



# A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS COMO FERRAMENTA PARA A DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM AMOSTRAS DE PLASMA SANGUÍNEO

Isabela de Fatima Zappa Costa

Adriana Arnosti Bonatti e Taís Betoni Rodrigues

Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo

isabelacosta@usp.br

## Objetivos

As xantinas são bases purínicas das quais derivam diversas moléculas estimulantes, como a cafeína e seus metabólitos. Devido à ação da cafeína no sistema nervoso central (SNC), hoje é uma das substâncias mais consumidas no mundo. No processo de absorção e metabolismo da cafeína pelo corpo humano surgem principalmente três compostos alcaloides que também fazem parte da classe das xantinas: paraxantina, teobromina e teofilina (FRANCIS S; CONTI M; HOUSLAY M, 2011). Existem estudos acerca de reações adversas e não desejadas devido ao uso excessivo desse composto bioativo. Desse modo, se faz necessário avaliar parâmetros que influenciam na absorção desta e seus efeitos dentro do organismo, como por exemplo, o horário de ingestão e seu uso posterior à realização de atividades físicas (BARRETO et al., 2021). Mesmo com o monitoramento da cafeína por agências mundiais de controle de substâncias em atletas, não existe um método definido para a análise dela em plasma sanguíneo. Assim, apesar de estudos positivos em relação à quantificação da cafeína e seus metabólitos em amostras biológicas, há espaço para aprimoramento e validação de um método robusto, rápido e com limite de quantificação satisfatório.

## Métodos e Procedimentos

A matriz utilizada foi plasma sanguíneo, cedido por meio de um projeto em colaboração com o grupo de pesquisa CROMA. O preparo de amostra foi feito por meio de precipitação de proteínas, com a avaliação de diferentes solventes. Após a adição do solvente, foi feita a centrifugação, secagem do sobrenadante, ressuspensão, centrifugação e coleta do sobrenadante. O método para a detecção e quantificação das xantinas (teobromina, paraxantina, teofilina e cafeína) foi desenvolvido em um sistema cromatográfico Acquity UPLC acoplado a um Xevo TQ-MS com a aquisição de dados pelo *software* MassLynx. A coluna utilizada foi uma Acquity UPLC BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm; Waters, EUA. Para a fase móvel, foram testadas diversas proporções, usando formiato de amônio 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  em água e metanol. Devido a problemas no equipamento e na etapa de validação, um novo método foi desenvolvido em um equipamento de HPLC-UV, com o uso de uma coluna InfinityLab Poroshell 120 EC C18 (2,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm; Agilent, EUA). A constituição da fase móvel utilizada foi a mesma do método UPLC-MS/MS, com mudanças de proporção ao longo dos testes realizados.

## Resultados

Para o preparo de amostra, devido à polaridade e mais fácil secagem, foi escolhida acetonitrila, na proporção de 4:1 (acetonitrila:plasma). A adição de etapa de secagem e ressuspensão possibilitou maior eficiência da precipitação de proteínas, que ocorreu devido a desnaturação das proteínas, alterando sua forma tridimensional, o que expõe grupos hidrofóbicos que normalmente não estão expostos por estarem no interior da molécula, o que aumenta a interação proteína-proteína e diminui a solubilidade (CAVALCANTI et al, 2010). A ressuspensão ocorreu com uma mistura de água e metanol (90:10), de modo a reproduzir constituição semelhante à da fase móvel inicial. Para o desenvolvimento do método UPLC-MS/MS, foram testados diferentes fluxos, de modo que o que apresentou melhor separação foi 0,30 mL.min<sup>-1</sup>, sendo um fluxo intermediário entre os testados. Para a fase móvel, foi utilizada uma mistura de formiato de amônio 5 mmol.mL<sup>-1</sup> em água e metanol, iniciando na proporção 90:10, chegando até 70:30 ao final do gradiente.

Para o desenvolvimento do método em um equipamento de HPLC-UV, a proporção inicial da fase móvel foi de 88:12, chegando até 40:60 ao final do gradiente. Foram testados diferentes fluxos, sendo que o que apresentou melhor separação foi de 0,30 mL.min<sup>-1</sup> e entre as temperaturas de forno testadas (40 °C, 50 °C e 55 °C), foi escolhida a de 55 °C para diminuir a pressão do sistema cromatográfico.

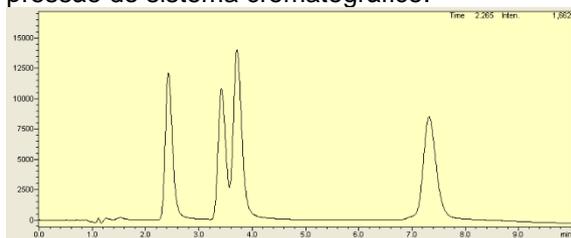


Figura 1: Cromatograma referente a análise das amostras de plasma sanguíneo fortificado com 1 ng/mL do mix de xantinas (teobromina, teofilina, paraxantina e cafeína), utilizando a coluna InfinityLab Poroshell 120 EC C18 (2,7 µm, 2,1 x 100 mm; Agilent, EUA).

## Conclusões

Apesar dos problemas encontrados durante a validação do método desenvolvido com a primeira técnica empregada (cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas), os resultados obtidos na segunda técnica (cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV-vis) se mostraram satisfatórios e com alto potencial de apresentarem os parâmetros necessários para a validação de acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 027/2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos.

Além disso, a participação do SIICUSP (Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP) deve propiciar a maior vivência acadêmica, de modo a complementar a experiência vivida no último ano.

## Agradecimentos

Meus agradecimentos ao Instituto de Química de São Carlos e ao grupo de Cromatografia CROMA, em especial a Adriana Arnosti Bonatti, Taís Betoni Rodrigues e ao Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto por todo o apoio ao longo do projeto. Agradeço também a USP pelo financiamento da bolsa de Iniciação Científica.

## Referências

- BARRETO, G. et al. Novel insights on caffeine supplementation, CYP1A2 genotype, physiological responses and exercise performance. **European Journal of Applied Physiology**, v. 121, n. 3, p. 749–769, 5 mar. 2021.
- CAVALCANTI, M. T. et al. Avaliação da estabilidade térmica das proteínas das amêndoas da faveleira. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 37-43, 2010.
- FRANCIS S; CONTI M; HOUSLAY M. **Phosphodiesterases as Drug Targets**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. v. 204.