

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

Renata Romanholi Pinhati

**QUANTIFICAÇÃO DE TRIPTOFANO EM PLASMA POR CROMATOGRÁFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA *ECO-FRIENDLY***

JUIZ DE FORA

2011

RENATA ROMANHOLI PINHATI

**Quantificação de Triptofano em Plasma por Cromatografia Líquida de Alta
Eficiência *Eco-friendly***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, área de concentração: Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Nádia Rezende Barbosa Raposo

JUIZ DE FORA, MG – BRASIL

2011

Pinhati , Renata Romanholi.

Quantificação de Triptofano em Plasma por Cromatografia Líquida de Alta Eificência *Eco-Friendly* / Renata Romanholi Pinhati. – 2011.
75 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Brasileira)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Cromatografia líquida. 2. Triptofano. 3. Serotonina . I. Título.

CDU 543.54

RENATA ROMANHOLI PINHATI

Quantificação de Triptofano em Plasma por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Eco-friendly

Objetivo: Aplicação de metodologia analítica para quantificação de triptofano em plasma utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência ecologicamente correta.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
MESTRADO EM SAÚDE BRASILEIRA

Data da aprovação: ___/___/___

Prof^a Dr^a Nádia Rezende Barbosa Raposo (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Humberto de Mello Brandão
Embrapa Gado de Leite – JF/MG

Dedico este trabalho a Deus,
aos meus pais, minha irmã,
e a todas as pessoas de boa-fé.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir o cumprimento de mais uma etapa em minha vida. Agradeço-Lhe pelo amparo e proteção durante todo tempo, sem Ele nada seria possível.

À orientadora Prof. Dra. Nádia R. B. Raposo, por me receber no NIQUA e acreditar em mim para que pudéssemos desenvolver este trabalho, agradeço-lhe pela oportunidade de aprendizado, crescimento, confiança, paciência e pelos exemplos de persistência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira.

Ao Dr. Felipe D'Alessandro F. Corchs, pela doação das amostras.

Às amigas e companheiras de bancada: Natália Calil, Fatinha e Aline Ferreira pelo apoio, ajuda, incentivo, discussões e idéias.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Farmácia que estiveram presentes desde a graduação.

Ao Pedro, Lucas, Romário, César, Hudson, Dirceu, Aneliza, Ana Paula, Érica, Carla, Francislene, Raquel, Fernanda, Edilene pela fraternidade, boas conversas e partilhas cotidianas.

Às amigas D. Siomara, Felícia e Terezinha pelas orações diárias.

Aos meus pais Vanda e Wanderley e minha irmã Fernanda obrigada pelo amor, apoio, confiança e por fazer dos meus sonhos os seus.

A todos que de alguma forma contribuíram para conclusão deste trabalho.

RESUMO

O triptofano é um aminoácido essencial e precursor da síntese de serotonina (5-HT). Variações nos níveis plasmáticos de 5-HT estão relacionadas com alterações de humor, ansiedade, depressão, sono, fadiga e supressão de apetite. Neste estudo foi desenvolvido um método simples, rápido e sensível para a quantificação de triptofano em plasma e que emprega a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector *diode array* (DAD) no comprimento de onda fixo de 267 nm. A separação foi realizada em coluna analítica ACE 5 C₁₈ (150 mm x 4,6 mm de diâmetro interno e tamanho da partícula de 5 µm), o tempo de corrida foi de 10 min. A fase móvel foi constituída por solução de acetato de sódio 5 mM e acetonitrila (92:8, v/v) e modo de eluição isocrática (1 mL min⁻¹). A preparação da amostra consistiu na desproteinização do plasma utilizando ácido perclórico 8%. O triptofano foi caracterizado no tempo de retenção de 5 min. A especificidade foi monitorada utilizando matrizes normais, lipêmicas e hemolizadas, não sendo observado nenhum pico interferente no tempo de retenção do triptofano. A linearidade do método foi detectada entre 0,5 a 30,0 µg mL⁻¹ e os coeficientes de variação do teste de precisão foram calculados intra e inter-dia para três concentrações (2,5; 5,0 e 15,0 µg mL⁻¹) apresentando variações de 0,26 a 1,30% (intra-dia) e 3,07 a 3,97% (inter-dia) respectivamente. Exatidão e recuperação satisfatórias foram obtidas por este método, além de utilizar pequenas quantidades de solvente orgânico, caracterizando a técnica como eficiente e ecologicamente amigável.

Palavras-chave: Triptofano. Serotonina. Cromatografia líquida

ABSTRACT

Tryptophan is an essential amino acid and a serotonin (5-HT) synthesis precursor. Altered plasma levels of 5-HT are related to humor and behavioral alterations, anxiety, depression, sleep, fatigue and appetite suppression. In this study, a simple, fast, sensitive and specific high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for determination of tryptophan with diode array detection (DAD) setting at programmed wavelength ($\lambda = 267 \text{ nm}$). The separation was carried out on an analytical column ACE 5 C₁₈ (150 mm x 4.6 mm internal diameter, 5 μm particle size) in less than 10 min. Mobile phase consisted of 5 mM sodium acetate and acetonitrile (92:8, v/v), isocratically eluted (1 mL min^{-1}). Sample preparation consisted of plasma deproteinization with 8% perchloric acid solution. Tryptophan was characterized by a retention time of 5 min. Specificity was monitored using lipemic and hemolysate plasma samples and any peak was observed at the same retention time of tryptophan. A linear range was detected from 0.5 to $30.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ and coefficients of variation calculated from intra and inter-day from 3 concentration (2.5; 5.0 e $15.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) assays precision were 0.26 – 1.30% and 3.07 – 3.97% respectively. Satisfactory accuracy and recovery were obtained by this method, and use small amounts of organic solvent, characterizing the technique as an efficient and eco-friendly.

Keywords: Tryptophan. Serotonin. Liquid chromatography

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1.	Estrutura química do triptofano.....	18
Ilustração 2.	Reação de síntese da 5-HT.....	21
Ilustração 3.	Via de metabolização da 5-HT em melatonina.....	24
Ilustração 4.	Perfil cromatográfico da solução-padrão de triptofano.....	46
Ilustração 5.	Perfil cromatográfico de amostras de plasma lipêmico, hemolisado e normal.....	48
Ilustração 6.	Perfil cromatográfico de amostra de paciente.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição da mistura de aminoácidos.....	34
Tabela 2.	Parâmetros de validação adotados pelas agência nacional e internacional.....	38
Tabela 3.	Análise de variância para estudo de validação.....	47
Tabela 4.	Precisão intra-dia e inter-dia para determinação de triptofano.....	49
Tabela 5.	Porcentagem de recuperação do triptofano.....	49
Tabela 6.	Estabilidade do triptofano.....	50
Tabela 7.	Estabilidade dos ciclos de congelamento e descongelamento.....	52
Tabela 8.	Parâmetros de validação para teste de robustez.....	54
Tabela 9.	Níveis plasmáticos de triptofano em pacientes.....	56

ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HIA - ácido 5-hidróxindolacético

5-HT - serotonina ou 5-hidroxitriptamina

5-HTP - 5-hidroxitriptofano

ACN - acetonitrila

AcNa - acetato de sódio

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEAPPesp - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

CN - cianonitrila

CV - coeficiente de variação

DAD – detector de arranjo de *diodos*

DP - desvio padrão

DTa - depleção aguda de triptofano

DTf - depleção falsa de triptofano

DP - depleção de triptofano

DSM - *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

EDTA - ácido etilenodiamonotetracético

FDA - *Food and Drug Administration*

FEBEM - Fundação Estadual para o Bem-Estar do Menor

FM – fase móvel

HCFMUSP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo

ICD - *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*

ICH - *International Conference on Harmonization*

ISRS - inibidor seletivo para recaptação de serotonina

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada

KYN - quinurenina

LCR - Líquor

LD - limite de detecção

LQ - limite de quantificação

min - minutos

mL - mililitros

mM - miliMolar

NFK - N-formilquinurenina

nm - nanômetro

OMS - Organização Mundial da Saúde

SNC - sistema nervoso central

TA – temperatura ambiente

TEPT - transtorno de estresse pós-traumático

TOC - transtorno obsessivo compulsivo

US Pharmacopeia - *United States Pharmacopeia*

SÍMBOLOS

g - gravidade

v/v - volume/volume

λ - comprimento de onda

μ - micrômetro

μg - micrograma

μL - microlitro

$^{\circ}C$ - graus Celsius

$\%$ - porcentagem

$>$ - maior

$<$ - menor

\geq - maior ou igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Depressão.....	24
2.2	Depleção aguda de triptofano.....	26
2.3	Aspectos analíticos do triptofano.....	27
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Geral.....	31
3.2	Específicos.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	Casuística.....	32
4.2	Aspectos éticos.....	33
4.3	Amostra biológica.....	33
4.4	Padrão de referência.....	35
4.5	Solventes, reagentes, acessórios e equipamentos.....	35
4.6	Métodos.....	36
4.6.1	<u>Preparo da amostra biológica</u>	36
4.6.2	<u>Condições cromatográficas para análise do triptofano</u>	37
4.6.3	<u>Validação do método cromatográfico para quantificação do triptofano</u>	37
4.6.3.1	Linearidade.....	38
4.6.3.2	Limite de detecção e Limite de quantificação.....	39
4.6.3.3	Especificidade.....	40

4.6.3.4	Precisão.....	40
4.6.3.5	Exatidão.....	41
4.6.3.6	Estabilidade.....	41
4.6.3.7	Recuperação.....	43
4.6.3.8	Robustez.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
6	CONCLUSÃO.....	59
7	PERSPECTIVAS.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	ANEXO.....	75

1 INTRODUÇÃO

O triptofano é um ácido aminado essencial e atua principalmente como o precursor da serotonina (5-HT), um importante neurotransmissor com atividade fisiológica (ZHANG *et al.*, 2009). Desempenha importantes papéis em processos fisiológicos (transmissão nervosa, resposta imune) e patológicos (depressão, estresse, distúrbios do sono e do apetite) (MOLNÁR-PERL, 2007). Os níveis plasmáticos de triptofano estão relacionados com alterações no humor, comportamento, ansiedade, sono, fadiga e a supressão do apetite (DEL BEM, 2005).

Do ponto de vista quantitativo, a proporção de triptofano utilizado para a produção de 5-HT é muito baixa: menos de 10% é metabolizado em 5-HT. A relação entre triptofano e 5-HT é geralmente considerada como o mecanismo envolvido no efeito depressivo da dieta baixa de triptofano (LE FLOCH; SEVE, 2007). Desse modo, os níveis plasmáticos desse aminoácido têm sido manipulados como um meio de entendimento da fisiopatologia da depressão (KAPEZINSKI *et al.*, 1998).

Como neurotransmissor, a 5-HT apresenta papel importante nas funções cerebrais de muitas doenças neuropsiquiátricas como: depressão, esquizofrenia, autismo, agressão e comportamento suicida. Nos seres humanos que sofrem de transtornos psiquiátricos, a deficiência de triptofano aumenta a ansiedade e irritabilidade podendo levar a depressão, que é atualmente a quarta causa de incapacitação em nível mundial, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), (RUSSO *et al.*, 2003).

A literatura apresenta alguns trabalhos baseados na separação e na quantificação do triptofano e de seus metabólitos ativos em sangue e tecidos empregando a CLAE (LAICH *et al.*, 2002; VIGNAU *et al.*, 2004; WANG; AIGUO, 2006; KAWAI *et al.*, 2007; XIAO *et al.*, 2008; LI; TANG; MU, 2011).

No entanto, muitos trabalhos que utilizam a técnica de CLAE, relatam a necessidade de utilização de grandes volumes de amostra, etapas demoradas e tediosas, emprego de eluição por gradiente (LAN-GAN *et al.*, 2009) coluna altamente sensível e multi-detectores durante uma mesma análise (ZHANG; HE; DING, 2009) tornando o método não aplicável a determinadas instalações de laboratórios clínicos (YUST *et al.*, 2004).

Dada a importância desse aminoácido em diversas funções fisiológicas, frente às diversificadas técnicas já disponíveis na literatura, utilizadas para quantificá-lo, buscou-se através deste trabalho otimizar uma metodologia simples e rápida para quantificação de triptofano em plasma humano, utilizando a CLAE ecologicamente correta, com detecção por arranjo de *diodos* (DAD).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Hopkins e Cole descobriram a molécula de triptofano no início de 1900, isolando-o a partir da caseína. Pouco tempo depois, Ellinge e Flamand definiram sua estrutura molecular nomeando-o como ácido 2-amino-3-indolpropiónico (Ilustração 1) (RICHARD *et al.*, 2009). O *L*-triptofano é um aminoácido essencial (ou seja, não é sintetizado no organismo humano e deve ser fornecido através da dieta). Para todos os aminoácidos, incluindo o *L*-triptofano, somente o isômero *L* é usado na síntese de proteína (MARKLOVÁ MAKOVICKOVÁ; KRÁKOROVÁ, 2000).

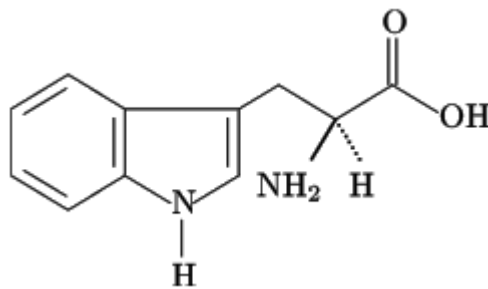


Ilustração 1. Estrutura química do *L*-triptofano.
Fonte: IUPAC, 2009.

Nos seres humanos, o nível de triptofano total no organismo é o mais baixo dentre todos os aminoácidos. É também o aminoácido encontrado em menor concentração nas proteínas dietéticas: 1% nas proteínas de origem animal e 1,4% nas proteínas de origem vegetal (ROSSI; TIRAPEGUI, 2004). Enquanto o consumo típico de muitas pessoas é aproximadamente de 900 a 1000 mg por dia, a ingestão diária recomendada para adultos é estimada entre 250 e 425 mg/dia, o que se traduz a uma ingestão de 3,5 a 6,0 mg/kg de peso corporal/dia. Dentre os alimentos ricos em triptofano, citam-se: o leite, o queijo, a carne de frango, a carne de peru, o

atum, o amendoim, o chocolate, a aveia, a banana, as ameixas secas e o pão (RICHARD *et al.*, 2009).

No plasma, cerca de 10% do triptofano circula na sua forma livre e 90% está ligado, principalmente, à albumina. O triptofano é ativamente transportado para o cérebro por um carreador que também transporta outros aminoácidos neutros e ramificados (ROSSI; CASTRO; TIRAPEGUI, 2003). Os níveis de triptofano cerebrais não são influenciados apenas por sua concentração no plasma, mas também pelas concentrações plasmáticas de outros cinco aminoácidos neutros (leucina, isoleucina, valina, fenilalanina e tirosina) para seu transporte e síntese de 5-HT cerebral. Dentre os aminoácidos competidores, o triptofano possui a menor concentração plasmática (50 mM), sendo estimada a razão entre triptofano e aminoácidos neutros de 1:100 (ROSSI; TIRAPEGUI, 2004).

Dentre as funções do triptofano, podem-se citar: contribuição no crescimento normal e síntese protéica, influência no sono, comportamento, fadiga, ingestão alimentar e precursor de vitamina B3 (niacina). Também estimula a secreção de insulina e hormônio do crescimento (ROSSI; TIRAPEGUI, 2004).

Koopmans e colaboradores (2006) em um estudo conduzido em porcos, observaram que animais quando tratados com uma dieta suplementada com 0,5% de triptofano apresentaram aumento nas atividades serotoninérgicas hipotalâmicas, com consequências benéficas no trato gastrointestinal e diminuição do estresse.

A ingestão de carboidratos aumenta o triptofano cerebral, promovendo, conseqüentemente, um aumento nos níveis de aminoácidos aromáticos no cérebro em relação aos aminoácidos de cadeia ramificada, pois estes vão para os músculos, devido à liberação de insulina. Isso ocorre devido ao fato de a insulina estimular o músculo a captar maior quantidade de aminoácidos de cadeia ramificada,

desequilibrando assim a concentração em favor do triptofano (TEFF; YOUNG, 1995; TAKEDA *et al.*, 2004).

O elevado nível de triptofano não-protéico mais facilmente absorvido pode contribuir para aumentar a variabilidade deste aminoácido no cérebro, influenciando assim a síntese de 5-HT. Portanto, torna-se relevante conhecer os níveis de triptofano não-protéico nos alimentos, considerando que é um dos aminoácidos limitantes do valor biológico em proteínas vegetais (COMAI *et al.*, 2007).

A 5-HT pertence ao grupo das aminas biogênicas (neurotransmissores), das quais fazem parte também as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina). É sintetizada a partir da descarboxilação de aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, tirosina e triptofano (MEEUSEM; DE MEIRLEIR, 1995). Conforme a Ilustração 2, o triptofano ao ser hidrolisado pela enzima triptofano hidroxilase forma o 5-hidroxitriptofano (5-HTP). A velocidade de conversão de triptofano em 5-HTP é a etapa limitante na produção de 5-HT e é influenciada por fatores como deficiência de vitamina B6, estresse e hipomagnesemia (PORTER *et al.*, 2008). Os níveis de 5-HT no cérebro são correlacionados com a provisão de 5-HTP. Este composto pode ser metabolizado em 5-HT fora do cérebro, mas quando isso acontece, sua contribuição para 5-HT cerebral é insignificante. Portanto, a atividade fisiológica da 5-HT depende amplamente da síntese da 5-HT no cérebro a partir de 5-HTP (DAS *et al.*, 2004).

O 5-HTP é um suplemento dietético popular que tem substituído o triptofano como um auxiliar no tratamento da depressão, para melhorar sintomas de fibromialgia, ajudar na perda de peso, prevenir dores de cabeça e ajudar pacientes que sofrem de insônia (BIRDSALL, 1998; DAS *et al.*, 2004).

Cerca de 70% da dose oral de 5-HTP vai para a corrente sanguínea e atravessa facilmente a barreira hematencefálica, aumentando efetivamente a síntese de 5-HT no sistema nervoso central (SNC) não necessitando de um transportador específico. Comparado ao transporte de triptofano, o transporte de 5-HTP torna-se vantajoso, pois o triptofano tem sua passagem para o cérebro prejudicada pela presença de outros aminoácidos neutros (MAGNUSSEN; NILSEN-KUDSK, 1980; DAS *et al.*, 2004).

Após a ação da triptofano descarboxilase, o 5-HTP dá origem a 5-HT, esta sofre ação da enzima monoamina oxidase e forma o 5-hidroxiindolacético (5-HIA) (ROSSI; TIRAPEGUI, 1999).

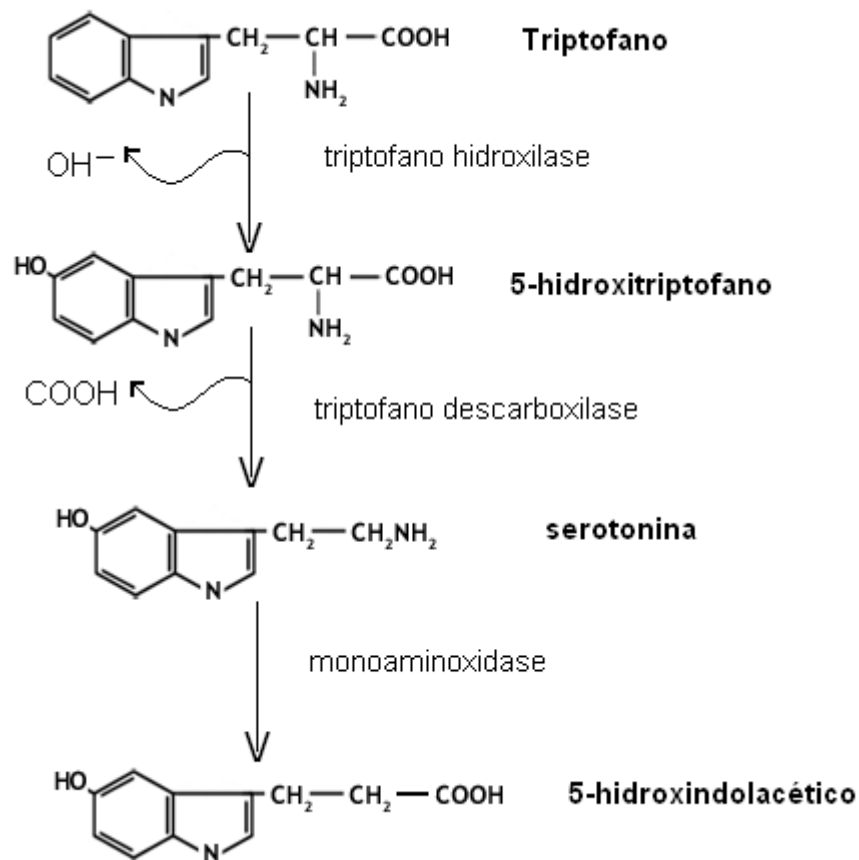


Ilustração 2. Reação de síntese da 5-HT.

Ersparmer e colaboradores (1930) iniciaram um estudo independente, cujo objetivo era extrair e caracterizar a substância que conferia propriedades peculiares às células enterocromafínicas da mucosa gastrointestinal. Seus experimentos levaram à descoberta, primeiro na mucosa e depois em outros tecidos, de um fator estimulador intestinal de natureza básica, o qual foi denominado enteramina. Em 1940, Ersparmer mostrou que esta enteramina presente em muitos tecidos de vertebrados e invertebrados era uma indolalquilamina. Este composto, ao ser preparado sinteticamente em 1951, apresentou todas as propriedades da 5-HT natural. Em 1952, Ersparmer e Asero identificaram a enteramina como 5-hidroxitriptamina ou 3-(β -aminoetil)-5-hidroxinol. Em meados da década de 1950, foi sugerido que a 5-HT atua como neurotransmissor no SNC de mamíferos (SANDERS-BUSCH; MAYER, 2010).

Dentre as ações da 5-HT, mediada por receptores na membrana celular, destacam-se: a contração nas circulações esplânica, renal, pulmonar e cerebral (KATZUNG; JULIUS, 2002). Induz também uma variedade de respostas cardíacas devido a estimulação ou inibição da atividade nervosa autônoma. Exerce também ações ionotrópicas e cronotrópicas positivas sobre o coração, que podem ser atenuadas pela estimulação simultânea de nervos aferentes a partir de barorreceptores e quimiorreceptores. Sobre as terminações do nervo vago produz reflexo, causando bradicardia extrema e hipotensão. Como resposta local dos vasos sanguíneos arteriais a 5-HT, pode ocorrer ação inibitória em decorrência da síntese estimulada de óxido nítrico e prostaglandinas (SANDERS-BUSCH; MAYER, 2010).

O triptofano, além de fazer parte de proteínas, é um precursor de compostos bioativos. Estes compostos são formados em duas rotas ou vias metabólicas específicas: via serotoninérgica e via das quinureninas. A via serotoninérgica,

quando ativada em plaquetas e neurônios, converte o triptofano no neurotransmissor 5-HT. Alguns tecidos são capazes de utilizar 5-HT para síntese do hormônio melatonina numa rota intermediada por N-acetilserotonina. Na via das quinureninas, o triptofano é oxidado a N-formil-quinurenina (NFK) que subsequentemente é transformado em L-quinurenina (KYN). A partir deste último, uma série de compostos com potencial atividade biológica, especialmente neurotóxica, é formada como, por exemplo: 3-hidroxi-quinurenina e o ácido quinolínico (STONE, 2001; WIDNER *et al.*, 2000).

A via metabólica das quinureninas está envolvida na patogênese de vários distúrbios neurológicos como: doença de *Alzheimer* (BARAN; JELLINGER; DECCKE, 1999), doença de *Parkinson* (MIRANDA *et al.*, 1999; OGAWA *et al.*, 1992), esquizofrenia (ERHARDT *et al.*, 2001) e esclerose múltipla (SAKURAI *et al.*, 2002).

A razão triptofano-quinurenina no plasma tem sido utilizada como uma ferramenta de diagnóstico em várias condições patológicas como: leucemia, síndrome do intestino irritável e câncer de próstata (JONG *et al.*, 2009).

Em outra rota metabólica da 5-HT, numa via alternativa, produz-se o hormônio melatonina sintetizado pela glândula pineal. A síntese da melatonina inicia-se com a serotonina, que é acetilada a N-acetilserotonina, e seguidamente orto-metilada, resultando na melatonina, conforme demonstrado na Ilustração 3. As enzimas responsáveis por estas duas fases são respectivamente: arilalquilamina N-acetiltransferase e hidroxindol-3-O-metiltransferase (RIBELAYGA *et al.*, 2000).

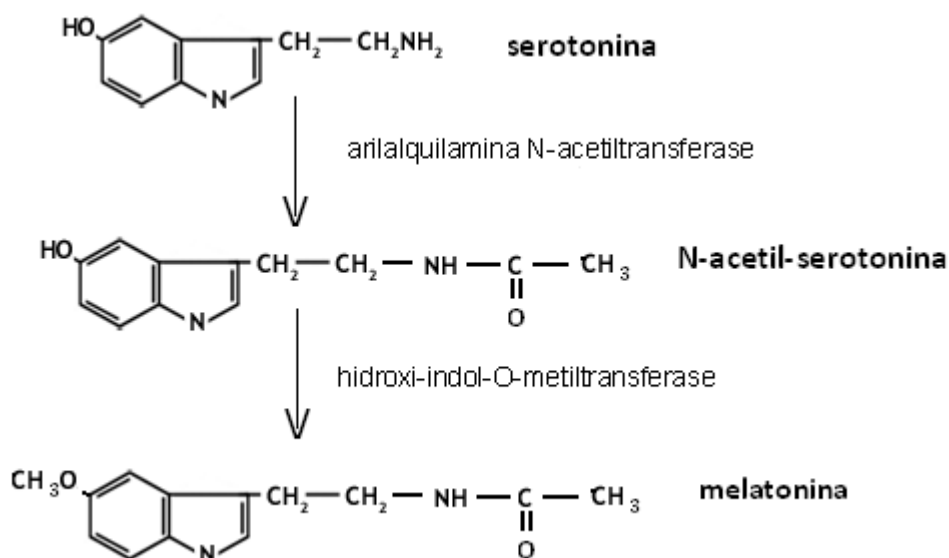


Ilustração 3. Via de metabolização da 5-HT em melatonina.

A regulação da atividade da glândula pineal se dá através da via do trato retino-hipotalâmico, tornando a melatonina como princípio fundamental para a adaptação do indivíduo e da espécie às flutuações temporais cíclicas do meio ambiente (SOARES *et al.*, 2003; MACCHI; BRUCE, 2004). Níveis elevados de 5-HT são detectados em mamíferos durante o dia, decaindo durante a fase noturna. Concomitantemente, ocorre o aumento da melatonina, pela maior conversão da 5-HT (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005).

2.1 Depressão

A depressão é uma condição médica comum, crônica e recorrente. Está frequentemente associada à incapacitação funcional e comprometimento da saúde física. Atualmente é abordada por duas diretrizes: *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD) e o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - 4ª revisão*, da *American Psychiatry*

Association (DSM-IV, APA, 1994). Este último classifica a depressão dentro dos transtornos do humor e também baseia a classificação nos episódios depressivos (DEL-BEN, 2005).

Na prática clínica sugere-se didaticamente, que a depressão seja considerada de duas maneiras: típica e atípica. As depressões típicas seriam aquelas que se apresentam através dos episódios depressivos, consoante às classificações internacionais (DSM-IV e ICD) e as depressões atípicas aquelas que se manifestam predominantemente através de sintomas ansiosos (pânico, fobia) e somáticos (<http://www.psiqweb.med.br>).

Os pacientes deprimidos apresentam limitação da suas atividades e bem-estar, além de uma maior utilização de serviços de saúde (FLECK; PERIZZOLO; BERLIM, 2003). A prevalência da depressão é duas a três vezes mais frequente em mulheres do que em homens, quando considerado estudos realizados em diferentes países, em diferentes comunidades e com pacientes que procuram serviços psiquiátricos (WEISSMAN *et al.*, 1996).

A depressão é o maior fator de risco das doenças cardiovasculares, aumentando em cinco a vinte vezes o risco em relação à maioria da população. Essa prevalência dobra a probabilidade de novos infartos do miocárdio no período de 12 meses (JOYNT; WHELLAN; O'CONNOR, 2003). Nos pacientes internados por qualquer doença física, a prevalência de depressão varia entre 22 a 33%, em pacientes que sofreram infarto recente é de 33% e em pacientes com câncer pode chegar a 47% (FLECK; PERIZZOLO; BERLIM, 2003).

Nos anos 90, a depressão foi estimada como a quarta causa específica de incapacitação, apresentando equivalência em relação à isquemia cardíaca, através de uma escala global para comparação de várias doenças. Para o ano de 2020, a

depressão está prevista como a primeira causa específica de incapacitação, em países em desenvolvimento e a segunda em países desenvolvidos (MURRAY; LOPEZ, 1997).

Em serviços de atenção primária e outros serviços médicos gerais, de 30 a 50% dos casos de depressão não são diagnosticados. Os motivos de sub diagnósticos advém de fatores relacionados a pacientes e médicos, tais como: preconceito por parte dos pacientes em relação ao diagnóstico de depressão e descrença em relação ao tratamento. Já os fatores relacionados aos médicos incluem: falta de treinamento e tempo, reconhecimento apenas dos sintomas físicos da depressão e identificação dos sintomas de depressão como uma reação "compreensível" (DAVIDSON; MELTZER-BRODY, 1999).

O prejuízo da função serotoninérgica tem sido implicado na etiologia de vários transtornos mentais, dentre eles: transtornos de ansiedade, depressão e transtornos relacionados ao controle do impulso. Isso se deve a alguns achados comuns a todos, ou pelo menos a parte desses transtornos, como redução na concentração do produto final do metabolismo de 5-HT, o 5-HIA no líquido (LCR), respostas hormonais atenuadas e desafios farmacológicos com substâncias que interferem na função serotoninérgica e alterações nas concentrações de receptores serotoninérgicos. Além disso, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) têm se mostrado efetivos no tratamento desses transtornos, o que se acredita ser devido ao aumento da neurotransmissão serotoninérgica (DEL BEM, 2005).

2.2 Depleção aguda de triptofano

Os ensaios clínicos para a determinação do triptofano no plasma dos pacientes são geralmente realizados através da técnica de depleção aguda de

triptofano (DTa). Esse procedimento é utilizado para manipular o funcionamento do sistema serotoninérgico a fim de avaliar os efeitos clínicos dessa intervenção (HOOD; BELL; NUTT, 2005) em várias condições psiquiátricas, particularmente na depressão (BELL; HOOD; NUTT, 2005).

Essa técnica consiste na administração de uma mistura de aminoácidos (sem triptofano), com um alto conteúdo de aminoácidos neutros. A mistura estimula a síntese de proteínas que requerem triptofano. Há uma concorrência entre os níveis de triptofano e aminoácidos neutros na barreira hematoencefálica. O consumo de triptofano plasmático no cérebro é, portanto, fortemente associado à proporção triptofano/aminoácidos neutros. Devido à grande quantidade de aminoácidos concorrentes, menos triptofano cruzará a barreira hematoencefálica (RIEDEL; KLAASSEN; SCHIMITT, 2002). Este método também tem sido aplicado em investigações de vários transtornos psiquiátricos, incluindo: transtorno bipolar (QUINTIN *et al.*, 2001), transtorno obsessivo compulsivo (TOC) (BERNEI *et al.*, 2006), esquizofrenia (SHARMA *et al.*, 1997), bulimia nervosa (KAYE *et al.*, 2000) e trauma no transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), (CORCHS, 2008). Embora esta seja uma técnica amplamente utilizada, a maioria destas pesquisas tem sido mais especificamente focadas no humor, depressão, memória e outras funções cognitivas e comportamentais.

2.3 Aspectos analíticos do triptofano

Vários esforços foram feitos para encontrar um método geral aplicável para análise de triptofano. Dentre as principais metodologias desenvolvidas para quantificação do aminoácido em amostra biológica citam-se: análise

espectrofotométrica direta, métodos colorimétricos (YUSTE *et al.*, 2004), espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (YAMADA *et al.*, 2008) e CLAE. Nesta metodologia, diversos tipos de detectores têm sido descritos, como por exemplo: espectrômetro de massa (ARVIDSSON *et al.*, 2007; YAMADA *et al.*, 2008; SCHEFOLD *et al.*, 2009), fluorescência (DELGADO-ANDRADE *et al.*, 2006; XIAO *et al.*, 2008; LUO, *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; LI, TANG, MU; 2011; SUN *et al.*, 2011), fluorimétrico (COZZI *et al.*, 2006) e ultravioleta (WANG; AIGUO, 2006; KAWAI *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2009; ZHEN *et al.*, 2011), DAD (BARIONE; BERTOLI; PISTELLI, 2008; PEDRAS *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2009).

Alguns pesquisadores tem proposto métodos para análises diretas como espectroscopia de segunda derivada (FLETOURIS *et al.*, 1993) e métodos colorimétricos que podem sofrer interferência da luz ambiente, devido à instabilidade da coloração das soluções. Segundo Yust e colaboradores (2004), a quantificação do triptofano envolve a realização de procedimentos demorados, análises tediosas sob condições especiais, que incluem uso de ácido clorídrico e aditivos como ácido tioglicólico (ASHWORTH, 1987), o ácido mercaptoentanosulfônico (GARDNER; CYSTEINE, 1984), mercaptoetanol (NG; PASCAUD; PASCAUD, 1987), o fenol (MURAMOTO; KAMIYA, 1990), a triptamina (PINTER-SZAKAES; MOLNÁR-PERL, 1990) ou enzima (GARCIA; BAXTER, 1992). A maioria desses processos envolve as seguintes etapas básicas: (a) hidrólise alcalina da amostra em ambiente a vácuo a 110 - 125°C por 16 a 20 h, (b) diluição do hidrolisado neutralizado ou não com ácido clorídrico concentrado a frio, com tampão cromatográfico, (c) clarificação do hidrolisado diluído, (d) cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), (e) determinação espectrofotométrica ou (f) fluorimétrica, levando-se em conta que

geralmente estes compostos estão em baixa concentração nas matrizes a serem analisadas (ARVIDSSON *et al.*, 2007).

Arvidsson e colaboradores (2007) propuseram um método eletroforético com modificação na parede de sílica, utilizando o 1-(4-iodobutil)4-azoniobiociclo[2,2,2]iódico, também chamado de M7C4I. Este método tem sido utilizado com sucesso para fundir a sílica na parede e promover um fluxo eletrosmótico estável.

No entanto, essas práticas analíticas apresentam desvantagens, pois a determinação de triptofano apresenta vários problemas analíticos, devido a sua natureza lábil na presença da luz, sensibilidade frente aos íons hidrogênio e oxigênio (reação redox), sendo necessário analisar imediatamente a amostra biológica após o processo de desproteinização (FRIEDMAN; CUQ, 1988), além de promoverem a utilização de grande quantidade de solvente orgânico.

O desenvolvimento das técnicas analíticas associado à implementação tecnológica permitiu o avanço no meio científico e o despertar do interesse para os conceitos de “Soluções Verdes para os Problemas Globais”, bem como para a aplicabilidade das técnicas *eco-friendly* (NARA, 2006). Tais técnicas visam principalmente, a redução no consumo de solventes orgânicos e a minimização de desperdícios em ambientes laboratoriais (ROJANARATA *et al.*, 2011), através de métodos de análises mais seguros, sem comprometer o seu desempenho, permitindo maior monitoramento ambiental e conseqüentemente a promoção da saúde (BULCÃO *et al.*, 2008). As técnicas *eco-friendly* são hoje consideradas o pilar da chamada “química verde” (ZHU *et al.*, 2009).

Entretanto, a CLAE ainda é o método mais utilizado para a determinação de triptofano em matrizes biológicas (MOLNÁR PERL, 1997), logo neste estudo foi

otimizado e validado um método simples, rápido e sensível para a quantificação de triptofano em plasma empregando a CLAE *eco-friendly* com detector DAD. Este último foi utilizado como método de escolha para a análise, devido à sua velocidade, eficiência e separação excelentes, tanto para o aminoácido e seus metabólitos (MARKLOVÁ; MAKOVICKOVÁ; KRÁKOROVÁ, 2000).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Aplicação de metodologia analítica para quantificação de triptofano em plasma utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência ecologicamente correta ou amigável (*eco-friendly*).

3.2 Específicos

Otimização dos parâmetros analíticos e posterior validação da metodologia, utilizando a técnica CLAE ecologicamente correta, com detecção por arranjo *diodos* (DAD).

Aplicar o método validado para quantificação de triptofano em amostras de plasma de pacientes com histórico de estresse pós-traumático, submetidos ao teste de depleção aguda de triptofano.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Os voluntários (pacientes) deste trabalho são oriundos de clínicas psiquiátricas e unidades básicas de saúde localizadas na cidade de São Paulo, ou, membros da comunidade que procuraram atendimento médico após conhecimento da pesquisa, a qual foi divulgada em veículos de comunicação como internet e jornais. Inicialmente foram selecionados 123 pacientes com TEPT como: testemunho de assassinato, tentativa de homicídio, acidente automobilístico, reféns de rebelião (FEBEM) e assalto. Todos os participantes faziam uso de ISRS, tais como: fluoxetina, sertralina, paroxetina e citalopram. Após entrevista prévia foram triados 65 pacientes, sendo que somente 13 deles chegaram a iniciar o procedimento laboratorial. No entanto, apenas 8 realizaram todas as etapas para execução do trabalho (CORCHS, 2008).

Todos os pacientes foram avaliados clinicamente antes dos testes de forma a garantir condições médicas seguras para a realização dos experimentos. Exames complementares foram realizados quando indicados clinicamente.

Seguindo o padrão de depleção do triptofano (DELGADO *et al.*, 1990), os pacientes foram expostos a dois testes separados por uma semana, dentre os quais a única diferença programada foi a presença (dia controle, DTf) ou ausência (dia DTa) de triptofano. Ambos os testes foram precedidos por 24 horas de uma dieta pobre em triptofano e jejum após a meia-noite, conforme orientação fornecida pelo pesquisador. A ordem dos dias DTa e DTf foi alocada de forma randomizada e os testes duplo-cegos.

4.2 Aspectos éticos

Esta pesquisa, em colaboração com a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEAPPesp – HCFMUSP) sob o número de protocolo 538/05, conforme Anexo.

4.3 Amostra biológica

Os participantes foram instruídos a tomar suas medicações normalmente nos dias dos testes e a chegar à unidade de pesquisa às 8h00 do dia marcado. Às 8h 30min coletou-se amostra de sangue para determinar os níveis plasmáticos basais de triptofano. Depois disso, os participantes descansavam em posição semi-supina na mesma sala de experimentos onde o restante dos procedimentos eram realizados. Após se habituarem a essa condição por 30 minutos, às 9h00, as medidas iniciais dos parâmetros subjetivos e cardiovasculares foram coletadas e às 9h 30min os pacientes ingeriram a fórmula de aminoácidos, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Composição da mistura de aminoácidos.

Ingredientes	Quantidade (g)
L-alanina	5,5
L-arginina*	4,9
L-cisteína HCl H ₂ O* δ	3,91
Glicina	3,2
L-histidina	3,2
L-isoleucina	8,0
L-leucina	13,5
L-lisina HCL	11,0
L-metionina*	3,0
L-fenilalanina	5,7
L-prolina	12,2
L-serina	6,9
L-treonina	6,5
L- tirosina	6,9
L-valina	8,9
Triptofano (dia DTf apenas)	2,3

* - Encapsulados e ingeridos 15 min antes da mistura líquida

δ - Contém L-cisteína 2,7g + HCl + H₂O

Fonte: Corchs, 2008.

Essa mistura continha 2,3g de triptotofano (dia controle; DTf) ou nenhum triptofano (dia DTa). Os aminoácidos fornecidos gentilmente pela Ajinomoto CO. INC. Os aminoácidos foram misturados a 150 mL de água e 5g de essência em pó nos sabores de baunilha, maracujá ou morango, segundo preferência do paciente. Devido ao sabor extremamente desagradável, os aminoácidos L-arginina, L-cisteína e L-metionina foram encapsulados e ingeridos separadamente 15 minutos antes da mistura líquida com os outros aminoácidos. As pacientes realizaram os testes nas duas primeiras semanas de seu ciclo menstrual, para diminuir a influência de fatores hormonais sobre os sintomas e ingeriram apenas 80% da quantidade total de

aminoácidos, por causa do menor peso corporal – esse procedimento leva a níveis plasmáticos de triptofano semelhantes aos obtidos em homens ao ingerirem 100% da mistura (CORCHS, 2008).

Durante os testes, os pacientes permaneceram sob dieta hídrica, ao final destes, às 15h 30min, uma nova amostra de sangue foi obtida para se determinar ocorrência ou não de depleção dos níveis plasmáticos de triptofano em relação às medidas de linha de base obtida às 8h 30min.

As amostras de plasma foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA. Posteriormente, o material biológico foi centrifugado (1200 g, 15 min) e as frações de plasma foram colocadas em criotubos, os quais foram armazenados em freezer à temperatura de - 80°C. O transporte do material biológico da cidade de São Paulo (SP) até Juiz de Fora (MG), foi realizado em caixas de isopor contendo gelo seco. No laboratório, as amostras foram acondicionadas em freezer à temperatura de - 80°C, até o momento da análise.

4.4 Padrão de referência

Utilizou-se padrão de referência primário de triptofano (teor de pureza de 98%, lote P831C004A), gentilmente doado pela Ajinomoto (São Paulo, Brasil).

4.5 Solventes, reagentes, acessórios e equipamentos

Para a realização deste estudo, utilizaram-se solventes e reagentes de grau HPLC ou analítico (p.a.), quando necessário, de diferentes fornecedores: acetonitrila (Tedia - Fairfield, EUA), metanol (Merck - Darmstadt, Alemanha), acetato de sódio e

ácido perclórico 8% (Merck - Darmstadt, Alemanha). Água ultrapurificada foi obtida diariamente pelo sistema de purificação de água *Master System* da Gehaka (São Paulo, Brasil).

Os acessórios utilizados, tais como pipetas automáticas com volumes ajustáveis e balões volumétricos, foram calibrados por empresa credenciada pela Rede Brasileira de Calibração.

Os equipamentos laboratoriais utilizados foram: lavadora ultrassônica Ultra Cleaner 1400 - Thorton Unique (São Paulo, Brasil), balança analítica HR 200 – A&D (Califórnia, EUA), vórtex Genie 2 – Scientific Industries (New York, EUA), centrífugas 5810R e 5417R - Eppendorf (Hamburgo, Alemanha), pHmetro B474 - Micronal (São Paulo, Brasil), cromatógrafo Shimadzu (Tóquio, Japão) com detector *diode array* (SPD-10A vp).

4.6 Métodos

4.6.1 Preparo da amostra biológica

Acrescentou-se a 500 μL da amostra (plasma), 50 μL de ácido perclórico 8%, para garantir a precipitação das proteínas da matriz biológica.

As amostras foram homogeneizadas em vórtex durante 1 minuto, a seguir foram centrifugadas: 1200 *g*, 15 min a temperatura de 4°C (Eppendorf 5417R) e o sobrenadante injetado no sistema cromatográfico (Shimadzu). As amostras de plasma foram submetidas ao mesmo processo de extração, independente do paciente ter sido submetido à ingestão da mistura (contendo ou não aminoácido).

4.6.2. Condições cromatográficas para análise de triptofano

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em sistema cromatográfico Shimadzu (Tóquio, Japão), equipado com: bombas LC-10AT Vp; controlador SCL-10A vp, amostrador automático SIL-10AF vp, detector de arranjo de *diodos* (DAD) SPD-10A vp fixado em 267 nm, degaseificador DGU-14A e alça de amostragem de 25 μL de capacidade. A separação foi realizada em coluna ACE 5 C₁₈ (150 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 μm) - Nova Analítica (São Paulo, Brasil), mantida à temperatura ambiente. A fase móvel (pH = 7,15) consistiu de uma solução aquosa de acetato de sódio (AcNa) 5 mM e acetonitrila (ACN) (92:8, v/v). A fase móvel foi previamente filtrada em filtro Millipore 0,22 μm , degaseificada em equipamento ultra-sônico por 15 min e armazenada a 4°C no prazo máximo de 15 dias após preparação. A vazão foi ajustada para 1 mL min⁻¹ em modo de eluição isocrático. Os cromatogramas foram obtidos e analisados através do software CLASS-Vp Shimadzu (Tóquio, Japão), versão 5.42.

4.6.3 Validação do método cromatográfico para quantificação de triptofano

Dentre as técnicas de validação que envolvem CLAE, podem-se destacar 4 diretrizes, internacionais: *US Food and Drug Administration* (FDA), *US Pharmacopeia* (USP), *International Conference on Harmonization* (ICH) e a diretriz nacional estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), segundo RDC n° 899 de 2003. A diferença básica entre as diretrizes USP e o ICH resume-se a uma questão de semântica. Tecnicamente, a USP faz considerações acerca de metodologia que envolve cromatografia em uma sessão separada, ao

passo que o ICH considera a parte de adequação do sistema como parte integrante da validação do método (SHABIR, 2003).

A Tabela 2 mostra uma relação de parâmetros descritos pelas diretrizes (internacional e nacional) para execução do processo de validação, que adotam a técnica de CLAE para análise de substâncias, drogas, produtos farmacêuticos e medicamentos.

Tabela 2. Parâmetros de validação adotados pelas agências nacional e internacional.

PARÂMETROS	AGÊNCIA
Linearidade	ICH, USP, ANVISA
Limite de detecção	ICH, USP, ANVISA
Limite de quantificação	ICH, USP, ANVISA
Exatidão	ICH, USP, ANVISA
Precisão	ICH, USP, ANVISA
Precisão intermediária	ICH, USP, ANVISA
Repetibilidade	ICH, USP ANVISA
Reprodutibilidade	ICH, USP, FDA
Especificidade	ICH, USP, FDA, ANVISA
Intervalo	ICH, USP
Estabilidade	FDA, ANVISA
Recuperação	FDA, ANVISA
Robustez	FDA, ANVISA
Adequação do sistema	FDA

A validação da metodologia para quantificação de triptofano realizada de acordo com a Resolução nº 899 de 2003 da ANVISA abordou os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, precisão, exatidão, estabilidade, recuperação, robustez.

4.6.3.1 Linearidade

A linearidade pode ser definida como a capacidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração

do analito na amostra. A linearidade do método foi avaliada através da preparação das soluções padrão de triptofano em concentrações de 0,5; 7,5; 15,0; 25,0 e 30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a fim de avaliar uma relação linear entre as concentrações de triptofano e as áreas dos picos obtidos. Dentro deste objetivo, os valores de cada nível de concentração foram analisados estatisticamente pelo teste de análise de variância (ANOVA) (MONTGOMERY, 2004; NETTO; SCARMINIO; BRUNS, 2010), a fim de se obter o valor do coeficiente de correlação da curva analítica.

4.6.3.2 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas, devendo ser de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base. Tal parâmetro foi determinado através da análise de soluções-padrão com concentrações conhecidas e decrescentes de triptofano, até o menor nível detectável.

O LQ é a menor quantidade do analito, presente em uma amostra, que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas, devendo ser, no mínimo, 5 vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção do analito.

Estes parâmetros foram determinados por meio da análise de soluções contendo concentrações conhecidas e decrescentes de triptofano até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis.

O LD e o LQ foram determinados a partir de três curvas de calibração padrão e foram calculadas conforme mostrado na Equação (1) e na Equação (2).

$$(1) \quad LD = S \frac{3}{a}$$

$$(2) \quad LQ = S \frac{10}{a}$$

onde a é a inclinação da curva de calibração e S é o desvio padrão do intercepto y .

4.6.3.3 Especificidade

Especificidade pode ser definida como sendo a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto na presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Este parâmetro foi determinado a partir da comparação dos cromatogramas das soluções-padrão de triptofano com o das amostras biológicas. Picos bem resolvidos e simétricos demonstraram a especificidade do método.

Para a determinação da especificidade do método bioanalítico, foram utilizadas amostras de plasma brancos obtidas de indivíduos sadios, sendo tais amostras classificadas em: normais, lipêmicas e hemolisadas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com solução aquosa do analito.

4.6.3.4 Precisão

Segundo a ANVISA (Resolução nº 899 de 2003), precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. O estudo da precisão incluiu a repetibilidade (precisão intra-dia) e a precisão intermediária (precisão inter-dia). A precisão do método foi determinada através da análise das amostras plasmáticas contendo

triptofano, em três concentrações diferentes: 2,5; 5,0; 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As análises realizadas no mesmo dia determinaram a precisão intra-dia com o número de réplicas igual a 5 para cada concentração e as análises realizadas em 3 dias diferentes e consecutivos determinaram a precisão inter-dia com um número de réplicas igual a 15 para cada concentração.

4.6.3.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor real, devendo ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo.

A exatidão do método foi avaliada utilizando-se 3 concentrações: baixa (2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), média (5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e alta (15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se 5 determinações por concentração.

Determinou-se a exatidão conforme a utilizada no ensaio de precisão, sendo expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, de acordo com a Equação (3):

$$(3) \quad \text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

4.6.3.6 Estabilidade

De acordo com as normas estabelecidas no processo de validação de métodos bioanalíticos (Resolução nº 899 de 2003 da ANVISA), o analito em questão deverá

ter seu estudo de estabilidade avaliado em matriz biológica e em solução-padrão, de acordo com os seguintes parâmetros: armazenamento de curta duração (temperatura ambiente), armazenamento de longa duração (congelamento) e ciclos de congelamento e descongelamento.

No estudo da estabilidade de curta duração, utilizou-se 3 amostras controle nas seguintes concentrações: baixa ($5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), média ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e alta ($25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), cada amostra permaneceu à temperatura ambiente por período de 4 a 24 horas e, posteriormente, analisadas.

No estudo da estabilidade de longa duração utilizou-se 3 amostras controle nas seguintes concentrações: baixa ($5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), média ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e alta ($25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) mantidas à temperatura nas temperaturas de 4°C , -20°C e -80°C por 7, 15 e 30 dias após a data do preparo.

Na estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento utilizou-se 3 amostras nas concentrações: baixa ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), média ($5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e alta ($15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) submetidas às seguintes condições de armazenamento: 4°C , -20°C e -80°C mantidas por 24h e, posteriormente, submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas à temperatura indicada para o armazenamento por mais 24h e assim sucessivamente até a finalização de 3 ciclos consecutivos. Ao final de cada etapa, as amostras foram analisadas.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos na análise das amostras preparadas inicialmente. As amostras foram consideradas estáveis quando não se observar desvio padrão superior a 10% do valor obtido nas amostras recém preparadas.

4.6.3.7 Recuperação

A recuperação corresponde à eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação, sendo expressa como a porcentagem de recuperação do analito obtido após análise comparativa com o padrão puro não submetido ao pré-tratamento.

Porcentagens de recuperação do analito próximos a 100% são desejáveis, porém admite-se valores superiores ou iguais a 85%.

A recuperação foi estimada através da quantificação prévia de um *pool* de plasma *in natura* e posteriormente fortificado com solução padrão de triptofano nas concentrações de 5,0; 10,0 e 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A recuperação da amostra foi expressa como: $\{[(\text{concentração experimental} - \text{a concentração do } \textit{pool} \text{ de plasma}) / \text{quantidade fortificada}] \times 100\}$.

4.6.3.8 Robustez

A robustez de um método analítico pode ser definida como a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos indicando sua confiança durante o uso normal. A robustez do método foi avaliada através de variáveis, tais como: fase móvel, taxa de fluxo e tipo de coluna cromatográfica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação de triptofano em plasma através da utilização da CLAE tornou-se o método de escolha para determinação deste aminoácido (YUST *et al.*; 2004; VIGNAU *et al.*; 2004; DELGADO-ANDRADE *et al.*; 2006; WANG, TANG; 2006; LAN-GAN *et al.*; 2009; ZHANG *et al.*, 2009; ZHANG; HE; DING, 2009).

Em CLAE por fase reversa, é comum a utilização de solventes orgânicos como ACN e metanol, para promoção da eluição e melhor separação do analito (JEN; HSIAO; LIU, 2002). No entanto, os resíduos gerados no processo cromatográfico nem sempre são tratados para posterior descarte, provocando no meio ambiente o acúmulo de substâncias que contribuem para o aumento do impacto ambiental.

Dentro deste contexto, o método proposto foi otimizado com o objetivo de utilizar a menor quantidade de solvente orgânico. Assim, após a extração de triptofano do plasma com ácido perclórico 8%, a separação foi realizada em cromatógrafo empregando coluna de fase reversa e fase móvel composta por solução 5 mM de AcNa e ACN (92:8, v/v).

Durante os testes, detectou-se que pequenas quantidades de ACN interferem no desempenho do método, podendo até mesmo impedir a detecção do pico cromatográfico. Logo, a composição da fase móvel contendo apenas 8% de ACN pôde ser considerada uma técnica *eco-friendly*, quando comparada com outros trabalhos, que descrevem a quantificação de triptofano por CLAE. Dentre esses trabalhos citam-se: a quantificação de triptofano e outros metabólitos em plasma por CLAE acoplada a espectrômetro de massa com detecção por *electrospray ionization* e fase móvel composta por 3 soluções: A (2,1% ácido fórmico), B (2,1% ácido

fórmico e 40% ACN) e C (2,1% ácido fórmico e 90% ACN) (AMIRKHANI *et al.*; 2002), a determinação de triptofano e seus metabólitos por CLAE utilizando detecção por UV e fluorescência com derivatização pré-coluna utilizando como fase móvel as soluções: A (0,1 M acetato de sódio) e B (0,1 M AcNa, ACN e metanol) nas razões de volume (44/46/10, v/v) (MÓLNAR-PERL; PRESITS, 2003), a quantificação de triptofano em suplementos esportivos e ingredientes a base de leite empregando CLAE com detecção por fluorescência tendo como composição da fase móvel: ACN e água (25:75, v/v) (ANDRADE *et al.*; 2006), e a quantificação de triptofano em cultura de células através da CLAE acoplada a espectrômetro de massa com detecção por *electrospray ionization* tendo como fase móvel: solução 5 mM de formiato de amônio e metanol (50:50, v/v) (YAMADA *et al.*; 2008).

De acordo com a descrição acima, observa-se que o consumo destes solventes é elevado, pois contribuem com cerca de 25 a 90% de ACN e 10 a 50% de metanol como constituinte da fase móvel, valores que colocam em questão a contaminação ambiental gerada nessas análises, bem como a exposição ocupacional do analista.

A análise do triptofano requer atenção especial, principalmente, quando considerado fatores como: os baixos níveis em fluidos biológicos, a necessidade de tratamento das amostras antes da injeção no sistema CLAE e a labilidade. Com relação ao tratamento prévio das amostras, há uma variabilidade de procedimentos que descrevem a desproteção de amostras biológicas através do uso de ácido perclórico, ácido acético ou hidróxido de sódio (ZHANG *et al.*; 2009; WANG; AIGUO, 2006; JONG, 2009).

A labilidade do triptofano refere-se a perda das características físico-químicas do aminoácido, logo o processo de análise deve ser realizado sob condições que

não prejudiquem a eluição do analito, e não comprometam a detecção do mesmo no sistema cromatográfico, pois o triptofano é sensível às interações redox, especialmente em meios fortemente ácidos (MOLNÁR-PERL, 2007). Para tanto, torna-se necessário que as etapas prévias para preparo da amostra biológica, assim como a análise cromatográfica, tenham um tempo de execução pré-definidos de acordo com a técnica a ser adotada. Nesse trabalho, a corrida cromatográfica ocorreu num intervalo de 10 min, tendo o analito um tempo de retenção (t_r) de 5,1 min, demonstrando que o t_r do triptofano mostrou-se inferior, ou seja com eluição prévia num tempo menor, quando comparado com outros trabalhos descritos que tiveram como t_r do triptofano os seguintes valores: 9,83 min (MÓLNAR-PERL, 2003), 11,94 min (YAMANDA, 2008), 9,5 min (LI; TANG; MU, 2011), 6,6 min (ZHEN *et al.*, 2011).

A Ilustração 4, mostra um cromatograma típico, obtido a partir da extração de uma amostra de plasma acrescida com triptofano, demonstrando o tempo de retenção (t_r) do analito em 5,1 min.

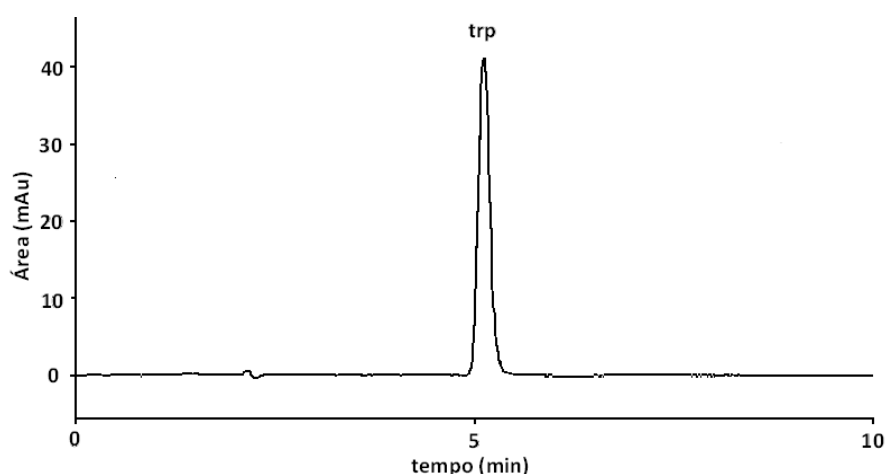


Ilustração 4. Perfil cromatográfico da solução-padrão de triptofano ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Antes da aplicação do método em plasma de humanos, executou-se a validação da metodologia aqui proposta. A linearidade foi avaliada em uma curva de calibração da concentração do triptofano *versus* a área do pico ($x = \mu\text{g mL}^{-1}$, $y = \text{mAu}$). A curva de calibração foi obtida através de experimentos realizados em duplicata, tendo a seguinte equação: $y (\pm 3.591,22) = 29.976,76 (\pm 86,79) x - 1026,19 (\pm 1.649,75)$, com $R^2 = 0,99993$. A linearidade do método foi também avaliada através da análise de variância, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Análise de variância para o ajuste do modelo de previsão para o modelo de validação.

Fonte de variação	Soma Quadrática (SQ)	Números de graus de liberdade	Média Quadrática (MQ)
Modelo	$1,06 \times 10^{12}$	1	$1,06 \times 10^{12}$
Resíduos	$7,10 \times 10^7$	8	$8,88 \times 10^6$
Falta de ajuste	$5,46 \times 10^7$	3	$1,82 \times 10^7$
Erro puro	$1,64 \times 10^7$	5	$3,28 \times 10^6$
Total	$1,06 \times 10^{12}$	9	$1,06 \times 10^{12}$

% de variação explicada pela regressão: 99,99
 % máxima de variação explicável: 99,99

O teste de significância da regressão remete um valor de $F_{\text{calculado}} (\text{MQ Modelo} / \text{MQ Resíduo}) = 119289,08$, maior do que $F_{\text{crítico } 0,05, v_1 = 1, v_2 = 8} = 5,32$, o que confirma a existência de uma relação linear significativa entre as duas variáveis, com 95%. O teste de falta de ajuste de valor $F_{\text{calculado}} (\text{MQ Falta de ajuste} / \text{MQ Erro puro}) = 5,55$, maior do que $F_{\text{crítico } 0,05, v_1 = 3, v_2 = 5} = 5,41$, com 95% de confiança. Através destes resultados, pode-se observar que há falta de ajuste no método, no entanto, a porcentagem de variação explicada é muito próxima (matematicamente igual) ao valor máximo que pode ser aplicado pelo modelo, logo recomenda-se o uso da curva analítica, pois de

acordo com a equação obtida, prevê-se que a quantificação dos níveis de triptofano nas amostras biológicas estarão muito próximas dos valores reais.

Assim, os resultados gerados quando se usa a equação do modelo para prever os níveis de triptofano nas amostras serão muito próximos dos valores reais.

O LD foi de $0,27 \mu\text{g mL}^{-1}$ de triptofano com $DP = 0,027$ e $CV = 10,09\%$. O LQ foi de $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$, com $DP = 0,011$ e $CV = 1,98\%$, para cinco repetições.

A especificidade do método foi obtida através da comparação entre os cromatogramas da amostra de plasma normal, lipêmico e hemolisado, conforme recomendação da RDC 899, não sendo observado nenhum pico cromatográfico no tempo de retenção do triptofano, conforme Ilustração 5. As amostras foram injetadas no cromatógrafo individualmente e acrescidas de triptofano nas seguintes concentrações: amostra lipêmica ($7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), hemolisada ($7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e amostra normal ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

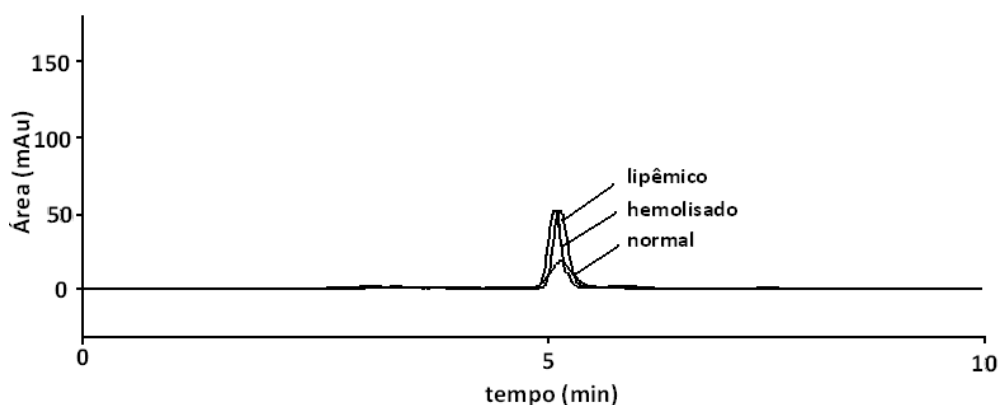


Ilustração 5. Perfil cromatográfico de amostras de plasma: normal, lipêmico e hemolisado.

A precisão do método foi calculada intra e inter-dia, a partir de três concentrações ($2,5$; $5,0$ e $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Precisão intra-dia e inter-dia para determinação de triptofano plasmático.

Concentração	Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DP	CV (%)
Intra-dia (n=5)			
2,5	2,60	0,007	0,26
5,0	4,98	0,036	0,72
15,0	15,11	0,196	1,30
Inter-dia (n=15)			
2,5	2,54	0,10	3,97
5,0	4,88	0,16	3,29
15,0	14,80	0,45	3,07

A exatidão do método mostrou-se 104,13% no nível de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, 99,54% no nível de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 100,78% no nível de $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, em relação a quantidade de triptofano nas amostras. A variação na porcentagem encontrada relaciona-se com os possíveis erros analíticos de preparação da amostra biológica, como dificuldade de pipetagem da matriz plasmática devido a sua viscosidade, bem como a utilização de um mesmo *pool* de plasma do início ao fim de todas as análises.

A recuperação do método foi estimada pelo acréscimo de solução padrão de triptofano no plasma em concentrações de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. A Tabela 5 mostra os resultados de recuperação para as amostras dentro da faixa de 94,32 a 99,80% (CV < 2,00%).

Tabela 5. Porcentagem de recuperação de triptofano.

Recuperação (n=3)	Média (%)	DP	CV.(%)
$5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	99,80	0,05	0,99
$10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	96,40	0,05	0,56
$25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	94,32	0,25	1,08

n=número de réplicas para cada concentração; DP= desvio-padrão; CV= coeficiente de variação.

Com relação à estabilidade, foram consideradas estáveis soluções-padrão em fase móvel e plasma, que apresentaram perda de teor de triptofano < 10% (Tabela 6). As soluções-padrão de triptofano em fase móvel mantiveram-se estáveis durante 6 horas à temperatura ambiente e a -20 °C por 7 dias. No plasma, a estabilidade foi verificada por um período de 2 horas a temperatura ambiente. Em -20 °C e -80°C, o triptofano não apresenta estabilidade, pois houve perda \geq 10% no valor da concentração da amostra, quando comparado com o valor medido antes do armazenamento. As soluções também não apresentam estabilidade durante os ciclos de congelamento e descongelamento (Tabela 7). Esses resultados confirmam que o triptofano é uma substância instável, principalmente no meio reativo, sendo necessário monitorar o tempo de manipulação do analito para posterior análise.

Tabela 6. Estabilidade do triptofano.

Padrão	Tempo	Temperatura de armazenamento	Meio	Concentração	Perda (%)
5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0	TA	FM	4,62	7,60
	2	TA	FM	4,57	8,60
	4	TA	FM	4,55	9,00
	6	TA	FM	4,55	9,00
	7 dias	4°C	FM	4,25	15,00
	15 dias	4°C	FM	4,20	16,00
	30 dias	4°C	FM	3,41	31,80
	7 dias	-20°C	FM	4,58	8,40
	15 dias	-20°C	FM	4,15	17,00
	30 dias	-20°C	FM	4,07	18,60
	30 dias	-80°C	FM	3,91	21,80
	0	TA	Plasma	4,87	2,60
	2	TA	Plasma	4,55	9,00
	4	TA	Plasma	-	-
	6	TA	Plasma	-	-
	7 dias	4°C	Plasma	4,11	17,80
	7 dias	-20°C	Plasma	4,23	15,40
	30 dias	-80°C	Plasma	4,33	13,40

Padrão	Tempo	Temperatura de armazenamento	Meio	Concentração	Perda (%)
10 µg mL ⁻¹	0	TA	FM	9,31	6,90
	2	TA	FM	9,21	7,90
	4	TA	FM	9,3	7,00
	6	TA	FM	9,09	9,10
	7 dias	4°C	FM	8,97	10,30
	15 dias	4°C	FM	8,75	12,50
	30 dias	4°C	FM	6,45	35,50
	7 dias	-20°C	FM	9,37	6,30
	15 dias	-20°C	FM	8,77	12,30
	30 dias	-20°C	FM	7,36	26,40
	30 dias	-80°C	FM	7,93	20,70
	0	TA	Plasma	9,61	3,90
	2	TA	Plasma	9,31	6,90
	4	TA	Plasma	-	-
6	TA	Plasma	-	-	
7 dias	4°C	Plasma	8,76	12,40	
7 dias	-20°C	Plasma	9,00	10,00	
30 dias	-80°C	Plasma	8,55	14,50	
25 µg mL ⁻¹	0	TA	FM	24,13	3,48
	2	TA	FM	24,01	3,96
	4	TA	FM	23,80	4,80
	6	TA	FM	23,35	6,60
	7 dias	4°C	FM	18,25	27,00
	15 dias	4°C	FM	17,19	31,24
	30 dias	4°C	FM	15,88	36,48
	7 dias	-20°C	FM	23,13	7,48
	15 dias	-20°C	FM	20,82	16,72
	30 dias	-20°C	FM	17,34	30,64
	30 dias	-80°C	FM	21,00	16,00
	0	TA	Plasma	24,00	4,00
	2	TA	Plasma	22,75	9,00
	4	TA	Plasma	-	-
6	TA	Plasma	-	-	
7 dias	4°C	Plasma	19,78	20,88	
7 dias	-20°C	Plasma	20,99	16,04	
30 dias	-80°C	Plasma	19,45	22,20	

TA: temperatura ambiente; FM: fase móvel

(-) amostras com coloração branca leitosa e consistência de gelatina não submetidas a injeção no cromatógrafo.

Tabela 7. Estabilidade dos ciclos de congelamento e descongelamento.

Padrão	Ciclo	Temperatura de armazenamento	Meio	Concentração	Perda (%)
2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0	TA	FM	2,47	1,20
	1°	4°C	FM	2,12	15,20
	2°	4°C	FM	1,66	33,60
	3°	4°C	FM	1,17	53,20
	1°	-20°C	FM	2,22	11,20
	2°	-20°C	FM	2,10	16,00
	3°	-20°C	FM	1,78	28,80
	1°	-80°C	FM	2,15	14,00
	2°	-80°C	FM	1,96	21,60
	3°	-80°C	FM	0,78	68,80
	0	TA	Plasma	2,46	1,60
	1°	4°C	Plasma	2,01	9,60
	2°	4°C	Plasma	1,97	1,20
	3°	4°C	Plasma	0,99	60,40
	1°	-20°C	Plasma	2,21	11,60
	2°	-20°C	Plasma	1,87	25,20
	3°	-20°C	Plasma	1,02	59,20
	1°	-80°C	Plasma	2,22	11,20
2°	-80°C	Plasma	1,94	22,40	
3°	-80°C	Plasma	1,33	46,80	
5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0	TA	FM	4,62	7,60
	1°	4°C	FM	4,15	17,00
	2°	4°C	FM	3,98	20,40
	3°	4°C	FM	3,24	35,20
	1°	-20°C	FM	4,15	17,00
	2°	-20°C	FM	4,07	18,60
	3°	-20°C	FM	3,87	22,60
	1°	-80°C	FM	4,58	8,40
	2°	-80°C	FM	4,25	15,00
	3°	-80°C	FM	3,98	20,40
	0	TA	Plasma	4,87	2,60
	1°	4°C	Plasma	4,11	17,80
	2°	4°C	Plasma	3,58	28,40
	3°	4°C	Plasma	2,25	55,00
	1°	-20°C	Plasma	4,55	9,00
	2°	-20°C	Plasma	4,19	16,20
	3°	-20°C	Plasma	4,05	19,00
	1°	-80°C	Plasma	4,56	8,80
2°	-80°C	Plasma	4,38	12,40	
3°	-80°C	Plasma	3,94	21,20	

Padrão	Ciclo	Temperatura de armazenamento	Meio	Concentração	Perda (%)
15,0 µg mL ⁻¹	0	TA	FM	14,87	0,86
	1°	4°C	FM	14,22	5,20
	2°	4°C	FM	13,25	11,67
	3°	4°C	FM	12,15	19,00
	1°	-20°C	FM	14,37	4,20
	2°	-20°C	FM	13,92	7,20
	3°	-20°C	FM	12,65	15,67
	1°	-80°C	FM	14,11	5,93
	2°	-80°C	FM	13,69	8,73
	3°	-80°C	FM	12,56	16,27
	0	TA	Plasma	14,67	2,20
	1°	4°C	Plasma	14,03	6,47
	2°	4°C	Plasma	13,27	11,53
	3°	4°C	Plasma	11,99	20,07
	1°	-20°C	Plasma	14,36	4,27
	2°	-20°C	Plasma	13,68	8,80
	3°	-20°C	Plasma	13,01	13,27
	1°	-80°C	Plasma	14,23	5,13
	2°	-80°C	Plasma	13,39	10,73
	3°	-80°C	Plasma	13,00	13,33

TA: temperatura ambiente; FM: fase móvel

Para avaliar a robustez, os seguintes parâmetros foram testados: o efeito do teor de solvente orgânico na fase móvel, o efeito da taxa de fluxo da fase móvel e o tipo de coluna cromatográfica. A Tabela 8 mostra os resultados do estudo de robustez.

Tabela 8. Parâmetros para avaliação do teste de robustez do método proposto.

Composição da fase móvel	Coluna	Fluxo (mL min ⁻¹)	Tempo de retenção (tr, min)
Tampão AcNa (pH=7)	C ₁₈	1,0	-
Tampão AcNa : ACN (99:1, v/v)	C ₁₈	1,0	-
Tampão AcNa : ACN (99:1, v/v)	C ₁₈	1,5	-
Tampão AcNa : ACN (98:2, v/v)	C ₁₈	1,0	8,0
Tampão AcNa : ACN (98:2, v/v)	C ₁₈	1,5	6,0
AcNa 5 mM : ACN (92:8, v/v)	C ₁₈	0,8	5,2
AcNa 5 mM : ACN (92:8, v/v)	C ₁₈	1,0	5,1
AcNa 5 mM : ACN (92:8, v/v)	C ₁₈	1,2	5,0
AcNa 5 mM : ACN (92:8, v/v)	CN	1,0	-

AcNa = acetato sódio, ACN = acetonitrila, CN = cianonitrila

(-) = nenhum pico cromatográfico foi observado, nas condições testadas

As soluções-padrão de triptofano foram preparadas e analisadas utilizando a fase móvel contendo diferentes quantidades de ACN (1, 2 e 8%). Com o aumento da quantidade de ACN, o tempo de retenção do analito diminuiu. Usando a fase móvel contendo 8% de ACN, a área do pico cromatográfico foi aumentada, mas a fase móvel contendo tampão acetato ou apenas 1% de ACN não promoveu eluição do triptofano. O tempo de retenção do analito foi diminuído, aumentando a vazão para 1,5 mL min⁻¹, entretanto, houve aumento da pressão do sistema cromatográfico (de 145 para 235 Kgf), podendo colocar o sistema de cromatografia em risco e/ou reduzir a vida média da coluna cromatográfica. Nenhum pico cromatográfico foi observado ao utilizar a coluna analítica CN.

Com base nesses resultados, observou-se que pequenas variações dos parâmetros analíticos podem tornar a análise de triptofano por CLAE uma prática difícil e, conseqüentemente, comprometer os resultados alcançados com o método. Assim, a fase móvel composta de solução de AcNa 5 mM : ACN (92:8, v/v), vazão de 1 mL min⁻¹ e coluna analítica C₁₈ foram caracterizados como as melhores

condições para a aplicação do método analítico, devido à sua seletividade, precisão e exatidão aceitáveis. Além disso, enfatiza o consumo de uma pequena porcentagem de ACN, em comparação com outros métodos robustos já descritos, que utilizam grandes quantidades de solvente orgânico. Assim sendo, este método pode ser considerado ecologicamente correto ou amigável (*eco-friendly*).

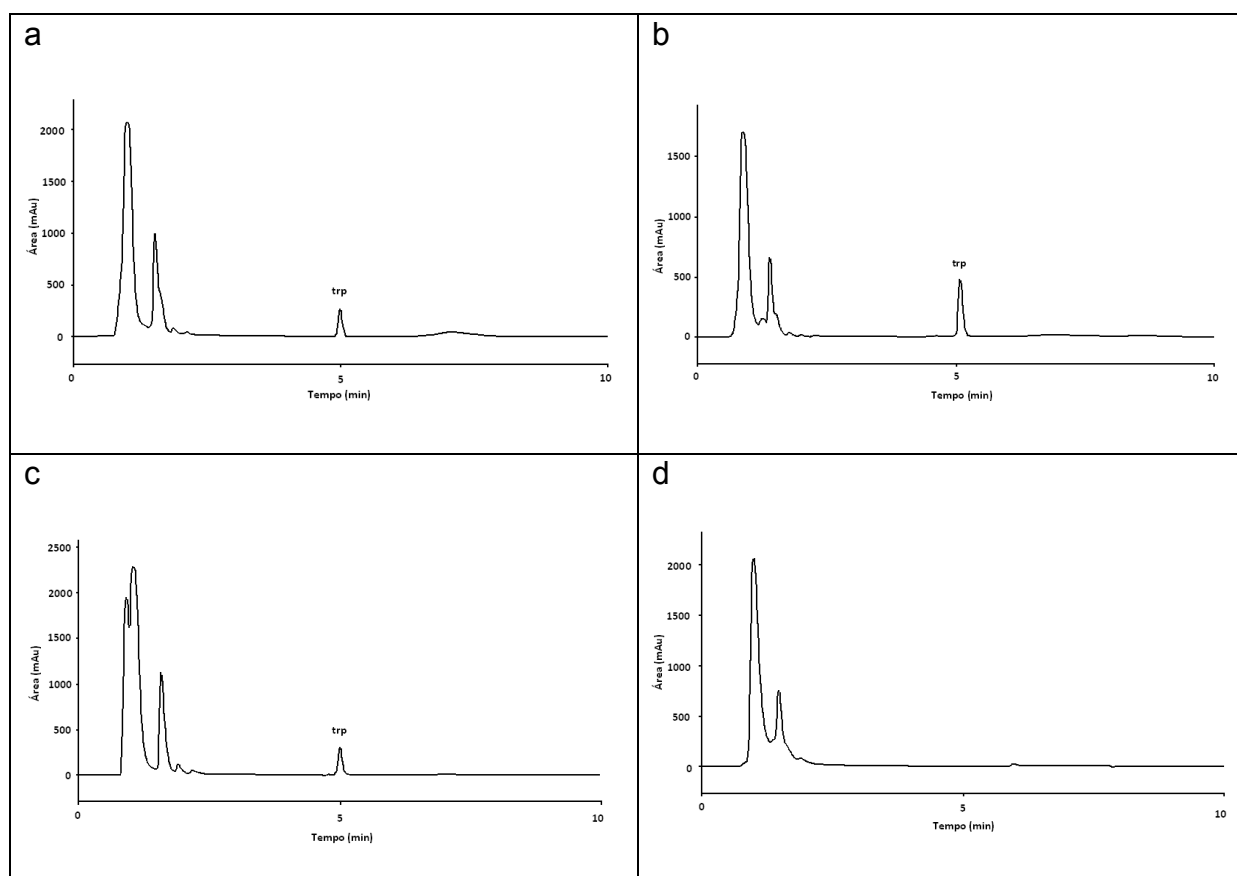
Após o processo de validação, as amostras de plasma dos pacientes foram submetidas à quantificação dos níveis de triptofano. Os pacientes que foram submetidos à ingestão da mistura que não continha triptofano, ou seja, depleção de triptofano (DT), tiveram suas concentrações plasmáticas variando entre 3,08 - 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (08h30min) e entre 0 - 4,79 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (15h30min). Os pacientes que ingeriram a mistura que continha triptofano tiveram suas concentrações plasmáticas variando entre 3,02 - 8,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (08h30min) e 5,69 - 18,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (15h30min). A Tabela 8 mostra os resultados individuais dos níveis plasmáticos de triptofano dos pacientes.

Ao compararmos os dados referentes à baixa estabilidade do triptofano frente ao tempo de armazenamento das amostras biológicas, observa-se que os valores absolutos da concentração do aminoácido foram subestimados, mas em relação aos valores relativos não houve perda considerável na concentração do aminoácido, pois todas as amostras foram coletadas simultaneamente, estocadas sob as mesmas condições e tratadas de maneira uniforme.

A Tabela 9 mostra os resultados individuais dos níveis plasmáticos de triptofano dos pacientes e a Ilustração 6, mostra os cromatogramas de um dos pacientes submetido ao teste de DT.

Tabela 9. Determinação dos níveis plasmáticos de triptofano em pacientes.

Pacientes	Mistura de aminoácidos sem triptofano		Mistura de aminoácidos com triptofano	
	Nível plasmático ($\mu\text{g mL}^{-1}$) 08h30min	Nível plasmático ($\mu\text{g mL}^{-1}$) 15h30min	Nível plasmático ($\mu\text{g mL}^{-1}$) 08h30min	Nível plasmático ($\mu\text{g mL}^{-1}$) 15h30min
1	5,66	2,97	8,90	18,70
2	3,08	1,13	4,39	9,29
3	6,83	4,79	3,98	5,69
4	6,30	não detectável	5,93	8,22
5	2,25	não detectável	8,87	14,98
6	7,81	não detectável	6,83	10,12
7	4,42	não detectável	3,02	7,28
8	5,05	não detectável	6,25	9,07

**Ilustração 6.** Perfis cromatográficos de plasma de paciente para comparação dos valores basais (a, c), com os valores obtidos após ingestão de mistura de aminoácidos contendo o triptofano (b) e sem triptofano (d).

Neste estudo, os resultados dos níveis plasmáticos de triptofano em pacientes submetidos à DT mostraram diferenças significativas em relação aos dois horários programados no teste. Os pacientes que ingeriram a mistura de aminoácidos que não continha triptofano tiveram seus níveis plasmáticos reduzidos ou mesmo não detectáveis, comparados aos pacientes que ingeriram a mistura que continha o triptofano. Esses dados mostram que, ao controlar os níveis plasmáticos de triptofano permite-se fazer uma análise indicativa dos níveis de 5-HT, pois a baixa biossíntese no cérebro afeta a qualidade de vida dos pacientes que sofrem de transtorno de humor, apetite, sono e até depressão (CORCHS, 2008). Estas descobertas estão de acordo com a literatura, tendo em vista que alguns trabalhos têm sido realizados para demonstrar a diminuição da concentração de triptofano em pacientes que foram submetidos ao teste DT (VAN DER DOES, 2001), ou mesmo em pacientes com histórico de doenças como TOC (BELLODI, 1997). Nos estudos de Shansis (1998), foi observado que no teste de DT os níveis de triptofano sofreram decréscimo de aproximadamente 80% após 5h da administração da mistura.

A técnica de DT já havia sido aplicada para avaliar o papel da 5-HT na sensibilidade a estímulos relacionados ao trauma no TEPT, remitido com ISRS (CORCHS, 2008). Segundo este estudo, os níveis plasmáticos de triptofano após a ingestão da mistura de aminoácidos sem triptofano diminuiu 66,5% no dia em que os pacientes ingeriram a mistura que continha este aminoácido. Esta diminuição nos níveis de triptofano mostrou que a depleção da 5-HT aumenta a resposta de ansiedade, o TEPT com ISRS.

Observa-se portanto, que a determinação dos níveis plasmáticos de triptofano pode ser usada com sucesso para entendimento da fisiopatologia da depressão

(MAES *et al.*, 2011) assim como abre novos horizontes para investigar os transtornos psiquiátricos, além de permitir que sejam feitas avaliações acerca do conteúdo nutricional da dieta de pacientes, que têm uma predisposição ao baixo nível plasmático de 5-HT.

6 CONCLUSÃO

- A metodologia analítica proposta neste trabalho mostrou-se capaz de quantificar o triptofano em plasma, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência ecologicamente amigável ou correta (*eco-friendly*).
- A otimização dos parâmetros analíticos e posterior validação da metodologia, apresentou um método simples, rápido e preciso, que não está sujeito a interferência de outras moléculas que absorvem na região do ultravioleta, além de consumir um pequeno volume de solvente orgânico, fato que proporciona uma maior economia, reduz o impacto ambiental e caracteriza a técnica como ecologicamente correta.
- A metodologia validada demonstrou ser aplicável para quantificar e monitorar as variações dos níveis plasmáticos de triptofano, em plasma de pacientes com histórico de estresse pós-traumático, submetidos ao teste de depleção aguda de triptofano.

7 PERSPECTIVAS

Como previsão para futuros trabalhos, ressalta-se a importância da aplicação e otimização de metodologias para quantificação de triptofano em outras matrizes biológicas, como por exemplo em plasma de animais (bovinos, caprinos, bubalinos), pois a manipulação dos níveis plasmáticos desse aminoácido em função da alimentação desses animais, influencia diretamente a produção de melatonina, permitindo um maior controle, a fim de satisfazer a demanda comercial exigida pelo mercado.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2003). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível Em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em 5 jun. 2009.

AMIRKHANI, A.; HELDIN, E.; MARKIDES, K. E.; BERGQUIST, J. Quantification of tryptophan, kynurenine and kynurenic acid in human plasma by capillary chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. v.780, p.381-387, 2002.

ARVIDSSON, B.; JOHANESSON, N.; CITTERIO, B.; RIGHETTI, P. G.; BERGQUIST, J.; High throughput analysis of tryptophan and metabolites in a complex matrix using capillary electrophoresis coupled to time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.1159, p.154-158, 2007.

ASHWORTH, R. B. Amino acid analysis for meat protein evaluation. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. v.70, p.80-85, 1987.

BARAN, H.; JELLINGER, K.; DECKE, L. **Journal of Neural Transmission**. v.106, p.165, 1999.

BARIONE, F.; BERTOLI, A.; PISTELLI, L. A straightforward procedure to biosynthesize melatonin using freshly chopped *Achillea millefolium* L. as reagent. **Phytochemistry Letters**. v.1, p.107-110, 2008.

BELL, C. J.; HOOD, S. D.; NUTT, D. J. Acute tryptophan depletion. Part II: clinical effects and implications. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**. v.39, p.565-574, 2005.

BELLODI, L.; ERZEGOVESI, S.; BIANCHI, L.; LUCINI, V.; CONCA, R.; LUCCA, A. Plasma tryptophan levels and tryptophan / neural amino acid ratios in obsessive-compulsive patients with and without depression. **Psychiatry Research**. v.69, p.9-15, 1997.

BERNEY, A.; SOOKMAN, D.; LEYTON, M.; YOUNG, S. L.; BENKELFAT, C. Lack of effects on core obsessive-compulsive symptoms of tryptophan depletion during symptom provocation in remitted obsessive-compulsive disorder patients. **Biological Psychiatry**. v. 59, p.853-857, 2006.

BIRDSALL, T.C. 5-Hydroxytryptophan: a clinically-effective serotonin precursor. **Alternative Medicine Review**. v.3, p.271-280, 1998.

BULCÃO, R.; MARIA, L. S.; CHARÃO, M.; MORO, A.; ROEHRS, M.; GARCIA, S. C.; LIMBERGER, R. P. Quantificação simultânea de indicadores biológicos de exposição a solventes orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**. v.31, p.1343-1348, 2008.

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Med**. v.9(1), p.11-24, 2005.

COMAI, S.; BERTAZZO, A.; BAILONI, L.; ZANCATO, M.; COSTA, C.V.L.; ALLEGRI, G. The content of proteic and nonproteic (free and protein-bound) tryptophan in quinoa and cereal flours. **Food Chemistry**. p.1350-1355, 2007.

CORCHS, F. D. F. Serotonina e sensibilidade a estímulos relacionados ao trauma no transtorno de estresse pós-traumático remitido com inibidores seletivos de recaptura de serotonina. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2008.

COZZI, A. ; ZIGNEGO, A. L., CARPENDO, R.; BIAGIOTTI, T.; ALDINUCCI , A.; MONTI, M.; GIANNINI, C.; ROSSELLI, M.; LAFFI, G.; MORONI, F. Low serum tryptophan levels, reduced macrophage IDO activity and high frequency of psychopathology in HCV patients, **Journal Viral Hepatit.** v.13, p.402-408, 2006.

DAS, Y. T.; BAGCHI, M.; BAGCHI, D.; PREUSS, H.G. Safety of 5-hydroxy-L-tryptophan. **Toxicology Letters.** v.150, p.111-122, 2004.

DAVIDSON, J. R. T.; MELTZER-BRODY, S. E. The under recognition and under treatment of depression: what is the breadth and depth of the problem? **Journal of Clinical Psychiatry.** v.60, p.4-9, 1999.

DEL BEM, C. M. Neurobiologia do transtorno de personalidade anti-social. **Revista de Psiquiatria Clínica.** v.32, p.27-36, 2005.

DELGADO-ANDRADE, C.; RUFÍAN-HENARES, J. A.; JIMÉNEZ-PÉREZ, S.; MORALES, F. J. Tryptophan determination in milk-based ingredients and dried Sport supplements by liquid chromatography with fluorescence detection. **Food Chemistry.** v.989, p.580-585, 2006.

DELGADO, P. L.; CHARNEU, D. S.; PRICE, L. H.; AGHAJANIAN, G. K.; LANDIS, H.; HENIGER, G. R. Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. **Archives of General Psychiatry.** v.47, p.411-18, 1990.

ERHARDT, S.; BLENNOW, K.; NORDIN, C.; SKOGH, E.; LINDSTROM, L. H.; ENGBERG, G. **Neuroscience Letters.** v.313, p.96, 2001.

FLECK, M. P.; PERIZZOLO, J.; BERLIM, M. T. Posttraumatic stress disorder and major depression. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v.25, p.51-54, 2003.

FLEUTORIS, D. J.; BOTSOGLOU, N. A.; PAPAGEORGIOU, G. E.; MANTINS, A. J. Rapid determination of tryptophan in intact proteins by derivative spectrophotometry. **Journal of the AOAC International**. v.76, p.1112-1119, 1993.

FRIEDMAN, M.; CUQ, J. L. Chemistry, analysis, nutritional value, and toxicology of tryptophan in food. A review. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.36, p.1079-1093, 1988.

GARCIA, S. E.; BAXTER, J. Determination of tryptophan content in infant formulas and medical nutritionals. **Journal of the AOAC International**. v.75, p.1112-1119, 1992.

GARDNER, M. L. CYSTEINE. A potential source of error in amino acid analysis of mercaptoethane sulfonic or hydrochloric acid hydrolysates of proteins and peptides. **Analytical Biochemistry**. v.141, p.429-431, 1984.

HOOD, S. D.; BELL, C. J.; NUTT, D.J. Acute tryptophan depletion. Part I: rationale and methodology. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**. v.39, p.558-564, 2005.

JEN, J. F.; HSIAO, S. L.; LIU, K. H. Simultaneous determination of uric acid and creatinine in urine by a eco-friendly solvent-free high performance liquid chromatographic method. **Talanta**. v.58, p.711-717, 2002.

JONG, W. H. A.; SMIT, R.; BAKKER, S. J. L.; DE VRIES, E. G. E.; KEMA, I. P. Plasma tryptophan, kynurenine and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. v.877, p.603-609, 2009.

JOYNT, K. E.; WHELLAN, D. J.; O'CONNOR, C. M. Depression and cardiovascular disease: Mechanisms of interaction. **Biological Psychiatry**. v.60, p.248-261, 2003.

KAPEZINSKI, F.; BUSNELLO, J.; ABREU, M. R.; CARRÃO, A. D. **Revista Psiquiatria Clínica**. v.25, p.158-65, 1998.

KATZUNG, B. G.; JULIUS, D. J. Histamina, serotonina e os alcalóides do esporão do centeio. **Farmacologia Básica & Clínica**. 8. ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.233-256, 2002.

KAWAI, K.; ISHIKAWA, H.; OHASHI, K.; ITOH, Y.; TERADAIRA, R. Rapid, simple and simultaneous measurement of kynurenine and tryptophan in plasma by column switching-HPLC method. **International Congress. Series**. v.1304, p.415-419, 2007.

KAYE W, H.; GENDALL, K. A.; FERNSTRON M, H.; FERNSTRON, J. D.; MCCONAHA, C. W.; WELTZIN, T. E. Effects of acute tryptophan depletion on mood in bulimia nervosa. **Biological Psychiatry**. v.47, p.151-157, 2000.

KOOPMANS, S. J.; GUZIK, A. C.; VAN DER MEULEN, J.; DEKKER, R.; KOGUT, J.; KERR, B. J.; SOUTHERN, L. L. Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behavior in weanling piglets. **Journal of Animal Science**. v.84, p.963-969, 2006.

LAICH, A.; NEURATER, G.; WIDNER, B.; FUCHS, D. More rapid method for simultaneous measurement of tryptophan and kynurenine by HPLC. **Clinical Chemistry**. v.48, p.872-874, 2004.

LAN-GAN, P.; AIGUO, T.; XIMING, M.; XIBO, L.; XIANG, A. More rapid and sensitive method for simultaneous determination of tryptophan and kynurenine acid by HPLC. **Clinical Biochemistry**. v.42, p.420-425, 2009.

LE FLOCH, N.; SEVE, B. Biological roles of tryptophan and its metabolism: potential implications for pig feeding. **Livestock Science**. v.112, p.23-32, 2007.

LI, Y.; TANG, A. G.; MU, S. HPLC-FLD determination of serum aromatic amino acids: Application in chronic kidney disease patients. **Clinica Chimica Acta**. v.412, p.1032-1035, 2011.

LUO, X. B.; TANG, A. G.; PI, L. G.; XIAO, L. D.; PU, Y. H. Determination of kynurenine in serum by high performance liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization, **Clinica Chimica Acta**. v.389, p.186-188, 2008.

MA, L.; XU, B.; WANG, W.; DENG, W.; DING, M. Analysis of typtophan catabolism in HBV patients by HPLC with programmed wavelength ultraviolet detection, **Clinica Chimica Acta**. v.405, p.94-96, 2009.

MACCHI, M. M.; BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Front Neuroendocrinology**. v.25(3-4), p.177-195, 2004.

MAES, M.; LEONARD, B. E.; MYINT, A. M.; KUBERA, M.; VERKERK, R. The new 5-HT hypothesis of depression: Cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of determination tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. **Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v.35, p.702-721, 2011.

MAGNUSSEN, I. E.; NIELSEN-KUDSK, F. Bioavailability and related pharmacokinetics in man of orally administered L-5-hydroxytryptophan in a steady state. **Acta of Pharmacology and Toxicology**. v.46, p.257-262, 1980.

MARKLOVÁ, E.; MAKOVIC'KOVÁ, H.; KRÁKOROVA, I. Screening for defects in tryptophan metabolism. **Journal of Chromatography A**. v.870, p.289-293, 2000.

MEEUSEM, R.; DE MEIRLEIR, K. Exercise and brain neurotransmission. **Sports Medicine**. v.20, p.160-188, 1995.

MIRANDA, A. F.; SUTTON, M. A.; BENINGER, R. J.; JHAMANDAS, K.; BOEGMAN, R. **Journal of Neuroscience Letters**. v.262, p.81, 1999.

MÓLNAR-PERL, I. Tryptophan analysis in peptides and proteins, mainly by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.763, p.1-10, 1997.

MÓLNAR-PERL, I.; PRESITS, P. HPLC of tryptophan and its metabolites using simultaneously UV, native fluorescence and pré-column fluorescence derivatization. **Chromatographia**. v.57, p.87-92, 2003.

MÓLNAR-PERL, I. Advancements in the rapid and sensitive analyses of tryptophan and its metabolites, by chromatography. **International Congress Series**. v.1304, p.389-403, 2007.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**, 6th ed, Wiley, New York, 2004.

MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Recovery of tryptophan in peptides and protein by high-temperature and short-term acid hydrolysis in the presence of phenol. **Analytical Biochemistry**. v.189, p.223-230, 1990.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Global mortality, disability and the contribution of risk factors; global burden of disease study. **Lancet**. v.349, n. 9063, p.1436-1442, 1997.

NARA, O. An eco-friendly efficient extactor. **Talanta**. v.68, p.522-526, 2006.

NETO, B. B.; SCARMINIO, E. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, 4 ed, Bookman, Porto Alegre, 2010.

NG, L. T.; PASCAUD, A.; PASCAUD, M. Hydrochloric acid hydrolysis of proteins and determination of tryptophan by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**. v.167, p.47-52, 1987.

OGAWA, T.; MATSON, W. R.; BEAL, M. F.; MYERS, R. H.; BIRD, E. D.; MILBURY, P.; SASO, S. **Neurology**. v.42, p.1702, 1992.

PEDRAS, M. S. C.; OKINYO-OWITI, D. P.; THOMS, K.; ADIO, M. The biosynthetic pathway of crucifer phytoalexins and phytoanticipins: De novo incorporation of deuterated tryptophans and quasi-natural compounds. **Phytochemistry**. v.70, p.1129-1139, 2009.

PINTER-SZAKAES, M.; MOLNÁR-PERL. I. Determination of tryptophan in unhydrolyzed food and feedstuffs by the acid ninhydrin method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.38, p.720-729, 1990.

PORTAL DE PSIQUIATRIA: <<http://psiqweb.med.br/>>. Acesso em 5 jun. 2011.

PORTER, R. J.; MULDER, R. T.; JOYCE, P. R.; MILLER, A. L.; KENNEDY, M. Tryptophan hydroxylase gene (TPH1) and peripheral tryptophan levels in depression. **Journal of Affective Disorders**. v.109, p.209-212, 2008.

QUINTIN, P.; BENKEEFAT, C.; LAUNAY, J. M.; ARSULF, I.; POINTEREAU-BELLINGER, A.; BARBAULT, S.; ALVAREZ, J. C.; VAROQUAUX, O.; PEREZ-DIAS, F.; JOUVENT, R.; LEBOVER, M. Clinical and neurochemical effect of acute tryptophan depletion in unaffected relatives with bipolar affective disorder. **Biological Psychiatry**. v.50, p.184–190, 2001.

RIBELAYGA, C.; PÉVET, P.; SIMONNEAUX; V. HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. **American Journal of Physiology**. v.278, p.1339-1345, 2000.

RICHARD, D. M.; DAWES, M. A.; MATHIAS, C. W.; ACHESON, A.; HILL-KAPTURCZAK, N.; DOUGHERTY, D. M. L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. **NIH Public Access**. v.2, p.45-60, 2009.

RIEDEL, W. J.; KLAASSEN, T.; SCHIMITT, J. A. J. Tryptophan, mood, and cognitive function. **Brain, Behavior, and Immunity**. v.16, p.581-589, 2002.

ROJANARATA, T.; SUMRAN, K.; NATEETAWEEWAT, P.; WINOTAPUN, W.; SUKPISIT, S.; OPANASOPIT, P.; NGAWHIRUNPAT, T. Microscale chemistry-based design of eco-friendly, reagent-saving and efficient pharmaceutical analysis: A miniaturized Volhard's titration for the assay of sodium chloride. **Talanta**. v.85, p.1324-1329, 2011.

ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre exercício físico, fadiga e nutrição. **Revista Paulista de Educação Física**. v.13, p.67-82, 1999.

ROSSI, L.; CASTRO, I. A.; TIRAPEGUI, J. Suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada e alteração na concentração da serotonina cerebral. **Journal Brazilian Society Food Nutrition**. v. 26, p.1-10, 2003.

ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Implicações do sistema serotoninérgico no exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v.48, p.227-233, 2004.

RUSSO, S.; KEMA, I. P.; FOKKEMA, R.; BOON, J. C.; WILLEMSE, P.H.B.; DE VRIES, E. G. E.; DEN BIER, J.A.; KORF, J. Tryptophan as a link between psychopathology and somatic states. **Psychosomatic Medicine**. v.65, p.665-671, 2003.

SAKURAI, K.; ZOU, J. P.; TSCHETTER, J. R.; WARD, J. M.; SHEARER, G. M. J. **Neuroimmunology**. v.129, p.186, 2002.

SANDERS-BUSCH, E.; MAYER, S. E. Agonistas e antagonistas dos receptores de 5-hidroxitriptamina (serotonina). In: **Goodman e Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica**, 11. ed. AMGH, Brasil, p.265-275, 2010.

SANDRA, P.; VANHOENACKER, G.; DAVID, F.; SANDRA, K.; PEREIRA, A. Green Chromatography (Part 1): Introduction and Liquid Chromatography, LCGC Europe, v.23, 2010.

SCHEFOLD, J.; ZEDEN, P.; FOTOPOULOU, C.; VON HAEHLING, S.; PSCHOWSKI, R.; HASPER, D. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms.

Nephrology Dialysis Transplantation. v.24, p.1901-1908, 2009.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A.** v.987, p.56-66, 2003.

SHANSIS, F. M. Efeitos da restrição aguda de triptofano sobre o humor, a ansiedade induzida e o desempenho cognitivo em voluntários normais. **Tese Mestrado** – Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas : Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

SHARMA, R. P.; SHAPIRO, L. E.; KAMATH, S. K.; SOLL, E. A.; WATANABE, M. D.; DAVIS, J. M. Acute dietary tryptophan depletion: Effects on schizophrenic positive and negative symptoms. **Neuropsychobiology.** v.35, p.5-10, 1997.

SOARES, Jr. J. M.; SIMÕES, R. S.; SIMÕES, M. J.; BARACAT, E. T. Aspectos moleculares dos receptores de melatonina e sua ação na reprodução. **Femina.** v.31(6), p.495-500, 2003.

STONE, T. W. Endogenous neurotoxins from tryptophan. **Toxicon**. v.39, p.61-73, 2001.

SUN, Z.; YOU, J.; LI, G.; ZHAO, X.; SUO, Y.; WANG, X. Determination of amino acids in rat brain microdialysate with 1,2,5,6-dibenzocarbazole-9-ethyl chloroformate as labeling reagent by high performance liquid chromatographic fluorescence detection and mass spectrometric identification. **Journal of Chromatography B**. v.879, p.1367-1374, 2011.

TAKEDA, E.; TERAOKA, J.; NAKAYA, Y.; MIYAMOTO, K.; BABA, Y.; CHUMA, H.; KAJI, R.; OHMORI, T.; ROKUTAN, K. Stress control and human nutrition. **The Journal of Medical Investigation**. v.51, p.139-145, 2004.

TEFF, K. L.; YOUNG, S.N. The effect of carbohydrate and protein administration on amino acids in the pancreas, brain, intestine, and plasma of the rat. **Nutritional Biochemistry**. v.6, p.564-569, 1995.

UNIÃO INTERNACIONAL DE QUÍMICA PURA E APLICADA. Disponível em: <<http://www.iupac.gov>>. Acesso em 20 jun. 2009.

VAN DER DOES, A. J. W. The effects of tryptophan depletion on mood and psychiatric symptoms. **Journal of Affective Disorders**. v.64, p.107-119, 2001.

VIGNAU, J.; JACQUEMONT, M. C.; LEFORT, A.; IMBENOTTE, M.; LHERMITTE, M. Simultaneous determination of tryptophan and kynurenine in serum by HPLC with UV and fluorescence detection. **Biomedical Chromatography**. v.18, p.872-874, 2004.

WANG R.; AIGUO, T. Simultaneous determination of kynurenine and tryptophan in serum by high performance liquid chromatography. **Chinese Journal of Chromatography** . v.24, p.140-143, 2006.

WEISSMAN, M. M.; R. C.; CANINO, G. J.; FARAVELLI, C.; GREENWALDS, S.; HWU, H. G.; JOYCE, P. R.; KARAM, E. G.; LEE, C. K.; LELLOUCH, J.; LEPINE, J. P.; NEWMAN, S. C.; RUBIO-STIPEC, M.; WELLS, J. E.; WICKRAMARATINE, P. J.; WITTCHEN, H.; YEH, E. K. Cross-national epidemiologic of major depression and bipolar disorder. **The Journal of the American Medical Association**. v.276, p.293-299, 1996.

WIDNER, B.; LEBLHUBER, F.; WALLI, J.; TILZ, GP.; DEMEL, U.; FUCHS, D. Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**. v.107, p.343-56, 2000.

XIAO, L. D.; LUO, X. B.; PI, L. G.; TANG, A. G. Simultaneous determination of kynurenine and kynurenic acid concentrations in human serum by HPLC with dual wavelenghts fluorescence detection. **Clinica Chimica Acta**. v.395, p.178-180, 2008.

XU, X.; LI, W.; LU, Z.; BETA, T.; HYDAMAKA, A. W. Phenolic content, composition, antioxidant activity, and their changes during domestic cooking of potatoes. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v.21, p.10231-10238, 2009.

YAMADA, K.; MIYAZAKI, T.; SHIBATA, T.; HARA, N.; TSUCHIYA, M. Simultaneous measurement of tryptophan and related compounds by liquid chromatography /electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. v.867, p.57-61, 2008.

YUST, M. M.; PEDROCHE, J.; GIRON-CALLE, J.; VIOQUE, J.; MILLAN, F.; ALAIZ, M. Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. **Food Chemistry**. v.85, p.317-320, 2004.

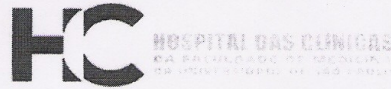
ZHANG, J. Z.; XUE, X. F.; ZHOU, J. H.; CHEN, F.; WU, L.; LI, Y.; ZHAO, J. Determination of tryptophan in bee pollen and royal jelly by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Biomedical Chromatography**. v.23, p.994-998, 2009.

ZHANG, X.; HE, Y.; DING, M. Simultaneous determination of tryptophan and kynurenine in plasma samples of children patients with Kawasaki disease by high-performance liquid chromatography with programmed wavelength ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**. v.877, p.1678-1682, 2009.

ZHEN, Q.; XU, B.; MA, L.; TIAN, G.; TANG, X.; DING, M. Simultaneous determination of tryptophan, kynurenine and 5-hydroxytryptamine by HPLC: Application in uremic patients undergoing hemodialysis. **Clinical Biochemistry**. v.44, p.226-230, 2011.

ZHU, L.; DING, L.; ZHANG, Q.; WANG, L.; TANG, F.; LIU, Q.; YAO, S. Direct analysis of cryptotanshinone and tanshinone IIA in biological samples and herbal medicinal preparations by a green technique of micellar liquid chromatography, **Green Chemistry**. v.11, p.132-137, 2009.

ANEXO



APROVAÇÃO

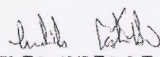
A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25.08.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 538/05, intitulado: "Estudo sobre a precipitação de sintomas em pacientes com transtorno do estresse pós-traumático remitidos com inibidores seletivos de recaptura de serotonina através da redução abrupta de triptofano", apresentado pelo Departamento de PSQUIATRIA, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Marcio Antonini Bernik

Pesquisador(a) Executante: Dr. Felipe D'Alessandro Ferreira Corchs

CAPPesq, 25 de agosto de 2005.


 PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
 Presidente da Comissão de Ética para Análise
 de Projetos de Pesquisa

Recebido: 07/10/05, às 10h22
 Departamento de Psiquiatria de FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
 Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
 Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
 Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq@hcnet.usp.br
 tms