

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Greyce Kelly Steinhorst Alcantara

Ribeirão Preto  
2012

## RESUMO

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

## INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Esquizofrenia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 1.2 Aminoácidos

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

A estrutura química geral dos aminoácidos (Figura 1) é formada por um carbono central (carbono  $\alpha$ ) ligado a um grupamento amino ( $-\text{NH}_2$ ), um grupamento carboxila ( $-\text{COOH}$ ) e, um átomo de hidrogênio, variando apenas a cadeia carbonada lateral, chamada genericamente de grupamento R, sendo a responsável pela diferenciação entre os 20 aminoácidos (JUNIOR E FRANCISCO, 2006).

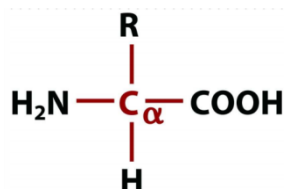
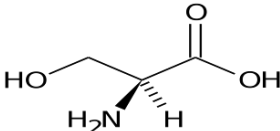
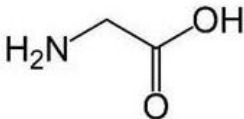
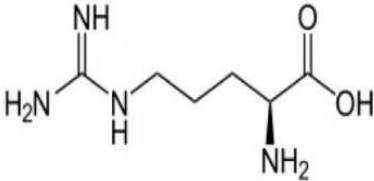
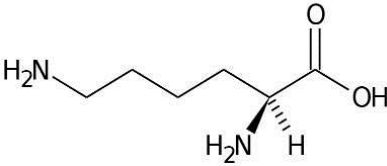
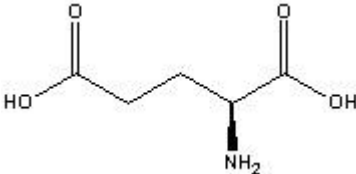
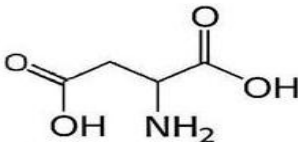


Figura 1. Estrutura geral dos aminoácidos

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

Tabela 1. Estrutura dos aminoácidos

Aminoácido	Fórmula estrutural
Serina	
Glicina	
Arginina	
Lisina	
Glutamato	
Aspartato	



### 1.3 Aminoácidos e a Esquizofrenia

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **1.4 Análise cromatográfica para determinação de aminoácidos**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

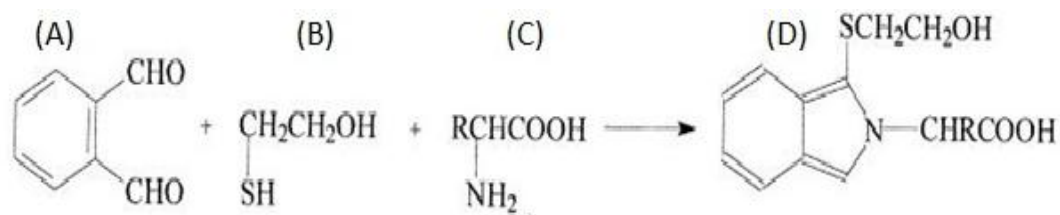


Figura 2. Reação de derivatização

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$\lambda_{em}$ : comprimento de emissão;  $\lambda_{exc}$ : comprimento de excitação;

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

**CONCLUSÃO**

---



## 5. CONCLUSÃO

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

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

## Referências Bibliográficas

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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