					
A β 40	300	HLB μ SPE	LC-MS/MS	0,4	[28]
A β 42					
A β 42	250	MCX μ SPE	2D-LC-MS/MS	0,6	[29]
A β 38					
A β 40	200	In-tube SPME	LC-MS/MS	0,6	Este estudo
A β 42					
A β 38					
A β 40	150	MCX-DPX	MS/MS	0,1	Este estudo
A β 42					

CONCLUSÃO FINAL

3. CONCLUSÃO FINAL

O desenvolvimento e validação dos métodos in-tube SPME UHPLC-MS/MS e DPX MS/MS para a determinação dos peptídeos A β em amostras de LCR apresentaram menor custo, redução do consumo de solvente orgânico, do volume de amostra biológica e do tempo de análise quando comparados aos métodos da literatura.

As fases (SPM-co-EDMA e Oasis MCX) apresentaram seletividade, capacidade sortiva, estabilidade mecânica e química adequadas para a extração dos peptídeos A β . A caracterização química e morfológica da fase monolítica orgânica com grupos sulfônicos (SPM-co-EDMA) comprovou a incorporação dos grupos trocadores de cátions e a homogeneidade.

O método in-tube SPME UHPLC-MS/MS desenvolvido e validado foi aplicado na determinação dos peptídeos A β em amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer. As concentrações determinadas estão de acordo com as reportadas na literatura.

O método DPX MS/MS desenvolvido e validado será aplicado na determinação dos peptídeos A β em amostras de LCR de pacientes com a Doença de Alzheimer para avaliar a acurácia dos peptídeos A β como biomarcadores em diferentes níveis: (1) diagnóstico precoce da DA – comprometimento cognitivo leve, (2) acompanhamento da progressão da DA e (3) identificação do estágio da demência.

REFERÊNCIAS

4. REFERÊNCIAS

- [1] G.M. McKhann, D.S. Knopman, H. Chertkow, B.T. Hyman, C.R. Jack, C.H. Kawas, W.E. Klunk, W.J. Koroshetz, J.J. Manly, R. Mayeux, R.C. Mohs, J.C. Morris, M.N. Rossor, P. Scheltens, M.C. Carrillo, B. Thies, S. Weintraub, C.H. Phelps, The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease, *Alzheimer's & Dementia*. 7 (2011) 263–269.
- [2] A.F.V. da S.F. Marques, T.A.S.C. Lapa, Anestesia e doença de Alzheimer – Percepções atuais, *Brazilian Journal of Anesthesiology*. 68 (2018) 174–182.
- [3] M. de A.C. Smith, Doença de Alzheimer, *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 21 (1999) 03–07.
- [4] K. Blennow, M.J. de Leon, H. Zetterberg, Alzheimer's disease, *The Lancet*. 368 (2006) 387–403.
- [5] C. Ballard, S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland, E. Jones, Alzheimer's disease, *The Lancet*. 377 (2011) 1019–1031.
- [6] S.L. Goodman, A. Gilman, J.G. Hardman, L.E. Limbird, *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.*, 1996.
- [7] R.J. Castellani, R.K. Rolston, M.A. Smith, Alzheimer Disease, *Disease-a-Month*. 56 (2010) 484–546.
- [8] S. Ferreira, M. João, Terapêutica farmacológica na doena de Alzheimer: progressos e esperanças futuras, *Arquivos de Medicina*. 27 (2013).
- [9] A. De Falco, D.S. Cukierman, R.A. Hauser-Davis, N.A. Rey, ALZHEIMER'S DISEASE: ETIOLOGICAL HYPOTHESES AND TREATMENT PERSPECTIVES, *Quim Nova*. (2015).
- [10] G.W. Small, P. V Rabins, P.P. Barry, N.S. Buckholtz, S.T. DeKosky, S.H. Ferris, S.I. Finkel, L.P. Gwyther, Z.S. Khachaturian, B.D. Lebowitz, T.D. McRae, J.C. Morris, F. Oakley, L.S. Schneider, J.E. Streim, T. Sunderland, L.A. Teri, L.E.

- Tune, Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society., *JAMA*. 278 (n.d.) 1363–71.
- [11] A. Alzheimer, *Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde.*, *Allgemeine Zeitschrift Für Psychiatrie Und Psychisch-Gerichtliche Medizin*. (1907) 146–148.
- [12] H.W. Querfurth, F.M. LaFerla, Alzheimer's Disease, *New England Journal of Medicine*. 362 (2010) 329–344.
- [13] Y.-H. Suh, F. Checler, Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease., *Pharmacol Rev*. 54 (2002) 469–525.
- [14] I.D. Souza, J.L. Anderson, V. Tumas, M.E.C. Queiroz, Direct coupling of fiber-in-tube solid-phase microextraction with tandem mass spectrometry to determine amyloid beta peptides as biomarkers for Alzheimer's disease in cerebrospinal fluid samples, *Talanta*. (2022) 124186.
- [15] P. Bros, V. Delatour, J. Vialaret, B. Lalere, N. Barthelemy, A. Gabelle, S. Lehmann, C. Hirtz, Quantitative detection of amyloid- β peptides by mass spectrometry: state of the art and clinical applications, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 53 (2015).
- [16] P.S. Aisen, S. Gauthier, B. Vellas, R. Briand, D. Saumier, J. Laurin, D. Garceau, *Alzhemed: a potential treatment for Alzheimer's disease.*, *Curr Alzheimer Res*. 4 (2007) 473–8.
- [17] K. Blennow, B. Dubois, A.M. Fagan, P. Lewczuk, M.J. Leon, H. Hampel, Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease, *Alzheimer's & Dementia*. 11 (2015) 58–69.
- [18] T.L.S. Benzinger, T. Blazey, C.R. Jack, R.A. Koeppe, Y. Su, C. Xiong, M.E. Raichle, A.Z. Snyder, B.M. Ances, R.J. Bateman, N.J. Cairns, A.M. Fagan, A. Goate, D.S. Marcus, P.S. Aisen, J.J. Christensen, L. Ercole, R.C. Hornbeck, A.M. Farrar, P. Aldea, M.S. Jasielc, C.J. Owen, X. Xie, R. Mayeux, A. Brickman, E. McDade, W. Klunk, C.A. Mathis, J. Ringman, P.M. Thompson, B. Ghetti, A.J. Saykin, R.A. Sperling, K.A. Johnson, S. Salloway, S. Correia, P.R. Schofield, C.L. Masters, C. Rowe, V.L. Villemagne, R. Martins, S. Ourselin, M.N. Rossor, N.C.

- Fox, D.M. Cash, M.W. Weiner, D.M. Holtzman, V.D. Buckles, K. Moulder, J.C. Morris, Regional variability of imaging biomarkers in autosomal dominant Alzheimer's disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110 (2013) E4502–E4509.
- [19] A. Anoop, P.K. Singh, R.S. Jacob, S.K. Maji, CSF Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis, *Int J Alzheimers Dis*. 2010 (2010) 1–12.
- [20] C.D. Aluise, R.A. Sowell, D.A. Butterfield, Peptides and proteins in plasma and cerebrospinal fluid as biomarkers for the prediction, diagnosis, and monitoring of therapeutic efficacy of Alzheimer's disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1782 (2008) 549–558.
- [21] H. Lu, X.-C. Zhu, T. Jiang, J.-T. Yu, L. Tan, Body fluid biomarkers in Alzheimer's disease., *Ann Transl Med*. 3 (2015) 70.
- [22] L.C. de Souza, M. Sarazin, A.L. Teixeira Júnior, P. Caramelli, A.E. dos Santos, B. Dubois, Biological markers of Alzheimer's disease, *Arq Neuropsiquiatr*. 72 (2014) 227–231.
- [23] B. Dubois, H. Hampel, H.H. Feldman, P. Scheltens, P. Aisen, S. Andrieu, H. Bakardjian, H. Benali, L. Bertram, K. Blennow, K. Broich, E. Cavedo, S. Crutch, J.-F. Dartigues, C. Duyckaerts, S. Epelbaum, G.B. Frisoni, S. Gauthier, R. Genthon, A.A. Gouw, M.-O. Habert, D.M. Holtzman, M. Kivipelto, S. Lista, J.-L. Molinuevo, S.E. O'Bryant, G.D. Rabinovici, C. Rowe, S. Salloway, L.S. Schneider, R. Sperling, M. Teichmann, M.C. Carrillo, J. Cummings, C.R. Jack, Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria, *Alzheimer's & Dementia*. 12 (2016) 292–323.
- [24] M.E. Lame, E.E. Chambers, M. Blatnik, Quantitation of amyloid beta peptides A β 1–38, A β 1–40, and A β 1–42 in human cerebrospinal fluid by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal Biochem*. 419 (2011) 133–139.
- [25] I.D. Souza, J.L. Anderson, M.E.C. Queiroz, Crosslinked zwitterionic polymeric ionic liquid-functionalized nitinol wires for fiber-in-tube solid-phase microextraction and UHPLC-MS/MS as an amyloid beta peptide binding protein assay in biological fluids, *Anal Chim Acta*. 1193 (2022) 339394.

- [26] J. Pannee, E. Portelius, M. Oppermann, A. Atkins, M. Hornshaw, I. Zegers, P. Höjrup, L. Minthon, O. Hansson, H. Zetterberg, K. Blennow, J. Gobom, A Selected Reaction Monitoring (SRM)-Based Method for Absolute Quantification of A β 38, A β 40, and A β 42 in Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's Disease Patients and Healthy Controls, *Journal of Alzheimer's Disease*. 33 (2013) 1021–1032.
- [27] P. Lin, W. Chen, F. Yuan, L. Sheng, Y. Wu, W. Zhang, G. Li, H. Xu, X. Li, An UHPLC–MS/MS method for simultaneous quantification of human amyloid beta peptides A β 1-38, A β 1-40 and A β 1-42 in cerebrospinal fluid using micro-elution solid phase extraction, *Journal of Chromatography B*. 1070 (2017) 82–91.
- [28] Y. Seino, T. Nakamura, T. Harada, N. Nakahata, T. Kawarabayashi, T. Ueda, M. Takatama, M. Shoji, Quantitative Measurement of Cerebrospinal Fluid Amyloid- β Species by Mass Spectrometry, *Journal of Alzheimer's Disease*. 79 (2021) 573–584.
- [29] M. Korecka, T. Waligorska, M. Figurski, J.B. Toledo, S.E. Arnold, M. Grossman, J.Q. Trojanowski, L.M. Shaw, Qualification of a Surrogate Matrix-Based Absolute Quantification Method for Amyloid- β 42 in Human Cerebrospinal Fluid Using 2D UPLC-Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Alzheimer's Disease*. 41 (2014) 441–451.
- [30] M.M. Budelier, R.J. Bateman, Biomarkers of Alzheimer Disease, *J Appl Lab Med*. 5 (2020) 194–208.
- [31] M. Korecka, L.M. Shaw, Mass spectrometry-based methods for robust measurement of Alzheimer's disease biomarkers in biological fluids, *J Neurochem*. (2021) jnc.15465.
- [32] K. Blennow, H. Hampel, M. Weiner, H. Zetterberg, Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease, *Nat Rev Neurol*. 6 (2010) 131–144.
- [33] S.C.N. Queiroz, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica, *Quim Nova*. 24 (2001).
- [34] R. Mayeux, L.S. Honig, M.-X. Tang, J. Manly, Y. Stern, N. Schupf, P.D. Mehta, Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk., *Neurology*. 61 (2003) 1185–90.

- [35] M. van Oijen, A. Hofman, H.D. Soares, P.J. Koudstaal, M.M. Breteler, Plasma A β 1–40 and A β 1–42 and the risk of dementia: a prospective case-cohort study, *Lancet Neurol.* 5 (2006) 655–660.
- [36] J.K. Lui, S.M. Laws, Q.-X. Li, V.L. Villemagne, D. Ames, B. Brown, A.I. Bush, K. De Ruyck, J. Dromey, K.A. Ellis, N.G. Faux, J. Foster, C. Fowler, V. Gupta, P. Hudson, K. Laughton, C.L. Masters, K. Pertile, A. Rembach, M. Rimajova, M. Rodrigues, C.C. Rowe, R. Rumble, C. Szoeki, K. Taddei, T. Taddei, B. Trounson, V. Ward, R.N. Martins, Plasma Amyloid- β as a Biomarker in Alzheimer's Disease: The AIBL Study of Aging, *Journal of Alzheimer's Disease.* 20 (2010) 1233–1242.
- [37] S.A. Cosentino, Y. Stern, E. Sokolov, N. Scarmeas, J.J. Manly, M.X. Tang, N. Schupf, R.P. Mayeux, Plasma β -Amyloid and Cognitive Decline, *Arch Neurol.* 67 (2010).
- [38] C. Laske, K. Sopova, C. Gkotsis, G.W. Eschweiler, G. Straten, M. Gawaz, T. Leyhe, K. Stellos, Amyloid- β peptides in plasma and cognitive decline after 1 year follow-up in Alzheimer's disease patients., *J Alzheimers Dis.* 21 (2010) 1263–9.
- [39] T. Wang, S. Xiao, Y. Liu, Z. Lin, N. Su, X. Li, G. Li, M. Zhang, Y. Fang, The efficacy of plasma biomarkers in early diagnosis of Alzheimer's disease, *Int J Geriatr Psychiatry.* 29 (2014) 713–719.
- [40] P. Lewczuk, J. Kornhuber, E. Vanmechelen, O. Peters, I. Heuser, W. Maier, F. Jessen, K. Bürger, H. Hampel, L. Frölich, F. Henn, P. Falkai, E. Rüther, H. Jahn, Ch. Luckhaus, R. Perneczky, K. Schmidtke, J. Schröder, H. Kessler, J. Pantel, H.-J. Gertz, H. Vanderstichele, G. de Meyer, F. Shapiro, S. Wolf, M. Bibl, J. Wiltfang, Amyloid β peptides in plasma in early diagnosis of Alzheimer's disease: A multicenter study with multiplexing, *Exp Neurol.* 223 (2010) 366–370.
- [41] W. Nowatzke, R. Delhaye, O. Bjornstal, K. Rogers, Y. Thomas, H. Riordan, Evaluation of the INNO-BIA Plasma A β Forms (INNOGENETICS) Commercial Kit for the Measurement of Beta Amyloid 40, 42, n-40 and n-42 in Human Plasma and Serum, *Alzheimer's & Dementia.* 6 (2010) S33.
- [42] K. Yaffe, A. Weston, N.R. Graff-Radford, S. Satterfield, E.M. Simonsick, S.G. Younkin, L.H. Younkin, L. Kuller, H.N. Ayonayon, J. Ding, T.B. Harris, Association of Plasma β -Amyloid Level and Cognitive Reserve With Subsequent Cognitive Decline, *JAMA.* 305 (2011) 261.

- [43] J.B. Toledo, H. Vanderstichele, M. Figurski, P.S. Aisen, R.C. Petersen, M.W. Weiner, C.R. Jack, W. Jagust, C. Decarli, A.W. Toga, E. Toledo, S.X. Xie, V.M.-Y. Lee, J.Q. Trojanowski, L.M. Shaw, Factors affecting A β plasma levels and their utility as biomarkers in ADNI, *Acta Neuropathol.* 122 (2011) 401–413.
- [44] K. Kim, M.-J. Kim, D.W. Kim, S.Y. Kim, S. Park, C.B. Park, Clinically accurate diagnosis of Alzheimer's disease via multiplexed sensing of core biomarkers in human plasma, *Nat Commun.* 11 (2020) 119.
- [45] J. Kamiie, S. Ohtsuki, R. Iwase, K. Ohmine, Y. Katsukura, K. Yanai, Y. Sekine, Y. Uchida, S. Ito, T. Terasaki, Quantitative Atlas of Membrane Transporter Proteins: Development and Application of a Highly Sensitive Simultaneous LC/MS/MS Method Combined with Novel In-silico Peptide Selection Criteria, *Pharm Res.* 25 (2008) 1469–1483.
- [46] H. Kawakami, S. Ohtsuki, J. Kamiie, T. Suzuki, T. Abe, T. Terasaki, Simultaneous Absolute Quantification of 11 Cytochrome P450 Isoforms in Human Liver Microsomes by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry with In Silico Target Peptide Selection, *J Pharm Sci.* 100 (2011) 341–352.
- [47] K. Watanabe, C. Ishikawa, H. Kuwahara, K. Sato, S. Komuro, T. Nakagawa, N. Nomura, S. Watanabe, M. Yabuki, A new methodology for simultaneous quantification of total-A β , A β _{x-38}, A β _{x-40}, and A β _{x-42} by column-switching LC/MS/MS, *Anal Bioanal Chem.* 402 (2012) 2033–2042.
- [48] M.C. Chiaradia, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos., *Química Nova* 2. 31 (2008) 623–636.
- [49] Z.-Y. Liu, An Introduction to Hybrid Ion trap/time-of-flight Mass Spectrometry Coupled With Liquid Chromatography Applied to Drug Metabolism Studies, *Journal of Mass Spectrometry.* 47 (2012) 1627–1642.
- [50] Y. Liu, K. Zhu, J. Wang, X. Huang, G. Wang, C. Li, J. Cao, S. Ding, Simultaneous detection and comparative pharmacokinetics of amoxicillin, clavulanic acid and prednisolone in cows' milk by UPLC–MS/MS, *Journal of Chromatography B.* 1008 (2016) 74–80.

- [51] K.L. Thoren, J.M. Colby, S.B. Shugarts, A.H.B. Wu, K.L. Lynch, Comparison of Information-Dependent Acquisition on a Tandem Quadrupole TOF vs a Triple Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometer for Broad-Spectrum Drug Screening, *Clin Chem.* 62 (2015) 170–178.
- [52] R. Eisert, J. Pawliszyn, Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography, *Anal Chem.* 69 (1997) 3140–3147.
- [53] M. Shamsayei, Y. Yamini, H. Asiabi, Electrochemically controlled fiber-in-tube solid-phase microextraction method for the determination of trace amounts of antipsychotic drugs in biological samples, *J Sep Sci.* 41 (2018) 3598–3606.
- [54] M.E. Costa Queiroz, I. Donizeti de Souza, C. Marchioni, Current advances and applications of in-tube solid-phase microextraction, *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 111 (2019) 261–278.
- [55] M. Sajid, M. Khaled Nazal, M. Rutkowska, N. Szczepańska, J. Namieśnik, J. Płotka-Wasyłka, Solid Phase Microextraction: Apparatus, Sorbent Materials, and Application, *Crit Rev Anal Chem.* 49 (2019) 271–288.
- [56] H. Piri-Moghadam, F. Ahmadi, J. Pawliszyn, A critical review of solid phase microextraction for analysis of water samples, *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 85 (2016) 133–143.
- [57] M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review, *Anal Chim Acta.* 906 (2016) 41–57.
- [58] H. Kataoka, K. Saito, Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis, *Bioanalysis.* 4 (2012) 809–832.
- [59] Y. Moliner-Martinez, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, C. Molins-Lagua, P. Campíns-Falcó, Recent advances of in-tube solid-phase microextraction, *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 71 (2015) 205–213.
- [60] C. Marchioni, Determinação de endocanabinóides e canabinóides em amostras biológicas de pacientes com a doença de Parkinson por cromatografia líquida de

ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem, Universidade de São Paulo, 2019.

- [61] C. Marchioni, T.M. Vieira, A.E. Miller Crotti, J.A. Crippa, M.E. Costa Queiroz, In-tube solid-phase microextraction with a dummy molecularly imprinted monolithic capillary coupled to ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine cannabinoids in plasma samples, *Anal Chim Acta*. 1099 (2020) 145–154.
- [62] H. Asiabi, Y. Yamini, S. Seidi, F. Ghahramanifard, Preparation and evaluation of a novel molecularly imprinted polymer coating for selective extraction of indomethacin from biological samples by electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction, *Anal Chim Acta*. 913 (2016) 76–85.
- [63] L. Beloti, L. Miranda, M. Queiroz, Butyl Methacrylate-Co-Ethylene Glycol Dimethacrylate Monolith for Online in-Tube SPME-UHPLC-MS/MS to Determine Chlormazine, Clozapine, Quetiapine, Olanzapine, and Their Metabolites in Plasma Samples, *Molecules*. 24 (2019) 310.
- [64] C.F. Grecco, L.F.C. Miranda, M.E. Costa Queiroz, 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, *Microchemical Journal*. 157 (2020) 105106.
- [65] L.F.C. Miranda, R.R. Gonçalves, M.E. C. Queiroz, A Dual Ligand Sol–Gel Organic-Silica Hybrid Monolithic Capillary for In-Tube SPME-MS/MS to Determine Amino Acids in Plasma Samples, *Molecules*. 24 (2019) 1658.
- [66] D.S. Domingues, I.D. de Souza, M.E.C. Queiroz, Analysis of drugs in plasma samples from schizophrenic patients by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry with organic–inorganic hybrid cyanopropyl monolithic column, *Journal of Chromatography B*. 993–994 (2015) 26–35.
- [67] L.C. de C. Abrão, E.C. Figueiredo, A new restricted access molecularly imprinted fiber for direct solid phase microextraction of benzodiazepines from plasma samples, *Analyst*. 144 (2019) 4320–4330.
- [68] I.D. Souza, L.P. Melo, I.C.S.F. Jardim, J.C.S. Monteiro, A.M.S. Nakano, M.E.C. Queiroz, Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access

- material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples, *Anal Chim Acta.* 932 (2016) 49–59.
- [69] I.D. Souza, L.W. Hantao, M.E.C. Queiroz, Polymeric ionic liquid open tubular capillary column for on-line in-tube SPME coupled with UHPLC-MS/MS to determine endocannabinoids in plasma samples, *Anal Chim Acta.* 1045 (2019) 108–116.
- [70] M.E.C. Queiroz, L.P. Melo, Recentes avanços da in-tube SPME-LC para bioanálises, *Scientia Chromatographica.* 5 (2013) 167–179.
- [71] A.M. Faria, C.B.G. Bottoli, I.C.S.F. Jardim, C.H. Collins, Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas, *Quim Nova.* 29 (2006) 300–309.
- [72] T. Nema, E.C.Y. Chan, P.C. Ho, Applications of monolithic materials for sample preparation, *J Pharm Biomed Anal.* 87 (2014) 130–141.
- [73] A. Sabarudin, Organic Polymer Monolith: Synthesis and Applications For bioanalytical, in: *Proceedings of the Seminar Nasional Kimia - National Seminar on Chemistry (SNK 2018)*, Atlantis Press, Paris, France, 2018.
- [74] D. Lan, L. Bai, X. Pang, H. Liu, H. Yan, H. Guo, In situ synthesis of a monolithic material with multi-sized pores and its chromatographic properties for the separation of intact proteins from human plasma, *Talanta.* 194 (2019) 406–414.
- [75] S. Eeltink, J.M. Herrero-Martinez, G.P. Rozing, P.J. Schoenmakers, W.Th. Kok, Tailoring the Morphology of Methacrylate Ester-Based Monoliths for Optimum Efficiency in Liquid Chromatography, *Anal Chem.* 77 (2005) 7342–7347.
- [76] E.F. Hilder, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Development and application of polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography, *J Chromatogr A.* 1044 (2004) 3–22.
- [77] J. Dong, J. Ou, X. Dong, R. Wu, M. Ye, H. Zou, Preparation and evaluation of rigid porous polyacrylamide-based strong cation-exchange monolithic columns for capillary electrochromatography, *J Sep Sci.* 30 (2007) 2986–2992.

- [78] J.C. Masini, F. Svec, Porous monoliths for on-line sample preparation: A review, *Anal Chim Acta*. 964 (2017) 24–44.
- [79] D. Hoegger, R. Freitag, Acrylamide-based monoliths as robust stationary phases for capillary electrochromatography, *J Chromatogr A*. 914 (2001) 211–222.
- [80] Z. Mao, Z. Chen, Monolithic column modified with bifunctional ionic liquid and styrene stationary phases for capillary electrochromatography, *J Chromatogr A*. 1480 (2017) 99–105.
- [81] Q.Ching. Wang, Frantisek. Svec, J.M.J. Fréchet, Macroporous polymeric stationary-phase rod as continuous separation medium for reversed-phase chromatography, *Anal Chem*. 65 (1993) 2243–2248.
- [82] Z. Lin, R. Yu, W. Hu, J. Zheng, P. Tong, H. Zhao, Z. Cai, Preparation of a poly(3'-azido-3'-deoxythymidine-co-propargyl methacrylate-co-pentaerythritol triacrylate) monolithic column by in situ polymerization and a click reaction for capillary liquid chromatography of small molecules and proteins, *Analyst*. 140 (2015) 4626–4635.
- [83] E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography. 1. Fine Control of Porous Properties and Surface Chemistry, *Anal Chem*. 70 (1998) 2288–2295.
- [84] E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography, *Anal Chem*. 69 (1997) 3646–3649.
- [85] E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography. 2. Effect of Chromatographic Conditions on the Separation, *Anal Chem*. 70 (1998) 2296–2302.
- [86] Frantisek. Svec, J.M.J. Fréchet, Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media, *Anal Chem*. 64 (1992) 820–822.

- [87] Y. Zhang, S. Lin, P. Jiang, X. Zhu, J. Ling, W. Zhang, X. Dong, Determination of melamine and cyromazine in milk by high performance liquid chromatography coupled with online solid-phase extraction using a novel cation-exchange restricted access material synthesized by surface initiated atom transfer radical polymerization, *J Chromatogr A*. 1337 (2014) 17–21.
- [88] F. Svec, C.G. Huber, Monolithic Materials: Promises, Challenges, Achievements, *Anal Chem*. 78 (2006) 2100–2107.
- [89] G. Guiochon, Monolithic columns in high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A*. 1168 (2007) 101–168.
- [90] S. Eeltink, S. Wouters, J.L. Dores-Sousa, F. Svec, Advances in organic polymer-based monolithic column technology for high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry profiling of antibodies, intact proteins, oligonucleotides, and peptides, *J Chromatogr A*. 1498 (2017) 8–21.
- [91] A. Nordborg, E.F. Hilder, Recent advances in polymer monoliths for ion-exchange chromatography, *Anal Bioanal Chem*. 394 (2009) 71–84.
- [92] M. JACOBY, MONOLITHIC CHROMATOGRAPHY, *Chemical & Engineering News*. 84 (2006) 14.
- [93] M. Lämmerhofer, F. Svec, J.M.J. Fréchet, W. Lindner, Capillary electrochromatography in anion-exchange and normal-phase mode using monolithic stationary phases, *J Chromatogr A*. 925 (2001) 265–277.
- [94] X. Ding, J. Yang, Y. Dong, Advancements in the preparation of high-performance liquid chromatographic organic polymer monoliths for the separation of small-molecule drugs, *J Pharm Anal*. 8 (2018) 75–85.
- [95] J. Zhong, M. Hao, R. Li, L. Bai, G. Yang, Preparation and characterization of poly(triallyl isocyanurate -co- trimethylolpropane triacrylate) monolith and its applications in the separation of small molecules by liquid chromatography, *J Chromatogr A*. 1333 (2014) 79–86.

- [96] D. Sýkora, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Separation of oligonucleotides on novel monolithic columns with ion-exchange functional surfaces, *J Chromatogr A*. 852 (1999) 297–304.
- [97] C. Legido-Quigley, N. Marlin, N.W. Smith, Comparison of styrene–divinylbenzene-based monoliths and Vydac nano-liquid chromatography columns for protein analysis, *J Chromatogr A*. 1030 (2004) 195–200.
- [98] B. Buszewski, M. Szumski, Study of Bed Homogeneity of Methacrylate-Based Monolithic Columns for Micro-HPLC and CEC, *Chromatographia*. 60 (2004).
- [99] T. Jiang, J. Jiskra, H.A. Claessens, C.A. Cramers, Preparation and characterization of monolithic polymer columns for capillary electrochromatography, *J Chromatogr A*. 923 (2001) 215–227.
- [100] B. Preinerstorfer, W. Bicker, W. Lindner, M. Lämmerhofer, Development of reactive thiol-modified monolithic capillaries and in-column surface functionalization by radical addition of a chromatographic ligand for capillary electrochromatography, *J Chromatogr A*. 1044 (2004) 187–199.
- [101] H. Fu, C. Xie, H. Xiao, J. Dong, J. Hu, H. Zou, Monolithic columns with mixed modes of reversed-phase and anion-exchange stationary phase for capillary electrochromatography, *J Chromatogr A*. 1044 (2004) 237–244.
- [102] H. Fu, C. Xie, J. Dong, X. Huang, H. Zou, Monolithic Column with Zwitterionic Stationary Phase for Capillary Electrochromatography, *Anal Chem*. 76 (2004) 4866–4874.
- [103] D. Lee, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Photopolymerized monolithic capillary columns for rapid micro high-performance liquid chromatographic separation of proteins, *J Chromatogr A*. 1051 (2004) 53–60.
- [104] M. Bedair, Z. El Rassi, Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases, *J Chromatogr A*. 1013 (2003) 35–45.
- [105] X. Huang, S. Zhang, G.A. Schultz, J. Henion, Surface-Alkylated Polystyrene Monolithic Columns for Peptide Analysis in Capillary Liquid

- Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Anal Chem.* 74 (2002) 2336–2344.
- [106] B.M. Novak, R.H. Grubbs, Catalytic organometallic chemistry in water: the aqueous ring-opening metathesis polymerization of 7-oxanorbornene derivatives, *J Am Chem Soc.* 110 (1988) 7542–7543.
- [107] K.D. Vernon-Parry, Scanning electron microscopy: an introduction, *III-Vs Review.* 13 (2000) 40–44.
- [108] A. Premstaller, H. Oberacher, C.G. Huber, High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Single- and Double-Stranded Nucleic Acids Using Monolithic Capillary Columns, *Anal Chem.* 72 (2000) 4386–4393.
- [109] J. Zhong, M. Hao, R. Li, L. Bai, G. Yang, Preparation and characterization of poly(triallyl isocyanurate -co- trimethylolpropane triacrylate) monolith and its applications in the separation of small molecules by liquid chromatography, *J Chromatogr A.* 1333 (2014) 79–86.
- [110] I. Nischang, O. Brüggemann, On the separation of small molecules by means of nano-liquid chromatography with methacrylate-based macroporous polymer monoliths, *J Chromatogr A.* 1217 (2010) 5389–5397.
- [111] K. Liu, H.D. Tolley, M.L. Lee, Highly crosslinked polymeric monoliths for reversed-phase capillary liquid chromatography of small molecules, *J Chromatogr A.* 1227 (2012) 96–104.
- [112] R. Li, J. Zhong, M. Hao, L. Bai, G. Yang, Preparation of a porous functional polymer and its application in the separation of small molecules in conjunction with HPLC, *Anal. Methods.* 6 (2014) 589–595.
- [113] A. Dąbrowski, Adsorption — from theory to practice, *Adv Colloid Interface Sci.* 93 (2001) 135–224.

- [114] K.S.W. Sing, Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984), *Pure and Applied Chemistry*. 57 (1985) 603–619.
- [115] S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller, Adsorption of Gases in Multimolecular Layers, *J Am Chem Soc*. 60 (1938) 309–319.
- [116] E.P. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halenda, The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms, *J Am Chem Soc*. 73 (1951) 373–380.
- [117] N. Tanaka, D. V. McCalley, Core–Shell, Ultrasmall Particles, Monoliths, and Other Support Materials in High-Performance Liquid Chromatography, *Anal Chem*. 88 (2016) 279–298.
- [118] V. González-Ruiz, A.I. Olives, M.A. Martín, Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 64 (2015) 17–28.
- [119] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, Core–shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography, *J Chromatogr A*. 1357 (2014) 36–52.
- [120] S. Hooshfar, B. Basiri, M.G. Bartlett, Development of a surrogate matrix for cerebral spinal fluid for liquid chromatography/mass spectrometry based analytical methods, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 30 (2016) 854–858.
- [121] J.R. Fogh, A.-M. Jacobsen, T.T.T.N. Nguyen, K.D. Rand, L.R. Olsen, Investigating surrogate cerebrospinal fluid matrix compositions for use in quantitative LC-MS analysis of therapeutic antibodies in the cerebrospinal fluid, *Anal Bioanal Chem*. 412 (2020) 1653–1661.
- [122] L. Dillen, W. Cools, L. Vereyken, P. Timmerman, A screening UHPLC–MS/MS method for the analysis of amyloid peptides in cerebrospinal fluid of preclinical species, *Bioanalysis*. 3 (2011) 45–55.

- [123] T.D. Ho, B.R. Toledo, L.W. Hantao, J.L. Anderson, Chemical immobilization of crosslinked polymeric ionic liquids on nitinol wires produces highly robust sorbent coatings for solid-phase microextraction, *Anal Chim Acta.* 843 (2014) 18–26.
- [124] S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller, Adsorption of Gases in Multimolecular Layers, *J Am Chem Soc.* 60 (1938) 309–319.
- [125] S. Souverain, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures, *J Chromatogr A.* 1058 (2004) 61–66.
- [126] S. Bruns, D. Stoeckel, B.M. Smarsly, U. Tallarek, Influence of particle properties on the wall region in packed capillaries, *J Chromatogr A.* 1268 (2012) 53–63.
- [127] D. Visky, Vanderheyden Y, T. Ivanyi, P. Baten, J. Debeer, Z. Kovacs, B. Noszal, P. Dehouck, E. Roets, D. Massart, Characterisation of reversed-phase liquid chromatographic columns by chromatographic tests Rational column classification by a minimal number of column test parameters, *J Chromatogr A.* 1012 (2003) 11–29.
- [128] I.D. de Souza, Prospecção de novos capilares revestidos com líquidos iônicos para in-tube SPME-UHPLC-MS/MS e cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC x GC), Universidade de São Paulo, 2019.
- [129] K. Liu, H.D. Tolley, J.S. Lawson, M.L. Lee, Highly crosslinked polymeric monoliths with various C6 functional groups for reversed-phase capillary liquid chromatography of small molecules, *J Chromatogr A.* 1321 (2013) 80–87.
- [130] Y. Li, H.D. Tolley, M.L. Lee, Preparation of monoliths from single crosslinking monomers for reversed-phase capillary chromatography of small molecules, *J Chromatogr A.* 1218 (2011) 1399–1408.
- [131] S. Mushtaq, N.M. Ahmad, H. Nasir, A. Mahmood, H.A. Janjua, Transpicious-Cum-Fouling Resistant Copolymers of 3-Sulfopropyl Methacrylate and Methyl Methacrylate for Optronics Applications in Aquatic Medium and Healthcare, *Advances in Polymer Technology.* 2020 (2020) 1–11.

- [132] R. Patel, W.S. Chi, S.H. Ahn, C.H. Park, H.-K. Lee, J.H. Kim, Synthesis of poly(vinyl chloride)-g-poly(3-sulfopropyl methacrylate) graft copolymers and their use in pressure retarded osmosis (PRO) membranes, *Chemical Engineering Journal*. 247 (2014) 1–8.
- [133] J. Gu, S. Yuan, W. Shu, W. Jiang, S. Tang, B. Liang, S.O. Pehkonen, PVBC microspheres tethered with poly(3-sulfopropyl methacrylate) brushes for effective removal of Pb(II) ions from aqueous solution, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 498 (2016) 218–230.
- [134] L.G.M. Beloti, Desenvolvimento do método in-tube SPME-UHPLC-MS/MS para a determinação de antipsicóticos e seus metabólitos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos, Universidade de São Paulo, 2020.
- [135] T. Mai, K. Wolski, A. Puciul-Malinowska, A. Kopyshv, R. Gräf, M. Bruns, S. Zapotoczny, A. Taubert, Anionic Polymer Brushes for Biomimetic Calcium Phosphate Mineralization—A Surface with Application Potential in Biomaterials, *Polymers (Basel)*. 10 (2018) 1165.
- [136] J. Pannee, E. Portelius, L. Minthon, J. Gobom, U. Andreasson, H. Zetterberg, O. Hansson, K. Blennow, Reference measurement procedure for CSF amyloid beta (A β) 1-42 and the CSF A β 1-42 /A β 1-40 ratio - a cross-validation study against amyloid PET, *J Neurochem*. 139 (2016) 651–658.
- [137] O. Hansson, S. Rutz, H. Zetterberg, E. Bauer, T. Hähl, E. Manuilova, M.C. Mert, S. Wahl, K. Blennow, E. Stomrud, Pre-analytical protocol for measuring Alzheimer's disease biomarkers in fresh CSF, *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*. 12 (2020).
- [138] S. Janelidze, H. Zetterberg, N. Mattsson, S. Palmqvist, H. Vanderstichele, O. Lindberg, D. Westen, E. Stomrud, L. Minthon, K. Blennow, O. Hansson, CSF AB42/AB40 and AB42/AB38 ratios: better diagnostic markers of Alzheimer disease, *Ann Clin Transl Neurol*. 3 (2016) 154–165.
- [139] I. Baldeiras, I. Santana, M.J. Leitão, H. Gens, R. Pascoal, M. Tábuas-Pereira, J. Beato-Coelho, D. Duro, M.R. Almeida, C.R. Oliveira, Addition of the A β 42/40 ratio to the cerebrospinal fluid biomarker profile increases the predictive value for underlying Alzheimer's disease dementia in mild cognitive impairment, *Alzheimers Res Ther*. 10 (2018) 33.

- [140] O. Hansson, S. Lehmann, M. Otto, H. Zetterberg, P. Lewczuk, Advantages and disadvantages of the use of the CSF Amyloid β (A β) 42/40 ratio in the diagnosis of Alzheimer's Disease, *Alzheimers Res Ther.* 11 (2019) 34.
- [141] W.E. Brewer, Disposable pipette extraction, US 6,566,145 B2, 2003.
- [142] Z. Li, Y. Li, X. Liu, X. Li, L. Zhou, C. Pan, Multiresidue Analysis of 58 Pesticides in Bean Products by Disposable Pipet Extraction (DPX) Cleanup and Gas Chromatography–Mass Spectrometry Determination, *J Agric Food Chem.* 60 (2012) 4788–4798.
- [143] A.L. Oenning, J. Merib, E. Carasek, An effective and high-throughput analytical methodology for pesticide screening in human urine by disposable pipette extraction and gas chromatography – mass spectrometry, *Journal of Chromatography B.* 1092 (2018) 459–465.
- [144] L. Tavares, R. Bernardo, A. de Oliveira, B. Vaz, A. Chaves, Novel Method for the Extraction of Cocaine from Oral Fluid by Means of Disposable Pipette Modified with Restricted Access Material, *J Braz Chem Soc.* (2021).
- [145] S.C. Tan, H.K. Lee, Graphitic carbon nitride as sorbent for the emulsification-enhanced disposable pipette extraction of eight organochlorine pesticides prior to GC-MS analysis, *Microchimica Acta.* 187 (2020) 129.
- [146] S.C. Tan, H.K. Lee, Fully automated graphitic carbon nitride-based disposable pipette extraction-gas chromatography-mass spectrometric analysis of six polychlorinated biphenyls in environmental waters, *J Chromatogr A.* 1637 (2021) 461824.
- [147] K. Garcia, M. Frena, O. Bittencourt, H. Magosso, E. Carasek, L. Madureira, A Green Procedure Using Disposable Pipette Extraction to Determine Polycyclic Aromatic Sulfur Heterocycles in Water Samples and Solid Petrochemical Residues, *J Braz Chem Soc.* (2021).
- [148] L. Valderrama, P. Valderrama, P.H. Março, J. Merib, E. Carasek, Estrogens determination through disposable pipette extraction coupled to ultraviolet spectroscopy and nonlinear pseudo-univariate calibration: Solving rank deficiency problems, *J Chemom.* 34 (2020).

- [149] G. Corazza, J. Merib, S. do Carmo, L. Mendes, E. Carasek, Assessment of a Fully Optimized DPX-Based Procedure for the Multiclass Determination of Pesticides in Drinking Water Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection, *J Braz Chem Soc.* (2019).
- [150] H. Zhang, Y. Li, J. Zhu, H. Li, D. Li, Z. Liu, X. Sun, B. Wang, Q. Wang, Y. Gao, Disposable Pipette Extraction (DPX) Coupled with Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for the Simultaneous Determination of Pesticide Residues in Wine Samples, *Food Anal Methods.* 12 (2019) 2262–2272.
- [151] Z. Lu, N. Fang, Z. Zhang, Z. Hou, Z. Lu, Y. Li, Residue analysis of fungicides fenpicoxamid, isofetamid, and mandestrobin in cereals using zirconium oxide disposable pipette extraction clean-up and ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A.* 1620 (2020) 461004.
- [152] D.C.M. Bordin, M.N.R. Alves, E.G. de Campos, B.S. De Martinis, Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art, *J Sep Sci.* 39 (2016) 1168–1172.
- [153] T.A.V. Brigante, Desenvolvimento de polímeros de impressão molecular para microextração em ponteiras de bisfenol A em amostras de urina e análise por GC-MS, Universidade de São Paulo, 2015.
- [154] M.A.L.P. de Melo, Desenvolvimento de fases extratoras seletivas para técnicas de microextração para a determinação de fármacos e endocanabinóide em amostras de plasma por LC-MS/MS, Universidade de São Paulo, 2018.
- [155] Waters Corporation, Oasis sample preparation products: chemistry and formats, 2010.
- [156] D.C. Mozaner Bordin, M.N.R. Alves, O.G. Cabrices, E.G. de Campos, B.S. De Martinis, A Rapid Assay for the Simultaneous Determination of Nicotine, Cocaine and Metabolites in Meconium Using Disposable Pipette Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS), *J Anal Toxicol.* 38 (2014) 31–38.
- [157] T. Kumazawa, C. Hasegawa, X.-P. Lee, A. Marumo, N. Shimmen, A. Ishii, H. Seno, K. Sato, Pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography–mass

- spectrometry for the determination of mequitazine in human plasma, *Talanta*. 70 (2006) 474–478.
- [158] H. Guan, W.E. Brewer, S.L. Morgan, New Approach to Multiresidue Pesticide Determination in Foods with High Fat Content Using Disposable Pipette Extraction (DPX) and Gas Chromatography–Mass spectrometry (GC-MS), *J Agric Food Chem*. 57 (2009) 10531–10538.
- [159] M.A.L. Pinto, M.E.C. Queiroz, Extração em ponteiros descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações, *Scientia Chromatographica*. 7 (2015) 101–108.
- [160] H. Wang, P. Bennett, Performance assessment of microflow LC combined with high-resolution MS in bioanalysis, *Bioanalysis*. 5 (2013) 1249–1267.
- [161] R. Raina, M.L. Etter, Liquid Chromatography with Post-Column Reagent Addition of Ammonia in Methanol Coupled to Negative Ion Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry for Determination of Phenoxyacid Herbicides and their Degradation Products in Surface Water, *Anal Chem Insights*. 5 (2010) ACI.S3148.
- [162] D.B. Mawhinney, R.D. Stanelle, E.I. Hamelin, R.J. Kobelski, Enhancing the response of alkyl methylphosphonic acids in negative electrospray ionization liquid chromatography tandem mass spectrometry by post-column addition of organic solvents, *J Am Soc Mass Spectrom*. 18 (2007) 1821–1826.
- [163] X. Feng, P. Xiang, H. Chen, M. Shen, LC–MS-MS with Post-Column Reagent Addition for the Determination of Zolpidem and its Metabolite Zolpidem Phenyl-4-carboxylic Acid in Oral Fluid after a Single Dose, *J Anal Toxicol*. 41 (2017) 735–743.
- [164] S.T. Ellison, W.E. Brewer, S.L. Morgan, Comprehensive Analysis of Drugs of Abuse in Urine Using Disposable Pipette Extraction, *J Anal Toxicol*. 33 (2009) 356–365.

ANEXOS



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



Caroline Fernandes Grecco, Luis Felipe Cabral Miranda, Maria Eugênia Costa Queiroz*

Departamento de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Hybrid organic-inorganic silica monolith
Mesoporous SBA-15 particles
In-tube SPME
HILIC-MS/MS
Plasma samples
Parkinson's Disease

ABSTRACT

This manuscript describes an automated method that combines the selectivity of in-tube solid-phase micro-extraction (in-tube SPME) with the sensitivity of liquid hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS) to determine levodopa, carbidopa, benserazide, dopamine, and 3-O-methyldopa in plasma samples. An aminopropyl hybrid silica monolithic capillary containing mesoporous Santa Barbara Amorphous (SBA-15) particles for in-tube SPME was prepared by sol-gel reactions (one step). The organic-inorganic hybrid silica monolithic capillary was reused over fifty times without significant extraction efficiency loss, which attested to its robustness. The FTIR spectra displayed readily identifiable peaks that were characteristic of aminopropyl groups. SEM and TEM micrographs showed that the monolithic phase consisted of a homogeneous, continuous, and mesoporous skeleton composed of interconnected ordered particles. The developed method afforded adequate linearity at concentrations ranging from the lower limit of quantification (1.2–170 ng mL⁻¹) to the upper limit of quantification (2000 ng mL⁻¹), and the coefficients of correlation (*r*) were higher than 0.99. The method was validated with intra-day and inter-day precision and accuracy. In-tube SPME-HILIC-MS/MS was successfully developed to determine levodopa, carbidopa, benserazide, dopamine, and 3-O-methyldopa in plasma samples obtained from patients with Parkinson's Disease for therapeutic drug monitoring purposes.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a chronic progressive neurodegenerative disorder of the central nervous system that is characterized by motor (resting tremor, rigidity, bradykinesia, and postural instability) and non-motor (sleep disturbance, delusions, and hallucinations) symptoms [1,2]. Its pathological features include dopaminergic neuron degeneration in the substantia nigra pars compacta, which culminates in severe functional neuronal circuitry disturbance in the basal ganglia and significant decrease in dopamine levels in the striatum [1,3].

The most common treatment of PD is based on a dopamine replacement strategy. Levodopa, a natural dopamine precursor, is the most efficacious and best tolerated drug for dopaminergic substitution therapy [4,5]. In the peripheral system, some of the systematically administered levodopa undergoes decarboxylation by aromatic amino acid decarboxylase (AADC) and is converted to dopamine, which cannot cross the blood-brain barrier (BBB) and enter the brain [6–8]. The levodopa that is not decarboxylated by AADC in the peripheral

system reaches the striatum, where it is metabolized, released, and taken up (mainly by dopaminergic neurons), and converted to dopamine [6].

Levodopa has been administered concomitantly with dopa decarboxylase inhibitors (DDI) such as carbidopa or benserazide [9]. These inhibitors reduce both the peripheral (extracerebral tissues) levodopa decarboxylation to dopamine (thereby increasing levodopa availability in the striatum and its later conversion to dopamine) and the extracerebral side effects associated with long-term therapy with levodopa [4,10].

Patients in continued treatment with levodopa may present shortened clinical response to levodopa. For this reason, they require higher and more frequent levodopa doses, which leads to motor fluctuations (wearing-off) and dyskinesia [11,12]. Combination therapy involving levodopa and an inhibitor markedly reduces the required levodopa dose and the incidence of motor fluctuation and dyskinesia [13,14]. Motor fluctuations can emerge as early as five to six months after treatment with larger doses of levodopa (≥ 600 mg/day) is initiated [15]. However, 70% of the patients in therapy with levodopa/carbidopa

* Corresponding author.

E-mail address: mariaeqn@frcirp.usp.br (M.E. Costa Queiroz).

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105106>

Received 16 March 2020; Received in revised form 28 May 2020; Accepted 28 May 2020

Available online 01 June 2020

0026-265X/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Novel materials as capillary coatings for in-tube solid-phase microextraction for bioanalysis

Caroline Fernandes Grecco  | Israel Donizeti de Souza  |
Maria Eugênia Costa Queiroz 

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence

Prof. Maria Eugênia Costa Queiroz, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
Email: mariaeqn@ffclrp.usp.br

Funding information

FAPESP, Grant/Award Numbers: 2017/02147-0, 2019/04386-7, 2019/19485-0, 2020/00126-8; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Grant/Award Number: 465458/2014-9

In-tube solid-phase microextraction with a capillary column as extraction device can be directly coupled with high-performance liquid chromatography systems (HPLC). The in-tube solid-phase microextraction technique has been continuously developed since it was introduced in 1997. New couplings have also been evaluated on the basis of state-of-the-art HPLC instruments. Different types of capillaries (wall-coated open tubular, porous layer open tubular, sorbent-packed, porous monolithic rods, or fiber-packed) with selective stationary phases (monoliths, magnetic nanoparticles, conducting polymers, restricted access materials, ionic liquids, carbon, deep eutectic solvents, and hybrid materials) have been developed to boost in-tube solid-phase microextraction performance (sorption capacity and selectivity). This technique has been successfully applied to analyze biological samples (serum, plasma, whole blood, hair, urine, milk, skin, and saliva) for therapeutic drug monitoring, to study biomarkers, to detect illicit drugs, to conduct metabolomics studies, and to assess exposure to drugs. This review describes current advances in in-tube solid-phase microextraction extraction devices and their application in bioanalysis.

KEYWORDS

bioanalysis, capillary coatings, in-tube solid-phase microextraction, online systems

1 | INTRODUCTION

Bioanalysis is a subdiscipline of analytical chemistry that quantitatively measures xenobiotics (chemically

Article Related Abbreviations: CapLC, capillary liquid chromatography; CME, capillary microextraction; DES, deep eutectic solvent; EGDMA, ethylene glycol dimethacrylate; GO, graphene oxide; IL, ionic liquid; in-tube SPME, in-tube solid-phase microextraction; LDH, layered double hydroxide; MIP, molecularly imprinted polymer; MWCNT, multi-walled carbon nanotube; NP, nanoparticle; PANI, polyaniline; PDMS, polydimethylsiloxane; PEDOT, poly(3,4-ethylenedioxythiophene); PEEK, polyether ether ketone; PIL, polymeric ionic liquid; PLOT, porous layer open tubular; PPy, polypyrrole; PTh, polythiophene; RAM, restricted access material; SDS, sodium dodecyl sulfate; SS, stainless steel; SWCNT, single-walled carbon nanotube; WCOT, wall-coated open tubular

synthesized or naturally extracted drugs, genetically produced biological molecules and their metabolites, and post-translationally modified products) and biotics (macromolecules, proteins, DNA, large drug molecules, and metabolites) in biological systems. In biological matrixes, the target analytes coexist with much higher concentrations of exogenous and endogenous compounds whose chemical structures resemble the structures of the analytes.

Unfortunately, during chromatographic separation, the endogenous compounds of biological samples (organic molecules such as peptides, carbohydrates, amines, lipids, peptides, and phospholipids) can coelute with the target analytes. Moreover, some of these endogenous compounds can irreversibly adsorb onto the analytical column



Recent advances in column switching high-performance liquid chromatography for bioanalysis

Jonas Carneiro Cruz^a, Israel Donizeti de Souza^a, Caroline Fernandes Grecco^a, Eduardo Costa Figueiredo^b, Maria Eugênia Costa Queiroz^{a,*}

^a Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-901, Brasil

^b Laboratory of Toxicant and Drugs Analysis, Federal University of Alfenas – UNIFAL-MG, Alfenas, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Column switching liquid chromatography
Online sample preparation
High-performance liquid chromatography
Bioanalysis

ABSTRACT

Bioanalysis is a relevant area of analytical chemistry for clinical studies. Biological samples are complex and diverse, so sample preparation represents a challenge when chromatographic methods are developed. According to the principles of green analytical chemistry (GAC), recent trends in sample preparation include miniaturization, automation (online coupling to the analytical instrument), and high-throughput performance. In this context, column switching liquid chromatography stands out as a multidimensional chromatographic method in which an extraction column is directly coupled to high-performance liquid chromatography (HPLC) systems. This online method consists of two steps and involves two columns, the extraction and the chromatographic columns. In the former column, the analytes are isolated from the sample and preconcentrated; in the latter column, the analytes are separated. Online systems improve the sensitivity and accuracy of analytical methods, consume lower amounts of organic solvents, and minimize sample handling. This review summarizes state-of-the-art column switching liquid chromatography and focuses on selective stationary phases for preconcentration of analytes (first dimension), including reversed phases, monolithic phases, restricted access materials (RAMs), and molecularly imprinted polymers (MIP). Principles, instrumental aspects, applications in bioanalysis, and future trends in column switching liquid chromatography are also discussed.

1. Introduction

Bioanalysis, an area of analytical chemistry, is applied in medical diagnosis, clinical treatment, anti-doping tests, studies on biomarkers, and forensic and pharmacokinetic investigations (Ocaña-González et al., 2016). However, analyzing target molecules in biological samples is no easy task: analytes often exist at trace levels and must be isolated from complex biological matrixes at an adequate level, so that they can be quantified without interferences (Nazario et al., 2017). Previous sample preparation is required even for the most sensitive and selective analytical instruments.

Sample preparation is the most complex and polluting step in analytical chemistry (Tobiszewski et al., 2009). Conventional extraction techniques based on solid or liquid sorbents have been employed, but

they involve manual procedures and demand large solvent and sample volumes, thereby exposing the analyst to biological hazards and toxic reagents. Additionally, manual procedures are repetitive and time-consuming, which may result in occupational diseases, errors, and reproducibility loss. Therefore, the scientific community has engaged in developing safer strategies that comply with the principles of green analytical chemistry (GAC).

GAC, a concept originating from green chemistry, recommends the use of safer analytical procedures with low environmental impact (Silveira et al., 2019). When it comes to adjusting the analysis to the GAC concept, sample preparation is the most critical step in the analytical sequence. Miniaturized sample preparation techniques like solid and liquid phase microextraction consume lower amounts of reagents (Armenta et al., 2019; Ocaña-González et al., 2016; Spietelun et al.,

Abbreviations: ADS, Alkyl-diol-silica; BSA, Bovine sérum albumin; GAC, Green analytical chemistry; LC, Liquid chromatography; LC-MS/MS, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LOD, Limit of detection; LOQ, Limit of quantification; MIP, Molecularly imprinted polymer; RACNT, Restricted access to carbon nanotubes; RAMIP, Restricted access molecularly imprinted polymer (RAMIP); RAMs, Restricted access materials; RP, Reversed-phase; TDM, therapeutic drug monitoring; THCCOOH, 11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol; UV, Ultraviolet.

* Corresponding author.

E-mail address: mariaeqn@ffclrp.usp.br (M.E.C. Queiroz).

<https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100431>





Received 26 November 2020; Received in revised form 12 March 2021; Accepted 3 April 2021

Available online 28 April 2021

2352-5541/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Review

In-Tube Solid-Phase Microextraction Directly Coupled to Mass Spectrometric Systems: A Review

Caroline Fernandes Grecco , Israel Donizeti de Souza , Igor Gustavo Carvalho Oliveira 
and Maria Eugênia Costa Queiroz * 

Department of Chemistry, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14040900, Brazil
* Correspondence: mariaeqn@ffclrp.usp.br; Tel.: +55-163315-9172

Abstract: Since it was introduced in 1997, in-tube solid-phase microextraction (in-tube SPME), which uses a capillary column as extraction device, has been continuously developed as online microextraction coupled to LC systems (in-tube SPME-LC). In the last decade, new couplings have been evaluated on the basis of state-of-the-art LC instruments, including direct coupling of in-tube SPME to MS/MS systems, without chromatographic separation, for high-throughput analysis. In-tube SPME coupling to MS/MS has been possible thanks to the selectivity of capillary column coatings and MS/MS systems (SRM mode). Different types of capillary columns (wall-coated open-tubular, porous-layer open-tubular, sorbent-packed, porous monolithic rods, or fiber-packed) with selective stationary phases have been developed to increase the sorption capacity and selectivity of in-tube SPME. This review focuses on the in-tube SPME principle, extraction configurations, current advances in direct coupling to MS/MS systems, experimental parameters, coatings, and applications in different areas (food, biological, clinical, and environmental areas) over the last years.

Keywords: in-tube SPME; state-of-the-art coupling of instruments; selective capillary coating; recent applications in different areas



Citation: Grecco, C.F.; de Souza, I.D.; Oliveira, I.G.C.; Queiroz, M.E.C. In-Tube Solid-Phase Microextraction Directly Coupled to Mass Spectrometric Systems: A Review. *Separations* **2022**, *9*, 394. <https://doi.org/10.3390/separations9120394>

Academic Editors: Maria José Trujillo-Rodríguez and Verónica Pino

Received: 27 October 2022
Accepted: 23 November 2022
Published: 26 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Sample preparation is an important step when analyzing complex samples (e.g., food, biological, and environmental samples) by chromatography—in these samples, the target analytes coexist with higher concentrations of interferents (exogenous and endogenous compounds) [1,2]. The main purposes of the sample preparation step include removing the interfering species and isolating and pre-concentrating the target analytes (trace levels). Thus, this step increases the selectivity and sensitivity of chromatographic methods [3,4].

Unfortunately, interferents can coelute with the target analytes, or they can irreversibly adsorb onto the vanguard pre-column. Consequently, the backpressure of the liquid chromatography (LC) system increases and/or ion formation is suppressed during electrospray ionization in mass spectrometry analysis (ESI-MS), decreasing the analytical sensitivity of the method [5,6].

Conventional offline sample preparation techniques generally require laborious procedures, which make them a time-consuming step of the analytical process (corresponding to 80% of the total analysis time). Additionally, the target analytes can be lost during multistep sample preparation [7]. Modern sample preparation techniques have focused on selective new sorbent materials, miniaturization, and automation of the analytical systems. These innovations reduce organic solvent consumption and sample volume and favor high-throughput performance of analytical systems [8]. In this context, in-tube solid-phase microextraction (in-tube SPME) is worthy of mention.

In-tube SPME was initially proposed by Eisert and Pawliszy in 1997 [9] to overcome difficulties inherent to SPME fibers (first generation), including low sorption capacity, limited effectiveness for weakly volatile or thermally labile compounds, and stability



Contents lists available at ScienceDirect

Trends in Analytical Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/trac

In vivo solid phase microextraction for bioanalysis

Maria Eugênia Costa Queiroz^{*}, Israel Donizeti de Souza, Igor Gustavo de Oliveira, Caroline Fernandes Grecco

Universidade de São Paulo, Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 January 2022
Received in revised form
21 April 2022
Accepted 22 April 2022
Available online 27 April 2022

Keywords:
In vivo SPME
Bioanalysis
Biocompatible SPME fibers
in vivo SPME – AMS

ABSTRACT

Solid phase microextraction (SPME) is a rapid, well-established, and solvent-free sample preparation technique. It has usually been hyphenated with GC-MS or LC-MS/MS to separate and to detect enriched analytes. In recent years, ambient ionization techniques have been developed fast. This has allowed MS to be used for direct and straightforward SPME analysis of complex samples, dismissing the need for chromatographic separation. SPME sampling disturbs systems to a minimum—it removes (extracts) only small fractions of analytes. Therefore, *in vivo* analysis is a special application area where SPME is gaining ground.

This review summarizes state-of-the-art *in vivo* SPME for bioanalysis (in human, rats, fishes, rhesus macaque, frog, and living cattle), including biocompatible SPME coatings, sampling approaches for *in vivo* SPME (skin, exhaled breath, saliva, blood, muscle, and brain sampling), analytical/detection systems, and calibration methods. This review also discusses *in vivo* SPME applications (pharmacokinetic studies, exposure, biomarkers, diagnosis, doping control, lipidomics, drug analysis, cosmetic dermatology, bioaccumulation, biomonitoring, environmental pollutants, and therapeutic drug monitoring) and future trends in *in vivo* SPME bioanalysis.

© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bioanalysis refers to identifying or measuring xenobiotics (e.g., drugs and their metabolites and environmental pollutants) and biotics (e.g., proteins, DNA, peptides, and metabolites) in biological matrices or samples, including serum, plasma, skin, blood, urine, saliva, tears, cerebrospinal fluid, and other organ tissues.

In the omics area (e.g., metabolic, metabolomics, and lipidomics), bioanalysis has been used to provide a more complete and informative view of biological pathways. Metabolomics is a technology that aims to identify and to quantify the metabolome—the dynamic set of all the small molecules present in an organism or biological sample. In this sense, metabolomics differs from metabolic profiling, which looks for target compounds and their biochemical transformation [1]. Lipids are the fundamental components of biological membranes; they are also produced as metabolites in organisms. Lipidomics, or lipid profiling, is a system-based study of all lipids. Such study aims to provide comprehensive analysis of lipids in biological systems [2]. These omics approaches

have been used to identify not only potential biomarkers for normal and pathogenic biological systems, but also responses to an exposure or intervention, including therapeutic interventions. Clinical use of prognostic and diagnostic biomarkers has significantly improved outcomes for patients with various illnesses [3].

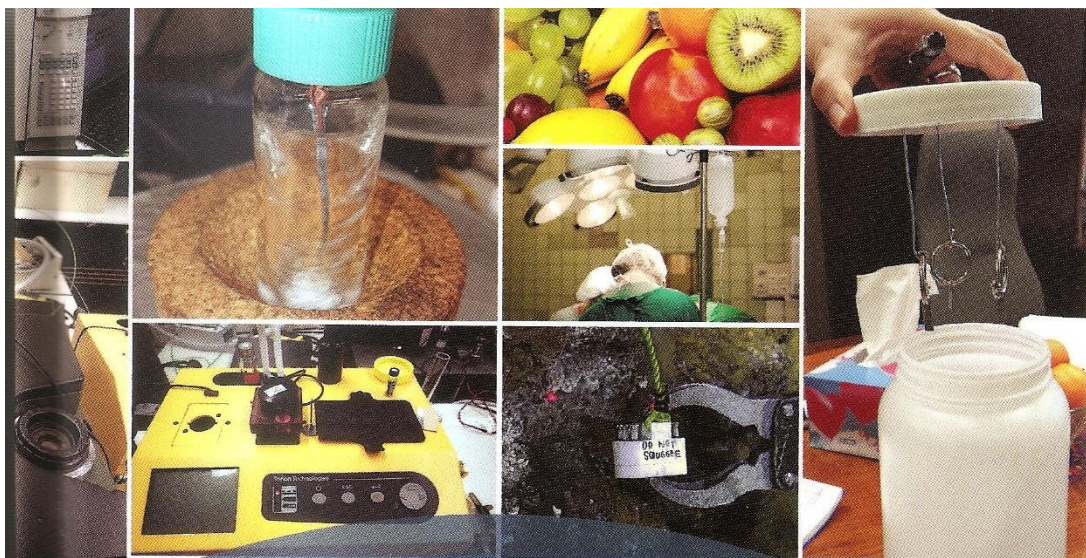
Bioanalysis is also applied in the toxicology area, including the pharmaceutical (drug development, pharmacokinetics, toxicokinetics, drug metabolism, and pharmacodynamics), forensic, clinical (therapeutic drug monitoring), environmental, and occupational fields. The two latter toxicology fields evaluate human exposure to toxicants by different routes (ingestion, inhalation, or dermal absorption).

Although the bioanalytical field has developed and evolved significantly over the years, chromatography remains the cornerstone of all techniques. Because mass spectrometry (MS) is highly sensitive and selective, liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) have been employed for bioanalysis of complex samples. In recent years, ambient ionization techniques have been developed fast. This has allowed MS to be used for direct and straightforward solid phase microextraction analysis of complex samples under ambient and open-air conditions, with no or little sample pretreatment [4].

^{*} Corresponding author.
E-mail address: mariaeqn@fclrp.usp.br (M.E.C. Queiroz).

Título do Livro: Evolution of Solid Phase Microextraction Technology. Editado por Janusz Pawliszyn. Editora: Royal Society of Chemistry, 1ª edição (24 março 2023), idioma: Inglês, n. páginas 1059, ASIN: B0BZSTKYY8.

Capítulo do Livro: Applications of In-tube SPME for Bioanalysis Autores: Maria Eugênia Costa Queiroz, Israel Donizeti de Souza, Igor Gustavo Carvalho Oliveira e Caroline Fernandes Grecco



Evolution of Solid Phase Microextraction Technology

Edited by Janusz Pawliszyn



In-tube solid-phase microextraction (sulfopropyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate monolithic capillary) coupled to LC-MS/MS to determine beta amyloid peptides in Alzheimer's cerebrospinal fluid samples

Caroline Fernandes Grecco¹ | Vitor Tumas² | Jaime Eduardo Cecilio Hallak² | Maria Eugênia Costa Queiroz¹ 

¹Department of Chemistry, Faculty of Philosophy, Science and Letters at Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

²Department of Neurosciences and Behavioral Sciences, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Correspondence

Maria Eugênia Costa Queiroz, Department of Chemistry, Faculty of Philosophy, Science and Letters at Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900-CEP, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil.
Email: mariaeqn@ffclrp.usp.br

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Numbers: 2017/02147-0, 2019/04386-7, 2020/00126-8; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Grant/Award Number: 465458/2014-9

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by an extracellular accumulation of amyloid beta peptides in the brain. The concentration of the amyloid beta peptides in cerebrospinal fluid (CSF) have been evaluated as potential biomarkers of AD for early diagnostic. In this work, an in-tube solid-phase microextraction (in-tube SPME) coupled to UHPLC-MS/MS method was established to determine amyloid beta peptides in CSF samples from AD patients. A strong cation-exchange (sulfopropyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolithic capillary was synthesized on the inner surface of a fused silica capillary and used as an extractive phase for in-tube SPME. The morphology and chemical structure of the monolithic phase were characterized by scanning electron microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy. The proposed method presented linear range from the lower limits of quantification 0.6 and 0.8 to 10 ng mL⁻¹. Excluding the lower limits of quantification values, the analytical validation showed precision with the coefficient of variation values lower than 13.1%, and accuracy with relative standard deviation lower than 13.5%. The in-tube SPME coupled to UHPLC-MS/MS method was successfully applied to determine amyloid beta peptides in CSF samples from AD patients.

KEYWORDS

Alzheimer's disease, amyloid beta peptides, in-tube solid-phase microextraction, organic monolith, UHPLC-MS/MS

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; AIBN, 2,2'-azobisisobutyronitrile; A β , amyloid beta; CSF, cerebrospinal fluid; CV, coefficient of variation; EDMA, ethylene glycol dimethacrylate; FDA, Food and Drug Administration; FTIR, Fourier transform infrared; IS, internal standard; LLOQ, lower limit of quantification; SPM, sulfopropyl methacrylate; ULOQ, upper limit of quantification; VTMS, vinyltrimethoxysilane.

1 | INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD), a progressive neurodegenerative disease associated with memory deficits and cognitive decline, is pathologically characterized by the presence of amyloid plaques (beta amyloid peptides, A β) and neurofibrillary tangles (tau protein) in the brain [1, 2].