

JUSSARA DA SILVA ALVES

Determinação de substâncias neuroativas através do acoplamento entre nano cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem (nanoLC-MS/MS)

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

SÃO CARLOS

2024

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

Assinatura: *Jussara S. Alves*  
Data: 11/06/2024

*Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC*

Alves, Jussara da Silva  
Determinação de substâncias neuroativas através do acoplamento entre nano cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem (nanoLC MS/MS) / Jussara da Silva Alves. São Carlos, 2024.  
104 f.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2024.  
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

1. Química. 2. Separação. 3. Determinação. 4. Métodos analíticos. 5. Quantificação. I. Título.

Sonia Alves - CRB: 4280/8



**Dedico** este trabalho à minha querida mãe, Maria da Silva Alves, àquela que nunca me deixou desistir, sempre me estendendo a mão, me mostrando o caminho e me ajudando a subir os degraus da minha trajetória.

**Agradeço** a minha família, em especial a minha mãe, por todo o suporte, por estar sempre presentes e nunca me deixar esquecer qual é o meu verdadeiro objetivo. Agradeço ao meu companheiro e amigo, Kevin Simões, pelo suporte, paciência e por estar sempre ao meu lado, muitas vezes tornando meus dias um pouco mais leves. Agradeço a todos os meus amigos pelo carinho, risadas e por oferecerem os ombros e os ouvidos. Ao Grupo de Cromatografia do IQSC (CROMA), em especial ao Dr. Guilherme Miola Titato e ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças, pela paciência, dedicação e ajuda que me forneceram, me auxiliando na conclusão desta etapa acadêmica profissional.

*“Quando o mundo estiver unido na busca do conhecimento, e não mais lutando por dinheiro e poder, então nossa sociedade poderá enfim evoluir a um novo nível.”*

*Autor Desconhecido*

## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) está correlacionada à formação de agregados proteicos no cérebro, os quais são constituídos, dentre outros compostos, por peptídeos beta-amiloides ( $A\beta$ ). A cafeína e os hormônios estradiol, estrona e progesterona atuam contra a DA inibindo a formação de  $A\beta$ . Os dipeptídeos são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica levando fármacos que combatem doenças neurodegenerativas. Neste estudo, métodos analíticos baseados no acoplamento entre nano cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem (nanoLC-MS/MS), foram propostos para a determinação de substâncias neuroativas. Desenvolveu-se um método de extração e pré-concentração dos analitos de interesse presentes em amostras sólidas utilizando o sistema Trap Valve Manager acoplado com nanoLC-MS/MS. Foram avaliadas diversas configurações do sistema nanoLC-MS/MS, bem como, diversas colunas, pré-colunas, traps, fases móveis, volumes de amostras e outros, para a análise de substâncias neuroativas visando seu posterior emprego na análise desses compostos em matrizes biológicas. Desenvolveu-se um método de separação cromatográfica dos hormônios estradiol, estrona, e progesterona e dos dipeptídeos TYR-GLY, GLY-TRP e TRP-GLY, ambos os métodos apresentaram bons resultados, separando os 3 analitos em um curto espaço de tempo. Também desenvolveu-se um método automatizado para amostras sólidas para os dipeptídeos, do qual não se obteve um bom resultado, mostrando a necessidade de melhor escolha de solvente e um estudo preliminar de contaminantes endógenos da matriz da amostra. Um método analítico de determinação de cafeína em pó de café utilizando um sistema de preparo de amostras automatizado foi desenvolvido, o alto teor de cafeína na amostra e sua alta solubilidade evidenciou a necessidade de melhorar a reprodutibilidade do método. Desenvolveu-se um método analítico de separação dos peptídeos  $A\beta$ 1-38,  $A\beta$ 1-40 e  $A\beta$ 1-42 utilizando um sistema de preparo de amostras automatizado, embora os resultados tenham mostrado o potencial da técnica, dificuldades relacionadas à característica de agregamento dos analitos ainda precisam ser vencidas.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is correlated with the formation of protein aggregates in the brain, which are made up, among other compounds, of beta-amyloid peptides ( $A\beta$ ). Caffeine and the hormones estradiol, estrone and progesterone act against AD by inhibiting the formation of  $A\beta$ . Dipeptides are capable of crossing the blood-brain barrier carrying drugs that fight against neurodegenerative diseases. In this work, analytical methods based on the coupling between nano liquid chromatography and tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS) were proposed for the determination of neuroactive substances. An extraction and preconcentration method of the analytes of interest present in solid samples was developed using the Trap Valve Manager system coupled with nanoLC-MS/MS. Various configurations of the nanoLC-MS/MS system were evaluated, as well as several columns, pre-columns, traps, mobile phases, sample volumes and others, for the analysis of neuroactive substances with a view to their subsequent use in the analysis of these compounds in biological matrices. A method for chromatographic separation of the hormones estradiol, estrone, and progesterone and the dipeptides TYR-GLY, GLY-TRP and TRP-GLY was developed. Both methods showed good results, separating the 3 analytes in a short space of time. An automated method for solid samples for dipeptides was also developed, which did not yield a good result, showing the need for a better choice of solvent and a preliminary study of endogenous contaminants in the sample matrix. An analytical method for determining caffeine in coffee powder using an automated sample preparation system was developed. The high caffeine content in the sample and its high solubility highlighted the need to improve the reproducibility of the method. An analytical method for separating peptides  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  and  $A\beta_{1-42}$  was developed using an automated sample preparation system. Although the results showed the potential of the technique, difficulties related to the aggregation characteristic of the analytes still need to be defeated.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo da diferença entre um neurônio saudável (A) e um neurônio de um paciente com Alzheimer (B).....	17
Figura 2 - Vias metabólicas e metabólitos da cafeína quando esta é sintetizada em corpo humano. As setas cinzas representam metabólitos que são produzidos em menor escala.....	20
Figura 3 - Exemplo de um diagrama esquemático de um sistema LC-MS/MS de preparo de amostras em várias etapas acoplado a um analisador de massas triplo quadrupolo com ênfase nos caminhos fluídicos (azul) e suas conexões estão. (a) Válvulas posicionadas de modo a ocorrer a extração e sorção dos analitos (etapa 1). (b) Válvulas posicionadas de modo a ocorrer a análise LC-MS/MS capilar dos analitos (etapa 2).....	29
Figura 4 - Estrutura molecular da $A\beta_{1-38}$ .....	30
Figura 5 - Estrutura molecular da $A\beta_{1-40}$ .....	31
Figura 6 - Estrutura molecular da $A\beta_{1-42}$ .....	32
Figura 7 - Estrutura molecular do estradiol .....	33
Figura 8 - Estrutura molecular da estrona .....	33
Figura 9 - Estrutura molecular da progesterona.....	33
Figura 10 - Estrutura molecular do TYR-GLY.....	34
Figura 11 - Estrutura molecular do GLY-TRP.....	34
Figura 12 - Estrutura molecular do TRP-GLY.....	35
Figura 13 - Estrutura molecular da cafeína.....	35
Figura 14 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido por LC-MS/MS da mistura de hormônios, utilizando o modo gradiente, com o volume de injeção de 0,180 $\mu$ L. As condições de análise utilizadas estão descritas na Tabela 3.....	54
Figura 15 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido por LC-MS/MS da mistura de hormônios, utilizando o modo gradiente, com o volume de injeção de 0,280 $\mu$ L. As condições de análise utilizadas estão descritas na Tabela 3.....	55
Figura 16 - Cromatograma de Íon Total (TIC) da mistura de hormônios, obtido utilizando o método isocrático, volume de injeção de 1 $\mu$ L, fluxo de 25 $\mu$ L e proporção de fase móvel 99% de A e 1% de B.....	56
Figura 17 - Cromatograma de Íon Total (TIC) da mistura de dipeptídeos, obtido utilizando modo isocrático, volume de injeção 0,5 $\mu$ L e fluxo de 10 $\mu$ L/min. Fase móvel: 30% de água e 70% de acetonitrila, ambos acidificados em 0,1%.....	57

Figura 18 - Cromatograma de Íon Total (TIC) da mistura de dipeptídeos, obtido no modo gradiente. Para as condições analíticas, veja Tabela 7.....	58
Figura 19 – Cromatograma de Íon Total (TIC) da mistura de dipeptídeos, obtido no modo gradiente utilizando a curva 3. Para as condições analíticas, veja Tabela 7.....	59
Figura 20 - Gráfico da taxa de mudança da composição do solvente e da taxa de fluxo ao longo do tempo com base no número da curva e no comprimento do segmento do gradiente. As curvas são especificadas por números e cada uma delas afeta tanto a composição do solvente quanto a taxa de fluxo.....	59
Figura 21 – Figura 21 – Cromatograma de Íon Total (TIC) da mistura de dipeptídeos, obtido pela análise da solução acidificada. ( $t_R$ TRP-GLY = 3,45 min; $t_R$ GLY-TRP = 3,63 min). Para demais condições analíticas, veja Tabela 8.....	60
Figura 22 - Cromatograma de Íon Total (TIC) da mistura de dipeptídeos, obtido com tempo de corrida reduzido a 12.....	61
Figura 23 – Cromatograma de Íon Total (TIC) da mistura de dipeptídeos, obtido usando metanol como fase móvel. Para as demais condições, veja Tabela 9.....	62
Figura 24 - Cromatograma de Íon Total (TIC) de uma amostra de cafeína em pó de café, obtido com o modo isocrático (75% A e 25% B) e trapping de 5 minutos (95% A e 5% B). As condições experimentais encontram-se nas Tabelas 10 e 11.....	64
Figura 25 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (75% A e 25% B) e trapping de 5 minutos e maior porcentagem de fase aquosa no início (99% A e 1% B).....	65
Figura 26 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (85% A e 15% B) e trapping de 5 minutos e maior porcentagem de fase aquosa no início (99% A e 1% B).....	65
Figura 27 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (85% A e 15% B) e trapping de 5 minutos (95% A e 5% B).....	67
Figura 28 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (80% A e 20% B) e trapping de 5 minutos e maior porcentagem de fase aquosa no início (99% A e 1% B).....	68
Figura 29 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (75% A e 25% B) e trapping de 4 minutos (95% A e 5% B), utilizando uma coluna de grafeno.....	69
Figura 30 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (75% A e 25% B) e trapping de 3 minutos (95% A e 5% B), utilizando uma coluna de grafeno.....	70

Figura 31 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (70% A e 30% B) e trapping de 3 minutos (95% A e 5% B), utilizando uma coluna de grafeno e 0,3 mg de café.....	71
Figura 32 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (70% A e 30% B) e trapping de 3 minutos (99% A e 1% B) a um fluxo de 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ na etapa de <i>trapping</i> , utilizando uma coluna de grafeno e 0,3 mg de pó de café descafeinado.....	72
Figura 33 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo gradiente e trapping de 3 minutos (95% A e 5% B) a um fluxo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ , utilizando uma coluna de grafeno e 0,3 mg de pó de café descafeinado.....	73
Figura 34 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido utilizando-se os parâmetros descritos na Tabela 27 e 28.....	75
Figura 35 - Comparação das áreas obtidas para cada par de energia de colisão e fluxo de gás testado. Em laranja as áreas obtidas para E.C. = 2,5 e F.G. = 150; em verde as áreas obtidas para E.C. = 2 e F.G. = 150; em roxo as áreas obtidas para E.C. = 2,5 e F.G. = 0; em amarelo as áreas obtidas para E.C. = 2 e F.G. = 0.....	76
Figura 36 - Comparação do gráfico de pressão obtido em quatro análises feitas em sequência e utilizando o mesmo método.....	77
Figura 37 – Monitoramento da pressão em um conjunto de 20 análises substituindo-se o padrão analítico por acetonitrila pura.....	78
Figura 38 - Cromatograma de Íon Total (TIC) de uma mistura de $\beta$ -amiloides obtido empregando uma coluna de CSH.....	79
Figura 39 - Comparação entre as áreas obtidas para quatro diferentes tempos de <i>trap</i> utilizando a fase móvel inicial na proporção 95% de A e 5% de B.....	80
Figura 40 - Cromatograma de Íon Total (TIC) de uma mistura de $\beta$ -amilases obtido utilizando-se o tempo de <i>trap</i> de 2 minutos e fase móvel inicial na proporção 95% de A e 5% de B.....	80
Figura 41 - Comparação das áreas obtidas utilizando fase móvel inicial na proporção 95% de A e 5% de B e na proporção 99% de A e 1% de B. O tempo de <i>trap</i> utilizado foi de 2 minutos.....	81
Figura 42 - Cromatograma de Íon Total (TIC) de uma mistura de $\beta$ -amilases obtido utilizando-se fase móvel inicial na proporção de 99% de A e 1% de B e tempo de <i>trap</i> de 2 minutos.....	82

Figura 43 - Comparação das áreas dos picos cromatográficos obtidas utilizando coluna <i>trap</i> de grafeno, tempo de <i>trap</i> de 0,5 e 1 minuto e fase móvel inicial na proporção 95% de A e 5% de B; e 99% de A e 1% de B.....	83
Figura 44 - Cromatograma de íon total (TIC) obtido utilizando coluna <i>trap</i> de grafeno, tempo de <i>trap</i> de 0,5 minutos e fase móvel inicial na proporção 99% de A e 1% de B.....	84
Figura 45 - Cromatograma típico de massas (transição MRM) obtido para o analito $A\beta_{1-38}$ utilizando coluna <i>trap</i> de grafeno, tempo de <i>trap</i> de 0,5 minutos e fase móvel inicial na proporção 99% de A e 1% de B.....	85
Figura 46 - Cromatograma típico de massas (transição MRM) obtido para o analito $A\beta_{1-40}$ utilizando coluna <i>trap</i> de grafeno, tempo de <i>trap</i> de 0,5 minutos e fase móvel inicial na proporção 99% de A e 1% de B.....	86
Figura 47 - Cromatograma típico de massas (transição MRM) obtido para o analito $A\beta_{1-42}$ utilizando coluna <i>trap</i> de grafeno, tempo de <i>trap</i> de 0,5 minutos e fase móvel inicial na proporção 99% de A e 1% de B.....	87
Figura 48 - Comparação da área dos picos obtidos utilizando uma coluna <i>trap</i> de grafeno e tempo de <i>trap</i> de 0,5 minutos e uma coluna <i>trap</i> de C18 e tempo de <i>trap</i> de 2 minutos.....	88
Figura 49 - Pressão do sistema nas últimas 5 análises cromatográficas antes da realização da limpeza do selo da coluna analítica.....	89
Figura 50 - Comparação da pressão atingida pelo sistema antes e depois da limpeza do selo da coluna e troca de fase móvel.....	90
Figura 51 - Gráfico de calibração obtido para os analitos $A\beta_{1-38}$ , $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{1-42}$ .....	91
Figura 52 - Novo gráfico de calibração obtido para os analitos $A\beta_{1-38}$ , $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{1-42}$ .....	92
Figura 53 - Comparação das áreas de três grupos de análises feitas em 3 diferentes dias, antes e após a limpeza do selo da coluna de <i>trap</i> .....	93
Figura 54 - Comparação da pressão atingida pelo sistema na tentativa de construir uma nova curva de calibração.....	94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros cromatográficos utilizados nas análises dos hormônios, dipeptídeos e cafeína.....	36
Tabela 2 - Parâmetros cromatográficos utilizados nas análises dos Aβs.....	36
Tabela 3 - Condições cromatográficas dos estudos realizados no modo de gradiente.....	38
Tabela 4 - Energia de colisão e voltagem do cone para cada transição monitorada na análise de hormônios.....	38
Tabela 5 - Condições cromatográficas no modo isocrático.....	39
Tabela 6 - Energia de colisão e voltagem do cone para cada transição monitorada na análise dos dipeptídeos TYR-GLY, GLY-TRP e TRP-GLY.....	40
Tabela 7 - Condições cromatográficas no modo gradiente 1.....	40
Tabela 8 - Condições cromatográficas no modo gradiente 2 (curva 3).....	41
Tabela 9 - Condições cromatográficas da análise utilizando metanol.....	41
Tabela 10 - Condições cromatográficas do trapping.....	42
Tabela 11 - Condições cromatográficas da etapa analítica.....	43
Tabela 12 - Energia de colisão e voltagem do cone para cada transição monitorada na análise da cafeína.....	43
Tabela 13 - Condições cromatográficas do trapping, início com maior porcentagem de fase aquosa.....	44
Tabela 14 - Condições cromatográficas da etapa alítica, com maior proporção de fase aquosa.....	44
Tabela 15 - Condições da etapa analítica, proporção de fase móvel 80% de A contra 20% de B.....	44
Tabela 16 - Condições cromatográficas do trapping utilizando coluna de grafeno.....	45
Tabela 17 - Condições cromatográficas da etapa analítica utilizando coluna de grafeno.....	45
Tabela 18 - Condições cromatográficas do trapping com um tempo total reduzido a 3 minutos.....	46
Tabela 19 - Condições cromatográficas do trapping, maior porcentagem de A.....	46
Tabela 20 - Condições cromatográficas da etapa analítica, menor porcentagem de A.....	46
Tabela 21 - Condições cromatográficas do trapping, fluxo de 8 µL/min.....	47
Tabela 22 - Condições cromatográficas do trapping, menor proporção de A.....	48
Tabela 23 - Condições cromatográficas da etapa analítica, modo gradiente.....	48
Tabela 24 - Condições cromatográficas do trapping, duração de 10 minutos.....	49

Tabela 25 - Condições cromatográficas do trapping, fluxo de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ .....	49
Tabela 26 - Condições cromatográficas do trapping, fluxo de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ .....	49
Tabela 27 - Íons de transição, energia de colisão e voltagem do cone, para cada analito, determinados por infusão direta.....	50
Tabela 28 - Gradiente utilizado na primeira etapa dos experimentos.....	50
Tabela 29 - Gradiente utilizado na etapa de <i>trapping</i> iniciando com 95% de A e 5% de B...	51
Tabela 30 - Gradiente utilizado na etapa de <i>trapping</i> iniciando com 99% de A e 1% de B...	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A $\beta$  -  $\beta$ -amilóide  
BEH - Ethylene Bridged Hybrid  
BHE - Barreira Hematoencefálica  
CCD - Cromatografia de Camada Delgada  
CG - Cromatografia Gasosa  
CL - Cromatografia Líquida  
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
CLUE - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência  
CP - Cromatografia em Papel  
CSH - Charged Surface Hybrid  
DA - Doença de Alzheimer  
DP - Doença de Parkinson  
EC - Energia do Capilar  
ESI - Electrospray Ionization  
FG - Fluxo de Gás  
GLY-TRP - Glicina-Triptofano  
LC - Cromatografia Líquida (Liquid Chromatography)  
MEPS - Microextração por Sorvente Empacotado  
MS - Espectrometria de Massas de Alto Rendimento  
MS/MS - Espectrometria de Massas em Tandem (Tandem Mass Spectrometry)  
MSPD - Dispersão da Matriz em Fase Sólida  
MSPE - Microextração em Fase Sólida Magnética  
MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas  
m/z - relação massa/carga  
PSE - Extração Rápida por Solventes Pressurizados  
QuEChERS - rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro  
SBSE - Extração Sortiva em Barra de Agitação  
SNC - Sistema Nervoso Central  
SPE - Extração em Fase Sólida  
SPME - Microextração em Fase Sólida  
TFC - Cromatografia em Fluxo Turbulento  
TIC - Cromatograma de Íon Total

TQ-S - Triple Quadrupole Mass

TRP-GLY - Triptofano-Glicina

TYR-GLY - Tirosina-Glicina

UPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Resolução (Ultra Performance Liquid Chromatography)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 A Doença de Alzheimer (DA).....	16
1.2 O papel neuroprotetor dos estrogênios.....	18
1.3 Os dipeptídeos como neuroprotetores.....	19
1.4 A cafeína: neuroprotetor para Doença de Alzheimer (DA) e Parkinson (DP).....	19
1.5 Análise química de substâncias neuroprotetoras e o papel da cromatografia líquida contemporânea.....	21
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
<b>3 EXPERIMENTAL.....</b>	<b>27</b>
3.1 Sistema LC-MS/MS.....	28
3.2 Analitos investigados.....	30
3.3 Seleção dos parâmetros cromatográficos empregados.....	35
3.4 Padrões analíticos.....	36
3.5 Preparo dos padrões, fase móvel e solventes de limpeza.....	36
3.6 Identificação e separação cromatográfica dos hormônios.....	37
3.7 Identificação e separação cromatográfica dos dipeptídeos.....	39
3.7.1 Avaliação da separação dos padrões preparados em meio aquoso neutro.....	39
3.7.2 Avaliação da separação dos padrões preparados em meio aquoso acidificado.....	40
3.7.3 Avaliação da separação cromatográfica utilizando metanol como fase móvel.....	41
3.7.4 Utilização do sistema de extração de amostra sólida automatizado.....	41
3.8 Determinação de cafeína em pó de café utilizando o sistema <i>Trap Valve Manager</i> .....	42
3.8.1 Avaliação da extração da cafeína sem incorporar uma coluna extratora ao sistema <i>Trap Valve Manager</i> .....	42
3.8.2 Avaliação da extração da cafeína incorporando uma coluna de extração ao sistema <i>Trap Valve Manager</i> .....	45
3.8.3 Avaliação da extração da cafeína reduzindo a massa de amostra sólida utilizada no sistema <i>Trap Valve Manager</i> .....	47
3.8.4 Avaliação da extração da cafeína empregando pó de café descafeinado como amostra sólida utilizada no sistema <i>Trap Valve Manager</i> .....	47

3.8.5 Avaliação da extração da cafeína aumentando a massa de pó de café descafeinado empregado como amostra sólida utilizada no sistema <i>Trap Valve Manager</i> .....	48
3.9 Avaliação da separação cromatográfica dos $\beta$ -amilóides.....	50
3.9.1 Seleção dos parâmetros cromatográficos e de espectrometria de massas.....	50
3.9.2 Procedimento de limpeza da coluna analítica.....	51
3.9.3 Avaliando coluna CSH.....	51
3.9.4 Montagem do sistema de <i>trapping</i> .....	51
3.9.5 Construção da curva de calibração.....	52
3.9.5.1 Limpeza do selo da coluna analítica e troca de fase móvel.....	52
3.9.5.2 Curva de calibração.....	52
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
4.1 Hormônios.....	54
4.1.1 Identificação e separação cromatográfica dos hormônios.....	54
4.1.2 Considerações finais sobre a separação dos hormônios estudados.....	56
4.2 Identificação e separação cromatográfica dos dipeptídeos investigados.....	57
4.2.1 Avaliação da separação dos padrões preparados em meio aquoso neutro.....	57
4.2.2 Avaliação da separação dos padrões preparados em meio aquoso acidificado.....	60
4.2.3 Avaliação da separação cromatográfica utilizando metanol como fase móvel.....	61
4.2.4 Utilização do sistema de extração de amostra sólida automatizado.....	62
4.2.5 Considerações finais sobre a análise dos dipeptídeos estudados.....	63
4.3 Determinação de cafeína em pó de café utilizando o sistema <i>Trap Valve Manager</i> .....	63
4.3.1 Avaliação da extração da cafeína sem incorporar uma coluna extratora aos sistema <i>Trap Valve Manager</i> .....	63
4.3.2 Avaliação da extração da cafeína incorporando uma coluna de extração ao sistema <i>Trap Valve Manager</i> .....	68
4.3.3 Avaliação da extração da cafeína reduzindo a massa de amostra sólida utilizada no sistema <i>Trap Valve Manager</i> .....	70
4.3.4 Avaliação da extração da cafeína empregando pó de café descafeinado como amostra sólida utilizada no sistema <i>Trap Valve Manager</i> .....	71
4.3.5 Avaliação da extração da cafeína aumentando-se a massa de pó de café descafeinado empregado como amostra sólida utilizada no sistema <i>Trap Valve Manager</i> .....	73
4.3.6 Considerações finais sobre a análise de cafeína em amostra sólida.....	74
4.4 Avaliação da separação cromatográfica dos $\beta$ -amilóides.....	74
4.4.1 Seleção dos parâmetros cromatográficos e de espectrometria de massas.....	74

4.4.2 Procedimento de limpeza da coluna analítica.....	76
4.4.3 Avaliação da coluna CSH.....	78
4.4.4 Montagem do sistema de <i>trapping</i> .....	79
4.4.4.1 Pré coluna de C18.....	79
4.4.4.2 Avaliação do uso de pré-colunas de grafeno na separação de $\beta$ -amilases.....	82
4.4.5 Construção da curva de calibração.....	88
4.4.5.1 Limpeza do selo da coluna analítica e troca da fase móvel.....	88
4.4.5.2 Gráfico de calibração (área x concentração) para os A $\beta$ s.....	90
4.4.6 Considerações finais sobre as análises de A $\beta$ s.....	94
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>96</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>

---

---

# **1. INTRODUÇÃO**

---

---

# 1 INTRODUÇÃO

A Química Analítica é a ciência que se dedica ao estudo analítico da matéria, ou seja, quais as propriedades, composição, estrutura, dentre outras características, de uma substância química.<sup>1,2</sup> Para tanto, este ramo da química foca na obtenção e estudo de processamentos, determinação qualitativa e quantitativa e identificação de analitos, seja a nível atômico ou molecular e esteja presente em um sistema simples ou em misturas complexas.<sup>1,2</sup> A Química Analítica é uma área de suma importância, pois sua aplicação pode resolver problemas em diferentes áreas como, por exemplo, ajudar a garantir que os regulamentos ambientais sejam seguidos através da determinação de poluentes; na saúde pública garantindo a segurança e qualidade de alimentos, fármacos e água, ou ainda atuando no diagnóstico de doenças; na toxicologia, ajudando no diagnóstico, prevenção e tratamento de intoxicações através da determinação e quantificação de fármacos, entorpecentes e demais substâncias químicas danosas, e muitas outras aplicações.<sup>2,3</sup>

## 1.1 A Doença de Alzheimer (DA)

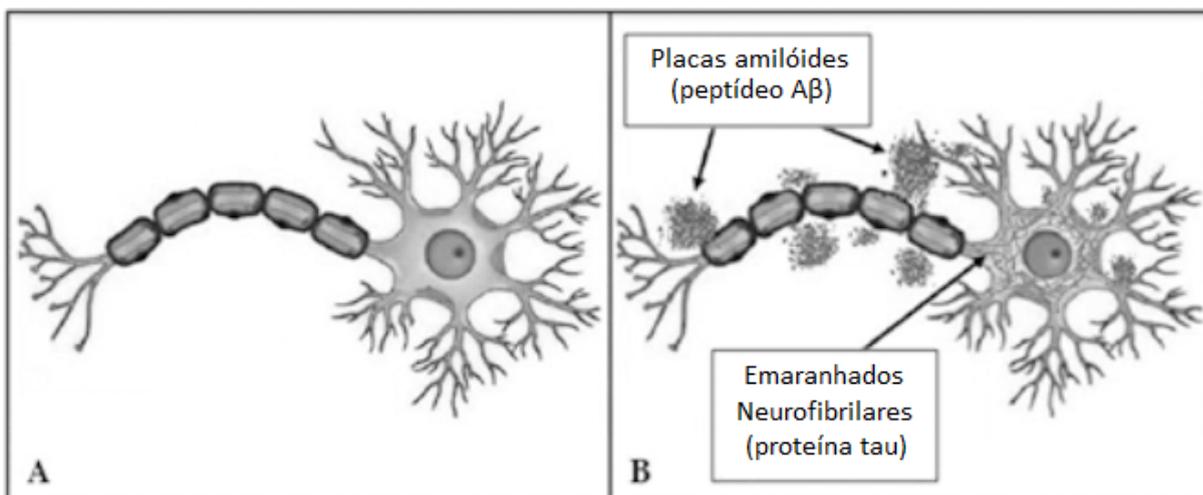
A doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio neurodegenerativo progressivo que ocorre na região do córtex cerebral, a qual é responsável pela percepção cognitiva e memória e está associada ao envelhecimento e fatores genéticos. É, também, a forma mais comum de demência e afeta predominantemente os idosos.<sup>4-6</sup> Os sintomas desta doença estão associados com a formação de agregados proteicos no cérebro, os quais são constituídos majoritariamente por placas fibrilares compactas e insolúveis de  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) (Figura 1), peptídeo de 38-43 aminoácidos derivado da clivagem enzimática da proteína precursora da amilóide.<sup>4-8</sup> Desta forma, há a geração de uma resposta imune inata no cérebro que, por sua vez, leva a uma inflamação progressiva no mesmo, degeneração de neurônios, perda sináptica, bem como um avanço na formação da placa  $A\beta$ .<sup>8</sup>

Existem três principais hipóteses para as causas da DA. A mais antiga é chamada de hipótese colinérgica, a qual faz uma associação da síntese do neuromediador acetilcolina com o desenvolvimento da DA.

A segunda hipótese associa a DA a falhas no processo de enovelamento das proteínas tau, a qual é responsável pela estabilização dos microtúbulos de tubulina atuando na formação de citoesqueleto e do tráfego de carga neural e, conseqüentemente, na regulação da morfologia dos neurônios através da fosforilação da mesma. Assim, a hiperfosforilação leva a

desestabilização do sistema de microtúbulos e, conseqüentemente, à morte do neurônio, pois faz a proteína se agregar, originando grandes fibrilas e emaranhados neurofibrilares.<sup>6</sup>

Figura 1 - Esquema representativo da diferença entre um neurônio saudável (A) e um neurônio de um paciente com Alzheimer (B).<sup>9</sup>



A terceira, e mais aceita, é a hipótese da cascata amiloide, de acordo com a qual o desenvolvimento da DA está relacionado às formas oligoméricas da A $\beta$  e à geração anormal, depuração, bem como ao arranjo conformacional aberrante da A $\beta$ . Esta hipótese encontra suporte no fato de que as mutações que normalmente ocorrem no início precoce da DA localizam-se, principalmente, nos genes que codificam a proteína precursora da A $\beta$  ou aquelas que estão ligadas à proteólise da mesma.<sup>6</sup> Estudos indicam que a progressão da DA está relacionada a presença de A $\beta$  solúvel no cérebro devido ao alto grau de toxicidade sináptica advinda dos oligômeros de A $\beta$ , enquanto que a placa de A $\beta$  não parece ser um causador da progressão da DA, mas sim um mecanismo de proteção que sequestra dos oligômeros A $\beta$  solúveis neutralizando. Assim, a toxicidade, ou seja, o acúmulo de agregados proteicos, está relacionado aos estágios avançados da demência.<sup>6,10</sup>

As formas predominantes de A $\beta$  são os peptídeos A $\beta_{1-40}$  e A $\beta_{1-42}$ . O A $\beta_{1-40}$  é frequentemente encontrado em fluidos biológicos, tais como o fluido cerebrospinal; em menor proporção, também são bastante encontradas as formas A $\beta_{1-38}$  e A $\beta_{1-42}$ . O A $\beta_{1-42}$  é mais propenso à formação de fibrilas.<sup>5,7</sup> Algumas isoformas de A $\beta$  (A $\beta_{1-42}$ /A $\beta_{1-38}$  e A $\beta_{1-42}$ /A $\beta_{1-40}$ ) têm sido descritas como potenciais biomarcadores de Alzheimer de modo a diferencia-lo de outras demências e facilitar a busca por medicamentos.<sup>4</sup>

Nos estágios iniciais da DA o diagnóstico pode ser feito por meio do uso de métodos tais como o de neuroimagem, ressonância magnética e tomografia por emissão de pósitrons. Já os biomarcadores são importantes para a identificação das características patológicas da DA e podem ser encontrados, por exemplo, no líquido cefalorraquidiano ou no tecido cerebral.<sup>11</sup> Como apenas uma pequena quantidade das proteínas cerebrais entram na corrente sanguínea e estas não apenas são diluídas pelas proteínas plasmáticas como, também, podem sofrer degradação ou serem metabolizadas, biomarcadores sanguíneos de DA não são utilizados até o presente momento, pois os níveis plasmáticos não retratam as mudanças que estão ocorrendo no cérebro no momento da análise.<sup>12</sup> É importante frisar, no entanto, que embora a DA possa ser diagnosticada mediante imagens cerebrais, testes de estado mental, histórico médico, etc, a constatação precisa da DA só pode ser feita “*post mortem*” através da análise dos tecidos cerebrais necropsia, bem como pela relação de medidas clínicas.<sup>11</sup>

## **1.2 O papel neuroprotetor dos estrogênios**

Os estrogênios são uma classe de hormônios esteróides formados por 18 carbonos que atuam nos sistema reprodutivos feminino e masculino, embora sejam produzidos em maior quantidade nas mulheres.<sup>13,14</sup> Suas funções envolvem auxiliar no desenvolvimento sexual e reprodutivo feminino, mas também desempenham papel no sistema cardiovascular, na regulação da síntese de proteína e da sensibilidade à insulina, na manutenção da massa óssea, na saúde cognitiva, dentre outros processos fundamentais do corpo humano.<sup>13,14</sup> Os três principais estrogênios são o estradiol, a estrona e o estriol; destes, o primeiro é o mais relevante fisiologicamente, sendo que os outros dois podem ser sintetizados a partir dele.<sup>15</sup> Nas mulheres, o estradiol é sintetizado nos ovários, sendo o mais produzido durante a idade fértil. Após atingir a menopausa, os níveis de estradiol diminuem consideravelmente e a estrona passa a ser o estrogênio predominante no corpo feminino.<sup>14,15</sup> O estradiol protege o cérebro contra toxinas e é capaz de reduzir a formação de A $\beta$  que pode formar agregados proteicos, pois induz a quebra da proteína precursora dos amilóides e, conseqüentemente, é capaz de inibir o acúmulo de A $\beta$ .<sup>16</sup> Uma vez que o estradiol atua como um neuroprotetor, a diminuição dos níveis de estradiol em mulheres na menopausa está correlacionada com o desenvolvimento de doenças degenerativas como, por exemplo, a DA. Desta forma, a reposição de estrogênio em mulheres na transição para a menopausa pode reduzir o risco de desenvolver DA.<sup>15,17</sup>

A progesterona é um hormônio sintetizado nos ovários, placenta e glândulas supra-renais nas mulheres, sendo este último também o local de síntese nos homens.<sup>18</sup> Seu papel vai desde atuar em funções reprodutivas, preparando o organismo para uma gestação e agindo na manutenção do útero após a contracepção, até a funções não reprodutivas como manutenção óssea, atuação no sistema cardiovascular e no sistema nervoso central (SNC).<sup>19,20</sup> No sistema nervoso, a progesterona desempenha vários papéis como neuroprotetor, a título de exemplo, melhorar a sobrevivência neural, reduzir o inchaço e inibir a apoptose e a inflamação causada por beta amilóides.<sup>21,22</sup> Este hormônio, assim como os estrogênios, têm seu nível diminuído no organismo feminino com a chegada da menopausa.<sup>23</sup> Estudos sugerem que a redução da progesterona no cérebro está correlacionada com o desenvolvimento da DA e que sua reposição contribui para redução dos riscos do desenvolvimento de DA por mulheres na menopausa.<sup>23- 25</sup>

### **1.3 Os dipeptídeos como neuroprotetores**

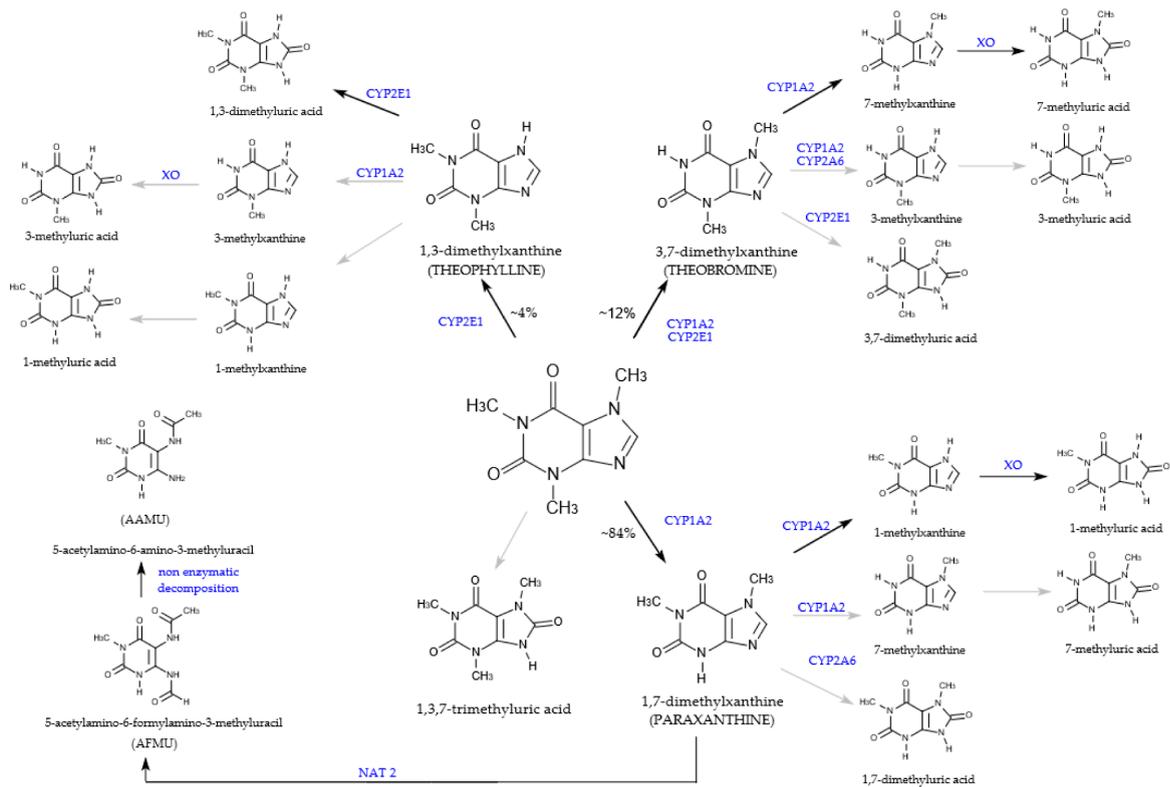
Dipeptídeos são peptídeos curtos formados por apenas dois aminoácidos. São rapidamente absorvidos pelo corpo humano e também são capazes de penetrar a barreira hematoencefálica (BHE), interface altamente seletiva que separa os SNC do sistema vascular. Ele protege o cérebro de moléculas exógenas e compostos tóxicos, porém também impede a entrada de fármacos no sistema nervoso central afetando, assim o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a DA.<sup>26- 28</sup> Uma forma de solucionar este problema é o uso de dipeptídeos capazes de atravessar a BHE como “*deliveries*” de medicamentos para o SNC.<sup>29,30</sup> O dipeptídeo TYR-GLY, formado pelos resíduos dos aminoácidos L-tirosina e glicina, atua como um metabólito e, também, é um tautômero de um zwitterion, composto eletricamente neutro que possui cátions e ânions em sua estrutura.<sup>31, 32</sup> Os dipeptídeos GLY-TRP e TRP-GLY são formados pelos resíduos de aminoácidos glicina e L-triptofano; ambos atuam como metabólitos.<sup>33, 34</sup>

### **1.4 A cafeína: neuroprotetor para Doença de Alzheimer (DA) e Parkinson (DP)**

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina), substância psicoestimulante mais consumida, é um alcalóide do grupo das xantinas que é naturalmente encontrado em fontes vegetais, tais como grãos de café, folhas de chá, erva mate, sementes de cacau, e outras.<sup>35</sup> No corpo humano a cafeína é metabolizada no fígado pelas enzimas citocromo P450 oxidase, sofrendo

desmetilação e podendo ser convertida em paraxantina, teobromina, teofilina e ácido 1,3,7-metilúrico. Estes, por sua vez, podem gerar subprodutos como, por exemplo, a 1-metilxantina, 7-metilxantina e ácido 1,7-dimetilúrico.<sup>36</sup> A Figura 2 apresenta todos os produtos e subprodutos gerados a partir da cafeína, bem como suas vias metabólicas.

Figura 2 - Vias metabólicas e metabólitos da cafeína quando esta é sintetizada no corpo humano. As setas cinzas representam metabólitos que são produzidos em menor escala.<sup>36</sup>



Após a absorção, a cafeína pode atuar em diferentes sistemas como, por exemplo, o cardiovascular, renal, pulmonar, músculo esquelético e do SNC.<sup>37</sup> O efeito da cafeína resulta no aumento do estado de vigília, melhora do humor e modulação do estado oxidativo e inflamatório influenciando, assim, na associação dos mecanismos advindos da prática de atividade física intensa.<sup>37</sup> No SNC, a cafeína atua através dos seus metabólitos alterando o nível de neurotransmissores, tais como a serotonina, dopamina e noradrenalina, além da adenosina e aminoácidos. Isto é possível uma vez que ela pode agir não apenas liberando e recaptando os neurotransmissores como também pode se associar a receptores de determinados neurotransmissores devido a semelhanças estruturais, podendo ser usada na produção de fármacos que atuam na redução da dor, cansaço e tontura, além do aumento do

recrutamento motor.<sup>37</sup> Um outro efeito que a cafeína demonstra apresentar no SNC é a prevenção de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e DA; isto devido a sua atuação nos mecanismos de estresse oxidativo e inflamatório.<sup>37</sup> Estudos sugerem que a ingestão de cafeína pode reduzir os níveis de A $\beta$  no cérebro e, conseqüentemente, reduzir a formação de placas amilóides no hipocampo o que, por sua vez, tem o efeito não apenas prevenir e retardar o aparecimento da DA como pode, também, reduzir parcialmente o comprometimento da memória já afetada.<sup>35,38</sup>

## **1.5 Análise química de substâncias neuroprotetoras e o papel da cromatografia líquida contemporânea**

Ao estudar amostras complexas contendo uma mistura de analitos, como os A $\beta$ s, hormônios, e outros, é necessário realizar uma série de procedimentos como, por exemplo, o preparo adequado da amostra, a separação dos analitos de interesse de outros contaminantes e, por fim, a identificação e quantificação dos mesmos.

Existem diversas técnicas de separação de misturas, como, por exemplo, a evaporação, a destilação, a filtração e a cromatografia. Dentre elas, a cromatografia é a mais versátil, pois é capaz de separar quaisquer tipos de mistura, seja ela líquido-líquido, líquido-sólido, sólido-sólido ou ainda uma mistura de gases. A cromatografia é uma técnica de separação que se baseia na interação dos analitos entre a fase móvel e a fase estacionária, as quais, em geral, são uma hidrofílica e outra lipofílica. Os analitos interagem de forma diferente com cada uma das fases, resultando na desejada separação. Além disso, a forma como cada analito interage com as fases móvel e estacionária também diferem entre si - ou seja, dependendo da polaridade de cada analito eles ficarão mais ou menos retidos na fase estacionária, o que confere um tempo de retenção diferente para cada analito presente na amostra permitindo, assim, que sejam devidamente separados, identificados e/ou quantificados.<sup>39</sup>

Considerando-se o estado físico da fase móvel existem tres tipos de cromatografia: cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida (CL) e cromatografia a fluido supercrítico (CFS). Na cromatografia líquida a fase móvel e a fase estacionária são compostas por uma fase líquida e uma fase sólida, respectivamente, sendo que a fase móvel flui pela fase estacionária carregando os analitos. Inicialmente, a cromatografia líquida era feita por meio de uma coluna preenchida com partículas adsorventes de 50-100  $\mu$ m de diâmetro, na qual a fase móvel fluía pela gravidade. Este método, no entanto, era bastante demorado e, portanto, não podia ser utilizada para fins analíticos.<sup>40</sup> Para solucionar este problema, reduziu-se o

tamanho das partículas da fase estacionária, fazendo com que o caminho de difusão se tornasse menor e a velocidade de separação foi aumentada, No entanto, ao utilizar partículas de diâmetro tão pequenos quanto 5 à 10  $\mu\text{m}$ , foi gerada uma alta pressão na entrada da coluna, tornando necessário o uso de bombas de alta pressão, surgindo, assim, a cromatografia líquida de alta pressão (CLAE ou HPLC).<sup>40</sup> Esta nova metodologia aumentou enormemente a eficiência das colunas de cromatografia líquida. Assim, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), surge unindo-se o uso de adsorventes de finas partículas como fase estacionária, bombas de alta pressão (superior à 200 atm) e detectores em fluxo, aumentando, assim, o desempenho da cromatografia líquida e sua gama de aplicações.<sup>40</sup>

Avanços mais recentes nas técnicas cromatográfica permitiram, no final do século XX e início do XXI, o desenvolvimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). Esta variação da CLAE/HPLC (também simbolizada por U-HPLC) utiliza partículas de empacotamento com diâmetro médio inferior a 2  $\mu\text{m}$ , possibilitando uma maior velocidade, sensibilidade e resolução quando comparado às técnicas anteriores - no entanto, a pressão sofrida pela coluna é bastante alta.<sup>41</sup> O desenvolvimento de técnicas cromatográficas que suportam altas pressões, utilizam partículas menores como fase estacionária e menores volumes mortos entre as conexões, cela de detecção e outros componentes, permitiu a criação de técnicas cromatográficas miniaturizadas como, por exemplo, a micro-LC e a nano-LC. A utilização de colunas de diâmetro interno miniaturizado trouxe como benefício maior sensibilidade, melhoria na eficiência da interface com a espectrometria de massas, menor consumo de solventes, baixo volume de amostras.<sup>42</sup> A redução do uso de amostras e solventes tornaram as técnicas miniaturizadas menos agressivas ao meio ambiente e ao analista que as demais técnicas, pois dessa forma, menos solvente é descartado, diminuindo o lixo produzido e a poluição ambiental. Além disso, a exposição do analista à solventes tóxicos é reduzida diminuindo, assim, possíveis danos a sua saúde.

Uma outra forma de reduzir a exposição do analista a compostos tóxicos e reduzir possíveis erros causados pela operação manual é a automatização e hifenização das técnicas analíticas já bem estabelecidas. Um exemplo é a combinação e automatização de técnicas miniaturizadas com o preparo de amostras.<sup>43</sup> Algumas das técnicas automatizadas que já foram abordadas em estudos anteriores são a extração em fase sólida (SPE) e suas adaptações para a técnica miniaturizada como, por exemplo, a microextração em fase sólida (SPME) e a microextração em fase sólida magnética (MSPE); microextração por sorvente empacotado (MEPS); extração sortiva em barra de agitação (SBSE); e a cromatografia em fluxo turbulento (TFC).<sup>43</sup> Estas técnicas, no entanto, aplicam-se bem quando a amostra encontra-se em fase

líquida. Para amostras no estado sólido ou semissólido, no entanto, os resultados obtidos não são muito promissores.<sup>43</sup>

Em geral, amostras sólidas e semissólidas precisam de um tratamento prévio que envolve a transferência dos analitos de interesse para um meio químico adequado, usualmente um solvente como a água, acetonitrila ou metanol.<sup>43</sup> As técnicas de preparo de amostra mais comumente utilizadas para matrizes sólidas são a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), a QuEChERS, (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro) e a extração rápida por solventes pressurizados (PSE). Estas técnicas, apesar de trazerem resultados eficazes, trazem a desvantagem de precisarem de inúmeras etapas além de, geralmente, precisar de uma grande quantidade de amostra e solventes, especialmente se comparada às técnicas cromatográficas miniaturizadas.<sup>43</sup> Recentes estudos têm proposto a automatização do preparo de amostras sólidas por meio da utilização de um cartucho tubular, no qual a amostra pode ser acondicionada em estado bruto; este cartucho deve ser colocado em linha com uma coluna de extração e uma coluna cromatográfica permitindo, desta forma, a automatização e miniaturização de todos os estágios da análise cromatográfica de amostras de matriz sólida, a qual pode ser utilizada em pouquíssima quantidade (na ordem de microgramas).<sup>43</sup>

Após o preparo da amostra, o analito é extraído da matriz e separado pela coluna cromatográfica, podendo então ser identificado e quantificado - esta etapa ser feita por meio de técnicas de espectrometria de massas (MS). Nesta técnica as moléculas são ionizadas, e os íons produzidos são separados com base na relação massa/carga ( $m/z$ ) dos fragmentos obtidos.<sup>44</sup> As massas moleculares e a estrutura química das moléculas são obtidos por meio do padrão de fragmentação e pelos valores de  $m/z$  dos fragmentos.<sup>44</sup> Ao utilizar dois ou mais espectrômetros de massas conectados entre si ou um único espectrômetro de massas com vários analisadores arranjados sequencialmente, tem-se a espectrometria de massas em tandem ou sequencial (MS/MS).<sup>44</sup> A espectrometria de massas MS/MS tipicamente envolve várias etapas. Na primeira etapa, ocorre a ionização da molécula de interesse, e um conjunto de íons de uma determinada  $m/z$  é selecionado para a próxima etapa. Esses íons são direcionados para uma câmara de colisão e atingidos com um feixe de um gás inerte. Dentre eles, íons previamente selecionados são monitorados no outro analisador de massas, obtém-se assim o perfil dos fragmentos gerados.<sup>44</sup> Esta técnica, também denominada de monitoramento de reações múltiplas (MRM), é uma técnica de varredura que seleciona íons pré definidos para análise. Os íons selecionados são chamados de íons precursores (ou íons pai, na nomenclatura mais antiga) e os íons formados após a fragmentação recebem o nome de íons produtos (ou filhos) correspondentes. A esses conjuntos de íons dá-se o nome de íons de

transição, sendo que normalmente monitora-se de duas à quatro transições por analito.<sup>45</sup> A técnica de varredura MRM tem um alto grau de especificidade devido à escolha de íons seletivos resultando, assim, em quantificações relativas e absolutas.<sup>45</sup> É uma técnica bastante útil para análises de amostras de matrizes complexas como, por exemplo, determinação de peptídeos e neurotransmissores em tecidos cerebrais, determinação de cafeína em pó de café, etc.<sup>44</sup>

No presente trabalho, avaliou-se o potencial uso da cromatografia líquida em nano escala (nanoLC) acoplada a espectrometria de massas em tandem ou sequencial (MS/MS) - através de um sistema nanoLC-MS/MS - para a análise de várias classes de substâncias neuroativas em diferentes matrizes e com diferentes arranjos experimentais.

---

---

## **2. OBJETIVOS**

---

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos analíticos para determinação de substâncias neuroativas utilizando cromatografia líquida capilar em nano escala acoplada a espectrometria de massas sequencial ou em tandem MS/MS, através de um sistema nanoLC-MS/MS.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um método analítico de identificação e separação dos hormônios estradiol, estrona, e progesterona;
- Desenvolver um método analítico de identificação e separação dos dipeptídeos TYR-GLY, GLY-TRP e TRP-GLY;
- Desenvolver um método analítico de identificação e separação dos dipeptídeos TYR-GLY, GLY-TRP e TRP-GLY presentes em uma amostra sólida utilizando um sistema de preparo de amostras automatizado;
- Desenvolver um método analítico de determinação de cafeína em pó de café utilizando um sistema de preparo de amostras automatizado;
- Desenvolver um método analítico de identificação e separação dos peptídeos  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$  utilizando um sistema de preparo de amostras automatizado.

---

---

## **3. EXPERIMENTAL**

---

---

## 3 EXPERIMENTAL

### 3.1 Sistema LC-MS/MS

O equipamento empregado nesta etapa do trabalho consiste em um cromatógrafo líquido da empresa Waters (Milford, Massachusetts, EUA) composto por três sistemas [ (i) uma bomba capilar *μBinary Solvent Manager*, (ii) um injetor *μSample Manager-FL* e (iii) um sistema *Trap Valve Manager*) acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolar em tandem, *XEVO TQ-S-micro*. A Figura 3 ilustra uma montagem do equipamento, evidenciando o sistema de extração acoplado online com o sistema LC- MS/MS. O sistema *Trap Valve Manager* é empregado em duas etapas, sendo a primeira é a etapa de preparo de amostra automatizada e a segunda a etapa analítica. Na etapa de preparo de amostra (Figura 3a) inicialmente ambas as válvulas são mantidas na posição 1. Desta forma, a fase móvel entra na válvula, passa pelo cartucho de modo a extrair os analitos da matriz bruta (os quais ficam retidos no co-adsorvente), e é encaminhada para o descarte. Em seguida, a válvula da esquerda é girada para a posição 2, e os analitos são carregados para a coluna de extração onde são pré-concentrados enquanto a maior parte dos resíduos são descartados. Na etapa analítica (Figura 3b) a válvula da esquerda é mantida na posição 1 e a válvula da direita na posição 2. Assim, a fase móvel passa pela coluna de extração e carrega os analitos para a coluna analítica, onde irá ocorrer a separação cromatográfica. Logo após, os analitos são encaminhados para o espectrômetro de massas.

Foram utilizadas as seguintes **colunas analíticas** ao longo do trabalho:

- *nanoEase M/Z Peptide BEH C18* (300 μm x 150 mm, tamanho das partículas: 1,7 μm e diâmetro dos poros: 300Å) para análise dos β-amilóides Aβ<sub>1-38</sub> (Figura 4), Aβ<sub>1-40</sub> (Figura 5) e Aβ<sub>1-42</sub> (Figura 6);
- coluna C18 BEH (300 μm x 150 mm, tamanho das partículas: 1,7 μm e diâmetro dos poros: 130Å) para a análise dos hormônios estradiol (Figura 7), estrona (Figura 8), e progesterona (Figura 9);
- coluna analítica *ACQUITY UPLC M-Class CSH C18* (300 μm x 150 mm, tamanho das partículas: 1,7 μm e diâmetro dos poros: 130Å) para análise dos dipeptídeos TYR-GLY (Figura 10), GLY-TRP (Figura 11) e TRP-GLY (Figura 12), análise dos β-amilóides e determinação de cafeína (Figura 13) em pó de café.

As **colunas de extração** utilizadas neste trabalho foram:

- (i) coluna *ACQUITY UPLC M-Class Trap Symmetry C18* (300  $\mu\text{m}$  x 5 mm, tamanho das partículas: 5  $\mu\text{m}$  e diâmetro dos poros: 100  $\text{\AA}$ ), adquirida da Waters;
- (ii) coluna *trap* de grafeno produzida em laboratório.

Figura 3 - Exemplo de diagrama esquemático de um sistema LC-MS/MS de preparo de amostras em várias etapas acoplado a um analisador de massas triplo quadrupolo com ênfase nos caminhos fluídicos (azul) e suas conexões. **(a)** Válvulas posicionadas de modo a ocorrer a extração e sorção dos analitos (etapa 1). **(b)** Válvulas posicionadas de modo a ocorrer a análise LC-MS/MS capilar dos analitos (etapa 2).<sup>43</sup>

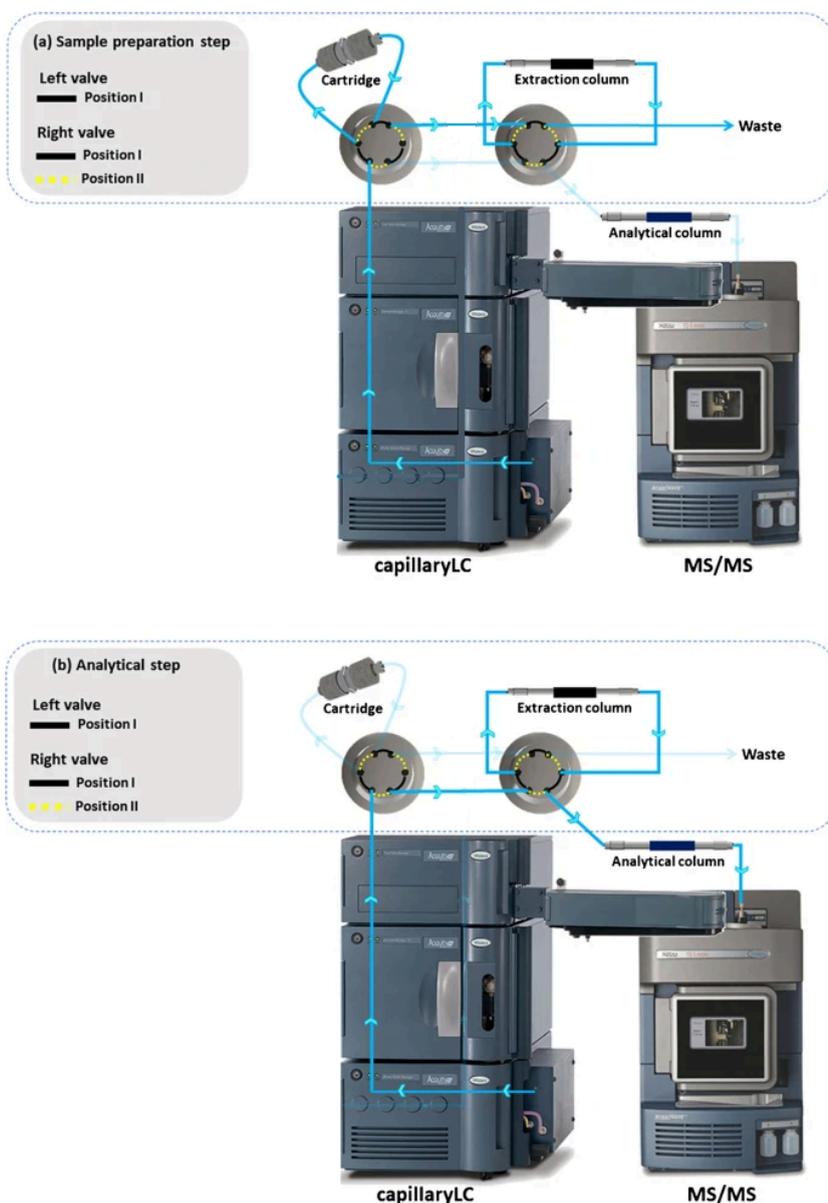






Figura 6 - Estrutura molecular da A $\beta$ <sub>1-42</sub>.<sup>48</sup>

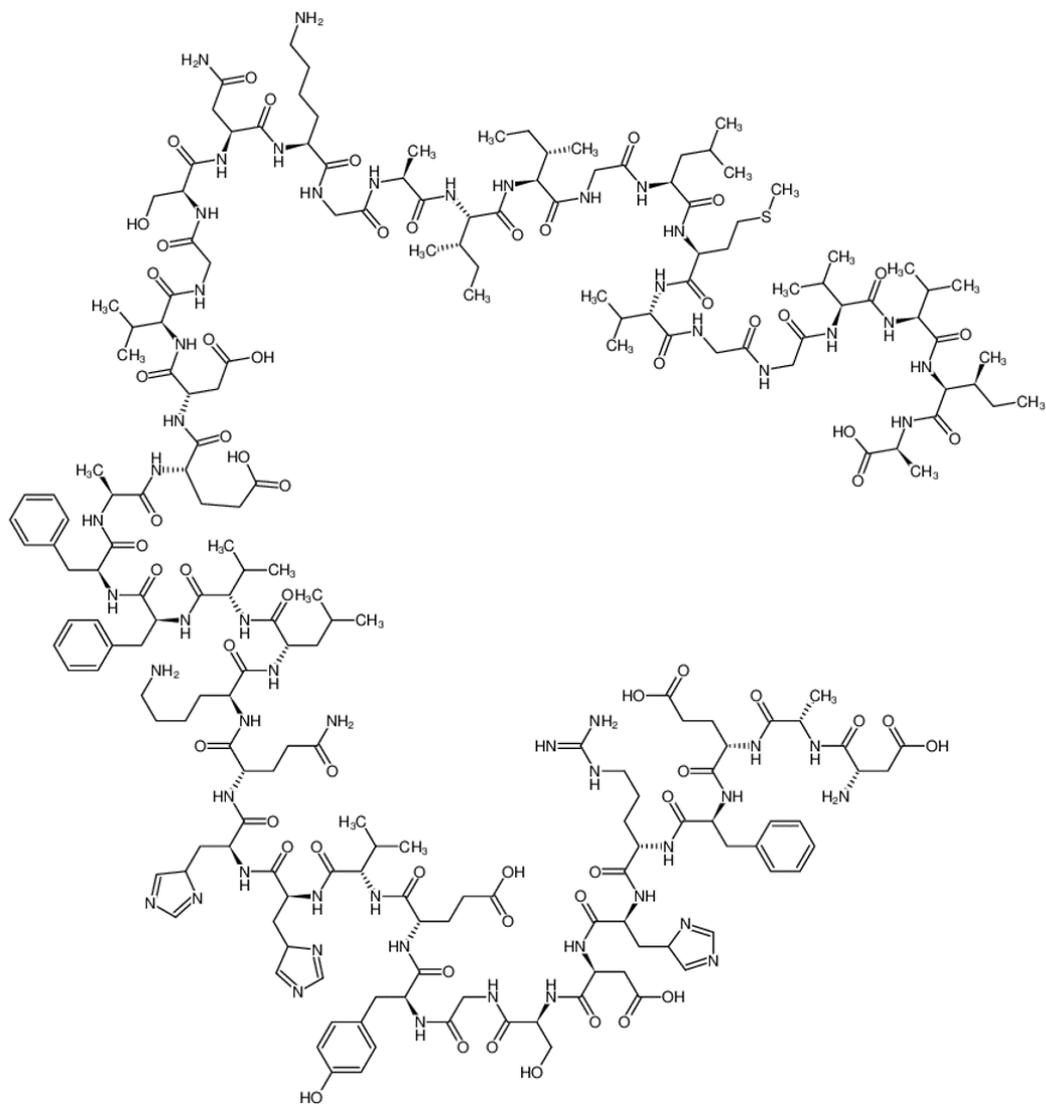


Figura 7 - Estrutura molecular do estradiol.<sup>49</sup>

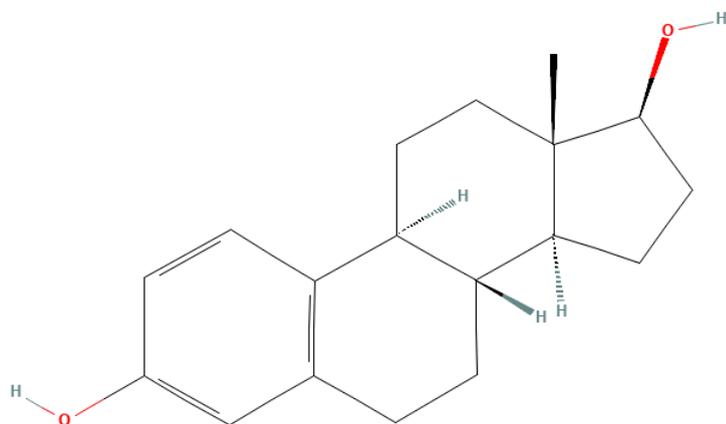


Figura 8 - Estrutura molecular da estrona.<sup>50</sup>

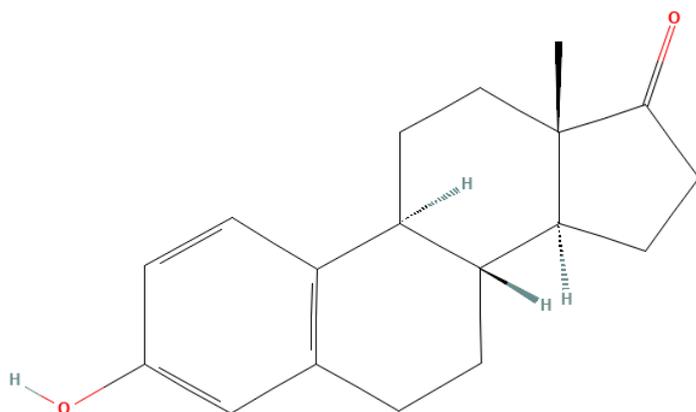


Figura 9 - Estrutura molecular da progesterona.<sup>51</sup>

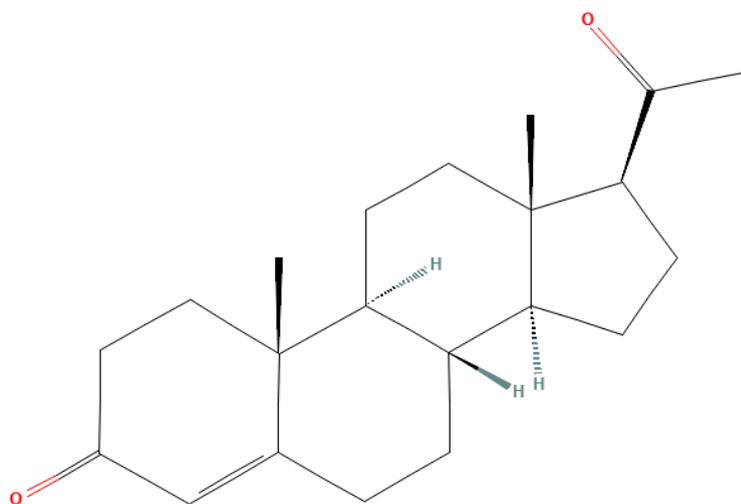


Figura 10 - Estrutura molecular do TYR-GLY.<sup>31</sup>

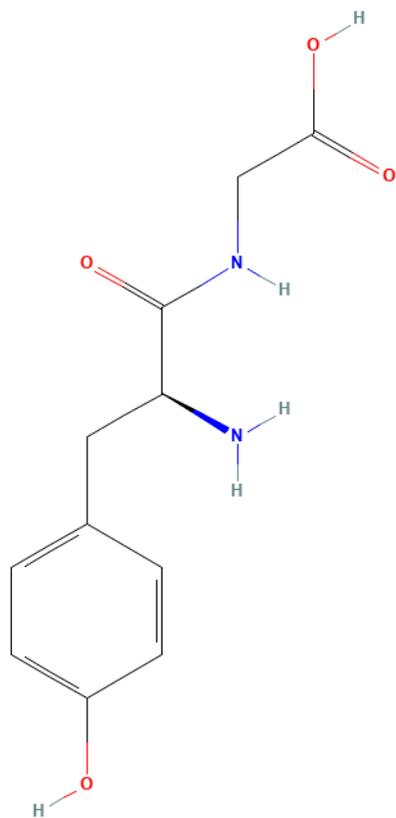


Figura 11 - Estrutura molecular do GLY-TRP.<sup>33</sup>

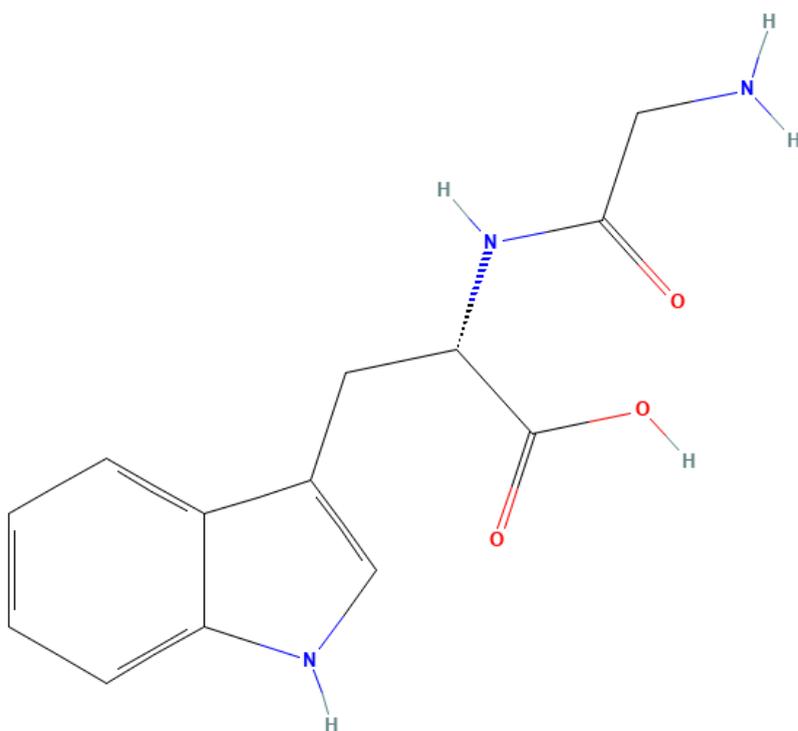


Figura 12 - Estrutura molecular do TRP-GLY.<sup>34</sup>

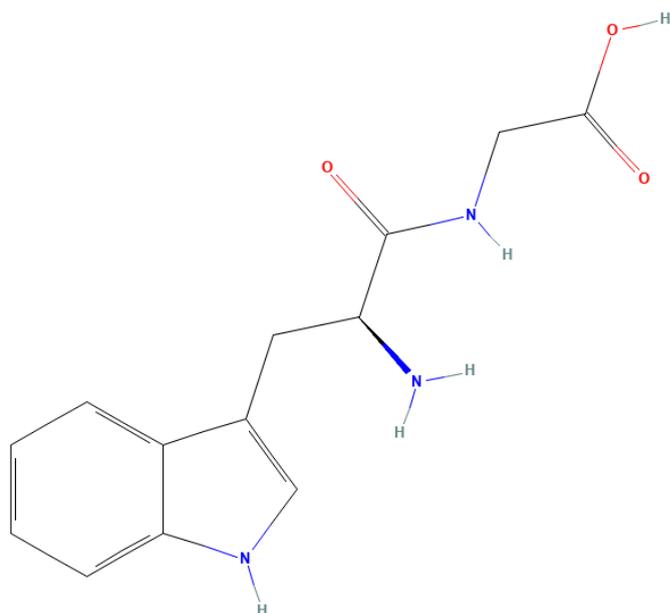
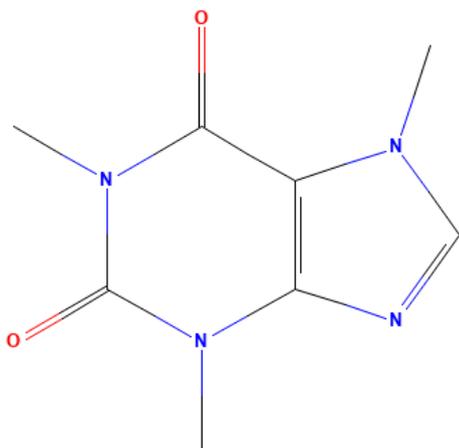


Figura 13 - Estrutura molecular da cafeína.<sup>52</sup>



### 3.3 Seleção dos parâmetros cromatográficos empregados

Os parâmetros cromatográficos utilizados para separação dos hormônios e dos dipeptídeos e na determinação de cafeína em pó de café estão descritas na Tabela 1; os parâmetros cromatográficos utilizados para análises dos Aβs estão descritos na Tabela 2.

Tabela 1 – Parâmetros cromatográficos e do espectrômetro de massas utilizados nas análises dos hormônios, dipeptídeos, e cafeína.

Temperatura da coluna cromatográfica	45°C
Modo de ionização	ESI+
Voltagem do capilar	3,5 kV
Temperatura de dessolvatação	350°C
Vazão do gás de arraste	800 L/h

Tabela 2 - Parâmetros cromatográficos e do espectrômetro de massas utilizados nas análises dos A $\beta$ s.

Temperatura da coluna cromatográfica	40°C (coluna CSH) e 55°C (coluna BEH)
Modo de ionização	ESI+
Voltagem do capilar	2
Temperatura de dessolvatação	350°C
Vazão do gás de arraste	0

### 3.4 Padrões analíticos

Para esta etapa do trabalho, uma mistura de hormônios (estradiol, estrona e progesterona) foi adquirida da Sigma-Aldrich (Burlington, Massachusetts, EUA). A mistura de dipeptídeos (tirosina-glicina, glicina-triptofano e triptofano-glicina) empregada foi adquirida da Sigma-Aldrich. Os peptídeos A $\beta$ <sub>1-38</sub>, A $\beta$ <sub>1-40</sub> e A $\beta$ <sub>1-42</sub> foram adquiridos da AnaSpec (Fremont, Califórnia, EUA).

### 3.5 Preparo dos padrões, fase móvel e solventes de limpeza

A partir de três soluções estoques, sendo uma de estradiol, uma de estrona, e outra de progesterona, preparou-se um mix destes três hormônios a uma concentração de 0,25 mg/L.

As análises de dipeptídeos foram feitas utilizando soluções padrão preparadas em dois meios aquosos diferentes, um neutro e outro acidificado. Para a solução padrão em meio aquoso neutro foi preparada uma solução estoque dos três di-peptídeos (TYR-GLY, GLY-TRP

e TRP-GLY) na concentração de 500 mg/L. A partir destas soluções estoques preparou-se soluções intermediárias de 50 mg/L, as quais foram utilizadas no preparo de um mix dos três di-peptídeos na concentração de 0,1 mg/L, utilizada como solução trabalho. Para a solução padrão em meio aquoso acidificado foi preparada uma solução estoque dos três di-peptídeos (TYR-GLY, GLY-TRP e TRP-GLY) na concentração de 500 mg/L em água acidificada com ácido fórmico em 5%. A partir destas soluções estoques preparou-se soluções intermediárias de 200 mg/L, as quais foram utilizadas no preparo de um mix dos três di-peptídeos na concentração de 0,1 mg/L, a qual foi utilizada como solução trabalho.

Os padrões de A $\beta$ s (A $\beta$ <sub>1-38</sub>, A $\beta$ <sub>1-40</sub> e A $\beta$ <sub>1-42</sub>) foram ressuspensos em solução aquosa de NH<sub>4</sub>OH a 1% (em volume suficiente para chegar à concentração de 1000 mg/L) e sonicados por 30 segundos. Em seguida, foram distribuídos em frascos de baixa retenção, diluídos à concentração de 50 mg/L com uma solução 80:20 NH<sub>4</sub>OH à 1%/acetonitrila (v/v), sonicados por 30 segundos e armazenados em freezer -80°C.

Como fases móveis para as análises de hormônios, dipeptídeos e determinação de cafeína utilizou-se acetonitrila e água, ambas acidificadas com ácido fórmico em 0,1%. Também utilizou-se água 0,1% acidificada com ácido fórmico e metanol como fases móveis para as análises de dipeptídeos.

Para a separação dos A $\beta$ s a fase móvel aquosa (fase A) foi composta por solução aquosa de NH<sub>4</sub>OH à 0,3%; a fase móvel orgânica (fase B) consistia em 90:10 acetonitrila/fase A (v/v). Foi preparada uma segunda fase móvel de menor basicidade onde a fase móvel aquosa (fase A) foi composta por solução aquosa de NH<sub>4</sub>OH à 0,1% e a fase móvel orgânica (fase B) consistia em 90:10 acetonitrila/fase A (v/v).

Para as análises de A $\beta$ , acetonitrila e isopropanol na proporção 80:20 (v/v) + 10% de NH<sub>4</sub>OH foi utilizado como solvente de limpeza forte; como solvente de limpeza fraco foi utilizado uma solução 95:5 água/acetonitrila (v/v) + 0,3% NH<sub>4</sub>OH. Para as análises dos demais analitos utilizou-se água ultrapura e acetonitrila como solventes de limpeza fraco e forte, respectivamente.

### **3.6 Identificação e separação cromatográfica dos hormônios**

Para a separação cromatográfica dos hormônios, inicialmente utilizou-se um volume de injeção de 0,180  $\mu$ L e a eluição foi feita no modo gradiente. A Tabela 3 apresenta as condições cromatográficas desse conjunto inicial. As transições monitoradas e suas respectivas voltagem de cone e energia de colisão estão descritas na Tabela 4.

Tabela 3 - Condições cromatográficas dos estudos realizados no modo de gradiente.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (µL/min)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	8	80	20	Inicial
5,50	8	25	75	6
6,70	8	5	95	6
10,00	8	5	95	6
11,00	8	80	20	6
19,00	8	80	20	6

Tabela 4 - Energia de colisão e voltagem do cone para cada transição monitorada na análise de hormônios.

<b>Composto</b>	<b>Íon Precursor</b>	<b>Íon Produto</b>	<b>Voltagem do Cone (kV)</b>	<b>Energia de colisão (eV)</b>
Estradiol	255,10	133,03	36	18
		159,05		
Estrona	271,14	133,03	30	24
	271,20	159,10	20	25
Progesterona	315,30	97,1	30	25
		109,10		

Um conjunto de ensaios utilizando o volume de injeção de 0,280 µL foi realizado sob as mesmas condições cromatográficas das análises anteriores (Tabela 3). Posteriormente, realizou-se uma avaliação da separação no modo isocrático, conforme pode ser observado na Tabela 5. Neste caso, o volume de injeção foi de 1 µL.

Tabela 5 - Condições cromatográficas no modo isocrático.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (µL/min)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	25	99	1	Inicial
0,5	25	99	1	6

### **3.7 Identificação e separação cromatográfica dos dipeptídeos**

#### **3.7.1 Avaliação da separação dos padrões preparados em meio aquoso neutro**

Inicialmente foi efetuada uma varredura (SCAN) na faixa de 50 a 500 no modo positivo para uma amostra contendo os três dipeptídeos, para efetuar-se a escolha dos íons de transição a serem empregados no monitoramento MS/MS. A voltagem do cone e energia do capilar utilizados foram obtidos por meio da infusão direta de uma solução padrão na concentração de 2 mg/L do mix de dipeptídeos. A Tabela 6 ilustra os íons de transição selecionados para cada um dos três dipeptídeos, os quais foram utilizados para realizar as análises posteriores.

A primeira análise do mix de dipeptídeos foi feita utilizando o método isocrático, sendo as porcentagens de 30% de fase orgânica (B) e 70% de fase aquosa (A). Acetonitrila e água, ambas 0,1% acidificadas com ácido fórmico, foram usadas como fase móvel. O volume de injeção foi de 0,5 µL e o fluxo foi de 10 µL/min. Um segundo conjunto de experimentos foi posteriormente efetuado em condições semelhantes à primeira. No entanto, utilizou-se 70% de fase orgânica (B) e 30% de fase aquosa (A).

Em seguida, foram realizados experimentos utilizando-se o modo gradiente ao invés do isocrático empregado anteriormente. As condições cromatográficas utilizadas podem ser observadas nas Tabelas 7 e 8. O volume de injeção de ambos conjuntos de experimentos foi de 0,5 µL.

Tabela 6 - Energia de colisão e voltagem do cone para cada transição monitorada na análise dos dipeptídeos TYR-GLY, GLY-TRP e TRP-GLY.

Composto	Íons Precusores	Íons Produto	Voltagem do Cone (kV)	Energia de colisão (eV)
TYR-GLY	238,49	91,06	18	36
		119,02		24
		136,06		12
GLY-TRP	261,51	117,99	22	38
		146,08		26
		188,09		18
TRP-GLY	261,51	132,10	18	28
		144,13		18
		159,15		18

Tabela 7 - Condições cromatográficas no modo gradiente 1.

Tempo (min)	Fluxo (µL/min)	Fase aquosa (A) (%)	Fase orgânica (B) (%)	Curva
Inicial	12	95	5	Inicial
1	12	95	5	6
4	12	70	30	6
8	12	1	99	3
10	12	1	99	3
11	12	95	5	3
14	12	95	5	3

### 3.7.2 Avaliação da separação dos padrões preparados em meio aquoso acidificado

Foram realizados experimentos utilizando padrões preparados em meio acidificado. As análises cromatográficas foram feitas nas mesmas condições descritas na Tabela 8, o volume de injeção utilizado foi de 0,5 µL. Posteriormente, novas análises foram feitas, também nestas mesmas condições, no tempo total de 13 e 12 minutos.

Tabela 8 - Condições cromatográficas no modo gradiente 2 (curva 3).

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (µL/min)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	12	95	5	Inicial
1	12	95	5	3
4	12	70	30	3
8	12	1	99	3
10	12	1	99	3
11	12	95	5	3
15	12	95	5	3

### 3.7.3 Avaliação da separação cromatográfica utilizando metanol como fase móvel

Foram realizados experimentos com a solução trabalho preparada em meio aquoso acidificado e substituindo a fase orgânica usada anteriormente por metanol. As condições de análises estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9 - Condições cromatográficas da análise utilizando metanol.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (µL/min)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	8	95	5	Inicial
1	8	95	5	3
4	8	70	30	3
8	8	1	99	3
10	8	1	99	3
11	8	95	5	3
15	8	95	5	3

### 3.7.4 Utilização do sistema de extração de amostra sólida automatizado

Utilizou-se um cartucho desenvolvido no laboratório preenchido com 30 mg de fase C18 e 10 mg de solo fortificado na concentração de 0,2 mg/L com o mix de dipeptídeos preparado em meio aquoso acidificado. O intuito desse experimento foi mimetizar o sistema

de amostra sólida contendo as proteínas a serem estudadas na etapa final do trabalho. O volume de injeção foi de 0,5  $\mu\text{L}$ , as fases móveis utilizadas foram água (A) e acetonitrila (B), ambas 0,1% acidificadas com ácido fórmico, o fluxo empregado foi de 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ . O modo utilizado foi o isocrático, sendo as porcentagens de fase orgânica e aquosa de 64% e 36%, respectivamente

### 3.8 Determinação de cafeína em pó de café utilizando o sistema *Trap Valve Manager*

#### 3.8.1 Avaliação da extração da cafeína sem incorporar uma coluna extratora ao sistema *Trap Valve Manager*

Inicialmente foram feitas análises utilizando pó de café como amostra sólida. Para tanto preencheu-se o cartucho de amostra sólida com 1 mg de pó de café e 39 mg de C18. As análises foram feitas em duas etapas, primeiramente foi feita a etapa de *trapping* onde a fase móvel passou em um fluxo alto (30  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) pelo cartucho contendo a amostra sólida e foi direcionada para o lixo. Essa etapa tem o propósito de ativar a fase sólida (C18). Logo a seguir, o fluxo foi diminuído e, em 3 minutos, ocorreu o giro da válvula direita para que, então, a fase móvel contendo o analito fosse para a coluna analítica, em seguida foi feita a etapa analítica. As condições cromatográficas do *trapping* e da etapa analítica estão descritas na tabela 10 e 11, respectivamente. As transições monitoradas e suas respectivas voltagem de cone e energia de colisão estão descritas na Tabela 12.

Tabela 10 - Condições cromatográficas do *trapping*.

Tempo (min)	Fluxo ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Fase aquosa (A) (%)	Fase orgânica (B) (%)	Curva
Inicial	30	95	5	Inicial
2,0	30	95	5	6
2,1	8	95	5	6
5,0	8	95	5	6

Tabela 11 - Condições cromatográficas da etapa analítica.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (µL/min)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	8	75	25	Inicial
5	8	75	25	6

Tabela 12 - Energia de colisão e voltagem do cone para cada transição monitorada na análise da cafeína.

<b>Íon Precursor</b>	<b>Íon Produto</b>	<b>Voltagem do Cone (kV)</b>	<b>Energia de colisão (eV)</b>
195	42	30	26
	110		22
	138		20

Em seguida foram realizados testes aumentando a porcentagem de fase aquosa no início da etapa de *trapping* de 95% para 99%, conforme observado na Tabela 13. Ou seja, aumentou-se a porcentagem de fase aquosa que passava pelo cartucho e era descartada, sem passar pela coluna analítica. As condições cromatográficas da etapa analítica não foram alteradas.

Um terceiro conjunto de testes foi realizado mantendo-se o início do *trapping* mais aquoso conforme a Tabela 13, e aumentando-se a porcentagem de fase aquosa também na etapa analítica (85% de fase A), conforme pode ser observado na tabela 14. Também foi realizado um conjunto de testes utilizando as condições cromatográficas de *trapping* descritas na tabela 11 (porcentagem de fase A mantida em 95%) e utilizando-se a fase móvel mais aquosa na etapa analítica conforme descrito na Tabela 14.

Tabela 13 - Condições cromatográficas do *trapping*, início com maior porcentagem de fase aquosa.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (µL/min)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	30	99	1	Inicial
2,0	30	99	1	6
2,1	8	95	5	6
5,0	8	95	5	6

Tabela 14 - Condições cromatográficas da etapa analítica, com maior proporção de fase aquosa.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (µL/min)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	8	85	15	Inicial
5	8	85	15	6

Posteriormente foi feito um conjunto de testes em que a as condições cromatográficas da etapa de *trapping*, cuja proporção inicial da fase móvel A era maior, foi usada (Tabela 13), enquanto a fase móvel da etapa analítica foi alterada para a proporção 80% de A e 20% de B, conforme pode ser observado na Tabela 15.

Tabela 15 - Condições da etapa analítica, proporção de fase móvel 80% de A contra 20% de B.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (µL/min)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	8	80	20	Inicial
5	8	80	20	6

### 3.8.2 Avaliação da extração da cafeína incorporando uma coluna de extração ao sistema *Trap Valve Manager*

Após realização dos primeiros testes com o pó de café, foi incorporado uma coluna de grafeno ao sistema com o objetivo de pré-concentrar a cafeína. Desta forma o sistema se dava da seguinte forma: primeiramente a etapa de *trapping*, onde inicialmente a fase móvel passa pelo cartucho e vai para o lixo; após 2 minutos, ocorre o giro da válvula direita e a fase móvel começa a passar pela coluna de grafeno e então ir para o lixo. Dessa forma, os analitos ficam retidos na coluna de grafeno. Em seguida, ocorre a etapa analítica onde a fase móvel passa pela coluna de grafeno e se direciona para a coluna analítica. As condições cromatográficas da etapa de *trapping* e analítica estão descritas nas Tabelas 16 e 17, respectivamente.

Os mesmos testes foram realizados, porém reduzindo o tempo total do *trapping* para 3 minutos, conforme pode ser observado na Tabela 18.

Tabela 16 - Condições cromatográficas do *trapping* utilizando coluna de grafeno.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (<math>\mu\text{L}/\text{min}</math>)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	30	95	5	Inicial
4	30	95	5	6

Tabela 17 - Condições cromatográficas da etapa analítica utilizando coluna de grafeno.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (<math>\mu\text{L}/\text{min}</math>)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	8	75	25	Inicial
10	8	75	25	6

Tabela 18 - Condições cromatográficas do trapping com um tempo total reduzido a 3 minutos.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (µL/min)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	30	95	5	Inicial
3	30	95	5	6

Novamente, repetiu-se os experimentos, aumentando-se, no entanto, a porcentagem de fase aquosa na etapa de *trapping*, conforme pode ser observado na Tabela 19.

Tabela 19 - Condições cromatográficas do trapping, maior porcentagem de A.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (µL/min)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	30	99	1	Inicial
3	30	99	1	6

Por fim, foi feito um novo conjunto de testes mantendo as condições cromatográficas do *trapping* do teste anterior (Tabela 19) e diminuindo a proporção da fase aquosa na etapa analítica, conforme descrito na Tabela 20.

Tabela 20 - Condições cromatográficas da etapa analítica, menor porcentagem de A.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (µL/min)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	8	70	30	Inicial
10	8	70	30	6

### 3.8.3 Avaliação da extração da cafeína reduzindo a massa de amostra sólida utilizada no sistema *Trap Valve Manager*

Foram realizados testes mantendo-se as condições cromatográficas iguais às do conjunto de testes anterior (ver tabela 19 e 20 para condições cromatográficas), reduzindo-se a massa de café para 0,3 mg e aumentando-se a massa de C18 para 39,7 mg. Outros dois conjuntos testes foram realizados, porém diminuindo o tempo em que a fase móvel com o analito passava pela coluna de grafeno para 0,5 e 0,1 minutos, respectivamente - ou seja, no primeiro caso o giro da válvula direita ocorreu em 2,5 minutos para a posição 1 (fase móvel passando pela coluna de grafeno ao invés de ir para o descarte), e no segundo caso essa alteração ocorreu em 2,9 minutos.

### 3.8.4 Avaliação da extração da cafeína empregando pó de café descafeinado como amostra sólida utilizada no sistema *Trap Valve Manager*

Após os testes feitos com o pó de café foram realizados testes com pó de café descafeinado. Neste caso foi retirada a etapa em que a fase móvel que passava pelo cartucho de fase sólida era encaminhada diretamente para o lixo, ou seja, toda a fase móvel que passou pelo cartucho passou também pela coluna de grafeno e, apenas após isso foi encaminhada para descarte. Primeiramente foi utilizado um fluxo de 8  $\mu\text{L}/\text{min}$  na etapa de *trapping*, conforme pode ser observado na Tabela 21. As condições cromatográficas da etapa analítica foram mantidas tais como na Tabela 20.

Tabela 21 - Condições cromatográficas do trapping, fluxo de 8  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Tempo (min)	Fluxo ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Fase aquosa (A) (%)	Fase orgânica (B) (%)	Curva
Inicial	8	99	1	Inicial
5	8	99	1	6

Em seguida foi repetido o teste utilizando-se o fluxo de fase móvel na etapa de *trapping* de 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ , porém sem o evento de giro de válvula, ou seja, fase móvel indo diretamente para a coluna de grafeno. As condições cromatográficas foram aquelas descritas na Tabela 19 e 20.

Posteriormente foram realizados testes utilizando-se uma menor proporção de fase aquosa (95% de A), conforme pode ser observado na Tabela 22. Em seguida, foram realizados testes utilizando-se o modo gradiente na etapa analítica, conforme a Tabela 23. As condições cromatográficas da etapa de *trapping* foram mantidas tais quais a tabela 22.

Tabela 22 - Condições cromatográficas do trapping, menor proporção de A.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (µL/min)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	30	95	5	Inicial
5	30	95	5	6

Tabela 23 - Condições cromatográficas da etapa analítica, modo gradiente.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (µL/min)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	8	70	30	Inicial
3,2	8	70	30	3
3,3	8	0	100	3
6,3	8	0	100	3
6,4	8	70	30	3
11	8	70	30	3

### **3.8.5 Avaliação da extração da cafeína aumentando-se a massa de pó de café descafeinado empregado como amostra sólida utilizada no sistema *Trap Valve Manager***

Foram realizadas análises utilizando-se pó de café descafeinado numa quantidade maior que a empregada anteriormente; para tanto utilizou-se 1 mg de pó de café descafeinado e 39 mg de fase sortiva (C18). A primeira análise foi realizada mantendo-se as condições

cromatográficas do conjunto de teste anterior (Tabela 22 e 23). Posteriormente, aumentou-se o tempo da etapa de *trapping* para 10 minutos, conforme pode ser observado na Tabela 24.

Tabela 24 - Condições cromatográficas do *trapping*, duração de 10 minutos.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (<math>\mu\text{L}/\text{min}</math>)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	30	95	5	Inicial
10	30	95	5	6

Repetiu-se o teste alterando-se o fluxo do *trapping* para 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  e, posteriormente, para 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ , conforme Tabelas 25 e 26.

Tabela 25 - Condições cromatográficas do *trapping*, fluxo de 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (<math>\mu\text{L}/\text{min}</math>)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	15	95	5	Inicial
10	15	95	5	6

Tabela 26 - Condições cromatográficas do *trapping*, fluxo de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (<math>\mu\text{L}/\text{min}</math>)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>	<b>Curva</b>
Inicial	50	95	5	Inicial
10	50	95	5	6

### 3.9 Avaliação da separação cromatográfica dos $\beta$ -amilóides

#### 3.9.1 Seleção dos parâmetros cromatográficos e de espectrometria de massas

As transições, energia de colisão e voltagem do cone foram obtidas por infusão direta a partir de uma solução padrão de 2 mg/L dos  $\beta$ -amilóides, os valores encontrados para cada analito e estão descritos na Tabela 27. A energia do capilar (EC) e fluxo de gás (FG) foram determinados experimentalmente através de análises feitas em triplicata. O gradiente de fase móvel utilizado está apresentado na Tabela 28 e o volume de injeção foi 1  $\mu$ L. A fase móvel utilizada foi a de maior basicidade.

Tabela 27 - Íons de transição, energia de colisão e voltagem do cone, para cada analito, determinados por infusão direta.

Analito	Íon precursor	Íon produto	Voltagem do cone (kV)	Energia de colisão (eV)
A $\beta$ 1-38	1033.8	1000.7	33	10
		1015.08		
A $\beta$ 1-40	1083.4	1029.27	60	10
		1054.22		
A $\beta$ 1-42	1129.5	1078.9	35	20
		1106.9		

Tabela 28 - Gradiente utilizado na primeira etapa dos experimentos.

Tempo (min)	Fluxo ( $\mu$ L/min)	Fase aquosa(A) (%)	Fase orgânica (B) (%)
Inicial	5	95	5
1,00	5	95	5
6,50	5	70	30
7,00	5	0	100
12,50	5	0	100
13,00	5	95	5
16,00	5	95	5

### 3.9.2 Procedimento de limpeza da coluna analítica

Para limpeza da coluna utilizou-se água e acetonitrila, ambos 0,1% acidificados com ácido trifluoroacético (TFA). A coluna foi colocada na posição invertida àquela utilizada na corrida cromatográfica e o fluxo utilizado foi de 3  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

### 3.9.3 Avaliando coluna CSH

Realizou-se um conjunto de experimentos nas mesmas condições cromatográficas descritas na Tabela 26, no entanto, trocando-se a coluna analítica *nanoEase M/Z Peptide BEH C18* pela coluna analítica *ACQUITY UPLC M-Class CSH C18*.

### 3.9.4 Montagem do sistema de *trapping*

Neste sistema o padrão analítico injetado passou pela coluna *trap* por um tempo pré determinado (0,5, 1, 1,5 e 2 minutos) em um fluxo de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Após o tempo de *trap* ocorreu o giro da válvula e, a um fluxo de 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , a fase móvel passou pela coluna de *trap* no sentido inverso (*backflush*) de modo a eluir os analitos e os carregar para a coluna analítica. Durante o tempo de *trap* a fase móvel foi utilizada no modo isocrático em duas proporções diferentes, sendo elas 95% de A e 5% de B; e 99% de A e 1% de B. Os dois gradientes utilizados estão descritos na Tabela 29 e 30.

Tabela 29 - Gradiente utilizado na etapa de *trapping* iniciando com 95% de A e 5% de B

Tempo (min)	Fluxo ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Fase aquosa (A) (%)	Fase orgânica (B) (%)
Inicial	5	95	5
1,0	5	95	5
6,5	5	40	60
7,0	5	0	100
12,5	5	0	100
13,0	5	95	5
16,0	5	95	5

Tabela 30 - Gradiente utilizado na etapa de *trapping* iniciando com 99% de A e 1% de B

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo (<math>\mu\text{L}/\text{min}</math>)</b>	<b>Fase aquosa (A) (%)</b>	<b>Fase orgânica (B) (%)</b>
Inicial	5	99	1
1,0	5	99	1
6,5	5	40	60
7,0	5	0	100
12,5	5	0	100
13,0	5	99	1
16,0	5	99	1

### 3.9.5 Construção da curva de calibração

#### 3.9.5.1 Limpeza do selo da coluna analítica e troca de fase móvel

Para a limpeza do selo utilizou-se uma mistura de 50:50 acetonitrila:isopropanol (v/v) e deixou-se o selo em banho-maria no ultrassom por cerca de 24 horas. A partir desta etapa passou-se a usar a fase móvel de menor basicidade.

#### 3.9.5.2 Curva de calibração

Para construção da curva de calibração dilui-se os padrões de  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$ ,  $A\beta_{1-42}$  de 10 mg/L à concentração de 0,1 mg/L, e a partir desta solução das misturas dos beta amilóides obteve-se 4 novos pontos correspondentes a 0,010, 0,030, 0,050 e 0,075 mg/L.

---

---

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

---

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Hormônios

#### 4.1.1 Identificação e separação cromatográfica dos hormônios

O cromatograma da Figura 14 ilustra um resultado típico obtido nas primeiras análises feitas com a mistura dos hormônios, onde os picos com tempos de retenção 5,76; 6,22; e 7,62 minutos referem-se, respectivamente, ao estradiol, estrona e progesterona. É possível observar-se que a resolução da separação foi satisfatória, apesar da pequena elevação da linha de base. Já a Figura 15 ilustra um resultado típico obtido sob as mesmas condições, porém utilizando um volume de injeção maior (0,280  $\mu\text{L}$ . ao invés de 0,180  $\mu\text{L}$ ). É possível observar que os analitos foram melhor separados na segunda análise. A partir desses experimentos iniciais concluiu-se que o volume da injeção anterior (0,180  $\mu\text{L}$ ) era muito pequeno e, conseqüentemente, a quantidade de analitos na coluna também, o que ocasionava o aumento da linha de base; desta forma, observou-se que o aumento do volume de injeção (para 0,280  $\mu\text{L}$ ) conduziu a um melhor resultado.

Figura 14 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido por LC-MS/MS da mistura de hormônios, utilizando o modo gradiente, com o volume de injeção de 0,180  $\mu\text{L}$ . As condições de análise utilizadas estão descritas na Tabela 3.

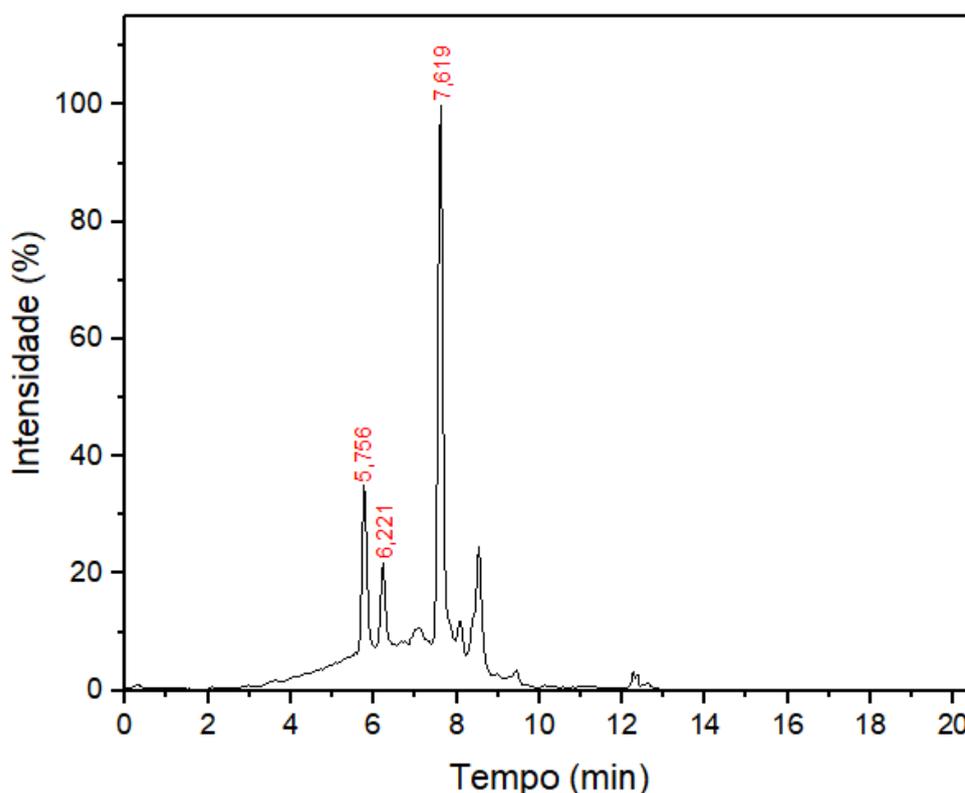
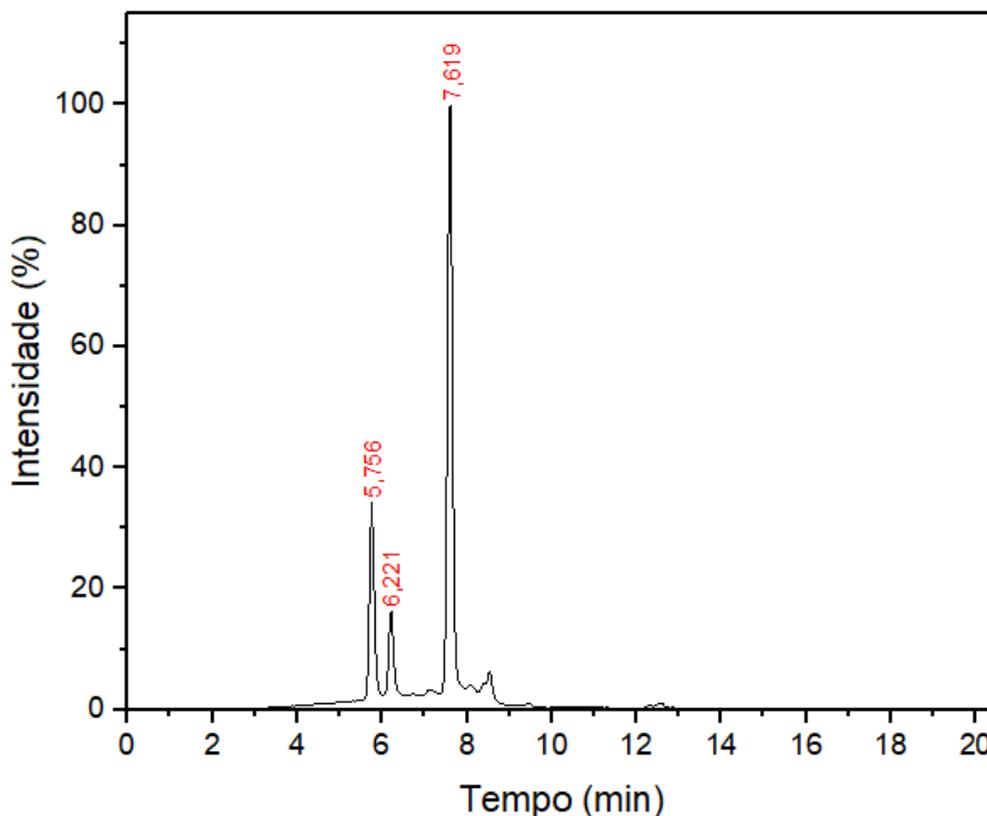
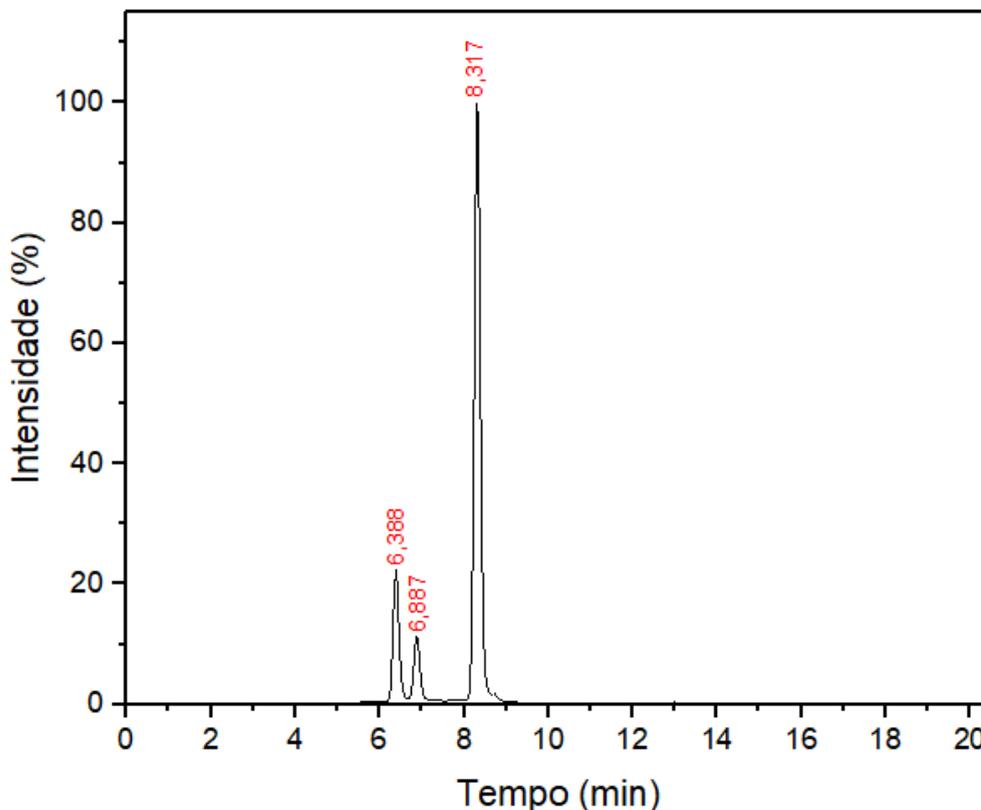


Figura 15 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido por LC-MS/MS da mistura de hormônios, utilizando o modo gradiente, com o volume de injeção de 0,280  $\mu$ L. As condições de análise utilizadas estão descritas na Tabela 3.



A Figura 16 ilustra um resultado típico da separação da mistura de hormônios obtida utilizando-se o modo isocrático. A intensidade dos picos neste cromatograma no modo isocrático foi maior do que o obtido no modo gradiente, enquanto os picos dos interferentes apresentaram menor intensidade. Além disso, ao comparar o cromatograma presente na Figura 16 como os das Figuras 14 e 15 é possível observar que houve um gradual aumento da resolução cromatográfica, ou seja, o modo isocrático ofereceu um melhor resultado para este grupo de analitos. É possível observar, ainda nas Figuras 14 e 15, o aparecimento de picos que aparecem depois da progesterona ( $t_R = 7,62$ ), decorrentes da presença de contaminantes, os quais provavelmente são provenientes dos padrões analíticos empregados.

Figura 16 - Cromatograma de Íon Total (TIC) da mistura de hormônios, obtido utilizando o método isocrático, volume de injeção de 1  $\mu\text{L}$ , fluxo de 25  $\mu\text{L}$  e proporção de fase móvel 99% de A e 1% de B.



#### 4.1.2 Considerações finais sobre a separação dos hormônios estudados

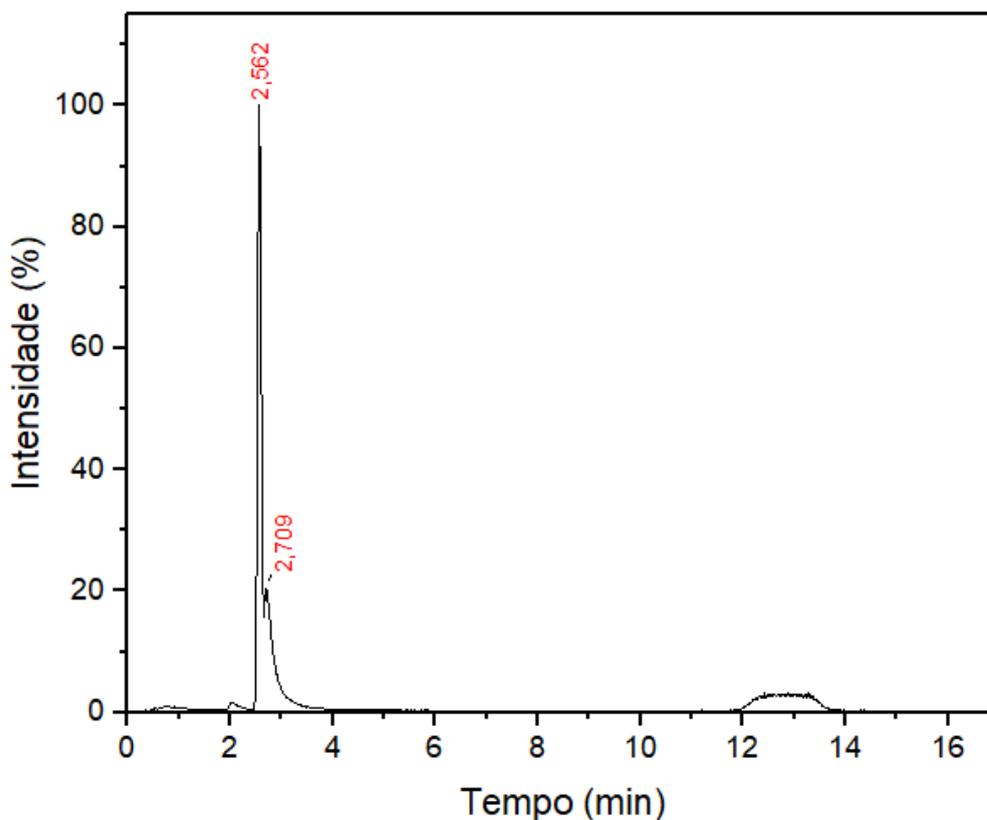
O método analítico de separação cromatográfica desenvolvido para a mistura de hormônios (estradiol, estrona e progesterona) conduziu a bons resultados, sendo possível realizar a separação dos 3 analitos em menos de 10 minutos através da técnica nanoLC-MS/MS evidenciando, assim, que a cromatografia líquida capilar é uma técnica adequada para a separação dos componentes desta classe de compostos. Deve ser observado que para esta separação empregou-se um volume de solução padrão bastante pequeno (280  $\mu\text{L}$  no modo gradiente e 1  $\mu\text{L}$  no modo isocrático) e uma quantidade ínfima de fase móvel (8  $\mu\text{L}$  no modo gradiente e 25  $\mu\text{L}$  no modo isocrático) evidenciando a relevância desta técnica para a análise de amostras biológicas onde, usualmente, a quantidade de amostra disponível é mínima.

## 4.2 Identificação e separação cromatográfica dos dipeptídeos investigados

### 4.2.1 Avaliação da separação dos padrões analíticos preparados em meio aquoso neutro

Na análise inicial não houve separação cromatográfica, ou seja, os três dipeptídeos eluíram ao mesmo tempo. Além disso, os picos interferentes apresentaram intensidade maior que aqueles oriundos dos analitos. Entretanto, ao trocar as porcentagens das fases móveis de 30% de fase orgânica e 70% de fase aquosa para 70% de fase orgânica e 30% de fase aquosa, começou-se a observar uma separação cromatográfica – o pico com tempo de retenção 2,56 minutos, referente ao TYR-GLY, e o pico com tempo de retenção 2,71 minutos referente ao GLY-TRP e ao TRP-GLY –, ainda que a resolução não tenha sido adequada, como observa-se na Figura 17. Isto ocorre porque a água é um solvente mais fraco que a acetonitrila nesse sistema, logo seu uso em maior porcentagem faz com que os analitos fiquem mais retidos.

Figura 17 - Cromatograma de Íon Total (TIC) da mistura de dipeptídeos, obtido utilizando modo isocrático, volume de injeção 0,5  $\mu\text{L}$  e fluxo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Fase móvel: 30% de água e 70% de acetonitrila, ambos acidificados em 0,1%.



Os cromatogramas das Figuras 18 e 19 foram obtidos no modo gradiente (Tabela 7 e 8, respectivamente). É possível observar-se que, ao mudar-se do modo isocrático para o gradiente, os analitos apresentaram uma melhor separação, a qual pode ser melhorada ao utilizar-se uma curva de gradiente 3 (Figura 20). Esta modificação leva a uma subida mais rápida do solvente B para a proporção pré-estabelecida do que a tradicional curva 6 (Tabela 8), sendo excepcionalmente bom para compostos que ficam muito retidos na coluna. Desta forma, o TYR-GLY é o primeiro a ser eluído ( $t_R = 2,51$  min), uma vez que o mesmo é o menos retido, sendo eluído com maior facilidade. Em seguida, com o aumento do solvente mais forte (acetonitrila), o GLY-TRP e o TRP-GLY também são eluídos, embora ainda no mesmo tempo de retenção ( $t_R = 4,6$  min).

Figura 18 - Cromatograma de Íon Total (TIC) da mistura de dipeptídeos, obtido no modo gradiente. Para as condições analíticas, veja Tabela 7.

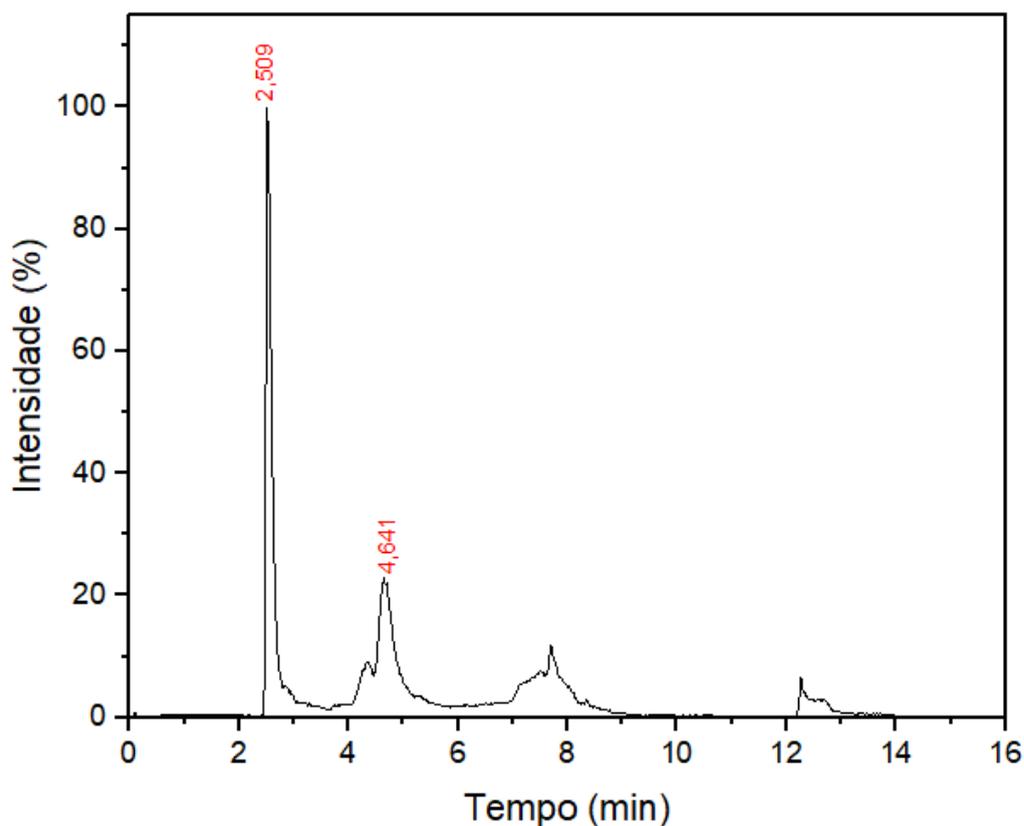


Figura 19 – Cromatograma de Íon Total (TIC) da mistura de dipeptídeos, obtido no modo gradiente utilizando a curva 3. Para as condições analíticas, veja Tabela 7.

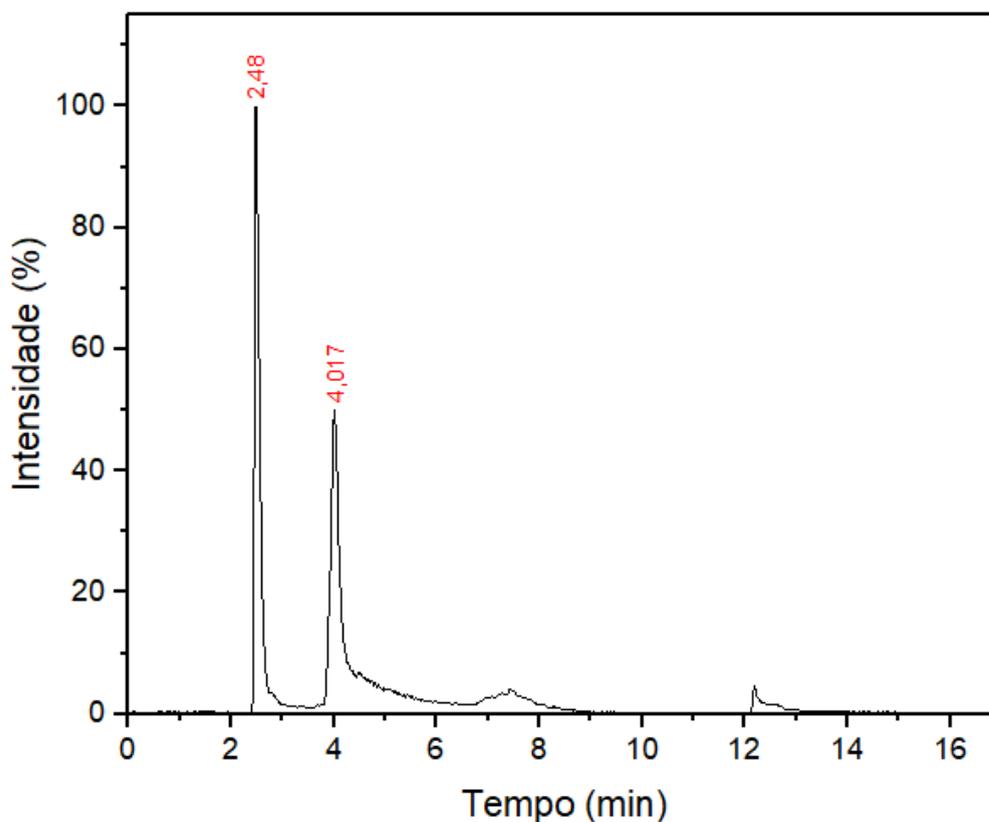
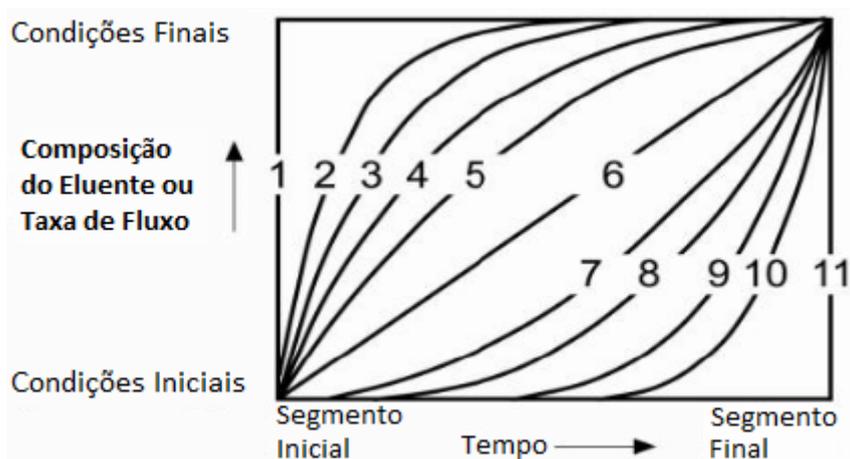


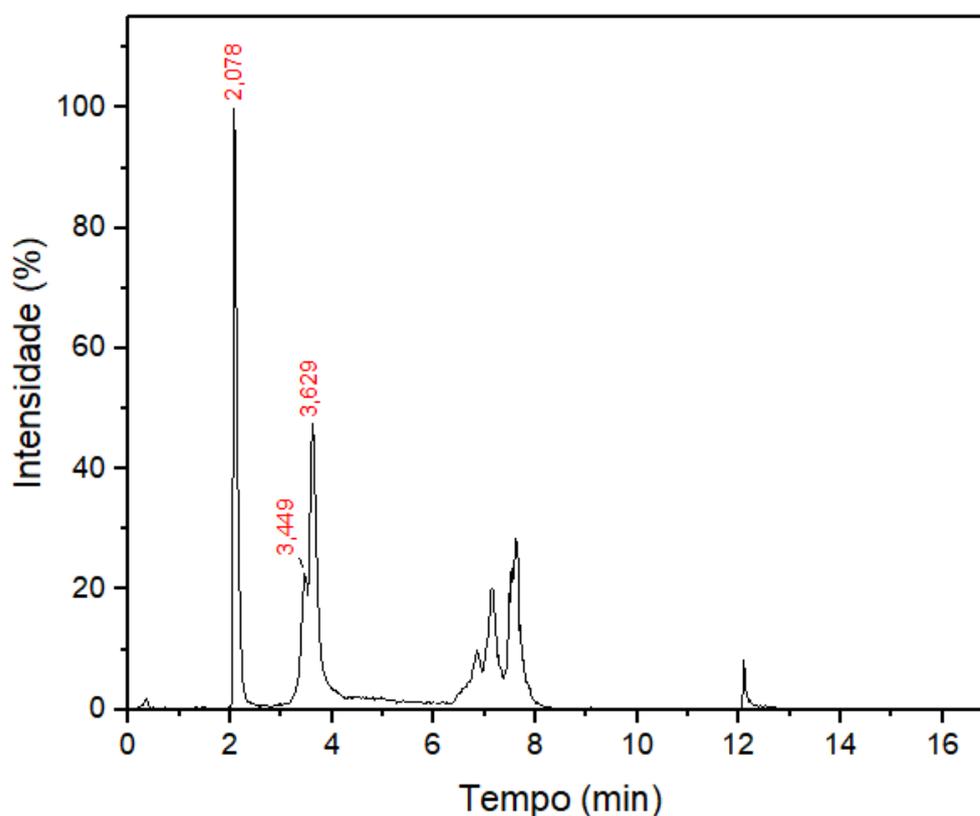
Figura 20 - Gráfico da taxa de mudança da composição do solvente e da taxa de fluxo ao longo do tempo com base no número da curva e no comprimento do segmento do gradiente. As curvas são especificadas por números e cada uma delas afeta tanto a composição do solvente quanto a taxa de fluxo.<sup>53</sup>



#### 4.2.2 Avaliação da separação dos padrões preparados em meio aquoso acidificado

A solução acidificada foi testada com a intenção de separar os dipeptídeos GLY-TRP e TRP-GLY, pois a solubilidade dos mesmos é maior em meio ácido. É possível observar na Figura 21 que a acidificação foi positiva, pois uma pequena separação entre estes dois compostos já pode ser observada no cromatograma ( $t_R$  GLY-TRP = 3,63 min;  $t_R$  TRP-GLY = 3,45 min). Esta separação seria suficiente para uma análise destes compostos via LC-MS/MS. Observa-se ainda no cromatograma a presença de vários contaminantes decorrentes de impurezas nos padrões analíticos empregados.

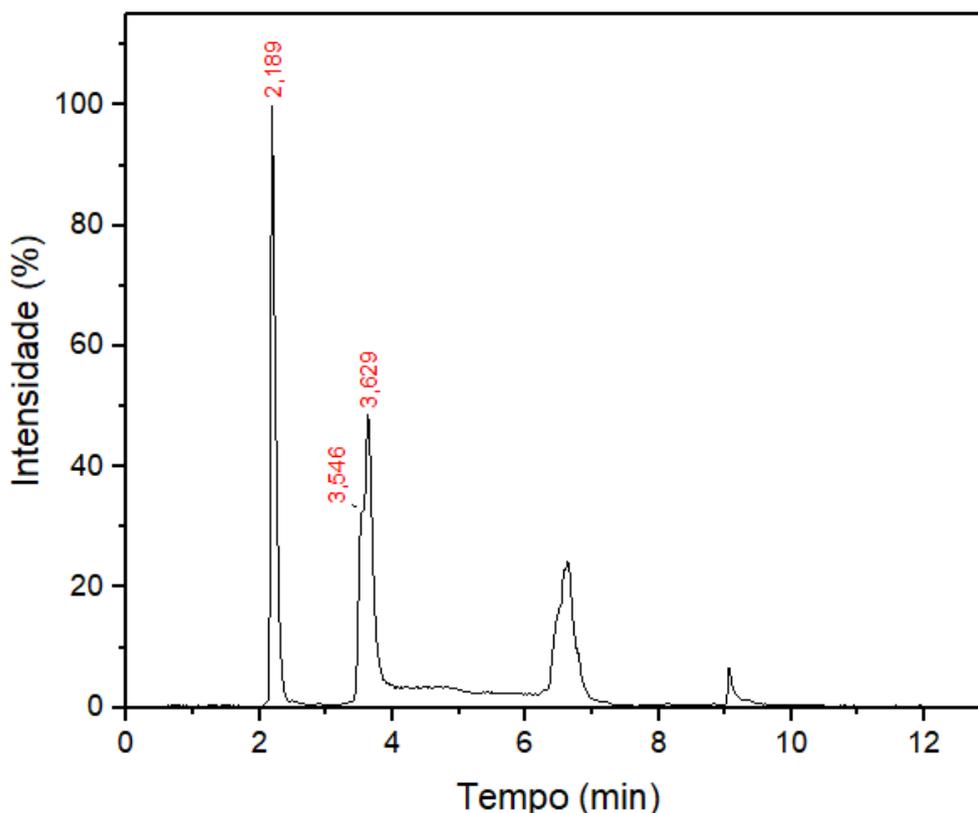
Figura 21 – Cromatograma de Íon Total (TIC) da mistura de dipeptídeos, obtido pela análise da solução acidificada. ( $t_R$  TRP-GLY = 3,45 min;  $t_R$  GLY-TRP = 3,63 min). Para demais condições analíticas, veja Tabela 8.



Uma vez que os analitos estavam sendo eluídos no início da corrida (entre 3 e 4 minutos), avaliou-se o efeito de uma mudança do gradiente. Os experimentos foram semelhantes ao anterior, entretanto com uma redução no tempo de corrida, o que foi obtido sem alterar a proporção do solvente ou demais condições da análise, mudando-se apenas a rampa do gradiente, tornando, assim, o tempo de análise mais curto. (Figura 22). No entanto,

como esperado, é possível observar-se que a redução de tempo diminuiu a separação dos dipeptídeos GLY-TRP ( $t_R = 3,55$  min) e TRP-GLY ( $t_R = 3,63$  min) e aumentou a intensidade dos interferentes. Esse resultado é atribuído ao fato de, ao diminuir-se o tempo de corrida, os analitos ficam menos tempo retidos na coluna, levando a uma piora da separação cromatográfica.

Figura 22 - Cromatograma de Íon Total (TIC) da mistura de dipeptídeos, obtido com tempo de corrida reduzido a 12.

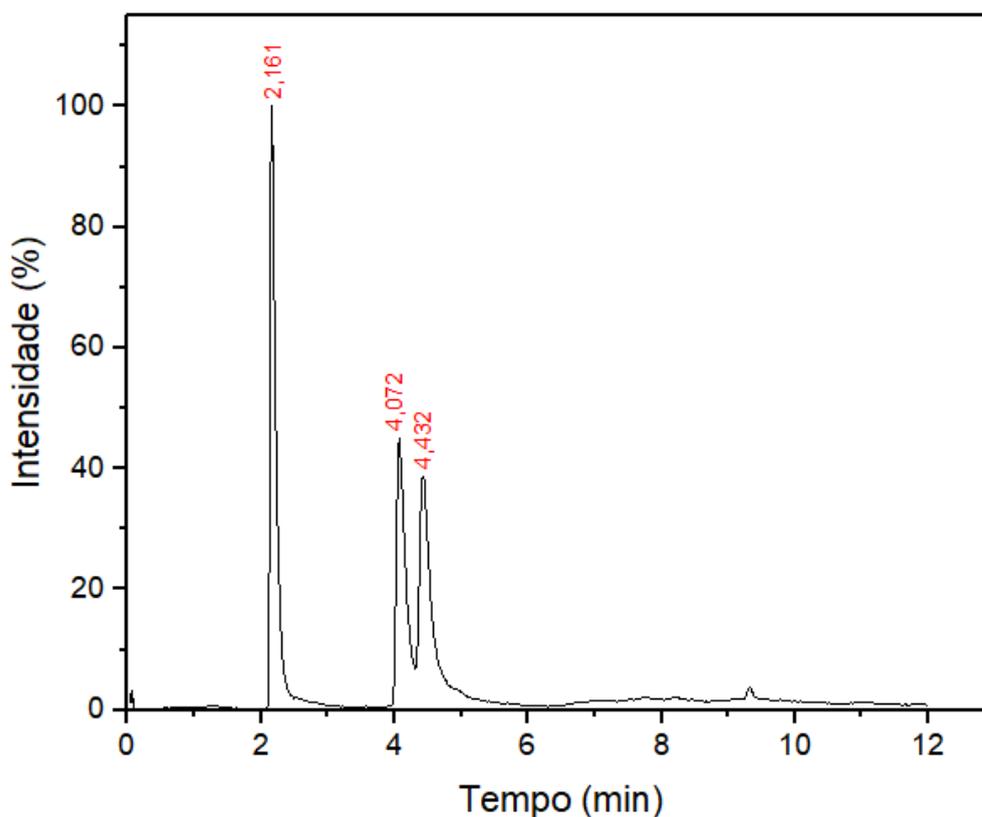


#### 4.2.3 Avaliação da separação cromatográfica utilizando metanol como fase móvel

A troca da acetonitrila acidificada em 0,1% por metanol 100% como fase móvel foi favorável para a separação. Isto pode ser observado no cromatograma presente na Figura 23, no qual é possível observar-se que os três dipeptídeos estão cromatograficamente separados. O uso do metanol, o qual é um solvente mais fraco neste sistema do que a acetonitrila, e mais forte que a água, possibilitou que a separação do GLY-TRP e o TRP-GLY ocorresse, cujos picos cromatográficos estavam se sobrepondo nos experimentos anteriores. Assim, os tempos de retenção desses dipeptídeos neste sistema de eluente são diferentes, levando ao surgimento de dois picos cromatográficos com  $t_R = 4,07$  e  $4,43$ , referentes ao TRP-GLY e ao GLY-TRP,

respectivamente. Apesar da resolução cromatográfica ainda não ser ótima, para efeito dos objetivos desta etapa do trabalho foi suficiente, uma vez que o sistema de detecção empregado (ESI-MS/MS) é capaz de diferenciar os compostos de interesse através de suas transições m/z características.

Figura 23 – Cromatograma de Íon Total (TIC) da mistura de dipeptídeos, obtido usando metanol como fase móvel. Para as demais condições, veja Tabela 9.



#### 4.2.4 Utilização do sistema de extração de amostra sólida automatizado

As análises realizadas utilizando o sistema de amostra sólida automatizado, não apresentou, ainda, os resultados esperados, uma vez que não houve a presença do sinal analítico dos picos cromatográficos, impossibilitando a detecção dos compostos de interesse. Isto pode ser atribuído ao fato da fortificação ter sido realizada em solução aquosa; o que evitou que a amostra secasse efetivamente, podendo ter alterado o resultado. Para a continuidade do trabalho sugere-se que a solução para a fortificação deva ser preparada em um solvente orgânico e volátil como, por exemplo, metanol ou acetonitrila. Uma vez que não foi possível identificar nenhum dos di-peptídeos pelo MRM, pode-se concluir que nenhuma

transição foi conclusiva, mostrando a necessidade de uma otimização do método antes de prosseguir o estudo.

#### **4.2.5 Considerações finais sobre a análise dos dipeptídeos estudados**

O método analítico de separação cromatográfica desenvolvido para a mistura de dipeptídeos (TYR-GLY, GLY-TRP e TRP-GLY) conduziu a bons resultados, sendo possível realizar a separação dos 3 analitos em um tempo curto de análise. A fase móvel orgânica composta por metanol se mostrou mais adequada para a análise desta classe de compostos do que a acetonitrila 0,1% acidificada; a troca da fase móvel permitiu que os analitos GLY-TRP e TRP-GLY fossem separados cromatograficamente. Os bons resultados obtidos evidenciaram que a cromatografia líquida capilar é uma técnica que se adequa a esta classe de compostos.

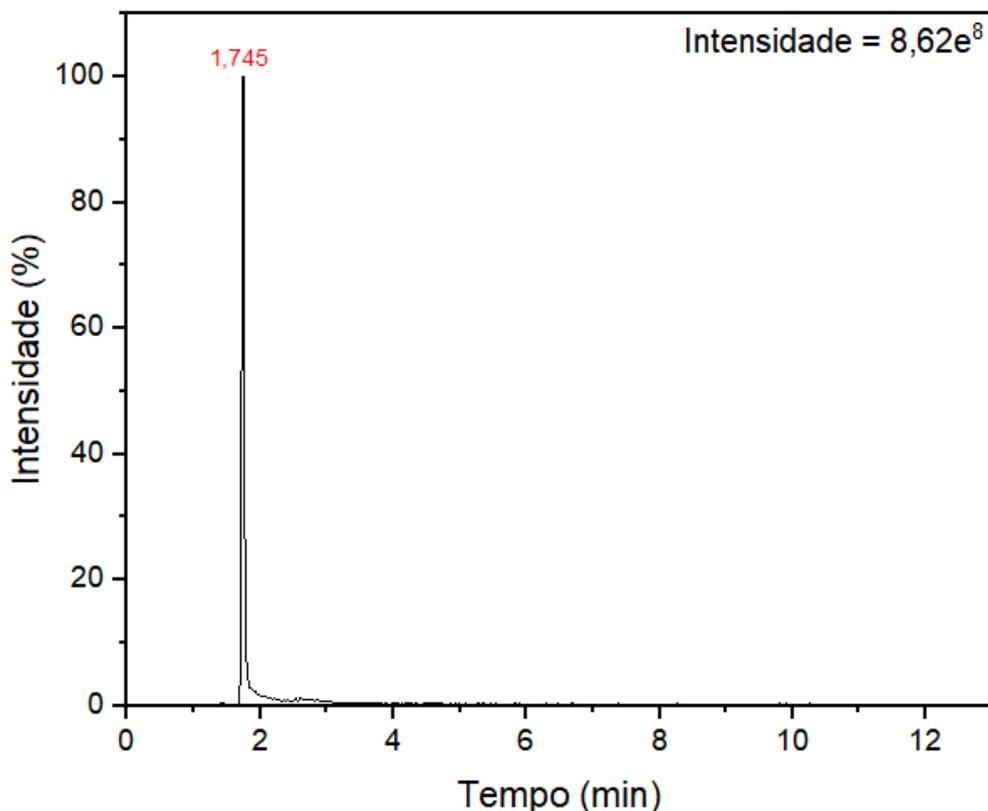
A técnica de automatização do preparo de amostras através do sistema *Trap Valve Manager*, no entanto, não levou ainda a bons resultados. Isto pode ter sido devido ao meio no qual os padrões foram preparados, pois como foram preparados em água e não em solvente volátil a amostra não secou rápido o suficiente para ser depositada no cartucho de forma efetiva, fazendo com que parte da amostra e, conseqüentemente, dos analitos fossem perdidos. Outro fator importante é a complexidade da amostra de solo, sendo necessários mais estudos para eliminação dos interferentes endógenos os quais podem interferir na análise por LC-MS/MS.

### **4.3 Determinação de cafeína em pó de café utilizando o sistema *Trap Valve Manager***

#### **4.3.1 Avaliação da extração da cafeína sem incorporar uma coluna extratora aos sistema *Trap Valve Manager***

Os primeiros resultados obtidos mostraram um pico correspondente à cafeína ( $t_R = 1,745$ ) bastante intenso no cromatograma ( $8,62e^8$ ), como esperado, pois o pó de café possui um teor de cafeína bastante elevado. Um cromatograma típico resultante está representado na Figura 24.

Figura 24 - Cromatograma de Íon Total (TIC) de uma amostra de cafeína em pó de café, obtido com o modo isocrático (75% A e 25% B) e trapping de 5 minutos (95% A e 5% B). As condições experimentais encontram-se nas Tabelas 10 e 11.



Na tentativa de diminuir-se a intensidade do pico no cromatograma, aumentou-se a porcentagem de fase aquosa no início do *trapping*; assim, pretendia-se que menos cafeína chegasse até a coluna analítica. Porém, como pode ser observado na Figura 25, a intensidade do pico no cromatograma obtido - embora menor - ainda foi bastante alta ( $1,48e^7$ ). Além disso, nota-se um aumento significativo no sinal do ruído.

Para tentar reduzir o nível do ruído e manter a intensidade do pico correspondente à cafeína menor, foram feitos novos experimentos mantendo-se a proporção da fase móvel do *trapping* do teste anterior e aumentando-se a proporção da fase aquosa da etapa analítica de 75% para 85%. O resultado obtido pode ser observado na Figura 26, onde é possível notar-se um pequeno aumento na intensidade ( $1,48e^7$  para  $7,90e^7$ ), e diminuição do ruído.

Figura 25 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (75% A e 25% B) e trapping de 5 minutos e maior porcentagem de fase aquosa no início (99% A e 1% B).

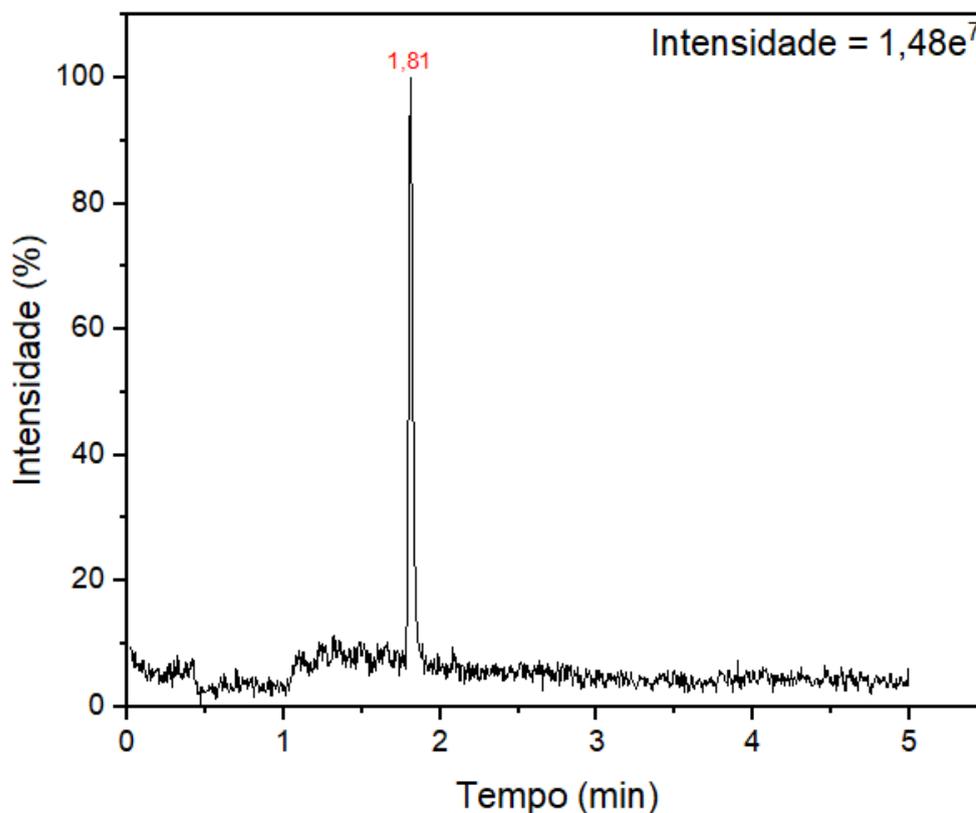
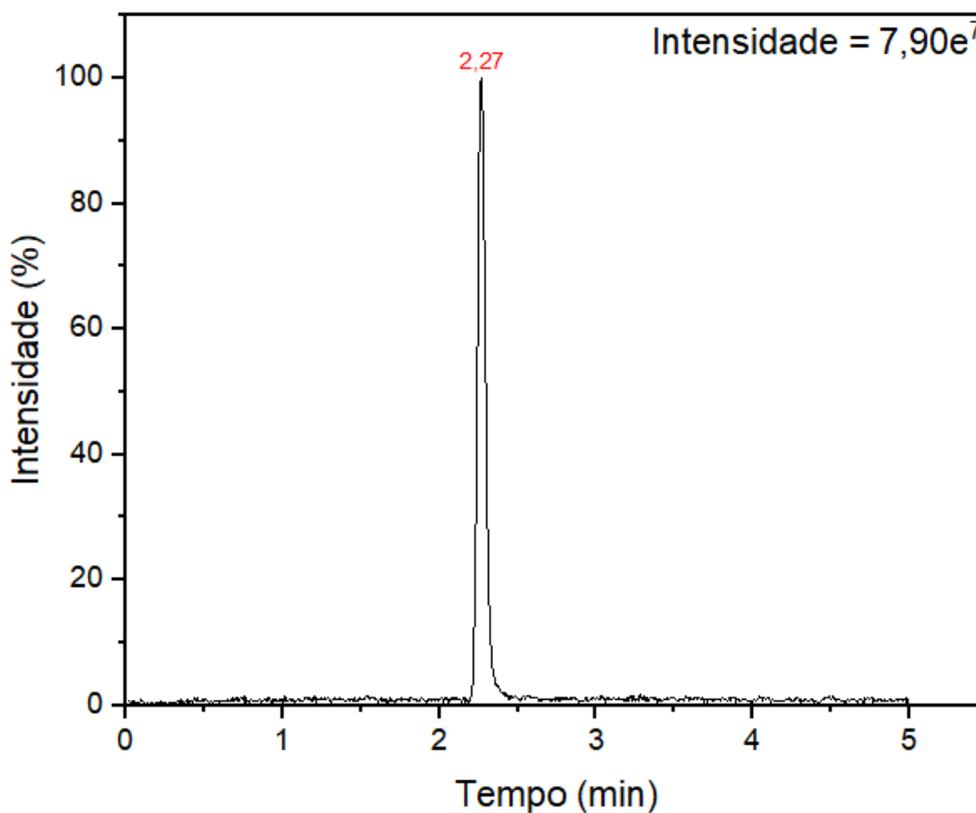
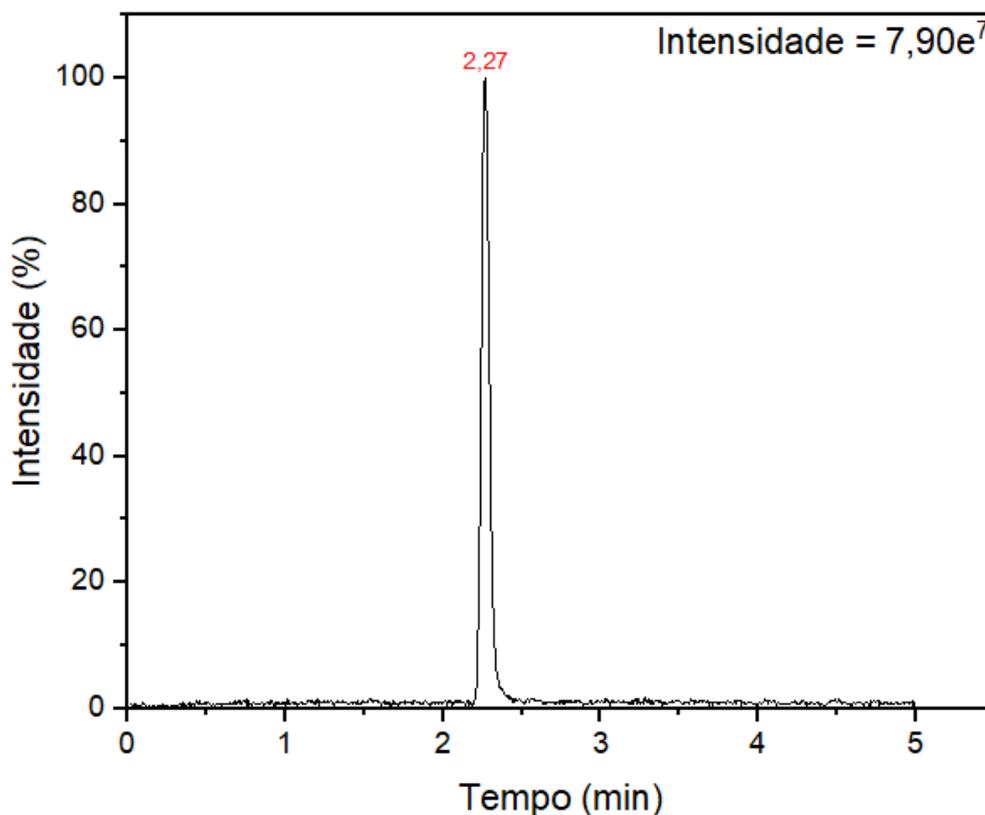


Figura 26 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (85% A e 15% B) e trapping de 5 minutos e maior porcentagem de fase aquosa no início (99% A e 1% B).



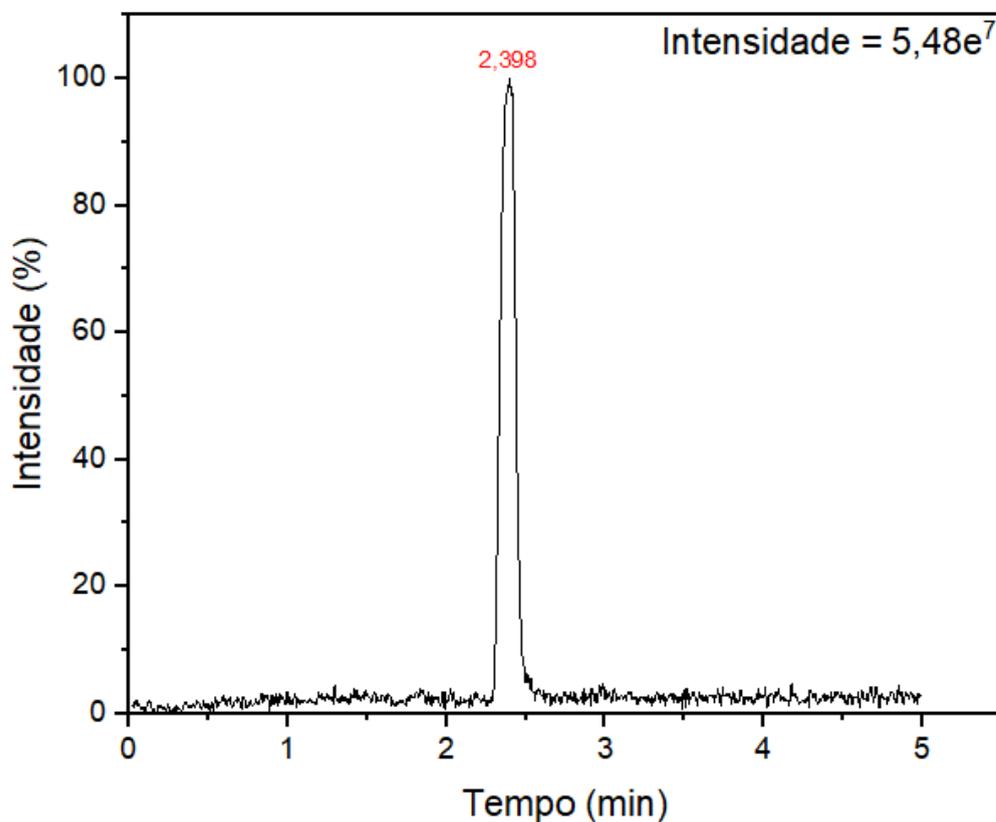
Para tentar diminuir o nível do ruído e manter a intensidade do pico correspondente à cafeína menor, foram feitos novos experimentos mantendo-se a proporção da fase móvel do *trapping* do teste anterior e aumentando-se a proporção da fase aquosa da etapa analítica de 75% para 85%. O resultado obtido pode ser observado na Figura 26, onde é possível notar-se um pequeno aumento na intensidade ( $1,48e^7$  para  $7,90e^7$ ), e diminuição do ruído.

Figura 26 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (85% A e 15% B) e trapping de 5 minutos e maior porcentagem de fase aquosa no início (99% A e 1% B).



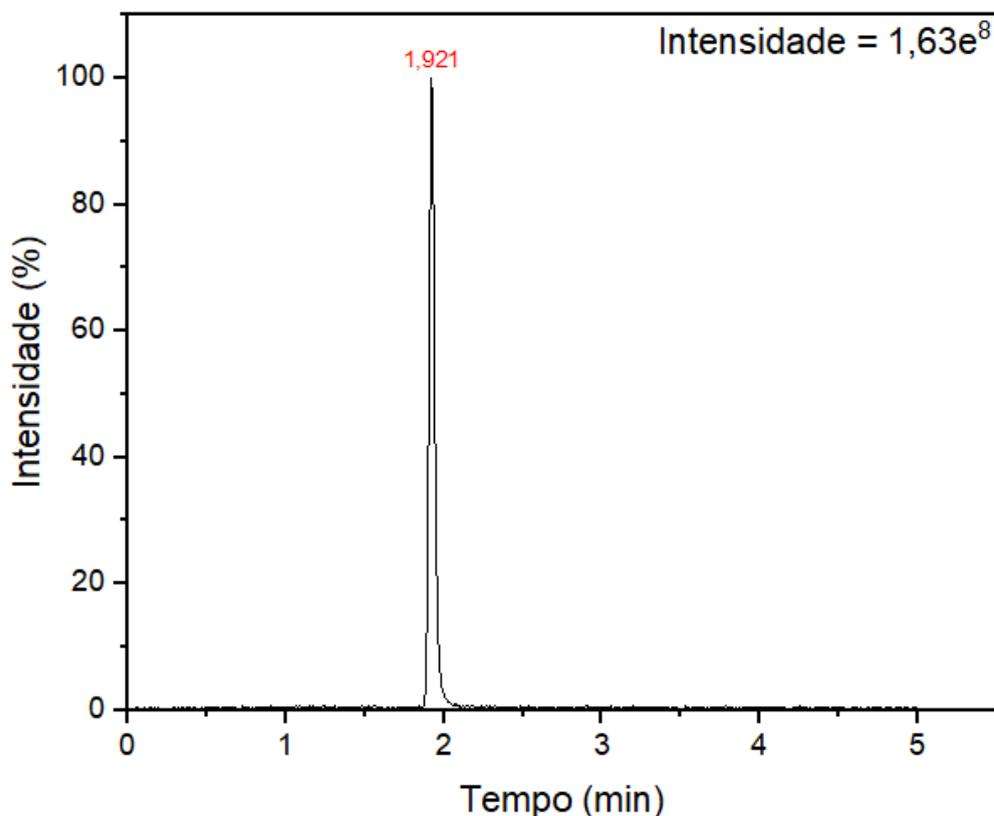
Novos experimentos foram realizados mantendo-se a proporção da fase móvel de 85% de A e 15% de B, e alterando-se as proporções do *trapping* para 95% de A e 5% de B (Figura 27). Desta forma, esperava-se que parte da cafeína fosse perdida na etapa de extração, de modo a reduzir a intensidade do sinal, já que menos analito seria encaminhado para a coluna analítica. Embora a intensidade do sinal para a cafeína tenha se mostrado menor do que o verificado no experimento anterior ( $5,48e^7$ ), observa-se um discreto alargamento da banda da cafeína devido ao uso em maior quantidade do solvente mais polar na etapa de extração; houve também um aumento do ruído na linha de base, uma vez que diminuiu-se a relação sinal-ruído.

Figura 27 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (85% A e 15% B) e trapping de 5 minutos (95% A e 5% B).



Novas modificações nas condições experimentais foram efetuadas, com alteração da proporção de fase móvel da etapa analítica para 80% de A e 20% de B e, para o início do *trapping*, 99% de A e 1% de B (Figura 28). Embora estas tenham sido as condições experimentais que geraram o cromatograma com o pico da cafeína mais estreito e com o menor ruído da linha de base, foi também o de maior intensidade do sinal analítico ( $1,63e^8$ ).

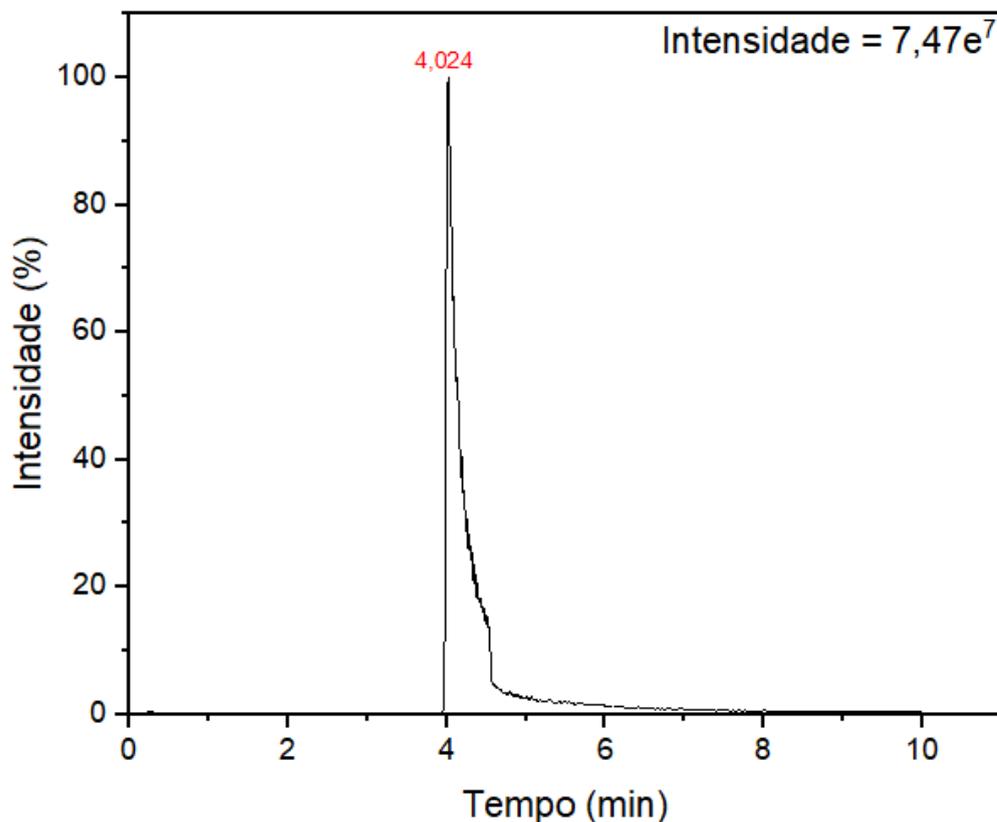
Figura 28 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (80% A e 20% B) e trapping de 5 minutos e maior porcentagem de fase aquosa no início (99% A e 1% B).



#### 4.3.2 Avaliação da extração da cafeína incorporando uma coluna de extração ao sistema *Trap Valve Manager*

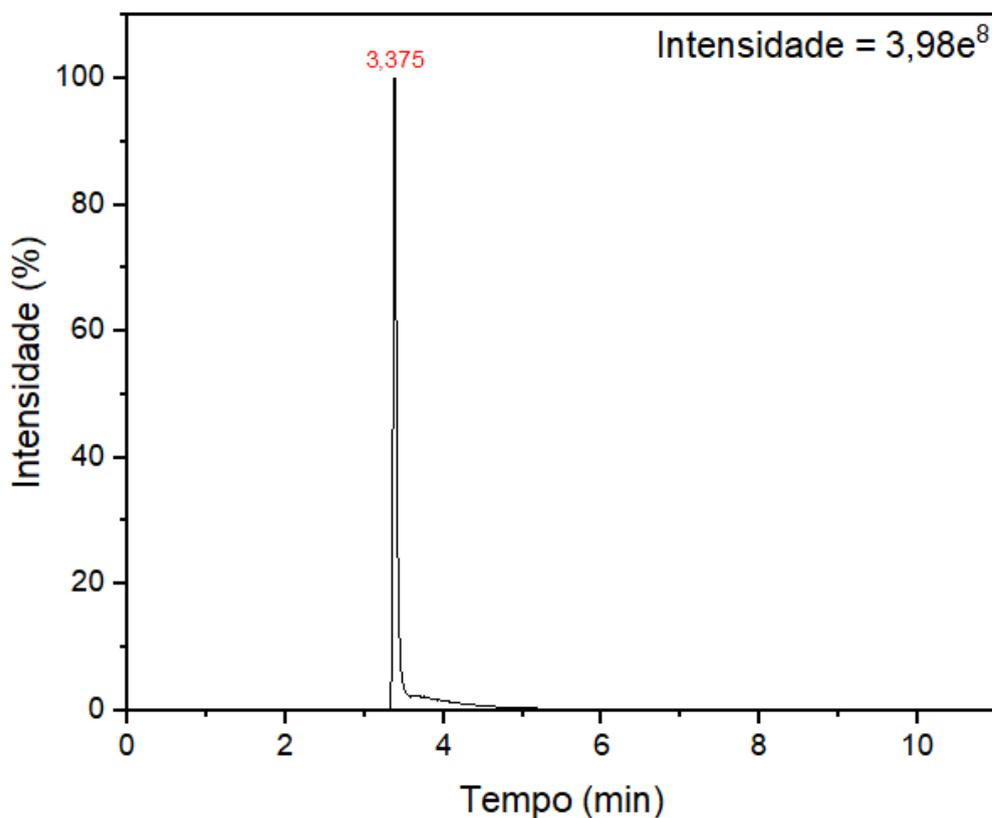
A próxima etapa foi a incorporação de uma coluna de grafeno, preparada no laboratório, com o objetivo de pré concentrar a cafeína na mesma e, desta forma, reduzir a intensidade do cromatograma através do controle da quantidade de cafeína que seria direcionada para a coluna analítica por meio do controle do tempo. Para tanto, utilizou-se as proporções de fase móvel de 75% de A e 25% de B para a etapa analítica e 95% de A e 5% de B para o início do *trapping*, cujo tempo total foi de 4 minutos. O cromatograma obtido, representado na Figura 29, apresentou uma cauda no pico, pois o analito pré concentrado foi continuamente encaminhado para a coluna analítica. Além disso, a intensidade do pico analítico ( $7,47e^7$ ) não diferiu muito daquelas provenientes dos cromatogramas de mais baixa intensidade resultantes do conjunto de testes anterior.

Figura 29 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (75% A e 25% B) e trapping de 4 minutos (95% A e 5% B), utilizando uma coluna de grafeno.



Foram então alteradas as condições experimentais, mantendo-se as proporções de fase móvel da etapa analítica e alterando-se a proporção da fase móvel da etapa de *trapping* para 95% de A e 5% de B, além disso reduziu-se o tempo da etapa de *trapping* para 3 minutos. O resultado, representado na Figura 30, foi uma diminuição considerável da cauda do pico da cafeína, em relação ao experimento anterior (Figura 29), já que a fase móvel ficou por um tempo menor encaminhando os analitos retidos na coluna de extração para a coluna analítica, ou seja, retirando uma menor quantidade de analito, porém com a intensidade foi ainda maior ( $3,98e^8$ ).

Figura 30 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (75% A e 25% B) e trapping de 3 minutos (95% A e 5% B), utilizando uma coluna de grafeno.



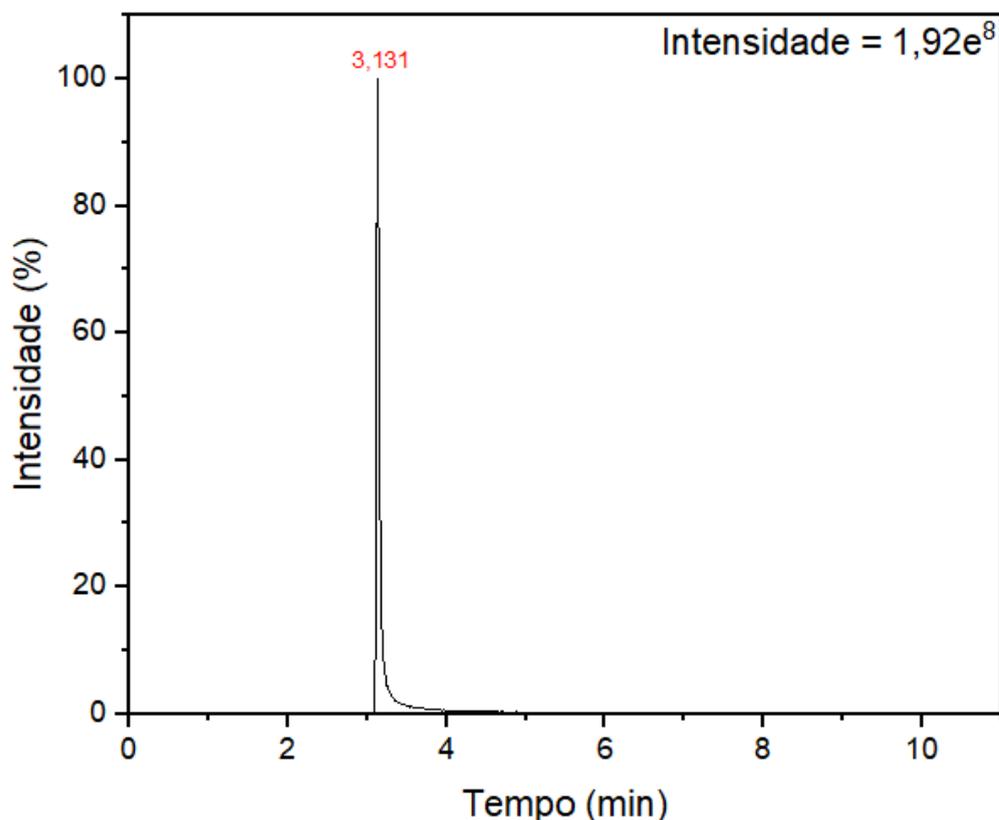
Alterou-se, então, a proporção de fase móvel da etapa de *trapping* para 99% de A e 1% de B e, como resultado, foi possível diminuir um pouco da intensidade do pico cromatográfico ( $1,50e^8$ ). No entanto, ao alterar as proporções de fase móvel para 70% de A e 30% de B para a etapa analítica e 95% de A e 5% de B para a etapa de *trapping*, a intensidade do pico cromatográfico obtido foi maior que o anterior ( $4,32e^8$ ).

#### 4.3.3 Avaliação da extração da cafeína reduzindo a massa de amostra sólida utilizada no sistema *Trap Valve Manager*

Uma vez que a intensidade dos cromatogramas obtidos com o conjunto de experimentos descritos anteriormente não só estavam apresentando intensidades ainda bastante elevadas para o pico correspondente à cafeína como, também, as alterações realizadas estavam resultando em mudanças não muito significativas, diminuiu-se a quantidade de amostra utilizada para 0,3 mg. As primeiras avaliações com esta nova quantidade de amostra foram feitas sob as mesmas condições cromatográficas utilizadas no teste anterior, cujo cromatograma obtido foi representado na Figura 37. O cromatograma

obtido nas novas condições, representado na Figura 31, apresentou uma intensidade de sinal ainda bastante alta ( $1,92e^8$ ).

Figura 31 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (70% A e 30% B) e trapping de 3 minutos (95% A e 5% B), utilizando uma coluna de grafeno e 0,3 mg de café.



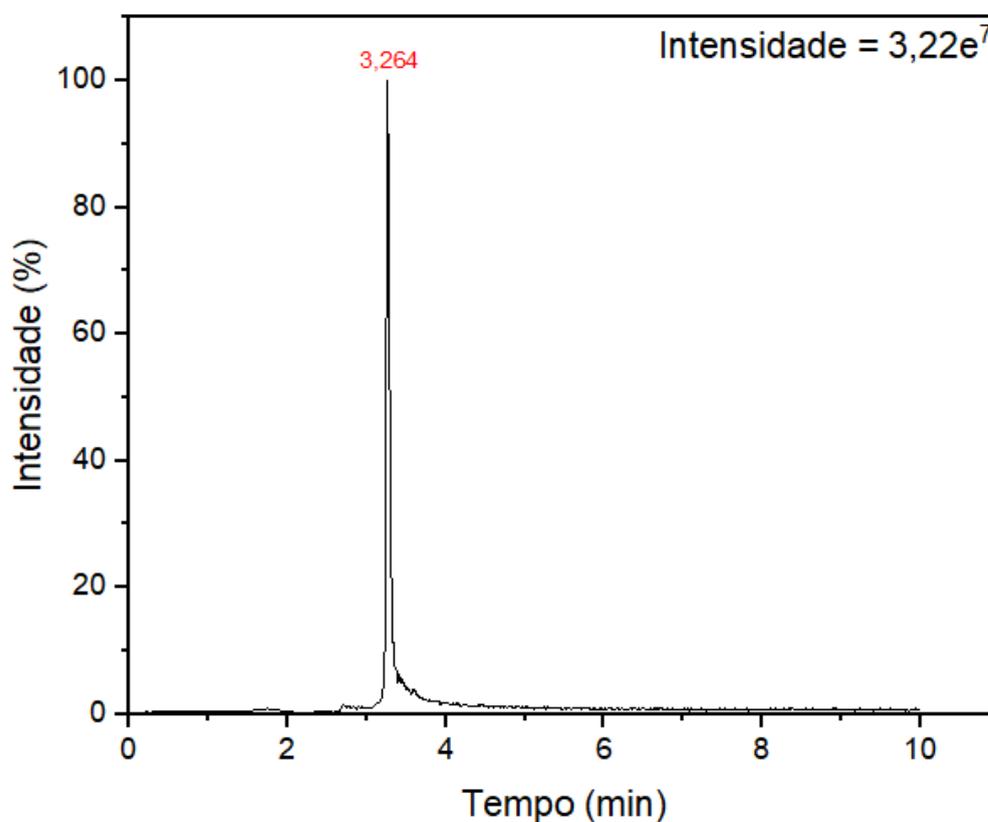
Ainda com o objetivo de tentar reduzir a intensidade do sinal do cromatograma obtido, variou-se o tempo em que a fase móvel passa pela coluna de grafeno para 0,5 minuto e depois para 0,1 minuto. Em ambos os casos não se obteve um bom resultado, pois a intensidade dos picos correspondentes à cafeína ainda foram bastante pronunciados:  $8,44e^8$  para o tempo de 0,5 min e  $2,50e^7$  para o tempo de 0,1 min.

#### **4.3.4 Avaliação da extração da cafeína empregando pó de café descafeinado como amostra sólida utilizada no sistema *Trap Valve Manager***

Como tanto a redução de massa de pó de café utilizado como a redução de tempo em que a fase móvel passava pela coluna de grafeno não surtiram o efeito desejado, foram feitos novos estudos substituindo o pó de café por pó de café descafeinado. Nos experimentos

utilizando-se pó de café descafeinado como amostra, foi utilizado um fluxo na etapa de *trapping* de 8  $\mu\text{L}/\text{min}$ , mantendo-se a proporção de fase móvel da etapa analítica de 70% de A e 30% de B e alterando-se a proporção de fase móvel da etapa de *trapping* para 99% de A e 1% de B. Como resultado o cromatograma típico obtido, representado na Figura 32, apresentou uma intensidade um pouco menor, porém ainda bastante alta ( $3,22e^7$ ).

Figura 32 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo isocrático (70% A e 30% B) e *trapping* de 3 minutos (99% A e 1% B) a um fluxo de 8  $\mu\text{L}/\text{min}$  na etapa de *trapping*, utilizando uma coluna de grafeno e 0,3 mg de pó de café descafeinado.

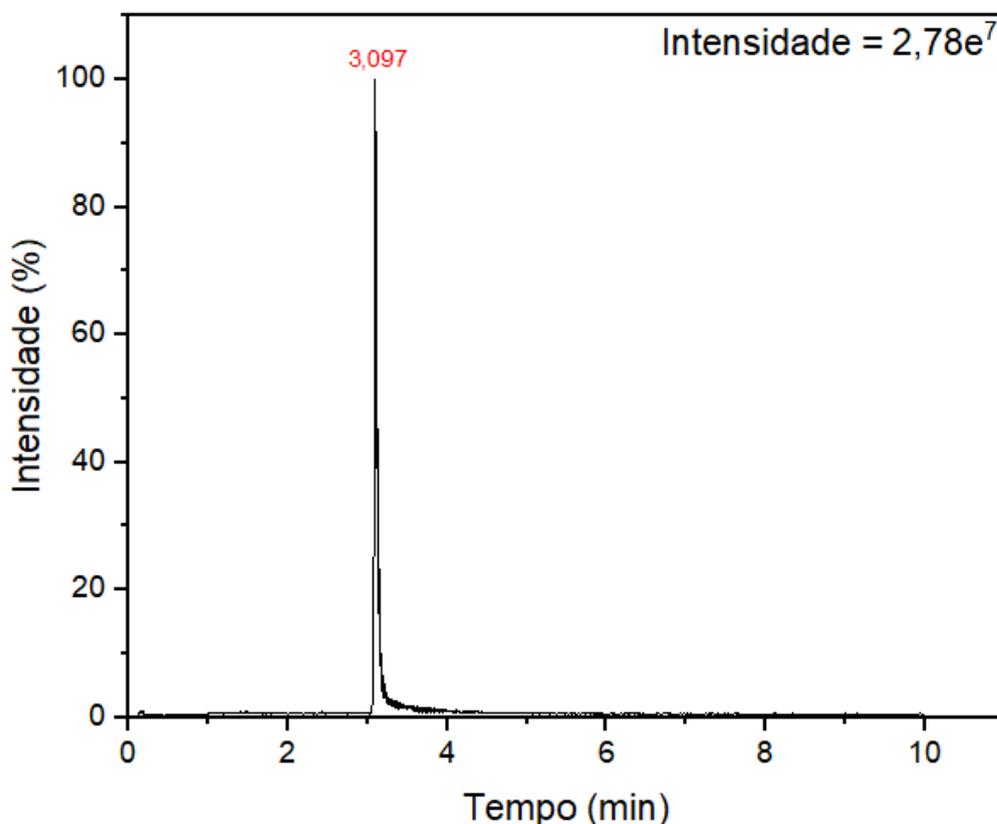


O fluxo na etapa de *trapping* foi então alterado para 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ , o que reduziu consideravelmente a intensidade do cromatograma, resultado atribuído ao fato de parte do analito ser descartada na etapa inicial do *trapping*. No entanto, observou-se que não estava havendo reprodutibilidade no método, uma vez que diferentes corridas feitas sob as mesmas condições cromatográficas apresentaram intensidades e áreas bastantes distintas (intensidade de  $2,45e^6$  e área 177676 para a mais intenso e intensidade de  $8,76e^5$  e área de 50207 para o menos intenso).

Realizou-se então uma nova avaliação com a proporção de fase móvel de 95% de A e 5% no início do *trapping*, com o objetivo de que menos analito fosse perdido nesta etapa de umidificação da fase sólida. No entanto, os cromatogramas obtidos nas mesmas condições cromatográficas ainda apresentaram uma grande discrepância na intensidade e área, sendo intensidade de  $1,54e^7$  e área de 810766 para o cromatograma mais intenso e  $1,64e^6$  e área de 75717 para o menos intenso.

Uma nova alteração foi realizada no modo de eluição da fase móvel, de modo isocrático para modo gradiente de eluição. Um resultado típico obtido é ilustrado na Figura 33. Não houve mudanças significativas no cromatograma resultado.

Figura 33 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido com o modo gradiente e trapping de 3 minutos (95% A e 5% B) a um fluxo de  $30 \mu\text{L}/\text{min}$ , utilizando uma coluna de grafeno e 0,3 mg de pó de café descafeinado.



#### 4.3.5 Avaliação da extração da cafeína aumentando-se a massa de pó de café descafeinado empregado como amostra sólida utilizada no sistema *Trap Valve Manager*

Uma nova tentativa de obter-se reprodutibilidade nos ensaios realizados com esse sistema foi feita. Para tanto, alterou-se a massa da amostra para 1 mg, pois deduziu-se que o

motivo para a discrepância da intensidade dos analitos estava associada a erros advindos da dificuldade em se pesar, de forma extremamente reprodutível, uma massa muito pequena (0,3 mg). Novamente o modo gradiente foi usado para a etapa analítica. Contudo, ainda observou-se uma discrepância significativa na intensidade e áreas dos cromatogramas obtidos sob as mesmas condições analíticas, ( $7,80e^7$  de intensidade e 3495338 de área contra  $2,05e^7$  de intensidade e 903423 de área).

Aumentou-se, então, o tempo da etapa de *trapping* para 10 minutos, na tentativa de, com um maior tempo de *trapping* a quantidade de analito retirada da amostra fosse mais homogênea e, conseqüentemente, os testes mais reprodutíveis. Os resultados se mostraram, no entanto, ainda bastante discrepantes, sendo intensidade de  $1,27e^8$  e área de 5689579 para o mais intenso e intensidade de  $3,63e^7$  e área de 2655739 para o menos intenso.

Adicionalmente, alterou-se o fluxo da etapa de *trapping* para 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ , com a intenção de avaliar-se a possibilidade de obter-se intensidades menores para o pico da cafeína e, também, valores mais reprodutíveis. Porém a intensidade manteve-se alta e as discrepâncias permaneceram - intensidade de  $9,38e^7$  e área de 3892443 para o mais intenso e intensidade de  $5,06e^7$  e área de 2213459 para o menos intenso.

Para fins de comparação, foi feito também avaliado o fluxo de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  na etapa de *trapping*, o que resultou em uma intensidade ainda mais elevada que a anterior ( $1,11e^8$ ).

#### **4.3.6 Considerações finais sobre a análise de cafeína em amostra sólida**

As análises feitas com pó de café não trouxeram bons resultados; como o café tem uma quantidade muito alta de cafeína e, além disso, a cafeína é muito solúvel, quantidades muito altas de analito são extraídas ao utilizar o sistema com o cartucho para amostras sólidas. Além disso, pode-se concluir que este sistema traz dificuldades para reprodutibilidade dos testes, uma vez que não apenas quantidades diferentes de analito são extraídas de cada vez como, também, parte do analito é descartado ao fazer a etapa de ativação da fase sortiva do cartucho, não havendo, ainda, um controle exato de suas quantidades.

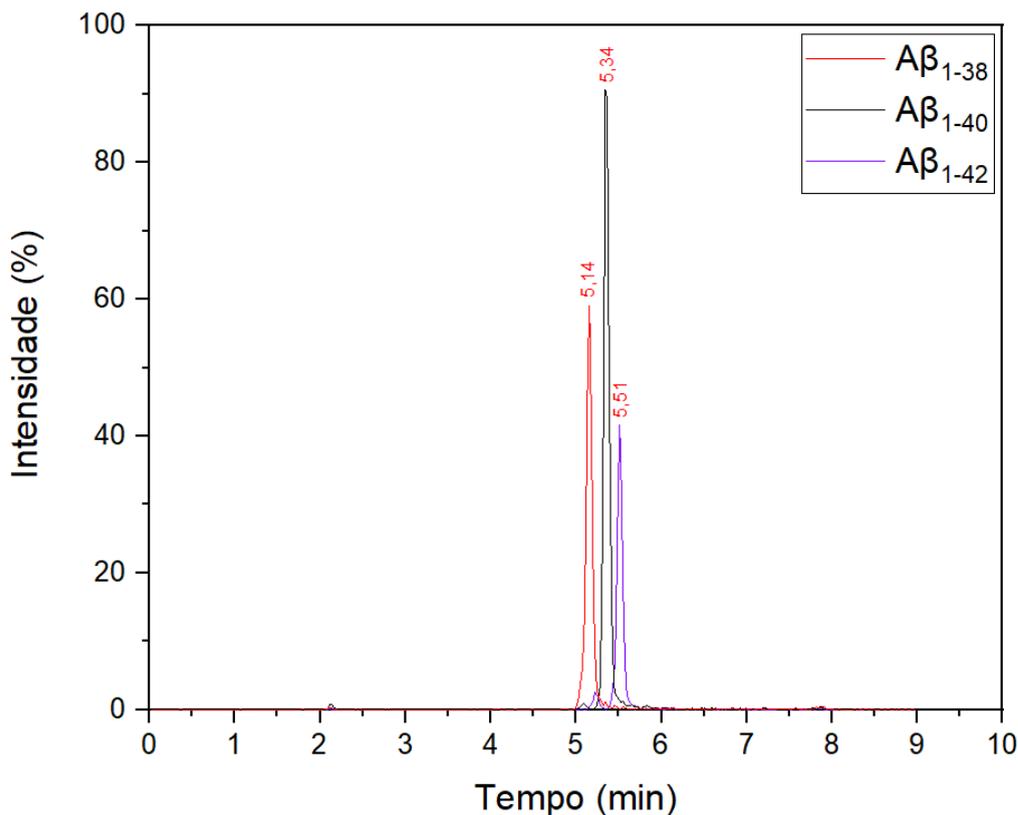
### **4.4 Avaliação da separação cromatográfica dos $\beta$ -amilóides**

#### **4.4.1 Seleção dos parâmetros cromatográficos e de espectrometria de massas**

O cromatograma de íon total (TIC) obtido no primeiro conjunto de experimentos está representado na Figura 34, sendo que os tempos de retenção 5,14; 5,34; e 5,51 referem-se,

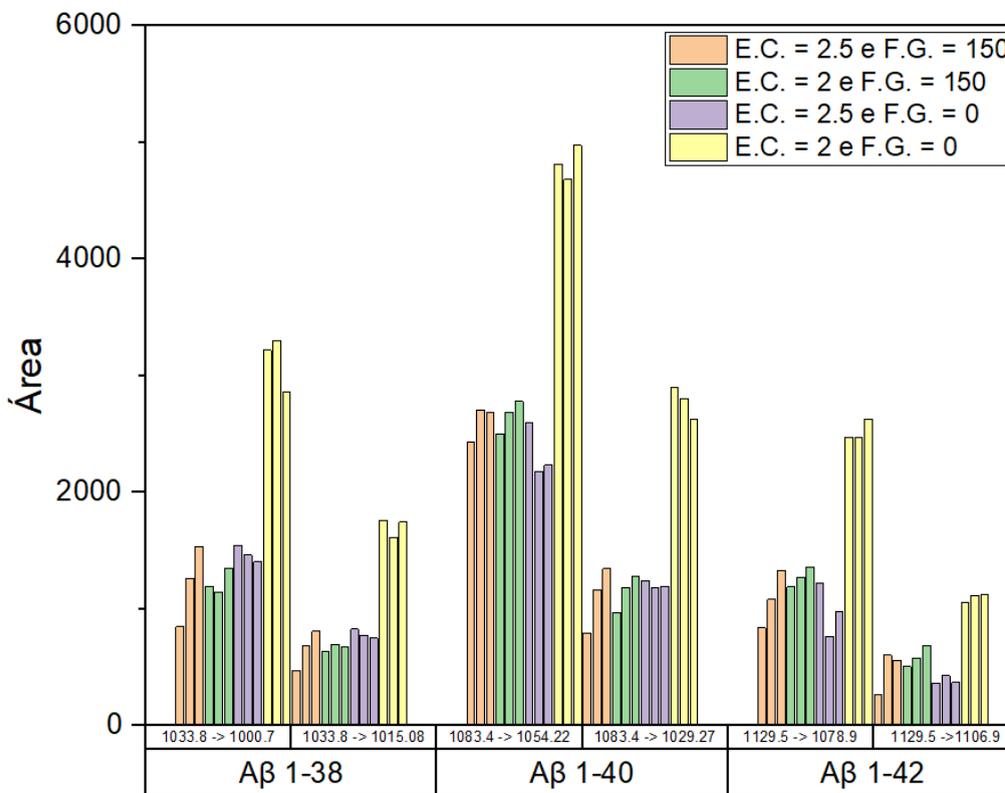
respectivamente, aos analitos  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ . É possível observar-se, nitidamente, a separação cromatográfica existente entre os picos. No entanto, ainda que os tempos de retenção fossem mais próximos, ou mesmo idênticos – que não é o caso - a análise qualitativa e quantitativa poderia ser executada através dos MRMs, prerrogativa do uso de um sistema LC-MS/MS.

Figura 34 - Cromatograma de Íon Total (TIC) obtido utilizando-se os parâmetros descritos na Tabela 27 e 28.



A Figura 35 apresenta uma comparação entre as áreas dos picos cromatográficos de cada transição para cada analito obtido - para cada par de energia do capilar (E.C.) e fluxo do gás reagente (F.G.) - empregado nos estudos de dissociação dos íons precursores através das colisões com o gás reagente (CID – *Collision-Induced Dissociation*). Os valores das áreas quando a energia de capilar e fluxo de gás foi 2 e 0, respectivamente, foi significativamente maior para ambas as transições de todos os analitos e, portanto, foi o utilizado para os experimentos posteriores.

Figura 35 - Comparação das áreas obtidas para cada par de energia de colisão e fluxo de gás testado. Em laranja as áreas obtidas para E.C. = 2,5 e F.G. = 150; em verde as áreas obtidas para E.C. = 2 e F.G. = 150; em roxo as áreas obtidas para E.C. = 2,5 e F.G. = 0; em amarelo as áreas obtidas para E.C. = 2 e F.G. = 0.



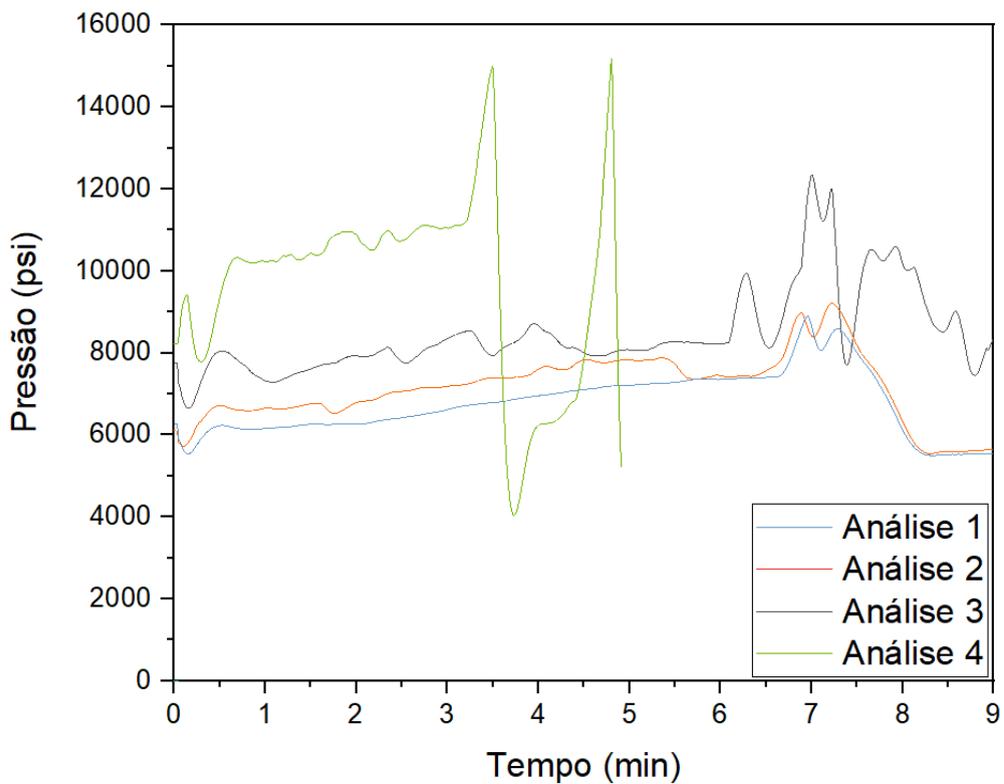
#### 4.4.2 Procedimento de limpeza da coluna analítica

Frequentemente a coluna apresentou comportamento de pressão característico de entupimento, ou seja, a pressão variava bastante, não estabilizando, em alguns momentos chegando ao valor máximo do equipamento (15000 psi), o que levava a erros e impossibilidade de dar sequência às análises. Isto ocorreu em decorrência da característica de agregamento dos beta amilóides, os quais se acumulavam no selo de entrada da coluna. Nestes casos era necessário efetuar limpeza da coluna analítica. Apesar da recuperação momentânea da coluna após limpeza, depois de apenas algumas poucas análises ela voltava a apresentar comportamento de entupimento, o que revelava que a limpeza não tinha sido completamente eficiente, ou seja, a impureza causadora do entupimento não havia sido totalmente eliminada.

A Figura 36 compara a pressão da coluna durante quatro análises. Pode-se observar que a pressão da primeira análise - representada em azul - ainda apresentava um comportamento estável; já a pressão da segunda análise - representada em vermelho -

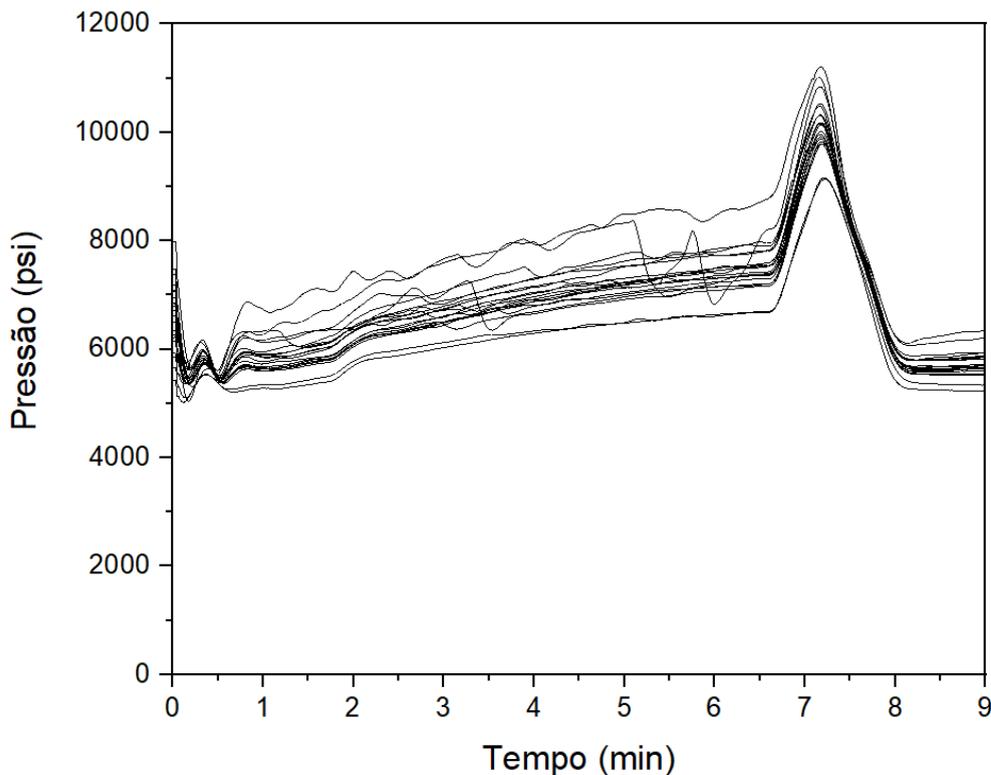
apresentou pequenas variações e valores um pouco maiores que os atingidos na primeira análise. A terceira análise - representada em preto - não apenas atingiu valores maiores que as duas anteriores como também apresentou um comportamento não estável; enquanto que a quarta análise - representada em verde - apresentou um comportamento bastante instável, com picos e quedas de pressão elevadas, atingindo o valor máximo de pressão do equipamento antes mesmo de terminar a análise.

Figura 36 - Comparação do gráfico de pressão obtido em quatro análises feitas em sequência e utilizando o mesmo método.



A Figura 37 apresenta os gráficos de pressão de um conjunto de 20 análises feitas após limpeza da coluna e trocando o padrão analítico por acetonitrila pura. Neste gráfico é possível perceber que ao utilizar-se uma amostra sem a característica de agregamento - no caso um solvente - o comportamento da pressão é mais linear, sem grandes variações. No entanto, uma vez que a coluna já havia sofrido entupimento é possível perceber também que a impureza não havia sido removida completamente do selo, e que a mesma estava se movendo no poro do selo, o que fazia que a sua influência na pressão ocorresse em maior menor grau. Isto pode ser evidenciado pelo fato de que algumas análises tiveram comportamento linear enquanto outras, embora em menor quantidade, apresentaram variações de pressão significativas.

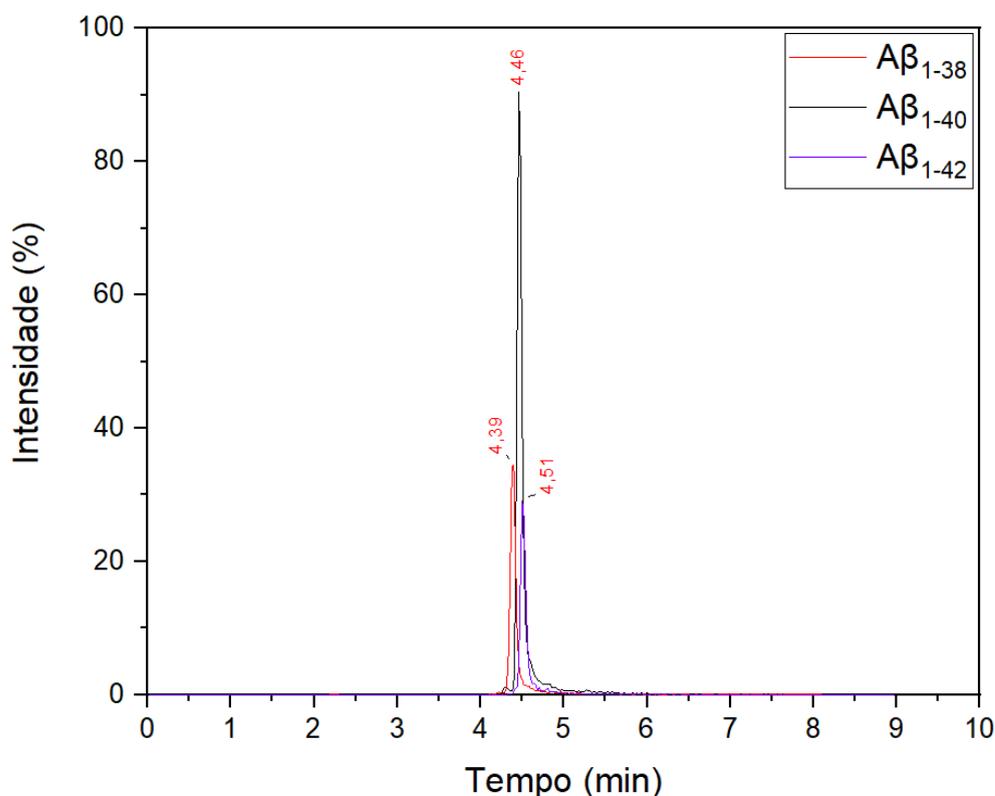
Figura 37 – Monitoramento da pressão em um conjunto de 20 análises substituindo-se o padrão analítico por acetonitrila pura.



#### 4.4.3 Avaliação da coluna CSH

Devido a problemas com entupimento das colunas já descritas, avaliou-se o uso de uma coluna de CSH. A Figura 38 apresenta o cromatograma de íon total típico obtido, onde os tempos de retenção foram 4,39; 4,46; e 4,51 para os analitos  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ , respectivamente. Pode-se observar que os picos não foram bem separados cromatograficamente; no entanto, devido ao equipamento de espectrometria de massas em tandem utilizado, e conforme já discutido, é possível identificar as transições de cada analito separadamente. Uma vez que o resultado obtido com a coluna de CSH foi inferior do que aquele obtido com a coluna de C18, e como esta - apesar dos problemas de entupimento - ainda estava em condições que permitiam seu uso, os demais experimentos foram feitos mantendo o uso da coluna de C18.

Figura 38 - Cromatograma de Íon Total (TIC) de uma mistura de  $\beta$ -amiloides obtido empregando uma coluna de CSH.



#### 4.4.4 Montagem do sistema de *trapping*

##### 4.4.4.1 Pré coluna de C18

Os resultados obtidos utilizando-se diferentes tempos de *trap* e proporção inicial de fase móvel 95% de A e 5% de B estão expostos no gráfico contido na Figura 39. O desvio padrão relativo das áreas resultantes das análises utilizando-se o tempo de 0,5, 1,0 e 1,5 minutos foi de 8,03%, 4,18% e 1,6% para os analitos  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ , respectivamente. O tempo de *trap* que resultou a maior área foi o de 2 minutos; ao acrescentar seus resultados no cálculo do desvio padrão relativo tem-se os resultados de 16,52%, 13,07% e 12,54% para os analitos  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ , respectivamente. Os valores, com exceção do obtido para o analito  $A\beta_{1-38}$  no segundo grupo de cálculos, ficaram dentro dos 15% esperados, demonstrando que não houve diferença significativa nas áreas obtidas. A Figura 340 apresenta o cromatograma de íon total obtido utilizando-se o tempo de *trap* de 2 minutos; os tempos de retenção foram 4,58; 4,67; e 4,75, para os analitos  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ , respectivamente.

Figura 39 - Comparação entre as áreas obtidas para quatro diferentes tempos de *trap* utilizando a fase móvel inicial na proporção 95% de A e 5% de B.

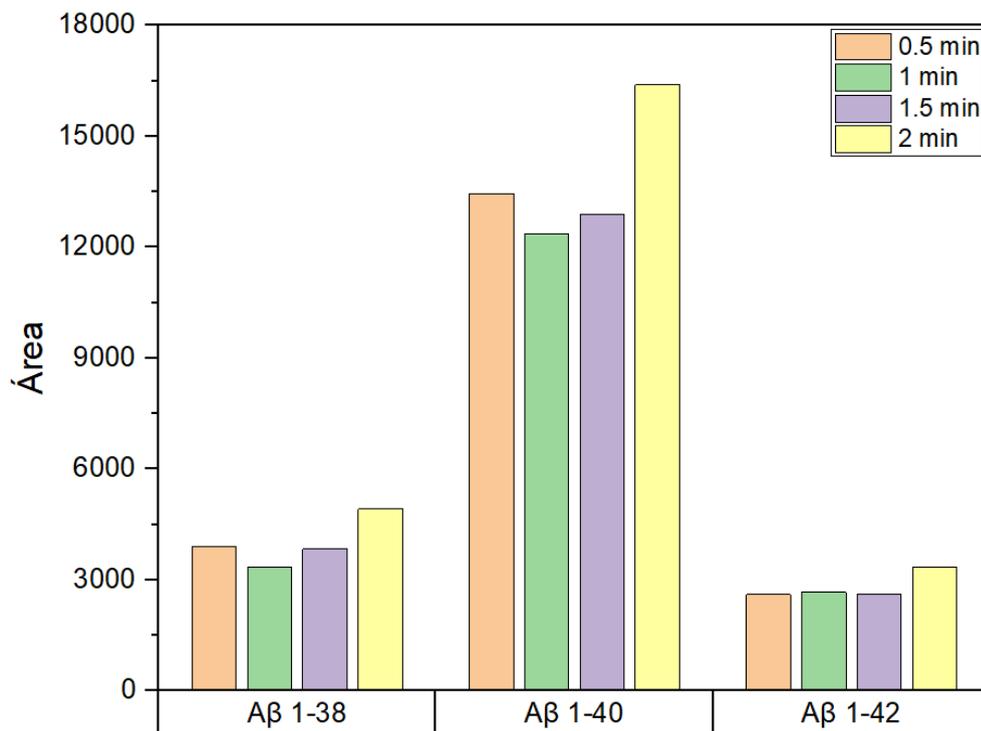
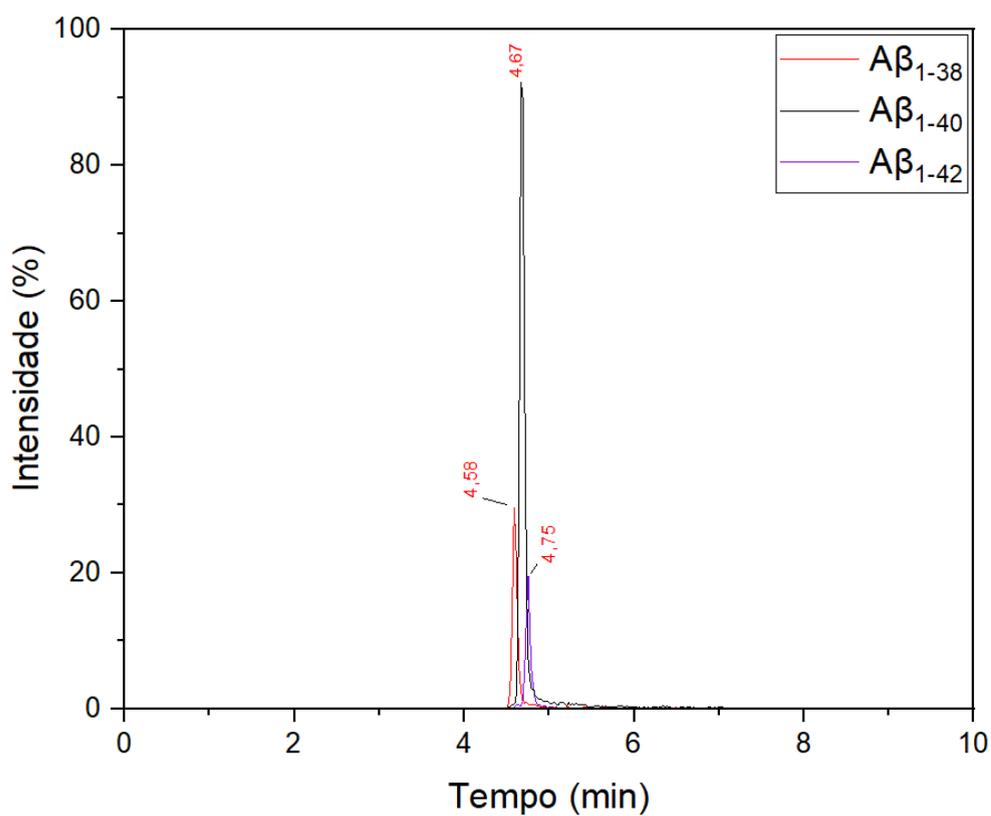
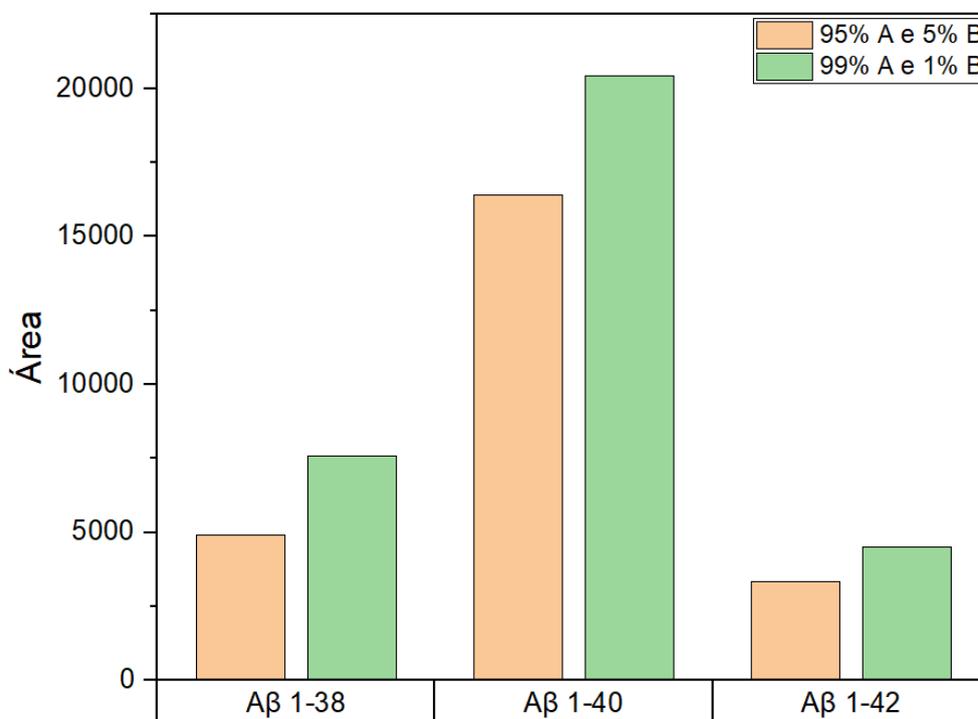


Figura 39 - Cromatograma de Íon Total (TIC) de uma mistura de  $\beta$ -amilases obtido utilizando-se o tempo de *trap* de 2 minutos e fase móvel inicial na proporção 95% de A e 5% de B.



A Figura 41 traz uma comparação das áreas dos picos obtidas utilizando fase móvel inicial na proporção 95% de A e 5% de B contra 99% de A e 1% de B, ambos utilizando o tempo de *trap* de 2 minutos. Nota-se que os resultados obtidos utilizando-se a fase móvel inicial 99% de A e 1% de B - representado em verde - foram melhores do que aqueles obtidos utilizando-se fase móvel inicial na proporção 95% de A e 5% de B. Isto é confirmado ao se analisar o desvio padrão relativo desses dois conjuntos de amostra, o qual foi de 30,28%, 15,55% e 21,04% os analitos  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ , respectivamente, ou seja, todos os valores foram maiores que o limite de 15%, sendo o analito  $A\beta_{1-40}$  o que menos sofreu influência desta troca de proporções de fase móvel. Este comportamento de aumento da área do pico cromatográfico ao utilizar a fase móvel aquosa em maior porcentagem se dá devido a polaridade dos analitos, uma vez que são mais solúveis em água uma porcentagem maior de fase aquosa irá contribuir para uma mais fácil eluição dos analitos da coluna de *trap* - ou seja, maior quantidade de analito irá chegar na coluna analítica, resultando, assim, em áreas de pico cromatográfico maiores.

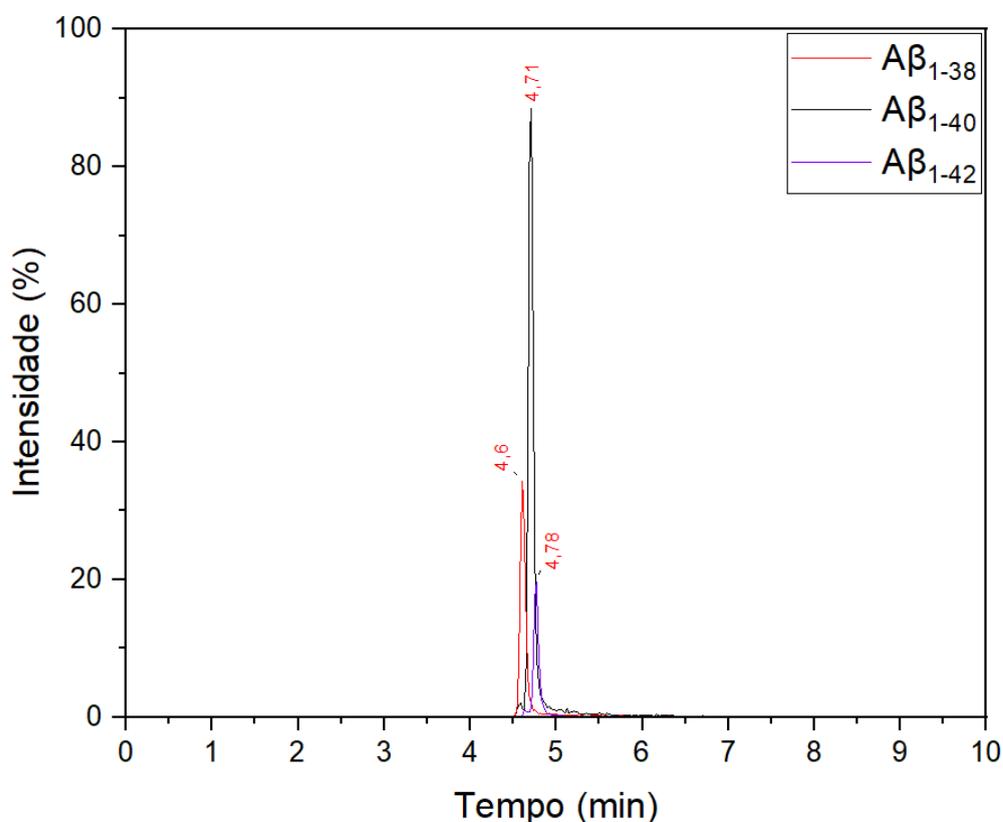
Figura 41 - Comparação das áreas obtidas utilizando fase móvel inicial na proporção 95% de A e 5% de B e na proporção 99% de A e 1% de B. O tempo de *trap* utilizado foi de 2 minutos.



A Figura 42 contém o cromatograma de íon total obtido utilizando o tempo de *trap* de 2 minutos e a fase móvel inicial na proporção de 99% de A e 1% de B, os tempos de retenção

foram 4,6; 4,71; e 4,78, para os analitos  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ , respectivamente. Ao comparar este cromatograma com o obtido sem o uso da coluna de *trap* (Figura 34), percebe-se que houve diminuição da separação cromatográfica, ou seja, os analitos apresentaram tempos de retenção mais próximos.

Figura 42 - Cromatograma de Íon Total (TIC) de uma mistura de  $\beta$ -amilases obtido utilizando-se fase móvel inicial na proporção de 99% de A e 1% de B e tempo de *trap* de 2 minutos.

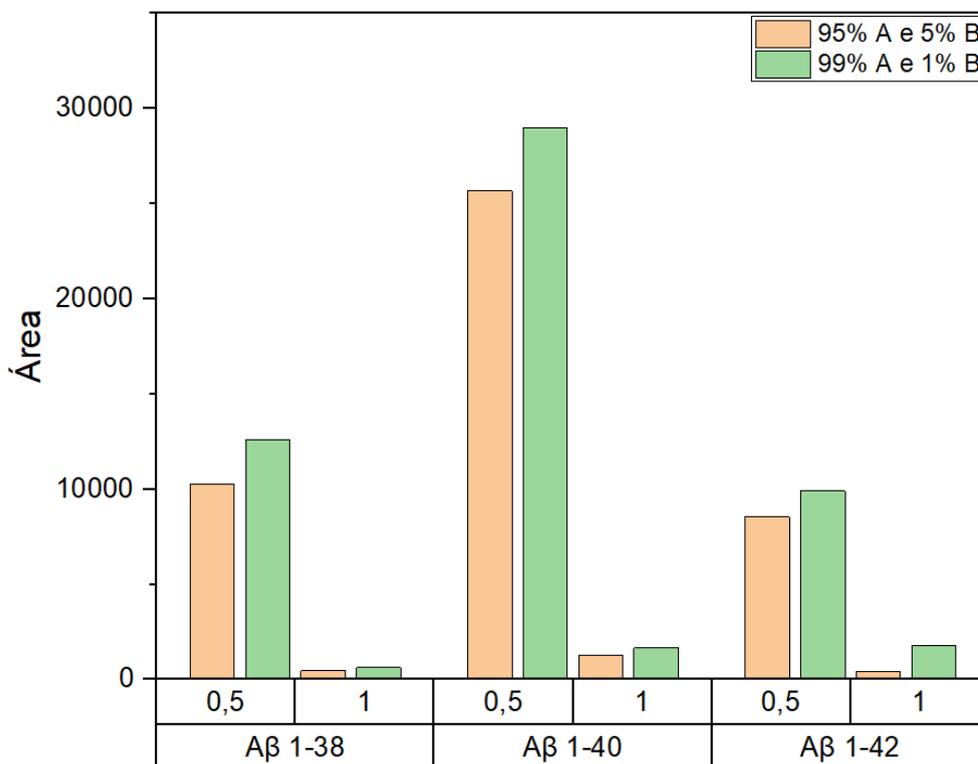


#### 4.4.4.2 Avaliação do uso de pré-colunas de grafeno na separação de $\beta$ -amilóides

Para a coluna *trap* de grafeno, produzida em nosso laboratório, os tempos de *trap* de 1,5 e 2 minutos não apresentaram resultados, pois este intervalo de tempo foi longo o suficiente para os analitos ficarem retidos na coluna de *trap* e, depois, serem eluídos antes de ocorrer o giro da válvula - ou seja, os analitos foram descartados antes de serem direcionados para a coluna analítica. Os resultados obtidos utilizando os tempos de *trap* de 0,5 e 1 minuto estão apresentados no gráfico contido na Figura 43, no qual é feita uma comparação das áreas obtidos nos diferentes tempo de *trap* e também utilizando a fase móvel inicial em duas

proporções diferentes - 95% de A e 5% de B (representada em rosa) e 99% de A e 1% de B (representado em verde). As áreas obtidas para cada analito utilizando o tempo de 0,5 minutos foram muito superiores àsquelas utilizando o tempo de 1 minuto, o que indica que o tempo de *trap* de um minuto já estava longo o suficiente para o analito retido na coluna *trap* de grafeno começar a ser eluído. Ou seja, parte do analito foi perdido antes de chegar na coluna analítica. Além disso, como esperado, e assim como o obtido para a coluna *trap* de C18, o uso de fase móvel inicial com maior proporção de solvente aquoso resultou em áreas maiores.

Figura 43 - Comparação das áreas dos picos cromatográficos obtidas utilizando coluna *trap* de grafeno, tempo de *trap* de 0,5 e 1 minuto e fase móvel inicial na proporção 95% de A e 5% de B; e 99% de A e 1% de B.



Através do cromatograma de íon total obtido e representado na Figura 44, é possível observar-se que ao utilizar a coluna *trap* de grafeno a separação cromatográfica diminuiu, pois os tempos de retenção (5,66; 5,72; e 5,79 para os analitos Aβ<sub>1-38</sub>, Aβ<sub>1-40</sub> e Aβ<sub>1-42</sub>, respectivamente) ficaram bastante próximos. Neste caso, o monitoramento individual das transições dos analitos Aβ<sub>1-38</sub>, Aβ<sub>1-40</sub> e Aβ<sub>1-42</sub>, apresentado, respectivamente, nas Figuras 45, 46 e 47, torna-se bastante úteis no auxílio da identificação dos analitos.

Figura 44 - Cromatograma de íon total (TIC) obtido utilizando coluna *trap* de grafeno, tempo de *trap* de 0,5 minutos e fase móvel inicial na proporção 99% de A e 1% de B.

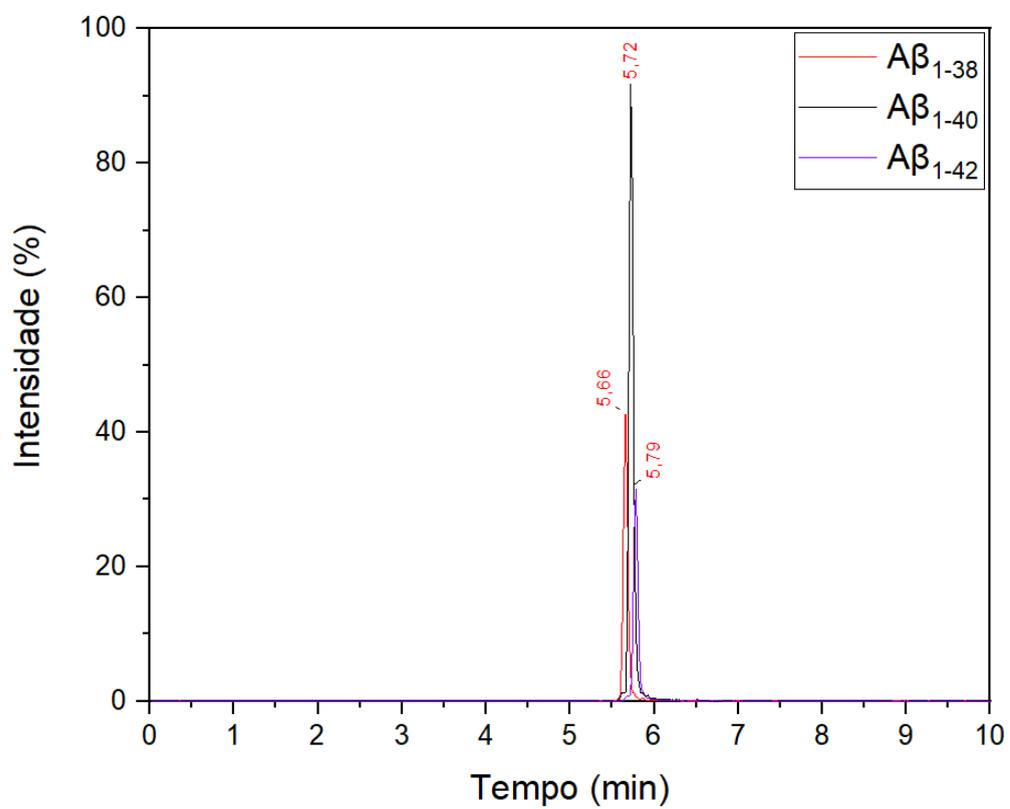


Figura 45 - Cromatograma típico de massas (transição MRM) obtido para o analito  $A\beta_{1-38}$  utilizando coluna *trap* de grafeno, tempo de *trap* de 0,5 minutos e fase móvel inicial na proporção 99% de A e 1% de B.

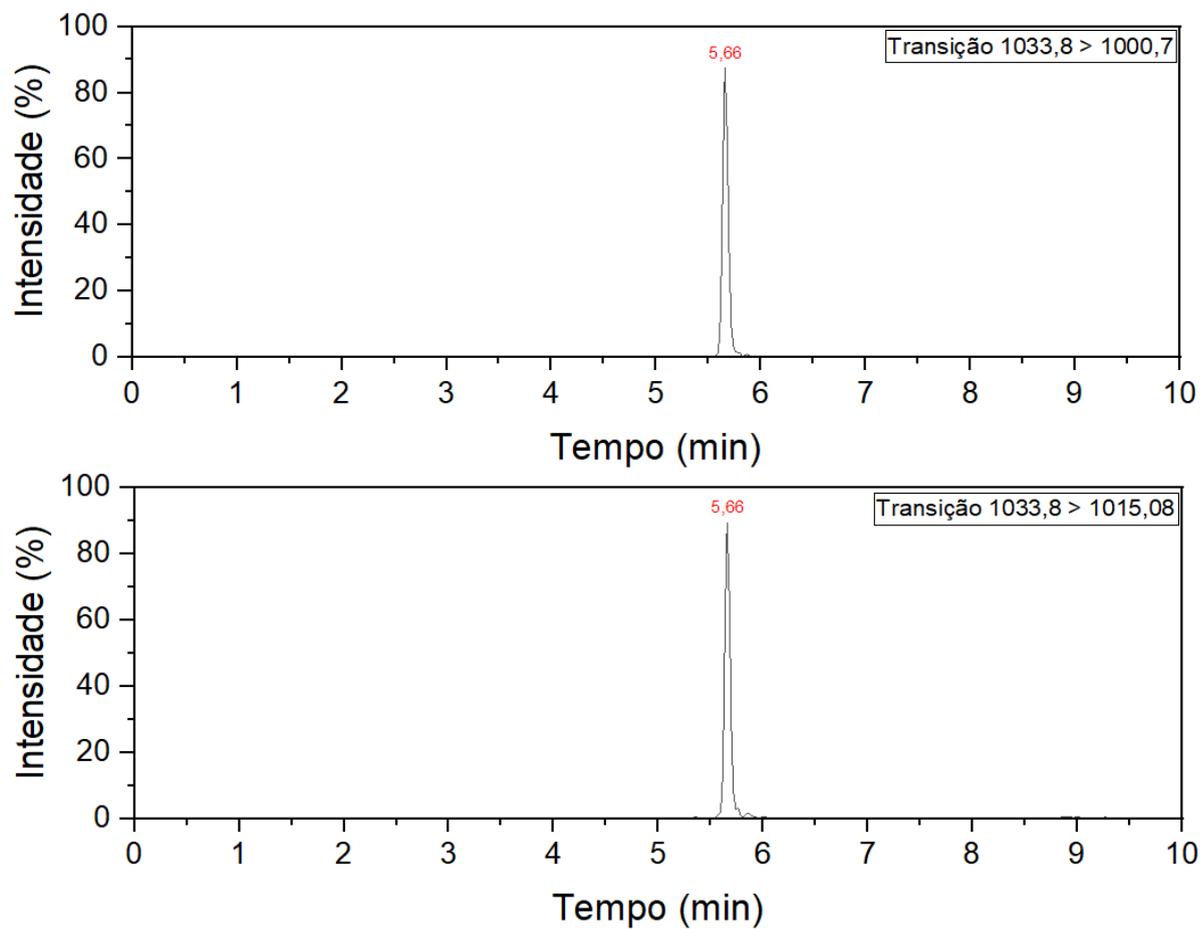


Figura 46 - Cromatograma típico de massas (transição MRM) obtido para o analito  $A\beta_{1-40}$  utilizando coluna *trap* de grafeno, tempo de *trap* de 0,5 minutos e fase móvel inicial na proporção 99% de A e 1% de B.

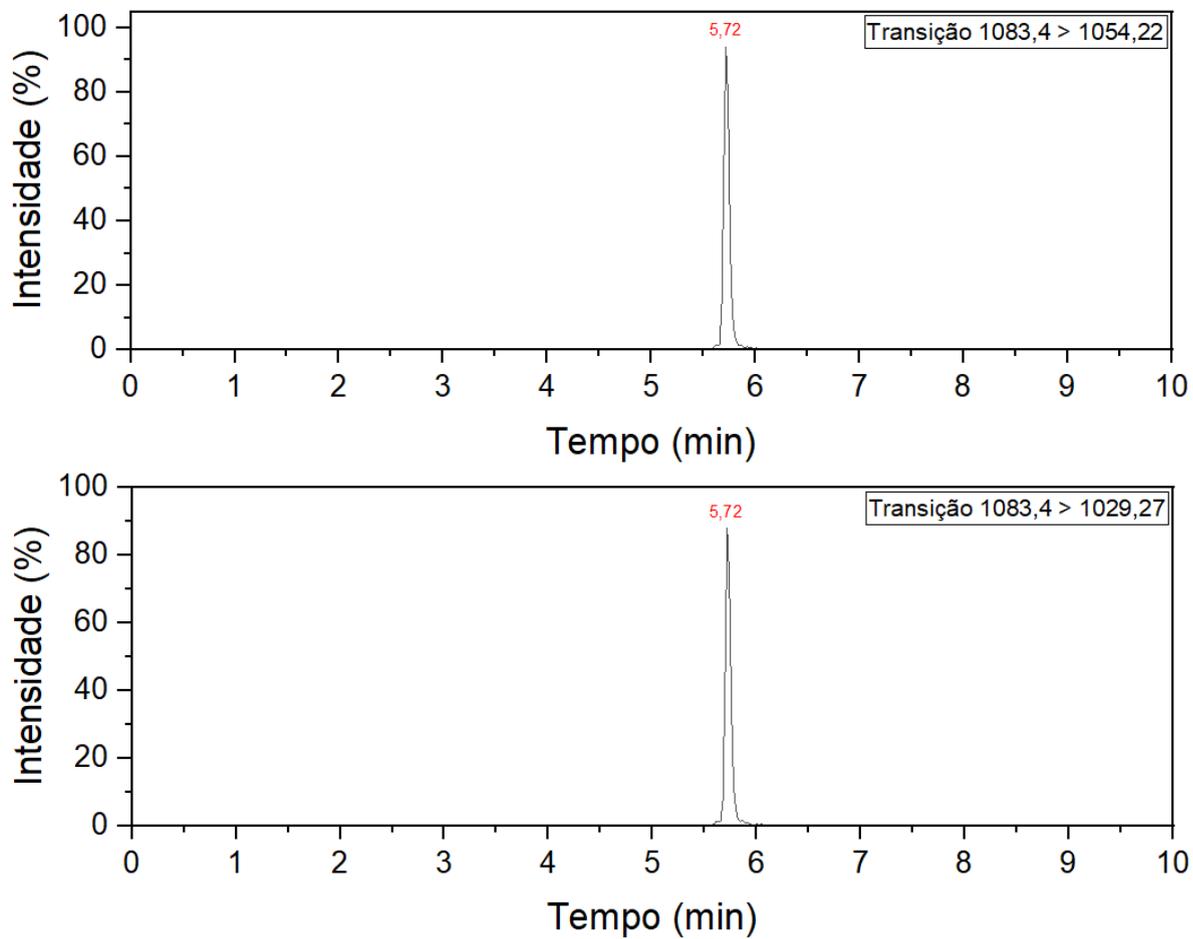
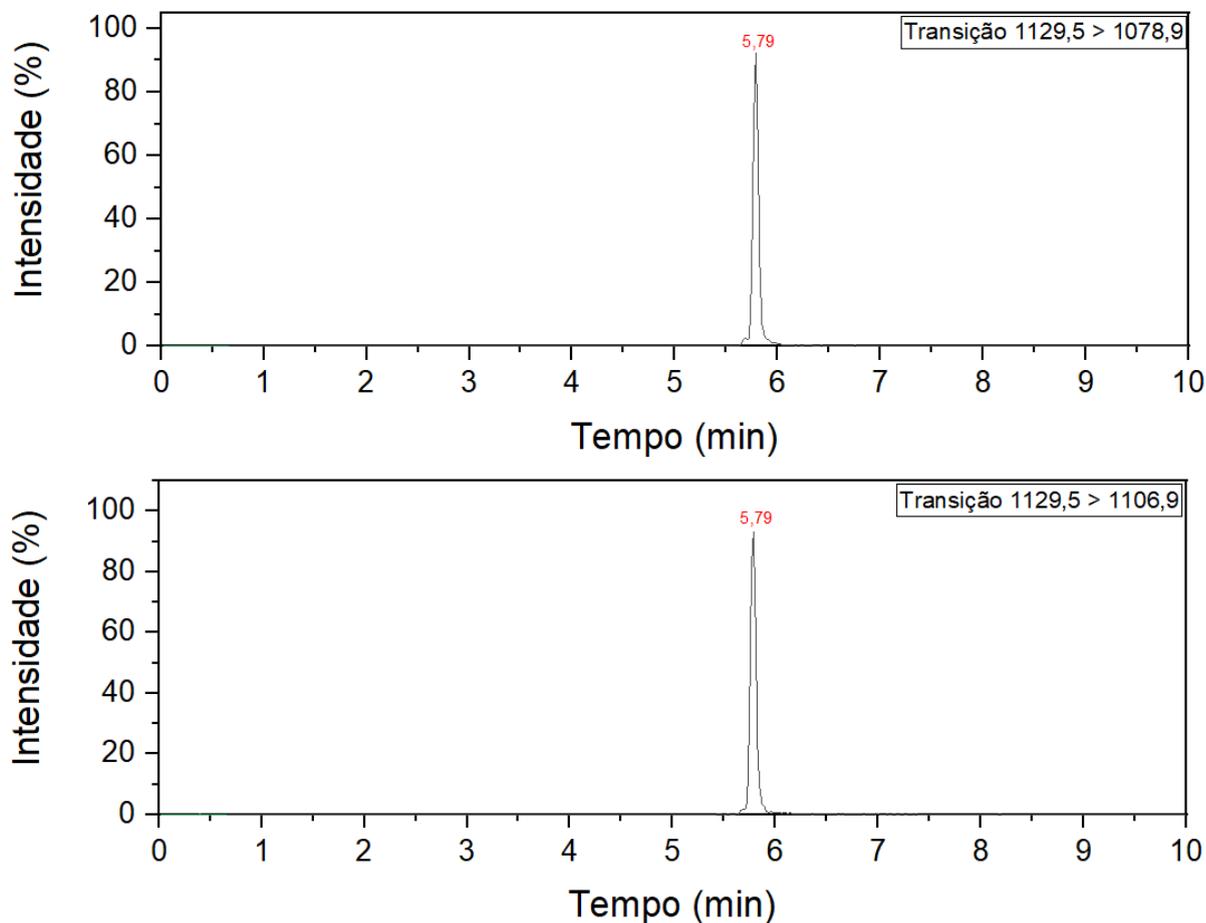
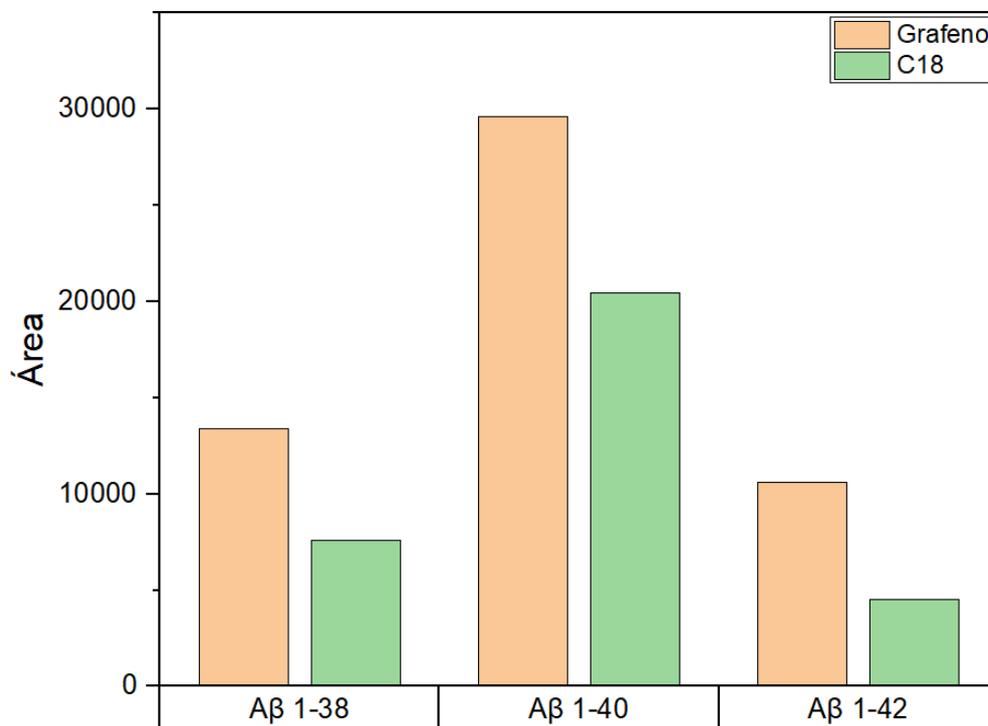


Figura 47 - Cromatograma típico de massas (transição MRM) obtido para o analito  $A\beta_{1-42}$  utilizando coluna *trap* de grafeno, tempo de *trap* de 0,5 minutos e fase móvel inicial na proporção 99% de A e 1% de B.



O gráfico ilustrado na Figura 48 apresenta uma comparação das áreas dos picos cromatográficos dos analitos  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$  obtidas utilizando-se a coluna de C18 e tempo de *trap* de 2 minutos (representado em verde) e utilizando-se a coluna de grafeno e tempo de *trap* de 0,5 minuto (representado em laranja). A área obtida utilizando-se a coluna de grafeno foi significativamente maior do que aquela obtida utilizando a coluna de C18. No entanto, os experimentos utilizando a coluna *trap* de grafeno tiveram de ser interrompidos, pois esta coluna, após algumas sequências de análises, perdeu o desempenho devido à soltura de partículas de grafeno, levando ao entupimento da tubulação *zenfit* do sistema de válvulas. Portanto, os demais experimentos que se seguiram foram feitos utilizando a coluna *trap* de C18.

Figura 48 - Comparação da área dos picos obtidos utilizando uma coluna *trap* de grafeno e tempo de *trap* de 0,5 minutos e uma coluna *trap* de C18 e tempo de *trap* de 2 minutos.

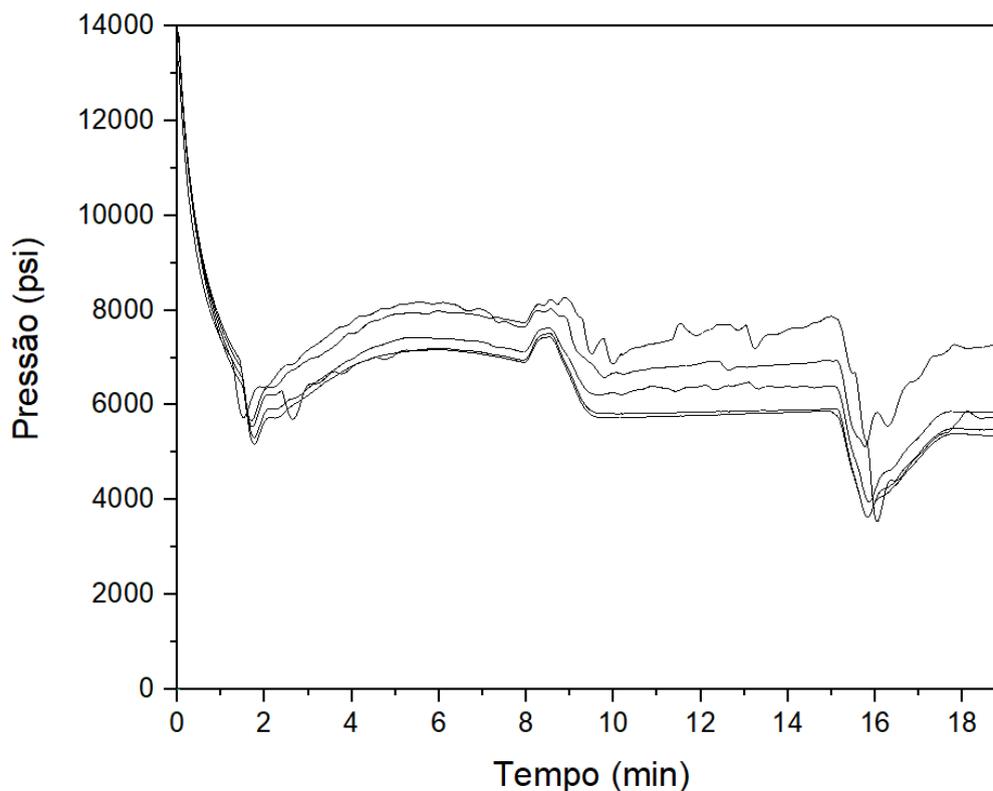


#### 4.4.5 Construção da curva de calibração

##### 4.4.5.1 Limpeza do selo da coluna analítica e troca da fase móvel

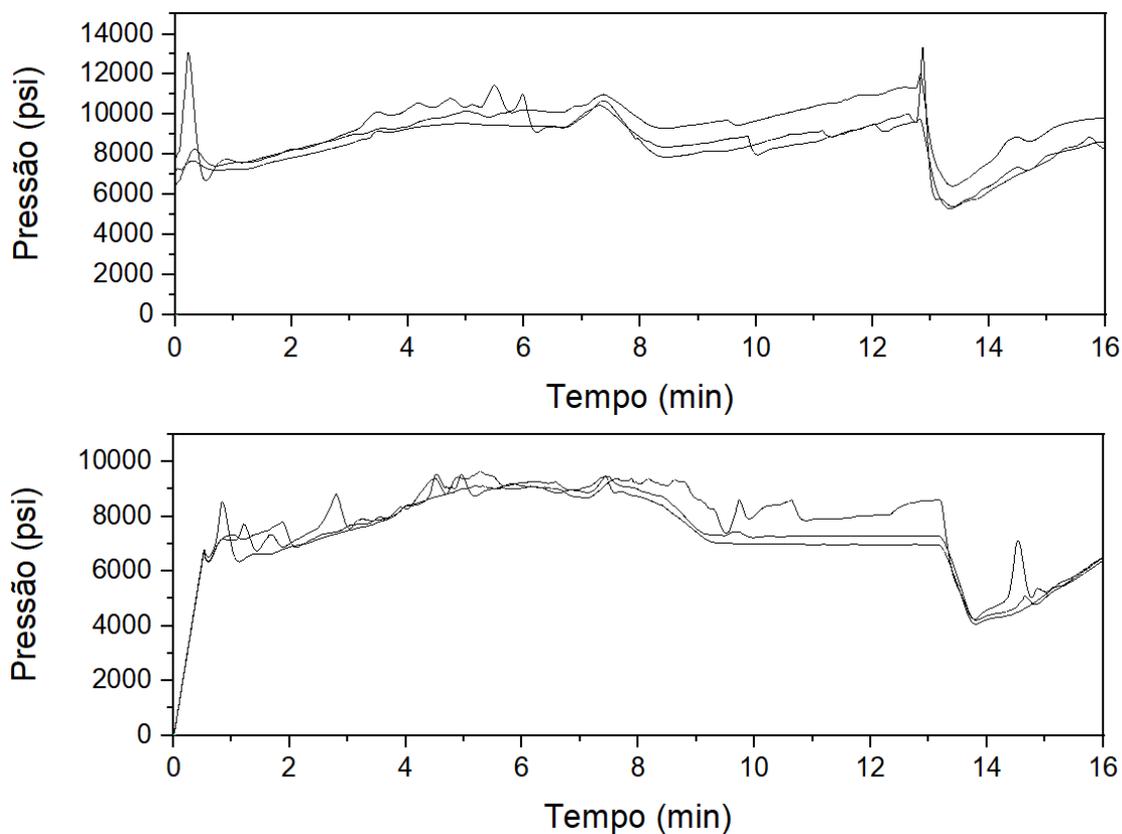
Antes da construção da curva de calibração foi necessário abrir a coluna analítica e realizar a limpeza do selo, pois, devido a característica de agregamento dos analitos, a coluna apresenta entupimentos frequentes, o que tornou inviável a continuidade das análises sem efetuar-se um procedimento de manutenção. O gráfico presente na Figura 49 mostra o comportamento da pressão nas 5 últimas análises feitas antes da limpeza do selo. Pode-se observar que a pressão não apenas não se manteve estável ao longo das corridas como iniciou em valores bastante altos, muito próximos ao máximo permitido pelo equipamento.

Figura 49 - Pressão do sistema nas últimas 5 análises cromatográficas antes da realização da limpeza do selo da coluna analítica.



Uma vez que o sistema suporta que se utilize fase móvel até pH=10, e o pH da fase móvel utilizada estava muito próximo disso, avaliou-se o uso da fase móvel com uma concentração de hidróxido de amônio mais baixa (0,1%). A Figura 50 faz uma comparação entre a pressão atingida pelo sistema em dois grupos de análises. O primeiro foi analisado antes da limpeza da coluna, a amostra injetada estava na concentração de 0,1 mg/L e a fase móvel basificada com 0,3% de hidróxido de amônio. O segundo grupo foi analisado depois da limpeza da coluna, a amostra injetada estava na concentração de 0,01 mg/L e a fase móvel basificada com 0,1% de hidróxido de amônio. Os demais parâmetros cromatográficos utilizados foram os mesmos para ambos os grupos. Analisando a imagem é possível observar que, após a limpeza e demais mudanças, houve diminuição geral da pressão; além disso, a pressão no início da corrida não só foi mais baixa como teve uma subida gradativa.

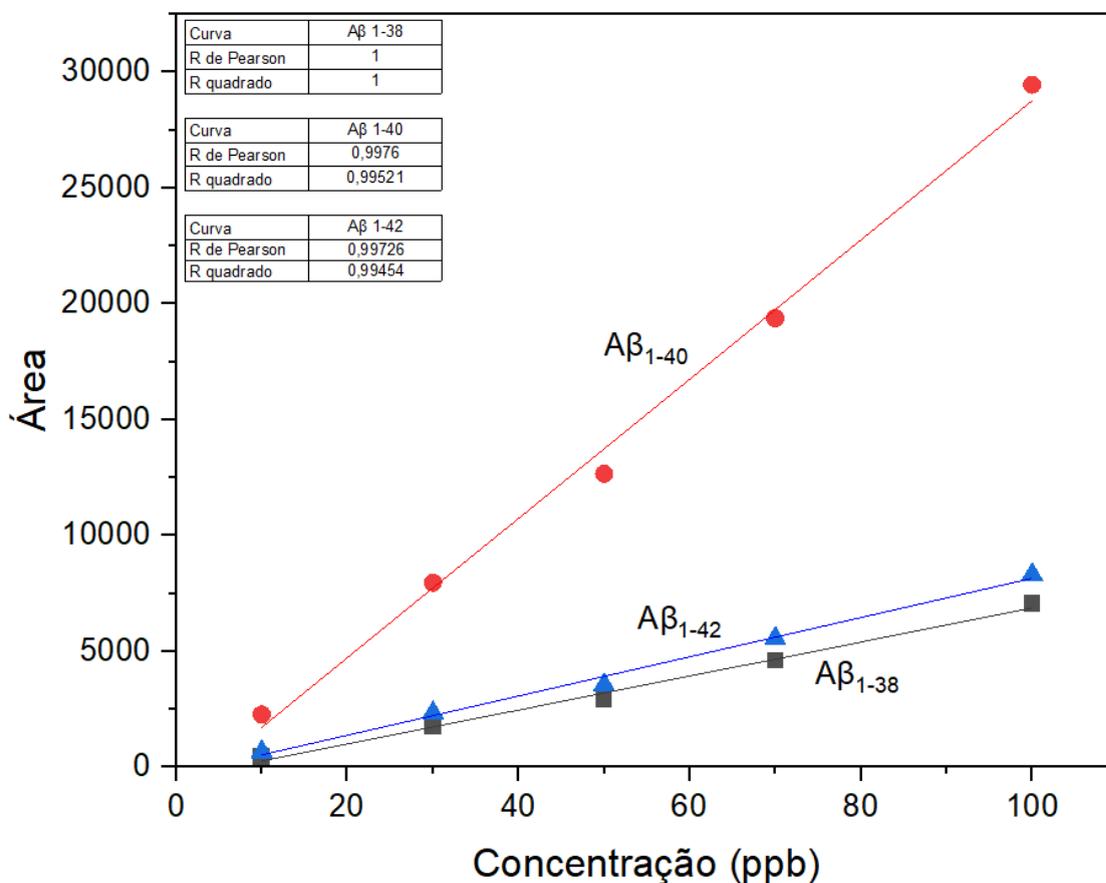
Figura 50 - Comparação da pressão atingida pelo sistema antes e depois da limpeza do selo da coluna e troca de fase móvel.



#### 4.4.5.2 Gráfico de calibração (área x concentração) para os A $\beta$ s

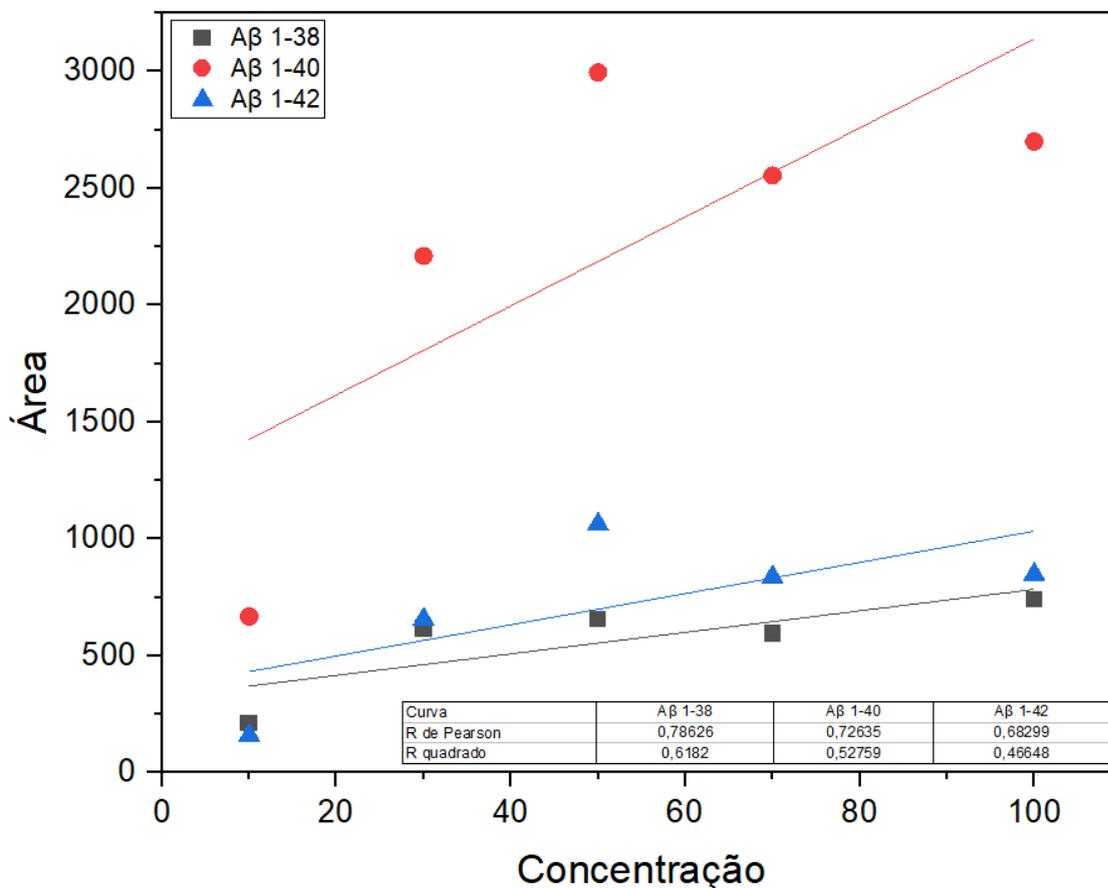
O gráfico de calibração construído visando a avaliação da possibilidade de determinação quantitativa dos analitos está apresentado na Figura 51. Os três analitos obtiveram valores elevados do coeficiente de correlação de Pearson e de  $R^2$ , sendo o primeiro 1, 0,99760 e 0,99726 e o segundo 1, 0,99521 e 0,99545, respectivamente, para os analitos A $\beta_{1-38}$ , A $\beta_{1-40}$  e A $\beta_{1-42}$ . Os altos valores de ambos os coeficientes indica que o equipamento apresentou uma boa acurácia e reprodutibilidade para este grupo de analitos.

Figura 51 - Gráfico de calibração obtido para os analitos  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ .



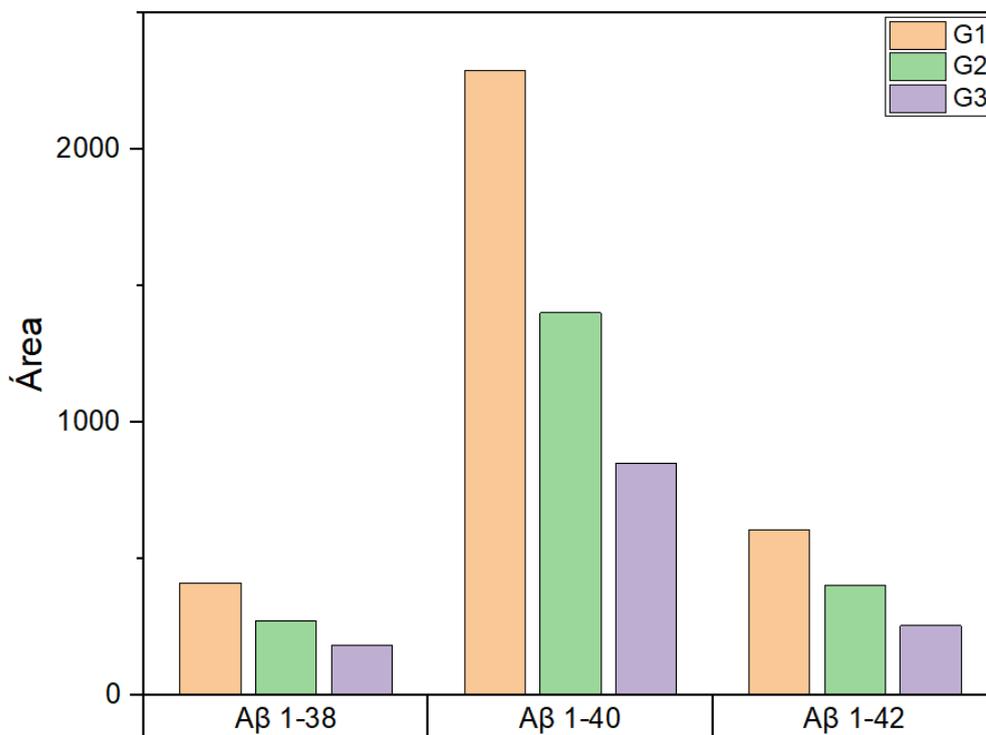
Em uma nova série de experimentos, entretanto, esse comportamento não foi observado (Figura 52). Os resultados obtidos foram bastante distintos dos anteriores. Os valores do coeficiente de correlação de Pearson foram de 0,78626, 0,72635 e 0,68299, enquanto os valores de  $R^2$  foram 0,61820, 0,52759 e 0,46648 para os analitos  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ , respectivamente. Os baixos valores obtidos, aliados ao aumento da pressão do sistema, indicaram um provável entupimento da coluna *trap* de C18. Ao realizar o procedimento de abertura e limpeza do selo verificou-se que havia escapado fase da coluna, o que explica o resultado não linear conforme seria esperado.

Figura 52 - Novo gráfico de calibração obtido para os analitos  $A\beta_{1-38}$ ,  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ .



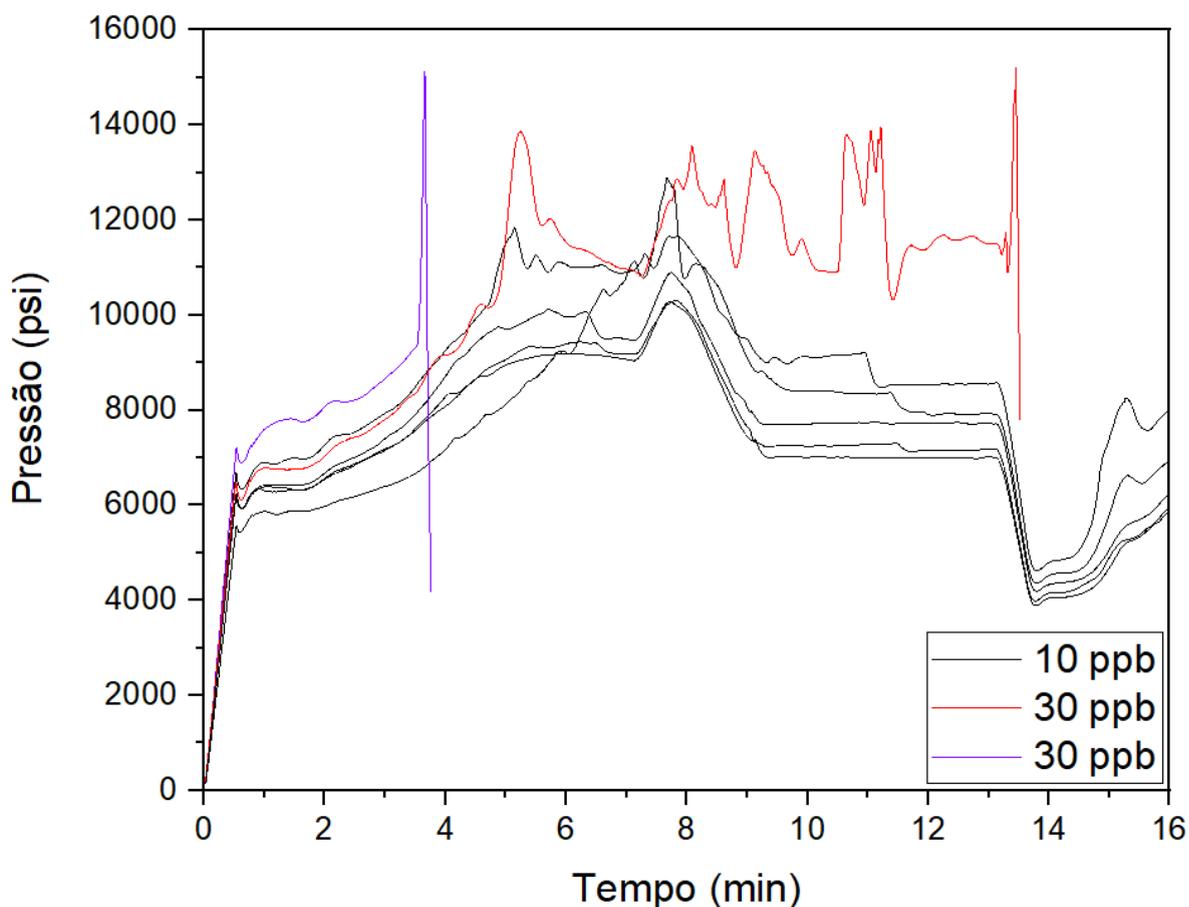
Após realizar a limpeza do selo da coluna de *trap* foram feitas novas análises, em dias diferentes, nas mesmas condições utilizadas na construção dos gráficos de calibração. A Figura 53 apresenta as áreas dos picos cromatográficos obtidas ao injetar 10 pbb de padrão analítico separado em três grupos de análises realizadas em dias diferentes. O primeiro grupo (laranja) corresponde às análises feitas na construção da primeira curva de calibração, o segundo grupo (verde) foi analisado logo após a limpeza do selo da coluna de *trap* e o terceiro grupo (roxo) foi analisado 3 dias após as análises do segundo grupo. Pode-se observar que houve um decréscimo das áreas, ou seja, não apenas a coluna de *trap* perdeu parte da capacidade de retenção como o problema estava se agravando ao longo do tempo.

Figura 53 - Comparação das áreas de três grupos de análises feitas em 3 diferentes dias, antes e após a limpeza do selo da coluna de *trap*.



Uma nova tentativa de construir um gráfico de calibração foi feita; no entanto, não foi possível devido ao problema de aumento da pressão do sistema. As análises referentes ao primeiro ponto da curva (0,01 mg/L) ocorreram sem grandes dificuldades, porém ao iniciar as análises do segundo ponto da curva (0,03 mg/L) houve sucessivas elevações de pressão, todos eles chegando ao limite máximo de pressão permitida pelo sistema. A Figura 54 compara a pressão atingida nas 5 análises feitas para obtenção do primeiro ponto da curva (representado em preto) com a pressão atingida em duas corridas feitas para obter o segundo ponto da curva. Em vermelho está representada a primeira análise feita à concentração de 0,03 mg/L. Observa-se que a pressão atinge o limite máximo pouco antes de terminar a corrida, não sendo possível obter-se os cromatogramas. A segunda corrida (representada em roxo), no entanto, atingiu o limite máximo de pressão logo no início, não possibilitando a aquisição de novos dados. Deste modo, não foi possível obter novos pontos, pois em todas as corridas subsequentes o sistema atingia o limite máximo de pressão antes de obter os picos cromatográficos.

Figura 54 - Comparação da pressão atingida pelo sistema na tentativa de construir uma nova curva de calibração.



#### 4.4.6 Considerações finais sobre as análises de A $\beta$ s

A utilização do sistema miniaturizado (cromatografia capilar) na determinação de peptídeos A $\beta$  apresentou dificuldades que precisam ser vencidas, pois a característica de agregamento destes analitos, juntamente com o fato do sistema capilar ser mais sensível do que o convencional (HPLC), faz com que haja problemas frequentes de entupimento e, conseqüentemente, elevações de pressão da coluna analítica. Embora o uso da coluna de extração para pré-concentrar os analitos tenha resolvido parcialmente os problemas de entupimento da coluna analítica, ainda não foi possível utilizar o sistema *Trap Valve Manager* para automatizar o preparo de amostras sólidas.

Apesar das dificuldades encontradas na utilização do sistema capilar devido a característica de agregamento dos analitos, os resultados que puderam ser obtidos como, por exemplo, o gráfico de calibração, foram bons, mostrando que - vencida esta dificuldade - a

técnica tem potencial para apresentar resultados robustos podendo, assim, ser aplicada a amostras mais complexas como, por exemplo, tecido cerebral.

---

---

## **5. CONCLUSÕES**

---

---

## 5 CONCLUSÃO

O equipamento empregado no presente trabalho é constituído por um sistema complexo de bombeamento de fase móvel em fluxo extremamente baixo, através de colunas capilares contendo fase estacionárias especiais. O sistema ainda permite o uso de uma coluna auxiliar – coluna “trap”- a qual aprisiona os analitos pelo tempo desejado, auxiliando na separação dos analitos de interesse. Os compostos separados (ou parcialmente separados) são direcionados a um espectrômetro de massas em tandem (MS/MS), o qual permite o monitoramento de íons bastante seletivos. Este conjunto, denominando nanoLC-MS/MS, ainda possui poucos estudos publicados fora do ambiente das ora denominadas ciências “OMICs” (proteômica, lipidômica, metabolômica, e outras). Neste estudo, avaliou-se o uso deste sistema em várias situações tendo diferentes amostras e analitos como sondas. As vantagens e dificuldades/limitações do sistema são discutidas ao longo de cada sub-projeto. Fases inovadoras para as colunas *trap* (como uma fase derivada de grafeno) são apresentadas e discutidas. Em geral, o sistema utilizado em várias configurações mostrou-se robusto e sensível, e o uso do mesmo na forma miniaturizada (nanoLC-MS/MS) mostrou-se eficaz na análise, separação e determinação dos diferentes grupos de substâncias neuroativas investigadas. As principais limitações foram encontradas ao realizar-se análises envolvendo analitos mais complexos como, por exemplo, os A $\beta$ s. Esta importante classe de analitos apresenta como característica uma tendência a aglomeração (efeito este atribuído, no presente, ao surgimento da doença de Alzheimer), entupindo as colunas de *trap*, pré-colunas, colunas analíticas e tubulações do sistema cromatográfico. Estas limitações podem ser reduzidas com o uso de uma coluna de extração mais apropriada (ainda a ser investigado) para pré-concentrar o analito e, desta forma, proteger a coluna analítica. Espera-se, também, que a diminuição da concentração dos analitos possa mitigar os danos sofridos pela coluna.

A utilização do sistema *Trap Valve Manager* para automatizar o preparo de amostras apesar de ter se mostrado eficaz, também apresentou limitações que ainda precisam ser vencidas como, por exemplo, a possibilidade de perda significativa de analito na etapa de ativação da fase, podendo interferir na precisão e exatidão do método. Outra dificuldade envolve a análise de amostras que contenham uma grande quantidade de analito, uma vez que a fase móvel passa continuamente pela amostra durante a etapa de *trap* e, portanto, o analito é continuamente extraído. Ambas as dificuldades demonstram que esta técnica aplicada à nanoLC-MS/MS, requer estudos adicionais para que possa vir a extrair quantidades exatas e

reprodutíveis dos analitos de interesse. Uma maneira de minimizar este problema seria a utilização de uma bomba adicional, assim seria possível interromper o fluxo que passa pela cartucho contendo a amostra, impedindo que a mesma seja continuamente extraída, desta forma, a fase móvel proveniente da bomba adicional carregaria os analitos para a coluna analítica.

Em suma, no presente estudo avaliou-se o uso de um sistema nanoLC-MS/MS, em diversas configurações, diversas colunas, pré-colunas, *traps*, fases móveis, volumes de amostras e outros, para a análise de substâncias neuroativas visando seu posterior emprego na análise dessas substâncias em matrizes biológicas. As diversas vantagens e algumas limitações do sistema – agravadas pela escala nano empregada – também foram apresentadas e discutidas.

A principal conclusão do trabalho é que o sistema nanoLC-MS/MS investigado, com as colunas, pré-colunas e colunas *trap* empregados, mostrou grande potencial para a análise de substâncias neuroativas em matrizes biológicas. Estudos adicionais com o sistema, aprofundando iniciados neste trabalho, poderão trazer mais luz ao tema, possibilitando, no futuro próximo, uma relevante contribuição prática para uma melhor compreensão e monitoramento das doenças neurodegenerativas.

---

---

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup>ZUCKERMAN, A. M. Analytical chemistry - today's definition and interpretation. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 343, p. 817-818, 1992.
- <sup>2</sup>ACS Chemistry for Life. **Analytical chemistry**. Washington, DC: ACS, 2023. Disponível em: <https://www.acs.org/careers/chemical-sciences/areas/analytical-chemistry.html>. Acesso em: 17 jan. 2024.
- <sup>3</sup>KASVI. **Toxicologia**: conceitos, especialidades e aplicações. São José dos Pinhais, 2018. Disponível em: <https://kasvi.com.br/toxicologia-conceitos-especialidades-aplicacao/#:~:text=Toxicologia%20Anal%C3%ADtica&text=Compreende%20a%20detec%C3%A7%C3%A3o%2C%20identifica%C3%A7%C3%A3o%20e,progn%C3%B3stico%20e%20preven%C3%A7%C3%A3o%20de%20intoxica%C3%A7%C3%B5es>. Acesso em: 17 jan. 2024.
- <sup>4</sup>LINA, P.; CHENA, W.; YUANA, F.; SHENGA, L.; WUB, Y.; ZHANGC, W.; LIC, G.; XUA, H.; LI, X. An UHPLC–MS/MS method for simultaneous quantification of human amyloid beta peptides A $\beta$ 1-38, A $\beta$ 1-40 and A $\beta$ 1-42 in cerebrospinal fluid using micro-elution solid phase extraction. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 1070, p. 82-91, 2017.
- <sup>5</sup>PORTELIUS, E.; TRAN, A. J.; ANDREASSON, U.; PERSSON, R.; BRINKMALM, G.; ZETTERBERG, H.; BLENNOW, K.; BRINKMALM, A. W. Characterization of Amyloid  $\beta$  peptides in cerebrospinal fluid by an automated immunoprecipitation procedure followed by mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, Washington, DC, v. 6, n. 11, p. 4433-4439, 2007.
- <sup>6</sup>URBAN, A. S.; PAVLOV, K. V.; KAMYNNINA, A. V.; OKHRIMENKO, I. S.; ARSENIIEV, A. S.; BOCHAROV, E. V. Structural studies providing insights into production and conformational behavior of Amyloid- $\beta$  peptide associated with Alzheimer's disease development. **Molecules**, Basel, v. 26, n. 10, p 2897, 2021.
- <sup>7</sup>LAME, M. E.; CHAMBERS, E. E.; BLATNIK, M. Quantitation of amyloid beta peptides A $\beta$ 1–38, A $\beta$ 1–40, and A $\beta$ 1–42 in human cerebrospinal fluid by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 419, p. 133- 139, 2011.
- <sup>8</sup>OE, T.; ACKERMANN, B. L.; INOUE, K.; BERNA, M. J.; GARNER, C. O.; GELFANOVA, V.; DEAN, R. A.; SIEMERS, E. R.; HOLTZMAN, D. M.; FARLOW, M. R.; BLA, I. A. Quantitative analysis of amyloid  $\beta$  peptides in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients by immunoaffinity purification and stable isotope dilution liquid chromatography/negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Hoboken, v. 20, p. 3723–3735, 2006.
- <sup>9</sup>DE FALCO, A. D.; CUKIERMAN, D. S.; DAVIES, R. A. H.; REY, N. A. Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 63-80, 2015.

- <sup>10</sup>TOLAR, M.; ABUSHAKRA, S.; SABBAGH, M. The path forward in Alzheimer's disease therapeutics: reevaluating the amyloid cascade hypothesis. **Alzheimer's & Dementia**, Hoboken, v. 16, n. 11, p. 1553-1560, 2019.
- <sup>11</sup>UDDIN, M. S.; KABIR, MD. T.; RAHMAN, S. M.; BEHL, T.; JEANDET, P.; ASHRAF, G. M.; NAJDA, A. BIN-JUMAH, M. N.; EL-SEEDI, H.; ABDEL-DAIM, M. M. Revisiting the amyloid cascade hypothesis: from Anti-A $\beta$  therapeutics to auspicious new ways for Alzheimer's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 16, p. 5858, 2020.
- <sup>12</sup>MCGIRR, S.; VENEGAS, C.; SWAMINATHAN, A. Alzheimers disease: a brief review. **Journal of Experimental Neurology**, Wilmington, v. 1, n. 3, p. 89-98, 2020.
- <sup>13</sup>NELSON, L. R.; BULUN, S. E. Estrogen production and action. **Journal of the American Academy of Dermatology**, New York, v. 45, n. 3, p. S116-S124, 2001.
- <sup>14</sup>EVERYTHING you need to know about estrogen. **Medical News Today**, Brighton, 2023. Disponível em: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/277177>. Acesso em: 01 fev. 2024.
- <sup>15</sup>RUSSELL, J. K.; JONES, C. K.; NEWHOUSE, P. A. The role of estrogen in brain and cognitive aging. **Neurotherapeutics**, New York, v. 16, p. 649–665, 2019.
- <sup>16</sup>UDDIN, M. S.; RAHMAN, M. M; JAKARIA, M.; RAHMAN, S. M.; HOSSAIN, M. S.; ISLAM, A.; AHMED, M.; MATHEW, B.; OMAR, U. M.; BARRETO, G. E.; ASHRAF, G. M. Estrogen signaling in Alzheimer's disease: molecular insights and therapeutic targets for Alzheimer's dementia. **Molecular Neurobiology**, New York, v. 57, p. 2654–2670, 2020.
- <sup>17</sup>NILSEN, J. Estradiol and neurodegenerative oxidative stress. **Frontiers in Neuroendocrinology**, San Diego, v. 29, n. 4, p. 463-475, 2008.
- <sup>18</sup>GUENNOUN, R. Progesterone in the brain: hormone, neurosteroid and neuroprotectant. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 15, p. 5271, 2020.
- <sup>19</sup>OROZCO, J. C. G.; ARROYO, I. C. Progesterone actions during central nervous system development. **Frontiers in Neuroscience**, Lausanne, v. 13, p. 503, 2019.
- <sup>20</sup>TARABORRELLI, S. Physiology, production and action of progesterone. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, Hoboken, v. 94, n. S161, p. 8-16, 2015.
- <sup>21</sup>QIN, Y.; CHEN, Z.; HAN, X.; WU, H.; YU, Y.; WU, J.; LIU, S.; HOU, Y. Progesterone attenuates A $\beta_{25-35}$ -induced neuronal toxicity via JNK inactivation and progesterone receptor membrane component 1-dependent inhibition of mitochondrial apoptotic pathway. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 154, p. 302-312, 2015.
- <sup>22</sup>HONG, Y.; WANG, X.; SUN, S.; XUE, G.; LI, J.; HOU, Y. Progesterone exerts neuroprotective effects against A $\beta$ -induced neuroinflammation by attenuating ER stress in astrocytes. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 33, p. 83-89, 2016.

- <sup>23</sup>SINGH, M.; SU, C. Progesterone and neuroprotection. **Hormones and Behavior**, Maryland Heights, v. 63, n. 2, p. 284-290, 2013.
- <sup>24</sup>WU, H.; WU, Z.; SHI, W.; GAO, H.; WU, H.; BIAN, F.; JIA, P.; HOU, Y. Effects of progesterone on glucose uptake in neurons of Alzheimer's disease animals and cell models. **Life Sciences**, Oxford, v. 238, p. 116979, 2019.
- <sup>25</sup>SHI, W.; WU, H.; LIU, S.; WU, Z.; WU, H.; LIU, J.; HOU, Y. Progesterone suppresses cholesterol esterification in APP/PS1 mice and a cell model of Alzheimer's disease. **Brain Research Bulletin**, Oxford, v. 173, p. 162-173, 2021.
- <sup>26</sup>HANOUT, W.; QVIT, N. **Peptide and peptidomimetic therapeutics: from bench to bedside**. 1. ed. Cambridge: Academic Press, 2022.
- <sup>27</sup>LANGEN, U. H.; AYLOO, S.; GU, C. Development and cell biology of the Blood-Brain Barrier. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 35, p. 591-613, 2019.
- <sup>28</sup>GUPTA, M.; LEE, H. J.; BARDEN, C. J.; WEAVER, D. F. The Blood-Brain Barrier (BBB) score. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 62, n. 21, p. 9824-9836, 2019.
- <sup>29</sup>TANAKA, M.; DOHGU, S.; KOMABAYASHI, G.; KYOHARA, H.; TAKATA, F.; KATAOKA, Y.; NIRASAWA, T.; MAEBUCHI, M.; MATSUI, T. Brain-transportable dipeptides across the blood-brain barrier in mice. **Scientific Reports**, London, v. 9, p. 5769, 2019.
- <sup>30</sup>LAKSITORINI, M.; PRASASTY, V. D.; KIPTOO, P. K.; SIAHAAN, T. J. Pathways and progress in improving drug delivery through the intestinal mucosa and Blood-Brain Barriers. **Therapeutic Delivery**, London, v. 5, n. 10, p. 1143-1163, 2014.
- <sup>31</sup>NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. National Center for Biotechnology Information. **PubChem compound summary for CID 7021854, Tyr-Gly**. Bethesda, 2006. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tyr-Gly>. Acesso em: 02 fev. 2024.
- <sup>32</sup>MAHMOUDPOUR, M.; JOUYBAN, A.; SOLEYMANI, J.; RAHIMI, M. Rational design of smart nano-platforms based on antifouling-nanomaterials toward multifunctional bioanalysis. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 302, p. 102637, 2022.
- <sup>33</sup>NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. National Center for Biotechnology Information. **PubChem compound summary for CID 92181, Glycyl-L-tryptophan**. Bethesda, 2005. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glycyltryptophan>. Acesso em: 02 fev. 2024.
- <sup>34</sup>NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. National Center for Biotechnology Information. **PubChem compound summary for CID 97054, Trp, gly**. Bethesda, 2005. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/97054>. Acesso em: 02 fev. 2024.
- <sup>35</sup>LONDZIN, P.; ZAMORA, M.; KAKOL, B.; TABOREK, A.; FOLWARCZNA, J. Potential of caffeine in Alzheimer's disease—a review of experimental studies. **Nutrients**, Basel, v. 13, n. 2, p. 537, 2021.

- <sup>36</sup>DEPAULA, J.; FARAH, A. Caffeine consumption through coffee: content in the beverage, metabolism, health benefits and risks. **Beverages**, Basel, v. 5, n. 2, p. 37, 2019.
- <sup>37</sup>BARCELOS, R. P.; LIMA, F. D.; CARVALHO, N. R.; BRESCIANI, G.; ROYES, L. F. Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance. **Nutrition Research**, Oxford, v. 80, p. 1-17, 2020.
- <sup>38</sup>ARENDASH, G. W.; CAO, C. Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, Amsterdam, v. 20, p. S117–S126, 2010.
- <sup>39</sup>BYJU'S. **Chromatography principle and its types**. [S. l.]: BYJU'S, 2017. Disponível em: <https://byjus.com/chemistry/differential-extraction-chromatography/>. Acesso em: 29 jan.2024.
- <sup>40</sup>YASHIN, Y. I.; YASHIN, A. Y. **Chemical analysis of food: techniques and applications**. 1. ed. Cambridge: Academic Press, 2012.
- <sup>41</sup>BASHARAT, R.; KOTRA, V.; LOONG, L. Y.; MATHEWS, A.; KANAKAL, M. M. A Mini-review on ultra performance liquid chromatography. **Oriental Journal of Chemistry**, Bhopal, v. 37, n. 4, p. 847-857, 2021.
- <sup>42</sup>SNEEKES, E. J.; RIEUX, L.; SWART, R. **Miniaturization of liquid chromatography: why do we do it?** Amsterdam: Thermo Fisher Scientific, 2021. Disponível em: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Reference-Materials/WP-70817-LC-Miniaturization-WP70817-EN.pdf>. Acesso em: 31 jan. 2024.
- <sup>43</sup>MACIEL, E. V. S.; LANÇAS, F. M. A cartridge-based device for automated analyses of solid matrices by online sample prep–capillary LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 414, p. 2725–2737, 2022.
- <sup>44</sup>BÜYÜKKÖROĞLU, G.; DORA D. D.; ÖZDEMİR F.; HIZEL, C. **Omics technologies and bio-engineering: towards improving quality of life**. 1. ed. Cambridge: Academic Press, 2017.
- <sup>45</sup>YOU, J.; WILLCOX, M. D.; MADIGAN, M. C.; WASINGER, V.; SCHILLER, B.; WALSH, B. J.; GRAHAM, P. H.; KEARSLEY, J. H.; LI, Y. Tear fluid protein biomarkers. *In*: MAKOWSKI, G. S. ed. **Advances in clinical chemistry**. San Diego: Elsevier, 2013. v. 62, p. 151-196.
- <sup>46</sup>CHEMICAL Book. **AMYLOID BETA-PROTEIN (1-38)**. Beijing, 2022. Disponível em: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB4218070.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4218070.htm). Acesso em: 09 fev. 2024.
- <sup>47</sup>NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. National Center for Biotechnology Information. **PubChem compound summary for CID 131954545, AMyloid beta-Protein (1-40)**. Bethesda, 2018. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/131954545>. Acesso em: 09 fev. 2024.
- <sup>48</sup>ECHELON Biosciences. **Beta Amyloid (1-42), human**. Salt Lake City, 2021. Disponível em: <https://www.echelon-inc.com/product/beta-amyloid-1-42-human/>. Acesso em: 09 fev. 2024.

- <sup>49</sup>NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. National Center for Biotechnology Information. **PubChem compound summary for CID 5757, Estradiol**. Bethesda, 2004. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Estradiol>. Acesso em: 09 fev. 2024.
- <sup>50</sup>NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. National Center for Biotechnology Information. **PubChem compound summary for CID 5870, Estrone**. Bethesda, 2004. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Estrone>. Acesso em: 09 fev. 2024.
- <sup>51</sup>NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. National Center for Biotechnology Information. **PubChem compound summary for CID 5994, Progesterone**. Bethesda, 2004. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Progesterone>. Acesso em 09 fev. 2024.
- <sup>52</sup>NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. National Center for Biotechnology Information. **PubChem compound summary for CID 2519, Caffeine**. Bethesda, 2004. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine>. Acesso em: 09 fev. 2024.
- <sup>53</sup>WATERS. **What does gradient curve 11 do in Empower 3 - WKB3489**. Millford, 2021. Disponível em: [https://support.waters.com/KB\\_Inf/Empower\\_Breeze/WKB3489\\_What\\_does\\_gradient\\_curve\\_11\\_do\\_in\\_Empower\\_3](https://support.waters.com/KB_Inf/Empower_Breeze/WKB3489_What_does_gradient_curve_11_do_in_Empower_3). Acesso em: 27 maio 2022.