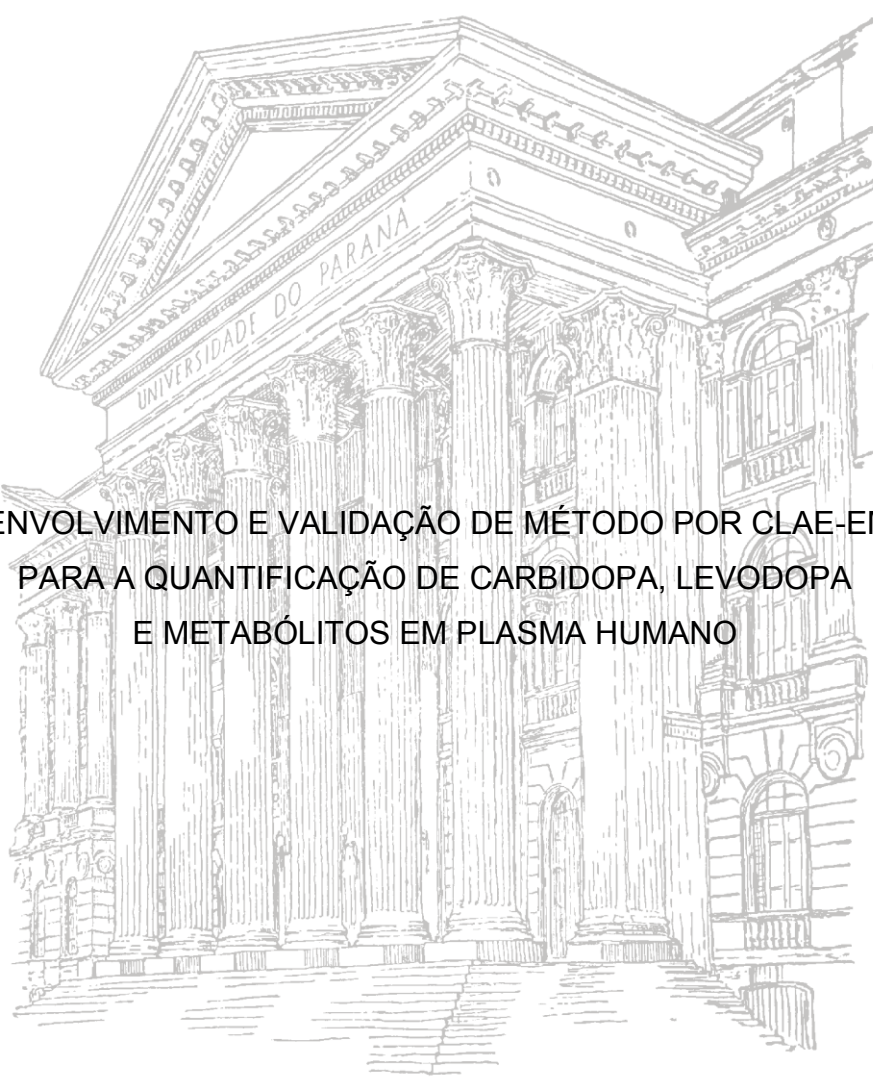


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAQUEL DE OLIVEIRA VILHENA



DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE-EM/EM
PARA A QUANTIFICAÇÃO DE CARBIDOPA, LEVODOPA
E METABÓLITOS EM PLASMA HUMANO

**CURITIBA
2014**

RAQUEL DE OLIVEIRA VILHENA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE-EM/EM PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE CARBIDOPA, LEVODOPA E METABÓLITOS
EM PLASMA HUMANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Medicamentos, Insumos e Correlatos, Linha de pesquisa Produção e Qualidade, Departamento de Farmácia do setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Coorientador: Prof. Dr. Marco André Cardoso

CURITIBA
2014

Vilhena, Raquel de Oliveira

Desenvolvimento e validação de método por CLAE-EM/EM para a quantificação de carbidopa, levodopa e metabólitos em plasma humano / Raquel de Oliveira Vilhena – Curitiba, 2014.

97 f. : il ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Coorientador: Professor Dr. Marco André Cardoso

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2014.

Inclui bibliografia

1. HILIC-EM/EM. 2. Levodopa. 3. Carbidopa. 4. Doença de Parkinson. 5. Monitoramento de fármacos. I. Pontarolo, Roberto. II. Cardoso, Marco André. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.833

TERMO DE APROVAÇÃO

RAQUEL DE OLIVEIRA VILHENA

Título: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE EM/EM PARA QUANTIFICAÇÃO DE CABIDOPA, LEVODOPA E METABOLITOS EM PLASMA HUMANO

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.


Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Orientador

Dr. João Cleverson Gasparetto
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Leandro Machado Rocha
Universidade Federal Fluminense

Curitiba, 21 de fevereiro de 2014.

À avó *Ignez* (sempre presente) e à mãe *Marisa*, por todo amor, carinho
e dedicação.

Ao *Breno*, por todo amor, meu eterno amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me proteger e iluminar o meu caminho.

Aos meus pais, Marisa de Oliveira Carlos Ernesto de Vilhena, a quem amo e admiro, por todo amor, carinho e incentivo.

Ao meu esposo Breno Maurício Marson, que tem todo meu amor e admiração, por todo amor, paciência e compreensão. Obrigada por todo incentivo e apoio durante esses anos, por tornar minha vida completa e muito mais feliz.

À minha amada avó Ignez Tagliari de Oliveira (sempre presente), pelo amor, carinho e dedicação. Pelo incentivo e suporte aos meus estudos e por sempre desejar o meu sucesso. Pelos momentos inesquecíveis que vivi ao seu lado. Saudades.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Pontarolo, por estar ao meu lado sempre disposto a ajudar. Obrigada pela oportunidade de aprendizado, pela confiança, pelo respeito e incentivo na elaboração desse trabalho. Minha sincera gratidão, respeito e admiração.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Marco André Cardoso, por todos os ensinamentos e contribuições durante o mestrado. Agradeço pela paciência, pelo tempo e pela disposição dedicados a realização desse trabalho.

À querida amiga Flávia Lada Degaut Pontes, por compartilhar suas experiências e aprendizado com muita paciência e dedicação. Por me acompanhar durante todo o desenvolvimento desse trabalho, contribuindo para que esse fosse realizado da forma mais elegante possível. Obrigada pelo carinho, amizade e companheirismo. Meu carinho, amizade, admiração e enorme gratidão.

À querida amiga Caroline Paola Uber, pela amizade, apoio, preocupação dedicação. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos e experiências durante esses anos. Meu carinho, amizade, admiração e gratidão.

Ao amigo Mário Sérgio Piantavini, pela paciência e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos e experiências. Pelos conselhos, mensagens e ensinamentos. Por proporcionar um RU mais temperado e trilha sonora para nossas tardes.

Ao Prof. Dr. Railson Hennenberg e amigos Thaís Martins Guimarães de Francisco e João Cleverson Gasparetto, pela disponibilidade em contribuir para o aprimoramento desse trabalho.

Aos queridos amigos Suelem Tavares da Silva Penteadó, Suzane Virtuoso, Helena Hiemischi Lobo Borba, Marciane Welter, Samanta Daliana Golin Pacheco, Rômulo Pereira Ribeiro, Michel Salamanca Coelho, Angela Cristina Leal Badaró Trindade, Astrid Wiens, Cleverson Antônio Ferreira Martins, Letícia Paula Leonart, Letícia Cerqueira Bonâncio, pelo companheirismo e amizade. Por tornar esses dois anos mais leves e divertidos.

Ao meu tio Marcos Anselmo de Oliveira, pelo amor, carinho e amizade. Obrigada pelos conselhos, pelo apoio e por tornar a vida mais divertida.

À minha tia Célia Vilhena, pela hospitalidade e pelo suporte oferecido em Curitiba durante esses dois anos.

À Capes, pela bolsa de estudo concedida.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização desse trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

O monitoramento dos níveis plasmáticos de levodopa e carbidopa é necessário para que o ajuste de dose desses fármacos seja realizado de acordo com as necessidades individuais de cada paciente com doença de Parkinson. Para isso, é necessária uma técnica confiável, sensível e precisa. A cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) tem se mostrado uma alternativa à cromatografia líquida de fase reversa para análise de analitos polares, como a levodopa e carbidopa, proporcionando boa retenção. Assim, um método por HILIC-cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HILIC-CLAE-EM/EM) foi desenvolvido para a determinação simultânea da carbidopa, levodopa e seus metabólitos (3-O-metildopa e dopamina) em plasma humano. Após um preparo simples e rápido da amostra por precipitação de proteínas com acetonitrila e aditivos, uma coluna Atlantis HILIC (150 x 2.1 mm, 3 μ m, Waters) acoplada a uma pré-coluna (10 x 2.1 mm, 3 μ m, Waters) foi utilizada para separação utilizando acetonitrila/água (79:21 v/v) contendo 0,05% de ácido fórmico e 3 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio, condição isocrática. Os analitos foram detectados por Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) no modo positivo e fonte de ionização por *electrospray* (ESI), utilizando a levodopa deuterada como padrão interno. O método foi validado com sucesso, apresentando resultados adequados para linearidade ($r \geq 0,99$; DPR e EPR < 15%), precisão e exatidão (DPR e EPR < 15%), efeito matriz (DPR < 15%), seletividade e estabilidade. Amostras de pacientes em tratamento com o medicamento Stalevo™ foram analisadas mostrando que esse novo método pode ser utilizado no monitoramento terapêutico da levodopa. Esse é o primeiro método HILIC-CLAE-EM/EM desenvolvido e validado para quantificação simultânea de carbidopa, levodopa e seus metabólitos em plasma humano.

Palavras-chave: HILIC-EM/EM. Levodopa. Carbidopa. Doença de Parkinson. Monitoramento de fármacos.

ABSTRACT

The monitoring of levodopa and carbidopa plasmatic levels is necessary to adjust the dose of these drugs to the individual needs of each Parkinson's disease patients. For this purpose, it is necessary a reliable, sensitive and accurate technique. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) has been shown to be an alternative to reversed phase for the analysis of these types of polar compounds providing good retention. Thus, a HILIC-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HILIC-HPLC-MS/MS) method was developed for the simultaneous determination of carbidopa, levodopa and its metabolites (3-O-methyldopa and dopamine) in human plasma. After a straightforward sample preparation by protein precipitation in acetonitrile and additives, an Atlantis HILIC (150 x 2.1 mm, 3 μ m, Waters) column coupled with an Atlantis HILIC (10 x 2.1 mm, 3 μ m, Waters) guard column were used for the separation at an isocratic condition of acetonitrile/water (79:21 v/v) containing 0.05% formic acid and 3 mmol.L⁻¹ ammonium formate. Analytes were detected in Multiple-reaction Monitoring with positive ionization mode and electrospray ionization technique, using deuterated levodopa as internal standard. The method was successfully validated showing adequate results to linearity ($r \geq 0.99$; RSD and RE of < 15%), precision and accuracy (RSD and RE of < 15%), matrix effect (RSD < 15%), selectivity and stability. Samples from patients undergoing treatment with Stalevo™ were analyzed, indicating that this new method is suitable for therapeutic drug monitoring. To our knowledge, this is the first HILIC-HPLC-MS/MS method reported for the simultaneous analysis of carbidopa, levodopa and its metabolites in human plasma.

Keywords: HILIC-MS/MS. Levodopa. Carbidopa. Parkinson's disease. Drug monitoring.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	FÓRMULA ESTRUTURAL DA LEVODOPA (A) E DOPAMINA (B).....	23
FIGURA 2 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO METABOLISMO DA LEVODOPA.....	23
FIGURA 3 -	FÓRMULA ESTRUTURAL DA CARBIDOPA (A) E BENSERAZIDA (B).....	26
FIGURA 4 -	FÓRMULA ESTRUTURAL DA TOLCAPONA (A) E ENTACAPONA (B).....	28
FIGURA 5 -	FÓRMULA ESTRUTURAL DO METABÓLITO 3-O-METILDOPA.....	28
FIGURA 6 -	PRINCIPAL MECANISMO DE RETENÇÃO NA HILIC: PARTIÇÃO ENTRE A FASE MÓVEL E CAMADA DE ÁGUA FORMADA NA FASE ESTACIONÁRIA.....	38
FIGURA 7 -	FÓRMULA ESTRUTURAL DA LEVODOPA DEUTERADA.....	48
FIGURA 8 -	INTENSIDADE DE SINAL DOS ANALITOS OBTIDOS ATRAVÉS DA INFUSÃO DIRETA NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS UTILIZANDO DIFERENTES ADITIVOS.....	66
FIGURA 9 -	ESPECTRO DE MASSAS DE LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA NA CONCENTRAÇÃO DE 500 ng.mL ⁻¹ CADA.....	67
FIGURA 10 -	CROMATOGRAMA DA MATRIZ PLASMA HUMANO ADICIONADA DAS SOLUÇÕES DE 3-O-METILDOPA, CARBIDOPA, DOPAMINA, LEVODOPA E PADRÃO INTERNO (LEVODOPA DEUTERADA) UTILIZANDO FASE MÓVEL ACN:H ₂ O (78:22 v/v) CONTENDO 0,05% DE ÁCIDO FÓRMICO (v/v).....	71
FIGURA 11 -	CROMATOGRAMA DA MATRIZ PLASMA HUMANO ADICIONADA DAS SOLUÇÕES DE 3-O-METILDOPA, CARBIDOPA, DOPAMINA, LEVODOPA, E PADRÃO INTERNO (LEVODOPA DEUTERADA) UTILIZANDO FASE MÓVEL ACN:H ₂ O (85:15 v/v) CONTENDO 3 mmol.L ⁻¹ DE	

	FORMIATO DE AMÔNIO E 0,05% DE ÁCIDO FÓRMICO (v/v)...	72
FIGURA 12 -	CROMATOGRAMA DA MATRIZ PLASMA HUMANO ADICIONADA DAS SOLUÇÕES DE 3-O-METILDOPA, CARBIDOPA, DOPAMINA, LEVODOPA, E PADRÃO INTERNO (LEVODOPA DEUTERADA) UTILIZANDO FASE MÓVEL ACN:H ₂ O (79:21 v/v) CONTENDO 3 mmol.L ⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO E 0,05% DE ÁCIDO FÓRMICO (v/v).....	73
FIGURA 13 -	SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DAS TRANSIÇÕES DA LEVODOPA, CARBIDOPA, DOPAMINA, 3-O-METILDOPA E PI OBTIDAS DAS AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO NORMAL, LIPÊMICO E HEMOLISADO E PLASMA BRANCO NORMAL, LIPÊMICO E HEMOLISADO ADICIONADO DE PADRÃO NA CONCENTRAÇÃO CORRESPONDENTE AO LIQ.....	76
FIGURA 14 -	CROMATOGRAMAS DE AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL (CARRYOVER) OBTIDOS POR CLAE-EM/EM: PLASMA BRANCO (B1) E PRIMEIRA (B2) E SEGUNDA (B3) INJEÇÃO DE PLASMA BRANCO APÓS INJEÇÃO DA AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO LSQ.....	77
FIGURA 15 -	CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE VOLUNTÁRIO OBTIDA POR CLAE EM/EM.....	87

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DA LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA.....	31
QUADRO 2 - PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO POR HILIC-CLAE-EM/EM.....	48
QUADRO 3 - CONCENTRAÇÕES DE ADITIVOS UTILIZADAS PARA A CHEGAGEM DE SINAL DOS ANALITOS.....	52
QUADRO 4 - NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS NA CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	57
QUADRO 5 - NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS NAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE.....	58
QUADRO 6 - CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS E CONDIÇÕES UTILIZADAS NOS ESTUDOS DE ESTABILIDADE DOS ANALITOS EM PLASMA.....	63
QUADRO 7 - AMOSTRAS E CONDIÇÕES UTILIZADAS NOS ESTUDOS UTILIZADAS NOS ESTUDOS DE ESTABILIDADE DOS ANALITOS EM SOLUÇÃO.....	64
QUADRO 8 - PARÂMETROS OTIMIZADOS E TRANSIÇÕES ESCOLHIDAS PARA MONITORAMENTO DOS ANALITOS EM ESTUDO.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	RECUPERAÇÃO DA LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA OBTIDAS COM O MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS UTILIZANDO ACETONITRILA CONTENDO FORMIATO DE AMÔNIO 3 mmol.L ⁻¹ E ÁCIDO FÓRMICO 0,05% (v/v).....	75
TABELA 2 -	RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EFEITO MATRIZ EM PLASMA NORMAL, LIPÊMICO E HEMOLISADO.....	78
TABELA 3 -	EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DA LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O- METILDOPA E DOPAMINA OBTIDOS COM O MÉTODO DESENVOLVIDO.....	80
TABELA 4 -	PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDAS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA LEVODOPA.....	80
TABELA 5 -	PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDAS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CARBIDOPA.....	81
TABELA 6 -	PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDAS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA 3-O-METILDOPA.....	81
TABELA 7 -	PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDAS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DOPAMINA.....	81
TABELA 8 -	PRECISÃO E EXATIDÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA AS AMOSTRAS CQ.....	82
TABELA 9 -	ESTABILIDADE DA LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E PI EM PLASMA HUMANO.....	84
TABELA 10 -	ESTABILIDADE DA LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E PI EM SOLUÇÃO.....	85
TABELA 11 -	CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA LEVODOPA NAS	

AMOSTRAS DOS VOLUNTÁRIOS.....	86
-------------------------------	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AADC	- <i>L</i> -aminoácido aromático descarboxilase
ACN	- Acetonitrila
ANVISA	- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	- Ionização química a pressão atmosférica
API	- Ionização a pressão atmosférica
AUC	- Área sob a curva
BHE	- Barreira hematoencefálica
CAD	- Gás de colisão
CAR	- Carbidopa
CE	- Energia de colisão
CEP	- Potencial de entrada na cela de colisão
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DE	- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção eletroquímica
CLAE-EM/EM	- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial
CLAE-FLU	- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção por fluorescência
COMT	- Catecol- <i>O</i> -metiltransferase
CQA	- Controle de qualidade de alta concentração
CQB	- Controle de qualidade de baixa concentração
CQD	- Controle de qualidade de diluição
CQM	- Controle de qualidade de média concentração
CUR	- Gás de interface
CXP	- Potencial de saída da cela de colisão
DAD	- <i>Diode Array Detector</i> (Detecção por arranjo de fotodiodos)
DC	- Corrente de voltagem
DE	- Detecção eletroquímica
DHBA	- 4-dihidroxibenzilamina
DOPA	- Dopamina
dp	- Desvio padrão

DP	- Doença de Parkinson
PD	- Potencial de desagrupamento
DPE	- 1,2-difeniletlenodiamina
DPR	- Desvio padrão relativo
EDTA	- Edetato tetrassódico
EM	- Espectrometria de massas
EM/EM	- Espectrometria de massas sequencial
EPR	- Erro padrão relativo
ESI	- Ionização por <i>electrospray</i>
EUA	- Estados Unidos da América
FDA	- <i>U S Food and Drug Administration</i>
FIA	- Análise por injeção em fluxo
FLU	- Fluorescência
FMN	- Fator matriz normalizado
GS1	- Gás de nebulização
GS2	- Gás auxiliar
HEMEPAR	- Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
HILIC	- Cromatografia líquida por interação hidrofílica
HILIC-EM/EM	- Cromatografia líquida por interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas sequencial
IS	- Voltagem do capilar
IPPPP	- Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe
LD	- Limite de detecção
LEV	- Levodopa
LQ	- Limite de quantificação
LIQ	- Limite inferior de quantificação
LSQ	- Limite superior de quantificação
MAO-B	- Monoaminoxidase-B
MeOH	- Metanol
MI	- <i>Multiple íons</i>
MRM	- Monitoramento de reações múltiplas
OPA	- O-ftalaldeído
PI	- Padrão interno

PVDF	- Fluoreto de polivinilideno
RDC	- Resolução da diretoria colegiada
RF	- Radio frequência
SNC	- Sistema nervoso central
$t_{1/2}$	- Meia-vida
USP	- <i>United States Pharmacopeia</i>
UV	- Ultravioleta
2-ME	- 2-mercaptoetanol
3-OMD	- 3-O-metildopa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVO GERAL.....	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 DOENÇA DE PARKINSON.....	20
2.2 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON.....	21
2.3 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE PARKINSON.....	21
2.4 TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON.....	22
2.4.1 Levodopa.....	22
2.4.2 Associação levodopa, carbidopa/benserazida.....	26
2.4.3 Inibidores da COMT: entacapona/tolcapona.....	27
2.4.4 Associação levodopa, carbidopa/benserazida e entacapona/tolcapona.....	29
2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA.....	30
2.6 MÉTODOS CROMTOGRÁFICOS ACOPLADOS A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	36
2.6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	36
2.6.2 Cromatografia líquida por interação hidrofílica (HILIC).....	37
2.6.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM).....	39
2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS.....	41
2.7.1 Seletividade.....	42
2.7.2 Limite de detecção e quantificação.....	42
2.7.3 Curva de calibração.....	43
2.7.4 Precisão.....	44
2.7.5 Exatidão.....	44
2.7.6 Efeito residual (<i>Carryover</i>).....	45
2.7.7 Efeito matriz.....	46
2.7.8 Estudo de estabilidade.....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 MATERIAL.....	48
3.1.1 Padrões Analíticos.....	48
3.1.2 Obtenção do plasma.....	49
3.1.3 Reagentes e solventes.....	49
3.1.4 Equipamentos e consumíveis.....	50
3.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-EM/EM.....	51
3.2.1 Avaliação da solubilidade dos padrões analíticos.....	51
3.2.2 Preparo da solução estoque.....	51
3.2.3 Preparo das soluções de trabalho.....	51
3.2.4 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas.....	52
3.2.5 Otimização cromatográfica.....	53
3.2.5.1 Preparo da fase móvel.....	53
3.3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DO PLASMA HUMANO.....	54

3.3.1 Ensaio de recuperação.....	55
3.3.2 Preparo da amostra.....	56
3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	57
3.4.1 Preparo das amostras controle de qualidade e níveis da curva de calibração.....	57
3.4.2 Seletividade.....	58
3.4.3 Efeito residual (<i>Carryover</i>).....	59
3.4.4 Efeito matriz.....	60
3.4.5 Limite de detecção e quantificação.....	60
3.4.6 Curva de calibração.....	61
3.4.7 Precisão e exatidão.....	62
3.4.8 Teste de estabilidade.....	62
3.4.8.1 Estabilidade de curta duração, longa duração e ciclos de congelamento e descongelamento.....	62
3.4.8.2 Estabilidade pós-processamento.....	63
3.4.8.3 Estabilidade dos analitos em solução.....	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 Avaliação da solubilidade dos padrões analíticos.....	65
4.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	65
4.2.1 Checagem e otimização da ionização dos analitos.....	65
4.2.2 Análises por monitoramento de reações múltiplos (MRM).....	67
4.2.3 Análise por injeção em fluxo (FIA).....	68
4.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA CROMATOGRAFIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	69
4.4 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DO PLASMA HUMANO.....	74
4.5 VALIDAÇÃO.....	76
4.5.1 Seletividade.....	76
4.5.2 Efeito residual (<i>Carryover</i>).....	77
4.5.3 Efeito matriz.....	78
4.5.4 Limite de detecção e quantificação.....	79
4.5.5 Curva de calibração.....	79
4.5.6 Precisão e exatidão.....	82
4.5.7 Estabilidade.....	83
4.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON EM TRATAMENTO COM STALEVO™.....	85
5 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa, crônica, progressiva e multifatorial. É uma das afecções degenerativas mais frequentes do sistema nervoso central (SNC), a qual acomete cerca de 1% da população mundial com mais de 65 anos, sendo que a sua prevalência aumenta com a idade (BENNETT *et al.*, 1996; DIAS; LIMONGI, 2003; WEINTRAUB; COMELLA; HORN, 2008).

Nos últimos anos surgiram muitos medicamentos para o tratamento dessa doença. Entretanto, desde a introdução da suplementação de dopamina, a levodopa tem sido considerada padrão ouro no tratamento dos sintomas motores dessa enfermidade (CLARKE; GUTTMAN, 2002). Ao contrário da dopamina, a levodopa é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica e ser convertida em dopamina pela descarboxilação primária nos terminais pré-sinápticos dos neurônios dopaminérgicos. Devido à sua extensa metabolização nos tecidos extracerebrais, a levodopa é comumente administrada em combinação com inibidores enzimáticos periféricos como carbidopa e benserazida (inibidores da L-aminoácido aromático descarboxilase – AADC), e tolcapona e entacapona (inibidores da catecol-O-metiltransferase – COMT). Dessa forma, aumenta-se a meia-vida plasmática e a fração do fármaco que chega ao SNC (STANDAERT; YOUNG, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2012).

Todavia, com o uso prolongado da levodopa, os pacientes começam a apresentar flutuações dos sintomas da doença, ou seja, complicações motoras como o fenômeno “*wearing-off*”, caracterizado pela alternância de momentos sem os benefícios proporcionados pela terapia e momentos com os benefícios, mas adicionados de discinesias. Além disto, estudos recentes evidenciam que altas doses de levodopa estão também relacionadas às discinesias apresentadas pelos pacientes (DAVID *et al.*, 2011). Por isso recomenda-se que as doses de levodopa sejam personalizadas de acordo com as necessidades individuais de cada paciente baseando-se na resposta clínica e no perfil de reações adversas (FAHN *et al.*, 2004).

Dessa forma, controlar a concentração plasmática dos fármacos empregados no tratamento da doença ao longo da terapia é importante para estabelecer uma adequada relação dose/paciente e um melhor acompanhamento durante a evolução da doença, contribuindo, assim, para melhora na segurança e eficácia do tratamento.

Diversos métodos são encontrados na literatura para quantificação da levodopa e seus metabólitos em matrizes biológicas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a diferentes técnicas de detecção, como fluorescência, eletroquímica e espectrometria de massas sequencial (KARIMI *et al.*, 2006; MUZZI *et al.*, 2008; KUOPPAMAKI *et al.*, 2009; BUGAMELLI *et al.*, 2011; CÉSAR *et al.*, 2011; GONZALEZ *et al.*, 2011; GOSETTI *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2013). No entanto, todos esses métodos utilizam a cromatografia de fase reversa. Devido às características hidrofílicas desses analitos, métodos de fase reversa resultam em uma pobre retenção, sendo necessário o uso de pareadores iônicos ou reagentes de derivatização, os quais podem ser incompatíveis com a detecção por espectrometria de massas (EM).

Apesar do mecanismo complexo envolvido, a cromatografia líquida por interação hidrofílica (HILIC) apresenta algumas vantagens em relação à cromatografia de fase reversa, como: boa retenção de compostos polares; baixa pressão do sistema e ganho em sensibilidade na detecção por EM devido à alta porcentagem de solvente orgânico presente na fase móvel, a qual proporciona alta eficiência de dessolvatação em técnicas de ionização por *electrospray* (BUSZEWSKI; NOGA, 2012). Nos últimos anos, o modo HILIC tem sido utilizado na separação de catecolaminas (KUMAR; HART; MCCALLEY, 2011) e neurotransmissores, como aminas biogênicas e aminoácidos precursores (CHIRITA *et al.*, 2010), mas não para o monitoramento plasmático simultâneo do tratamento com levodopa e associações.

Considerando as características destes compostos e as vantagens do modo HILIC, torna-se interessante o desenvolvimento de um método alternativo à fase reversa, utilizando a eficiência de separação da cromatografia juntamente com a sensibilidade e seletividade da espectrometria de massas para quantificação em plasma desses analitos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método bioanalítico através da HILIC-EM/EM para quantificação simultânea de fármacos utilizados no tratamento da doença de Parkinson (levodopa e carbidopa) e metabólitos da levodopa (3-O-metildopa, dopamina) em plasma humano.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver um método por CLAE-EM/EM utilizando modo HILIC, otimizando os parâmetros cromatográficos e do espectrômetro de massas.

Otimizar o método de extração da amostra (plasma humano).

Validar o método por HILIC-CLAE-EM/EM segundo norma vigente nacional (ANVISA) e internacional (FDA).

Aplicar o método validado HILIC-CLAE-EM/EM na quantificação simultânea de levodopa, 3-O-metildopa, dopamina e carbidopa em amostras de plasma de pacientes em tratamento com levodopa e associações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE PARKINSON

Em 1817, James Parkinson descreveu as principais características clínicas da DP e seu agravamento (GOOLE; AMIGHI, 2009). Passado mais de cem anos foi, então, que se descobriu que a característica central da doença era a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra compacta. Em 1958, com a descoberta de dopamina no cérebro de mamíferos, houve uma aceleração nas pesquisas. Descobriu-se, nesse período, que a perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra compacta levava a deficiência de dopamina estriatal (responsável pela maioria dos sintomas da doença) e o tratamento com precursor da dopamina (levodopa) aliviava a maioria dos sintomas (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

O Parkinson é uma doença neurodegenerativa progressiva que afeta a mobilidade e controle do sistema músculo-esquelético manifestando-se geralmente próximo aos 55 anos, sendo que sua incidência aumenta conforme o aumento da idade. Os casos esporádicos dessa doença, ou seja, os aparentemente não relacionados a fatores genéticos correspondem a 95% e sendo os 5% restantes relacionados à hereditariedade (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Pacientes com a DP sofrem de sintomas não motores, como depressão, diminuição do sentido olfativo e distúrbios do sono (KHOR; HSU, 2007). Na clínica, o parkinsonismo é uma síndrome caracterizada por tremor de repouso, rigidez, lentidão ou ausência de movimentos voluntários, instabilidade postural e incapacidade de iniciar movimentos voluntários. Qualquer doença que inclua deficiência de dopamina estriatal ou dano estriatal direto, como sequelas de infecções neurológicas e por uso de medicamentos, pode levar ao parkinsonismo. A DP é a causa mais comum dessa síndrome, sendo responsável por 80% dos casos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; WEINTRAUB; COMELLA; HORN, 2008).

2.2 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

A perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra compacta é a responsável pelas manifestações motoras da doença. A dopamina é uma catecolamina sintetizada nos terminais dos neurônios dopaminérgicos a partir da tirosina por uma sequência de ações das enzimas tirosina hidrolase e AADC. A ação desse neurotransmissor é mediada pelos receptores dopaminérgicos presentes na região do estriado. O estriado, juntamente com as outras regiões que compõem o gânglio basal, é responsável por modular o fluxo de informações recebidas pelo córtex cerebral para os neurônios motores da coluna espinhal. Nos indivíduos acometidos pela DP, a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra compacta leva a deficiência de dopamina no estriado, afetando os estímulos que controlam o movimento (STANDAERT; YOUNG, 2007).

2.3 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE PARKINSON

O diagnóstico da DP é feito pela avaliação clínica do paciente. Os quatro sinais motores primários da doença são a bradicinesia, rigidez muscular, instabilidade postural e tremor. O diagnóstico é baseado pela presença de pelo menos dois desses sintomas. Também são avaliados sintomas como a demência e problemas na motilidade gastrointestinal, além da avaliação da resposta à terapia com levodopa (NUSSBAUM; POLYMERPOULOS, 1997). Sintomas como micrografia, perda de expressão facial e características não motoras como distúrbios afetivos e do sono, comprometimento cognitivo e queixas sensoriais também são consideradas como componentes do diagnóstico da DP (REZAK, 2007).

Como características neuropatológicas, a presença de corpúsculos de Lewis na substância negra compacta é requerida no diagnóstico da DP (SPILLANTINI *et al.*, 1998; WEINTRAUB; COMELLA; HORN, 2008), além da perda de células nessa região.

2.4 TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON

Nos últimos anos, as opções para o tratamento da DP se ampliaram tanto no enfoque farmacoterapêutico quanto neurocirúrgico. Os avanços no tratamento farmacológico dos sintomas da doença têm proporcionado uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes (REZAK, 2007).

Entre os tratamentos disponíveis estão os medicamentos agonistas da dopamina, anticolinérgicos, inibidores da monoaminoxidase-B (MAO-B), inibidores da COMT, a amantadina e a levodopa (REZAK, 2007).

2.4.1 Levodopa

Nos últimos anos surgiram muitos medicamentos para tratamento dos sintomas da DP. Entretanto, desde a introdução da terapia por suplementação de dopamina, a levodopa tem sido considerada padrão ouro no tratamento dos sintomas motores da doença (CLARKE; GUTTMAN, 2002; FAHN *et al.*, 2004; REZAK, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2012).

A levodopa, 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina, é um aminoácido neutro, precursor natural da dopamina (FIGURA 1). Diferentemente da dopamina, a levodopa é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica através de transporte facilitado. No cérebro, é convertida em seu metabólito ativo dopamina através da enzima AADC e então armazenada em vesículas pré-sinápticas até ser liberada para os receptores pós-sinápticos (GOOLE; AMIGHI, 2009; LEWITT, 2009).

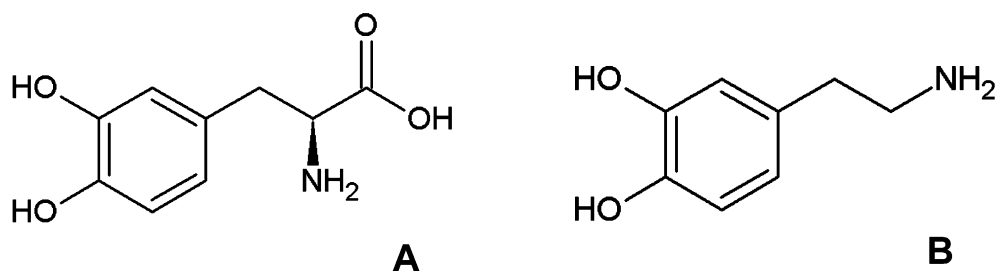


FIGURA 1 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA LEVODOPA (A) E DOPAMINA (B)
 FONTE: O autor (2014)

Sua absorção após administração oral é feita via sistema de transporte saturável de aminoácidos. Apesar de ser bem absorvida, a levodopa está sujeita a extensas metabolizações periféricas que comprometem sua biodisponibilidade (FIGURA 2). Desta forma, apenas uma pequena quantidade de levodopa (1%) é transportada para o SNC (KHOR; HSU, 2007).

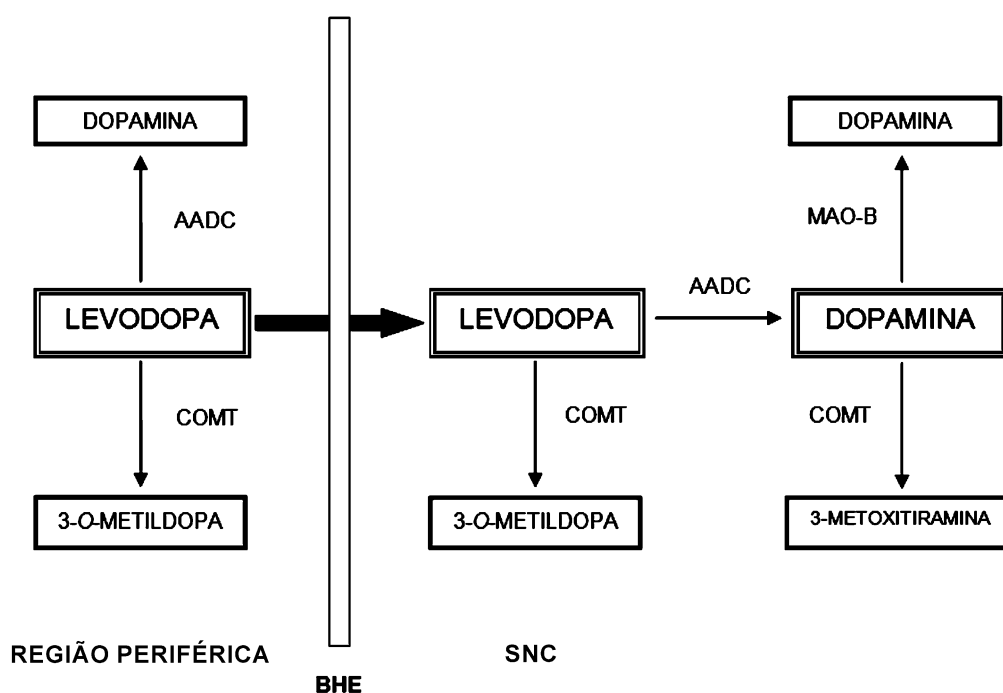


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO METABOLISMO DA LEVODOPA
 NOTA: AADC: enzima L-aminoácido aromático descarboxilase; BHE: barreira hemato-encefálica; COMT: enzima catecol-o-metiltransferase; MAO-B: enzima monoaminoxidase-B; SNC: sistema nervoso central.
 FONTE: O autor (2014)

Nos tecidos extracerebrais, principalmente no sistema gastrointestinal, a levodopa é rapidamente metabolizada em dopamina pela enzima AADC. (KHOR; HSU, 2007). A dopamina convertida terá ação apenas nos receptores periféricos, produzindo reações adversas como náuseas, hipotensão ortostática e sudorese. Além dos efeitos colaterais produzidos pela metabolização periférica da levodopa, os

pacientes também podem apresentar efeitos gerados no SNC, como sedação, sintomas psiquiátricos, flutuações motoras e discinesias (REZAK, 2007).

Uma alta variabilidade inter e intra-individual na absorção e farmacocinética da levodopa é encontrada nos pacientes com a DP. O aparecimento das complicações motoras e outros efeitos adversos podem ser explicados pelas variações na metabolização enzimática do medicamento, competição por absorção intestinal com outros aminoácidos neutros e variações na motilidade gastrointestinal (GORDIN; KAAKKOLA; TERÄVÄINEN, 2004).

Fatores como o ganho ou perda de peso também podem influenciar na farmacocinética da levodopa, gerando complicações. Um estudo realizado por Müller, Woitalla e Kuhn (2000) mostrou que a massa corporal é um fator que influencia na concentração plasmática da levodopa e, conseqüentemente, na ação cerebral desse medicamento. Quanto maior a massa corporal do paciente, menor a concentração plasmática encontrada. Isso ocorre provavelmente devido ao aumento da absorção pelos tecidos periféricos (gordura e músculos) e/ou aumento no volume de distribuição. Quando um paciente apresenta ganho ou perda de peso, o que é comum durante a evolução dessa doença, as doses devem ser ajustadas de forma a manter as concentrações plasmáticas necessárias para obtenção dos benefícios esperados.

A presença de efeitos adversos no sistema motor, como as flutuações e discinesias, são associadas ao uso prolongado da levodopa e a dose administrada (CLARKE; GUTTMAN, 2002; FAHN *et al.*, 2004; MURATA, 2006; WU; POLITIS; PICCINI, 2009; DAVID *et al.*, 2011). Acredita-se que a curta meia-vida ($t_{1/2}$) da levodopa (60-90 min) gere uma estimulação pulsátil excessiva dos receptores de dopamina, distorcendo seu funcionamento normal (REZAK, 2007).

Os estudos realizados por Murata (2006) mostraram que os pacientes que estavam em tratamento com levodopa por mais de cinco anos apresentaram mudanças no perfil farmacocinético (aumento do parâmetro área sob a curva – AUC e diminuição na $t_{1/2}$). Essas mudanças foram significativamente correlacionadas com a dose e a duração do tratamento. Os resultados dos estudos indicaram que as mudanças na farmacocinética podem ser causadas pelo aumento da absorção desse medicamento.

Segundo Goolie e Amighi (2009), a resposta da terapia com levodopa a curto-prazo mostra que esse medicamento é eficaz nos sintomas da DP, mesmo em

estágios avançados. Com a progressão da doença, a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra compacta e subsequente redução da dopamina cerebral, os terminais dopaminérgicos não são mais capazes de exercer efeitos compensatórios pela administração de levodopa exógena e a duração da resposta a esse composto é reduzida. Nesse estágio, os pacientes se tornam muito sensíveis às variações da concentração de levodopa plasmática, apresentando flutuações motoras e discinesias.

As flutuações motoras podem variar desde as mais simples, como o fenômeno “*wearing off*”, observados entre os intervalos de dose, até oscilações graves na função motora, como o fenômeno “*on-off*” (liga/desliga). Nesse fenômeno, o paciente alterna entre manifestações graves de sintomas parkinsonianos (efeito “*off*”) e estado motor quase normal (efeito “*on*”) seguido de movimentos involuntários (REZAK, 2007).

Goolie e Amighi (2009) trazem que as estratégias utilizadas para se evitar essas complicações são: adiar o uso de levodopa no tratamento, reduzir a dosagem cumulativa de levodopa, evitar a estimulação pulsátil dos receptores de dopamina e utilizar mecanismos de neuroproteção para retardar a progressão da doença. Segundo Rezak (2007) a escolha da terapia na DP deve ter como objetivo maximizar as possíveis estratégias poupadoras de levodopa. No entanto, em casos que essas estratégias deixam de controlar os sintomas ou quando o paciente está exposto a situações de perigo devido aos sintomas, a terapia com levodopa faz-se necessária.

Visando a redução dessas complicações e uma melhora na qualidade de vida do paciente, as pesquisas se concentram em modular ou desenvolver fórmulas capazes de fornecer e sustentar um fluxo constante de levodopa, prolongando sua resposta.

2.4.2 Associação levodopa e carbidopa/benserazida

A carbidopa e a benserazida (FIGURA 3) são medicamentos competitivos reversíveis da enzima AADC periférica. A associação dessa classe de

medicamentos com a levodopa auxilia na redução da conversão da levodopa em dopamina. Assim, é possível diminuir as reações adversas e aumentar a quantidade de levodopa plasmática disponível para atravessar a barreira hemato-encefálica (GOOLE; AMIGHI, 2009).

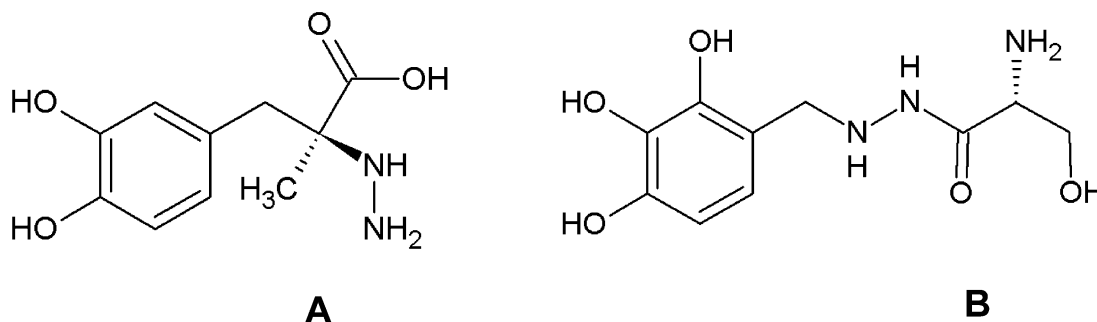


FIGURA 3 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA CARBIDOPA (A) E BENSERAZIDA (B)
 FONTE: O autor (2014)

Atualmente no Brasil, estão disponíveis formulações de liberação imediata e controlada contendo levodopa/carbidopa (Sinemet® 250mg + 50mg e Cronomet® 50mg + 200mg) e levodopa/benserazida (Prolopa® 200mg + 50mg e Prolopa HBS 100mg + 25mg) (ANVISA, 2012).

Segundo Goolie e Amighi (2009), em formulações de liberação imediata, devido a curta $t_{1/2}$ da levodopa, os receptores dopaminérgicos são estimulados de forma anormal e descontínua. Isso resulta em oscilações da resposta clínica desse medicamento. Uma revisão de estudos feita por esses autores mostra que as concentrações de levodopa no plasma eram mais estáveis em pacientes tratados com a forma farmacêutica líquida. Isso está provavelmente relacionado à possibilidade de ajustes individuais da dose, permitindo ao paciente receber a dose de acordo com sua necessidade.

Formas farmacêuticas de liberação controlada permitem inicialmente uma liberação imediata de uma dose definida de fármaco seguida da liberação contínua do princípio ativo por um período prolongado de tempo. A vantagem nesse tipo de formulação é que as concentrações plasmáticas de fármaco se mantêm elevadas por um longo período de tempo, reduzindo-se o número de administrações diárias, o que aumenta a adesão ao tratamento pelo paciente. No caso dessas associações, melhoram-se alguns problemas como a dificuldade de se manter picos elevados

durante a noite com formas de liberação imediata, reduzindo-se os efeitos adversos apresentados pelos pacientes pela manhã (GOOLE; AMIGHI, 2009).

No entanto, sistemas de liberação controlada de levodopa possuem algumas limitações. A absorção da levodopa ocorre na região do duodeno e porção superior do jejuno onde o transporte facilitado para aminoácidos neutros está presente, ou seja, há um período de tempo limitado para que essa absorção ocorra. Além disso, a absorção será influenciada pela presença de aminoácidos provenientes da alimentação, os quais competirão com a levodopa pelo sistema de transporte (LEWITT, 2009).

2.4.3 Inibidores da COMT: entacapona e tolcapona

Na década de 50, sabendo-se da participação das enzimas COMT e MAO-B na metabolização da dopamina, surgiram os primeiros inibidores da COMT, também chamados de primeira geração. Porém, esses inibidores eram pouco seletivos e apresentavam baixa eficácia e alta toxicidade. Com o avanço no conhecimento das enzimas COMT, na década de 80, as indústrias farmacêuticas passaram a investir na síntese de estruturas contendo o grupo nitrocatecol, as quais eram inibidores potentes, seletivos e reversíveis das enzimas COMT. Foi nesse momento que surgiram os medicamentos de segunda geração, como a entacapona e a tolcapona (FIGURA 4), os quais foram introduzidos na prática clínica nos anos 90 (GORDIN; BROOKS, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2012).

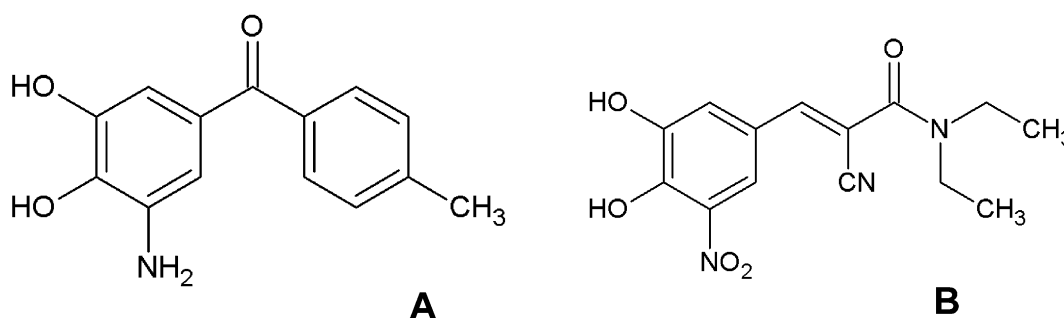


FIGURA 4 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA TOLCAPONA (A) E ENTACAPONA (B)
FONTE: O autor (2014)

O mecanismo de ação desses inibidores está relacionado à sua estrutura, a qual tem alta afinidade pelas enzimas COMT, agindo como substrato. Dessa forma, previne-se a O-metilação de outras catecolaminas (JORGA *et al.*, 1999). Sendo assim, a principal ação terapêutica dos inibidores da COMT é bloquear a conversão da levodopa em 3-O-metildopa (FIGURA 5), aumentando a $t_{1/2}$ plasmática assim como a fração da dose que chega ao cérebro. Quando comparada com a entacapona, a tolcapona apresenta maior lipofilicidade em pH fisiológico e também uma melhor penetração no cérebro (FORSBERG *et al.*, 2005). Por isso, a tolcapona parece ter ação cerebral e periférica, apresentando longa duração e sendo normalmente administrada duas ou três vezes ao dia. Já a entacapona tem ação de curta duração (cerca de 2h) e sua ação é periférica, sendo administrada juntamente com cada dose de levodopa associada à carbidopa ou benserazida (GONÇALVES *et al.*, 2012). Estudos como o de Canesi e colaboradores (2008) demonstram que a tolcapona é eficaz em pacientes resistentes a entacapona, o que leva a acreditar que esse medicamento apresenta melhor eficácia do que a entacapona.

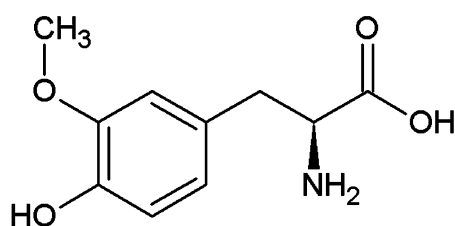


FIGURA 5 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO METABÓLITO 3-O-METILDOPA
FONTE: O autor (2014)

Logo após sua introdução no mercado, o uso da tolcapona foi suspenso na União Européia e Canadá devido à ocorrência de três mortes por hepatotoxicidade de pacientes com DP em tratamento. Nos Estados Unidos da América (EUA) e em outros países seu uso passou a ser restrito. Em 2004, a União Européia voltou a comercializar a tolcapona restringindo a indicação terapêutica apenas para pacientes intolerantes à entacapona ou que não respondiam ao tratamento com esse medicamento. Também passou a exigir um monitoramento da função hepática durante a terapia com esse medicamento (CANESI *et al.*, 2008).

2.4.4 Associação levodopa, carbidopa/benserazida e entacapona/tolcapona

A terapia utilizando essas três classes de fármacos pode ser feita através da inclusão do inibidor da COMT ao tratamento com levodopa e um inibidor da AADC ou substituindo-se os medicamentos usados pelo medicamento que contém a associação da levodopa, carbidopa e entacapona (Stalevo™).

A levodopa, quando administrada com um inibidor da AADC (carbidopa, benserazida), tem sua via de metabolização pelas enzimas COMT ativada. Assim como a dopamina, a levodopa possui um grupamento catecolamina, o qual pode ser inativado pelas enzimas COMT, influenciando diretamente na farmacocinética periférica da levodopa e sintomas da DP (MURATA, 2006; REZAK, 2007; GOOLE; AMIGHI, 2009).

O uso de tolcapona e entacapona tem sido sugerido com a finalidade de suavizar as flutuações de concentração plasmática de levodopa após administração oral (GOOLE; AMIGHI, 2009). Em estudos em humanos, ambos mostraram atividade de inibição das enzimas COMT dose-dependente, melhorando a biodisponibilidade da levodopa e inibindo a formação da 3-O-metildopa (MANNISTO; KAAKKOLA, 1999).

Quando os pacientes, que muitas vezes estão utilizando altas doses de levodopa em terapia com levodopa/carbidopa ou levodopa/benserazida, passam a apresentar “*wearing-off*” normalmente a entacapona é adicionada ao tratamento. Nesses casos, esses pacientes manifestam efeitos dopaminérgicos secundários como discinesias, já que a eliminação da levodopa é reduzida. Dessa forma, torna-se necessário a redução da dose de levodopa ou o aumento do intervalo da dose nesses pacientes para que se estabeleça uma dosagem ótima (GORDIN; KAAKKOLA; TERÄVÄINEN, 2004).

Seeberger e Hauser (2007) dizem que não há uma dose padrão da levodopa e dos inibidores enzimáticos administrados a fim de manter uma concentração adequada de dopamina no SNC, já que existe uma variabilidade endógena individual de fatores de degradação da levodopa em cada paciente. Sendo assim, é preciso monitorar tanto a levodopa quanto os inibidores enzimáticos e os metabólitos formados com a finalidade de determinar, individualmente, qual posologia deve ser

ajustada. Esse monitoramento é necessário não apenas para corrigir as doses necessárias de acordo com a evolução da doença, na qual há a diminuição gradativa da produção de dopamina endógena, mas também para evitar o fenômeno liga/desliga (“*on-off*”).

2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA

Diversas técnicas utilizando a CLAE-EM/EM, CLAE-deteção eletroquímica (DE) e CLAE-fluorescência (FLU) são encontradas para determinação dos fármacos e metabólitos em estudo (QUADRO 1). No entanto, nenhuma dessas técnicas utiliza o modo HILIC, o qual proporciona melhor retenção de compostos polares.

Matriz	Analito	Método	Preparo da Amostra	Condições de Análise	Limite de Quantificação	Referência
Plasma Humano	Levodopa Carbidopa Dopamina 3-O-metildopa	CLAE-DE	Precipitação de proteínas c/ 500 μ L plasma + 50 μ L PI em ácido perclórico + 50 μ L ácido perclórico.	Coluna: C18 Fase Móvel: 5% MeOH: tampão citrato-fosfato (EDTA+ Heptanossulfonato de sódio) pH 3,2 Padrão Interno: DHBA	-	(CEDARBAUM; WILLIAMSON; KUTT, 1987)
	Levodopa Carbidopa Dopamina 3-O-metildopa	CLAE-DE	Precipitação de proteínas c/ 1 mL plasma + 1 mL PI+ 1 mL ácido perclórico 1M. Sobrenadante é aplicado em cartucho de extração em fase sólida (SPE).	Coluna: C18 Fase Móvel: MeOH: solução de acetato de sódio e ácido cítrico (EDTA + Octanossulfonato de sódio, dibutilamina) pH 3,0	25 ng.mL ⁻¹	(MICHOTTE <i>et al.</i> , 1987)
	Levodopa Carbidopa Dopamina 3-O-metildopa	CLAE-DE	Precipitação de proteínas c/ 1 mL plasma + 100 μ L ácido perclórico 4M.	Coluna: C18 Fase Móvel: solução de ácido ortofosfórico e octanossulfonato de sódio: MeOH Padrão Interno: α -etildopa	25 ng.mL ⁻¹	(TITUS <i>et al.</i> , 1990)

QUADRO 1 - MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DA LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA EM PLASMA HUMANO (CONTINUA)

Matriz	Analito	Método	Preparo da Amostra	Condições de Análise	Limite de Quantificação	Referência
Plasma Humano	Levodopa Carbidopa 3-O-metildopa Metabólitos	CLAE-DE	Precipitação de proteínas c/ 500 μ L plasma + 500 μ L ácido perclórico (0,5% metabissulfito de sódio e 0,05% EDTA).	Coluna: C18 Fase Móvel: ACN: tampão (EDTA+ Octanossulfonato de sódio) pH 2,1: tetrahydrofurano	20 ng.mL ⁻¹	(WIKBERG, 1991)
	Levodopa	CLAE-DE	Precipitação de proteínas 1 mL plasma + 300 μ L TCA 60 mM	Coluna: C18 Fase Móvel: Tampão Diidrogeno-ortofosfato de potássio 50 mM: dodecil- sulfato de sódio 1,4 mM : ACN (42:42:16 v/v/v) pH 2,8	-	(RIZZO <i>et al.</i> , 1996)
	Levodopa Carbidopa Metabólitos	CLAE-DE	Plasma: processo c/ 2 colunas analíticas	Coluna: C8 Fase Móvel: diidrogeno-ortofosfato de sódio + EDTA 0,1 M + MeOH + Heptanossulfonato de sódio 0,5 mM, pH 3,4	8 ng.mL ⁻¹ 10 ng.mL ⁻¹	(SAGAR; SMYTH, 2000)

QUADRO 1 - MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DA LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA EM PLASMA HUMANO
(CONTINUAÇÃO)

Matriz	Analito	Método	Preparo da Amostra	Condições de Análise	Limite de Quantificação	Referência
Plasma Humano	Levodopa	CLAE-EM/EM	Precipitação de proteínas c/ 50 μ L plasma + 60 μ L ácido perclórico 0,4M. Dilui o sobrenadante em 100 μ L de fase móvel.	Coluna: C18 Fase Móvel: 0,5% ácido fórmico: MeOH (90:10 v/v) Fonte Ionização: ESI Modo positivo Padrão Interno: α -metildopa	1 ng.mL ⁻¹	(IGARASHI <i>et al.</i> , 2003)
	Levodopa Carbidopa Dopamina 3-O-metildopa DOPAC	CLAE-DE	Precipitação de proteínas c/ 500 μ L plasma + 10 μ L PI em ácido perclórico + 300 μ L ácido perclórico 1,2M. Precipita o ácido perclórico c/ tampão fosfato-citrato pH 3,8.	Coluna: C18 Fase Móvel: Tampão CAT-A-PHASE HPLC + 0,3% ACN ajustando pH p/ 3,2 c/ NaOH 2N Padrão Interno: DHBA	4 ng.mL ⁻¹ 40 ng.mL ⁻¹ 5 ng.mL ⁻¹ 5 ng.mL ⁻¹	(KARIMI <i>et al.</i> , 2006)
	Levodopa 3-O-metildopa Metabólitos	CLAE-DE	Precipitação de proteínas c/ 500 μ L plasma + 500 μ L ácido perclórico 0,6N (1% dissulfito de sódio).	Coluna: C18 Fase Móvel: ACN: tampão (EDTA+ Octanossulfonato de sódio) pH 2,1: tetrahydrofurano	-	(BET <i>et al.</i> , 2008)

QUADRO 1 - MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DA LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA EM PLASMA HUMANO
(CONTINUAÇÃO)

Matriz	Analito	Método	Preparo da Amostra	Condições de Análise	Limite de Quantificação	Referência
Plasma Humano	Levodopa Carbidopa	CLAE-DE	Utiliza SPE.	-	25 ng.mL ⁻¹ 2,5 ng.mL ⁻¹	(KUOPPAMAKI <i>et al.</i> , 2009)
	Levodopa Carbidopa Metildopa	CLAE-DAD aliada à calibração de 2ª ordem	Precipitação de proteínas c/ 250 µL plasma + 750 µL MeOH. Dilui sobrenadante em fase móvel.	Coluna: C18 Fase Móvel: solução de fosfato de potássio pH 5,0: MeOH (75:25 v/v)	-	(LI <i>et al.</i> , 2010)
	Levodopa Carbidopa 3-O-metildopa	CLAE-DE	Precipitação de proteínas c/ 200 µL plasma + 180 µL TCA.	Coluna: C18 Fase Móvel: Tampão fosfato de potássio (EDTA+octanossulfonato de sódio) pH 2,88: MeOH (92:8 v/v) Padrão Interno: catecol	8 ng.mL ⁻¹ 10 ng.mL ⁻¹ 10 ng.mL ⁻¹	(BUGAMELLI <i>et al.</i> , 2011)

QUADRO 1 - MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DA LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA EM PLASMA HUMANO
(CONTINUAÇÃO)

Matriz	Analito	Método	Preparo da Amostra	Condições de Análise	Limite de Quantificação	Referência
Plasma Humano	Levodopa 3-O-metildopa	CLAE-EM/EM	Precipitação de proteínas c/ 250 μ L plasma + 50 μ L ácido perclórico 2M. Dilui sobrenadante em água:MeOH (1:1 v/v).	Coluna: C18 Fase Móvel: ácido fórmico 0,2%: ACN 96:4 v/v) Fonte Ionização: ESI Modo: positivo Padrão Interno: Carbidopa	50 ng.mL ⁻¹ 25 ng.mL ⁻¹	(CÉSAR <i>et al.</i> , 2011)
	Levodopa	CLAE-EM/EM	Precipitação de proteínas c/ 200 μ L plasma + 240 μ L ácido perclórico 0,4M. Dilui sobrenadante em 100 μ L água.	Coluna: C18 Fase Móvel: água:MeOH (90:10 v/v) 0,5% ácido fórmico Fonte Ionização: ESI Modo: positivo Padrão Interno: Carbidopa	25 ng.mL ⁻¹	(MARTINS <i>et al.</i> , 2013)
Soro Humano	Levodopa Dopamina 3-O-metildopa α -metildopa	CLAE-FLU e UV	Precipitação de proteínas c/ 250 μ L soro + 125 μ L ácido perclórico 2M Avalia derivatização c/ DPE e FLU nativa.	Coluna: C18 Fase Móvel: Tampão fosfato de potássio 0,02M : MeOH (gradiente) e tampão tris 50 nM pH 7,0 : MeOH : ACN 8:1:1	-	(MUZZI <i>et al.</i> , 2008)

QUADRO 1 - MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DA LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA EM PLASMA HUMANO **(CONCLUSÃO)**

NOTA: APCI: ionização química a pressão atmosférica; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; DAD: detecção por arranjo de fotodiodos; DHBA: 4-dihidroxibenzilamina; DPE: 1,2-difeniletlenodiamina; DE: detecção eletroquímica; EM/EM: espectrometria de massa sequencial; ESI: ionização por *electrospray*; 2-ME: 2-mercaptoetanol; MeOH: metanol; OPA: o-ftalaldeído; ACN: acetonitrila; UV: ultravioleta.

FONTE: O autor (2014)

Para análise de catecolaminas, a CLAE-DE é o procedimento comumente utilizado. No entanto, o detector eletroquímico tem aplicabilidade mais restrita, sendo utilizado apenas para compostos que possam sofrer oxidação ou redução.

A detecção por fluorescência é uma técnica popular por sua seletividade e sensibilidade (TSUNODA, 2006). No entanto, as amostras necessitam passar por uma derivatização para aumentar a sua sensibilidade de detecção, utilizando agentes derivatizantes. A desvantagem está no extenso preparo da amostra e na dificuldade de encontrar um reagente de derivatização compatível com todos os analitos de interesse. O 1,2-difeniletildenodiamina (DPE), por exemplo, é comumente utilizado para derivatização de catecolaminas. No entanto, esse agente não reage com o metabólito 3-O-metildopa, impossibilitando a quantificação simultânea desse metabólito com a levodopa e dopamina (MUZZI *et al.*, 2008).

Técnicas utilizando o espectrômetro de massa acoplado a métodos de separação como CLAE são bastante utilizadas em matrizes biológicas devido a sua alta especificidade e sensibilidade. Os métodos da literatura que utilizam essa técnica permitem avaliar diversos compostos simultaneamente. Entretanto, estes métodos, na sua maioria, utilizam a cromatografia de fase reversa como técnica de separação cromatográfica resultando em uma pequena retenção das catecolaminas endógenas devido às suas características hidrofílicas.

2.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ACOPLADOS A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

2.6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida é uma técnica analítica muito difundida e empregada em diversas áreas, incluindo-se a área médica e farmacêutica. Essa técnica teve início nos anos 50 e tem evoluído desde esse período. Os maiores avanços foram obtidos na última década, no qual se desenvolveram colunas de alta eficiência,

compostas por pequenas partículas, permitindo análises mais rápidas e com melhor resolução entre os analito de interesse (MALDANER; JARDIM, 2009).

Essa técnica é capaz de separar e analisar quantitativamente diversos compostos em diferentes matrizes com alta resolução, eficiência e seletividade, em um curto período de análise. Na CLAE, a fase móvel é eluida sob altas pressões por uma coluna recheada pela fase estacionária. O equipamento é composto basicamente por um injetor, bomba, coluna (fase estacionária), fase móvel e sistema de detecção. Dentre os detectores mais comumente utilizados estão o detector por arranjo de fotodiodos, fluorescência, espalhamento de luz, eletroquímico e espectrômetro de massas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

2.6.2 Cromatografia líquida por interação hidrofílica (HILIC)

HILIC é uma técnica na qual se utiliza uma fase estacionária polar (sílica pura ou com fase ligada) juntamente com uma fase móvel composta por uma alta quantidade (>70%) de solvente orgânico (geralmente acetonitrila) e pequena quantidade de água (mínimo de 2,5%) (MCCALLEY, 2007). O termo HILIC foi proposto por Alpert (1990) para essa variação de uso da fase normal, mostrando sua aplicação na separação de proteínas, peptídeos e aminoácidos, obtendo-se uma ordem de eluição inversa à encontrada na fase reversa para esses compostos. Alpert (1990) considerou como principal mecanismo de retenção a partição entre a fase móvel e uma camada de fase móvel enriquecida com água parcialmente retida na superfície da fase estacionária (FIGURA 6). No entanto, o mecanismo de retenção no modo HILIC parece ser complexo, envolvendo também troca iônica e pequena contribuição de interações com as ligações siloxano (MCCALLEY, 2007).

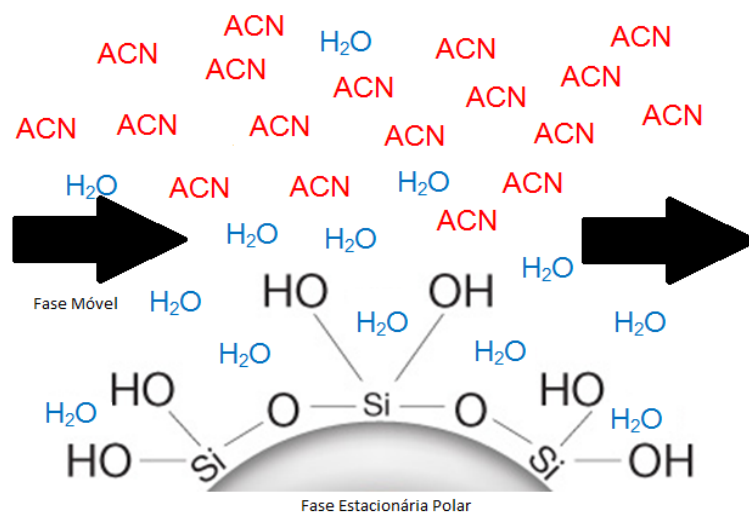


FIGURA 6 - PRINCIPAL MECANISMO DE RETENÇÃO NA HILIC: PARTIÇÃO ENTRE A FASE MÓVEL E CAMADA DE ÁGUA FORMADA NA FASE ESTACIONÁRIA
 FONTE: O autor (2014).

As fases estacionárias utilizadas são compostas basicamente por sílica e podem ser divididas de acordo com a carga que podem apresentar dependendo do pH: diol, amida e ciano (neutras); sílica pura (carga negativa); amina (carga positiva); zwitteriônico. O solvente orgânico utilizado na fase móvel é geralmente a acetonitrila, já que permite uma melhor retenção dos compostos por ter uma menor força de eluição. No modo HILIC, os álcoois são os solventes com maior força de eluição (CHIRITA *et al.*, 2010).

Nos últimos anos muitos trabalhos surgiram mostrando o uso do modo HILIC para retenção de compostos básicos. McCalley (2007) estuda a separação de compostos ácidos, básicos e neutros em diferentes marcas de colunas de sílica pura e diferentes tampões, obtendo uma boa seletividade e retenção dos compostos, considerando HILIC uma alternativa valiosa para separação de compostos ionizáveis. Além disso, considera como uma das vantagens da HILIC o aumento na sensibilidade quando acoplado a espectrometria de massas devido à alta concentração de solvente orgânico na fase móvel, que melhora a eficiência na dessolvatação em técnicas por *electrospray*. Heaton *et al* (2012) também destacam o aumento de sensibilidade devido a grande quantidade de solvente orgânico na fase móvel para ionização por *electrospray* para efedrinas utilizando HILIC.

2.6.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM)

A combinação da cromatografia líquida e a espectrometria de massas sequencial é uma técnica analítica que ganhou extrema importância em diversos segmentos, principalmente no farmacêutico e alimentício. Essa técnica associa a eficiência de separação da cromatografia com a sensibilidade e especificidade da espectrometria de massas, tornando-se uma importante ferramenta na área farmacêutica (PEREIRA *et al.*, 2005).

A espectrometria de massas mede a razão massa/carga (m/z) de um átomo ou molécula ionizada positiva ou negativamente. A intensidade ou abundância dos íons é característica de cada molécula e está relacionada com a quantidade de analito presente na amostra. Assim, os espectros de massas do íon precursor e de seus fragmentos servem tanto para identificação quanto quantificação do analito na amostra (DOOLEY, 2003).

A espectrometria de massas sequencial é composta por dois estágios. O primeiro permite o monitoramento do íon precursor, que será fragmentado em um próximo estágio formando os íons produtos. Dessa forma, nessa técnica de análise é possível controlar tanto o íon precursor (que vai gerar os íons produtos) quanto à formação dos íons produtos associando-se os analisadores em sequência (GLISH; VACHET, 2003).

O espectrômetro de massas é composto por uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector, sendo que diferentes tipos desses componentes têm sido utilizados na análise de amostras bioanalíticas (GLISH; VACHET, 2003).

A ionização a pressão atmosférica (API) é uma técnica que permite a ionização sem o uso de vácuo, permitindo a análise de espécies não voláteis, carregadas e instáveis e permite a interface com a CLAE. A ionização por *electrospray* (ESI) é uma das formas de API na qual a amostra é pulverizada através de um capilar altamente carregado de energia. Então, com a evaporação, a tensão superficial das gotículas carregadas fica cada vez menor, e, devido à repulsão entre as cargas, ocorre a “explosão coulômbica”, liberando os íons livres e solvatados em

uma nuvem direcionada para entrar no espectrômetro de massas. O capilar, quando carregado positivamente, formará íons com o mesmo tipo de carga, representando muitas vezes a espécie protonada. Da mesma forma, quando o capilar apresenta carga negativa, a espécie formada também será carregada negativamente na sua forma desprotonada (DOOLEY, 2003).

A ESI é uma técnica sensível e robusta, sendo amplamente utilizada em laboratórios clínicos. Esse tipo de fonte é um processo de ionização brando, ou seja, uma mínima energia é transferida para os analitos, permitindo que esses continuem intactos durante a ionização, dependendo do analito (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009). A ampla faixa de aplicação é uma grande vantagem dessa técnica, possibilitando a análise qualitativa e quantitativa de diversas substâncias inorgânicas bem como estruturas biológicas complexas. Também trabalha muito bem com proporções de água e solvente orgânico, sendo adequado, portanto, para hifenação com CLAE. Uma das desvantagens é a susceptibilidade a supressão iônica quando em presença de altas concentrações de sal (GLISH; VACHET, 2003).

Assim como para as fontes de ionização, existem diferentes tipos de analisadores de massa, os quais têm como objetivo separar os íons de acordo com sua razão massa carga (m/z) e transmiti-los ao detector. A escolha do tipo de analisador a ser utilizado em determinada análise depende do limite de detecção, do intervalo de massas e da resolução desejados (VAN BRAMER, 1997).

Os principais analisadores de massa podem ser divididos em dois grupos: os analisadores de transmissão e os de captura. Nos analisadores de transmissão, é através de um campo eletromagnético que os íons são conduzidos até o detector e nos de captura, os íons são armazenados no analisador por um campo eletromagnético onde podem ser avaliados ou injetados para outra fonte externa de íons (GLISH; VACHET, 2003).

Ao longo dos anos, o quadropolo foi o analisador mais amplamente utilizado, sendo acoplado principalmente a cromatografia gasosa e líquida. Esse analisador é um exemplo de analisador de transmissão. O analisador é composto basicamente por quatro barras cilíndricas paralelas. Um campo elétrico acelera os íons que estão na fonte de ionização para dentro dos quadropolos. Então, é aplicada aos eletrodos uma determinada radio frequência (RF) e uma corrente de voltagem (DC) gerando uma oscilação no campo elétrico que atua como um filtro, permitindo a transmissão até o detector apenas da m/z selecionada (VAN BRAMER, 1997). A separação de

massa em um quadrupolo é o resultado, então, da movimentação do íon num campo elétrico dinâmico (rádio frequência) que é dependente diretamente da razão massa carga (m/z) dos íons (GLISH; VACHET, 2003). Para cada pico cromatográfico eluído do cromatógrafo a líquido é gerado, então, um espectro de massas (KORFMACHER, 2005).

O analisador triplo quadrupolo, o qual permite a análise por espectrometria de massas sequencial, é o mais utilizado para doseamentos analíticos e bioanalíticos. É constituído por três quadrupolos em sequência, sendo que o segundo quadrupolo desse analisador é utilizado como cela de colisão onde os íons selecionados no primeiro quadrupolo são fragmentados e direcionados para o terceiro quadrupolo (VAN BRAMER, 1997).

2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

A validação de um método é o processo pelo qual se estabelece que as características de desempenho do procedimento analítico satisfaçam os requisitos das aplicações que o método analítico se propõe (USP32, 2009), assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

Em maio de 2012 entrou em vigor a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº27, a qual dispõe sobre os requisitos mínimos exigidos para validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos no Brasil. Segundo essa resolução, a validação deve conter ensaios de precisão, exatidão, curva de calibração, efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade, conforme as especificações de cada ensaio (BRASIL, 2012).

2.7.1 Seletividade

É definida como a capacidade que o método possui de avaliar de forma inequívoca o analito na presença de componentes que já se espera encontrar na matriz, produtos de degradação e impurezas (BRASIL, 2003).

A matriz deve ser analisada e comparada com as amostras processadas no limite de quantificação inferior do método, sendo que a resposta dos picos dos interferentes devem ser inferiores a 20% da resposta do analito das amostras de limite de quantificação inferior (BRASIL, 2012).

Quando a matriz biológica isenta do analito não estiver disponível, esse parâmetro pode ser testado pela comparação das inclinações de, no mínimo, 6 curvas de adição de padrão em 6 amostras de fontes distintas de matriz biológica (contendo nível basal) e da curva padrão em solução ou matriz substituta (BRASIL, 2012).

2.7.2 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção é a menor quantidade do analito que pode ser detectada em uma amostra utilizando-se um determinado procedimento experimental. Pode ser determinado através da equação:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

Onde LD é o limite de detecção; DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e, no mínimo, três curvas de calibração contendo a concentração do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ser também obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito que pode ser quantificada em uma amostra utilizando-se um determinado procedimento experimental. É estabelecido por meio de análises de concentrações decrescente do fármaco em estudo, até obter-se a menor concentração passível de quantificação. Pode ser determinado através da equação:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Onde LQ é o limite de quantificação; DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de, no mínimo, três curvas de calibração contendo a concentração do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ser também obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

Também pode ser determinado por meio do sinal ruído, determinando-se o ruído da linha de base e considerando a menor concentração de quantificação aquela que apresentar relação sinal-ruído superior a 10:1, atendendo aos critérios de precisão (BRASIL, 2003).

2.7.3 Curva de calibração

A curva de calibração é definida como a relação entre a resposta do instrumento frente a concentrações conhecidas do analito (BRASIL, 2003). Esse parâmetro deve garantir um nível adequado de precisão, exatidão e linearidade dos resultados obtidos com o método (USP32, 2009).

Devem ser analisadas no mínimo três curvas de calibração contendo amostras com seis diferentes concentrações de analito e o padrão interno, além de incluir a análise de matriz (branco) e matriz adicionada de padrão interno (BRASIL, 2012).

2.7.4 Precisão

A precisão é a avaliação do grau de concordância entre os resultados obtidos de análises individuais de uma mesma amostra, sob mesmas condições de ensaio (USP32, 2009).

Para amostras bioanalíticas, a precisão deve ser determinada numa mesma corrida (intracorridas) e no mínimo entre três corridas diferentes (intercorridas), abrangendo corridas em dias distintos. Devem ser analisadas no mínimo cinco diferentes concentrações do analito em cada corrida, incluindo concentrações equivalentes ao limite inferior de quantificação, a três vezes o limite de quantificação inferior, a concentrações acima do limite superior de quantificação e a concentrações médias (BRASIL, 2012).

A precisão deve ser expressa pelo desvio padrão relativo (DPR), o qual tem como valor de referência variações até 15%, com exceção do LIQ, para o qual se admitem valores inferiores ou iguais a 20%, sendo calculado pela fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CME} \times 100$$

Onde DPR é o desvio padrão relativo; DP é o desvio padrão e CME é a concentração média experimental (BRASIL, 2012).

2.7.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos nesse método em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

Deve-se determinar a exatidão intracorrida, ou seja, em uma mesma corrida e no mínimo três intercorridas ou três corridas diferentes. Em cada corrida devem ser analisadas no mínimo cinco replicatas em pelo menos cinco concentrações,

incluindo concentrações equivalentes ao limite inferior de quantificação (LIQ), a três vezes o limite de quantificação inferior (CQB), concentração acima do limite superior de quantificação (CQD), concentração próxima à média entre limite de quantificação inferior e superior (CQM) e concentração entre 75% e 85% da maior concentração da curva de calibração (CQA) (BRASIL, 2012).

A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não sendo admitidos valores fora da faixa de +/-20% do valor nominal para concentração igual ao limite inferior de quantificação e +/-15% do valor nominal para as demais concentrações, calculando-se segundo a fórmula:

$$EPR = \frac{(CME - VN)}{VN} \times 100$$

Onde EPR é o Erro Padrão Relativo; CME é a concentração média experimental; VN é o valor nominal (BRASIL, 2012).

2.7.6 Efeito residual (*Carryover*)

Segundo a RDC nº 27, o efeito residual é causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente, gerando o aparecimento ou aumento do sinal do analito ou padrão interno (BRASIL, 2012).

Para avaliar esse parâmetro, no mínimo três injeções da mesma amostra branco devem ser realizadas, sendo uma vez antes e duas logo após a injeção da maior concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz (LSQ). Os resultados devem ser comparados com as amostras processadas de menor concentração da curva de calibração preparadas em matriz (LIQ) (BRASIL, 2012).

As repostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito das amostras processadas do LIQ e as repostas de picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno devem ser inferiores a 5% da resposta do padrão interno (BRASIL, 2012).

A fim de se evitar que a precisão e exatidão do método sejam afetadas, procedimentos específicos na execução do método devem ser realizados para se controlar o efeito residual, caso este seja inevitável (BRASIL, 2012).

2.7.7 Efeito matriz

O efeito matriz é o efeito causado por componentes da matriz biológica na resposta do analito ou padrão interno (BRASIL, 2012).

Com a finalidade de se avaliar esse efeito, devem ser analisadas amostras das matrizes biológicas posteriormente adicionadas de analitos e padrão interno nas seguintes concentrações: entre 75% e 85% da amostra de maior concentração da curva de calibração e até três vezes o valor do limite inferior de quantificação do método (BRASIL, 2012).

Quando a matriz biológica utilizada for o plasma, devem ser analisadas oito amostras de fontes distintas, sendo quatro normais, duas hemolisadas e duas lipêmicas. No caso da amostra biológica saliva, seis amostras de fontes distintas devem ser analisadas (BRASIL, 2012).

Para cada amostra deve ser obtido o fator de matriz normalizado (FMN) por padrão interno, calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$FMN = \frac{RAM}{RPM} \div \frac{RAS}{RPS}$$

Onde FMN é o fator de matriz normalizado; RAM é a resposta do analito em matriz; RPM é a resposta do padrão interno em matriz; RAS é a resposta do analito em solução; RPS é a resposta do padrão interno em solução (BRASIL, 2012).

O desvio padrão relativo dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15%. Caso o resultado seja superior a 15% devido às amostras hemolisadas, um novo desvio padrão relativo poderá ser calculado sem essas amostras e as amostras em estudo hemolisadas não poderão ser analisadas (BRASIL, 2012).

Caso a metodologia bioanalítica não permita a avaliação do efeito matriz conforme descrito pela RDC n° 27, deve ser aplicado um procedimento alternativo (BRASIL, 2012).

2.7.8 Estudo de estabilidade

As matrizes biológicas são de natureza complexa e a instabilidade dos fármacos, pró-fármacos e metabólitos nessas amostras são considerados um problema. A estabilidade dos analitos pode ser afetada por diversos fatores, dentre eles a temperatura de estocagem, o pH, a presença de anticoagulantes e aos ciclos de congelamento que essas amostras são submetidas. Além disso, as amostras estão sujeitas a problemas com a estabilidade durante as várias etapas da análise, como, por exemplo, na coleta e armazenamento da amostra, pré-tratamento (procedimentos de *clean-up*, concentração, extração) e tempo de análise nos equipamentos (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

A resolução exige a demonstração da estabilidade dos analitos na matriz biológica por meio da realização de estudos de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta e longa duração e pós-processamento, avaliando-se concentrações alta e baixa do controle de qualidade. A estabilidade é demonstrada quando o desvio da média das concentrações obtidas não for superior a 15% em relação ao valor nominal (BRASIL, 2012). A avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento e estabilidade de curta e longa duração dos analitos em solução também se faz necessária uma vez que essas soluções são utilizadas na curva de calibração.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Padrões analíticos

Os padrões analíticos utilizados nesse trabalho, assim como peso molecular, teor e marca dessas estão descritos no QUADRO 2. A levodopa deuterada (FIGURA 7) foi utilizada como padrão interno.

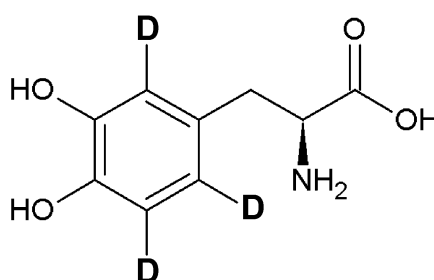


FIGURA 7 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA LEVODOPA DEUTERADA
 FONTE: O autor (2014)

Analito	Peso Molecular	Teor	Marca
Carbidopa hidratada	244,29	≤ 98%	Sigma Aldrich
Cloridrato de dopamina	189,64	≤ 98%	Sigma Aldrich
Levodopa	197,19	≤ 98%	Sigma Aldrich
3-O-metildopa	211,21	92%	USP
Levodopa deuterada	200,21	98%	Sigma Aldrich

QUADRO 2 - PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO POR HILIC-CLAE-EM/EM

NOTA: USP: UNITED STATES PHARMACOPOEIA

FONTE: O autor (2014)

3.1.2 Obtenção do plasma

O plasma normal (branco), hemolisado (contendo hemácias lisadas) e lipêmico (pós-prandial – alto teor de lipídios) utilizados no desenvolvimento e validação do método foram gentilmente cedidos pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR, Curitiba, Brasil).

As amostras de pacientes foram cedidas pelo Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (IPPPP, Curitiba, Brasil). Os plasmas foram provenientes de exames de rotina realizados no ambulatório do instituto, ou seja, não foi necessário realizar coleta especificamente para a condução do estudo. Os participantes da pesquisa foram 12 pacientes de ambos os sexos, com faixa etária entre 62 e 73 anos, diagnosticados com doença de Parkinson, e submetidos a tratamento com o medicamento Stalevo™ (Novartis®) 100/25/200 mg (levodopa/carbidopa/entacapona). Todos os voluntários receberam informações sobre a utilização do material biológico na pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As amostras de sangue (5,0 mL) foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante edetato tetrassódico (EDTA) aproximadamente uma hora após receberem o medicamento. As amostras coletadas foram centrifugadas em temperatura ambiente a 4000 rpm por 5 min (Eppendorf 5810-R, Hamburg, Alemanha) e os plasmas foram aliquotados e congelados a -80 °C (Thermo Scientific Revco 40, Asheville, EUA) até o momento das análises.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR (CAAE: 14078213.1.0000.0102).

3.1.3 Reagentes e solventes

- Água ultrapura obtida através do sistema Milli-Q (Millipore, Milford, EUA), acetonitrila e metanol grau CLAE (Tédia, Fairfield, EUA), ácido fórmico (88%,

v/v) (J. T. Baker, New Jersey, EUA), formiato de amônio ($\geq 97\%$) (Acros Orgânicos, New Jersey, EUA), ácido clorídrico (36-38% v/v) (Mallinckrodt Baker, Edo. de Mexico, México).

3.1.4 Equipamentos e consumíveis

- Agitador de amostras Mixer Glas-Col (Terre Haute, EUA);
- Balança analítica Mettler Toledo, modelo Excellence Plus XP 205, com precisão de 0,01 mg (Columbus, EUA);
- Banho de ultrassom Branson 2510 (Danbury, EUA);
- Centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5810-R (Hamburg, Alemanha);
- Concentrador de amostras Centrivap, Labconco (Kansas City, EUA);
- Cromatógrafo Agilent, modelo 1200 equipado com bomba binária G1312B, degaseificador G1379B (Wilmington, EUA) e injetor automático CTC Waters 2777 Sample Manager (Milford, EUA);
- Espectrômetro de massas triplo quadrupolo Applied Biosystem, modelo API 3200 (Toronto, Canadá) equipado com bomba de infusão Havard 22 Dual Modal Apparatus (South Natick, EUA), fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e software Analyst versão 1.4 (ABI/Sciex) para processamento de dados;
- Purificador de água Milli-Q, Millipore, A10 Gradiente (Milford, EUA);
- Vortex, Genie 2 (Bohemia, EUA);
- Coluna Atlantis HILIC (150 x 2,1 mm; 3 μm), Waters (Milford, EUA);
- Coluna Luna HILIC (150 x 2,0 mm; 3 μm); Phenomenex (Torrance, EUA);
- Pré-coluna Atlantis HILIC (10 x 2,1 mm; 3 μm), Waters (Milford, EUA);
- Filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,22 e 0,45 μm de poro Millex, Millipore (Billerica, EUA);
- Tubo para centrifugação tipo Falcon, Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Suíça).

3.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-EM/EM

3.2.1 Avaliação da solubilidade dos padrões analíticos

O uso da acetonitrila, metanol e metanol contendo 0,5% de ácido clorídrico foi avaliado como diluente no preparo das soluções estoque. Para a avaliação, soluções dos padrões analíticos foram preparadas na concentração de 1 mg.mL^{-1} , utilizando a acetonitrila, o metanol e o metanol acidificado como diluentes, submetendo-se à solubilização com auxílio de banho ultrassom por 10 minutos. As soluções foram mantidas em repouso por 3 horas à temperatura de 25°C e avaliadas individualmente quanto à formação ou não de precipitados, o não aparecimento de precipitados indica que a solubilidade no solvente é adequada à finalidade.

3.2.2 Preparo da solução estoque

Para obtenção das soluções estoque, cada fármaco e metabólito foi pesado em balança analítica (corrigindo-se a massa de acordo com a forma cloridrato ou hidratada) e solubilizados separadamente em metanol acidificado (HCl 0,5% v/v) atingindo-se concentração de 1 mg.mL^{-1} . As soluções foram estocadas em freezer a -40°C e protegidas da luz.

3.2.3 Preparo das soluções de trabalho

As soluções de trabalho foram preparadas da seguinte forma: concentrações intermediárias e solução de padrão interno foram diluídas em metanol e as

concentrações finais dos demais analitos foram diluídas em acetonitrila contendo 0,05% de ácido fórmico e 3 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio.

3.2.4 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas

A checagem de sinal dos analitos foi feita através de análise por infusão direta no espectrômetro de massas. Com o objetivo de definir a melhor condição de ionização dos analitos, esse experimento foi realizado preparando-se soluções de trabalho a 100 ng.mL⁻¹, diluídas em uma mistura de acetonitrila:água (50:50, v/v), variando-se as concentrações dos aditivos (QUADRO 3). As soluções foram infundidas em bomba seringa a um fluxo de 10 µL.min⁻¹ na interface *electrospray*, no modo positivo de ionização. A posição do capilar foi mantida em 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal.

ADITIVOS	CONCENTRAÇÕES
Ácido fórmico	0,01%
	0,05%
	0,1%
	0,2%
	0,5%
	1%
Formiato de amônio	3 mM
	5 mM
	10 mM
Ácido fórmico e formiato de amônio	0,05% e 3 mM

QUADRO 3 - CONCENTRAÇÕES DE ADITIVOS UTILIZADAS PARA A CHECAGEM DE SINAL DOS ANALITOS

Na sequência foi realizado o experimento de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). A concentração dos analitos foi variada a fim de se obter uma intensidade de sinal entre 2×10^5 e 1×10^6 . Os parâmetros potencial de desagrupamento (PD), potencial de entrada (EP), potencial de entrada na cela de

colisão (CEP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da cela de colisão (CXP) foram otimizados automaticamente, obtendo-se os fragmentos de cada analito.

A próxima etapa foi a análise por injeção em fluxo (FIA). Nessa etapa, o cromatógrafo a líquido foi acoplado ao espectrômetro de massas para otimização dos seguintes parâmetros: gás de colisão (CAD); gás de interface (CUR); gás de nebulização (GS1); gás auxiliar (GS2); voltagem do capilar (IS); temperatura da fonte. Nessa análise não foi utilizada coluna cromatográfica. A fase móvel foi composta por acetonitrila:água (50:50 v/v) contendo 0,05% de ácido fórmico e 3 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio, mantendo-se um fluxo de 200 µL.min⁻¹ e a posição do capilar em 3 mm na vertical e 5 mm na horizontal. O volume de injeção foi de 20 µL e todos os analitos estavam na concentração de 200 ng.mL⁻¹ na solução de trabalho.

3.2.5 Otimização cromatográfica

A otimização cromatográfica foi conduzida utilizando-se duas colunas cromatográficas: Atlantis HILIC (150 x 2,1 mm; 3 µm) e Luna HILIC (150 x 2,0 mm; 3 µm). Diferentes proporções de água, acetonitrila e aditivos foram testadas, mantendo-se 0,05% de ácido fórmico e 3 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio como aditivos e proporção acetonitrila:água 79:21 (v/v), fluxo de 200 µL.min⁻¹ e temperatura a 25°C. Após a escolha da coluna, foram modificados os demais parâmetros (fluxo, temperatura e volume de injeção).

Os ensaios foram realizados com soluções de trabalho contendo a mistura contendo 1000 ng.mL⁻¹ de levodopa, carbidopa e 3-O-metildopa, 250 ng.mL⁻¹ de dopamina e 2500 ng.mL⁻¹ de levodopa deuterada.

3.2.5.1 Preparo da fase móvel

Para compor a fase móvel foram preparadas duas soluções: solução A (acetonitrila/água (95:5 v/v)) e solução B (água), ambas contendo 0,05% de ácido

fórmico e 3 mmol.L^{-1} de formiato de amônio, utilizando-se a proporção 79:21 (v/v) da solução A e solução B, respectivamente.

3.3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DO PLASMA HUMANO

A fim de se obter um método simples de extração com desejada precisão, as técnicas de precipitação de proteínas plasmáticas e extração líquido-líquido foram testadas, avaliando-se quatro solventes: acetonitrila contendo 0,05% de ácido fórmico e 3 mmol.L^{-1} de formiato de amônio; metanol; hexano; terc-butil-metil éter.

Para realização desse teste foram preparadas amostras em triplicata. Alíquotas de $400 \mu\text{L}$ de plasma branco (isento dos medicamentos em estudo) foram transferidas para tubos plásticos de 2 mL (tipo *Eppendorf*). Na sequência foram adicionados ao plasma branco $50 \mu\text{L}$ de solução de trabalho contendo os analitos em estudo e $50 \mu\text{L}$ de solução de padrão interno, obtendo-se concentrações equivalentes a 400 ng.mL^{-1} de levodopa, carbidopa e 3-O-metildopa, 200 ng.mL^{-1} de dopamina e 2500 ng.mL^{-1} de padrão interno.

As amostras foram, então, homogeneizadas em vórtex durante 1 min e, por fim, extraídas da seguinte forma:

Precipitação de proteínas plasmáticas: uma alíquota de $1500 \mu\text{L}$ de solvente (acetonitrila contendo 0,05% de ácido fórmico e 3 mmol.L^{-1} de formiato de amônio ou metanol) foi adicionada ao tubo de plástico contendo o plasma branco adicionado de solução padrão. As amostras foram, então, agitadas em vórtex durante 3 min e, em seguida, centrifugadas por 20 min., a 14000 rpm, a 5°C . Na sequência, o sobrenadante foi filtrado em filtro de PVDF de $0,22 \mu\text{m}$ de poro e analisado por CLAE-EM/EM.

Extração líquido-líquido: uma alíquota de $1200 \mu\text{L}$ de solvente (hexano ou terc-butil-metil éter) foi adicionada ao tubo de plástico contendo o plasma branco adicionado de solução padrão. As amostras foram, então, agitadas em vórtex durante 3 min e, em seguida, centrifugadas por 10 min., a 14000 rpm, a 5°C . Na

sequência, o sobrenadante foi filtrado em filtro de PVDF de 0,22 μm de poro e analisado por CLAE-EM/EM.

Os métodos de extração e a eficiência dos solventes utilizados foram comparados e avaliados de acordo com a área dos picos obtidos através de cada procedimento.

3.3.1 Ensaio de recuperação

Para condução desse ensaio foram preparadas amostras em sextuplicata e em duas concentrações, baixa e alta, para todos os analitos, de duas formas:

Analitos adicionados antes da extração: Alíquotas de 400 μL de plasma branco (isento dos medicamentos em estudo) foram transferidas para tubos plásticos de 2 mL (tipo *Eppendorf*). Na sequência foram adicionados ao plasma branco 50 μL de solução de trabalho contendo os analitos em estudo e 50 μL de solução de padrão interno, obtendo-se concentrações equivalentes a 225 e 640 ng.mL^{-1} de levodopa, 195 e 640 ng.mL^{-1} de carbidopa e 3-O-metildopa, 60 e 320 ng.mL^{-1} de dopamina e 2500 ng.mL^{-1} de padrão interno. As amostras foram, então, homogeneizadas em vórtex durante 1 min. Uma alíquota de 1500 μL de acetonitrila contendo 0,05% de ácido fórmico e 3 mmol.L^{-1} de formiato de amônio foi adicionada ao tubo de plástico contendo o plasma branco adicionado de solução padrão. As amostras foram, então, agitadas em vórtex durante 3 min e, em seguida, centrifugadas por 20 min., a 14000 rpm, a 5°C. Na sequência, o sobrenadante foi filtrado em filtro de PVDF de 0,22 μm de poro e analisado por CLAE-EM/EM.

Analitos adicionados antes da extração: Alíquotas de 400 μL de plasma branco (isento dos medicamentos em estudo) foram transferidas para tubos plásticos de 2 mL (tipo *Eppendorf*). Na sequência foram adicionadas de 1600 μL de agente de precipitação, agitadas em vórtex durante 3 min. e, em seguida, centrifugadas (14000 rpm, 20 min., 5°C). Uma alíquota de 950 μL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo plástico e se adicionou 25 μL da solução de trabalho contendo analitos de interesse e 25 μL da solução do PI, obtendo-se concentração final dos analitos igual a 225 e 640 ng.mL^{-1} de levodopa, 195 e 640

ng.mL⁻¹ de carbidopa e 3-O-metildopa, 60 e 320 ng.mL⁻¹ de dopamina e 2500 ng.mL⁻¹ de padrão interno. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 1 min e filtradas em filtro de PVDF de 22 µm de poro e analisadas por CLAE-EM/EM.

A recuperação e o desvio padrão relativo foram calculados a partir da comparação das áreas obtidas nas duas formas de preparo (adição dos analitos antes e após o processo de extração). A adição das soluções contendo os analitos e o padrão interno na matriz já extraída representou 100% de extração. A recuperação foi calculada da seguinte forma:

$$RECUPERAÇÃO \% = \frac{R_1}{R_2} \times 100$$

Onde R₁ é a resposta dos analitos adicionados antes da extração e R₂ é a resposta dos analitos adicionados depois da extração.

3.3.2 Preparo da amostra

A precipitação de proteínas plasmáticas das amostras de pacientes foi conduzida da seguinte forma: alíquotas de 400 µL de plasma de pacientes foram transferidas para tubos plásticos de 2 mL (tipo *Eppendorf*). Na sequência foram adicionados ao plasma 50 µL de padrão interno, obtendo-se concentração final de 2500 ng.mL⁻¹. As amostras foram, então, homogeneizadas em vórtex durante 1 min. Uma alíquota de 1600 µL de acetonitrila contendo 0,05% de ácido fórmico e 3 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio foi adicionada ao tubo de plástico contendo o plasma branco adicionado de solução padrão. As amostras foram, então, agitadas em vórtex durante 3 min e, em seguida, centrifugadas por 20 min., a 14000 rpm, a 5°C. Na sequência, o sobrenadante foi filtrado em filtro de PVDF de 0,22 µm de poro e analisado por CLAE-EM/EM.

3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método foi realizada de acordo com a RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

3.4.1 Preparo das amostras controle de qualidade e níveis da curva de calibração

As amostras utilizadas para validação do método foram preparadas da seguinte forma:

Uma alíquota de 400 μL de plasma branco (isento de analitos), descongelada a temperatura ambiente, foi acrescida de 50 μL de solução de trabalho contendo carbidopa, dopamina, levodopa e 3-O-metildopa de forma a se obter os diferentes níveis das curvas analíticas (QUADRO 4) e amostras controles (exceto CQD) (QUADRO 5). Também foi adicionado 50 μL de solução de trabalho de levodopa deuterada (PI) em todos os níveis das curvas e amostras controles, obtendo-se uma concentração final de 2500 ng.mL^{-1} .

Nível	Concentração (ng.mL^{-1})				
	Levodopa	Carbidopa	3-O-metildopa	Dopamina	Levodopa deuterada (PI)
1	75	65	65	20	2500
2	200	200	200	100	
3	400	400	400	200	
4	500	500	500	250	
5	650	650	650	325	
6	800	800	800	400	

QUADRO 4 - NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS NA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Amostras CQ	Concentração (ng.mL ⁻¹)				
	Levodopa	Carbidopa	3-O-metildopa	Dopamina	Levodopa deuterada (PI)
LIQ	75	65	65	20	2500
CQB	225	195	195	60	
CQM	430	430	430	210	
CQA	640	640	640	320	
CQD	400*	400*	400*	200*	

QUADRO 5 - NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS NAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE

NOTA: CQ: amostras de controle de qualidade; LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de média concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração; CQD: controle de qualidade de diluição; *Concentração obtida após a diluição de 5 vezes em plasma branco.

As amostras foram, então, homogeneizadas em vórtex durante 1 min. Uma alíquota de 1500 µL do agente de precipitação foi adicionada às amostras, agitou-se em vórtex durante 3 min e, em seguida, centrifugou-se por 20 min., a 14000 rpm, a 5°C. Na sequência, o sobrenadante foi filtrado em filtro de PVDF de 0,22 µm de poro e analisadas por CLAE-EM/EM.

Para o preparo da CQD, uma alíquota de 350 µL de plasma branco (isento de analitos), descongelada a temperatura ambiente, foi acrescida de 50 µL de solução de trabalho contendo carbidopa, dopamina, levodopa e 3-O-metildopa de modo a se obter concentrações de 4000 ng.mL⁻¹ de dopamina e 8000 ng.mL⁻¹ dos demais analitos, respectivamente. Em seguida diluiu-se essa amostra transferindo-se 100 µL da amostra para um tubo plástico contendo 300 µL plasma branco, obtendo-se um volume total de 400 µL. Essa amostra diluída foi preparada adicionando-se 50 µL de PI e agitando-se em vórtex por 1 min. Uma alíquota de 1550 µL do agente de precipitação foi adicionada às amostras e procedeu-se conforme descrito no parágrafo anterior.

3.4.2 Seletividade

A seletividade foi avaliada através da comparação das matrizes de plasma isento dos analitos de interesse e plasma adicionado de padrão.

Seis amostras (quatro de plasma normal, uma de plasma lipêmico e uma de plasma hemolisado) isentas dos analitos de interesse, foram preparadas da seguinte forma: alíquotas de 400 µL de cada amostra foram adicionadas de 1600 µL de agente de precipitação, agitadas em vórtex durante 3 min. e, em seguida, centrifugadas (20 min, 14000 rpm, 5°C). O sobrenadante foi filtrado em filtro de PVDF de 22 µm de poro.

Outras seis amostras (quatro de plasma normal, uma de plasma lipêmico e uma de plasma hemolisado) foram adicionadas de 50 µL solução de trabalho contendo os analitos de interesse de forma a se obter concentração correspondente ao LIQ e 50 µL de PI obtendo-se a concentração de 2500 ng.mL⁻¹. Essas amostras passaram, então, pelo procedimento de precipitação de proteínas plasmáticas e filtração conforme descrito no item 3.4.1.

As amostras foram analisadas e os cromatogramas obtidos das amostras isentas dos analitos e das amostras adicionadas de padrão foram sobrepostos e comparados. Para que o método seja considerado seletivo, nenhum pico interferente próximo aos tempos de retenção dos analitos deve apresentar área superior a 20% da área das amostras LIQ e próximo ao tempo de retenção do PI, o valor não deve ser superior a 5% da área do PI (BRASIL, 2012).

3.4.3 Efeito residual (*Carryover*)

O efeito residual foi avaliado analisando-se a injeção de uma amostra branco, seguida de uma amostra adicionada de padrão preparado na concentração correspondente ao limite superior de quantificação (LSQ) preparada de acordo com o item 3.4.1, e, logo após, mais duas injeções da mesma amostra branco foram realizadas. Os picos presentes nas injeções da amostra branco devem ser comparados com as amostras de concentração correspondente ao LIQ. Para o método ser considerado isento de efeito residual, as áreas dos picos interferentes não devem ser significativas, ou seja, não devem ser superiores a 20% da área das amostras LIQ e 5% da área do PI (BRASIL, 2012).

3.4.4 Efeito matriz

Para avaliação do efeito matriz foram preparadas oito replicatas dos padrões em solução na concentração do CQA e oito replicatas na concentração do CQB.

Também foram preparadas oito amostras branco - quatro de plasma normal, duas de plasma lipêmico e duas de plasma hemolisado. Alíquotas de 400 μL de cada amostra foram adicionadas de 1600 μL de agente de precipitação, agitadas em vórtex durante 3 min. e, em seguida, centrifugadas (14000 rpm, 20 min., 5°C). Uma alíquota de 950 μL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo plástico e se adicionou 25 μL da solução de trabalho contendo analitos de interesse e 25 μL da solução do PI, obtendo-se concentração final dos analitos igual à CQA. As amostras foram, então, homogeneizadas em vórtex por 1 min e filtradas em filtro de PVDF de 22 μm de poro para os vials. Da mesma forma foram preparadas mais oito amostras, mas com concentração final igual ao CQB.

Para cada amostra foi calculado o fator matriz normalizado por PI (FMN) conforme descrito no item 2.7.7. Para o método ser considerado isento de efeito matriz, o desvio padrão relativo (DPR) entre os FMN das amostras adicionadas de padrão e as respectivas soluções padrão não deve ser superior a 15% (BRASIL, 2012).

3.4.5 Limite de detecção e quantificação

Os limites inferiores de detecção (LD) e quantificação (LIQ) foram determinados calculando-se a relação sinal/ruído. As amostras para realização desse ensaio foram preparadas em triplicata conforme descrito a seguir: alíquotas de 400 μL de plasma branco foram adicionadas de 1600 μL de agente de precipitação, agitadas em vórtex durante 3 min. e, em seguida, centrifugadas (14000 rpm, 20 min., 5°C). Transferiu-se uma alíquota de 990 μL de sobrenadante para um novo tubo plástico e adicionou-se 10 μL de solução de trabalho contendo analitos de interesse obtendo-se concentração final correspondente a 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. As amostras

foram, então, homogeneizadas em vórtex por 30 s e filtradas em filtro de PVDF de 22 µm de poro. Essas amostras foram diluídas em série (plasma branco processado) e injetadas no CLAE-EM/EM até a obtenção do menor pico detectável. O LD foi determinado através da relação sinal/ruído 3:1 enquanto que o LIQ foi determinado através da relação sinal/ruído de, no mínimo, 10:1, considerando um desvio padrão relativo (DPR) <20% entre as triplicatas.

3.4.6 Curva de calibração

Para realização do ensaio curva de calibração foram preparadas três curvas de calibração, em seis níveis de concentração, durante três dias consecutivos, conforme descrito no item 3.4.1. Também foram analisadas a amostra branco (isenta de analitos) e a amostra zero (adicionada apenas de PI).

Para construção das curvas de calibração foi utilizado o método dos mínimos quadrados – como controle da relação entre as variáveis – e o controle de *outliers* foi realizado através dos limites de confiança e predição (95% de confiança). A análise de resíduos (95% de confiança) foi realizada para calcular as incertezas ao longo da curva de calibração. Também foram calculados o desvio padrão (dp) e o desvio padrão relativo (DPR) para cada nível de concentração. A regressão linear utilizada foi 1/x.

Os padrões de calibração devem primeiramente ser aprovados para compor a equação da curva, ou seja, não devem ser observadas variações superiores a 15% em relação à concentração nominal do nível da curva, exceto para o LIQ, cuja variação não pode ser superior a 20%.

Considera-se a curva de calibração aprovada quando no mínimo seis padrões da curva, incluindo o LIQ e o LSQ, sejam aprovados segundo os critérios acima (BRASIL, 2012).

3.4.7 Precisão e exatidão

Para o ensaio de precisão e exatidão foram preparadas em quintuplicata amostras nas concentrações LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD, em quintuplicatas, conforme descrito no item 3.4.1. Esses ensaios foram avaliados em um mesmo dia (intradia) e durante três dias consecutivos (interdia).

A precisão foi expressa calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) entre as concentrações das replicatas de um mesmo nível de concentração e a exatidão foi calculada através do erro padrão relativo (EPR) conforme descrito no item 2.7.5. Para que o método seja considerado preciso e exato, as variações devem ser menores que 15% para todos os níveis, exceto para o LIQ, que os desvios devem ser menores que 20%.

3.4.8 Teste de estabilidade

3.4.8.1 Estabilidade de curta duração, longa duração e ciclos de congelamento e descongelamento

Para avaliação da estabilidade dos analitos em matriz biológica, alíquotas de 400 μ L de plasma foram adicionadas de 50 μ L de solução contendo os analitos, de modo a obter concentrações correspondentes ao CQB e CQA, homogeneizando em vórtex durante 1 min. As amostras foram preparadas em triplicata para cada nível de concentração e teste, sendo armazenadas nas condições e tempo descritos no QUADRO 6.

Estudo	Concentração	Nº de amostras	Condições do estudo
Curta duração	CQB	3	0-1h na bancada (temperatura ambiente – 25 °C)
	CQA	3	
Longa duração	CQB	3	0-5 dias (freezer -80°C)
	CQA	3	
Ciclos de congelamento e descongelamento	CQB	3	3 ciclos de 24h cada (freezer -80°C e temperatura ambiente – 25°C)
	CQA	3	

QUADRO 6 - CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS E CONDIÇÕES UTILIZADAS NOS ESTUDOS DE ESTABILIDADE DOS ANALITOS EM PLASMA

NOTA: CQB, controle de qualidade de baixa concentração; CQA, controle de qualidade de alta concentração.

Após o tempo determinado para cada estudo, as amostras foram, então, adicionadas do padrão interno, submetidas à extração por precipitação de proteínas e filtração, conforme descrito no item 3.4.1. As amostras foram analisadas por CLAE-EM/EM, calculando-se as concentrações de acordo com uma curva de calibração recém-preparada. A estabilidade é demonstrada quando o desvio observado não for superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

3.4.8.2 Estabilidade pós-processamento

Para avaliação da estabilidade pós-processamento, alíquotas de 400 µL foram adicionadas de 50 µL de solução contendo os analitos e 50 µL de solução de PI, de modo a obter concentrações correspondentes ao CQB e CQA e 2500 ng.mL⁻¹ de PI. Foram realizadas três replicatas para cada concentração. Na sequência, as amostras foram submetidas à extração por precipitação de proteínas e filtração, conforme descrito no item 3.4.1. As amostras foram armazenadas no gerenciador de amostras (4°C, 0-6h). Após esse período, as amostras foram analisadas por CLAE-EM/EM, calculando-se as concentrações de acordo com uma curva de calibração recém-preparada. A estabilidade é demonstrada quando o desvio observado não for superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

3.4.8.3 Estabilidade dos analitos em solução

Foram avaliadas nesse ensaio soluções estoque e de trabalho dos analitos e PI nas concentrações de 1 mg.mL^{-1} e 1000 ng.mL^{-1} em triplicata. As condições de estudo avaliadas foram de 0-20 dias armazenados em freezer -40°C (solução estoque) e 0-6h em temperatura ambiente (solução de trabalho) (QUADRO 7).

Estudo	Concentração	Nº de amostras	Condições do estudo
Solução estoque	1 mg.mL^{-1}	3	0-20 dias (freezer, -40°C)
Solução de trabalho	1000 ng.mL^{-1}	3	0-6h (geladeira, 4°C)

QUADRO 7 - CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS E CONDIÇÕES UTILIZADAS NOS ESTUDOS DE ESTABILIDADE DOS ANALITOS EM SOLUÇÃO

Após o tempo na condição determinada, as soluções foram diluídas em fase móvel (item 3.2.5.1) obtendo-se concentração dos analitos equivalente à CQM e o do PI de 2500 ng.mL^{-1} , filtradas em filtro de PVDF de $22 \mu\text{m}$ de poro e analisadas por CLAE-EM/EM. As concentrações obtidas das soluções em estudo foram comparadas com as concentrações das soluções recém-preparadas de mesma concentração. A estabilidade é demonstrada quando o desvio observado não for superior a 10% da média das concentrações obtidas com relação à média das soluções recém-preparadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DOS PADRÕES ANALÍTICOS

Dentre os solventes avaliados, o metanol acidificado com 0,5% de ácido clorídrico foi o que proporcionou a completa solubilização de todos os padrões analíticos.

4.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

4.2.1 Checagem e otimização do sinal dos analitos

Para análise por infusão direta no espectrômetro de massas foi selecionado a fonte de ionização *electrospray*, devido à sua robustez e sensibilidade, e modo positivo baseado nos métodos encontrados na literatura e características químicas dos analitos (QUADRO 1).

Soluções de trabalho foram preparadas em diferentes aditivos (QUADRO 3) e infundidas separadamente, avaliando-se a intensidade e estabilidade do sinal através do modo *Multiple Ions* (MI). Foi observada para todos os analitos moléculas na forma protonada $[M+H]^+$.

Primeiramente, foram avaliadas diferentes concentrações de ácido fórmico e formiato de amônio, separadamente. Após a obtenção dos resultados, a concentração de cada aditivo que proporcionou melhor intensidade de sinal foi escolhida para compor a combinação entre eles.

Li, Rossi e Fountain (2000) testaram a infusão direta de soluções de levodopa e dopamina em ácido clorídrico, ácido perclórico, ácido acético, ácido trifluoroacético e ácido fórmico, obtendo-se uma boa intensidade de sinal com o

ácido fórmico 2,5%. Comparando-se os resultados dos diferentes aditivos testados, também se obteve uma melhor intensidade de sinal utilizando o ácido fórmico, mas em uma concentração de 0,05%, com exceção da levodopa (FIGURA 8).

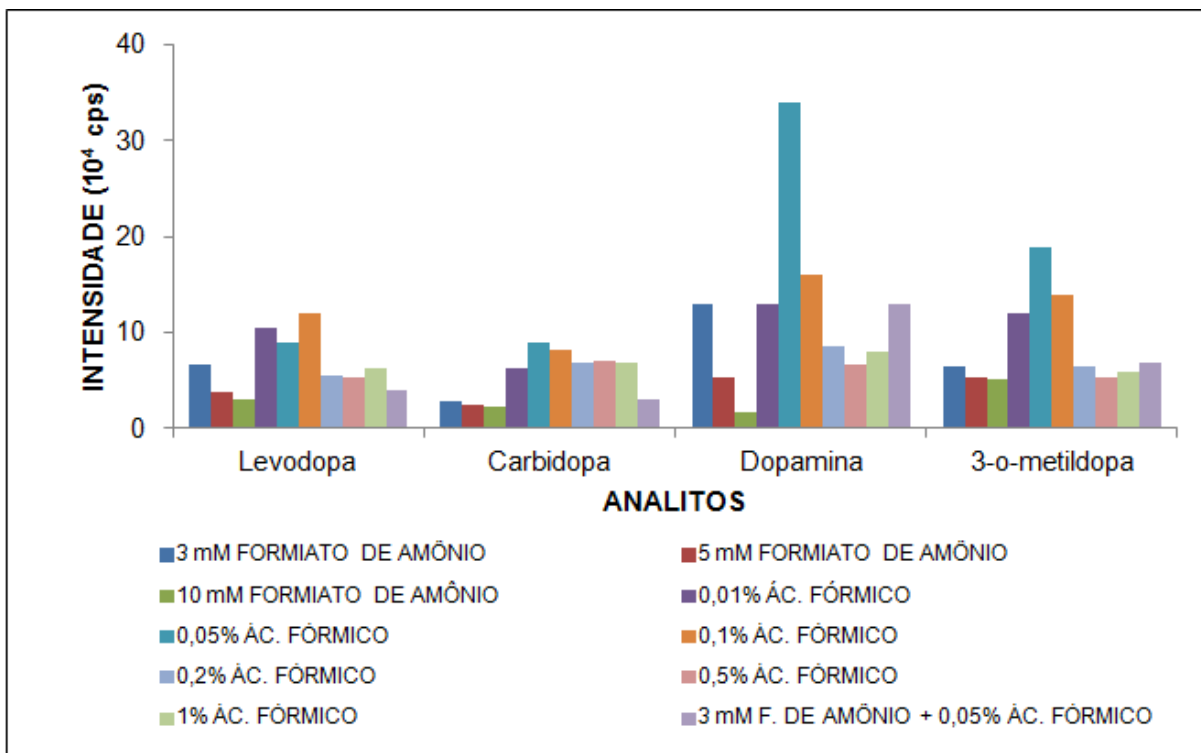


FIGURA 8 - INTENSIDADE DE SINAL DOS ANALITOS OBTIDOS ATRAVÉS DE ANÁLISE POR INFUSÃO DIRETA NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS UTILIZANDO DIFERENTES ADITIVOS

A escolha da concentração do ácido fórmico para os testes iniciais foi baseada na melhor condição para maioria dos analitos (0,05%). O espectro obtido na condição otimizada pode ser observado na FIGURA 9.

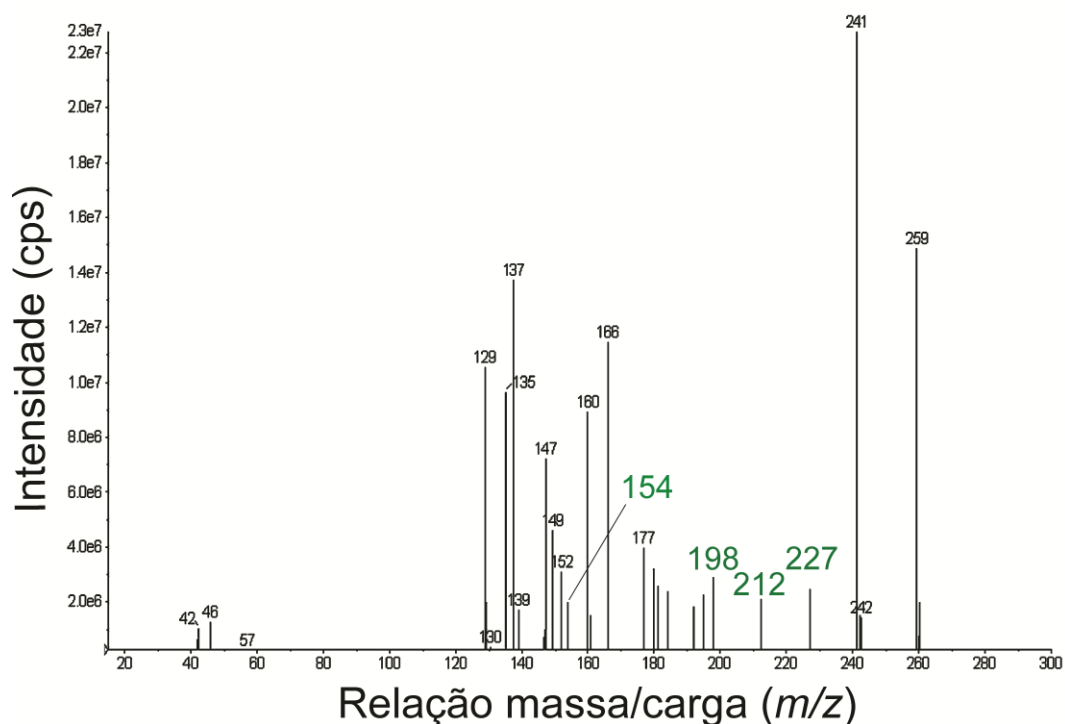


FIGURA 9 - ESPECTRO DE MASSAS DA LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA NA CONCENTRAÇÃO DE 500 ng.mL⁻¹ CADA.

NOTA: DILUENTE: acetonitrila:água 50:50 (v/v) contendo 0,05% de ácido fórmico. m/z 154 = dopamina; m/z 198 = levodopa; m/z 212 = 3-O-metildopa; m/z 227 = carbidopa.

4.2.2 Análise por monitoramento de reações múltiplas (MRM)

Após a checagem e otimização da intensidade do sinal dos analitos, partiu-se para análise por MRM. A concentração adequada para realização desse experimento foi de 200 ng.mL⁻¹ para cada um dos analitos. Os parâmetros individuais de cada analito (PD, EP, CEP, CE e CXP) foram otimizados, obtendo-se os íons fragmentos dos analitos. O íon fragmento mais intenso foi escolhido para quantificação e o segundo mais intenso, para qualificação (QUADRO 8).

Analito	Massa Molecular (Da)	Íon Molecular [M+H] ⁺ (m/z)	Transições (m/z)	CE (eV)	CEP (V)	CXP (V)	PD (V)	EP (V)
3-O-metildopa	211,1	212,1	212,1→195,0* 212,1→166,2	17	14	4	21	4,5
				19	14	4	21	4,5
Carbidopa	226,0	227,0	227,0→181,3* 227,0→71,0	17	14	4	26	5
				33	14	6	26	5
Dopamina	153,1	154,1	154,1→137,2* 154,1→91,1	13	10	4	16	6,5
				29	10	4	46	6,5
Levodopa	197,2	198,2	198,2→152,1* 198,2→181,2	17	12	4	26	5,5
				13	12	4	41	5,5
Levodopa deuterada (D ₃) (PI)	200,2	201,2	201,2→154,1* 201,2→155,0	17	12	4	21	7
				35	12	4	21	7

QUADRO 8 - PARÂMETROS OTIMIZADOS E TRANSIÇÕES ESCOLHIDAS PARA MONITORAMENTO DOS ANALITOS EM ESTUDO

NOTA: * transição de quantificação; CE, energia de colisão; CEP, potencial de entrada na célula de colisão; CXP, potencial de saída da cela; PD, potencial de desagrupamento; EP, potencial de entrada; PI, padrão interno.

Os íons fragmentos obtidos pelo método para os analitos em estudo coincidiram com os já relatados pela literatura, confirmando que a escolha das transições é adequada. De acordo com as propostas de fragmentação apresentadas por Bergquist (1998) e Syslová (2011), o íon fragmento m/z 137 da dopamina e o m/z 181 da levodopa são obtidos pela desaminação dos íons precursores m/z 154 e m/z 198 ([M+H-NH₃]⁺), respectivamente.

4.2.3 Análise por injeção em fluxo (FIA)

Definidas as condições do analisador, a próxima etapa foi a otimização dos parâmetros da fonte de ionização por *electrospray*. Esse experimento foi conduzido acoplando-se o cromatógrafo a líquido ao espectrômetro de massas sem a presença da coluna cromatográfica. A otimização dos parâmetros CAD, CUR, GS1, GS2, IS e temperatura é importante, uma vez que permite a realização da análise por espectrometria de massas utilizando-se um fluxo maior, característico dos métodos cromatográficos.

Os valores obtidos para os parâmetros da fonte de ionização foram: CAD: 10 psi; CUR: 10 psi; GS1: 50 psi; GS2: 45 psi; IS: 5000 V; temperatura: 450°C.

4.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA CROMATOGRAFIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Considerando que os analitos em estudos possuem características básica e polar, o modo escolhido para cromatografia foi o modo HILIC. Assim como na fase normal, quanto mais polar o analito, maior sua retenção. No entanto, o mecanismo de retenção no modo HILIC é complexo e não é tão bem estabelecido como os mecanismos envolvidos na cromatografia por fase reversa. Além das interações hidrofílicas na partição, podem estar presentes interações eletrostáticas secundárias (atração ou repulsão) e interações por ligações de hidrogênio (MCCALLEY, 2007; CHIRITA *et al.*, 2010).

Um grande número de colunas compatíveis com o modo HILIC se tornou disponível nos últimos anos, com uma variedade de grupos funcionais ligados quando comparado às colunas de fase reversa. Isso torna o processo de escolha da fase estacionária uma etapa difícil, considerando que não há uma classificação dessas colunas disponível assim como para fase reversa (KAWACHI *et al.*, 2011).

Para facilitar a otimização de análises por HILIC, Chirita *et al* (2010) sugerem um esquema para o desenvolvimento de análises por essa técnica cromatográfica, sendo que a escolha da coluna é feita baseada na carga presente no analito. Considerando os valores de pKa dos analitos em estudo, em pH ácido a 3-O-metildopa, carbidopa e dopamina apresentam carga positiva e a levodopa está no estado zwitteriônico (eletricamente carregada, mas com carga total neutra). Sendo assim, a fim de se obter retenção adequada desses analitos, as colunas selecionadas para o desenvolvimento foram a Atlantis HILIC (150 x 2,1 mm; 3 µm) (sílica pura – carga negativa) e Luna HILIC (150 x 2,0 mm; 3 µm) (diol – neutra).

Uma vez definidas as fases estacionárias a serem avaliadas foi necessário definir a composição da fase móvel. Altas concentrações de solvente orgânico e baixas concentrações de água são requeridas para separação de compostos no

modo HILIC, uma vez que essa composição tem um bom impacto no tempo de retenção, perfil dos picos e sensibilidade do método (NEMOTO *et al.*, 2013). Quando comparados alcoóis e acetonitrila, aqueles possuem maior força de eluição. A acetonitrila é um solvente aprótico, sendo menos suscetível à formação de ligações de hidrogênio com o grupo funcional da fase estacionária ou com os próprios analitos (LI; HUANG, 2004; LIU *et al.*, 2008). Dessa forma, a acetonitrila foi escolhida para compor a fase móvel já que proporciona uma melhor retenção dos analitos polares como as catecolaminas endógenas.

O primeiro teste foi conduzido acoplando-se a coluna Atlantis HILIC (150 x 2,1 mm; 3 µm) à pré-coluna Atlantis HILIC (10 x 2,1 mm; 3 µm). Como fase móvel foi utilizada ACN:água (85:15 v/v) contendo 0,05% de ácido fórmico (v/v). A eluição foi realizada em modo isocrático com fluxo de 200 µL.min⁻¹. A temperatura de forno da coluna foi mantida em 25 °C e o volume de injeção foi de 10 µL. Infelizmente, nessas condições os compostos ficaram muito retidos e foram observados picos alargados.

Por isso, alterou-se a proporção de água para 30% na composição da fase móvel, mantendo-se os demais parâmetros. Todos os analitos apresentaram o típico comportamento na HILIC, ou seja, com o aumento da proporção de água na fase móvel, o tempo de retenção dos analitos foi reduzido consideravelmente. No entanto, os picos permaneceram alargados, com baixo fator de retenção e em uma possível região de supressão iônica (próximo do volume morto).

Sabe-se que o alargamento dos picos cromatográficos pode ocorrer por diversos fatores, dentre eles a saturação da capacidade da coluna devido a altas concentrações de analito. Portanto, para manter uma alta eficiência de separação é indicado o uso de baixos volumes de injeção (RUTA *et al.*, 2010). Por isso, o volume de injeção foi reduzido de 10 µL para 5 µL, observando-se uma melhora considerável no perfil dos picos cromatográficos. Além disso, a proporção de água na fase móvel foi reduzida para 22%, obtendo-se, com esta proporção, tempos de retenção adequados para todos os analitos em solução.

Entretanto, quando os analitos foram avaliados na matriz biológica, ocorreu a divisão dos picos cromatográficos, conforme mostra a FIGURA 10.

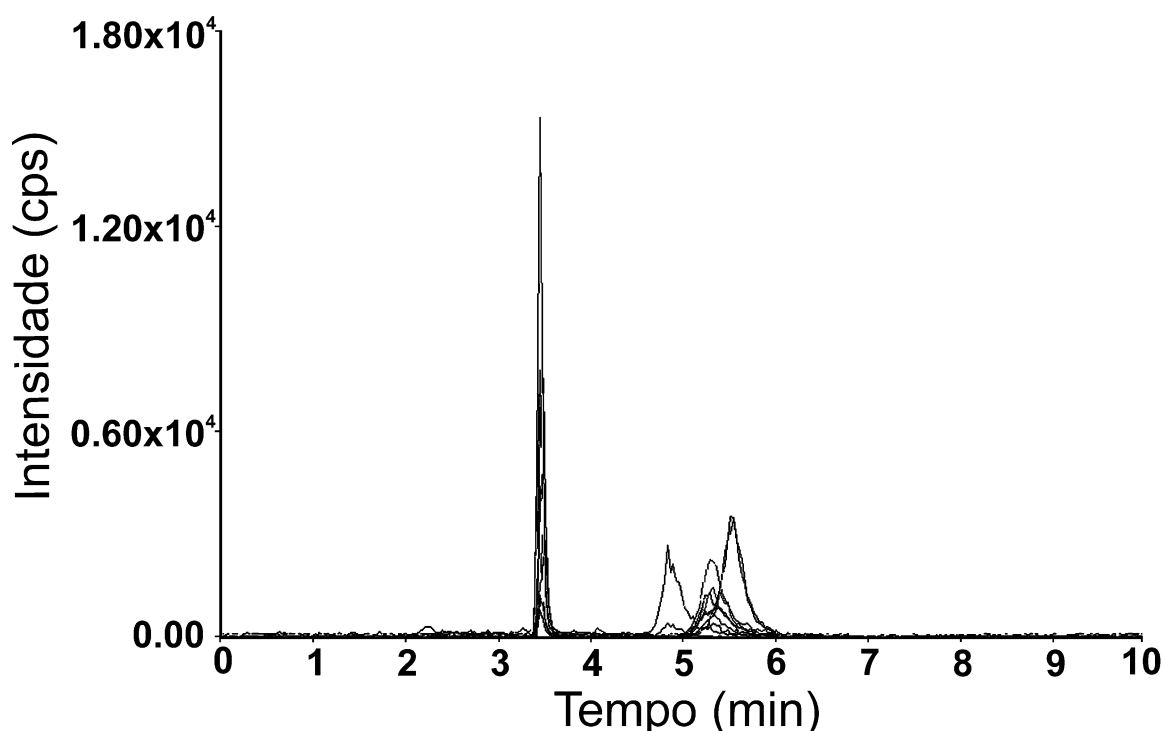


FIGURA 10 - CROMATOGRAMA DA MATRIZ PLASMA HUMANO ADICIONADA DAS SOLUÇÕES DE 3-O-METILDOPA, CARBIDOPA, DOPAMINA, LEVODOPA E PADRÃO INTERNO (LEVODOPA DEUTERADA) UTILIZANDO FASE MÓVEL ACN:H₂O (78:22 v/v) CONTENDO 0,05% DE ÁCIDO FÓRMICO (v/v)

NOTA: nos tempos de retenção entre 3 e 4 minutos e entre 4,5 e 6 minutos foram observados picos correspondentes às transições de quantificação e qualificação da levodopa, dopamina, carbidopa, 3-O-metildopa e padrão interno. Condições CROMATOGRÁFICAS: COLUNA: ATLANTIS HILIC (150 X 2,1 mm; 3 μ m); FLUXO: 200 μ L.min⁻¹; ELUIÇÃO: ISOCRÁTICO; VOL. INJEÇÃO: 5 μ L; TEMPERATURA DA COLUNA: 25°C

Com o objetivo de melhorar o perfil cromatográfico para matriz plasma, avaliou-se a coluna Luna HILIC (diol). No entanto, o mesmo comportamento foi observado. Possivelmente, parte dos analitos estava interagindo com componentes da matriz, causando a divisão dos picos cromatográficos. Dependendo dos aditivos que estão presentes na fase móvel, diferentes mecanismos de retenção podem ocorrer, resultando em diferentes comportamentos de eluição (HAO; XIAO; WENG, 2008).

Considerando as exigências da técnica analítica utilizada (CLAE-EM/EM) optou-se pela adição de formiato de amônio como aditivo na fase móvel. Para evitar o comprometimento da intensidade de ionização dos analitos, a concentração de formiato de amônio escolhida foi de 3 mmol.L⁻¹ combinada com 0,05% de ácido fórmico, a qual proporcionou a melhor resposta frente às demais concentrações avaliadas de sal. O uso dessa combinação resultou em um único pico cromatográfico para cada analito

O mecanismo de interação que proporcionou tal melhora não é bem definido pela literatura. Frente aos resultados obtidos, julga-se que o aditivo presente na fase móvel interage com os componentes da matriz, deixando os analitos livres para as interações com a fase estacionária, sem interferência. Nessas condições também foi observada uma melhora no perfil dos picos da carbidopa e 3-O-metildopa.

Entretanto, os picos da levodopa e PI se apresentaram extremamente alargados e, conseqüentemente, com baixa intensidade de resposta devido à grande retenção desses analitos na fase estacionária diol (FIGURA 11). Por isso foi selecionada a coluna Atlantis HILIC (sílica pura), na qual foram obtidos retenção e perfil de picos adequados para todos os analitos (FIGURA 12).

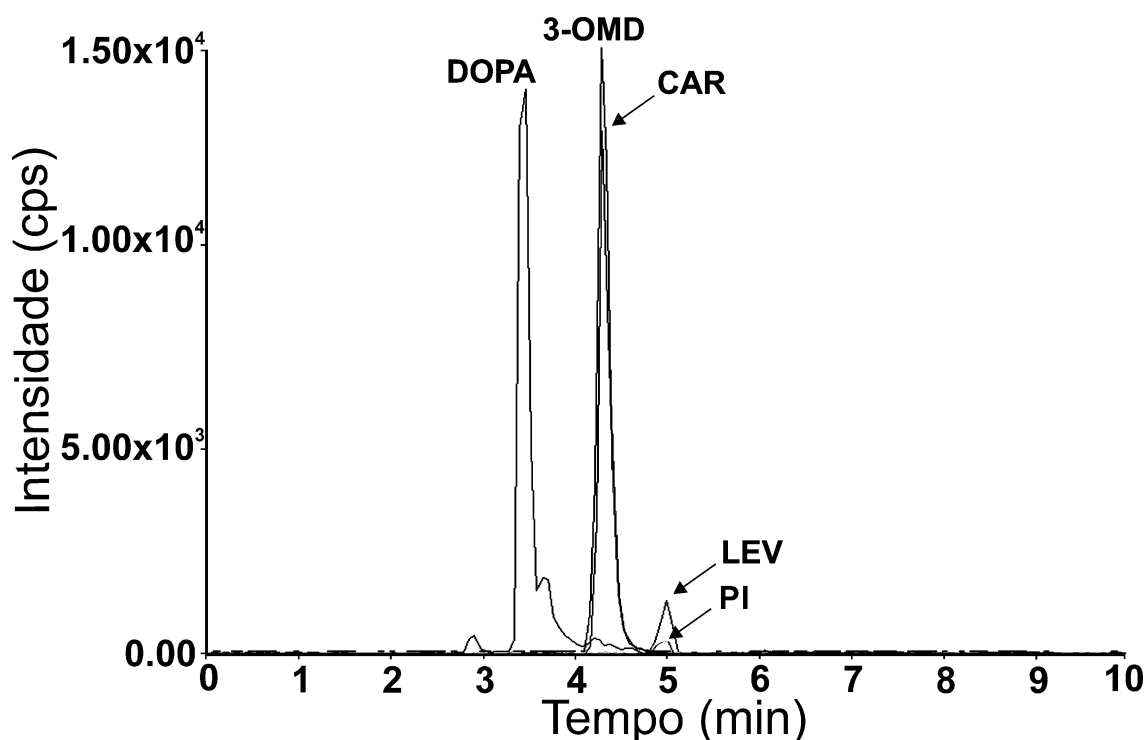


FIGURA 11 - CROMATOGRAMA DA MATRIZ PLASMA HUMANO ADICIONADO DAS SOLUÇÕES DE 3-O-METILDOPA, CARBIDOPA, DOPAMINA, LEVODOPA, E PADRÃO INTERNO (LEVODOPA DEUTERADA) FASE MÓVEL: ACN:H₂O (85:15 v/v) CONTENDO 3 mmol.L⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO E 0,05% DE ÁCIDO FÓRMICO (v/v)

NOTA: CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: COLUNA: LUNA HILIC (150 X 2,0 mm; 3 μm); VOL. DE INJEÇÃO: 5 μL ; FLUXO: 200 μL.min⁻¹; ELUIÇÃO: isocrático; TEMPERATURA DA COLUNA: 25°C. LEV, levodopa; CAR, carbidopa; 3-OMD, 3-O-metildopa; PI, levodopa deuterada.

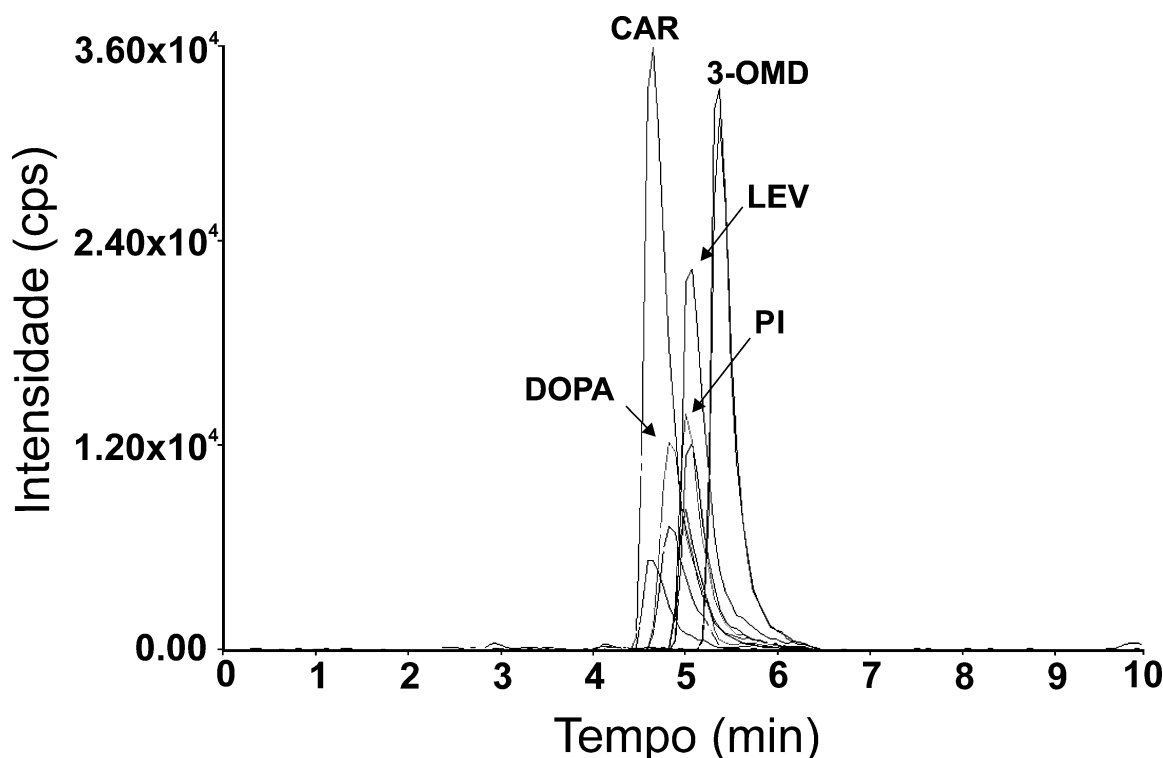


FIGURA 12 - CROMATOGRAMA DA MATRIZ PLASMA HUMANO ADICIONADO DAS SOLUÇÕES DE 3-O-METILDOPA, CARBIDOPA, DOPAMINA, LEVODOPA, E PADRÃO INTERNO (LEVODOPA DEUTERADA) FASE MÓVEL: ACN:H₂O (79:21 v/v) CONTENDO 3 mmol.L⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO E 0,05% DE ÁCIDO FÓRMICO (v/v)

NOTA: CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: COLUNA: ATLANTIS HILIC (150 X 2,1 mm; 3 μm); VOL. DE INJEÇÃO: 5 μL ; FLUXO: 200 μL.min⁻¹; ELUIÇÃO: isocrático; TEMPERATURA DA COLUNA: 25°C. LEV, levodopa; CAR, carbidopa; 3-OMD, 3-O-metildopa; PI, levodopa deuterada.

Outro importante parâmetro a ser avaliado na HILIC é a temperatura. Sabe-se que a temperatura da coluna é um parâmetro que pode influenciar na separação, afetando a difusão do analito, viscosidade da fase móvel e entalpia de transferência do analito entre as fases estacionária e móvel. Em geral, o aumento de temperatura da coluna pode aumentar o coeficiente de difusão, resultando em picos mais estreitos e, ao mesmo tempo, pode diminuir o tempo de retenção dos analitos. Além disso, a temperatura da coluna pode impactar na entalpia de transferência especialmente quando estão envolvidos mecanismos de troca iônica, os quais podem acontecer nas colunas de sílica pura devido aos grupos silanóis presentes (HAO; XIAO; WENG, 2008). Entretanto, para os analitos em estudo não foram observadas alterações significativas no tempo de retenção e perfil de pico entre as temperaturas de 25°C, 35°C e 45°C. Sendo assim, foi mantida a temperatura da coluna em 25°C.

Resumindo, para os analitos em questão, um cromatograma satisfatório foi obtido (FIGURA 12) utilizando as seguintes condições:

- Solução diluente da amostra: acetonitrila contendo 0,05% de ácido fórmico (v/v) e 3 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio;
- Fase móvel: solução A (acetonitrila/água (95:5 v/v)) e solução B (água), ambas contendo 0,05% de ácido fórmico e 3 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio – proporção 79:21 (v/v);
- Fluxo da fase móvel: 0,2 µL.min⁻¹;
- Volume de injeção: 5 µL;
- Solução de limpeza do gerenciado de amostras: 1 mL de metanol e 1 mL de acetonitrila entre as injeções;
- Coluna Atlantis HILIC (150 x 2,1 mm; 3 µm) acoplada à pré-coluna Atlantis HILIC (10 x 2,1 mm; 3 µm), Waters (Milford, EUA);
- Temperatura da coluna: 25 °C;
- Fonte de ionização: ESI operando no modo positivo de ionização;
- Aquisição dos dados: MRM com *dwell time* de 300 ms.

4.4 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DO PLASMA HUMANO

O preparo da amostra deve ser otimizado de modo a se obter um método preciso de extração, que minimize o efeito matriz e a presença de substâncias interferentes, com o menor número de etapas e custo possível (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Assim, a precipitação de proteínas plasmáticas e extração líquido-líquido foram inicialmente testadas pela simplicidade do preparo da amostra.

O solvente mais comumente utilizado para extração de catecolaminas é o ácido perclórico (QUADRO 1). Os métodos de preparo de amostra apresentados por Martins *et al.* (2013), Cesar *et al.* (2011) e Igarashi *et al.* (2003) utilizam esse ácido como agente de precipitação. No entanto, ácidos fortes nem sempre são compatíveis com a técnica ESI-EM/EM, podendo reduzir a sensibilidade do método (LI; ROSSI; FOUNTAIN, 2000). Como forma de contornar esse problema, uma etapa de diluição é incluída nesses métodos para minimizar esse efeito.

Com o objetivo de se evitar uma etapa adicional de diluição, foram testados como solventes acetonitrila, metanol, terc-butil metil éter e hexano. Quando utilizado o metanol, foi observado um maior carrear de componentes da matriz, possivelmente por proporcionar solubilização desses (NAJMANOVÁ *et al.*, 2011). Já para as amostras preparadas por extração líquido-líquido utilizando terc-butil metil éter e hexano obteve-se uma baixa recuperação, pois os solventes não favoreceram a solubilização dos analitos de interesse. Apenas quando utilizado a extração por precipitação de proteínas plasmáticas com acetonitrila foram obtidos resultados satisfatórios.

No modo HILIC é desejável que a composição do diluente da amostra deve ser a mais próxima possível da fase móvel (RUTA *et al.*, 2010). A fim de se obter um método de precipitação simples, acetonitrila contendo 0,05% de ácido fórmico e 3 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio foi utilizado como agente de precipitação. Dessa forma, o sobrenadante obtido foi compatível com a fase móvel, evitando o comprometimento do perfil cromatográfico dos picos. Então, após a centrifugação, etapas como evaporação e ressuspensão da amostra não foram necessárias, podendo-se apenas filtrar e injetar o sobrenadante diretamente no sistema. O método desenvolvido mostrou recuperação e precisão adequadas, como pode ser observado na TABELA 1.

TABELA 1 - RECUPERAÇÃO DA LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA OBTIDAS COM O MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS UTILIZANDO ACETONITRILA CONTENDO FORMIATO DE AMÔNIO 3 mmol.L⁻¹ E ÁCIDO FÓRMICO 0,05% (v/v)

Analito	Concentração (ng.mL ⁻¹)	Recuperação ^a (%) (média ± dp)	DPR (%)
Levodopa	225	82,02 ± 4,01	4,89
	640	84,85 ± 4,32	5,09
Carbidopa	195	76,88 ± 3,38	4,40
	640	73,58 ± 2,58	3,51
Dopamina	60	84,36 ± 5,01	5,90
	320	86,06 ± 0,07	1,20
3-O-metildopa	195	87,76 ± 4,10	4,67
	640	90,34 ± 1,23	1,37
Levodopa deuterada (PI)	2500	81,95 ± 2,23	2,72

NOTA: ^a n=6; dp, desvio padrão; DPR, desvio padrão relativo; PI, padrão interno.

4.5 VALIDAÇÃO

4.5.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada em plasma humano normal, lipêmico e hemolisado. Como mostra a FIGURA 13, nenhum interferente endógeno com intensidade de sinal significativa foi observado no tempo de retenção dos analitos de interesse e PI, indicando que o método é seletivo.

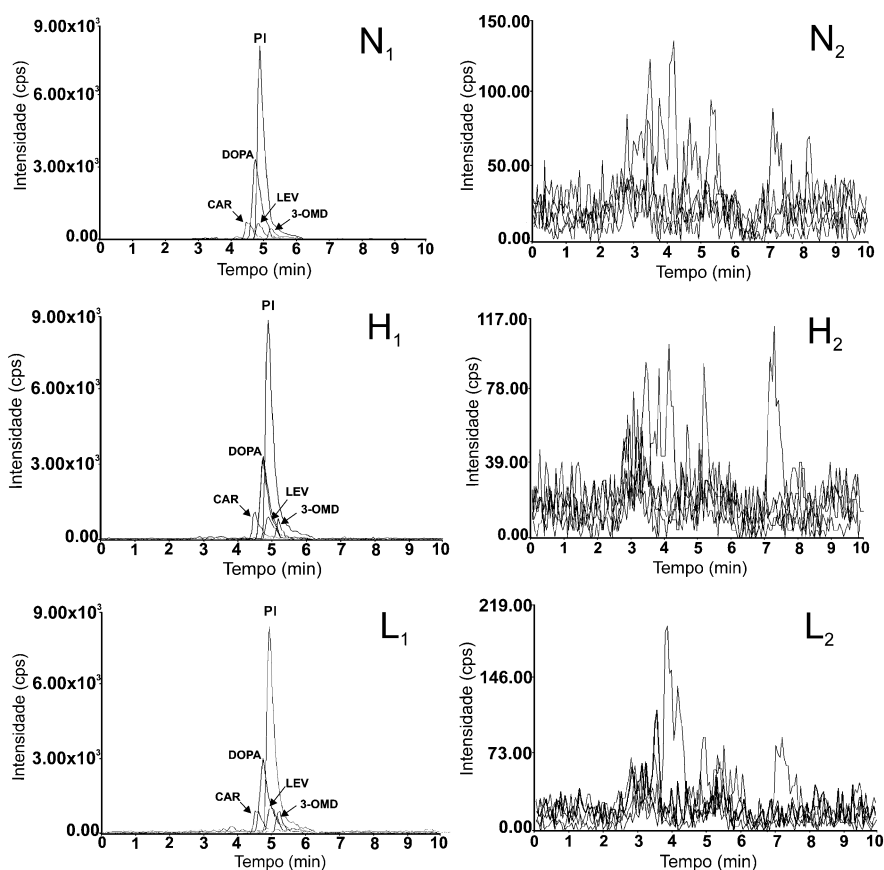


FIGURA 13 - SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DAS TRANSIÇÕES DA LEVODOPA, CARBIDOPA, DOPAMINA, 3-O-METILDOPA E PI OBTIDAS DAS AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO NORMAL, LIPÊMICO E HEMOLISADO E PLASMA BRANCO NORMAL, LIPÊMICO E HEMOLISADO ADICIONADO DE PADRÃO NA CONCENTRAÇÃO CORRESPONDENTE AO LIQ

NOTA: LIQ, limite inferior de quantificação; N₁, plasma normal (LIQ); N₂, plasma branco normal; H₁, plasma hemolisado (LIQ); H₂, plasma branco hemolisado; L₁, plasma lipêmico (LIQ); L₂, plasma branco lipêmico; LEV, levodopa; CAR, carbidopa; 3-OMD, 3-O-metildopa; PI, levodopa deuterada.

4.5.2 Efeito Residual (*Carryover*)

Conforme mostrado na FIGURA 14, na amostra branco injetada após a injeção da amostra de concentração correspondente ao LSQ para todos os analitos e 2500 ng.mL⁻¹ do PI foi observado apenas o pico referente a dopamina. Entretanto, a área da dopamina (área = 70200) correspondeu a menos de 3% da sua área na concentração LIQ (área = 1952) (FIGURA 14). Portanto, os resultados mostram que não há efeito residual que possa oferecer risco de interferência entre amostras analisadas com o método desenvolvido.

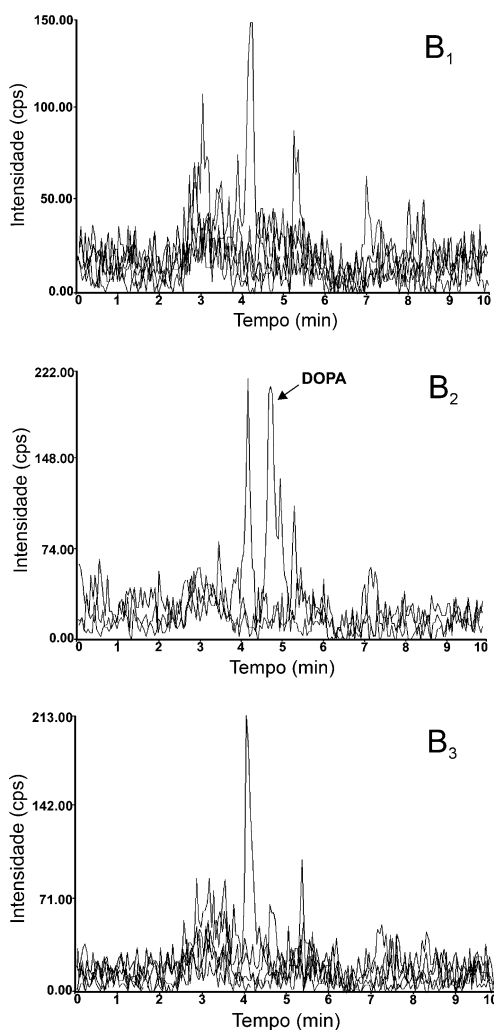


FIGURA 14 - CROMATOGRAMAS DE AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL (*CARRYOVER*) OBTIDOS POR CLAE-EM/EM: PLASMA BRANCO (B₁) E PRIMEIRA (B₂) E SEGUNDA (B₃) INJEÇÃO DE PLASMA BRANCO APÓS INJEÇÃO DA AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO LSQ

NOTA: LSQ, limite superior de quantificação; DOPA, dopamina.

4.5.3 Efeito matriz

O efeito matriz é uma alteração na eficiência da ionização que ocorre quando há coeluição de moléculas presentes na matriz com os analitos de interesse. É muito importante que esse efeito seja avaliado durante o desenvolvimento e validação do método, pois resulta na supressão iônica ou no incremento do sinal do analitos, afetando diretamente parâmetros como a precisão e exatidão (TAYLOR, 2005).

O efeito matriz foi avaliado comparando-se os FMN dos analitos em matriz e em solução. O FMN foi calculado segundo descrito no item 2.7.7, e os valores de DPR estão apresentados na TABELA 2. Os resultados indicam que não há interferência significativa da matriz na ionização dos analitos, obtendo-se um DPR < 15% para todas as amostras, incluindo as amostras de plasma hemolisado e lipêmico.

TABELA 2 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EFEITO MATRIZ EM PLASMA NORMAL, LIPÊMICO E HEMOLISADO

Analito	Concentração (ng.mL ⁻¹)	FMN ^a ± dp	Média dos FMN ^b ± dp	FMN ^b DPR %
LEV	225	1,21 ± 0,13	1,14 ± 0,13	11,41
	640	1,06 ± 0,08		
CAR	195	0,93 ± 0,06	0,98 ± 0,09	8,77
	640	1,02 ± 0,08		
3-OMD	195	1,19 ± 0,11	1,12 ± 0,11	10,00
	640	1,05 ± 0,06		
DOPA	60	1,40 ± 0,05	1,38 ± 0,07	5,38
	320	1,36 ± 0,09		

NOTA: ^a n=8; ^b n=16; FMN, fator matriz normalizado; dp, desvio padrão; DPR, desvio padrão relativo; LEV, levodopa; CD, carbidopa, DOPA, dopamina; 3-OMD, 3-O-metilidopa.

4.5.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (relação sinal ruído ≥ 3) e quantificação (relação sinal ruído ≥ 10) encontrados foram, respectivamente, de 30 e 75 ng.mL⁻¹ para levodopa,

25 e 65 ng.mL⁻¹ para carbidopa e 3-O-metildopa e 0,2 e 20 ng.mL⁻¹ para dopamina. A sensibilidade do método mostrou-se adequada para monitoramento desses fármacos e metabólitos em plasma humano.

4.5.5 Curva de calibração

As curvas de calibração exibiram valores de coeficiente de correlação maiores que 0,98, mostrando linearidade adequada na faixa de concentração avaliada para todos os analitos, indicando que há proporcionalidade na relação entre resposta do analito e concentrações avaliadas. A equação da reta e coeficiente de correlação individual são apresentados na TABELA 3. Adicionalmente, para todos os níveis de concentração, as três análises realizadas em dias diferentes apresentaram variações de precisão e exatidão inferiores a 15%, conforme mostrado nas TABELAS 4, 5, 6 e 7, indicando ajuste dos dados em todos os níveis de concentração.

TABELA 3 - EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DA LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O- METILDOPA E DOPAMINA OBTIDOS COM O MÉTODO DESENVOLVIDO

Analito	Dia	Equação da Reta	Coefficiente de Correlação (r)
Levodopa	1	$y = 2,94x + 0,0166$	0,9962
	2	$y = 2,96x + 0,00056$	0,9939
	3	$y = 2,58x + 0,0000164$	0,9901
Carbidopa	1	$y = 4,65x + (-0,0288)$	0,9929
	2	$y = 4,87x + (-0,0315)$	0,9972
	3	$y = 3,55x + (-0,00599)$	0,9942
3-O-metildopa	1	$y = 3,37x + (-0,0161)$	0,9928
	2	$y = 3,06x + (-0,00119)$	0,9949
	3	$y = 2,63x + (-0,0074)$	0,9929
Dopamina	1	$y = 59,5x + (-0,28)$	0,9970
	2	$y = 42,7x + (-0,00488)$	0,9913
	3	$y = 68,2x + (-0,0397)$	0,9853

TABELA 4 - PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDAS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA LEVODOPA

Concentração Nominal (ng.mL ⁻¹)	1º DIA ^a		2º DIA ^a		3º DIA ^a	
	Precisão (DPR, %)	Exatidão (EPR, %)	Precisão (DPR, %)	Exatidão (EPR, %)	Precisão (DPR, %)	Exatidão (EPR, %)
75	3,95	7,38	3,76	4,04	3,83	7,16
200	5,11	2,67	7,14	0,67	7,46	-6,50
400	3,03	-3,58	2,27	-3,83	8,75	-2,08
500	5,69	1,13	9,16	-2,80	6,33	-4,73
650	8,36	-2,26	2,58	-6,05	7,65	6,36
800	5,42	1,13	2,32	8,08	10,67	-0,21

NOTA: ^a n= 3; DPR, desvio padrão relativo; EPR, erro padrão relativo.

TABELA 5 - PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDAS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CARBIDOPA

Concentração Nominal (ng.mL ⁻¹)	1º DIA ^a		2º DIA ^a		3º DIA ^a	
	Precisão (DPR, %)	Exatidão (EPR, %)	Precisão (DPR, %)	Exatidão (EPR, %)	Precisão (DPR, %)	Exatidão (EPR, %)
65	4,88	6,72	3,85	-6,82	1,30	-4,41
200	6,49	4,00	1,96	6,67	1,64	0,67
400	4,08	-0,58	6,00	1,50	5,01	3,25
500	8,13	1,47	4,80	2,13	5,71	3,33
650	7,48	-2,05	4,44	-1,95	6,25	3,18
800	10,19	-3,08	4,10	-1,58	8,39	-6,13

NOTA: ^a n= 3; DPR, desvio padrão relativo; EPR, erro padrão relativo.

TABELA 6 - PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDAS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA 3-O-METILDOPA

Concentração Nominal (ng.mL ⁻¹)	1º DIA ^a		2º DIA ^a		3º DIA ^a	
	Precisão (DPR, %)	Exatidão (EPR, %)	Precisão (DPR, %)	Exatidão (EPR, %)	Precisão (DPR, %)	Exatidão (EPR, %)
65	10,40	4,87	6,48	11,79	2,50	10,15
200	6,83	2,17	2,68	-10,83	1,50	-12,33
400	3,03	-2,58	9,69	-7,17	6,24	-2,33
500	1,41	-0,80	5,93	2,27	6,69	-5,13
650	9,14	3,95	3,77	0,36	5,29	5,23
800	9,74	1,63	2,41	3,63	8,12	2,17

NOTA: ^a n= 3; DPR, desvio padrão relativo; EPR, erro padrão relativo.

TABELA 7 - PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDAS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DOPAMINA

Concentração Nominal (ng.mL ⁻¹)	1º DIA ^a		2º DIA ^a		3º DIA ^a	
	Precisão (DPR, %)	Exatidão (EPR, %)	Precisão (DPR, %)	Exatidão (EPR, %)	Precisão (DPR, %)	Exatidão (EPR, %)
20	3,89	-4,67	0,64	-1,83	8,52	-2,17
100	2,94	8,00	4,13	-3,53	1,93	0,37
200	1,83	0,33	1,39	3,17	5,19	-3,83
250	9,64	-3,20	7,38	4,13	5,44	-3,47
325	4,29	-3,69	3,15	6,36	6,78	-6,97
400	2,21	3,00	10,89	-4,67	9,40	-8,41

NOTA: ^a n= 3; DPR, desvio padrão relativo; EPR, erro padrão relativo.

4.5.6 Precisão e exatidão

Conforme mostrado na TABELA 8, o novo método apresentou precisão e exatidão adequadas para todos os analitos. Para as amostras diluídas (CQD) também foram obtidos valores dentro das especificações, demonstrando que o procedimento de diluição é adequado. Em virtude desses resultados, o método foi considerado preciso e exato.

TABELA 8 - PRECISÃO E EXATIDÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA AS AMOSTRAS CQ

Analito	Amostras CQ	Concentração Nominal (ng.mL ⁻¹)	Intradia (n= 5)		Interdia (n= 15)	
			Precisão (DPR, %)	Exatidão (EPR, %)	Precisão (DPR, %)	Exatidão (EPR, %)
LEV	LIQ	75	12,83	-0,82	9,32	2,78
	CQB	225	5,13	-4,22	5,82	-6,42
	CQM	430	1,20	-7,67	8,00	-3,86
	CQA	640	7,93	-5,08	6,86	-7,70
	CQD	400*	4,66	-7,71	11,46	-3,99
CAR	LIQ	65	7,61	-0,22	13,99	-0,41
	CQB	195	3,91	12,30	13,95	8,64
	CQM	430	5,76	5,21	9,45	-2,98
	CQA	640	4,13	-13,44	11,42	-7,27
	CQD	400*	3,69	-6,40	8,69	-5,13
DOPA	LIQ	20	5,83	-5,42	7,08	-8,15
	CQB	60	2,91	-3,47	6,22	-8,29
	CQM	210	6,44	-13,41	4,88	-13,50
	CQA	320	6,25	-11,46	10,25	-10,37
	CQD	200*	3,57	-7,00	5,01	-9,44
3-OMD	LIQ	65	3,97	1,14	7,71	-2,23
	CQB	195	4,74	-3,18	7,26	-8,13
	CQM	430	3,24	-5,91	5,40	0,72
	CQA	640	4,50	-3,30	7,45	-8,98
	CQD	400*	4,96	-11,13	8,19	-7,39

NOTA: CQ, controle de qualidade; DPR, desvio padrão relativo; EPR, erro padrão relativo; T, temperatura; LEV, levodopa; CD, carbidopa, DOPA, dopamina; 3-OMD, 3-O-metildopa; LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de média concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração; CQD: controle de qualidade de diluição; *Concentração obtida após a diluição de 5 vezes em plasma branco.

4.5.7 Estabilidade

A estabilidade dos analitos de interesse é um importante parâmetro a ser cuidadosamente avaliado, assegurando a confiabilidade dos resultados obtidos nas análises. Diversos são os fatores que podem causar a instabilidade dos analitos como o armazenamento das amostras coletadas e o tempo e condições de manuseio dessas amostras durante as análises. É conhecido que as catecolaminas são instáveis devido à propensão de sofrerem auto-oxidação (LI; ZHANG; TSE, 2010). Por isso é de extrema importância estimar as condições que essas amostras podem ser submetidas de forma a não comprometer os resultados. Durante o preparo e armazenamento as amostras foram protegidas da luz e/ou expostas o mínimo possível. Os resultados estão apresentados na TABELA 9 e indicam que as amostras se mantiveram estáveis frente às condições avaliadas (DPR e EPR <15%).

TABELA 9 - ESTABILIDADE DA LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E PI EM PLASMA HUMANO

Condições do estudo	Analito	Concentração Nominal (ng.mL ⁻¹)	Estabilidade (n= 6)	
			Precisão (DPR %)	Exatidão (EPR %)
1h (25°C)	LEV	225	6,19	-5,93
		640	1,22	-8,80
	CAR	195	3,61	-7,18
		640	2,82	-5,83
	DOPA	60	14,67	-10,61
		320	5,94	-11,46
3-OMD	195	5,98	-2,05	
	640	3,39	-9,53	
PI	2500	9,95	10,70	
5 dias (-80°C)	LEV	225	6,90	-7,41
		640	4,11	-1,46
	CAR	195	10,20	-5,81
		640	1,59	-7,45
	DOPA	60	5,55	-13,89
		320	2,79	-8,02
3-OMD	195	3,02	-9,91	
	640	2,73	-13,43	
PI	2500	-	-	
Ciclos de descogelamento (3 ciclos)	LEV	225	10,18	-6,37
		640	4,35	-7,24
	CAR	195	4,98	-10,09
		640	1,62	-13,44
	DOPA	60	12,24	-14,61
		320	4,30	-13,65
3-OMD	195	8,64	-8,64	
	640	4,40	-11,04	
PI	2500	-	-	
6h gerenciador de amostras (4°C)	LEV	225	5,48	-7,26
		640	2,66	-8,59
	CAR	195	6,14	-8,38
		640	3,34	-9,32
	DOPA	60	3,99	-13,83
		320	5,59	-13,54
3-OMD	195	7,56	-11,62	
	640	5,14	-12,19	
PI	2500	10,75	2,10	

NOTA: DPR, desvio padrão relativo; EPR, erro padrão relativo; T, temperatura; LEV, levodopa; CD, carbidopa, DOPA, dopamina; 3-OMD, 3-O-metildopa; PI, levodopa deuterada.

As soluções estoque foram estáveis por um período de 20 dias quando armazenadas a -40°C. Já as soluções de trabalho se mantiveram estáveis em geladeira por um período de até 6h, sendo necessário o preparo diário dessas soluções (TABELA 10).

TABELA 10 - ESTABILIDADE DA LEVODOPA, CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E PI EM SOLUÇÃO

Condições do estudo	Concentração avaliada	Analito	DPR ^a (%)
20 dias (-40°C)	1 mg.mL ⁻¹	LEV	3,91
		CAR	4,54
		DOPA	6,75
		3-OMD	5,02
		PI	3,76
6h (4°C)	1000 ng.mL ⁻¹	LEV	8,87
		CAR	7,98
		DOPA	8,29
		3-OMD	5,78
		PI	4,95

NOTA: ^a n=3, calculado em relação à solução padrão preparada a fresco; DPR, desvio padrão relativo; LEV, levodopa; CD, carbidopa, DOPA, dopamina; 3-OMD, 3-O-metildopa; PI, levodopa deuterada.

4.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON EM TRATAMENTO COM STALEVO™

O método desenvolvido e validado foi aplicado em amostras de pacientes diagnosticados com doença de Parkinson e em tratamento com o medicamento Stalevo™ 100/25/200 mg (levodopa/carbidopa/entacapona), as quais foram cedidas pelo Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe.

Todas as 12 amostras apresentaram concentrações plasmáticas apenas para levodopa. Metade das amostras analisadas estava abaixo do limite de quantificação enquanto que para as demais foram obtidas concentrações plasmáticas de levodopa na faixa de 530,75 a 672,50 ng.mL⁻¹ (TABELA 11), o que mostra a variabilidade individual. Como exemplo, o cromatograma de um dos voluntários pode ser observado na FIGURA 15.

TABELA 11 - CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA LEVDOPA NAS AMOSTRAS DOS VOLUNTÁRIOS

Voluntário	Sexo	Idade (anos)	Concentração plasmática de levodopa (ng.mL ⁻¹)	DPR ^a (%)
			Média ± dp ^a	
1	M	62	detectado	-
2	M	63	672,50±57,50	8,55
3	F	63	570,00±10,00	1,75
4	M	64	detectado	-
5	M	65	530,75±44,25	8,34
6	F	66	572,50±47,50	8,30
7	M	68	detectado	-
8	F	70	detectado	-
9	F	70	detectado	-
10	F	71	617,50±2,50	0,40
11	M	73	detectado	-
12	F	73	547,50±32,50	5,94

NOTA: ^a n=3, dp, desvio padrão; DPR, desvio padrão relativo; M, masculino; F, feminino.

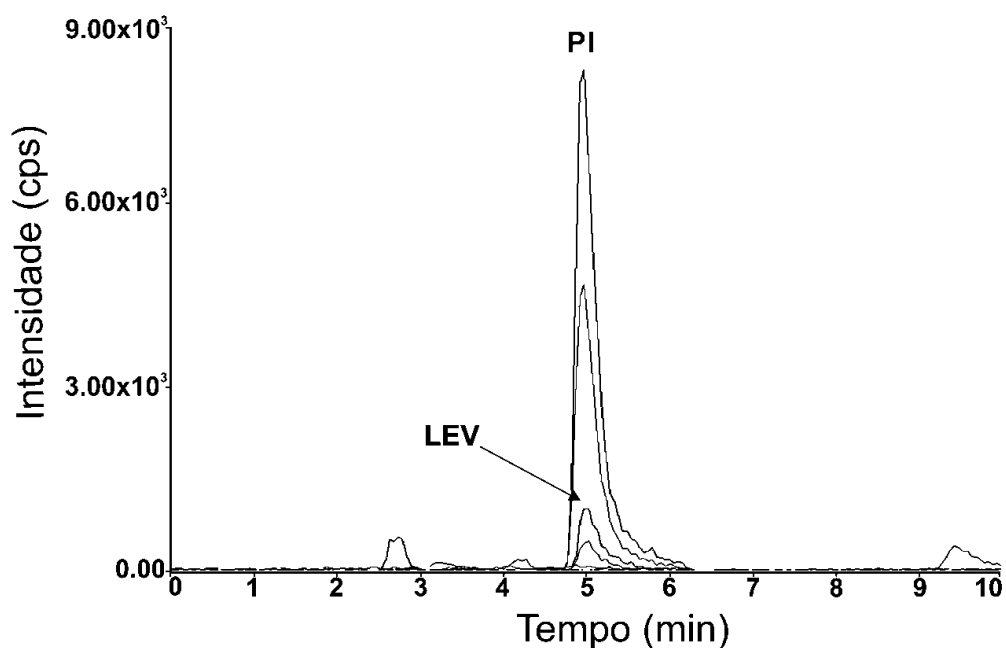


FIGURA 15 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE VOLUNTÁRIO OBTIDA POR CLAE-EM/EM
NOTA: LEV, levodopa; PI, levodopa deuterada (padrão interno). O voluntário recebeu uma dose do medicamento Stalevo™ (100 mg de levodopa, 25 mg de carbidopa e 200 mg de entacapona) e a coleta foi realizada pela manhã, aproximadamente 1 hora após a tomada.

Esses resultados sugerem que a combinação dos dois inibidores enzimáticos (carbidopa e entacapona) é adequada para manutenção dos níveis plasmáticos de levodopa, já que os seus metabólitos não foram detectados.

Níveis plasmáticos de carbidopa não foram detectados nas amostras possivelmente por esse fármaco ter um perfil farmacocinético diferente da levodopa. A carbidopa possui concentração plasmática máxima em torno de 2,5h após a tomada e as amostras foram coletadas, aproximadamente, 1h após a ingestão do medicamento Stalevo™. Portanto, o ideal seria realizar outros tempos de coleta para quantificação da carbidopa.

O método foi aplicado em amostras de pacientes, mostrando que pode ser utilizado no monitoramento terapêutico de pacientes em tratamento com levodopa e associações. No entanto, para que se possa propor essa manutenção ou o ajuste de dose é necessário que o médico faça a avaliação de todo o quadro clínico do paciente, relacionando os sintomas descritos pelo paciente com o esquema posológico e com os resultados dos níveis plasmáticos obtidos.

5 CONCLUSÃO

O método CLAE-EM/EM desenvolvido e validado no presente trabalho mostrou ser eficiente na determinação simultânea da levodopa, carbidopa, 3-O-metildopa e dopamina. Além disso, esse foi o primeiro método descrito na literatura que utiliza o modo HILIC para quantificação simultânea desses analitos em plasma humano. O modo HILIC proporcionou uma retenção adequada dos analitos em estudo, demonstrando ser uma alternativa à fase reversa para análise de analitos polares.

O método desenvolvido provou ser altamente seletivo, linear, preciso e exato. A precipitação de proteínas plasmáticas utilizando acetonitrila adicionada de formiato de amônio e ácido fórmico (3 mmol.L^{-1} e 0,05% v/v, respectivamente) proporcionou uma recuperação satisfatória e uma excelente precisão na extração, além do curto tempo de preparo. Comparado com os métodos de extração previamente reportados na literatura, o presente método de pré-tratamento da amostra mostrou ser mais simples e rápido, o que é uma grande vantagem para uso na rotina de laboratórios.

Por fim, o método por CLAE-EM/EM foi aplicado em análise de amostras de plasma de pacientes em tratamento com levodopa associada a carbidopa e entacapona, demonstrando que esse método pode ser utilizado no monitoramento terapêutico de pacientes com DP para quantificação de carbidopa, levodopa e seus metabólitos.

REFERÊNCIAS

ANVISA. **Lista de Medicamentos de Referência**. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e306e30047457b5b8829dc3fbc4c6735/lista+06-07-2012+LISTA+DE+MED+REFER%C3%8ANCIA11_b.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em:10/07/2012.

BENNETT, D. A. *et al.* Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 2, p.71-76, 1996.

BET, L. *et al.* Bimodal administration of entacapone in Parkinson's disease patients improves motor control. **European Journal of Neurology**, v. 15, n. 3, p.268-73, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 de jun. de 2003. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em:10/07/2012.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 de mai. 2012. Disponível em:<<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=22/05/2012&jornal=1&pagina=93&totalArquivos=192>>. Acesso em:10/07/2012.

BUGAMELLI, F. *et al.* Determination of l-dopa, carbidopa, 3-O-methyldopa and entacapone in human plasma by HPLC-ED. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 3, p.562-567, 2011.

BUSZEWSKI, B. A.; NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 1, p.231-247, 2012.

CANESI, M. *et al.* Clinical experience of tolcapone in advanced Parkinson's disease. **Neurological Sciences**, v. 29 Suppl 5, n., p.S380-2, 2008.

CANNAZZA, G. *et al.* Simultaneous measurement of adenosine, dopamine, acetylcholine and 5-hydroxytryptamine in cerebral mice microdialysis samples by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 71, n., p.183-6, 2012.

CEDARBAUM, J. M.; WILLIAMSON, R.; KUTT, H. Simultaneous determination of levodopa, its metabolites and carbidopa in clinical samples. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 415, n. 0, p.393-399, 1987.

CÉSAR, I. D. C. *et al.* Simultaneous quantitation of levodopa and 3-O-methyldopa in human plasma by HPLC-ESI-MS/MS: Application for a pharmacokinetic study with a levodopa/benserazide formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 5, p.1094-1100, 2011.

CHIRITA, R. I. *et al.* Approach to hydrophilic interaction chromatography column selection: application to neurotransmitters analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 18, p.3091-104, 2010.

CHO, Y. A. *et al.* Development and validation of an LC-ESI-MS/MS method for simultaneous determination of levodopa, dopamine, L- α -methyldopa and 3-O-methyldopa in rat plasma. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 42, n. 6, p.361-368, 2012.

CLARKE, C. E.; GUTTMAN, M. Dopamine agonist monotherapy in Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 360, n. 9347, p.1767-1769, 2002.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p.889-909, 2003.

DAVID, F. J. *et al.* Progressive resistance exercise and Parkinson's disease: a review of potential mechanisms. **Parkinson's Disease**, v. 2012, n., p.124527, 2011.

DIAS, A. E.; LIMONGI, J. C. P. Tratamento dos Distúrbios da Voz na Doença de Parkinson - O método Lee Silverman. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 61, n. 1, p.61-66, 2003.

DOOLEY, K. C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 6, p.471-81, 2003.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 3, p.210-230, 2009.

FAHN, S. *et al.* Levodopa and the progression of Parkinson's disease. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 24, p.2498-2508, 2004.

FORSBERG, M. M. *et al.* The role of physicochemical properties of entacapone and tolcapone on their efficacy during local intrastriatal administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 5, p.503-511, 2005.

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation**. United States Department of Health and Human Services.

FUJINO, K. *et al.* Simultaneous determination of 5-hydroxyindoles and catechols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine. **Journal of Chromatography A**, v. 1012, n. 2, p.169-177, 2003.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p.140-150, 2003.

GONÇALVES, D. *et al.* Bioanalytical chromatographic methods for the determination of catechol-O-methyltransferase inhibitors in rodents and human samples: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 710, n. 0, p.17-32, 2012.

GONZALEZ, R. R. *et al.* Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass-spectrometry (UHPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of neurotransmitters in rat brain samples. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 198, n. 2, p.187-94, 2011.

GOOLE, J.; AMIGHI, K. Levodopa delivery systems for the treatment of Parkinson's disease: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 380, n. 1-2, p.1-15, 2009.

GORDIN, A.; BROOKS, D. Clinical pharmacology and therapeutic use of COMT inhibition in Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v. 254, n. 0, p.IV37-IV48, 2007.

GORDIN, A.; KAAKKOLA, S.; TERÄVÄINEN, H. Clinical advantages of COMT inhibition with entacapone - a review. **Journal of Neural Transmission**, v. 111, n. 10-11, p.1343-63, 2004.

GOSETTI, F. *et al.* Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 2-3, p.907-916, 2013.

HAO, Z.; XIAO, B.; WENG, N. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 9, p.1449-1464, 2008.

IGARASHI, K. *et al.* Determination of cabergoline and l-dopa in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 792, n. 1, p.55-61, 2003.

JORGA, K. *et al.* Metabolism and excretion of tolcapone, a novel inhibitor of catechol-O-methyltransferase. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, n. 4, p.513-20, 1999.

KARIMI, M. *et al.* Modified high-performance liquid chromatography with electrochemical detection method for plasma measurement of levodopa, 3-O-methyldopa, dopamine, carbidopa and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid. **Journal of Chromatography B**, v. 836, n. 1-2, p.120-123, 2006.

KAWACHI, Y. *et al.* Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 35, p.5903-5919, 2011.

KHOR, S. P.; HSU, A. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa in the treatment of Parkinson's disease. **Current Clinical Pharmacology**, v. 2, n. 3, p.234-43, 2007.

KIM, H. R. *et al.* Direct detection of tetrahydrobiopterin (BH4) and dopamine in rat brain using liquid chromatography coupled electrospray tandem mass spectrometry.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 419, n. 4, p.632-7, 2012.

KORFMACHER, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 20, p.1357-1367, 2005.

KUMAR, A.; HART, J. P.; MCCALLEY, D. V. Determination of catecholamines in urine using hydrophilic interaction chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 25, p.3854-61, 2011.

KUOPPAMAKI, M. *et al.* Comparison of pharmacokinetic profile of levodopa throughout the day between levodopa/carbidopa/entacapone and levodopa/carbidopa when administered four or five times daily. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 65, n. 5, p.443-55, 2009.

LEWITT, P. A. Levodopa therapeutics for Parkinson's disease: new developments. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 15, Supplement 1, n. 0, p.S31-S34, 2009.

LI, R.; HUANG, J. Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1041, n. 1-2, p.163-169, 2004.

LI, S.-F. *et al.* Quantitative analysis of levodopa, carbidopa and methyldopa in human plasma samples using HPLC-DAD combined with second-order calibration based on alternating trilinear decomposition algorithm. **Talanta**, v. 81, n. 3, p.805-812, 2010.

LI, W.; ROSSI, D. T.; FOUNTAIN, S. T. Development and validation of a semi-automated method for L-dopa and dopamine in rat plasma using electrospray LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 2, p.325-333, 2000.

LI, W.; ZHANG, J.; TSE, F. L. S. Strategies in quantitative LC-MS/MS analysis of unstable small molecules in biological matrices. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 1-2, p.258-277, 2010.

LIU, M. *et al.* Stability-indicating hydrophilic interaction liquid chromatography method for highly polar and basic compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1188, n. 2, p.255-263, 2008.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p.214-222, 2009.

MANNISTO, P. T.; KAAKKOLA, S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. **Pharmacological Review**, v. 51, n. 4, p.593-628, 1999.

MARTINS, H. F. *et al.* Determination of levodopa in human plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS): application to a bioequivalence study **Química Nova**, v. 36, n. 1, p.171-176, 2013.

MCCALLEY, D. V. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? **Journal of Chromatography A**, v. 1171, n. 1-2, p.46-55, 2007.

MICHOTTE, Y. *et al.* Simultaneous determination of levodopa, carbidopa, 3-O-methyldopa and dopamine in plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 5, n. 7, p.659-664, 1987.

MURATA, M. Pharmacokinetics of L-dopa. **Journal of Neurology**, v. 253, n. suppl. 3, p.47-52, 2006.

MUZZI, C. *et al.* Simultaneous determination of serum concentrations of levodopa, dopamine, 3-O-methyldopa and α -methyldopa by HPLC. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 4, p.253-258, 2008.

NAJMANOVÁ, V. *et al.* LC-ESI-MS-MS Method for Monitoring Dopamine, Serotonin and Their Metabolites in Brain Tissue. **Chromatographia**, v. 73, n. 1, p.143-149, 2011.

NEMOTO, T. *et al.* High-throughput determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human plasma by HILIC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, n. 0, p.71-80, 2013.

NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1-2, p.8-35, 2009.

NUSSBAUM, R. L.; POLYMEROPOULOS, M. H. Genetics of Parkinson's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 10, p.1687-91, 1997.

PEITZSCH, M. *et al.* Simultaneous liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of urinary free metanephrines and catecholamines, with comparisons of free and deconjugated metabolites. **Clinica Chimica Acta**, v. 418, n., p.50-8, 2013.

PEREIRA, A. D. S. *et al.* Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, n., p.S107-S111, 2005.

REZAK, M. Current pharmacotherapeutic treatment options in Parkinson's disease. **Disease-a-Month**, v. 53, n. 4, p.214-22, 2007.

RIZZO, V. *et al.* Concentrations of L-dopa in plasma and plasma ultrafiltrates. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, n. 8-10, p.1043-6, 1996.

RUTA, J. *et al.* A systematic investigation of the effect of sample diluent on peak shape in hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 52, p.8230-8240, 2010.

SAGAR, K. A.; SMYTH, M. R. Simultaneous determination of levodopa, carbidopa and their metabolites in human plasma and urine samples using LC-EC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, n. 3, p.613-624, 2000.

SPILLANTINI, M. G. *et al.* alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 95, n. 11, p.6469-73, 1998.

STANDAERT, D. G.; YOUNG, A. B. Tratamento dos Distúrbios Degenerativos do Sistema Nervoso Central. In: BRUNTON, L. L., LAZO, J. S. e PARKER, K. L. (Ed.). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica** ed. S.I: Mc Graw-Hill Companies, 2007. p. 469-486.

SU, F. *et al.* Determination of 5-Hydroxytryptamine, Norepinephrine, Dopamine and Their Metabolites in Rat Brain Tissue by LC-ESI-MS-MS. **Chromatographia**, v. 69, n. 3-4, p.207-213, 2009.

SYSLOVA, K. *et al.* Monitoring of dopamine and its metabolites in brain microdialysates: method combining freeze-drying with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 21, p.3382-91, 2011.

TAREKE, E.; BOWYER, J. F.; DOERGE, D. R. Quantification of rat brain neurotransmitters and metabolites using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry and comparison with liquid chromatography/electrochemical detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 23, p.3898-904, 2007.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 4, p.328-334, 2005.

TITUS, D. C. *et al.* Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of carbidopa, levodopa and 3-O-methyldopa in plasma and carbidopa, levodopa and dopamine in urine using electrochemical detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 534, n. 0, p.87-100, 1990.

TSUNODA, M. Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 3, p.506-514, 2006.

USP32. **The United States Pharmacopoeia**. 32. ed: Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2009.

UUTELA, P. *et al.* Discovery of dopamine glucuronide in rat and mouse brain microdialysis samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 1, p.427-34, 2009.

VAN BRAMER, S. E. **An introduction to mass spectrometry**. ed: Chester: Widener University, 1997.

WEINTRAUB, D.; COMELLA, C. L.; HORN, S. Parkinson's Disease—Part 1: Pathophysiology, Symptoms, Burden, Diagnosis, and Assessment. **The American Journal of Manager Care**, v. 14, n. 2, p.S40-S48, 2008.

WIKBERG, T. Simultaneous determination of levodopa, its main metabolites and carbidopa in plasma by liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 9, n. 2, p.167-176, 1991.

WU, K.; POLITIS, M.; PICCINI, P. Parkinson disease and impulse control disorders: a review of clinical features, pathophysiology and management. **Postgraduate Medical Journal**, v. 85, n. 1009, p.590-6, 2009.

ZHAO, H.-X. *et al.* A rapid method for the determination of dopamine in porcine muscle by pre-column derivatization and HPLC with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 1, n. 3, p.208-212, 2011.

ZHU, K. Y. *et al.* The establishment of a sensitive method in determining different neurotransmitters simultaneously in rat brains by using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 11-12, p.737-42, 2011.