



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ZUZANA CIESLAROVÁ

**INVESTIGAÇÃO DE HOMOCISTEÍNA E SEUS METABÓLITOS POR
ELETROFORESE CAPILAR COMO POTENCIAIS BIOMARCADORES DE
ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA**

CAMPINAS

2016

ZUZANA CIESLAROVÁ

**INVESTIGAÇÃO DE HOMOCISTEÍNA E SEUS METABÓLITOS POR
ELETROFORESE CAPILAR COMO POTENCIAIS BIOMARCADORES DE
ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA**

**Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutora em Ciências**

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA ZUZANA CIESLAROVÁ E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ANA VALÉRIA
COLNAGHI SIMIONATO CANTÚ**

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

C487i Cieslarová, Zuzana, 1987-
Investigação de homocisteína e seus metabólitos por eletroforese capilar como potenciais biomarcadores de esclerose lateral amiotrófica / Zuzana Cieslarová. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Metabolitos. 2. Esclerose amiotrófica lateral. 3. Aminoácidos. 4. Marcadores biológicos. 5. Eletroforese capilar. I. Cantú, Ana Valéria Colnaghi Simionato, 1974-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Investigation of homocysteine and metabolites by capillary electrophoresis as potential biomarkers of amyotrophic lateral sclerosis

Palavras-chave em inglês:

Metabolites

Amyotrophic lateral sclerosis

Aminoacids

Biological markers

Capillary electrophoresis

Área de concentração: Química Analítica

Títuloção: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú [Orientador]

Claudimir Lucio do Lago

Marina Franco Maggi Tavares

Alessandra Sussulini

Marcondes Cavalcante França Junior

Data de defesa: 03-10-2016

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú (Orientadora)

Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago (IQ-USP)

Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares (IQ-USP)

Profa. Dra. Alessandra Sussulini (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Marcondes Cavalcante França Junior (FCM-UNICAMP)

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna **ZUZANA CIESLAROVÁ**, aprovada pela Comissão Julgadora em 03 de outubro de 2016.

Tuto dizertační práci bych ráda věnovala svým rodičům,
Emilovi a Magdaleně Cieslarovým. Bez Vaší obrovské
podpory by tato práce nikdy nevznikla.

“Malý je ten, kdo má malé cíle.”

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que tornaram este trabalho possível. Não somente as pessoas que participaram diretamente do trabalho, mas também aquelas que me deram apoio e de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal. Foram tantas pessoas, que provavelmente algumas podem faltar nessa página, não era minha intenção.

Em primeiro lugar agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ana Valéria C. Simionato, por ter me aceitado sem eu falar uma única palavra em português e não saber nada de eletroforese capilar, e também, por apoiar minhas ideias (muitas vezes) loucas e irrealizáveis.

Aos colegas e ex-colegas do nosso laboratório: Rê, Carol e Helô, que me ensinaram que IC não é só mandar fazer o trabalho; Dri, Sumaya, Carol e Lucas, por me aceitarem de braços abertos e ajudarem nos meus primeiros passos na eletroforese capilar; e também Dri, Gustavo, José, Felipe, Natália e Flávia, que preferem ficar no laboratório ThoMSon, mas acrescentaram ao meu trabalho final com muitas dicas. Também agradeço todos os colegas e ex-colegas do outro lado da bancada pela amizade e muitos cafés.

Ao Prof. Dr. Marcondes C. França Jr., da FCM-UNICAMP pela colaboração e inúmeras dicas sobre esclerose lateral amiotrófica. À Dr^a. Helen M. T. de Andrade, ao Thiago M. Peluzzo e a toda equipe do Ambulatório de Doenças Neuromusculares pela ajuda na coleta das amostras de plasma.

Aos professores Dr. José Alberto Fracassi da Silva e Dr. Dosil Pereira de Jesus por terem me ajudado com a parte de detecção condutométrica sem contato e me apresentado ao mundo de microfluídica. E aos colegas e ex-colegas do laboratório GEM, Camila, Richard, Hugo, Aline, Gabi e muitos outros, que me ajudaram com o equipamento e compartilhavam os bolos comigo.

Ao professor Dr. Michael C. Breadmore, da Universidade de Tasmânia, por ter me aceitado como sua aluna durante meu intercâmbio, pela ajuda com acoplamento dos capilares SPE-CE e por ter me mostrado um novo caminho no meu doutorado. Também agradeço aos colegas do ACROSS pela ajuda e amizade que,

apesar da distância, mantemos até hoje. E mais um grande agradecimento vai para Jen&Matt Whitten, um casal excepcional, que me abrigou durante meu intercâmbio e se tornou a minha família.

Ao professor Dr. Claudimir Lucio do Lago pela colaboração, confiança, apoio e acesso livre ao poderoso CE-MS/MS, o único do seu tipo no Brasil. Ao Dr. Fernando S. Lopes pela ajuda com equipamento, orientação e amizade. E aos colegas e agregados do grupo LAIA pela amizade e por terem me mostrado o melhor croissant de chocolate que eu já comi na vida.

Aos professores e funcionários do IQ-UNICAMP por terem contribuído com a minha formação e pelas inúmeras dicas, e às agências de financiamento, CAPES, FAPESP, CNPq e Banco Santander.

Ao Quinteto Fantástico: Natália, Tamy, Moniquita e Chefinha; pela amizade, apoio, Cinética, dicas de beleza, belos momentos de distração e muito mais.

Aos meus pais, Emil e Magdalena e ao meu irmão Emil, por todo amor e apoio que me deram não só durante meu doutorado, mas também em toda a minha vida. Agradeço principalmente por todo apoio nas minhas decisões que sei que muitas vezes foram difíceis de aceitar.

À minha nova família, Pedrito e Sueli, e todos os demais familiares, que me receberam com amor e carinho, me deram apoio e força, e compartilharam todos os momentos de felicidade.

E por último, mas não menos importante (pelo contrário), gostaria de registrar meus imensos agradecimentos ao meu marido, Fabio de Castro Fabis. Àquela pessoa maravilhosa que sempre está presente, me apoia, tem muita paciência comigo e me trata com amor e carinho na hora que mais preciso. Sem ele não teria concluído esse doutorado. Te amo de todo meu coração.

RESUMO

A esclerose lateral amiotrófica (ALS) é uma doença neurodegenerativa progressiva causada pela degeneração dos neurônios motores superiores e inferiores no cérebro e na medula espinhal. Vários estudos mostraram níveis alterados de homocisteína (Hcy), cisteína (Cys), metionina (Met) e ácido glutâmico (Glu) em pacientes com ALS. A eletroforese capilar (CE) é uma técnica de separação usada principalmente na análise de amostras biológicas devido à sua rapidez, alta eficiência e baixo consumo de amostras e solventes. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um método de análise de Hcy, Cys, Met e Glu em plasma por CE. Foram comparados três modos de detecção – por absorção UV, condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C⁴D) e espectrometria de massas (MS). A CE-UV e CE-C⁴D apresentaram altos limites de quantificação (LQ). Assim, foi desenvolvido um método por extração em fase sólida acoplada à CE-UV *on-line* para aumentar a detectabilidade do método, porém, os picos de Hcy e Cys apresentaram baixa resolução. A CE-MS/MS se mostrou mais adequada, apresentando LQs entre 0,1170 (Hcy) e 0,8944 (Glu) $\mu\text{mol/L}$, precisão intra-dia e inter-dia com coeficientes de variação menores que 6% e 11%, respectivamente, sendo então selecionada para análise de amostras de plasma. As concentrações dos analitos foram comparadas por métodos univariados (teste t de Student para dados paramétricos ou teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos) e multivariados (Análise de componentes principais), revelando diferenças significativas entre os níveis de Cys e Glu em plasma de pacientes em relação a indivíduos saudáveis, indicando suas potencialidades como biomarcadores de ALS.

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects both lower and upper motor neurons, leading to muscle atrophy and weakness. Recently, altered levels of homocysteine (Hcy), cysteine (Cys), methionine (Met) and glutamic acid (Glu) have been observed in plasma of ALS patients. Capillary electrophoresis (CE) is a frequently applied method for the analysis of biological samples due to short analysis time, high efficiency and low sample and solvent consumption. The aim of this work was to develop a method for analysis of Hcy, Cys, Met and Glu in plasma by CE. Three modes of detection were compared – UV absorption, capacitively coupled contactless conductivity (C^4D) and mass spectrometry (MS). CE-UV and CE- C^4D showed high limits of quantification (LQ). Therefore, on-line coupling of solid phase extraction and CE (SPE-CE) was developed to increase the method detectability. However, low resolution between the peaks of Hcy and Cys precluded the use of this method for the analysis of real samples. The CE-MS/MS method was the most appropriate method for the analysis of plasma samples revealing LQs between 0.1170 (Hcy) and 0.8944 (Glu) $\mu\text{mol/L}$, and intra-day and inter-day precision with relative standard deviations lower than 6% and 11%, respectively. Plasma samples of healthy individuals and patients were analyzed and analytes concentrations were compared by univariate methods (t-test and Mann-Whitney), as well as multivariate methods (Principal component analysis). Significant differences between concentration of Cys and Glu in plasma of healthy individuals and patients with ALS were found, indicating their potential as biomarkers of ALS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1. Ciclo de homocisteína (adaptado de [30]).....	28
Fig. 2: Reação de derivatização de aminoácidos com FMOC.....	39
Fig. 3. Processo de fabricação dos microcartuchos para SPE-CE. a) corte dos três segmentos de capilar; b) junção dos capilares SPE-CE; c) preenchimento do capilar SPE-CE com sorvente; capilar SPE-CE pronto para uso.....	41
Fig. 4. Esquema de análise de aminoácidos por SPE-CE-UV.....	43
Fig. 5. Comparação de eletroferogramas de separação de aminoácidos em BGE composto por: a) borato na concentração de 20, 30 e 50 mmol/L e pH 10,1; b) borato 50 mmol/L em pH 9,3; 9,5; 9,7; 9,9 e 10,1. Condições de análise: Tensão: 20 kV, L_{eff} : 72 cm, 75 μ m i.d., tempo de injeção: 15 s (50 mbar), λ : 265 nm.	46
Fig. 6. Comparação das resoluções de pares de picos nos eletroferogramas de separação de aminoácidos utilizando BGE composto por borato na concentração 20; 30 e 50 mmol/L e pH 9,3 a 10,1. A composição do BGE está apresentada na Tab. 2. Legenda: 1 – FMOC-OH; 2 – Met+PI; 3 – Hcy+Cys, 4 – Glu. Condições de análise como na Fig. 5.....	47
Fig. 7. a) Comparação das resoluções de pares de picos nos eletroferogramas de separação de FMOC-AAs utilizando BGE composto por borato na concentração 50; 60; 80; 100; 120 e 150 mmol/L e pH 10,1. Legenda: 1 – FMOC-OH; 2 – Met+PI; 3 – Hcy+Cys, 4 – Glu. b) Eletroferograma ilustrando a separação de FMOC-AAs em BGE composto por borato na concentração de 150 mmol/L e pH 10,1. Demais condições de análise como na Fig. 5.	48
Fig. 8. Comparação de eletroferogramas de separação de FMOC-AAs em BGE composto por borato e SDS em várias concentrações e pH 10,1 (Tab. 4). Demais condições de análise como na Fig. 5.....	50
Fig. 9. Curva de Ohm para o BGE composto por borato 50 mmol/L e SDS 40 mmol/L em pH 10,1. Demais condições como na Fig. 5.	50
Fig. 10. Comparação de eletroferogramas (CZE-UV) de mistura de NL, Met, Hcy e Glu (A), e mistura de Pro-OH, Met, Hcy e Glu (B) (soluções de padrões 250 μ mol/L): 1 – Met, 2 – NLeu, 3 – Hcy, 4 – Glu, 5 – Pro-OH. Condições de análise: V: +15 kV, capilar: L_{eff} : 60 cm, 50 μ m i.d., tempo de injeção: 15 s (50 mbar), λ : 265 nm. Composição do BGE: borato 50 mmol/L, pH 10,0.	53
Fig. 11. Comparação de eletroferogramas de separação de FMOC-AAs por SPE-CE-UV on-line utilizando sorvente à base de sílica modificado com C18 na forma: a) irregular; b) regular. Condições de extração: Tempo de injeção: 1 min 930 mbar (pH ~ 3), eluição: 90 s 50 mbar, eluente: acetonitrila:metanol:BGE 3:3:1 (v/v/v). As demais condições de análise são as mesmas citadas na Fig. 10.....	53

Fig. 12. Eletroferogramas de separação dos FMOC-AAs (1 $\mu\text{mol/L}$) por SPE-CE-UV, utilizando sorvente DVB com diâmetro de partículas de 45 μm ou 80 μm . As condições de análise são as mesmas citadas na Fig. 11.....	54
Fig. 13. Pré-concentração e separação dos FMOC-AAs (1 $\mu\text{mol/L}$) por SPE-CE-UV, utilizando sorvente HLB, DVB (com diâmetro de partículas de 80 μm), C18 ou C8. As condições de extração e análise são as mesmas citadas na Fig. 12.	55
Fig. 14. Relação de área do pico de a) Met, b) Hcy e c) Glu, e tempo de injeção de cada analito (1 $\mu\text{mol/L}$) variando entre 0,5 a 45 min. As demais condições de extração e análise são as mesmas citadas na Fig. 12.....	56
Fig. 15. Comparação das intensidades dos picos de cada analito para amostras dissolvidas em mistura de água com a) acetonitrila (ACN); b) isopropanol (IPA); c) acetona nas proporções 1:3, 1:1 e 3:1 (v/v); d) ACN, IPA e acetona na proporção 1:1 (v/v).	66
Fig. 16. a) Comparação da separação de aminoácidos por CE- C^4D (100 $\mu\text{mol/L}$) utilizando BGE contendo diferentes concentrações de ácido acético. Condições de análise: V: +20 kV, capilar: L_{eff} : 40 cm, 50 μm i.d., tempo de injeção: 15 s (11 kPa), Detector C^4D : 620 kHz 2,0 V_{p-p} (sinais no eletroferograma foram invertidos). b) Resoluções calculadas para cada condição.	67
Fig. 17. Comparação das a) intensidades dos picos e b) larguras na meia altura dos picos de Hcy, Met, PI, Cys e Glu (100 $\mu\text{mol/L}$) com diferentes tempos de injeção (11 kPa).....	67
Fig. 18. Curvas analíticas e gráficos de resíduos para cada analito na matriz biológica obtidos pelo método de CE- C^4D otimizado.	70
Fig. 19: Eletroferograma de amostra de pool de plasma dos indivíduos sadios pré-concentrado 2x e fortificado com mistura de Hcy, Met, Glu e Cys na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$. Condições de análise: BGE: ácido acético 5 mol/L, tempo de injeção 30 s. Demais condições são as mesmas como na Fig. 16.	73
Fig. 20. Comparação de eletroferogramas de íons totais de aminoácidos em plasma. Condições de análise: capilar de silica fundida recoberta com PVA (L_T = 60 cm, 50 μm i.d.); BGE: ácido acético 500 mmol/L; tensão aplicada: +25 kV; injeção hidrodinâmica: 50 mbar por 10 s; temperatura: 20°C. SL: ácido acético 5 mmol/L em metanol / água 50:50 (v/v) com vazão de 6 $\mu\text{L/min}$; gas secante (nitrogênio): 6 L/min, 160°C; ESI: 4,5 kV (positivo). As transições monitoradas no SRM: m/z: 150→140 (Met), m/z: 148→130 (Glu), m/z: 136→90 (Hcy), m/z: 122→105 (Cys), m/z: 132→86 (NLeu), m/z: 118→72 (NVal), m/z: 132→68 (Pro-OH), m/z: 181→154 (fenantrolina), m/z: 77→49 (Gly ^{13}C).	83
Fig. 21. Comparação de eletroferogramas de íons totais (TIC) de aminoácidos em plasma após dez injeções consecutivas. Condições de análise: capilar de silica fundida (L_T = 60 cm, 50 μm id); BGE: ácido acético 500 mmol/L; tensão aplicada: +25 kV; injeção hidrodinâmica:	

50 mbar por 10 s; temperatura: 20°C. SL: ácido acético 5 mmol/L em metanol / água 50:50 (v/v) com vazão de 6 µL/min; gás secante (nitrogênio): 6 L/min, 160°C; ESI: 4,5 kV (positivo).	85
Fig. 22. Eletroferogramas de íons extraídos (EIE) de aminoácidos em plasma após o preparo incluindo somente a precipitação de proteínas com acetonitrila. Legenda: Hcy-Hcy: homocistina, Cys-Cys: cistina. Condições de análise: BGE: ácido acético 5 mol/L. Transições monitoradas por SRM: m/z: 150→140 (Met), m/z: 148→130 (Glu), m/z: 136→90 (Hcy), m/z: 122→105 (Cys), m/z: 241→152 (Cys-Cys), m/z: 269→136 (Hcy-Hcy). Demais condições como na Fig. 21.	87
Fig. 23. Redução de dissulfetos com DTT [94].	88
Fig. 24. Curva de calibração de Cys construída no plasma, que foi preparado pela redução de dissulfetos com DTT e precipitação de proteínas com acetonitrila.	88
Fig. 25. Reação de tióis com IAA em meio básico.	89
Fig. 26. Curvas analíticas e gráficos de resíduos para cada analito em matriz biológica obtidos pelos métodos de CE-MS/MS otimizados.	91
Fig. 27. Diagrama de caixas para cada aminoácido mostrando a variação da concentração em plasma dos indivíduos saudáveis e pacientes com ALS.	101
Fig. 28. Curvas ROC para metionina (A), ácido glutâmico (B), homocisteína (C) e cisteína (D).	106
Fig. 29. Gráfico de escores de PCA de concentrações de aminoácidos em plasma (indivíduos saudáveis e pacientes com ALS).	107
Fig. 30. Gráfico de loadings de PCA de concentrações de aminoácidos em plasma (indivíduos saudáveis e pacientes com ALS).	108
Fig. 31. Gráfico de escores mostrando o possível agrupamento entre as classificações de ALS.	109
Fig. 32. Gráfico de escores mostrando o possível agrupamento entre as os subtipos de ALS. Legenda: AMP – Atrofia muscular progressiva; Clássica – ALS clássica; PLS – Esclerose lateral primária; PBP – Paralisia bulbar progressiva.	110

LISTA DE TABELAS

Tab. 1. Classificação da ALS com base nos El Escorial Critérios [15]	25
Tab. 2. Otimização inicial da composição do BGE para análise de aminoácidos por CE-UV....	45
Tab. 3. Valores de pK_a dos aminoácidos derivatizados com FMOC [67].....	46
Tab. 4. Composição de BGE para otimização de separação dos aminoácidos por MEKC	49
Tab. 5: Comparação dos valores de LQ de FMOC-AAs obtidos por CE-UV e níveis esperados de AAs em plasma de indivíduos saudáveis.....	51
Tab. 6. Algumas figuras de mérito obtidas para SPE-CE-UV, usando uma solução de padrões analíticos em solvente.....	56
Tab. 7. Comparação dos pK_a s dos aminoácidos [67]	63
Tab. 8. Comparação dos tempos de migração, intensidade dos picos e resoluções utilizando BGE com diferentes concentrações de HEC	64
Tab. 9. Figuras de mérito avaliadas para a validação do método para determinação dos aminoácidos em plasma por CE- C^4D	71
Tab. 10. Figuras de mérito avaliadas para a validação do método para determinação dos aminoácidos em solvente por CE- C^4D	72
Tab. 11. Parâmetros utilizados no espectrômetro de massas para análise de aminoácidos, seus derivados e padrões internos.	82
Tab. 12. Comparação dos desvios relativos (em %) dos tempos de migração (t_m), áreas dos picos e razão sinal/ruído (S/N) de vinte injeções consecutivas de plasma no CE-MS.....	85
Tab. 13. Figuras de mérito avaliadas para a validação dos métodos 1 e 2 para determinação dos aminoácidos em plasma por CE-MS/MS.....	92
Tab. 14. Informações sobre os pacientes com ALS	96
Tab. 15. Informações sobre os indivíduos saudáveis.....	97
Tab. 16. Concentrações médias e desvios padrão de aminoácidos em amostras de plasma ...	98
Tab. 17. Teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$)	102
Tab. 18. Valores de t calculados para testes t de Student ($\alpha = 0,05$) para Met e Cys em plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com ALS.....	103
Tab. 19. Valores de U calculados para teste de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$) para Glu e Hcy em plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com ALS.....	103
Tab. 20. Coeficientes de correlação r entre aminoácidos e progresso da doença.....	104
Tab. 21. Valores de AUC, e respectivos valores p , ponto de corte, sensibilidade e especificidade no ponto de corte para os aminoácidos Met, Glu, Hcy e Cys.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS	esclerose lateral amiotrófica
ALSFRS-R	Revisada Escala Funcional de Avaliação em ALS
5-MTHF	5-metiltetrahidrofolato
ACN	acetonitrila
ADN	Ambulatório de Doenças Neuromusculares
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGE	eletrólito de corrida
C ⁴ D	detector condutométrico sem contato acoplado capacitivamente
CE	eletroforese capilar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CV	coeficiente de variação
Cys	cisteína
CZE	eletroforese capilar em zona
DTT	ditiotreitol
DVB	divinilbenzeno
EDTA	ácido etilenodiamino tetraacético
EIE	eletroferogramas de íons extraídos
EMG	eletromiografia
EOF	fluxo eletrosmótico
ESI	electrospray
fALS	esclerose lateral amiotrófica familiar

FMOC	cloreto de 9-fluorenil-metoxycarbonil
FMOC-AAs	fluorenil-metoxycarbonil-derivados de aminoácidos
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
Glu	ácido glutâmico
Gly ¹³ C	glicina ¹³ C
Hcy	homocisteína
HEC	hidroxietilcelulose
HLB	equilíbrio hidrofílico-lipofílico
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
i.d.	diâmetro interno
IAA	ácido iodoacético
IgG	imunoglobulinas G
IPA	isopropanol
LCR	líquido cefalorraquidiano
LD	limite de detecção
L _{eff}	comprimento efetivo
LLE	extração líquido-líquido
LMN	neurônio motor inferior
LQ	limite de quantificação
L _T	comprimento total
MEKC	cromatografia eletrocinética micelar
Met	metionina
MS	espectrometria de massas

MTHFR	metilenotetrahidrofolato redutase
NLeu	norleucina
NMR	ressonância magnética nuclear
NVal	norvalina
o.d.	diâmetro externo
PBP	paralisia bulbar progressiva
PC	componente principal
PCA	análise de componentes principais
PI	padrão interno
PLS	esclerose lateral primária
PMA	atrofia muscular progressiva
Pro-OH	hidroxiprolina
PTFE	politetrafluoretileno
PVA	polivinil álcool
PVDF	fluoreto de polivinilideno
sALS	esclerose lateral amiotrófica esporádica
SDS	dodecil sulfato de sódio
SL	líquido auxiliar
SOD1	superóxido dismutase 1
SPE	extração em fase sólida
SRM	monitoramento de reação selecionada
TIC	eletroferograma de íons totais
tITP	isotacoforese transiente

UMN neurônio motor superior

UV ultravioleta

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	22
Introdução.....	22
1.1. Esclerose lateral amiotrófica.....	23
1.2. Diagnóstico da ALS	25
1.3. Os biomarcadores da ALS.....	26
1.4. Análise de aminoácidos por eletroforese capilar	30
CAPÍTULO 2.....	33
Objetivos.....	33
2.1. Objetivo geral	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
CAPÍTULO 3.....	35
Análise de aminoácidos por eletroforese capilar com detecção UV e extração em fase sólida acoplada <i>on-line</i> à eletroforese capilar com detecção UV.....	35
3.1. Introdução	36
3.2. Materiais e métodos	37
3.2.1. Solventes, reagentes e padrões analíticos	37
3.2.2. Equipamentos e materiais	38
3.2.3. Preparo de soluções de aminoácidos	39
3.2.4. Derivatização de aminoácidos	39
3.2.5. Preparo de solução de eletrólito de corrida.....	40
3.2.6. Análise de aminoácidos por CE-UV.....	40
3.2.7. Fabricação de microcartuchos para acoplamento de SPE e CE.....	41
3.2.8. Análise de aminoácidos por SPE-CE-UV.....	42
3.3. Resultados e discussão.....	43
3.3.1. Derivatização de aminoácidos	43
3.3.2. Otimização de composição do BGE	44

3.3.3. Limites de detecção e quantificação	50
3.3.4. Pré-concentração de aminoácidos por extração em fase sólida acoplada on-line à CE-UV	51
3.4. Conclusões parciais.....	57
Capítulo 4	58
Análise de aminoácidos por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato acoplada capacitativamente.....	58
4.1. Introdução	59
4.2. Materiais e equipamentos.....	60
4.2.1. Solventes, reagentes e padrões analíticos	60
4.2.2. Equipamentos e materiais	60
4.2.3. Preparo de soluções de aminoácidos	61
4.2.4. Preparo de solução eletrólito de corrida.....	61
4.2.5. Preparo de amostra de plasma.....	61
4.2.6. Análise de aminoácidos por CE-C ⁴ D	62
4.3. Resultados e discussão.....	62
4.3.1. Otimização do método CE-C ⁴ D para análise de aminoácidos.....	62
4.3.2. Validação do método CE-C ⁴ D para determinação de aminoácidos em plasma ...	68
4.4. Conclusões parciais.....	73
CAPÍTULO 5.....	75
Análise de aminoácidos por eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas sequencial	75
5.1. Introdução	76
5.2. Materiais e equipamentos.....	77
5.2.1. Solventes, reagentes e padrões analíticos	77
5.2.2. Equipamentos e materiais	78
5.2.3. Preparo de soluções.....	78
5.2.4. Preparo de solução de eletrólito de corrida e líquido auxiliar	79
5.2.5. Preparo de amostra de plasma.....	79
5.2.6. Análise de aminoácidos por CE-MS/MS	80

5.3.	Resultados e discussão	81
5.3.1.	Otimização do método CE-MS/MS	81
5.3.2.	Padrão interno	83
5.3.3.	Adsorção de proteínas na parede do capilar	84
5.3.4.	Preparo de amostras	86
5.3.5.	Validação dos métodos de CE-MS/MS para determinação de aminoácidos em plasma	89
5.4.	Conclusões parciais.....	92
CAPÍTULO 6.....		94
Análise de amostras de plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com ALS por eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas sequencial		94
6.1.	Introdução	95
6.2.	Materiais e métodos	96
6.2.1.	Origem das amostras de plasma de pacientes com ALS.....	96
6.2.2.	Origem das amostras de plasma dos indivíduos saudáveis.....	97
6.2.3.	Preparo de amostras de plasma	97
6.2.4.	Análise de plasma por CE-MS/MS.....	97
6.2.5.	Análise de resultados por métodos estatísticos	97
6.3.	Resultados e discussão	98
6.3.1.	Análise de amostra de plasma.....	98
6.3.2.	Comparação das concentrações de aminoácidos em plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com ALS	100
6.3.3.	Correlação de concentração de aminoácidos em plasma e progresso da doença	103
6.3.4.	Curva ROC	104
6.3.5.	Análise de componentes principais.....	107
6.4.	Conclusões parciais.....	110
CAPÍTULO 7.....		111
Conclusões finais.....		111
CAPÍTULO 8.....		115

Referências	115
CAPÍTULO 9.....	122
Anexo	122

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. Esclerose lateral amiotrófica

A esclerose lateral amiotrófica (ALS – do inglês *Amyotrophic Lateral Sclerosis*), também conhecida como doença de Lou Gehrig ou doença de Charcot, é uma doença neurodegenerativa progressiva causada pela degeneração dos neurônios motores superiores e inferiores no cérebro e na medula espinhal. Quando os neurônios motores morrem, o cérebro perde a capacidade de iniciar e controlar movimentos e os pacientes em fase terminal da doença podem ficar totalmente paralisados e morrer de insuficiência respiratória ou por complicações infecciosas. Na maioria dos casos, a sobrevivência é de 3 anos após o início dos primeiros sintomas; porém, 10% dos pacientes sobrevivem por 5 anos e 5% podem viver 20 anos ou mais [1].

A incidência da ALS no mundo varia entre 1 e 2,5 casos por 100000 habitantes, o que a classifica como uma doença rara; porém, o número de casos está crescendo a cada ano [2]. No Brasil, a taxa de mortalidade por ALS cresceu de 0,36/100000 habitantes em 2004 para 0,58/100000 habitantes em 2013. A taxa de mortalidade ajustada para acima de 45 anos foi de 2,3/100000 habitantes em 2013. No Brasil, 0,09% dos óbitos entre janeiro de 2004 e dezembro de 2013 foram causados pela ALS, sendo que a idade média dos pacientes foi $62,7 \pm 13,2$ anos. A ALS foi associada mais com homens (53,8%), brancos (73,4%) e com indivíduos nascidos nas regiões sul e sudeste [3].

O termo ALS inclui vários fenótipos de doenças caracterizadas pela degeneração progressiva de neurônios motores, porém, a forma mais comum é a ALS clássica. Outros fenótipos da ALS incluem a paralisia bulbar progressiva (PBP), atrofia muscular progressiva (PMA), esclerose lateral primária (PLS), síndrome de *flail leg*, síndrome de *flail arm* e ALS com demência. Todas as variantes da ALS têm diferentes apresentações clínicas, taxa de progressão da doença e prognóstico [4].

As causas desta doença ainda não foram estabelecidas, com exceção de 5 - 10% dos casos em que a doença é baseada no modelo da genética mendeliana (fALS). Antes de 2011, 13 genes e seus respectivos *loci* relacionados à ALS foram descobertos. Dos genes conhecidos, as mutações no gene superóxido dismutase 1 (SOD1), representam 20% dos casos da fALS, sendo os mais frequentes [5].

Existem várias hipóteses sobre a possível causa de cerca de 90% dos casos esporádicos da ALS (sALS). Na metade do século XX, foi observada uma alta incidência da ALS entre os índios Chamorros da ilha de Guam, localizada no Oeste do Oceano Pacífico. Os estudos epidemiológicos propuseram três teorias: níveis baixos de cálcio e magnésio juntamente com níveis altos de alumínio e manganês na terra e na água potável dessa região; o consumo de farinha de cicadófito, que contém a neurotoxina β -N-metilamino-L-alanina; e herança genética proveniente da população da ilha [6,7].

Giagheddu *et al.* e Rosati *et al.* estudaram os casos de ALS na Sardenha, uma ilha no sul da Itália, nos anos 1957-1980 e 1965-1974, respectivamente. Os dois grupos observaram que a incidência da ALS entre os trabalhadores na agricultura foi significativamente elevada comparando com a incidência média de ALS (4,51 a 8,25 vezes maior) [8,9]. A associação entre a agricultura (uso de inseticidas, fertilizantes e outros produtos químicos) e o aumento do risco da ALS foi também observada na província de Ferrara (norte da Itália) entre os anos de 1964 e 1982 [10].

O aumento da incidência da ALS nos veteranos da Guerra do Golfo continua controverso. Alguns estudos mostraram que a taxa de incidência da ALS nos veteranos jovens é maior do que a taxa de mortalidade esperada nos Estados Unidos da América para a mesma faixa etária [11]. Por outro lado, Kang e Bullman confirmaram que houve maior taxa de óbitos entre os veteranos da Guerra do Golfo em relação a veteranos de outras guerras, porém, esse aumento foi causado por acidentes e não pela ALS [12].

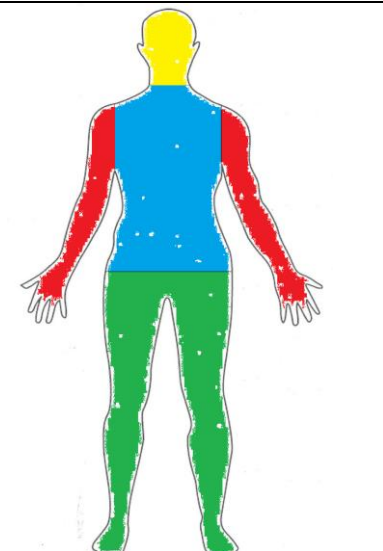
Os esforços físicos, a prática de esporte, o trauma físico, fraturas ósseas e cirurgias, foram associados ao desenvolvimento da ALS em atletas. Em 1939, Lou Gehrig teve que abandonar abruptamente o baseball após ter sido diagnosticado com ALS, chamando a atenção de sociedade para a doença. Esse caso foi seguido por mais de 30 casos de ALS em jogadores italianos de futebol no período de 1960 a 1997. O mecanismo do início da doença nesses atletas ainda não é conhecido, mas eles sofreram mais traumas na cabeça e fraturas ósseas e, também, eram mais fisicamente ativos que a população em geral [13].

1.2. Diagnóstico da ALS

Apesar das características clínicas e patológicas da ALS terem sido descritas por Charcot em 1874, o diagnóstico é apenas clínico e demanda um longo tempo (tempo médio de 11,5 meses). A maioria dos pacientes recebe pelo menos um diagnóstico alternativo, sendo a neuropatia o mais comum, sendo necessário cerca de três médicos para confirmação de ALS. Porém, o tempo de obtenção do diagnóstico é mais curto nos casos da fALS e nos pacientes com idade menor de 60 anos [14].

O diagnóstico da ALS se baseia nos critérios de exclusão estabelecidos pela *World Federation of Neurology Subcommittee on Motor Neuron Disease* durante o VII Congresso Internacional de Doenças Neuromusculares, em 1990 (El Escorial Critérios). Os El Escorial Critérios definem quatro classes de ALS: suspeita, possível, provável e definida, dependendo da demonstração de sinais de envolvimento dos neurônios motores superiores (UMN – do inglês *Upper Motor Neuron*) e inferiores (LMN – do inglês *Lower Motor Neuron*) em várias regiões do organismo (Tab. 1) [15].

Tab. 1. Classificação da ALS com base nos El Escorial Critérios [15]

		ALS			
		Suspeita	Possível	Provável	Definida
 <p>Regiões: ● bulbar, ● cervical, ● torácica, ● lombossacra</p>	Diagnóstico	LMN em duas regiões	LMN + UMN em uma região	LMN + UMN em duas regiões	LMN + UMN em região bulbar e em duas ou mais regiões
	Alternativa	LMN em mais de duas regiões	UMN em duas ou mais regiões	LMN + UMN em mais de duas regiões	LMN + UMN em três ou mais regiões

LMN – neurônio motor inferior, UMN – neurônio motor superior

Os El Escorial Critérios foram revisados em 2000 (El Escorial Critérios revisados) com a finalidade de aumentar a sensibilidade do diagnóstico. Assim, acrescentou-se a classe ALS provável com auxílio laboratorial, contando com sinais de degeneração dos LMN e UMN em uma região ou, como alternativa, sinais de UMN em uma região junto com os sinais de LMN em duas regiões diagnosticados por eletromiografia (EMG). Além disso, aplicam-se exames laboratoriais clínicos e neuroimagem para excluir o diagnóstico de outras doenças similares [16].

Além de El Escorial Critérios, Awaji Critérios foram estabelecidos em 2006, propondo a equivalência dos resultados de electromiografia e exames clínicos no diagnóstico da ALS. Guennoc *et al.* compararam Awaji e El Escorial Critérios revisados, confirmando a maior sensibilidade do diagnóstico feito através de Awaji Critérios. Entretanto, o novo método conta com somente três classes da ALS: definida, provável e possível, prejudicando os pacientes que apresentaram sinais de comprometimento dos UMN em uma região concomitantemente com sinais de LMN em duas regiões. Estes pacientes foram diagnosticados com a ALS provável com auxílio laboratorial baseando nos El Escorial Critérios revisados. Entretanto, eles foram diagnosticados com ALS possível na base de Awaji Critérios [17,18].

1.3. Os biomarcadores da ALS

Segundo Hulka *et al.*, os marcadores biológicos, ou biomarcadores, podem ser definidos como alterações celulares, bioquímicas ou moleculares mensuráveis em meios biológicos, tais como tecidos, células ou fluidos biológicos [19,20]. Essa definição foi generalizada para incluir as características biológicas que podem ser medidas objetivamente e avaliadas como indicadores dos processos biológicos normais, dos processos patogênicos ou das respostas farmacêuticas para a intervenção terapêutica [21]. Na prática, os biomarcadores incluem ferramentas e tecnologias que podem ajudar na compreensão da predição, da causa, do diagnóstico, da progressão, da regressão ou do resultado do tratamento da doença.

Os biomarcadores foram classificados de acordo com Perera e Weinstein baseando-se na sequência de eventos a partir da exposição até a doença. Existem então duas classes de biomarcadores: biomarcadores de exposição, que são usados para a predição do risco; e biomarcadores da doença, que são usados para

o *screening*, o diagnóstico e para o monitoramento de progressão da doença (biomarcadores prognósticos) [20,22].

Até o momento, não há relato de nenhum biomarcador da ALS, uma vez que a investigação de tais biomoléculas em fluidos biológicos falhou na identificação de componentes-chave dos processos neurodegenerativos desta enfermidade. Alguns estudos publicados sugeriram que níveis reduzidos da cistatina C e níveis elevados dos neurofilamentos no líquido cefalorraquidiano (LCR) podem ser um biomarcador da ALS [23,24]. Zhou *et al.* encontraram níveis elevados da galectina-3 no LCR dos pacientes com doença de neurônio motor em comparação com outras doenças neurológicas e indivíduos saudáveis [25].

Em 2005, foi realizado o primeiro estudo metabolômico em plasma de 28 pacientes com a doença do neurônio motor (incluindo principalmente a ALS) e 30 indivíduos sadios por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) com detecção eletroquímica [26]. O estudo mostrou que dos 317 metabolitos encontrados, 50 se encontravam em maior concentração nos pacientes com a doença do neurônio motor e mais de 70 se encontravam em níveis menores. Blasco *et al.* relataram o perfil metabólico do LCR de 50 pacientes com ALS na fase inicial e 44 indivíduos sadios por ressonância magnética nuclear ($^1\text{H-NMR}$ – do inglês *Proton Nuclear Magnetic Resonance*) [27]. Os resultados mostraram uma concentração de acetato significativamente menor nos pacientes com ALS que nos indivíduos sadios, enquanto que as concentrações de acetona, piruvato e ascorbato foram mais elevadas. O glutamato não pôde ser quantificado no LCR dos pacientes com ALS e também nos indivíduos sadios por $^1\text{H-NMR}$. Em outro estudo, as amostras do LCR de pacientes com ALS (casos familiares e esporádicos) e de indivíduos sadios foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS – do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*), mostrando a presença de outros metabolitos neste fluido biológico [28]. Assim, observou-se que os aminoácidos glutamato e glutamina apresentavam-se em níveis reduzidos, em particular nos pacientes com fALS. O estudo mostrou diferenças significativas no perfil e composição metabólica entre os pacientes com a forma familiar e esporádica da ALS e também nos pacientes com a mutação no gene *SOD1*.

Vários estudos mostraram que o nível elevado de homocisteína (Hcy) tem diversos mecanismos de ação na patogênese da ALS, incluindo acumulação de radicais livres e de cálcio citosólico, disfunção mitocondrial, ativação de apoptose e danos causados por aminoácidos excitotóxicos [29]. A Hcy é um aminoácido neurotóxico, formada a partir do metabolismo da metionina (Met) e é metabolizada tanto pela conversão a cisteína (Cys) por transulfuração ou a Met por remetilação (Fig. 1).

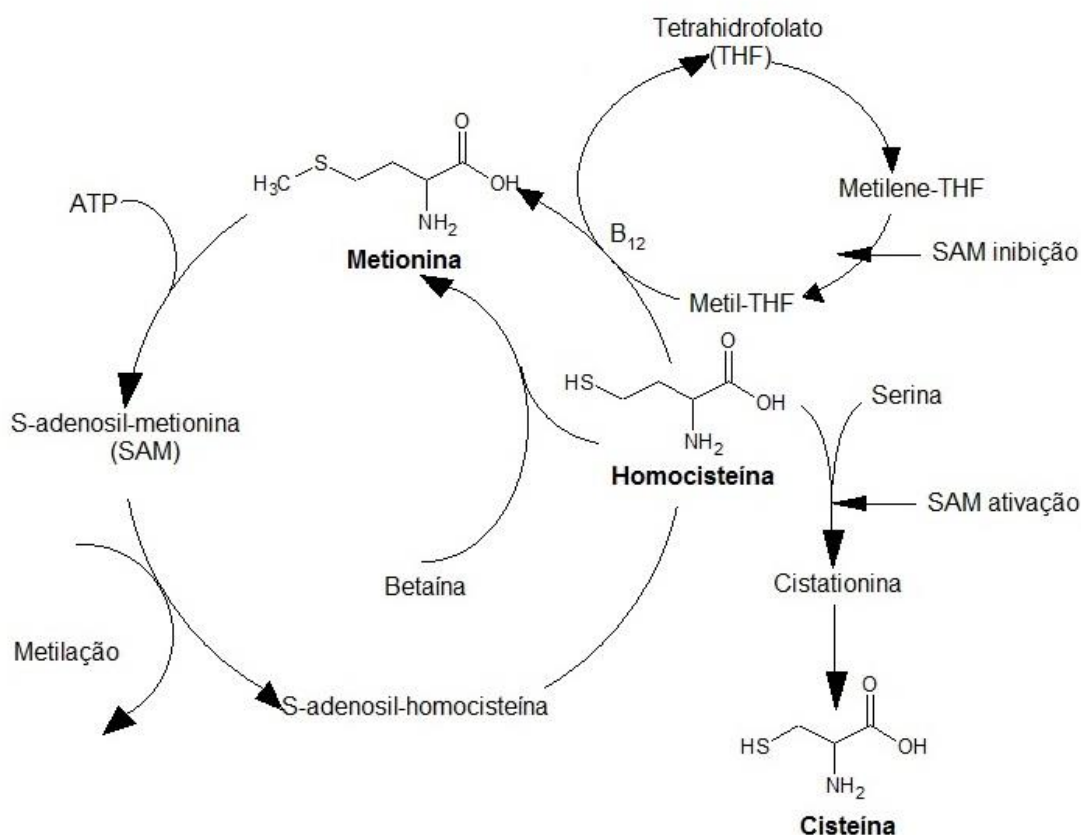


Fig. 1. Ciclo de homocisteína (adaptado de [30])

No primeiro estudo *in vivo* das mudanças do nível de Hcy no sistema nervoso central, Chung *et al.* usaram camundongos transgênicos que expressam mutação pontual na enzima Cu/Zn SOD humana (que apresenta um fenótipo similar a ALS em humanos, *SOD1G93A*). Assim, eles forneceram a evidência que astrócitos Hcy-imunorreativos foram encontrados no sistema nervoso central e sugeriram que os mesmos podem desempenhar um papel importante na patogênese e no progresso da ALS [31]. Levin *et al.* encontraram níveis elevados de metilmalonato na

urina e também níveis elevados de Hcy no soro de pacientes com paralisia supranuclear progressiva, ALS e doença de Parkinson, em comparação a indivíduos saudáveis [32]. Não foram encontradas diferenças nos níveis de Hcy e metilmalonato entre essas doenças, o que poderia significar que Hcy pode estar relacionada com a causa ou a consequência de neurodegeneração. Entretanto, a função de Hcy e metilmalonato nas doenças neurodegenerativas ainda não está clara. Zhang *et al.* demonstraram que o nível de 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), um metabólito do ciclo do ácido fólico envolvido com o metabolismo de Hcy, é significativamente reduzido no modelo de camundongos *SOD1G93A* transgênicos com a fase inicial da ALS pré-sintomática, enquanto que o nível de ácido fólico é reduzido na fase intermediária até a fase final, e o nível de Hcy é marcadamente elevado depois dos sintomas de neurônios motores aparecerem [33]. Portanto, eles sugeriram que o nível reduzido de 5-MTHF pode ser um possível biomarcador para o diagnóstico da fase inicial da doença. Valentino *et al.* estenderam as descobertas recentes dos níveis plasmáticos de Hcy na ALS para a determinação de Hcy no LCR e no plasma de pacientes com ALS e de indivíduos saudáveis [34]. Uma elevada concentração plasmática de Hcy foi encontrada nos pacientes com ALS em comparação a indivíduos saudáveis, o que está de acordo com os estudos anteriores. A concentração de Hcy no LCR foi significativamente elevada nos pacientes com ALS, independentemente do estágio da doença ou sexo do indivíduo. Por outro lado, Ricci *et al.* não observaram uma associação significativa do genoma com a ALS, tanto para o polimorfismo *c.677C>T* do gene metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR c.677C>T*) quanto para a combinação com polimorfismo de PON1 (paraoxonase 1, uma enzima da classe esterase que protege contra homocisteinilação de proteínas). Os resultados negativos sugeriram que o *MTHFR c.677C>T* não induz o risco da ALS na população italiana [35]. Esses resultados foram confirmados também no trabalho de Sazci *et al.* [36].

Diversos estudos também revelaram um papel importante de ácido glutâmico (Glu) em ALS. O Glu é um aminoácido e um importante neurotransmissor excitatório. Ele é armazenado em vesículas nos neurônios pré-sinápticos e liberado em resposta a despolarização de membrana, ativando as células pós-sinápticas pelos receptores de Glu. Após a transmissão do sinal, os transportadores de glutamato, localizados nas membranas de neurônios e da glia, retiram rapidamente

este aminoácido do espaço extracelular. O excesso de Glu pode levar à excitotoxicidade devido ao fluxo elevado de cálcio para dentro de neurônios. Assim, a alta concentração de cálcio ativa enzimas que podem destruir os componentes de células, levando à sua morte devido a apoptose [37].

Plaitakis e Caroscio observaram níveis de Glu elevados em plasma de pacientes com ALS, em comparação com indivíduos saudáveis e pacientes com outras doenças neurodegenerativas. Os níveis de outros aminoácidos permaneceram inalterados (Hcy e Cys não foram determinadas) [38]. Rothstein *et al.* também observaram níveis elevados de aminoácidos excitatórios Glu (190% maior) e ácido aspártico (100% maior) em LCR de pacientes com ALS em comparação com indivíduos saudáveis [39]. Ao estudarem o sistema de transporte de Glu nas sinaptossomas isoladas de cérebro e medula espinhal, observaram que a velocidade de transportadores de alta afinidade a Glu diminuiu, o que levou a acumulação de Glu dentro de neurônios [40].

Apesar de vários estudos ter mostrado que existe uma relação entre os níveis de aminoácidos e ALS, até o momento nenhum estudo quantificou Hcy, Cys, Met e Glu em plasma do mesmo grupo de saudáveis e pacientes com ALS. Além disso, nenhum estudo sobre os aminoácidos como potenciais biomarcadores de ALS foi feito no Brasil. É importante ressaltar, que a incidência de ALS e a idade mediana no Brasil são menores que na Europa. Em particular, a idade mediana dos pacientes da população indígena é $48,5 \pm 12,3$ anos, comparando com idade mediana de $64,4 \pm 12,3$ anos de população predominantemente caucasiana na Europa [3]. Esse fato pode ser associado com novas mutações genéticas ou nova suscetibilidade a fatores ambientais e, portanto, um estudo sobre a relação dos níveis plasmáticos de aminoácidos e ALS, incluindo a população brasileira, é essencial.

1.4. Análise de aminoácidos por eletroforese capilar

Os aminoácidos Hcy, Met, Cys e Glu apresentam caráter polar e, de acordo com a acidez do meio, possuem carga positiva ou negativa. Assim, podem ser analisados pela modalidade mais simples de eletroforese capilar (CE), que é uma técnica de separação que se baseia principalmente na migração diferencial de espécies iônicas ou ionizáveis em um campo elétrico [41]. A CE é amplamente

utilizada para análise de amostras biológicas devido à sua rapidez, alta resolução e eficiência. Além disso, requer baixos volumes de amostra e solventes (na faixa de nL e μ L, respectivamente), o que a torna um método ideal para a análise de fluidos biológicos cujo volume de amostra é restrito.

O modo de detecção mais utilizado em CE é a absorção de radiação UV, porém, os aminoácidos Hcy, Met, Cys e Glu não contêm um grupo cromóforo, impossibilitando, então, a sua detecção diretamente por CE-UV. Para contornar esse problema, pode-se realizar a análise por CE-UV com detecção direta ou indireta [42]. Na detecção direta, os aminoácidos reagem com um reagente derivatizante que contém o grupo cromóforo. Desta forma, os aminoácidos derivatizados absorvem radiação UV e podem ser detectados por CE-UV. Recentemente, vários tipos de reagentes derivatizantes foram comparados para aumentar ou possibilitar a detecção por absorção de radiação UV e por fluorescência [43]. É importante ressaltar que a derivatização aumenta a sensibilidade e a seletividade do método, porém, também altera as mobilidades eletroforéticas e hidrofobicidade dos aminoácidos.

Na detecção indireta, o eletrólito de corrida (BGE) contém um cromóforo que absorve radiação UV constantemente. Quando a zona de amostra contendo o aminoácido que não absorve radiação UV passa pelo detector, um sinal negativo é registrado [42]. Lee e Lin compararam nove cromóforos adicionados ao BGE para determinação de aminoácidos por CE com detecção indireta. Eles obtiveram a separação de 18 aminoácidos em 25 min utilizando ácido *p*-aminosalicílico ou ácido 4-(N,N-dimetil)aminobenzóico em meio alcalino como BGE [44]. Os valores de limites de detecção (LD) obtidos por detecção indireta são geralmente 10 vezes mais altos que os obtidos por detecção direta, porém, a vantagem da detecção indireta consiste na universalidade da detecção e um preparo de amostra mais simples em relação à detecção direta [45].

Outro modo de detecção desenvolvido mais recentemente é a detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C^4D – do inglês *Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection*). O C^4D é um detector universal, ou seja, não requer que seja realizado preparo adicional da amostra, como derivatização, para que os analitos sejam detectados. Ele se baseia na diferença

entre condutividade do BGE e da zona do analito que está passando pelo detector. Se a condutividade da zona do analito é maior que a do BGE, um pico positivo é registrado, enquanto que uma zona do analito com condutividade menor que a do BGE, gera um pico negativo [46]. Alguns aminoácidos já foram analisados em plasma e várias amostras naturais por CE-C⁴D [47,48], porém, nenhum estudo sobre a análise de Hcy ou aminotióis empregando esse tipo de detecção foi publicado até o momento.

Os detectores UV e C⁴D são pouco seletivos e informativos em relação à estrutura dos analitos. Desta forma, a única maneira de identificar um pico é pela comparação de tempos de migração com os de padrões ou pela adição de padrão. A identificação dos picos em amostras provenientes de matrizes complexas demanda o uso de outras técnicas instrumentais. A espectrometria de massas (MS) é uma técnica de detecção e identificação de moléculas de acordo com a razão massa/carga (m/z). A MS tem sido acoplada a diversas técnicas de separação com a finalidade de aumentar a sua detectabilidade e seletividade. A CE-MS tem sido empregada na análise metabolômica devido à sua aplicabilidade na análise de compostos polares e carregados e à sua complementaridade a outras técnicas como LC-MS e GC-MS [50–52]. Recentemente, diversos métodos de análise de aminoácidos foram publicados na literatura [53,54]. No estudo mais recente, 27 aminoácidos foram separados e determinados em urina utilizando *stacking* mediado por pH, uma estratégia de pré-concentração eletroforética usada para aumentar a detectabilidade do método [55]. Já a Hcy ou aminotióis, em geral, não são determinados junto com outros aminoácidos, devido à fácil oxidação do grupo tiol, o que requer um preparo de amostra diferenciado. Contudo Ivanov *et al.* determinaram Hcy em plasma de chinchila por CE-MS após a redução com mercaptoetanol ou ditioneitol [56].

Os métodos já publicados demonstraram sucesso na análise de Hcy e seus metabólitos por CE, porém um método analítico com simples tratamento da amostra, que possa ser utilizado para análise de aminotióis e aminoácidos na análise clínica, ainda precisa ser desenvolvido.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho envolveu o desenvolvimento de método analítico que permite a quantificação de homocisteína, cisteína, metionina e ácido glutâmico em plasma para a comparação dos níveis destes aminoácidos em pacientes com ALS e indivíduos saudáveis.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de homocisteína, cisteína, metionina e ácido glutâmico em plasma, empregando eletroforese capilar com detecção: por absorção UV (CE-UV); condutometria sem contato acoplado capacitivamente (CE-C⁴D); e por acoplamento com espectrometria de massas sequencial (CE-MS/MS).
- Validação do método que apresenta a melhor separação e detectabilidade.
- Comparação dos níveis plasmáticos de homocisteína, cisteína, metionina e ácido glutâmico em pacientes com ALS e indivíduos saudáveis, empregando análises uni- e multivariadas.

CAPÍTULO 3

**ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS POR
ELETROFORESE CAPILAR COM DETECÇÃO UV
E EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ACOPLADA
ON-LINE À ELETROFORESE CAPILAR COM
DETECÇÃO UV**

3.1. Introdução

A detecção por absorção UV é a mais empregada em CE. Porém, pode apresentar baixa detectabilidade devido ao caminho ótico reduzido e baixo volume de amostra injetado. Em CE, o caminho ótico é determinado pelo diâmetro interno do capilar utilizado, que é geralmente da ordem de dezenas de μm . Desta forma, os menores limites de detecção encontrados são na faixa de 10^{-5} a 10^{-7} mol/L [57].

Assim sendo, para melhorar a detectabilidade do método é necessário buscar um método de pré-concentração dos analitos. Existem ao menos duas estratégias de pré-concentração usadas em CE. A estratégia mais aplicada é a pré-concentração *on-line*, ou *stacking* (empilhamento), onde maior quantidade de amostra pode ser introduzida hidrodinamicamente ou/e eletrocinematicamente sem prejudicar a separação. As estratégias como *stacking* por injeção de grande volume, *stacking* mediado por força iônica e isotacoforese transiente, entre as outras, podem aumentar a resposta do detector de 10 a 1000 vezes [58,59].

Outra estratégia de pré-concentração dos analitos em CE é feita através de acoplamento à extração em fase sólida (SPE – do inglês *Solid Phase Extraction*). Na SPE, grande volume de amostra é carregado em um cartucho contendo um sorvente, onde os analitos são retidos. Em seguida, o analito é removido do cartucho com pequeno volume de eluente e assim pré-concentrado. Além da pré-concentração dos analitos através de SPE, é possível também eliminar os interferentes e, então, simplificar a amostra que será introduzida no sistema de CE e reduzir o efeito matriz [60].

A pré-concentração dos aminoácidos por SPE é feita principalmente no modo *off-line*, ou seja, primeiramente a amostra é pré-concentrada por SPE e depois é transferida manualmente para o sistema CE. Desta forma, pode ocorrer maior perda de amostra e aumento do tempo de análise. Para contornar esses problemas, a SPE pode ser acoplada à CE também *on-line*. No acoplamento SPE-CE *on-line*, o sistema SPE faz parte do sistema CE. Geralmente dois capilares, um para pré-concentração por SPE e outro para separação por CE, são acoplados diretamente ou pelo sistema de válvulas. Assim, as perdas de amostra entre SPE e CE são reduzidas, assim como o tempo de análise [61].

Li *et al.* pré-concentraram amostras de aminoácidos por SPE-CE *on-line* utilizando capilar com parede interna revestida com sol-gel apresentando carga positiva de sal quaternário de amônio. Foi possível pré-concentrar alanina até 150000 vezes em comparação com o método CE convencional [62]. Breadmore *et al.* usaram um pequeno cartucho SPE a base de monolito polimerizado dentro do capilar de separação. O triptofano foi introduzido na coluna em solução de ácido sulfúrico diluída com pH 2,9 (eletrólito fraco) e eluído por eletro-eluição com solução de etilenodiamina (62,5 mmol/L, pH 2,9) com 40% (v/v) acetonitrila (eletrólito forte). Nesse caso, a pré-concentração de triptofano foi de 300 vezes [63].

Recentemente, um acoplamento SPE-CE *on-line* utilizando sorvente comercial chamou atenção pela sua fabricação simples e de baixo custo [64]. Por esse motivo, testou-se o método de pré-concentração dos aminoácidos, após a derivatização, por SPE-CE *on-line* utilizando sorvente polimérico Oasis HLB. Os experimentos com SPE-CE *on-line* foram feitos durante um intercâmbio de três meses no Centro Australiano para Pesquisa em Ciência de Separações (ACROSS – do inglês *Australian Centre for Research on Separation Science*), na Universidade de Tasmânia, sob orientação do Prof. Michael Breadmore.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Solventes, reagentes e padrões analíticos

3.2.1.1. Solventes

Metanol com grau de pureza para HPLC foi adquirido da Tedia (Brasil). A acetonitrila com grau de pureza para UPLC foi comprada na PanReac (EUA). Pentano com grau de pureza P.A. foi obtido da Synth (Brasil). Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada em sistema MilliQ (Millipore, EUA).

3.2.1.2. Reagentes

Cloreto de 9-fluorenil-metoxicarbonil (FMOC, pureza $\geq 99\%$) e ácido bórico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha). Hidróxido de sódio, ácido clorídrico com grau de pureza P.A. e ácido fórmico (pureza 85%) foram comprados na Synth

(Brasil). Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi obtido da Promega (Brasil), e formiato de sódio foi adquirido da Vetec (Brasil, pureza min. 99%).

3.2.1.3. Padrões analíticos

Homocisteína, hidrocloreto de cisteína, ácido glutâmico, metionina, norleucina, norvalina e *trans*-4-hidroxiprolina foram obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha). Todos os padrões analíticos foram adquiridos com pureza maior de 98%.

3.2.2. Equipamentos e materiais

As análises eletroforéticas foram feitas no equipamento CE modelo 7100 equipado com detector de arranjo de diodos (Agilent, Alemanha). A aquisição dos dados foi realizada pelo programa ChemStation (Agilent, EUA). Foram utilizados capilares de sílica fundida com diâmetro externo de 360 µm e diâmetro interno de 50 e 250 µm (Polymicro, EUA). Os capilares foram cortados com cortador de colunas (Agilent, EUA). Para acoplar os capilares de extração em fase sólida à CE (SPE-CE), tubos de politetrafluoretileno (PTFE) com diâmetro externo de 1,58 mm e diâmetro interno de 0,3 mm (Supelco, EUA) foram utilizados.

Os capilares de SPE-CE foram preenchidos utilizando um sistema de Manifold conectado à bomba de vácuo modelo VISIPREPTM (Supelco, EUA) com compressor aspirador (FANEM®, Brasil). Os sorventes utilizados foram: fase reversa C18 quimicamente ligada a suporte de sílica (55-105 µm, Sep-Pak C18, Waters, EUA); fase reversa C8 e C18 quimicamente ligada a suporte de sílica (55 µm, Strata, Phenomenex, EUA), fase reversa baseada em poliestireno-divinilbenzeno (DVB, 45 e 85 µm, Chromabond, Macherey-Nagel, Alemanha) e sorventes com equilíbrio hidrofílico-lipofílico (55 µm, Oasis HLB, Waters, EUA). O acoplamento de SPE-CE foi verificado com microscópio ótico (aumento de 10 vezes, Nikon E-800, Japão).

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada no sistema de purificação de água MilliQ modelo Direct-Q® (Millipore, EUA). Os padrões sólidos foram pesados em balança analítica modelo GH-202 (A&D, Japão) com precisão de $\pm 0,01$ mg. As soluções foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo vórtex modelo MX-S (GOMixer, Tedia, Brasil) ou em banho de ultrassom (Eco-Sonics, Brasil). O pH das soluções foi ajustado com pH-metro modelo 827 pH lab (Metrohm,

Suíça). Todas as soluções foram filtradas com filtros de seringa com membrana Durapore® de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,22 µm (Millex® - GV, 13 mm) ou com filtros de seringa com membrana de nylon 0,45 µm (Millex® - GN, 33 mm) da Merck Millipore (Irlanda).

3.2.3. Preparo de soluções de aminoácidos

As soluções estoque de padrões de aminoácidos para desenvolvimento do método de análise por CE-UV foram preparadas na concentração de aproximadamente 7 mmol/L em água deionizada, enquanto as soluções estoque para desenvolvimento do método de análise por SPE-CE-UV foram preparadas na concentração de 1 mmol/L. As alíquotas de soluções estoque filtradas com filtro de membrana com poro de 0,22 µm foram armazenadas no máximo por um mês a -20 °C até o dia da análise. As soluções de trabalho foram preparadas mediante diluição da solução estoque.

3.2.4. Derivatização de aminoácidos

A derivatização dos aminoácidos para detecção UV foi feita através da reação com FMOC (Fig. 2) [65].

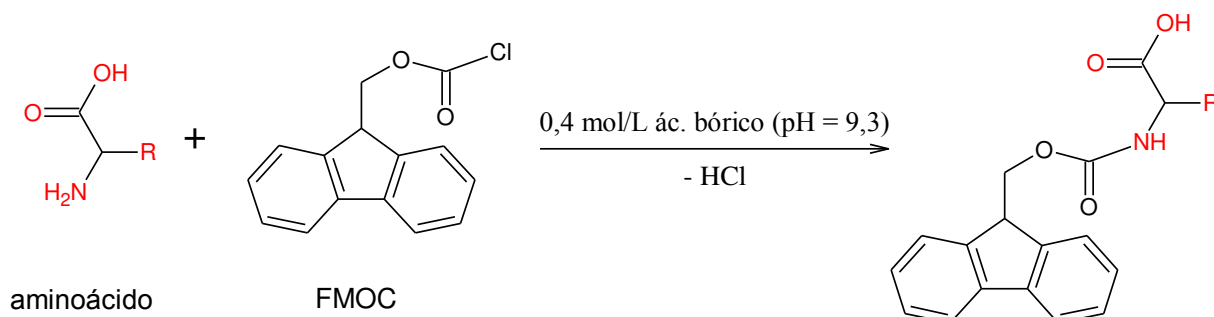


Fig. 2: Reação de derivatização de aminoácidos com FMOC.

Inicialmente, 50 µL de tampão borato (0,4 mol/L; pH = 9,3) foram adicionados a 100 µL de solução de trabalho de aminoácidos. Subsequentemente, 100 µL de solução de FMOC 5 mmol/L em acetonitrila foram adicionados à mistura de aminoácidos em tampão. Após 1 min de reação, o excesso de FMOC foi extraído duas vezes com pentano. A extração foi feita através de adição de 0,5 mL de pentano, seguida de agitação da mistura em vórtex por 30 s. Após a separação das

fases, a fase orgânica foi descartada e a fase aquosa foi extraída novamente com 0,5 mL de pentano. Depois da extração, a fase aquosa foi injetada diretamente ao CE. Para análise por SPE-CE-UV, 10 µL de ácido fórmico foram adicionados à fase aquosa para garantir que todos os aminoácidos derivatizados (FMOC-AAs) estivessem neutros.

3.2.5. Preparo de solução de eletrólito de corrida

Para análise de aminoácidos por CE-UV foi empregado o eletrólito de corrida (BGE – do inglês *Background Electrolyte*) composto por borato 50 mmol/L e SDS 40 mmol/L (pH = 10,1). Primeiramente, preparou-se uma solução estoque de tampão borato na concentração de 250 mmol/L pela dissolução de aproximadamente 0,8 g de ácido bórico em água deionizada. Após ajuste de pH para 10,1 com a solução de NaOH 1 mol/L, o volume foi completado para 50 mL. A solução estoque de tampão borato foi mantida sob refrigeração (4 °C). Para preparo de BGE, aproximadamente 0,1 g de SDS foi dissolvido em 2 mL de solução estoque de tampão borato e o volume foi completado para 10 mL com água deionizada. A solução de BGE foi preparada diariamente.

Para análise de aminoácidos por SPE-CE-UV se utilizou BGE composto por borato 50 mmol/L (pH 10), preparado mediante a dissolução de aprox. 0,08 g de ácido bórico em água deionizada e ajuste de pH para 10 com a solução de NaOH 1 mol/L. O volume foi completado com água deionizada para 25 mL e a solução de BGE foi mantida sob refrigeração (4 °C).

3.2.6. Análise de aminoácidos por CE-UV

A separação dos aminoácidos derivatizados com FMOC (FMOC-AAs) foi feita em capilares de sílica fundida com comprimento efetivo (L_{eff}) de 60 cm, 360 µm o.d. e 50 µm i.d. Antes do primeiro uso, os capilares foram pré-condicionados com NaOH 0,1 mol/L por 30 min, água deionizada por 10 min e BGE por 30 min. Entre as corridas, os capilares foram condicionados com NaOH 0,1 mol/L por 2 min, água deionizada por 2 min e BGE por 5 min. O BGE foi composto por borato 50 mmol/L e SDS 40 mmol/L (pH = 10,1). A separação ocorreu a 25 °C, aplicando potencial de +15 kV. As soluções de FMOC-AAs foram injetadas hidrodinamicamente, aplicando-

se pressão de 50 mbar por 15 s. Os FMOC-AAs foram detectados em comprimento de onda de 265 nm.

3.2.7. Fabricação de microcartuchos para acoplamento de SPE e CE

Os microcartuchos de SPE foram preparados durante o intercâmbio no ACROSS, na Universidade de Tasmânia de acordo com o artigo previamente publicado por Botello, *et al.* [64]. Resumidamente, um capilar de sílica fundida com diâmetro externo (o.d.) de 360 μm e diâmetro interno (i.d.) de 50 μm foi cortado com cortador cerâmico em dois segmentos de 8,5 e 5 cm. Em seguida, 5 mm de um capilar de sílica fundida de 360 μm o.d. e 250 μm i.d. foi cortado. O corte apropriado é essencial para o funcionamento adequado de SPE-CE; portanto, o processo foi acompanhado com o uso de um microscópio ótico. O capilar de 8,5 cm (*inlet*) e o microcartucho (capilar de 5 mm) foram inseridos em um tubo de PTFE de 1,5 cm e 300 μm i.d., que funcionou como uma luva. O *inlet* foi conectado à bomba de vácuo, o microcartucho foi inserido no frasco contendo o sorvente de SPE e o vácuo foi ligado. Quando todo microcartucho foi preenchido com o sorvente, o vácuo foi desligado e o microcartucho foi fechado com 5 cm de capilar com i.d. 50 μm . O microcartucho pronto foi conferido com o microscópio ótico. O processo de fabricação do microcartucho está apresentado na Fig. 3.

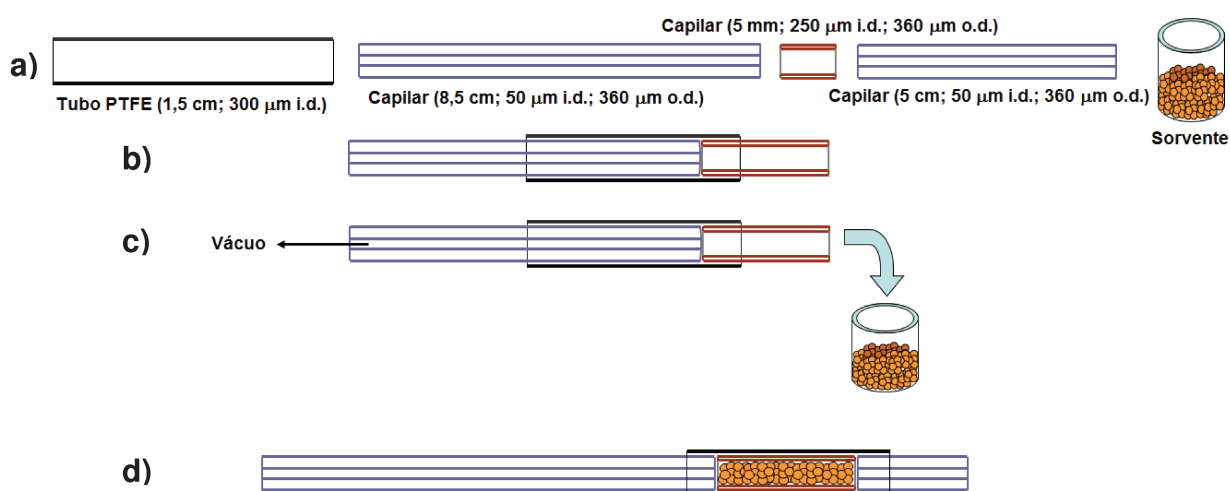


Fig. 3. Processo de fabricação dos microcartuchos para SPE-CE. a) corte dos três segmentos de capilar; b) junção dos capilares SPE-CE; c) preenchimento do capilar SPE-CE com sorvente; d) capilar SPE-CE pronto para uso.

3.2.8. Análise de aminoácidos por SPE-CE-UV

Os microcartuchos de SPE foram acoplados ao capilar de separação (SPE-CE), previamente condicionado com NaOH 0,1 mol/L por 30 min, água deionizada por 10 min e BGE por 30 min. O funcionamento dos capilares SPE-CE foi verificado aplicando-se o potencial de +15 kV por 1 min, sendo observada uma corrente elétrica estável de 12 μ A. Além disso, foi verificado o tempo necessário para que a zona de metanol (injetado por 15 s, 50 mbar) atingisse o detector (λ = 210 nm), aplicando-se pressão positiva de 930 mbar ao *inlet*. Este tempo foi de 70 a 75 s no capilar de SPE-CE, se fabricado corretamente.

Antes de cada análise, o capilar de SPE-CE foi condicionado com BGE por 2 min, acetonitrila por 5 min e formiato de sódio 50 mmol/L (pH = 3) por 2 min. Após o condicionamento do capilar de SPE-CE, a solução de FMOC-AAs contendo 10 μ L de ácido fórmico, para garantir que todos os analitos estejam neutros (pH \sim 2), foi injetada sob pressão de 930 mbar por 15 min. Os interferentes foram retirados pela passagem do BGE (2 min, 930 mbar), sendo o capilar concomitantemente preenchido com o BGE. Os FMOC-AAs foram eluídos com a zona de solução contendo acetonitrila:metanol:BGE, 3:3:1 v/v/v (eluente, 90 s, 50 mbar). Esta zona de eluente fluiu pelo sorvente com o auxílio de outra zona de BGE até que a zona de amostra chegasse à entrada do capilar de separação (500 s, 50 mbar). O potencial de +15 kV foi aplicado e os FMOC-AAs foram, então, separados. O procedimento de extração e análise de aminoácidos por SPE-CE-UV está resumido na Fig. 4.

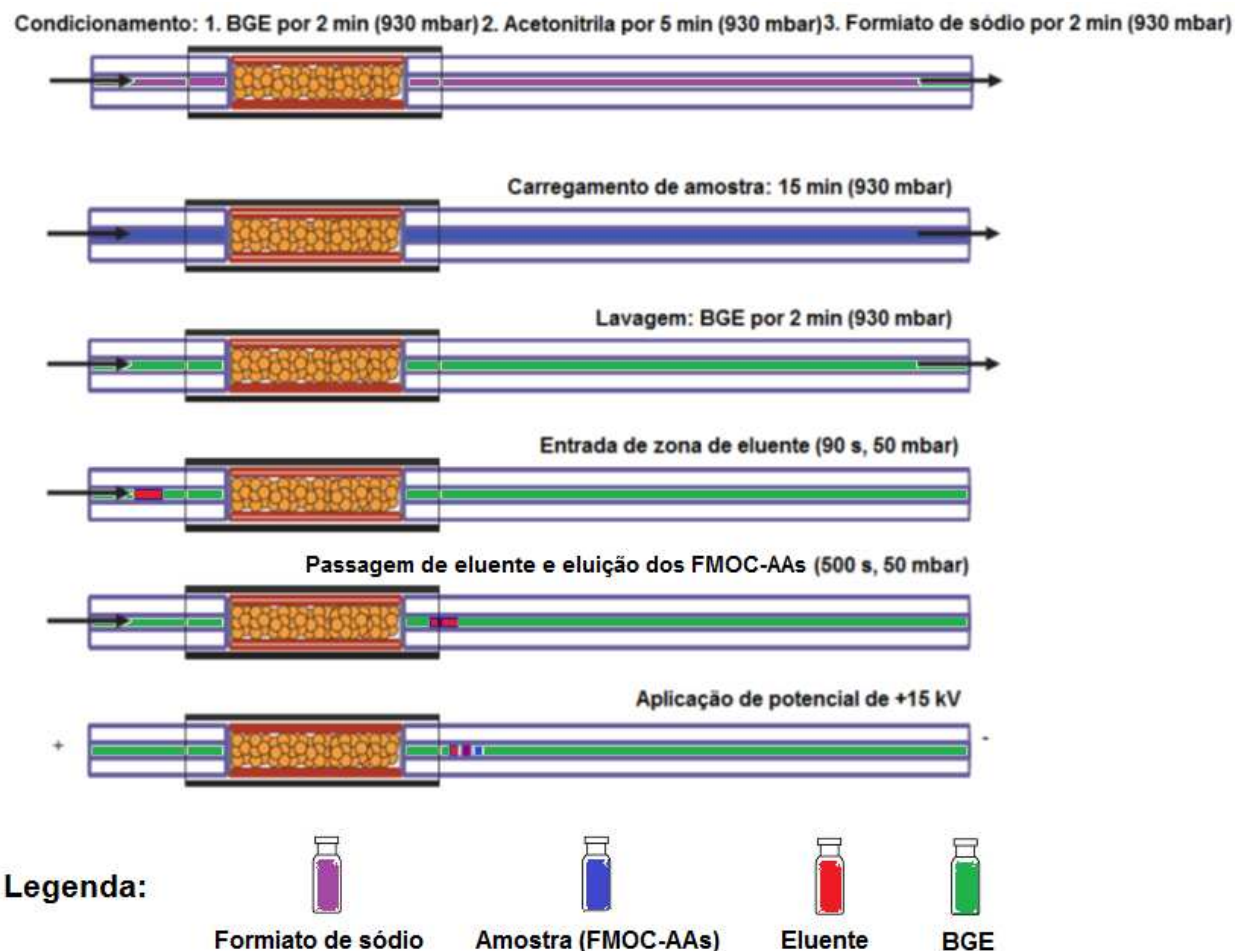


Fig. 4. Esquema de análise de aminoácidos por SPE-CE-UV.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Derivatização de aminoácidos

A derivatização dos aminoácidos antes da análise é uma boa opção para modificar os aminoácidos que não apresentam grupos cromóforos e permitir sua detecção por absorção de radiação UV. Entre vários reagentes derivatizantes publicados na literatura, o FMOC foi escolhido devido à sua rapidez da reação, custo relativamente baixo e razoável estabilidade dos produtos de derivatização. A reação é dependente da acidez do meio e requer excesso de reagente derivatizante para garantir que a reação seja completa. Porém, o excesso de FMOC passa por hidrólise, formando FMOC-OH, que pode interferir na análise eletroforética, por apresentar um pico bastante intenso. Assim, é necessário remover o FMOC

remanescente através da reação com cloridrato de amantadina ou extração líquido-líquido (LLE).

Diferentes condições de derivatização com FMOC são encontradas na literatura [66]. Geralmente, usa-se um tampão borato nas concentrações entre 0,01 a 0,4 mol/L e pH de 6 a 11,4. Porém, em pH maior que 10, a velocidade de hidrólise aumenta, o que requer maior excesso de FMOC e favorece a produção de FMOC-OH.

Neste trabalho, as condições iniciais empregadas foram baseadas no método publicado por Chan *et al.* [65]. 500 μ L de solução de padrões de aminoácidos foram misturados com 100 μ L de tampão borato 0,4 mol/L (pH 9,3) e 400 μ L de FMOC (5 mmol/L em acetonitrila). Após 1 min, o excesso de FMOC foi extraído duas vezes com 2 mL de pentano. Posteriormente, os volumes de reagentes foram diminuídos para 100:50:100 (volume em μ L de aminoácidos: volume em μ L de tampão: volume em μ L de FMOC). A extração foi feita duas vezes com 500 μ L de pentano, conforme descrito na sessão 3.2.4.

3.3.2. Otimização de composição do BGE

Para otimização do método de separação de aminoácidos por CE-UV, foi usada uma solução contendo cisteína, homocisteína, metionina, ácido glutâmico e *trans*-4-hidroxi-prolina (padrão interno, PI) na concentração final de 0,1 mmol/L. O método publicado por Chan *et al.* [65] utiliza BGE composto por borato 20 mmol/L, pH 9,2. Portanto, inicialmente, a concentração de borato e o pH do BGE foram alterados simultaneamente, conforme descrito na Tab. 2.

Tab. 2. Otimização inicial da composição do BGE para análise de aminoácidos por CE-UV.

BGE	[borato] (mmol/L)	pH
1	20	9,3
2		9,5
3		9,7
4		9,9
5		10,1
6	30	9,3
7		9,5
8		9,7
9		9,9
10		10,1
11	50	9,3
12		9,5
13		9,7
14		9,9
15		10,1

Observou-se que com aumento da concentração de borato, e consequente, o aumento da força iônica do BGE, houve diminuição do fluxo eletrosmótico (EOF), levando a um maior tempo de análise (Fig. 5). O pH acima de 8 não tem influência na velocidade do EOF, já que todos os grupos silanóis da parede interna do capilar estão desprotonados e, portanto, neste pH, o EOF atinge a velocidade máxima.

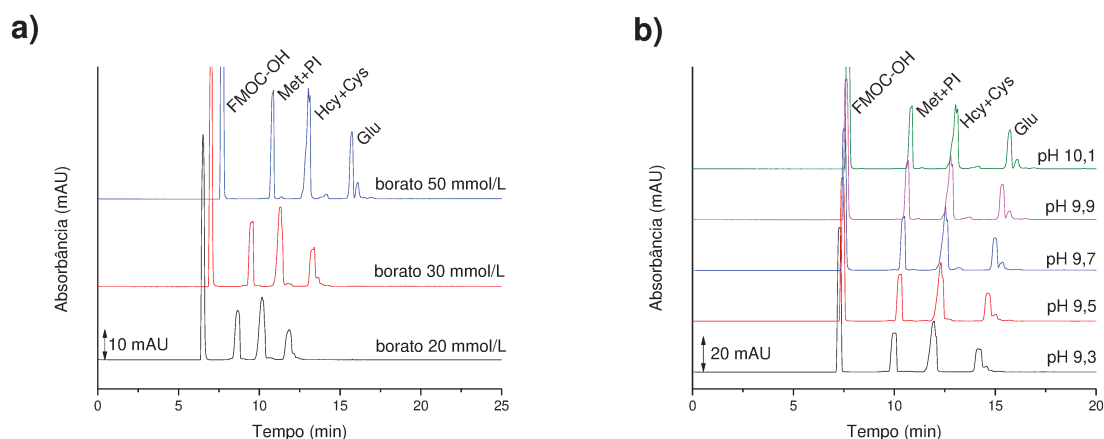


Fig. 5. Comparação de eletroferogramas de separação de aminoácidos em BGE composto por: a) borato na concentração de 20, 30 e 50 mmol/L e pH 10,1; b) borato 50 mmol/L em pH 9,3; 9,5; 9,7; 9,9 e 10,1. Condições de análise: Tensão: 20 kV, L_{eff} : 72 cm, 75 μm i.d., tempo de injeção: 15 s (50 mbar), λ : 265 nm.

Vale a pena destacar que a derivatização dos aminoácidos com Fmoc modifica o grupo amina ($-\text{NH}_2$) devido à ligação da carbonila do Fmoc no nitrogênio do aminoácido. Desta forma, os aminoácidos derivatizados possuem carga negativa em pH maior que 4 (Tab. 3), levando à pouca variação de mobilidade na faixa de pH entre 9,3 e 10,1 (avaliados nas corridas eletroforéticas).

Tab. 3. Valores de pK_a dos aminoácidos derivatizados com Fmoc [67].

Aminoácido	pK_{a1}	pK_{a2}	R
Metionina	3,82	14,16	$-(\text{CH}_2)_2\text{-S-CH}_3$
Homocisteína	3,77	14,23	$-(\text{CH}_2)_2\text{-SH}$
Cisteína	3,70	14,32	$-\text{CH}_2\text{-SH}$
Ácido glutâmico	3,38	14,03	$-(\text{CH}_2)_2\text{-COOH}$

A avaliação de composição do BGE foi feita através da comparação de resoluções entre os pares de picos e eficiências de separação. A resolução R foi calculada pela Eq. 1:

$$R = \frac{2(t_{m2} - t_{m1})}{(w_2 + w_1)} \quad \text{Eq. 1}$$

onde t_m é tempo de migração e w é a largura na base do pico.

A eficiência de separação (N) foi calculada através da Eq. 2:

$$N = 16 \left(\frac{t_m}{w} \right)^2 \quad \text{Eq. 2}$$

As resoluções entre os pares de picos foram comparadas (Fig. 6), sendo que a resolução mínima aceitável foi 1,5. A separação com melhores resoluções foi em BGE composto por borato na concentração 50 mmol/L em pH 10,1. Porém, ainda assim, não foi possível separar PI de Met e Hcy de Cys. As resoluções foram: 5,8 entre os picos de Fmoc-OH e PI+Met; 2,9 entre os picos de PI+Met e Hcy+Cys e 2,9 entre os picos de Hcy+Cys e Glu.

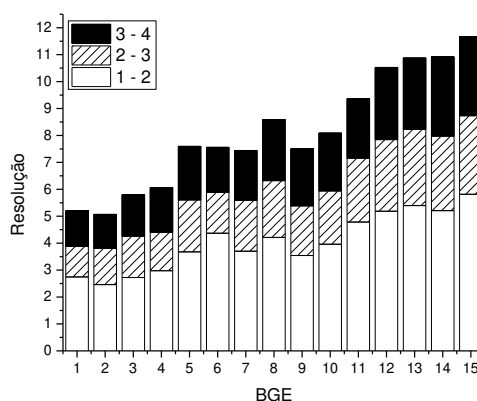


Fig. 6. Comparação das resoluções de pares de picos nos eletroferogramas de separação de aminoácidos utilizando BGE composto por borato na concentração 20; 30 e 50 mmol/L e pH 9,3 a 10,1. A composição do BGE está apresentada na Tab. 2. Legenda: 1 – Fmoc-OH; 2 – Met+PI; 3 – Hcy+Cys, 4 – Glu. Condições de análise como na Fig. 5.

Como as maiores resoluções foram obtidas com maior concentração de borato, aumentou-se a concentração do borato para 60, 80, 100, 120 e 150 mmol/L. Manteve-se o pH do BGE em 10,1, já que a máxima capacidade de tamponamento de borato é na região de pH de $9,2 \pm 1$, sendo que as maiores resoluções foram obtidas em pH 10,1. Novamente, as resoluções entre os pares de picos foram calculadas pela Eq. 1 e são comparadas na Fig. 7a.

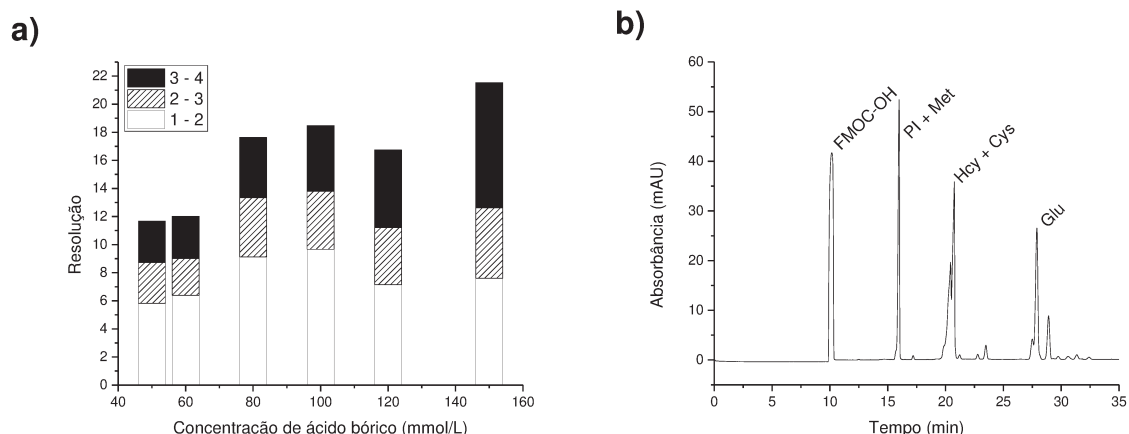


Fig. 7. a) Comparação das resoluções de pares de picos nos eletroferogramas de separação de Fmoc-AAs utilizando BGE composto por borato na concentração 50; 60; 80; 100; 120 e 150 mmol/L e pH 10,1. Legenda: 1 – Fmoc-OH; 2 – Met+PI; 3 – Hcy+Cys, 4 – Glu. b) Eletroferograma ilustrando a separação de Fmoc-AAs em BGE composto por borato na concentração de 150 mmol/L e pH 10,1. Demais condições de análise como na Fig. 5.

As resoluções entre os pares de picos aumentaram com aumento de concentração de borato no BGE, porém, a separação de PI e Met não foi observada para nenhuma das condições testadas. Utilizando o BGE contendo borato na concentração de 150 mmol/L e pH 10,1 notou-se separação parcial entre Hcy e Cys (Fig. 7b). A resolução entre esses dois picos foi de 0,5, que é menor que o valor aceitável. Decidiu-se não aumentar mais a concentração do borato para evitar possível efeito Joule e não tornar o tempo de análise excessivamente longo.

Outra modalidade de eletroforese capilar é a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC – do inglês *Micelar Electrokinetic Chromatography*), que é voltada principalmente para separação eletroforética de compostos neutros. O mecanismo de separação se baseia nas interações entre micelas e analitos. Os analitos neutros apolares ou moderadamente polares interagem com o interior das micelas, enquanto os analitos polares podem interagir com a superfície das micelas. Os analitos anfifílicos se alinham com a micela para que possam interagir com o interior hidrofóbico e superfície hidrofílica da micela. A velocidade de migração dos analitos é determinada pela extensão da interação entre a micela e analito [68].

Devido à dificuldade de separar os aminoácidos com mobilidades próximas por CZE, foi testada a adição de SDS ao BGE com intuito de separá-los por MEKC. Testaram-se soluções de BGE compostas por borato com concentrações

de 30, 40, 50, 60, 80 e 100 mmol/L e SDS com concentrações de 30, 40 e 50 mmol/L (Tab. 4). As soluções de BGE contendo borato na concentração maior que 100 mmol/L não foram testadas, por resultarem em longo tempo de análise (mais que 25 min). Foi observado que, utilizando concentração do borato acima de 60 mmol/L e SDS acima de 40 mmol/L houve aumento do tempo de análise para mais de 30 min. Na Fig. 8 são apresentados os eletroferogramas obtidos para cada condição. As resoluções e eficiências foram também calculadas e foi confirmado que a melhor separação foi obtida utilizando BGE composto por 50 mmol/L borato e 40 mmol/L SDS (condição H, Fig. 8) com resolução mínima de 1,7 entre os picos de FMOC-OH e Hcy+Cys e eficiências entre $3,3 \times 10^3$ (PI) e $6,6 \times 10^3$ (Met). Porém, ainda assim, não houve separação entre Hcy e Cys por MEKC.

Tab. 4. Composição de BGE para otimização de separação dos aminoácidos por MEKC

Condição	[borato] (mmol/L)	[SDS] (mmol/L)
A	30	30
B		40
C		50
D	40	30
E		40
F		50
G	50	30
H		40
I		50
J	60	30
K		40
L		50
M	80	30
N		40
O		50
P	100	30
Q		40
R		50

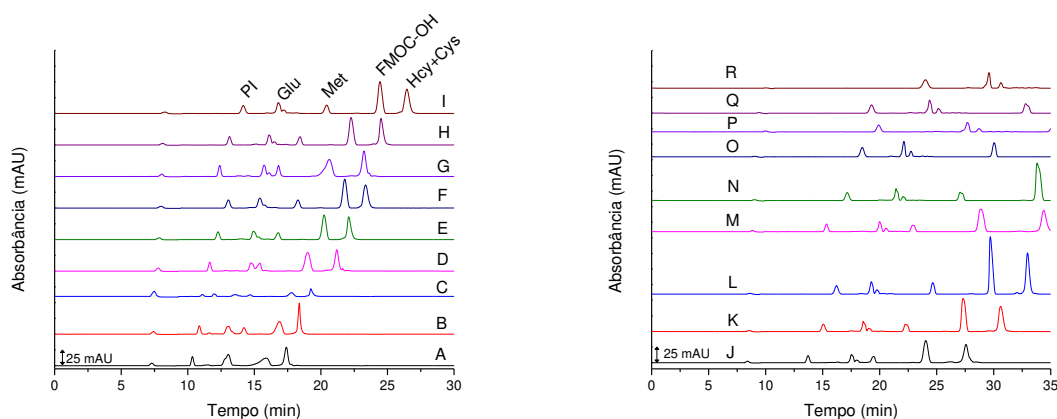


Fig. 8. Comparação de eletroferogramas de separação de FMOc-AAs em BGE composto por borato e SDS em várias concentrações e pH 10,1 (Tab. 4). Demais condições de análise como na Fig. 5.

A curva de Ohm foi construída para verificar a eficiência na dissipação do calor gerado pela aplicação do campo elétrico (efeito Joule) (Fig. 9). O resultado mostrou que a curva começou a desviar da linearidade a partir de 20 kV. Assim, seleccionou-se potenciais menores que 20 kV para as etapas seguintes.

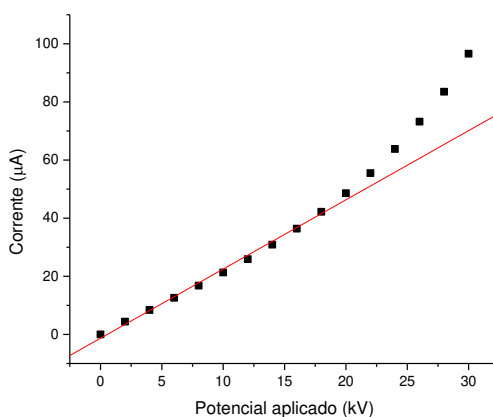


Fig. 9. Curva de Ohm para o BGE composto por borato 50 mmol/L e SDS 40 mmol/L em pH 10,1. Demais condições como na Fig. 5.

3.3.3. Limites de detecção e quantificação

Geralmente, as concentrações médias de Hcy, Met e Glu em plasma variam entre 9 e 59 $\mu\text{mol/L}$ (Tab. 5, [69]). Para verificar se seria possível quantificar todos os analitos pelo método otimizado, determinaram-se os valores de limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método pela razão sinal/ruído. Para isso, foram injetadas soluções de aminoácidos derivatizados em concentrações

regressivas até observação de relação sinal/ruído igual a 3 e a 10 para LD e LQ, respectivamente. Os valores de LQ determinados indicaram que o método não poderia ser utilizado para determinação de Hcy em plasma e que seria necessário usar uma estratégia de pré-concentração.

Tab. 5: Comparação dos valores de LQ de FMOC-AAs obtidos por CE-UV e níveis esperados de AAs em plasma de indivíduos saudáveis

Aminoácido	LQ obtido por CE-UV (μmol/L)	Concentração média em plasma (μmol/L) [69]
Metionina	28,8	30
Homocisteína	208	9
Ácido glutâmico	6,69	59

3.3.4. Pré-concentração de aminoácidos por extração em fase sólida acoplada on-line à CE-UV

A extração em fase sólida (SPE) é um dos métodos mais utilizados para extração e pré-concentração dos analitos. Em comparação com outros métodos, como a LLE, a SPE possui alta seletividade com uma ampla faixa de sorventes que podem ser empregados para extração e pré-concentração dos aminoácidos.

Na maioria dos casos, a SPE é executada de forma *off-line* através da passagem da amostra por cartuchos comerciais contendo o sorvente de interesse. Porém, a SPE pode ser também realizada de forma *on-line*, utilizando capilares de diâmetros internos diferentes, preenchidos com os mesmos sorventes comerciais [60].

3.3.4.1. Comparação de sorventes para SPE-CE-UV on-line

Os aminoácidos são compostos anfóteros, que apresentam carga positiva ou negativa de acordo com a acidez do meio. Por este motivo, podem ser extraídos com sorventes de troca iônica. Porém, as matrizes biológicas complexas contêm altos níveis de sais que prejudicam a pré-concentração dos aminoácidos através desse tipo de sorvente.

Em geral, os aminoácidos não apresentam grupos cromóforos, exceto os que têm grupos aromáticos, sendo então necessária a derivatização de tais analitos

antes da análise por CE-UV. Após a etapa de derivatização, os aminoácidos adquirem tanto grupos cromóforos como maior caráter hidrofóbico, podendo ser extraídos com sorventes como C8, C18 e fenil.

A SPE é usualmente realizada no modo *offline*, ou seja, a extração, a pré-concentração e a análise da amostra são conduzidas separadamente. Primeiramente, a amostra é tratada por SPE e, em seguida, é introduzida de modo convencional no sistema, onde ocorrem separação e detecção, neste caso, por CE-UV. A SPE pode ser realizada também na forma *on-line*. No sistema SPE-CE *on-line*, ocorre extração, pré-concentração e separação dos analitos da amostra no mesmo capilar. Esse sistema traz várias vantagens, como: automatização; consumo de volume de amostras e solventes extremamente baixos; redução no tempo de preparo e análise de amostras complexas; e diminuição de introdução de erros provenientes do operador. O plasma é uma amostra muito complexa e disponível em pequenos volumes, geralmente são coletados 4 mL de sangue por indivíduo de qual cerca de 55% é o plasma. Assim, o uso de um sistema SPE-CE *on-line* é extremamente vantajoso [60].

Nesse trabalho, foram comparados vários sorventes comerciais com propriedades hidrofóbicas para SPE-CE-UV *on-line*: C8, C18, divinilbenzeno (DVB) e com equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB). Primeiramente, foi realizada a pré-concentração dos FMOC-AAs utilizando capilares preenchidos com partículas de C18 com formato irregular com diâmetro de 55 a 105 μm . Foi observado que os FMOC-AAs foram eluídos do sorvente pela passagem da solução de lavagem (BGE contendo borato 50 mmol/L e SDS 40 mmol/L em pH 10,1). O SDS tem uma cadeia de 12 átomos de carbono, conferindo propriedades hidrofóbicas ao surfactante; portanto, a presença do SDS no BGE causa a eluição precoce dos FMOC-AAs. Foi, então, necessário mudar a composição do BGE sem alterar a separação do padrão interno hidroxiprolina (Pro-OH) e da metionina, o que só foi possível no modo MEKC. Por esse motivo, a Pro-OH foi substituída por norleucina (NLeu) com o intuito de realizar a separação eletroforética com um BGE livre de SDS. A Fig. 10 mostra a separação de NLeu, Met, Hcy e Glu, em comparação com a separação de Pro-OH, Met, Hcy e Glu por CZE sem acoplamento à SPE, utilizando BGE contendo borato 50 mmol/L em pH 10,0.

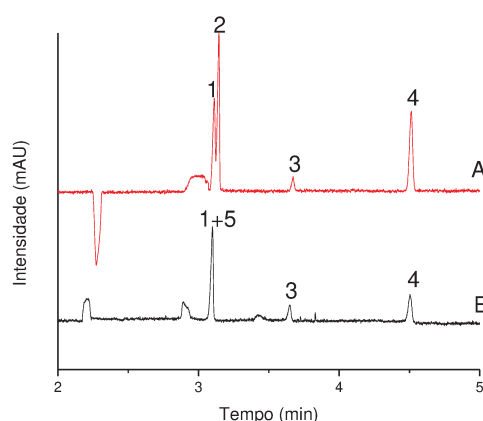


Fig. 10. Comparação de eletroferogramas (CZE-UV) de mistura de NL, Met, Hcy e Glu (A), e mistura de Pro-OH, Met, Hcy e Glu (B) (soluções de padrões 250 $\mu\text{mol/L}$): 1 – Met, 2 – NLeu, 3 – Hcy, 4 – Glu, 5 – Pro-OH. Condições de análise: V: +15 kV, capilar: Leff: 60 cm, 50 μm i.d., tempo de injeção: 15 s (50 mbar), λ : 265 nm. Composição do BGE: borato 50 mmol/L, pH 10,0.

Observou-se que a separação de FMOC-AAs por SPE-CE-UV (utilizando sorvente irregular à base de C18) com BGE contendo somente borato 50 mmol/L não foi possível, por causa da corrente instável (Fig. 11). Substituiu-se então o sorvente irregular por partículas C18 esféricas regulares. Deste modo, observou-se a pré-concentração e separação dos FMOC-AAs com uma corrente elétrica estável de 11 μA . Assim, tais partículas foram usadas nas análises por SPE-CE-UV seguintes.

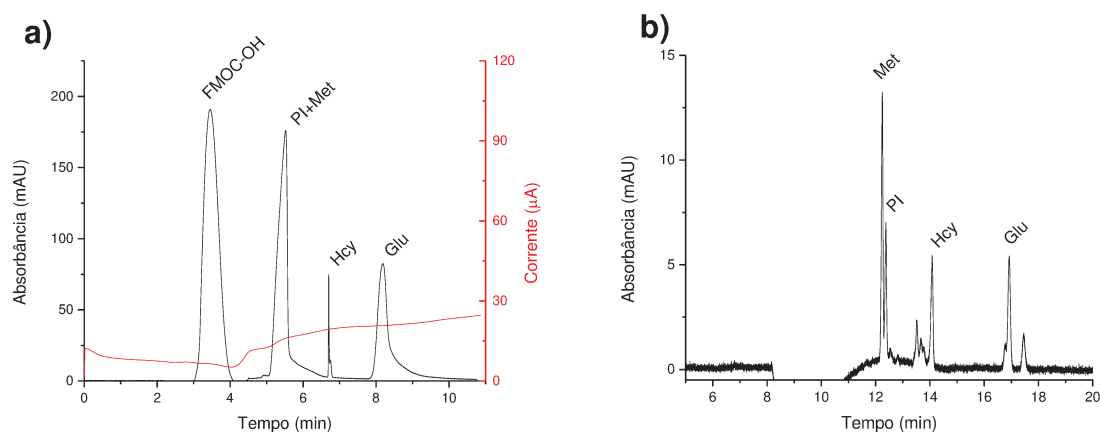


Fig. 11. Comparação de eletroferogramas de separação de FMOC-AAs por SPE-CE-UV on-line utilizando sorvente à base de sílica modificado com C18 na forma: a) irregular; b) regular. Condições de extração: Tempo de injeção: 1 min 930 mbar (pH \sim 3), eluição: 90 s 50 mbar, eluente: acetonitrila:metanol:BGE 3:3:1 (v/v/v). As demais condições de análise são as mesmas citadas na Fig. 10.

Além de sorventes à base de sílica modificada, foram utilizados também sorventes à base de poliestireno-divinilbenzeno (DVB) de dois diâmetros diferentes – 45 e 80 μm . Compararam-se os eletroferogramas obtidos (Fig. 12) e foi concluído que quanto maior o diâmetro das partículas, maior a intensidade dos picos. Essa conclusão é válida principalmente para o pico da Hcy, cuja intensidade aumentou 2,8 vezes.

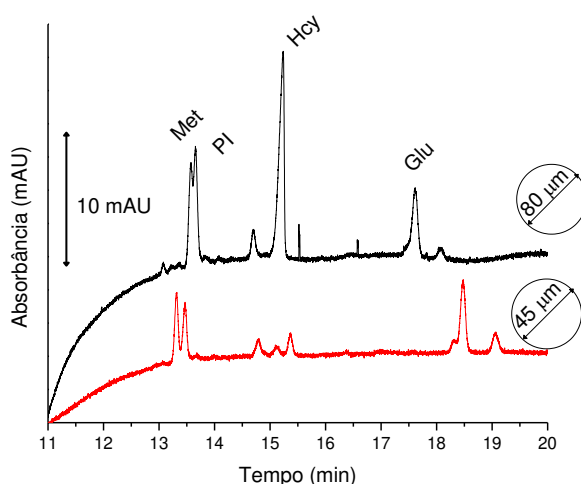


Fig. 12. Eletroferogramas de separação dos FMOC-AAs (1 $\mu\text{mol/L}$) por SPE-CE-UV, utilizando sorvente DVB com diâmetro de partículas de 45 μm ou 80 μm . As condições de análise são as mesmas citadas na Fig. 11.

Também foi avaliado o uso de sorventes como sílica modificada com C8 ou sorvente com equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB). Todos os eletroferogramas obtidos são comparados na Fig. 13. A pré-concentração dos FMOC-AAs foi muito baixa quando os capilares foram preenchidos com sorventes C8. O sorvente C8 é menos hidrofóbico que C18, por isso retém menos os compostos hidrofóbicos e diminui a pré-concentração dos FMOC-AAs. Melhores resultados foram obtidos utilizando sorventes com base polimérica (DVB e HLB) em comparação com a sílica (C8 e C18), pois, em geral, os sorventes poliméricos possuem maior área superficial e então possuem maior capacidade em comparação com os sorventes a base de sílica. Além disso, os sorventes poliméricos são compatíveis com a maioria dos solventes utilizados em SPE e permitem trabalhar em toda faixa de pH (0 a 14). Essa característica é especialmente vantajosa devido ao uso de BGE em pH 10,0, lembrando que sorventes à base de sílica só podem ser usados em uma faixa de pH entre 2 e 9. O sorvente HLB é um copolímero que possui equilíbrio hidrofílico-

lipofílico, que permite extrair uma vasta gama de analitos de matrizes complexas, e possibilita o uso de vários solventes em toda faixa de pH [70]. Sendo assim, o sorvente mais adequado para pré-concentração dos FMOC-AAs foi o HLB, pois aumentou a intensidade dos picos em 2,9 vezes para Met, 1,2 vezes para Hcy e 2,5 vezes para Glu, comparando-se com o sorvente DVB.

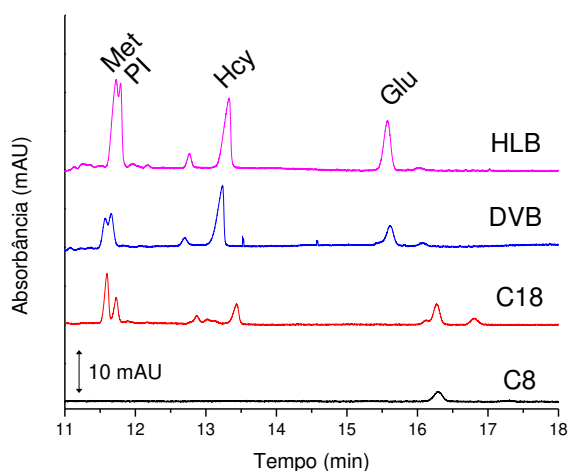


Fig. 13. Pré-concentração e separação dos FMOC-AAs ($1 \mu\text{mol/L}$) por SPE-CE-UV, utilizando sorvente HLB, DVB (com diâmetro de partículas de $80 \mu\text{m}$), C18 ou C8. As condições de extração e análise são as mesmas citadas na Fig. 12.

3.3.4.2. Desenvolvimento de método de análise de FMOC-AAs por SPE-CE-UV

Inicialmente, foram determinadas as capacidades de microcartuchos de SPE preenchidos com o sorvente HLB para cada analito. Cada solução de analitos ($1 \mu\text{mol/L}$) foi injetada separadamente no capilar de SPE-CE após o condicionamento do mesmo. Os tempos de injeção variaram entre 0,5 e 45 min. As áreas dos picos foram integradas e comparadas (Fig. 14). O tempo ideal de injeção é atingido quando a área do pico torna-se constante. Porém, esse tempo varia para cada analito, sendo então selecionado 15 min como tempo de injeção ideal.

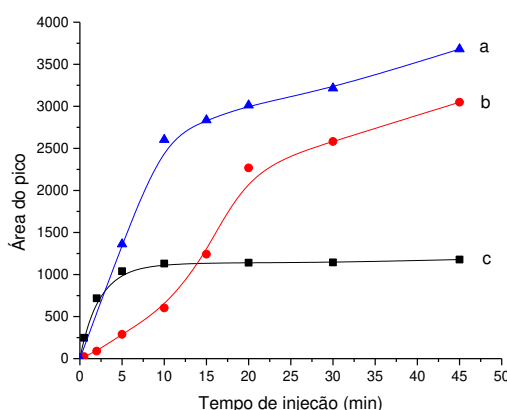


Fig. 14. Relação de área do pico de a) Met, b) Hcy e c) Glu, e tempo de injeção de cada analito ($1 \mu\text{mol/L}$) variando entre 0,5 a 45 min. As demais condições de extração e análise são as mesmas citadas na Fig. 12.

Com a finalidade de obter alguns parâmetros de *performance* do método SPE-CE-UV, construíram-se curvas analíticas com cinco concentrações variando entre 100 e 500 nmol/L para cada analito. Os resultados são apresentados na Tab. 6. Os LQs e LDs foram calculados como 10 vezes ou 3 vezes a relação sinal/ruído, respectivamente. O fator de pré-concentração foi calculado dividindo-se o valor de LD obtido por SPE-CE-UV pelo valor de LD obtido por CE-UV.

Tab. 6. Algumas figuras de mérito obtidas para SPE-CE-UV, usando uma solução de padrões analíticos em solvente.

Analito	Metionina	Homocisteína	Ácido glutâmico
Equação da reta*	a	$4,4 \times 10^7$	$7,5 \times 10^7$
	b	1,4	-0,2
R^2	0,974	0,996	0,976
LQ (nmol/L)	61	104	105
LD (nmol/L)	39	75	52
LD ($\mu\text{mol/L}$) CE-UV	9	63	2
Fator de pré-concentração	225	840	38

* $y = ax + b$, onde y é área do pico, x é concentração do analito (mol/L)

Os valores de LD obtidos por SPE-CE-UV variaram de 39 (Met) a 75 nmol/L (Hcy). Comparando com os valores de LD obtidos por CE-UV, foi possível observar a pré-concentração de Hcy até 840 vezes utilizando um microcartucho preenchido com sorvente HLB acoplado *on-line* à CE.

3.4. Conclusões parciais

Um método CE-UV com detecção direta foi otimizado. O FMOC foi utilizado para derivatização dos aminoácidos. Os aminoácidos Hcy, Met, Glu e Pro-OH foram separados em 25 min no capilar com comprimento efetivo 60 cm e diâmetro interno 50 μm . A separação foi feita aplicando potencial 20 kV e utilizando BGE composto por 50 mmol/L de borato e 40 mmol/L de SDS, pH 10,1, com resolução mínima de 1,7. O método apresentou altos valores de LD (63 $\mu\text{mol/L}$ para Hcy) e, então, foi necessário buscar uma estratégia de pré-concentração de aminoácidos.

Desta forma, foi desenvolvido um método de pré-concentração de Met, Hcy e Glu por SPE-CE-UV *on-line*. Os valores de LD atingidos foram entre 39 (Met) e 75 nmol/L (Hcy), que resultou em um fator de pré-concentração de até 840 vezes (Hcy), em relação ao método CE-UV. Apesar de obter uma boa pré-concentração dos analitos, o método não foi aplicado para análise de aminoácidos em plasma, porque não foi possível separar cisteína e homocisteína.

CAPÍTULO 4

**ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS POR
ELETROFORESE CAPILAR COM
DETECÇÃO CONDUTOMÉTRICA SEM
CONTATO ACOPLADA
CAPACITATIVAMENTE**

4.1. Introdução

A detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C^4D) em CE foi introduzida independentemente por Zemmann *et al.* e Fracassi da Silva e do Lago em 1998 [71,72]. A C^4D é uma detecção condutométrica, onde os eletrodos não tem contato direto com a solução analisada. O detector consiste em dois eletrodos tubulares de aproximadamente 4 mm, que circundam o capilar de separação, separados por um espaço de 2 mm entre eles, chamado *gap*, onde ocorre a detecção. No primeiro eletrodo, um sinal alternado de alta frequência, da ordem de centenas de kHz, é aplicado. No outro eletrodo, mede-se a corrente elétrica resultante, que é função da condutividade da solução passando pelo *gap*. Desta forma, o detector é universal, ou seja, a maioria dos compostos, inclusive os aminoácidos, pode ser detectada sem necessidade de derivatização [73–75].

Os aminoácidos já foram determinados por CE- C^4D em vários tipos de amostras, inclusive em plasma [47,48,76,77]. Já que os aminoácidos são compostos anfóteros, podem ser separados como cátions ou ânions, dependendo da acidez do meio. Consequentemente, a escolha do BGE é essencial, uma vez que determina a carga dos aminoácidos na forma que serão separados, lembrando que quanto maior a diferença de condutância entre analito e BGE, maior será o sinal obtido por C^4D .

Na maior parte dos trabalhos, o ácido acético é empregado como BGE, devido à sua boa capacidade tamponante e baixa condutividade elétrica, resultando em redução do calor gerado no capilar. Além disso, o co-íon para os aminoácidos é o íon hidroxônio (H_3O^+), que tem condutância maior que os aminoácidos, deixando os aminoácidos com carga negativa. A CE- C^4D foi comparada com CE-UV para separação de compostos biologicamente ativos (como creatinina, arginina e 3-metil-histidina) em BGE composto por ácido acético, mostrando respostas similares, porém o detector C^4D mostrou maior sensibilidade e, conseqüente, menor LD (7 vezes menor para histidina) comparado com UV [78].

Buscando um método eletroforético, que permite separar e detectar os aminoácidos Hcy, Cys, Met e Glu em plasma, testou-se o detector C^4D . Para alcançar sensibilidade adicional do método, vários tipos de solventes foram

adicionados à amostra com objetivo de pré-concentrar os aminoácidos por *stacking* e isotacoforese transiente.

4.2. Materiais e equipamentos

4.2.1. Solventes, reagentes e padrões analíticos

4.2.1.1. Solventes

Metanol, isopropanol e acetona com grau de pureza para HPLC foram adquiridos da Tedia (Brasil). A acetonitrila com grau de pureza para UPLC foi comprada na PanReac (EUA). Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada em sistema MilliQ (Millipore, EUA).

4.2.1.2. Reagentes

Hidróxido de sódio com grau de pureza P.A. foi comprado na Synth (Brasil). Ácido acético glacial foi adquirido da J.T.Baker (EUA) e hidroxietilcelulose da Sigma-Aldrich (Alemanha).

4.2.1.3. Padrões analíticos

Homocisteína, hidrocloreto de cisteína, ácido glutâmico, metionina e norleucina foram obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha). Todos os padrões analíticos foram adquiridos com a pureza maior que 98%.

4.2.2. Equipamentos e materiais

As análises eletroforéticas foram realizadas no equipamento de CE *lab-made* sob supervisão do Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva, equipado com detector C⁴D, posicionado a 10 cm do final do capilar. Um sinal senoidal de 616 kHz e amplitude 2 V_{p-p} foi aplicado sobre um dos eletrodos do C⁴D com auxílio de um gerador de sinais modelo MFG-4202 (Minipa, Brasil). O outro eletrodo foi conectado ao circuito eletrônico do detector com etapas de conversão corrente-tensão, retificação e amplificação do sinal, que foi posteriormente coletado por uma interface A/D modelo USB-6009 (National Instruments, EUA). A aquisição dos dados foi realizada por *software* criado no mesmo laboratório, implementado em Labview 7.1 (National Instruments, EUA). As separações ocorreram em capilares de sílica

fundida com diâmetro externo de 360 µm e diâmetro interno de 50 µm (Polymicro, EUA).

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada no sistema MilliQ modelo Direct-Q® (Millipore, EUA). Os padrões sólidos foram pesados na balança analítica modelo GH-202 (A&D, Japão) com precisão de $\pm 0,01$ mg. As soluções foram homogeneizadas no agitador de tubos tipo vórtex modelo MX-S (GOMixer, Tedia, Brasil) ou no banho de ultrassom (Eco-Sonics, Brasil). O pH das soluções foi ajustado com pH-metro modelo 827 pH lab (Metrohm, Suíça). Todas as soluções foram filtradas com filtros de seringa com membrana Durapore® em PVDF 0,22 µm (Millex® - GV, 13 mm) ou com filtros de seringa com membrana de nylon 0,45 µm (Millex® - GN, 33 mm) da Merck Millipore (Irlanda). As amostras de plasma foram centrifugadas na centrífuga modelo Mikro 220R (Hettich, Alemanha).

4.2.3. Preparo de soluções de aminoácidos

As soluções estoque foram preparadas na concentração de aproximadamente 1 mmol/L e foram armazenadas sob refrigeração (4°C) por no máximo uma semana. As soluções de trabalho foram preparadas mediante diluição da solução estoque em mistura de água deionizada:acetonitrila (1:1, v/v).

4.2.4. Preparo de solução eletrólito de corrida

Foi empregado um BGE composto por ácido acético 5 mol/L preparado mediante a diluição de 2,85 mL de ácido acético glacial em água deionizada para 10 mL. A solução foi ultrassonificada por 5 min para eliminar as bolhas de ar e filtrada com filtro de membrana com poro de 0,45 µm e mantida sob a refrigeração (4°C).

4.2.5. Preparo de amostra de plasma

Para a otimização e validação do método foram coletadas 20 amostras de sangue de indivíduos saudáveis de acordo com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP, sob a resolução 466/2012 CNS/MS. A coleta foi realizada no Hemocentro da UNICAMP, em frascos com solução de EDTA, que foram centrifugados por 10 minutos a 2500 rpm. O plasma foi separado, misturado em um *pool* e alíquotas de 1 mL foram armazenadas em tubos Eppendorf a -80 °C até o momento da análise.

200 μL de *pool* de plasma foram misturados com 600 μL de acetonitrila gelada. Após agitar a amostra em vórtex por 30 s, a mistura foi centrifugada por 10 min a 4 °C e 6000 rpm. O sobrenadante foi separado, filtrado com filtro de membrana com poros de 22 μm e seco em fluxo de nitrogênio. O resíduo foi ressuspensionado em 100 μL de mistura de padrões analíticos dissolvidos em acetonitrila:água 1:1 (v/v).

4.2.6. Análise de aminoácidos por CE-C⁴D

A separação dos aminoácidos foi feita em capilares de sílica fundida com L_T de 50 cm, 360 μm o.d. e 50 μm i.d. O detector C⁴D foi posicionado a 10 cm do *outlet*. Antes do primeiro uso, o capilar foi pré-condicionado com hidróxido de sódio 0,1 mol/L por 30 min, água deionizada por 10 min e BGE por 30 min. Entre as corridas, o capilar foi condicionado com BGE por 2 min. A separação ocorreu a 22 °C, aplicando-se potencial de +20 kV. As soluções de padrões foram injetadas hidrodinamicamente, aplicando-se pressão de 11 kPa por 30 s.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Otimização do método CE-C⁴D para análise de aminoácidos

Uma vez que a maioria dos aminoácidos não absorve radiação na região do UV, a derivatização dos aminoácidos ou a detecção indireta são necessárias. Para contornar esses problemas, avaliou-se o detector C⁴D, que realiza a detecção dos analitos através da alteração de um sinal de alta frequência, da ordem de centenas de kHz. Tal frequência é aplicada entre dois eletrodos na cela de detecção, medindo-se a corrente elétrica resultante, que é função da condutividade da solução. Como a condutividade da solução pode ser medida para qualquer sistema, o detector C⁴D é universal, podendo ser usado para a análise de aminoácidos sem necessidade de derivatizá-los.

Com o uso do sistema CE-UV não foi possível separar os aminoácidos homocisteína e cisteína. Devido à reação de FMOC com o grupo amina do aminoácido, somente o grupo carboxílico de FMOC-AA fica disponível para adquirir carga. Assim, os aminoácidos podem ser separados como ânions utilizando o BGE com pH maior que 2,79 (Tab. 7).

Tab. 7. Comparação dos pK_a s dos aminoácidos [67]

Aminoácido	pK_a (-COOH)	pK_a (-NH ₂)
Norleucina	2,79	9,53
Homocisteína	2,46	9,41
Cisteína	2,35	9,05
Metionina	2,53	9,50
Ácido glutâmico	1,88	9,54

Já quando se utiliza o detector C⁴D, a análise eletroforética não requer a derivatização prévia dos aminoácidos, pois os aminoácidos se tornam cátions em pH menor que 1,88 e ânions em pH maior que 9,54. Na região de pH entre 1,88 e 9,54 os aminoácidos possuem ambas as cargas (positiva e negativa), o que pode dificultar a separação dos mesmos por CE.

Como a Cys e Hcy comigram em meio básico, decidiu-se utilizar BGE com pH em torno de 2. Recentemente, Samcova e Tuma publicaram um trabalho sobre a análise de aminoácidos em plasma por CE-C⁴D [47]. Neste trabalho, com o uso de BGE contendo ácido acético 1,7 mol/L com hidroxietilcelulose (HEC) 0,1% (m/v), 21 aminoácidos foram separados em 60 min. Os valores de LD variaram entre 4,3 (arginina) e 42,9 μ mol/L (Cys). Os autores compararam diferentes composições de BGE com a finalidade de separar o maior número de aminoácidos em uma única corrida.

Como um dos objetivos desse trabalho foi separar Cys, Hcy, Met e Glu, foi necessário otimizar o BGE novamente. Para isso, manteve-se primeiramente a concentração de ácido acético em 5 mol/L e avaliou-se a concentração de HEC no BGE. O HEC tem a função de suprimir o EOF e prevenir a adsorção dos aminoácidos na parede interna do capilar (e, posteriormente, também as proteínas remanescentes em plasma, nas análises de amostras reais) [48]. A adição de 0,1% (m/v) HEC ao BGE causou um aumento de tempo de migração dos aminoácidos devido à supressão do EOF, acarretando em melhor resolução dos picos. Porém, a intensidade dos picos diminuiu e a intensidade do ruído aumentou de 4,25 mV para 4,67 mV, prejudicando a detectabilidade do sistema (Tab. 8). Com objetivo de

conseguir maior intensidade dos picos para obtenção de menores valores de LQ, o HEC foi então retirado do BGE.

Tab. 8. Comparação dos tempos de migração, intensidade dos picos e resoluções utilizando BGE com diferentes concentrações de HEC

Aminoácido	Tempo de migração (min)		Intensidade do sinal (mV)		Resolução	
	sem HEC	0,1% (m/v) HEC	sem HEC	0,1% (m/v) HEC	sem HEC	0,1% (m/v) HEC
Norleucina (PI)	7,03	9,11	295,55	199,77	1,73	1,93
Homocisteína	7,32	9,54	244,45	146,15		
Metionina	7,59	9,90	301,48	182,74	1,59	1,80
					2,10	2,65
Ácido glutâmico	8,00	10,58	208,77	158,86	1,59	1,64
Cisteína	8,31	10,99	193,19	117,35		

A adição de solvente orgânico para dissolução da amostra também foi investigada. O solvente orgânico na zona de amostra pode levar ao aumento da intensidade do pico devido a dois efeitos: *stacking* mediado por força iônica e isotacoforese transiente (tITP – do inglês *transient Isotachophoresis*) devido à presença simultânea de solvente orgânico e alta concentração de íons na zona de amostra (o plasma contém cerca de 100 mmol/L de NaCl). Nesse caso, os cátions como Na⁺ e aminoácidos básicos em plasma, que migram mais rápido que Hcy, Cys, Met e Glu, se tornam os íons líderes, e o solvente orgânico age como terminador [79].

A adição de solvente orgânico à amostra também pode evitar a divisão de pico de Glu. Recentemente, Campos *et al.* observaram picos artefatos que se formaram devido à diferença de pH na zona de amostra e no BGE. Adicionando um

solvente orgânico à zona de amostra, as constantes de dissociação e mobilidades eletroforéticas podem ser alternadas, levando à eliminação dos picos artefatos [77].

Compararam-se, então, três solventes orgânicos: acetonitrila, isopropanol e acetona, em proporções 1:3, 1:1 e 3:1 (v/v) com água deionizada, para diluir as soluções estoque de padrões analíticos de aminoácidos. Todas as soluções continham também NaCl 100 mmol/L para mimetizar a matriz biológica. A Fig. 16 compara as intensidades dos picos de cada analito para cada combinação de solventes avaliada. Com o aumento da proporção de acetonitrila de 1:3 para 1:1 (v/v), houve aumento da intensidade de todos os picos. Já quando se variou a proporção de 1:1 para 3:1 (v/v), não houve aumento adicional de intensidade (Fig. 16a). As intensidades dos picos aumentaram com a proporção de isopropanol e acetona na amostra (Fig. 16b,c), porém, a maior parte dos picos não apresentou as mesmas intensidades dos picos obtidas com acetonitrila:água 1:1 (v/v) (Fig. 16d). Além disso, quando os padrões foram dissolvidos em mistura de acetona com água, não foram detectados todos os analitos. Assim, o solvente acetonitrila:água 1:1 (v/v) foi selecionado para dissolução da amostra.

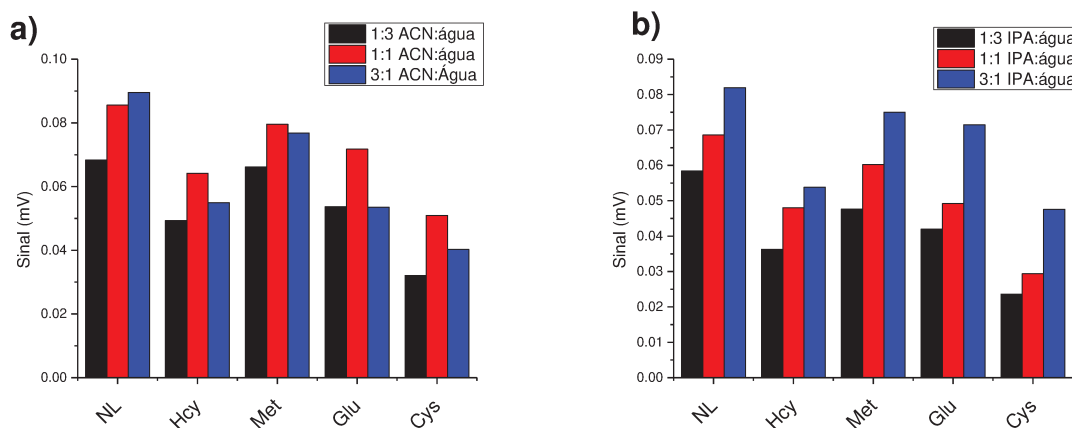


Fig. 15. Legenda na página seguinte.

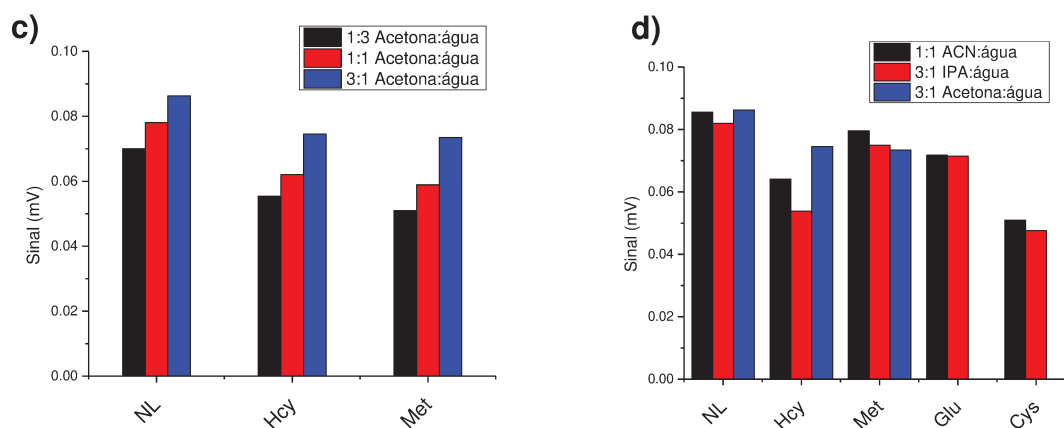


Fig. 16. Comparação das intensidades dos picos de cada analito para amostras dissolvidas em mistura de água com a) acetonitrila (ACN); b) isopropanol (IPA); c) acetona nas proporções 1:3, 1:1 e 3:1 (v/v); d) ACN, IPA e acetona na proporção 1:1 (v/v).

Variou-se também a concentração de ácido acético, mantendo-o como principal componente do BGE por proporcionar a linha de base mais estável. A Fig. 17a mostra os eletroferogramas da separação dos aminoácidos utilizando BGE com diferentes concentrações de ácido acético. Com a diminuição da concentração de ácido acético, a intensidade dos picos aumentou devido a menor condutividade do BGE e, então, maior diferença entre condutividade do BGE e dos analitos. Com o aumento da concentração de ácido acético, Glu e Cys começaram a comigrar. Por outro lado, quando a concentração de ácido acético foi diminuída, Hcy e Met começaram a comigrar. Decidiu-se então utilizar o BGE contendo ácido acético 5 mol/L, por conciliar boas resoluções (acima de 1,0 para todos os pares de picos - Fig. 17b) com aumento de intensidade dos picos.

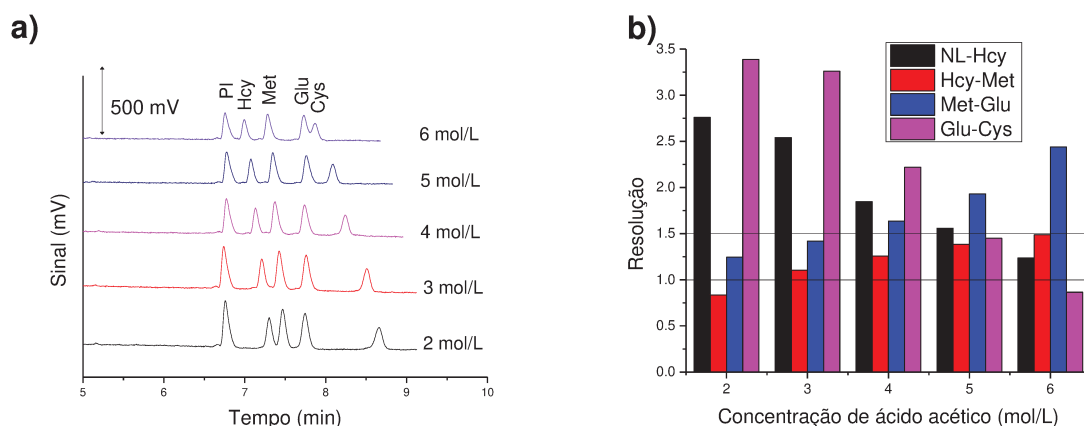


Fig. 17. a) Comparação da separação de aminoácidos por CE- C^4D (100 $\mu\text{mol/L}$) utilizando BGE contendo diferentes concentrações de ácido acético. Condições de análise: V : +20 kV, capilar: L_{eff} : 40 cm, 50 μm i.d., tempo de injeção: 15 s (11 kPa), Detector C^4D : 620 kHz 2,0 V_{p-p} (sinais no eletroferograma foram invertidos). b) Resoluções calculadas para cada condição.

Avaliou-se, então, o tempo de introdução da amostra, variando o tempo de injeção entre 15 e 35 s, aplicando-se pressão de 11 kPa. Observou-se o aumento da intensidade dos picos com o aumento de tempo de injeção (Fig. 18a). Ao mesmo tempo foi observado o aumento na largura na meia altura do pico (Fig. 18b). Como o C^4D é um detector universal, ou seja, qualquer espécie que tiver diferença de condutividade de BGE é detectada, optou-se por utilizar o tempo de injeção de 30 s.

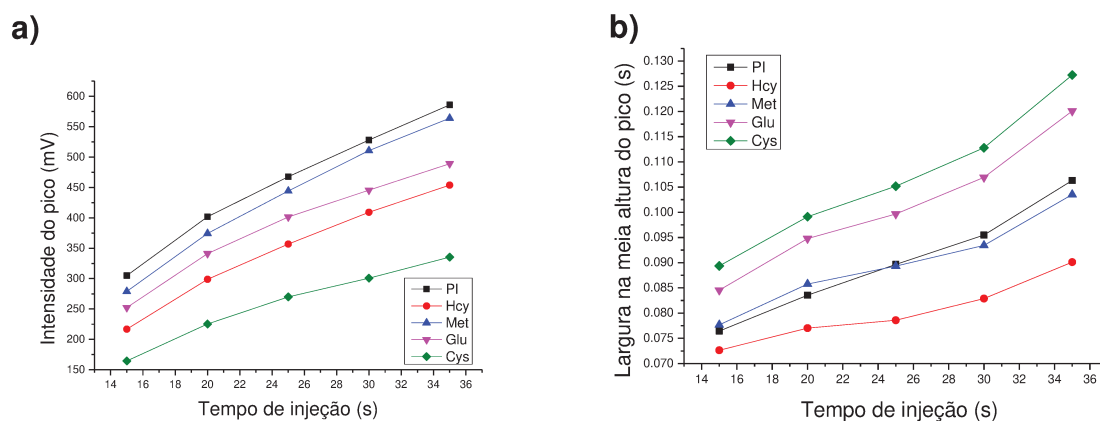


Fig. 18. Comparação das a) intensidades dos picos e b) larguras na meia altura dos picos de Hcy, Met, PI, Cys e Glu (100 $\mu\text{mol/L}$) com diferentes tempos de injeção (11 kPa).

4.3.2. Validação do método CE-C⁴D para determinação de aminoácidos em plasma

Como as normas da ANVISA não são direcionadas particularmente à validação de métodos para quantificação de metabólitos em fluidos biológicos, mas para validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos de medicamentos, a validação do método foi feita baseada nos parâmetros direcionados por estas legislações, mas não seguindo tão estritamente os limites ditados pelas mesmas, de modo a garantir a confiabilidade dos resultados [80].

O método otimizado para determinação de aminoácidos em plasma utilizando BGE contendo ácido acético 5 mol/L com injeção hidrodinâmica por 30 s para amostras diluídas em acetonitrila:água 1:1 (v/v) foi validado em solvente e em matriz biológica, mediante avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, limite de detecção e quantificação, efeito matriz, precisão intra e inter-dias e exatidão.

A faixa linear, a linearidade e a sensibilidade foram estabelecidas por meio da construção de curva analítica em cinco níveis de concentração, em triplicata, mediante fortificação do plasma ressuspendido em 100 µL de solução de mistura de aminoácidos, resultando em concentrações de: 5, 10, 20, 35 e 50 µmol/L de Hcy; 20, 40, 60, 80 e 100 µmol/L de Met; 20, 75, 150, 200 e 250 µmol/L de Glu; e 50, 100, 75, 150 e 250 µmol/L de Cys. As faixas de concentração de cada analito foram escolhidas para garantir que a concentração de cada analito na amostra real fosse incluída na curva analítica. Também foi adicionado o padrão interno a cada amostra, cuja concentração final foi de 50 µmol/L. Após a avaliação da presença de possíveis *outliers* pelo teste de Jackknife, foi estabelecida a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados ordinários. As curvas analíticas e os gráficos de resíduos são mostrados na Fig. 19.

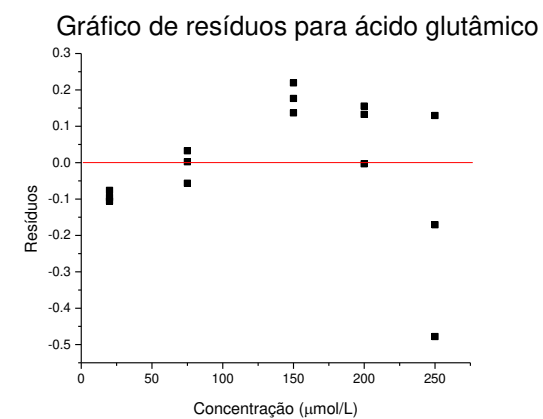
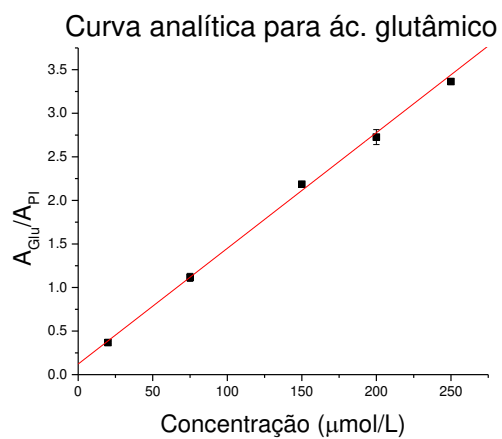
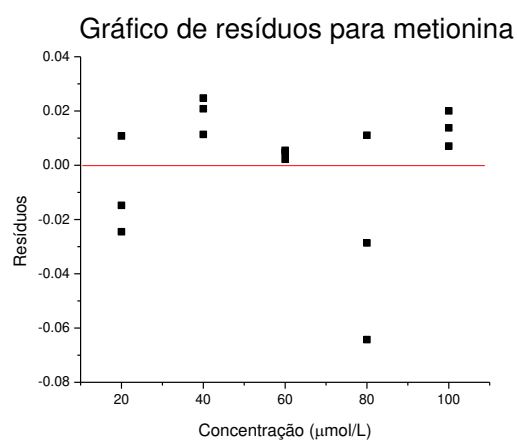
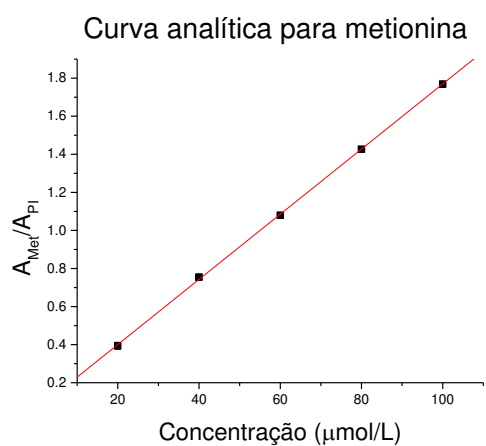
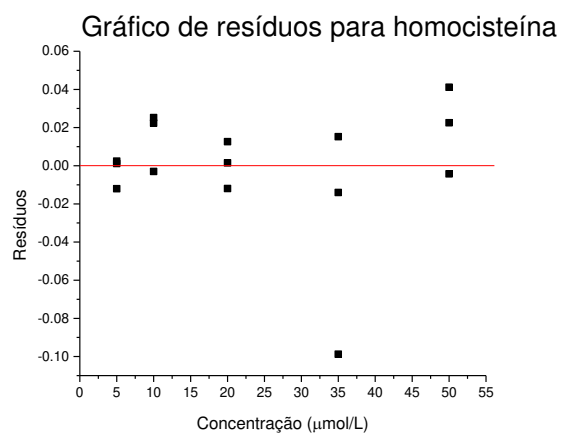
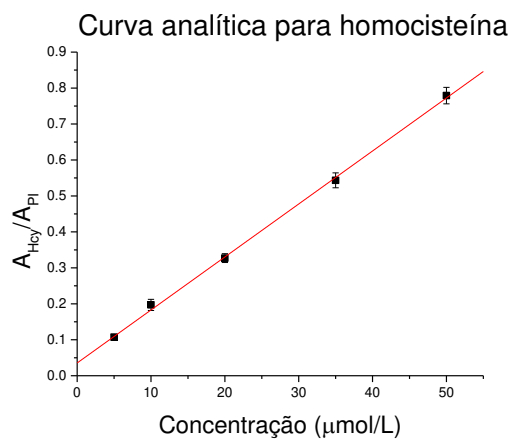


Fig. 19. Legenda na página seguinte

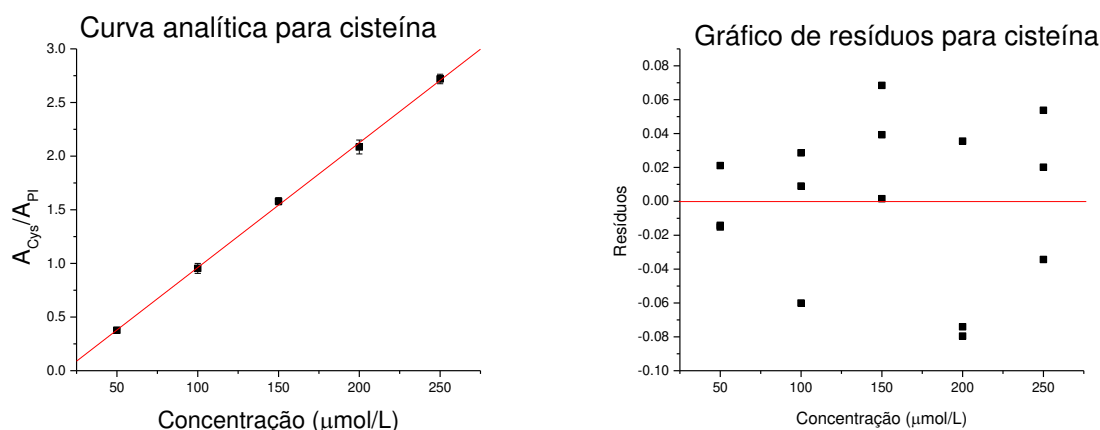


Fig. 19. Curvas analíticas e gráficos de resíduos para cada analito na matriz biológica obtidos pelo método de CE- C^4D otimizado.

Para avaliação da precisão, as amostras de plasma foram fortificadas em três níveis de concentração de aminoácidos dentro da faixa linear: baixo, médio e alto. A precisão intra-dia foi realizada em triplicata no mesmo dia. Os resultados foram expressos pelos coeficientes de variação.

A exatidão do método foi calculada mediante ensaio de exatidão. Para isso, amostras de plasma foram fortificadas em três níveis de concentração de aminoácidos dentro da faixa linear: baixo, médio e alto, sendo analisadas em triplicata. Os resultados foram expressos pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Eq. 3).

$$Exatidão = \frac{(Concentração\ média\ experimental - Valor\ nominal) * 100}{Valor\ nominal} \quad Eq. 3$$

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados pela razão sinal/ruído. Para isso, foram injetadas amostras de plasma fortificadas em concentrações regressivas até observação da relação sinal/ruído igual a 3 e a 10 para LD e LQ, respectivamente.

Os parâmetros de regressão linear, obtidos por meio das curvas analíticas preparadas na matriz de plasma, os resultados da precisão, expressos pelo coeficiente de variação (CV); da exatidão, expressos pela porcentagem de exatidão; e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) são apresentados na Tab. 9.

Tab. 9. Figuras de mérito avaliadas para a validação do método para determinação dos aminoácidos em plasma por CE-C⁴D.

Parâmetro		Homocisteína	Metionina	Ácido glutâmico	Cisteína
Faixa linear ($\mu\text{mol/L}$)		5 - 50	20 - 100	20 - 250	50 - 250
Coeficiente de regressão linear (r)		0,998	0,999	0,998	0,999
Sensibilidade (V.L/ μmol)		0,0147	0,0171	0,01311	0,0116
Precisão intra-dia ^a	Baixo ^b	12%	6%	6%	4%
	Médio ^c	4%	0,2%	2%	2%
	Alto ^d	3%	0,4%	10%	2%
Exatidão	Baixo ^b	106%	105%	109%	101%
	Médio ^c	102%	101%	106%	102%
	Alto ^d	101%	100%	111%	101%
LD ($\mu\text{mol/L}$)		4,2	2,2	6,5	24,5
LQ ($\mu\text{mol/L}$)		13,0	10,2	39,2	38,7

^a coeficiente de variação

^b Hcy, Met, Glu e Cys na concentração de 5, 20, 20 e 50 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.

^c Hcy, Met, Glu e Cys na concentração de 20, 60, 150 e 150 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.

^d Hcy, Met, Glu e Cys na concentração de 50, 100, 250 e 250 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.

De acordo com os dados apresentados na Tab. 9, todos os analitos apresentaram coeficiente de regressão linear acima de 0,99. As variações de precisão e exatidão foram menores que 15% para todos os analitos em cada nível de concentração. Assim, a linearidade, a precisão e a exatidão do método estão dentro das conformidades esperadas para um método bioanalítico, de acordo com a ANVISA.

Os valores de LQ atingidos foram menores que os níveis de aminoácidos esperados em plasma de indivíduos saudáveis, exceto para Hcy, cuja concentração média é 9 $\mu\text{mol/L}$ (Tab. 5, sessão 3.3.3). Assim, para quantificação de Hcy, as amostras de plasma deveriam ser ressuspensas em volume duas vezes menor.

Para avaliar o efeito matriz, foram construídas curvas analíticas para cada analito em solvente, nas mesmas concentrações. A equação da reta foi estabelecida pelo método dos mínimos quadrados ordinários após a avaliação da presença de possíveis *outliers* pelo teste de Jackknife (Tab. 10). E o efeito matriz foi calculado pela razão entre as sensibilidades obtidas pela equação da reta da curva construída na matriz biológica e em solvente (Eq. 4):

$$Efeito\ matriz = 1 - \frac{Sensibilidade\ (matriz)}{Sensibilidade\ (solvente)} \quad Eq. 4$$

Tab. 10. Figuras de mérito avaliadas para a validação do método para determinação dos aminoácidos em solvente por CE- C^4D .

Parâmetro	Homocisteína	Metionina	Ácido glutâmico	Cisteína
Faixa linear ($\mu\text{mol/L}$)	5 - 50	20 - 100	20 - 250	50 - 250
Coeficiente de regressão linear (r)	0,998	0,998	0,986	0,993
Intercepto	0,027	0,072	-0,01	0,05
Sensibilidade ($\text{V L}/\mu\text{mol}$)	0,0148	0,0169	0,0059	0,0114
Sensibilidade* ($\text{V L}/\mu\text{mol}$)	0,0147	0,0171	0,01311	0,0116
Efeito matriz	0,7	-1,2	-122,2	-1,8

* curva analítica construída na matriz biológica

Seguindo as normas da ANVISA para a validação de métodos bioanalíticos, o efeito matriz de todos os analitos deve ser inferior a 15%. Conforme a Tab. 10, somente o ácido glutâmico apresentou efeito matriz significativo e, portanto, para quantificação desse analito deve ser usado método de adição de padrão.

A Fig. 20 mostra um eletroferograma da separação de aminoácidos em *pool* de plasma de indivíduos saudáveis. A amostra de plasma foi preparada de acordo com o capítulo 4.2.5. O plasma foi ressuspenso numa solução de

aminoácidos com concentração final de 50 $\mu\text{mol/L}$. O volume da solução foi 2 vezes menor que o volume inicial de amostra de plasma.

Foi possível observar a comigração de Glu com outro pico que não foi identificado, o que pode explicar o pronunciado efeito matriz apresentado por esse analito. A universalidade do detector C^4D apresentou tanto vantagens quanto desvantagens. Por CE- C^4D foi possível separar e detectar todos os analitos sem necessidade de derivatização, porém, um tratamento simples incluindo somente a precipitação de proteínas levou a um eletroferograma bastante complexo (Fig. 20), que tornou a determinação dos aminoácidos praticamente impossível sem adição de padrões.

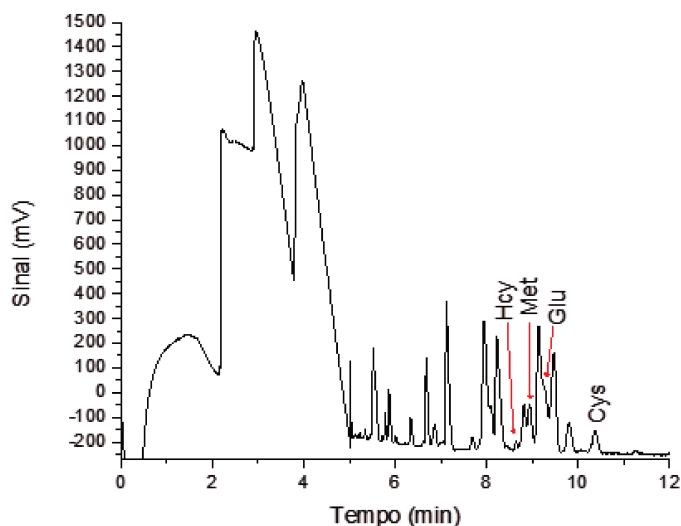


Fig. 20: Eletroferograma de amostra de pool de plasma dos indivíduos saudáveis pré-concentrado 2x e fortificado com mistura de Hcy, Met, Glu e Cys na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$. Condições de análise: BGE: ácido acético 5 mol/L, tempo de injeção 30 s. Demais condições são as mesmas como na Fig. 17.

4.4. Conclusões parciais

Neste capítulo, foram otimizadas condições para separação de Hcy, Cys, Met e Glu por CE- C^4D , utilizando BGE contendo ácido acético 5 mol/L. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente por 30 s e 11 kPa dissolvidas em mistura de acetonitrila e água 1:1 (v/v), levando à pré-concentração dos analitos por *stacking* e

isotacoforese transiente devido à existência simultânea de solvente orgânico e sais presentes na matriz biológica.

O método otimizado foi validado com amostras de padrões dissolvidas em solvente e em matriz biológica. As duas curvas foram comparadas pela inclinação da reta (sensibilidades) para avaliar o efeito matriz. Apenas o Glu apresentou o efeito matriz significativo, ou seja, a sua quantificação no plasma deve ser feita utilizando a curva na matriz. O método validado mostrou-se adequado à quantificação dos analitos, no entanto, devido à complexidade da amostra e o efeito matriz significativo, apresentado para o Glu, a análise das amostras reais será possível mediante ao método da adição de padrão.

CAPÍTULO 5

ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS POR ELETROFORESE CAPILAR ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

5.1. Introdução

Os modos de detecção em CE previamente discutidos (CE-UV e CE- C^4D), são pouco seletivos e podem apresentar altos limites de quantificação, o que pode impossibilitar a determinação de metabólitos em fluidos biológicos. Além disso, fornecem pouca ou nenhuma informação sobre a estrutura dos analitos, o que pode levar a identificação equivocada dos analitos devido a demais metabólitos presentes em plasma. A CE-MS é uma técnica que consome pouco volume de amostra, é rápida e permite alta eficiência de separação, ao mesmo tempo, que fornece informação estrutural inequívoca, por elucidar o íon molecular e perfil de fragmentação, levando a uma segunda dimensão de separação. Por isso, ela é considerada como técnica de “ouro” e única aceita para confirmação dos resultados em diversas áreas [49].

Os conceitos básicos sobre o acoplamento CE e MS foram introduzidos já no início de década de 1980 por Mikkers, Jorgenson e colaboradores [81,82]. Naquela época foi possível ionizar moléculas pequenas e grandes em fase gasosa por *electrospray* (ESI), que foi desenvolvido por Dole, Fenn e colaboradores [83,84]. Contudo o acoplamento entre CE e MS foi introduzido em 1987 pelo grupo de Smith [85]. Desde então o acoplamento de CE-MS vem aprimorando e ampliando suas áreas de aplicação [86].

O maior desafio desse acoplamento é referente à interface entre CE e MS, uma vez que as vazões em CE são geralmente muito baixas (nL/min) para o funcionamento apropriado de MS e requer um circuito elétrico fechado na saída do capilar ou na entrada do MS. Esse problema foi superado pelo desenvolvimento de uma interface com líquido auxiliar, onde um líquido auxiliar (SL – do inglês *Sheath liquid*) com uma vazão de $\mu\text{L}/\text{min}$ é introduzido coaxialmente ao efluente eletroforético. Também é introduzido um gás nebulizador que auxilia na formação de um *electrospray*. Além de interface com líquido auxiliar, que é a mais comum, uma interface sem SL ou com junção líquida pode ser utilizada [45,49]. A interface sem SL apresenta menores LODs já que não há diluição de amostra com SL, porém a maior dificuldade da interface é manter simultaneamente os circuitos elétricos de CE e ESI. Para isso, um filme fino de material condutor como ouro ou prata pode ser depositado na extremidade do capilar, um fio de arame pode ser introduzido à saída

do capilar ou uma luva metálica é posicionada em torno de ponta porosa do capilar. Já a interface com junção líquida também utiliza SL, porém o SL é misturado com o efluente eletroforético fora da entrada do MS. Há um reservatório com SL, onde termina o capilar e o sistema é aterrado. A vantagem desse sistema é que o CE e o ESI podem ser operados independentemente, porém, devido à junção dos capilares no reservatório há um volume morto elevado que pode levar a um aumento de dispersão e, conseqüentemente, a perda de eficiência de separação. Apesar de interface sem SL e com junção líquida apresentarem várias vantagens, a interface com SL é ainda mais utilizada em CE-MS devido à alta estabilidade de ESI, reprodutibilidade e robustez.

Vários trabalhos publicados reportam a determinação de aminoácidos em fluídos biológicos por CE-MS [53,54]. Contudo, os métodos publicados para determinação de aminoácidos não incluem a determinação dos aminotióis Hcy e Cys, que requerem um preparo de amostra mais complexo, devido à ligação covalente de tiós a resíduos de Cys em proteínas presentes em fluído biológico [87]. Esse capítulo descreve o desenvolvimento de método para determinação de aminoácidos por CE-MS/MS com foco no preparo de amostra de plasma para que possam ser determinados tanto aminoácidos Glu e Met, quanto aminotióis Hcy e Cys nesta matriz biológica.

5.2. Materiais e equipamentos

5.2.1. Solventes, reagentes e padrões analíticos

5.2.1.1. Solventes

Metanol e acetonitrila com grau de pureza para UPLC foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada em sistema MilliQ (Millipore, EUA).

5.2.1.2. Reagentes

As soluções de hidróxido de sódio para HPCE na concentração de 0,1 e 1 mol/L foram adquiridas da Agilent Technologies (Alemanha). Ácido acético (pureza $\geq 99,7\%$), ditioneitol (pureza $\geq 99,0\%$) e ácido iodoacético (pureza $\geq 98,0\%$) foram comprados na Sigma-Aldrich (EUA).

5.2.1.3. Padrões analíticos

Homocisteína, hidrocloreto de cisteína, ácido glutâmico, metionina e norleucina, norvalina, *trans*-4-hidroxiprolina e glicina-2-¹³C foram obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha). Todos os padrões analíticos foram adquiridos com pureza maior que 98%.

5.2.2. Equipamentos e materiais

As análises eletroforéticas foram feitas no equipamento de eletroforese capilar modelo 7100 acoplado a espectrômetro de massas (Agilent, EUA) com analisador de massas triplo-quadrupolo (6430) e ionização por ESI. Usou-se uma bomba isocrática modelo 1260 (Agilent, EUA) para interface com líquido auxiliar. A aquisição dos dados foi realizada pelo programa MassHunter (Agilent, EUA). As separações ocorreram em capilares de sílica fundida com diâmetro externo de 360 µm e diâmetro interno de 50 µm sem recobrimento interno, ou capilares de sílica fundida com diâmetro externo de 360 µm e diâmetro interno de 50 µm recoberto internamente com polivinil álcool (PVA) (ambos da Agilent, EUA).

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada no sistema de MilliQ modelo Direct-Q® (Millipore, EUA). Os padrões foram pesados em balança analítica modelo BP211D (Sartorius, Alemanha) com precisão de ± 0,01 mg. As soluções foram homogenizadas em agitador de tubos tipo vórtex modelo Vortex 1 (IKA, Alemanha). As soluções de BGE e líquido auxiliar foram degaseificadas em banho de ultrassom (Eco-Sonics, Brasil). As amostras de plasma foram centrifugadas na centrífuga modelo Prism Mini (Labnet International, EUA). Todo desenvolvimento e validação do método CE-MS/MS foi feito no Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica no Instituto de Química, na Universidade de São Paulo.

5.2.3. Preparo de soluções

As soluções estoque de aminoácidos foram preparadas na concentração de aproximadamente 10 (Met), 25 (Glu), 5 (Hcy), 30 (Cys) e 10 mmol/L (glicina-2-¹³C, PI) e foram armazenadas sob refrigeração (4°C) por no máximo uma semana. As soluções de trabalho foram preparadas mediante diluição da solução estoque em água deionizada.

A solução de ditioneitol (DTT) foi preparada pela diluição de aproximadamente 39 mg de DTT em água deionizada. Adicionou-se água para obter 500 μ L de solução 500 mmol/L.

A solução de ácido iodoacético (IAA) foi preparada da mesma maneira pela diluição de aproximadamente 46 mg em solução de hidróxido de sódio 1 mol/L para obter uma solução de concentração 500 mmol/L.

Ambas as soluções de DTT e IAA foram preparadas imediatamente antes do uso em tubos Eppendorf âmbar.

5.2.4. Preparo de solução de eletrólito de corrida e líquido auxiliar

Foi empregado um BGE composto por ácido acético 5 mol/L preparado mediante a diluição de 2,85 mL de ácido acético 99,7% em água deionizada para 10 mL. A solução foi ultrassonicada por 5 min para eliminar as bolhas de ar. O BGE foi preparado diariamente.

O líquido auxiliar (SL – do inglês *Sheath Liquid*) foi composto por ácido acético 5 mmol/L em água deionizada e metanol (1:1, v/v). Primeiramente, 25 mL de metanol foram adicionados aos 25 mL de água deionizada. Adicionaram-se 14,3 μ L de ácido acético 99,7% a essa mistura.

5.2.5. Preparo de amostra de plasma

Para a otimização do método, foram coletadas 20 amostras de sangue de indivíduos saudáveis de acordo com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP, sob a resolução 466/2012 CNS/MS. A coleta foi realizada no Hemocentro da UNICAMP, em frascos com solução de EDTA, que foram centrifugados por 10 minutos a 2500 rpm. O plasma foi separado, misturado em um *pool* e alíquotas de 1 mL foram armazenadas em tubos Eppendorf a -80 °C até o momento da análise.

As amostras de plasma de 20 indivíduos saudáveis e de 39 pacientes com ALS foram coletados no Ambulatório de Doenças Neuromusculares (ADN), no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Todas as amostras de plasma são remanescentes do projeto “Estudo de Biomarcadores em Doenças do Neurônio Motor”, aprovado previamente pelo CEP da FCM-UNICAMP sob o número 270/11 e

desenvolvido no laboratório do Prof. Dr. Marcondes Cavalcante França Junior (Laboratório de Neuroimagem, Departamento de Neurologia, FCM, UNICAMP). Os pacientes com ALS foram previamente diagnosticados de acordo com os critérios El Escorial revisados.

Para validação dos métodos, um *pool* de plasma de indivíduos saudáveis coletados no ADN foi preparado a partir de 12 amostras remanescentes após a quantificação dos aminoácidos (amostras: 01; 02; 04; 06; 09; 11; 15; 17-21).

Compararam-se três tipos de tratamento de amostras:

- A. Tratamento descrito no item 4.2.5.
- B. 100 μL de pool de plasma foram misturados com 10 μL de DTT 500 mmol/L e 10 μL de solução de padrões em água. Após agitar a amostra em vórtex por 30 s, a mistura foi deixada em repouso por 30 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Quando se formou um gel, 100 μL de acetonitrila foram adicionados e a solução foi agitada em vórtex por 30 s. A mistura foi centrifugada por 15 min a 6000 rpm. O sobrenadante foi separado e injetado diretamente no CE.
- C. 100 μL de pool de plasma foram misturados com 10 μL de DTT 500 mmol/L e 10 μL de solução de padrões em água. Após agitar a amostra em vórtex por 30 s, a mistura foi deixada por 30 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Quando se formou um gel, 20 μL de IAA 500 mmol/L em hidróxido de sódio 1 mol/L e 100 μL de acetonitrila foram adicionados e a solução foi agitada em vórtex por 30 s. A mistura foi centrifugada por 15 min a 6000 rpm. O sobrenadante foi separado e injetado diretamente no CE.

5.2.6. Análise de aminoácidos por CE-MS/MS

A análise dos aminoácidos foi dividida em dois métodos: análise dos aminoácidos metionina e ácido glutâmico, e análise dos aminotióis Hcy e Cys, como S-acetilaminotióis. A separação ocorreu em capilar de sílica fundida com $L_T = L_{\text{eff}}$ de 60 cm, 360 μm o.d. e 50 μm i.d. Entre as corridas, o capilar foi lavado com hidróxido

de sódio 1 mol/L por 100 s, água MilliQ por 60 s e BGE, composto por ácido acético 5 mol/L, por 100 s, enquanto o ESI foi desligado. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente por 10 s aplicando a pressão de 50 mbar no *inlet*. A separação ocorreu a 20 °C aplicando tensão de +25 kV. O acoplamento CE-ESI-MS foi feito com SL. A composição do SL foi metanol:água 50:50 (v/v) com adição de 5 mmol/L ácido acético com vazão de 4 µL/min. A tensão do capilar foi de 4500 V. A pressão do gás nebulizador (nitrogênio) foi de 5 psi, a vazão do gás secante (nitrogênio) foi de 6 L/min com temperatura de 160 °C. A ionização foi feita por ESI no modo positivo e o monitoramento dos íons foi feito no modo SRM (monitoramento de reação selecionada) com duas transições, uma para quantificação e a segunda para confirmação.

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Otimização do método CE-MS/MS

O acoplamento de CE e MS combina a alta eficiência e pequeno consumo de amostra em CE com a universalidade, sensibilidade e seletividade da MS. Além disso, a MS oferece informações indispensáveis sobre massa molecular e estrutura dos analitos para identificá-los e quantificá-los em uma matriz complexa, como o plasma sanguíneo [49].

Os parâmetros de MS/MS foram otimizados por infusão direta das soluções de 10 µmol/L de padrões de Met, Glu, Hcy e Cys em água pelo capilar no modo positivo. Primeiramente, selecionou-se um íon precursor (Q1) no modo de varredura apresentado como $[M + H]^+$ concordante com o calculado pela fórmula molecular. Posteriormente, esse íon foi acelerado e fragmentado na célula de colisão (Q2) variando a tensão no capilar de amostragem e a energia de colisão para obter o melhor sinal de íon produzido (Q3). Os parâmetros otimizados são sumarizados na

Tab. 11. Além dos aminoácidos que foram quantificados (Met, Glu, Hcy e Cys), a

Tab. 11 contém todos os íons que foram identificados no trabalho.

A pressão do gás nebulizador, vazão do gás secante e tensão do capilar foram otimizados pelo programa Optimizer, que faz parte do programa MassHunter.

Para cada condição, foi obtido um eletroferograma de separação de aminoácidos. Visando a melhor sensibilidade foram obtidos os seguintes parâmetros otimizados: pressão do gás nebulizador 5 psi, vazão do gás secante 6 L/min, temperatura do gás 160 °C e tensão do capilar 4500 V.

Inicialmente, utilizou-se o BGE com a mesma composição do usado em CE-C⁴D, já que o ácido acético é compatível com MS, porém, diminuiu-se a concentração para 500 mmol/L. O SL foi composto por ácido acético 5 mmol/L dissolvido em água:metanol 50:50 (v/v) com vazão de 4 µL/min.

Tab. 11. Parâmetros utilizados no espectrômetro de massas para análise de aminoácidos, seus derivados e padrões internos.

	Q1 (m/z)	Q3 [*] (m/z)	Q3 ^{**} (m/z)	Tensão no capilar de amostragem (V)	Energia de colisão (V)
Metionina	150	104	133 ^{**}	70	7
S-acetilcisteína	180	163	107 ^{**}	100	10
S-acetilhomocisteína	194	148	134 ^{**}	100	10
Ácido glutâmico	148	84	130 ^{**}	90	8
Glicina-2-¹³C	77	49	59 ^{**}	70	3
Norleucina	132	-	86	70	5
Norvalina	118	-	72	50	10
Hidroxi-prolina	132	-	68	70	20
Fenantrolina	181	-	154	70	40
Cisteína	122	-	76	90	8
Homocisteína	136	-	90	90	8
Cistina	241	-	152	90	10
Homocistina	269	-	136	20	5

^{*} íon de quantificação, ^{**} íon de confirmação

5.3.2. Padrão interno

A norleucina (NLeu), utilizada nos capítulos anteriores como padrão interno (PI), foi detectada em amostras de plasma sem adição desse padrão (branco). Assim, foram testados também norvalina (NVal), hidroxiprolina (Pro-OH), fenantrolina e glicina-2- ^{13}C (Gly ^{13}C) como PI. Somente fenantrolina e Gly ^{13}C não foram detectadas na amostra branco (Fig. 21). Guo e Li também reportaram a presença de NLeu e NVal em um *pool* de urina nas concentrações de 0,1 e 0,3 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente [88]. A literatura não apresenta registros sobre as concentrações destes aminoácidos em plasma. Porém, como são encontrados em urina, decidiu-se não usá-los como padrão interno, já que outras opções estavam disponíveis. Os níveis sanguíneos de Pro-OH variam entre 11,8 a 20 $\mu\text{mol/L}$ [69]. Portanto, não é possível utilizar NLeu, NVal e Pro-OH como PI. A fenantrolina não foi encontrada em plasma, porém, ela pode formar um complexo com o ferro bivalente presente em sangue e, então, não foi utilizada como PI. Assim, o PI mais adequado para análises por CE-MS foi a Gly ^{13}C , já que tem estrutura química similar aos analitos, apresenta tempo de migração diferente dos demais analitos e não está presente na matriz biológica em estudo.

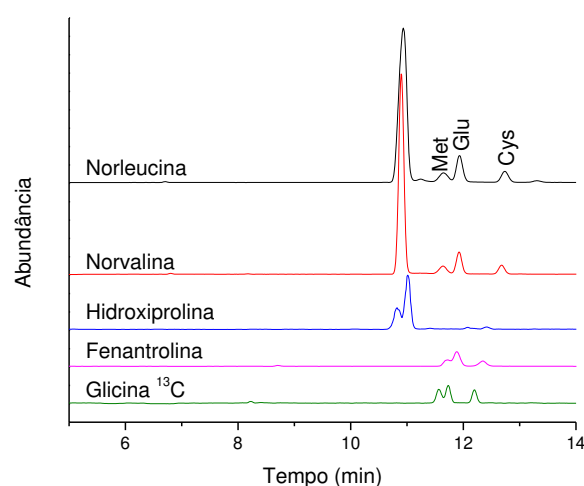


Fig. 21. Comparação de eletroferogramas de íons totais de aminoácidos em plasma. Condições de análise: capilar de sílica fundida recoberta com PVA ($L_T = 60\text{ cm}$, $50\text{ }\mu\text{m i.d.}$); BGE: ácido acético 500 mmol/L; tensão aplicada: +25 kV; injeção hidrodinâmica: 50 mbar por 10 s; temperatura: 20°C. SL: ácido acético 5 mmol/L em metanol / água 50:50 (v/v) com vazão de 6 $\mu\text{L/min}$; gas secante (nitrogênio): 6 L/min, 160°C; ESI: 4,5 kV (positivo). As transições monitoradas no SRM: m/z : 150→140 (Met), m/z : 148→130 (Glu), m/z : 136→90 (Hcy), m/z : 122→105 (Cys), m/z : 132→86 (NLeu), m/z : 118→72 (NVal), m/z : 132→68 (Pro-OH), m/z : 181→154 (fenantrolina), m/z : 77→49 (Gly ^{13}C).

5.3.3. Adsorção de proteínas na parede do capilar

Embora tenha sido adicionado solvente orgânico à amostra de plasma para precipitação de proteínas antes da análise por CE-MS/MS, observou-se adsorção das proteínas remanescentes na parede interna do capilar, já que houve alargamento dos picos e aumento de tempo de migração dos analitos após análises consecutivas. Assim, testou-se um capilar de sílica com parede interna recoberta permanentemente com PVA ($L_T = 60$ cm, $50 \mu\text{m}$ i.d.), que elimina o EOF e minimiza a adsorção de proteínas na parede de capilar. Porém, após várias injeções, observou-se novamente o efeito de adsorção das proteínas, provavelmente causado pela presença de acetonitrila na amostra que removeu a camada de PVA da sílica.

Avaliou-se então outra estratégia empregando o condicionamento de capilar de sílica com solução em meio básico. O ponto isoelétrico das proteínas mais abundantes do plasma varia entre 6,6-10 para imunoglobulinas G (IgG); 5,8 - 6,2 para transferrina e 5,4 - 5,8 para albumina [89]. Em meio com pH $\sim 2,5$ (devido ao BGE composto por ácido acético 500 mmol/L), a maior parte das proteínas e aminoácidos apresentam carga efetiva positiva, resultando na interação com os grupos silanóis da parede interna do capilar de sílica fundida (pK_a dos grupos silanóis entre 5,3 a 6,3 [90]). Empregando uma solução com pH maior que o pK_a das proteínas e aminoácidos, os grupos serão desprotonados e, então, estas espécies apresentarão uma carga efetiva negativa, que impede a interação com a parede interna do capilar.

Inicialmente, a solução de bicarbonato de sódio na concentração 50 mmol/L e pH ~ 8 foi empregada durante o condicionamento de capilar entre as corridas. Passou-se bicarbonato de sódio por 100 s, seguido por água por 60 s e BGE por 100 s. Após esse procedimento ainda foi observado o alargamento dos picos, então, o capilar foi condicionado com a solução de bicarbonato por 300 s, seguido por água por 60 s e BGE por 100 s antes da corrida. Contudo, os picos continuaram alargados, o que exigiu o uso de uma solução de base mais forte, como hidróxido de sódio.

Entre as corridas, o capilar foi condicionado com hidróxido de sódio 0,1 mol/L por 100 s, seguido por água por 60 s e BGE por 100 s. Foram feitas vinte injeções consecutivas de uma única amostra de plasma (branco) e os desvios relativos de tempos de migração, áreas e razão sinal/ruído (S/N) foram calculados (Tab. 12). Notou-se que os tempos de migração (t_m) variaram em torno de 3% para todos os analitos, enquanto a área e S/N mudaram entre 15 e 33%. Essas variações seriam corrigidas pela adição de PI. Alguns eletroferogramas são mostrados na Fig. 22.

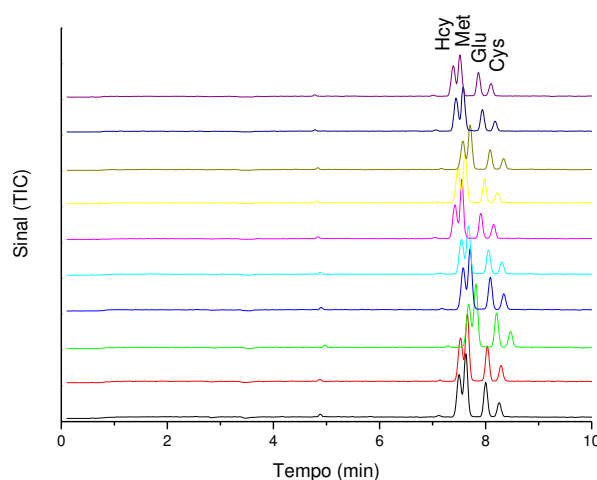


Fig. 22. Comparação de eletroferogramas de íons totais (TIC) de aminoácidos em plasma após dez injeções consecutivas. Condições de análise: capilar de sílica fundida ($L_T = 60$ cm, $50 \mu\text{m}$ id); BGE: ácido acético 500 mmol/L; tensão aplicada: +25 kV; injeção hidrodinâmica: 50 mbar por 10 s; temperatura: 20°C . SL: ácido acético 5 mmol/L em metanol / água 50:50 (v/v) com vazão de $6 \mu\text{L}/\text{min}$; gás secante (nitrogênio): $6 \text{ L}/\text{min}$, 160°C ; ESI: 4,5 kV (positivo).

Tab. 12. Comparação dos desvios relativos (em %) dos tempos de migração (t_m), áreas dos picos e razão sinal/ruído (S/N) de vinte injeções consecutivas de plasma no CE-MS.

Analito	CV (%)		
	t_m (min)	Área	S/N
Metionina	3,36	18	33
Ácido glutâmico	3,36	20	18
Homocisteína	3,35	23	15
Cisteína	3,50	25	27

Posteriormente, observou-se novamente a variação de tempos de migração e alargamento dos picos. Aumentou-se, então, a concentração de ácido acético no BGE para 5 mol/L e hidróxido de sódio para 1 mol/L no condicionamento do capilar entre as corridas. A fonte de ESI se manteve desligada durante o condicionamento.

5.3.4. Preparo de amostras

O tratamento de amostras envolvendo somente a precipitação de proteínas com acetonitrila (conforme descrito em 5.2.5A) se mostrou ineficaz para Hcy e Cys. A Fig. 23 mostra que não foram encontrados os picos de Hcy e Cys, assim como os produtos de oxidação cistina e homocistina. No plasma, a forma oxidada de aminotióis predomina. Aproximadamente 70 a 80% de Hcy total está ligada a proteínas via ponte dissulfeto [56]. Assim, testou-se o preparo de amostras de plasma com a precipitação de proteínas com ditioneína (DTT) seguido por precipitação com acetonitrila (item 5.2.5B). A vantagem do tratamento com DTT consiste na redução de uma ponte dissulfeto para dois grupos tióis. A redução com DTT libera os analitos de proteínas e também precipita as proteínas, principalmente as que contêm muitos resíduos de cisteínas, como a albumina [91]. Além disso, o DTT reduz cistina e homocistina para Cys e Hcy, respectivamente. Isso se torna vantajoso já que o grupo tiol oxida facilmente para dissulfeto durante o armazenamento das amostras de plasma sob refrigeração. A posterior adição de acetonitrila pode precipitar outros tipos de proteínas que ainda remanesceram em suspensão após a precipitação com DTT. Além disso, a presença de acetonitrila e sais do plasma na zona de amostra aumenta a intensidade de picos devido às estratégias de pré-concentração eletroforética por *stacking* e tITP, já discutidos anteriormente.

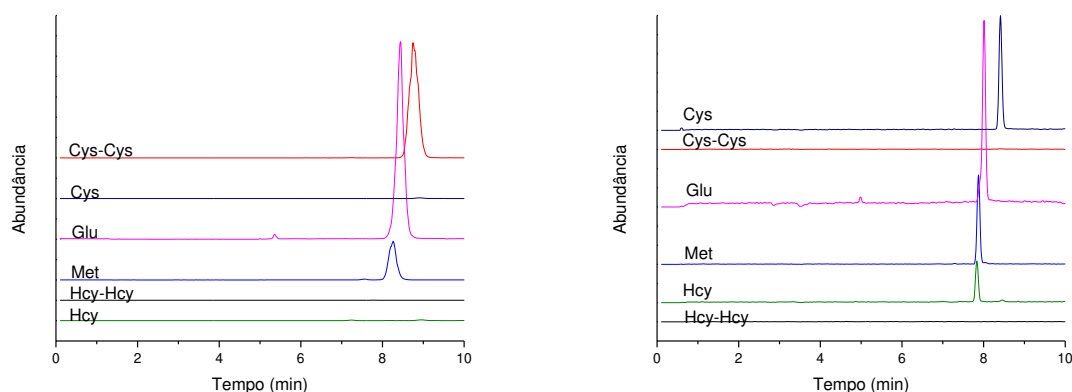


Fig. 23. Eletroferogramas de íons extraídos (EIE) de aminoácidos em plasma após o preparo incluindo somente a precipitação de proteínas com acetonitrila. Legenda: Hcy-Hcy: homocistina, Cys-Cys: cistina. Condições de análise: BGE: ácido acético 5 mol/L. Transições monitoradas por SRM: m/z : 150→140 (Met), m/z : 148→130 (Glu), m/z : 136→90 (Hcy), m/z : 122→105 (Cys), m/z : 241→152 (Cys-Cys), m/z : 269→136 (Hcy-Hcy). Demais condições como na Fig. 22.

Adicionou-se 10 μ L de solução de DTT nas concentrações 25; 50; 100; 250 e 500 mmol/L a 100 μ L de plasma. Após 15 min foram adicionados 100 μ L de acetonitrila gelada e a mistura foi centrifugada por 10 min a 6000 rpm. O sobrenadante foi injetado diretamente no CE-MS/MS. Monitoraram-se as transições de m/z 122→76 (Cys); 136→90 (Hcy); 241→152 (cistina) e 269→136 (homocistina).

Somente com a solução de DTT na concentração 500 mmol/L foi possível completar a redução de homocistina e cistina para Hcy e Cys, respectivamente. Após trinta minutos de reação (25 °C) observou-se a formação de um gel. Como a reação com DTT é dependente de temperatura, a velocidade de formação do gel aumentou com o aumento da temperatura. Da mesma forma, a redução de dissulfetos com DTT é pH-dependente, pois demanda que o reagente apresente carga efetiva negativa (Fig. 24, [92]). Assim, é recomendável manter o pH do meio reacional acima de 7, já que os valores de pK_a dos grupos tióis do DTT são 9,2 e 10,1. Porém, avaliando a composição salina do plasma, conclui-se que o tampão formado apresenta pH entre 7,38 e 7,42 o que proporciona a redução dos grupos dissulfeto dos analitos simplesmente mediante adição de solução aquosa de DTT à amostra de plasma [93].

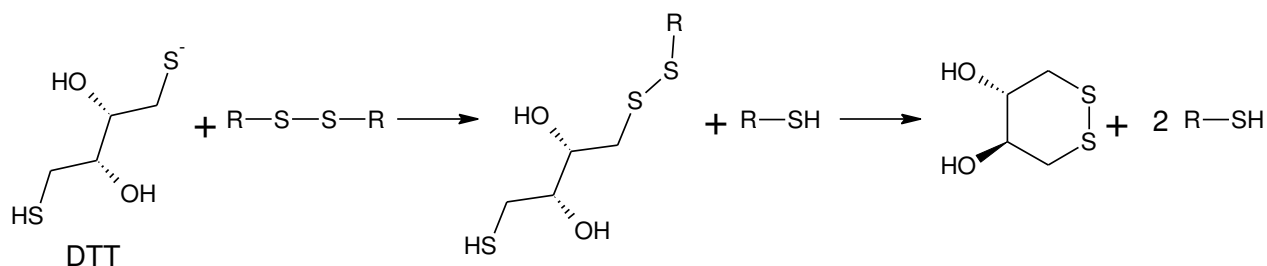


Fig. 24. Redução de dissulfetos com DTT [94]

Para verificar a eficiência da etapa de preparo de amostras para a determinação de Met, Glu, Cys e Hcy em plasma por CE-MS/MS foram construídas curvas analíticas em quatro níveis de concentração. Observou-se que a curva de calibração de Cys não apresentou linearidade aceitável (Fig. 25), visto que a área do pico de Cys diminuiu ao longo das análises. Essa tendência pode ser explicada pela alta reatividade do grupo tiol, uma vez que os grupos dissulfetos foram reduzidos, o grupo tiol ficou suscetível a uma nova oxidação a dissulfeto. Desta forma, o grupo tiol foi derivatizado para evitar a sua oxidação.

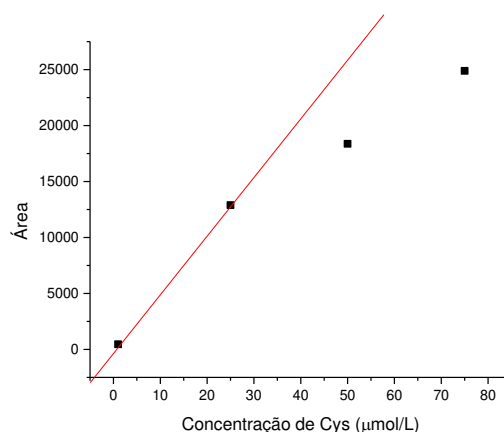


Fig. 25. Curva de calibração de Cys construída no plasma, que foi preparado pela redução de dissulfetos com DTT e precipitação de proteínas com acetonitrila.

O reagente derivatizante mais comumente usado para evitar a oxidação do grupo tiol é o ácido iodoacético (IAA). A reação segue o mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (Fig. 26) e exige meio básico para que todos os grupos tíóis sejam desprotonados (pK_a Cys - 10,17; pK_a Hcy - 10,28 [67,95,96]). A

proporção molar de tiol e IAA é geralmente 1:2, porém o excesso de IAA deve ser evitado, principalmente quando Met também é derivatizada. Como a redução de dissulfetos foi feita com DTT (que também apresenta grupo tiol) na concentração 500 mmol/L, avaliou-se, então, a adição de IAA 500 mmol/L em hidróxido de sódio 1 mol/L nas proporções 1:1 e 1:2 (DTT:IAA, v/v). Os ensaios utilizando DTT:IAA na proporção 1:1 levou à alquilação incompleta dos tióis e na proporção 1:2 causou a alquilação parcial de Met. Dessa forma, decidiu-se dividir o método de análise dos aminoácidos em dois métodos: análise de Met e Glu envolvendo tratamento de plasma apenas com DTT, e análise de aminotióis Cys e Hcy envolvendo tratamento de plasma com DTT e IAA 1:2 (v/v).

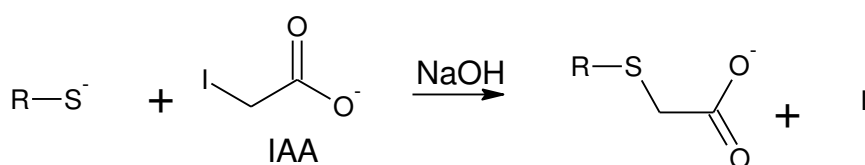


Fig. 26. Reação de tióis com IAA em meio básico.

5.3.5. Validação dos métodos de CE-MS/MS para determinação de aminoácidos em plasma

A validação dos métodos de análise de aminoácidos se baseou na norma estabelecida pela ANVISA para métodos bioanalíticos [80]. Os parâmetros avaliados foram selecionados de modo a garantir a confiabilidade dos resultados.

A faixa linear, a linearidade e a sensibilidade foram estabelecidas por meio da construção de curva analítica em seis níveis de concentração, em triplicata, mediante fortificação de 100 µL de plasma com 10 µL de solução de mistura de aminoácidos, resultando em concentrações finais de: 2,5; 12,5; 22,5; 32,5; 42,5 e 52,5 µmol/L de Hcy, 20; 135; 250; 365; 480 e 595 µmol/L de Cys e Glu, e 10; 18; 26; 34; 42 e 50 µmol/L de Met. As faixas de concentrações de cada analito foram escolhidas para garantir que a concentração de cada analito na amostra real estivesse incluída na curva analítica. Também foi adicionado o padrão interno a cada amostra, cuja concentração final foi 100 µmol/L. Após verificação da homocedasticidade da curva e avaliação da presença de possíveis *outliers* pelo teste de Jackknife, foi estabelecida a equação da reta pelo método dos mínimos

quadrados ordinários. As figuras das curvas analíticas e os gráficos de resíduos são mostrados na Fig. 27.

Para avaliação da precisão, as amostras de plasma foram fortificadas em três níveis de concentração de aminoácidos dentro da faixa linear: baixo (ponto 1), médio (ponto 3) e alto (ponto 5). A precisão intra-dia foi realizada em triplicata no mesmo dia. A precisão inter-dia foi realizada em três dias consecutivos em triplicata ($n = 9$). Os resultados foram expressos pelos CVs.

A exatidão do método foi calculada mediante ensaio de exatidão. Para isso, amostras de plasma foram fortificadas no nível médio (ponto 3) de concentração de aminoácidos dentro da faixa linear em triplicata. Os resultados foram expressos pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados pela razão sinal/ruído. Para isso, foram injetadas soluções de aminoácidos (em água:acetonitrila 1:1) em concentrações regressivas até observação de relação sinal/ruído igual a 3 e a 10 para LD e LQ, respectivamente.

Os parâmetros de regressão linear, obtidos por meio das curvas analíticas preparadas na matriz de plasma, são mostrados na Tab. 13, assim como os resultados da precisão, expressos pelo coeficiente de variação (CV); da exatidão, expressos pela porcentagem de exatidão; e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

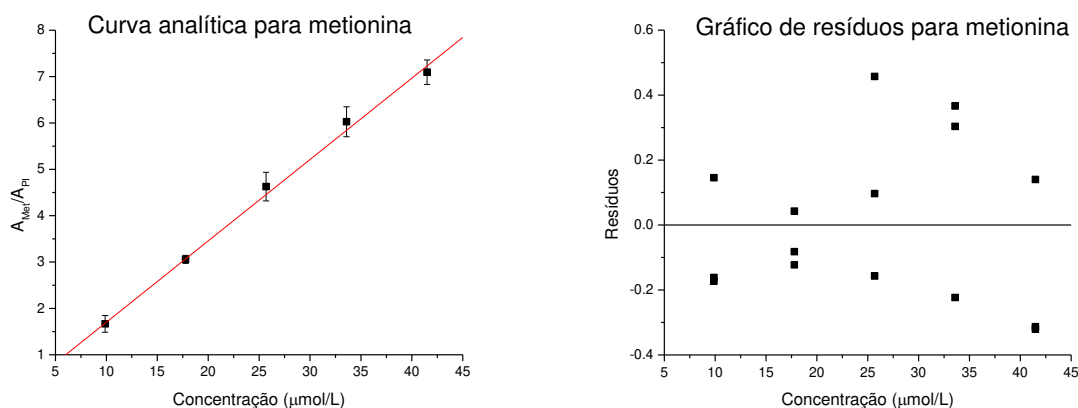


Fig. 27. Legenda na página seguinte

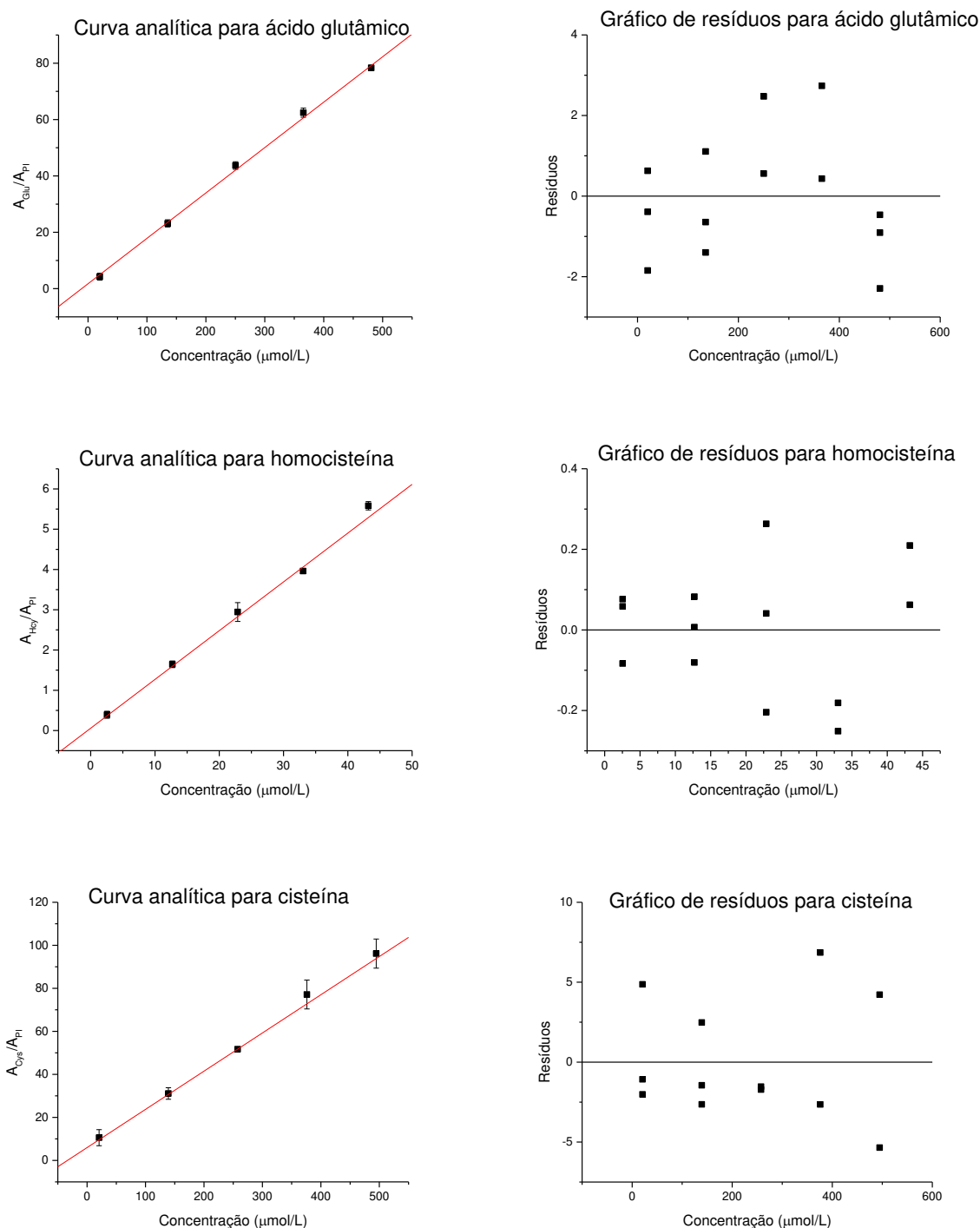


Fig. 27. Curvas analíticas e gráficos de resíduos para cada analito em matriz biológica obtidos pelos métodos de CE-MS/MS otimizados.

O método desenvolvido apresentou boa precisão intra- e inter-dia para todos os analitos em três níveis de concentração, exceto a precisão inter-dia no nível baixo da concentração de Glu. Os valores de exatidão no nível médio das

concentrações de aminoácidos estavam dentro dos limites permitidos pela ANVISA (até $\pm 15\%$). Foram obtidos baixos valores de LD e LQ, 35 e 117 nmol/L, respectivamente, para Hcy. O método validado foi considerado confiável e foi aplicado para análise de amostras de plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com ALS.

Tab. 13. Figuras de mérito avaliadas para a validação dos métodos 1 e 2 para determinação dos aminoácidos em plasma por CE-MS/MS

Método 1: Aminoácidos		Método 2: Aminotióis		
Parâmetro	Metionina	Ácido glutâmico	Homocisteína	Cisteína
Faixa linear ($\mu\text{mol/L}$)	10 – 50	20 – 595	2,5 – 52,5	20 – 595
Coefficiente de regressão linear (r)	0,986	0,997	0,993	0,987
Sensibilidade ($\text{L}/\mu\text{mol}$)	0,175	0,162	0,125	0,183
Intercepto	0,001	1,536	0,0574	6,178
Precisão intra-dia (%) ^a	baixo ^b	5%	14%	7%
	médio ^c	5%	2%	6%
	alto ^d	3%	2%	7%
Precisão inter-dia (%) ^a	baixo ^b	12%	17%	10%
	médio ^c	10%	5%	11%
	alto ^d	8%	4%	10%
Exatidão (%)	102%	101%	108%	95%
LD (nmol/L)	64	268	35	40
LQ (nmol/L)	213	894	117	132

^a coeficiente de variação

^b Met, Glu, Hcy e Cys na concentração de 10; 20; 2,5; 20 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.

^c Met, Glu, Hcy e Cys na concentração de 26; 250; 22,5 e 250 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.

^d Met, Glu, Hcy e Cys na concentração de 42; 480; 42,5 e 480 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.

5.4. Conclusões parciais

Desenvolveu-se um método de análise de aminoácidos por CE-MS/MS que possibilitou a confirmação dos aminoácidos em plasma pelo modo SRM. Foram

avaliados vários tipos de tratamento de amostra e condicionamento do capilar para garantir maior repetibilidade. A análise foi dividida em dois grupos: aminoácidos Glu e Met e aminotióis Hcy e Cys, com dois métodos de preparo de amostra diferente. Ambos os métodos foram validados em matriz biológica e podem ser aplicados para análise de amostras de plasma de indivíduos sadios e portadores de ALS.

CAPÍTULO 6

**ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PLASMA DE
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E PACIENTES COM
ALS POR ELETROFORESE CAPILAR
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS
SEQUENCIAL**

6.1. Introdução

Atualmente, o diagnóstico da ALS se baseia nos El Escorial Critérios revisados que avaliam os sinais de envolvimento do UMN (fraqueza e sinais de liberação piramidal), e os sinais de comprometimento do LMN (atrofia, fasciculações). Faz-se um questionário sobre as atividades cotidianas, como, por exemplo, subir a escada, vestir-se, cortar alimentos, falar, etc. Cada questão é avaliada na escala de zero (indicando que o paciente não consegue concluir a tarefa) a quatro (indicando habilidade normal do paciente). A escala mais aplicada é a Escala funcional de avaliação em ALS revisada (ALSFRS-R – do inglês *ALS Functional Rating Scale – revised*) que inclui 12 questões, onde cada uma vale de 0 a 4 pontos. A soma dos pontos estima o nível de comprometimento funcional do paciente. Outra avaliação de ALS comumente usada no Brasil é a escala de gravidade que examina quatro dimensões (extremidade inferior, extremidade superior, fala e deglutição) pontuando-as de 1 a 10. Além da ALSFRS-R e da escala de gravidade, os resultados de eletromiografia e ressonância magnética ajudam no diagnóstico de ALS [97,98].

A falta de um biomarcador específico para diagnóstico de ALS levou diversos grupos de pesquisa a busca de várias classes de metabólitos como potenciais biomarcadores de ALS. Para poder avaliar, se o metabólito é um biomarcador, a validação tem que ser realizada, definindo os parâmetros como sensibilidade e especificidade, entre outros [99]. Vários testes estatísticos podem ser empregados na busca e validação de biomarcadores, tanto com análise univariada como multivariada.

As amostras de plasma dos indivíduos saudáveis e pacientes com ALS foram analisadas pelo método CE-MS/MS previamente validado e as concentrações de Hcy, Cys, Met e Glu determinadas foram comparadas por métodos estatísticos. Procuraram-se diferenças entre as concentrações destes aminoácidos no plasma dos indivíduos saudáveis e pacientes com ALS, além de correlações entre as concentrações dos aminoácidos e progresso da doença.

6.2. Materiais e métodos

6.2.1. Origem das amostras de plasma de pacientes com ALS

As amostras de sangue de pacientes adultos com diagnóstico de ALS e de variantes dessa doença, acompanhados no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, usadas neste projeto são remanescentes das análises do projeto: “Estudo de Biomarcadores em Doenças do Neurônio Motor” (aprovado previamente pelo CEP da FCM-UNICAMP sob o número 270/11). Para poder analisar essas amostras por CE, foi aprovado novo projeto sob a resolução 466/2012 CNS/MS (Anexo), que trata da solicitação de autorização adicional aos pacientes vivos que já participaram no projeto 270/11 e cujas amostras são de interesse para o projeto proposto.

Foram observados os dados contidos nos prontuários dos pacientes como sexo, idade, tempo de evolução da doença e exames subsidiários relativos. Alguns destes dados estão sumarizados na Tab. 14.

Tab. 14. Informações sobre os pacientes com ALS

		Total	Homens	Mulheres
Número de pacientes		39	22	17
Idade média (\pm DP^a)		54 \pm 12	51 \pm 11	56 \pm 13
Tempo mediano de doença (meses)		23	21	24
Definição de ALS^b	definida	8	4	4
	provável	10	4	6
	provável com suporte laboratorial	9	5	4
	possível	11	9	2
Subtipo de ALS	clássica	16	7	9
	atrofia muscular progressiva	4	3	1
	esclerose lateral primária	2	2	0
	flail arm	5	1	4
	flail leg	7	4	3
	paralisia bulbar progressiva	5	5	0

^a desvio padrão

^b ALS foi definido na base de El Escorial Critérios revisados.

6.2.2. Origem das amostras de plasma dos indivíduos saudáveis

As amostras de sangue dos indivíduos saudáveis foram coletadas no Hospital das Clínicas da UNICAMP no ADN, de acordo com a aprovação do CEP da FCM-UNICAMP, sob a resolução 466/2012 CNS/MS. Para fins estatísticos, foram solicitados alguns dados pessoais como sexo e idade. Alguns destes dados estão sumarizados na Tab. 15.

Tab. 15. Informações sobre os indivíduos saudáveis

	Total	Homens	Mulheres
Número de indivíduos	20	10	10
Idade média (\pm DP)	23 \pm 3	23 \pm 3	24 \pm 2

6.2.3. Preparo de amostras de plasma

Todas as amostras de sangue foram coletadas em frascos com solução de EDTA, que foram centrifugados por 10 minutos a 2500 rpm (4°C). O plasma foi separado e armazenado em tubos Eppendorf a -80 °C até o momento da análise.

As amostras de plasma foram preparadas de acordo com o descrito no item 5.2.5C.

6.2.4. Análise de plasma por CE-MS/MS

A análise dos aminoácidos foi dividida em dois métodos conforme descrito no item 5.2.6.

6.2.5. Análise de resultados por métodos estatísticos

Para cada amostra, foi calculada a média e desvio padrão de três concentrações obtidas. As concentrações médias de cada amostra foram divididas em dois grupos: indivíduos saudáveis (N = 21) e pacientes com ALS (N = 39). Para cada grupo foi realizada a análise descritiva no programa Microsoft Excel (versão 2010, Microsoft Office, EUA).

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi feito para cada aminoácido de cada grupo no programa OriginPro (versão 9.0, OriginLab, EUA). Para dados que apresentaram distribuição normal, utilizou-se teste t de Student para médias de duas

amostras. Para dados com outra distribuição, realizou-se teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Os testes de hipótese foram calculados no programa OriginPro. A curva ROC foi feita no software MetaboAnalyst 3.0 [100].

A análise multivariada foi feita no programa Pirouette (versão 3.11, Infometrix, EUA). Realizou-se análise de componentes principais (PCA – do inglês *Principal Component Analysis*) utilizando dados centrados na média. O modelo foi validado por validação cruzada.

6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Análise de amostra de plasma

Todas as amostras de plasma foram analisadas pelos métodos previamente validados (item 5.3.5). Cada amostra foi preparada e injetada em triplicata. As concentrações médias de cada aminoácido estão citadas na Tab. 16. As amostras de plasma dos indivíduos saudáveis contêm sigla C (grupo controles), enquanto as amostras de plasma dos pacientes com ALS contêm P (grupo pacientes).

Tab. 16. Concentrações médias e desvios padrão de aminoácidos em amostras de plasma

Amostra	Metionina ($\mu\text{mol/L}$)	Ácido glutâmico ($\mu\text{mol/L}$)	Homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)	Cisteína ($\mu\text{mol/L}$)
C01	13 \pm 2	98 \pm 8	3,3 \pm 0,2	57 \pm 2
C02	9,5 \pm 0,2	23 \pm 2	3,6 \pm 0,3	76 \pm 2
C03	15,3 \pm 0,9	115 \pm 12	6*	50*
C04	21,6 \pm 0,3	170 \pm 15	5,1 \pm 0,4	123 \pm 8
C06	12,34 \pm 0,07	108 \pm 6	4,73 \pm 0,05	143 \pm 9
C07	13,1 \pm 0,5	98 \pm 6	3,5 \pm 0,4	110 \pm 15
C08	10,9 \pm 0,6	94 \pm 6	4,4 \pm 0,2	105 \pm 13
C09	13,0 \pm 0,3	154 \pm 6	7,6 \pm 0,9	136 \pm 17
C10	14,5 \pm 0,7	194 \pm 17	7,57 \pm 0,02	137 \pm 42
C11	16,3 \pm 0,8	91 \pm 2	5*	125*
C12	19,7 \pm 0,7	155 \pm 5	8,0 \pm 0,8	98 \pm 7
C13	8,7 \pm 0,5	45 \pm 7	9*	76*
C14	18,0 \pm 0,5	107 \pm 7	8,2 \pm 0,4	206 \pm 4
C15	21 \pm 1	139 \pm 12	5,9 \pm 0,7	166 \pm 27

Tab. 16. Continuação de tabela da página anterior

Amostra	Metionina ($\mu\text{mol/L}$)	Ácido glutâmico ($\mu\text{mol/L}$)	Homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)	Cisteína ($\mu\text{mol/L}$)
C16	24 \pm 1	188 \pm 15	8,3 \pm 0,5	176 \pm 5
C17	23 \pm 1	70,5 \pm 0,8	9,5 \pm 0,3	178,4 \pm 0,1
C18	16,1 \pm 0,4	90 \pm 3	6,4 \pm 0,2	72 \pm 31
C19	14,2 \pm 0,1	72,76 \pm 0,03	6,0 \pm 0,3	146 \pm 6
C20	10,9 \pm 0,2	70 \pm 11	6,8 \pm 0,6	153 \pm 24
C21	28 \pm 3	142 \pm 13	8,5 \pm 0,3	168 \pm 27
P01	8,69 \pm 0,02	71 \pm 7	7 \pm 1	202 \pm 5
P02	17,77 \pm 0,02	153,0 \pm 0,3	8,7 \pm 0,8	234 \pm 24
P03	20,7 \pm 0,1	98 \pm 2	5,4 \pm 0,1	273 \pm 3
P04	25 \pm 1	176 \pm 12	9,9 \pm 0,6	312,0 \pm 0,7
P05	17,8 \pm 0,8	162 \pm 11	5,6 \pm 0,8	216 \pm 37
P06	30 \pm 4	286 \pm 15	7,3 \pm 0,2	169 \pm 16
P07	17 \pm 5	184 \pm 45	11 \pm 1	305 \pm 11
P08	17,1 \pm 0,9	177 \pm 31	7 \pm 1	220 \pm 28
P09	14 \pm 2	160 \pm 18	24 \pm 2	211 \pm 21
P10	11,2 \pm 0,4	172 \pm 8	15 \pm 1	198 \pm 20
P11	25 \pm 3	390 \pm 45	2,5 \pm 0,3	115 \pm 33
P12	13,6 \pm 0,7	139 \pm 2	7 \pm 1	116 \pm 15
P13	17 \pm 2	94 \pm 5	7 \pm 1	94 \pm 2
P14	17 \pm 2	149 \pm 9	7,6 \pm 0,5	165 \pm 16
P15	12,5 \pm 0,1	68 \pm 3	8,3 \pm 0,5	130 \pm 16
P16	17,4 \pm 0,6	196 \pm 20	5,32 \pm 0,09	190 \pm 17
P17	12 \pm 1	59 \pm 5	9,5 \pm 0,8	202 \pm 9
P18	15,5 \pm 0,3	149 \pm 9	11,2 \pm 0,6	162,0 \pm 0,7
P19	10,0 \pm 0,5	128 \pm 14	4,0 \pm 0,4	185 \pm 3
P20	20 \pm 1	216 \pm 8	2,600 \pm 0,002	106 \pm 10
P21	14,5 \pm 0,4	123 \pm 6	10,4 \pm 0,7	164 \pm 18
P22	26 \pm 2	113 \pm 19	3,4 \pm 0,1	136 \pm 12
P23	16,7 \pm 0,6	163 \pm 15	8,7 \pm 0,7	196 \pm 31
P24	19,7 \pm 0,2	105 \pm 9	6,5 \pm 0,5	171 \pm 24
P25	10,4 \pm 0,1	145 \pm 7	9 \pm 2	250 \pm 47
P26	14,9 \pm 0,1	233 \pm 3	7,5 \pm 0,8	229 \pm 29
P27	20,0 \pm 0,6	147 \pm 14	6,8 \pm 0,6	186 \pm 17
P28	27 \pm 2	165 \pm 9	6,8 \pm 0,2	200 \pm 8

Tab. 16. Continuação de tabela da página anterior

Amostra	Metionina ($\mu\text{mol/L}$)	Ácido glutâmico ($\mu\text{mol/L}$)	Homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)	Cisteína ($\mu\text{mol/L}$)
P29	14 \pm 1	143 \pm 11	11,4 \pm 0,4	139 \pm 7
P30	19,9 \pm 0,6	203 \pm 6	11,3 \pm 0,1	181 \pm 35
P31	15,16 \pm 0,08	94 \pm 3	5,6 \pm 0,2	160 \pm 8
P32	13 \pm 2	100,0 \pm 0,7	6,4 \pm 0,6	129 \pm 12
P33	20,3 \pm 0,5	298 \pm 18	4,9 \pm 0,7	156 \pm 25
P34	14,0 \pm 0,2	220 \pm 8	5,7 \pm 0,8	186 \pm 19
P35	10,7 \pm 0,9	217 \pm 15	9 \pm 3	206,9 \pm 0,7
P36	10,9 \pm 0,6	440 \pm 24	4*	104*
P37	12 \pm 4	93 \pm 5	4 \pm 1	131 \pm 13
P38	16,6 \pm 0,4	153 \pm 7	2,8 \pm 0,2	104 \pm 6
P39	18 \pm 2	224 \pm 22	4,3 \pm 0,7	74 \pm 24
P40	16 \pm 2	296 \pm 23	4,9 \pm 0,8	162 \pm 28

* Não foi possível completar a determinação em triplicata.

C – indivíduo saudável (controle); P – paciente

6.3.2. Comparação das concentrações de aminoácidos em plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com ALS

Para análise estatística, foi construída uma matriz (60x4) contendo as médias de concentração de cada aminoácido em cada amostra. Construiu-se um diagrama de caixa para cada aminoácido em cada grupo (Fig. 28). Esse tipo de diagrama mostra a variação de concentrações de cada aminoácido em grupos de indivíduos saudáveis e pacientes com ALS. A linha inferior da caixa representa o primeiro quartil, ou seja, o valor da concentração referente a 25% de todos os valores de concentrações ordenados. Da mesma forma, a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, ou seja, o valor da concentração referente a 75% de todos os valores ordenados. A linha dentro da caixa descreve a mediana, enquanto o ponto dentro da caixa mostra a concentração média. As extremidades de retas verticais mostram os valores mínimos e máximos.

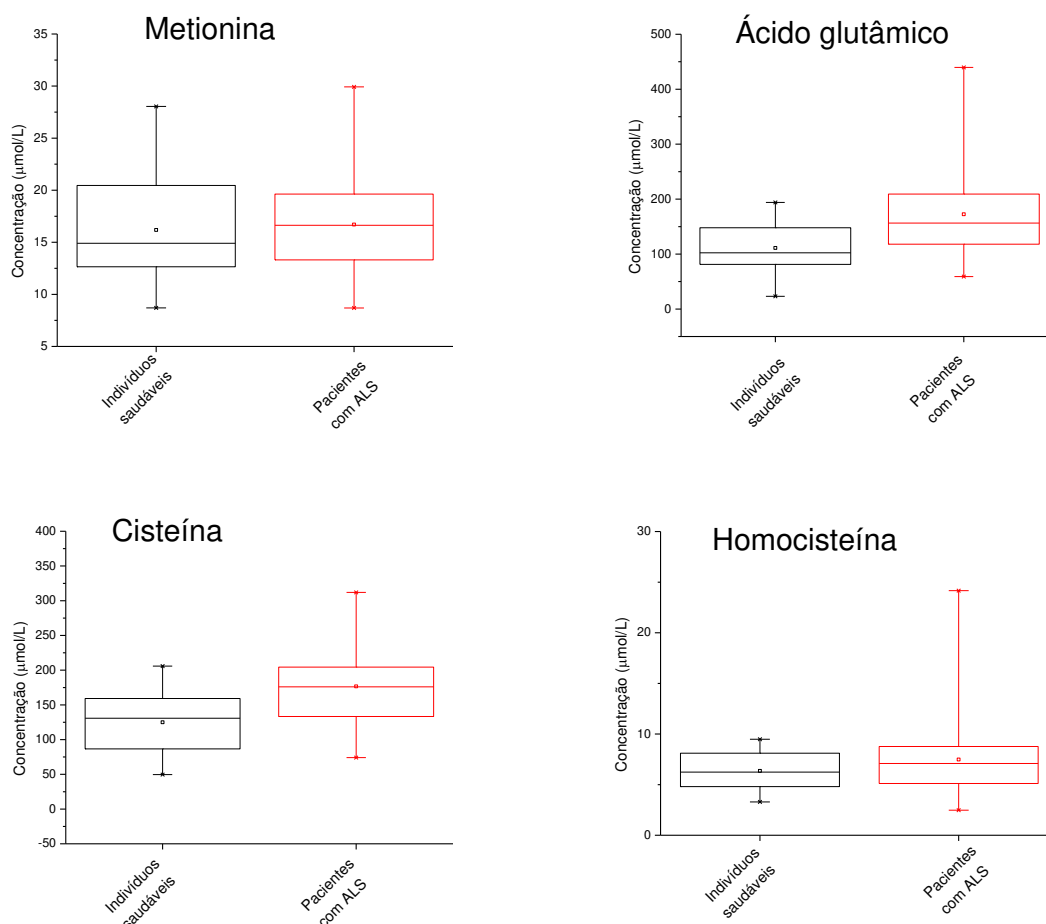


Fig. 28. Diagrama de caixas para cada aminoácido mostrando a variação da concentração em plasma dos indivíduos saudáveis e pacientes com ALS.

Os diagramas de caixa na Fig. 28 mostraram que não existe nenhuma diferença entre os valores de concentração de Met em plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com ALS. Por outro lado, as concentrações de Glu e Cys se encontraram elevadas em plasma de pacientes com ALS. Apesar de Hcy apresentar alguns valores de concentração maiores em plasma de pacientes com ALS, a maioria de pacientes com ALS apresentaram concentrações de Hcy na mesma faixa que os indivíduos saudáveis.

Para confirmar estas conclusões, foram feitos testes de hipótese. As concentrações de cada aminoácido em plasma foram divididas em dois grupos – indivíduos saudáveis e pacientes com ALS. Primeiramente foi feito o teste de normalidade de Shapiro-Wilk com nível de significância de 0,05, que determina se as

concentrações de aminoácidos em cada grupo são distribuídas normalmente. Entre os testes de normalidade, o teste de Shapiro-Wilk é considerado como um dos melhores testes para avaliar a normalidade de um conjunto de dados com menos de 40 amostras [101]. Baseando-se na estatística W , formula-se a hipótese:

H_0 : A amostra provém de uma população normal.

H_a : A amostra não provém de uma população normal.

Se o W calculado for menor que W tabulado no nível de significância escolhido, é necessário rejeitar a H_0 e então confirma-se que a amostra não tem uma distribuição normal. Os resultados obtidos de W e o valor p calculado são mostrados na Tab. 17.

Tab. 17. Teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$)

Aminoácido (grupo)	N	$W_{\text{calculado}}$	W_{tabelado} [102]	p-valor
Met (saudáveis)	20	0,952	0,905	0,403
Met (pacientes)	40	0,952	0,940	0,086
Glu (saudáveis)	20	0,971	0,905	0,784
Glu (pacientes)	40	0,888	0,940	0,001
Hcy (saudáveis)	20	0,950	0,905	0,362
Hcy (pacientes)	40	0,831	0,940	0,00003
Cys (saudáveis)	20	0,970	0,905	0,764
Cys (pacientes)	40	0,973	0,940	0,441

Observou-se que a maioria dos dados mostrou distribuição normal, com exceção das concentrações de Glu e Hcy em plasma dos pacientes com ALS. Desta forma, os resultados de concentrações de Glu e Hcy em plasma devem ser tratados com testes não-paramétricos, enquanto os resultados de concentrações de Met e Cys podem ser tratados com testes paramétricos.

Para confirmar se as concentrações de cada aminoácido são estatisticamente diferentes em plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com ALS, foram realizados testes de hipótese. Escolheu-se o teste t de Student para média de duas amostras para concentrações de Met e Cys e teste de Mann-Whitney para concentrações de Glu e Hcy (teste não-paramétrico). Formularam-se duas hipóteses:

H_0 : Não há diferença significativa entre as duas amostras.

H_a : Há diferença significativa entre as duas amostras.

Quando o p-valor calculado foi menor que o nível de significância ($\alpha = 0,05$), houve diferença significativa entre as concentrações encontradas em plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com ALS. As Tab. 18 e Tab. 19 mostram os p-valores calculados para cada aminoácidos.

Tab. 18. Valores de t calculados para testes t de Student ($\alpha = 0,05$) para Met e Cys em plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com ALS

Aminoácido	$t_{\text{calculado}}$	t_{tabelado}	p-valor
Met	0,37796	2,0017	0,7068
Cys	3,6903	2,0017	0,0005

Tab. 19. Valores de U calculados para teste de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$) para Glu e Hcy em plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com ALS

Aminoácido	U	Z	p-valor
Glu	204	3,07	0,00217
Hcy	337	0,98	0,32705

Os testes de hipótese confirmaram que há diferença significativa entre os níveis plasmáticos de Cys e Glu em indivíduos saudáveis e pacientes com ALS.

6.3.3. Correlação de concentração de aminoácidos em plasma e progresso da doença

Com o objetivo de procurar a correlação entre as concentrações de aminoácidos em plasma de pacientes com ALS e o progresso da doença, calculou-se o coeficiente de Pearson (distribuição normal) e coeficiente de Spearman (não-paramétrico).

A Tab. 20 mostra os coeficientes de correlação (r) e respectivos p-valores para cada relação entre aminoácido e progresso de doença. O coeficiente r apresenta valores entre -1 e 1, sendo que r igual a 1 significa uma correlação positiva entre duas variáveis; r igual a -1 significa uma correlação negativa e r igual a zero significa que não existe nenhuma correlação entre as duas variáveis. Desta

forma, não foi encontrada nenhuma correlação entre as concentrações de aminoácidos e progresso de ALS.

Tab. 20. Coeficientes de correlação r entre aminoácidos e progresso da doença

Progresso de doença	Met	Glu	Hcy	Cys
Tempo de doença	-0,156	-0,067	0,283	-0,028
Escala ALSFRS-R	0,130	-0,178	0,098	0,133
Escala de gravidade	0,295	-0,080	-0,146	-0,0285
Idade	0,088	-0,108	0,241	0,366

6.3.4. Curva ROC

Para poder avaliar a capacidade dos aminoácidos em discriminar entre indivíduos saudáveis e pacientes com ALS, foram construídas curvas ROC (do inglês *Receiver Operating Characteristic Curves*). Atualmente, a curva ROC é bastante usada na área médica para auxiliar na classificação de indivíduos em doentes ou não doentes, mas originalmente, a curva ROC foi desenvolvida durante a segunda guerra mundial para distinguir sinal de ruído, ou seja, se o avião que estava no radar, era do inimigo ou de um objeto voador irrelevante - como um bando de aves [103].

A curva ROC é construída a partir da sensibilidade em função da especificidade da espécie em questão (potencial biomarcador de ALS, neste caso), onde a área sob a curva (AUC – do inglês *Area Under the Curve*) mostra a probabilidade de um indivíduo portador da doença apresentar um resultado positivo ao teste diagnóstico, quando comparado com um indivíduo saudável. Os melhores testes diagnósticos apresentam curva ROC com AUC igual a 1, enquanto os testes com AUC igual a zero não conseguem classificar corretamente nenhum paciente. De acordo com Hajian-Tilaki, o valor mínimo de AUC para classificar um paciente como doente deve ser 0,5 [104]. A Fig. 30 mostra as curvas ROC obtidas para cada aminoácido em estudo. Observa-se que a Cys e Glu apresentaram os maiores valores de AUC - 0,749 e 0,745, respectivamente, mostrando maior capacidade de distinguir um indivíduo com ALS e um indivíduo sadio. Nos pontos de corte (536 $\mu\text{mol/L}$ para Cys e 384 $\mu\text{mol/L}$ para Glu) a sensibilidade e especificidade foram 65% e 75%, respectivamente, para Cys, e 68% e 75%, respectivamente, para Glu. A Met

e Hcy apresentaram AUCs igual a 0,570 e 0,521, respectivamente, mostrando pouca capacidade de classificar indivíduos saudáveis e doentes. Nos pontos de corte (23,4 $\mu\text{mol/L}$ para Met e 14,6 $\mu\text{mol/L}$ para Hcy) a sensibilidade e especificidade foram 63% e 50%, respectivamente, para Met, e 63% e 55%, respectivamente, para Hcy. Todos os resultados estão sumarizados na Tab. 21.

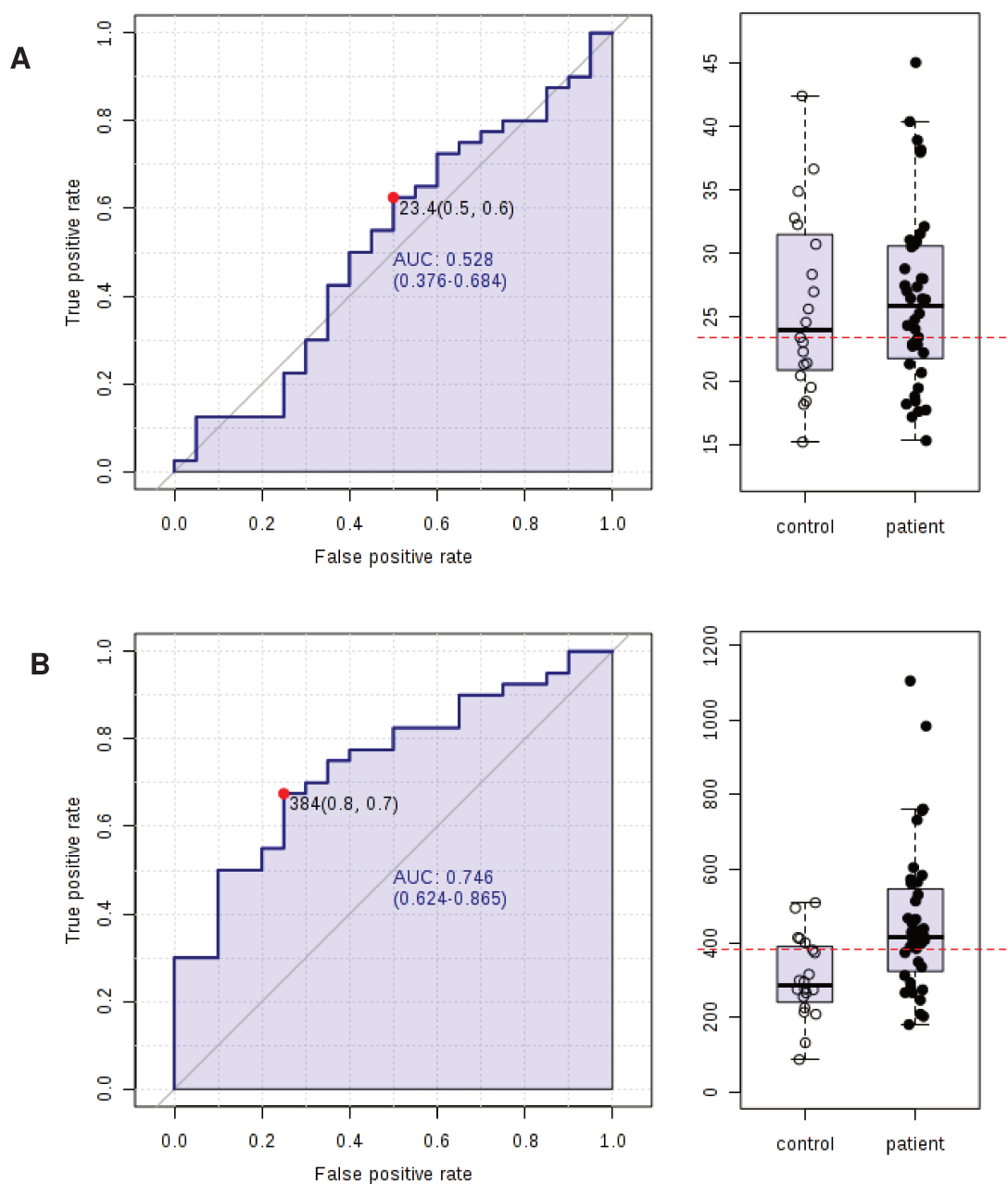


Fig. 29. Legenda na página seguinte.

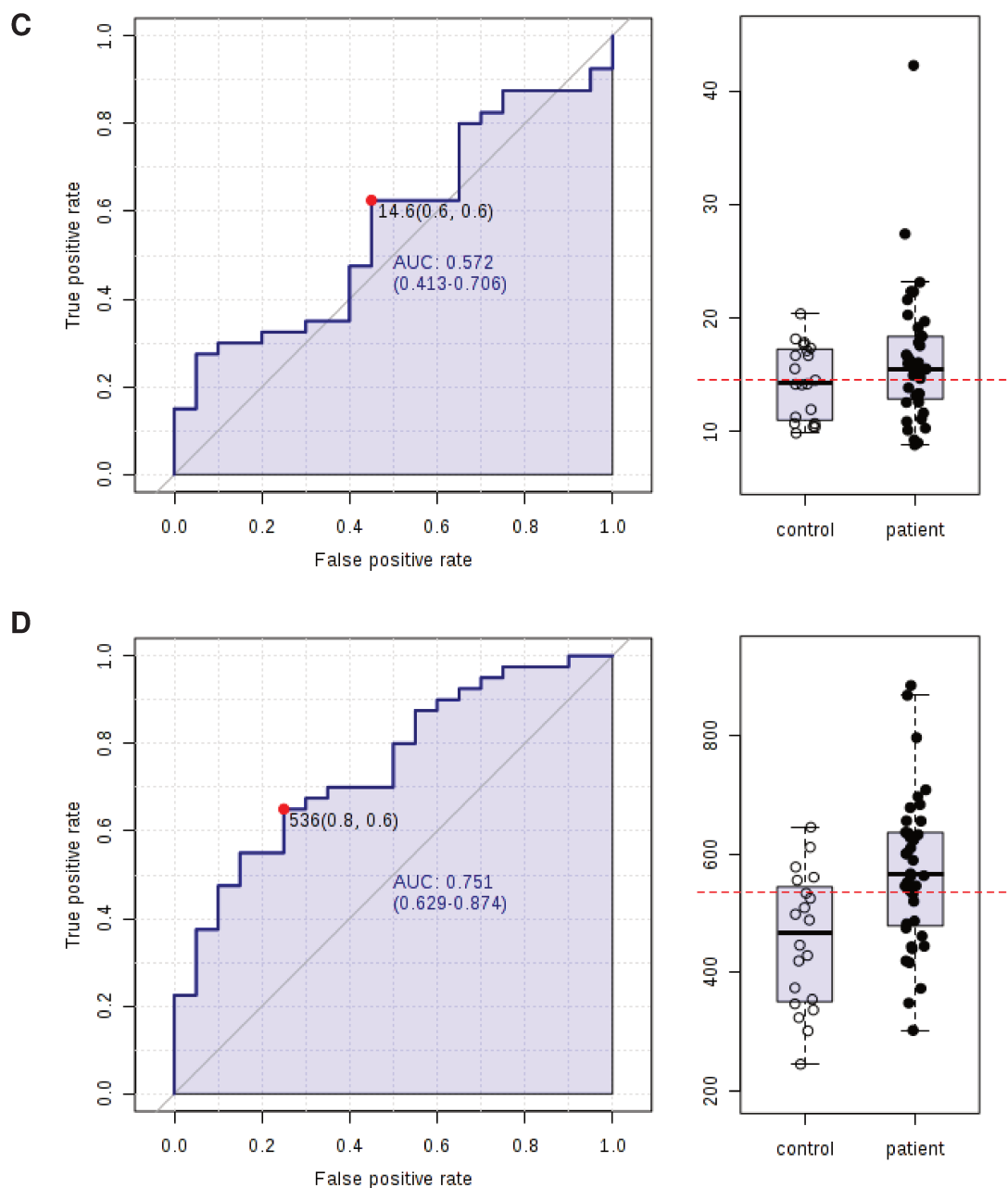


Fig. 30. Curvas ROC para metionina (A), ácido glutâmico (B), homocisteína (C) e cisteína (D).

Tab. 21. Valores de AUC, e respectivos valores p, ponto de corte, sensibilidade e especificidade no ponto de corte para os aminoácidos Met, Glu, Hcy e Cys.

Aminoácido	AUC*	Valor p	Ponto de corte	Sensibilidade (intervalo de confiança)	Especificidade (intervalo de confiança)
Metionina	0,521	0,826	23,4	0,63(0,48-0,78)	0,50(0,27-0,70)
Ácido glutâmico	0,745	0,003	384	0,68(0,50-0,83)	0,75(0,57-0,90)
Homocisteína	0,570	0,210	14,6	0,63(0,50-0,79)	0,55(0,32-0,75)
Cisteína	0,749	0,001	536	0,65(0,50-0,80)	0,75(0,52-0,93)

*do inglês - Area Under the Curve

6.3.5. Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (PCA – do inglês *Principal Component Analysis*) é um método multivariado utilizado para análise exploratória de dados. A PCA é um método matemático que transforma um espaço multidimensional em um novo espaço, onde os eixos são denominados componentes principais (PCs). Os PCs descrevem a direção de maior variância de dados originais. As amostras plotadas nesse novo espaço, que é geralmente bi- ou tridimensional, podem ser visualizadas com maior facilidade. Assim, podem ser encontradas similaridades ou diferenças entre alguns grupos de dados [105]. Os resultados de PCA são geralmente usados para outros métodos multivariados, como análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais, entre outros.

Traçou-se uma PCA para todas as amostras, para visualizar se é possível diferenciar os dois grupos (indivíduos saudáveis e pacientes com ALS) de acordo com a concentração dos aminoácidos investigados. Plotou-se um gráfico de escores utilizando as três primeiras PCs que descrevem 99,9% de variância dos dados (Fig. 31).

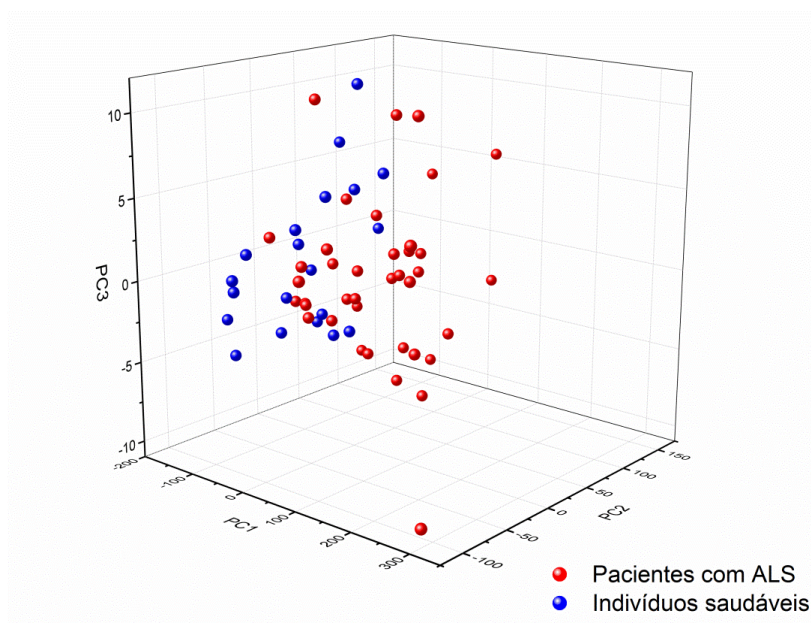


Fig. 31. Gráfico de escores de PCA de concentrações de aminoácidos em plasma (indivíduos saudáveis e pacientes com ALS)

O modelo de PCA mostrou que é possível diferenciar indivíduos saudáveis e pacientes com ALS de acordo com as concentrações de Met, Hcy, Cys e Glu em plasma. Para obter informações adicionais, plotou-se também o gráfico de *loadings* (Fig. 32). Esse gráfico mostra qual variável original tem maior variância na respectiva PC. Podemos concluir que os pacientes com ALS podem ser distinguidos dos indivíduos saudáveis a partir das concentrações de Glu e Cys. O Glu teve a maior influência na variância de dados, apresentando 0,98 de *loadings* na PC1 que descreve 70% dos dados. A Cys apresentou 0,98 em *loadings* na PC2 que descreve 29% dos dados. Embora a concentração de Met seja alta em PC3 (0,94), esta componente contém somente 0,2% de variância total dos dados. A Hcy praticamente não contribuiu na variância dos dados, pois apresentou *loadings* de -0,33 em PC3. Desta forma, o resultado obtido por PCA confirmou os resultados obtidos pelas análises univariadas.

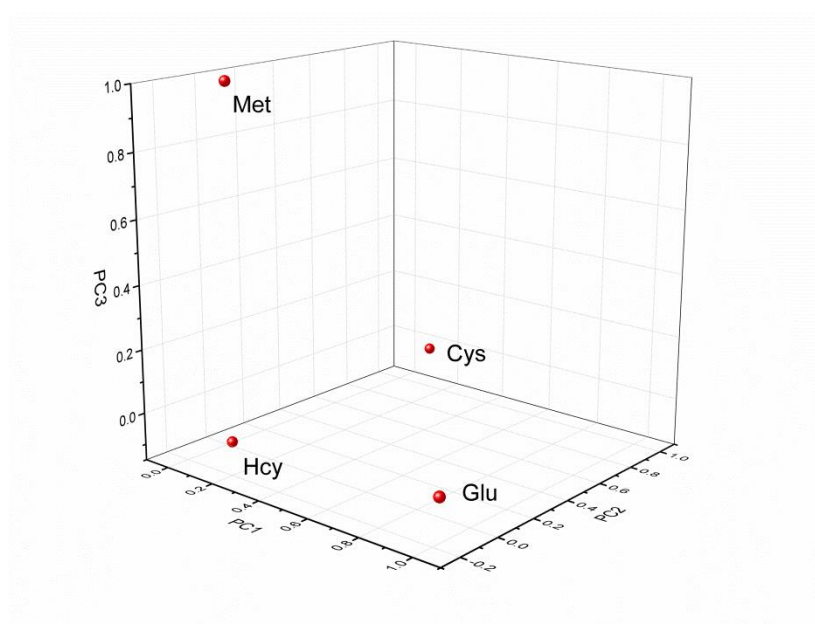


Fig. 32. Gráfico de *loadings* de PCA de concentrações de aminoácidos em plasma (indivíduos saudáveis e pacientes com ALS)

Além da PCA calculada para todos os dados, foi feita também uma PCA utilizando somente as concentrações de aminoácidos em plasma de pacientes com ALS, para poder visualizar se existem similaridades dentro desse grupo. Calculou-se

um modelo, cujas três primeiras PCs continham 99,9% de toda variância, que foi visualizado de duas maneiras diferentes (Fig. 33 e Fig. 34).

Buscou-se a possibilidade de distinguir entre os diferentes níveis de classificação de ALS (El Escorial critérios revisados) ou entre os diferentes subtipos da ALS. Porém, os gráficos de escores de PCA não mostraram nenhum agrupamento dentro dessas classificações. Desta forma, os aminoácidos determinados não podem ser utilizados como biomarcadores das diferentes formas de doença ou seu prognóstico, porém, podem ser usados para diagnóstico da ALS.

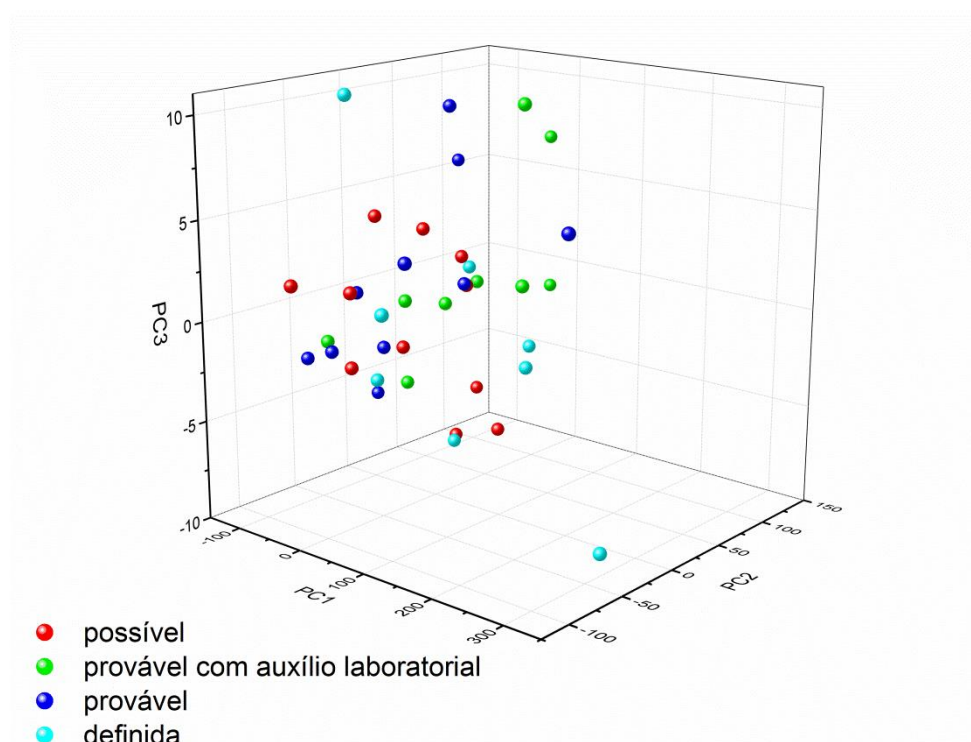


Fig. 33. Gráfico de escores mostrando o possível agrupamento entre as classificações de ALS.

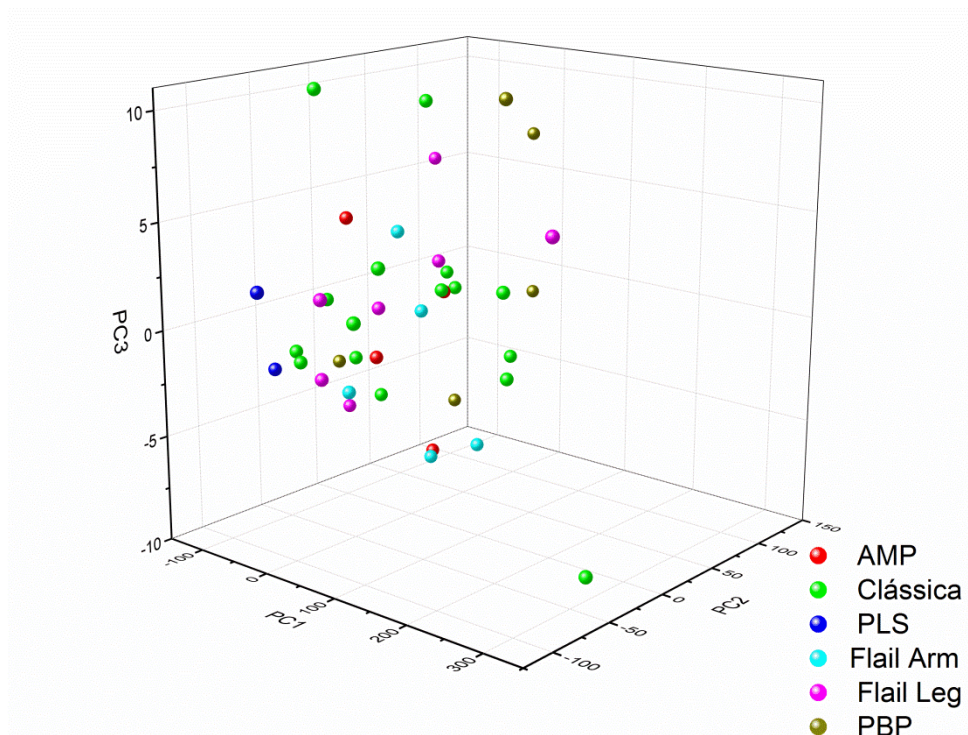


Fig. 34. Gráfico de escores mostrando o possível agrupamento entre as os subtipos de ALS. Legenda: AMP – Atrofia muscular progressiva; Clássica – ALS clássica; PLS – Esclerose lateral primária; PBP – Paralisia bulbar progressiva.

6.4. Conclusões parciais

Neste capítulo, as concentrações de aminoácidos Hcy, Cys, Glu e Met foram determinadas em plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com ALS. Os testes t de Student e Mann-Whitney foram aplicados para comparar os níveis plasmáticos de aminoácidos, revelando diferença significativa de concentração de Glu ($p = 0,0005$) e Cys ($p = 0,00217$) em plasma dos pacientes com ALS em comparação com indivíduos saudáveis. Não foi encontrada nenhuma correlação entre concentração de aminoácidos e idade ou progresso da doença. Os resultados obtidos por análise univariada foram confirmados também por análise multivariada, mostrando que existe diferença significativa entre a concentração de aminoácidos em pacientes com ALS e indivíduos saudáveis. Glu e Cys apresentaram as maiores influências na variância dos dados, conforme observado pelas curvas ROC e pelas análises por PCA, indicando a possibilidade de serem biomarcadores de diagnóstico da ALS.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES FINAIS

Neste trabalho, os aminoácidos Met, Glu, Hcy e Cys foram analisados em plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com ALS com finalidade de caracterizá-los como possíveis biomarcadores de ALS. Para isso, métodos de análise de aminoácidos por CE foram desenvolvidos, comparando três tipos de detecção: por absorção de radiação UV, C^4D e CE-MS/MS.

A derivatização dos aminoácidos Met, Glu, Hcy e Cys foi necessária nas análises por CE-UV, uma vez que esses analitos não absorvem a radiação UV. O FMOC foi escolhido como reagente derivatizante devido à sua rapidez de reação com os aminoácidos e seu baixo custo. Os aminoácidos Met, Glu, Hcy e Pro-OH (PI) derivatizados foram separados em 25 min no capilar com L_{eff} de 60 cm e i.d. de 50 μm , utilizando BGE composto por 50 mmol/L de borato e 40 mmol/L de SDS, pH 10,1. O LD para a Hcy nesse método foi de 63 $\mu mol/L$, que é maior do que a concentração que se espera encontrar no plasma, 9 $\mu mol/L$. Dessa forma, uma estratégia de pré-concentração dos aminoácidos se fez necessária.

Para poder pré-concentrar os aminoácidos Met, Hcy e Glu, microcartuchos de SPE foram acoplados à CE-UV *on-line*. Foram comparados vários tipos de sorventes vendidos comercialmente como fase sólida de SPE. Os sorventes a base polimérica se mostraram mais adequados para SPE-CE, devido à estabilidade da corrente durante a separação eletroforética e da maior capacidade em comparação aos sorventes a base de sílica. Pelo método SPE-CE-UV utilizando como sorvente HLB foi possível atingir valores de LD entre 39 (Met) e 75 nmol/L (Hcy), que resultou em um fator de pré-concentração de até 840 vezes (Hcy), em relação ao método CE-UV. Apesar da pré-concentração dos analitos, o método não foi aplicado para análise de aminoácidos em plasma, porque não foi possível separar Cys da Hcy.

Em busca da separação de Met, Glu, Hcy e Cys foi avaliado um outro tipo de detecção, a C^4D , que é universal e não requer a derivatização dos aminoácidos. Utilizando BGE contendo ácido acético 5 mol/L, foi possível separar todos os aminoácidos de interesse em 10 min. As amostras dissolvidas em mistura de acetonitrila e água 1:1 (v/v) foram injetadas hidrodinamicamente por 30 s e 11 kPa, levando à pré-concentração dos analitos por *stacking* e tITP devido à existência simultânea de solvente orgânico e sais presentes na matriz biológica. Os valores de

LD foram de 2,2 (Met) a 24,5 $\mu\text{mol/L}$ (Cys). Comparando as sensibilidades de curvas de calibração construídas em matriz biológica e em solvente, observou-se efeito matriz para análise de Glu. Desta forma, a análise de amostras reais seria possível somente pelo método de adição de padrões.

Devido a baixa seletividade e pouca informação sobre a identidade dos compostos provenientes dos detectores UV e C^4D , foram feitas também análises por CE-MS/MS, que possibilita a identificação inequívoca dos aminoácidos em plasma pelo modo SRM. Durante o desenvolvimento do método CE-MS/MS, foi observado que o tratamento de amostra de plasma pela precipitação das proteínas com acetonitrila se mostrou ineficaz para Hcy e Cys. Esses dois aminoácidos contêm o grupo tiol, que pode se ligar a proteínas, assim, eles são removidos juntos com as proteínas durante a precipitação. Testou-se, então, outro tipo de tratamento da amostra, incluindo a etapa de redução de ponte dissulfeto com DTT antes da precipitação com acetonitrila. Desta forma, foi possível detectar Hcy e Cys no plasma, porém, ainda foi necessário proteger o grupo tiol contra oxidação com IAA. Devido à alquilação de Met com IAA durante a derivatização, o método foi dividido em análise de Met e Glu após a precipitação com DTT e acetonitrila, e análise de Hcy e Cys após a redução com DTT, precipitação com acetonitrila e derivatização com IAA. O método de análise de aminoácidos por CE-MS/MS mostrou baixos valores de LD, de 35 (Hcy) a 268 nmol/L (Glu). As precisões intra-dia e inter-dia apresentaram CVs menores que 6% e de 11%, respectivamente, no nível médio de concentração para todos os aminoácidos.

O método CE-MS/MS foi aplicado para análise de aminoácidos em plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com ALS. Os testes t de Student e Mann-Whitney foram aplicados para comparar os níveis plasmáticos de Hcy, Cys, Met e Glu. Observou-se diferença significativa de concentração de Glu ($p = 0,0005$) e Cys ($p = 0,00217$) em plasma dos pacientes com ALS comparando com indivíduos saudáveis, porém, não foi encontrada nenhuma correlação entre concentração de aminoácidos e idade ou progresso da doença. As curvas ROC revelaram que Cys e Glu têm o maior potencial diagnóstico de ALS. Os níveis plasmáticos desses aminoácidos permitiram diferenciar entre os indivíduos saudáveis e pacientes com ALS com sensibilidade e especificidade de 65% e 75%, respectivamente, para Cys,

e 68% e 75%, respectivamente, para Glu. Além disso, as diferenças das concentrações de aminoácidos em plasma de pacientes com ALS foram encontradas também por análise multivariada (PCA). Os aminoácidos Glu e Cys apresentaram maiores pesos em PC1 e PC2, confirmando, assim, a possibilidade de serem biomarcadores de ALS.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS

- [1] “Facts You Should Know - The ALS Association,” disponível em <http://www.alsa.org/about-als/facts-you-should-know.html>. Acesso em fevereiro de 2016.
- [2] Matos, S. E. De, Conde, M. T. R. P., Fávero, F. M., Taniguchi, M., Quadros, A. A. J., Fontes, S. V., Oliveira, A. S. B., *Arq. Neuropsiquiatr.* 2011, 69, 861–866.
- [3] Moura, M., Casulari, L., Carvalho Garbi Novaes, M., *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 2016, 8421, 1–7.
- [4] Wijesekera, L. C., Nigel Leigh, P., *Orphanet J. Rare Dis.* 2009, 4, 1–22.
- [5] Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J. R., Zoing, M. C., *Lancet* 2011, 377, 942–955.
- [6] Ahmed, A., Wicklund, M. P., *Neurol. Clin.* 2011, 29, 689–711.
- [7] Yase, Y., *Lancet* 1972, 300, 292–296.
- [8] Giagheddu, M., Puggioni, G., Masala, C., Biancu, F., Pirari, G., Piras, M. R., Rachele, M. G., *Acta Neurol. Scand.* 1983, 68, 394–404.
- [9] Rosati, G., Pinna, L., Granieri, E., Aiello, I., Tola, R., Agnetti, V., Pirisi, A., Bastiani, P., *Acta Neurol. Scand.* 1977, 55, 231–244.
- [10] Granieri, E., Carreras, M., Tola, R., Paolino, E., Tralli, G., Eleopra, R., Serra, G., *Neurology* 1988, 38, 1604–1604.
- [11] Haley, R. W., *Neurology* 2003, 61, 750–756.
- [12] Kang, H. K., Bullman, T. A., *N. Engl. J. Med.* 1996, 335, 1498–1504.
- [13] Piazza, O., Sirén, A.-L., Ehrenreich, H., *Curr. Med. Res. Opin.* 2004, 20, 505–508.
- [14] Paganoni, S., Macklin, E. a, Lee, A., Murphy, A., Chang, J., Zipf, A., Cudkowicz, M., Atassi, N., *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* 2014, 15, 1–4.
- [15] Brooks, B. R., *J. Neurol. Sci.* 1994, 124, 96–107.
- [16] Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M., Munsat, T. L., *Amyotroph. Lateral Scler.* 2000, 1, 293–299.
- [17] De Carvalho, M., Dengler, R., Eisen, A., England, J. D., Kaji, R., Kimura, J., Mills, K., Mitsumoto, H., Nodera, H., Shefner, J., Swash, M., *Clin. Neurophysiol.* 2008, 119, 497–503.
- [18] Guennoc, a. M., Camu, W., Corcia, P., *Rev. Neurol. (Paris).* 2013, 169, 470–475.

- [19] Hulka, B. S., Griffith, J. D., Wilcosky, T. C., *Biological Markers in Epidemiology*, Oxford University Press, USA 1990.
- [20] Mayeux, R., *NeuroRx* 2004, 1, 182–188.
- [21] Naylor, S., *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2003, 3, 525–529.
- [22] Perera, F. P., Weinstein, I. B., *Carcinogenesis* 2000, 21, 517–524.
- [23] Wilson, M. E., Boumaza, I., Lacomis, D., Bowser, R., *PLoS One* 2010, 5, e15133.
- [24] Zetterberg, H., Jacobsson, J., Rosengren, L., Blennow, K., Andersen, P. M., *Eur. J. Neurol.* 2007, 14, 1329–1333.
- [25] Zhou, J.-Y., Afjehi-Sadat, L., Asress, S., Duong, D. M., Cudkowicz, M., Glass, J. D., Peng, J., *J. Proteome Res.* 2010, 9, 5133–5141.
- [26] Rozen, S., Cudkowicz, M. E., Bogdanov, M., Matson, W. R., Kristal, B. S., Beecher, C., Harrison, S., Vouros, P., Flarakos, J., Vigneau-Callahan, K., Matson, T. D., Newhall, K. M., Beal, M. F., Brown, R. H., Kaddurah-Daouk, R., *Metabolomics* 2005, 1, 101–108.
- [27] Blasco, H., Corcia, P., Moreau, C., Veau, S., Fournier, C., Vourc'h, P., Emond, P., Gordon, P., Pradat, P.-F., Praline, J., Devos, D., Nadal-Desbarats, L., Andres, C. R., *PLoS One* 2010, 5, e13223.
- [28] Wuolikainen, A., Moritz, T., Marklund, S. L., Antti, H., Andersen, P. M., *PLoS One* 2011, 6, e17947.
- [29] Zoccolella, S., Simone, I. L., Lamberti, P., Samarelli, V., Tortelli, R., Serlenga, L., Logroscino, G., *Neurology* 2008, 70, 222–225.
- [30] Selhub, J., *Annu. Rev. Nutr.* 1999, 19, 217–246.
- [31] Chung, Y. H., Hong, J.-J., Shin, C. M., Joo, K. M., Kim, M. J., Cha, C. I., *Brain Res.* 2003, 967, 226–234.
- [32] Levin, J., Bötzel, K., Giese, A., Vogeser, M., Lorenzl, S., *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2010, 29, 553–559.
- [33] Zhang, X., Chen, S., Li, L., Wang, Q., Le, W., *J. Neurol. Sci.* 2010, 293, 102–105.
- [34] Valentino, F., Bivona, G., Butera, D., Paladino, P., Fazzari, M., Piccoli, T., Ciaccio, M., La Bella, V., *Eur. J. Neurol.* 2010, 17, 84–89.
- [35] Ricci, C., Penco, S., Benigni, M., Mosca, L., Tarlarini, C., Lunetta, C., Giannini, F., Corbo, M., Battistini, S., *Neurobiol. Aging* 2012, 33, 208.e7–208.e8.

- [36] Sazci, A., Ozel, M. D., Emel, E., Idrisoglu, H. A., *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 2012, 16, 716–721.
- [37] Blasco, H., Mavel, S., Corcia, P., Gordon, P. H., *Curr. Med. Chem.* 2014, 21, 3551–3575.
- [38] Plaitakis, a, Caroscio, J. T., *Ann. Neurol.* 1987, 22, 575–579.
- [39] Rothstein, J. D., Tsai, G., Kuncl, R. W., Clawson, L., Cornblath, D. R., Drachman, D. B., Pestronk, a, Stauch, B. L., Coyle, J. T., *Ann. Neurol.* 1990, 28, 18–25.
- [40] Rothstein, J. D., Martin, L. J., Kuncl, R. W., *N. Engl. J. Med.* 1992, 326, 1464–1468.
- [41] Tavares, M. F. M., *Quim. Nova* 1996, 19, 173–181.
- [42] Jager, A. V., Tavares, M. F. M., *Quim. Nova* 2001, 24, 363–373.
- [43] Wuethrich, A., Quirino, J. P., *Electrophoresis* 2016, 37, 45–55.
- [44] Lee, Y.-H., Lin, T.-I., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 287–297.
- [45] Kuhn, R., Hoffstetter-Kuhn, S., *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Heidelberg 1993.
- [46] Da Silva, J. A. F., *Quim. Nova* 2003, 26, 56–64.
- [47] Samcova, E., Tuma, P., *Electroanalysis* 2006, 18, 152–157.
- [48] Coufal, P., Zuska, J., Goor, T. Van De, Smith, V., Gas, B., *Electroanalysis* 2003, 24, 671–677.
- [49] Assunção, N. A., Bechara, E. J. H., Simionato, A. V. C., Tavares, M. F. M., Carrilho, E., *Quim. Nova* 2008, 31, 2124–2133.
- [50] Ramautar, R., *Bioanalysis* 2016, 8, 371–374.
- [51] Ramautar, R., Somsen, G. W., de Jong, G. J., *Metabolomics in Practice*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2013, pp. 177–208.
- [52] Ramautar, R., Somsen, G. W., de Jong, G. J., *Electrophoresis* 2015, 36, 212–224.
- [53] Desiderio, C., Iavarone, F., Rossetti, D. V., Messana, I., Castagnola, M., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 2385–2393.
- [54] Britz-McKibbin, P., in: Alterman, A.M., Hunziker, P. (Eds.), *Amino Acid Analysis: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ 2012, pp. 83–99.

- [55] Rodrigues, K. T., Mekahli, D., Tavares, M. F. M., Van Schepdael, A., *Electrophoresis* 2016, 37, 1039–1047.
- [56] Ivanov, a. V., Luzyanin, B. P., Moskovtsev, a. a., Rotkina, a. S., Kubatiev, a. a., *J. Anal. Chem.* 2011, 66, 317–321.
- [57] Spudeit, D. A., Dolzan, M. D., Micke, G. A., *Sci. Chromatogr.* 2012, 4, 287–297.
- [58] Moraes, M. de L. L. de, Moraes, S. L. de, Pereira, E. A., Tavares, M. F. M., *Quim. Nova* 2009, 32, 1041–1046.
- [59] Chiu, T., *Anal Bioanal Chem* 2013, 405, 7919–7930.
- [60] Tempels, F. W. A., Ulderberg, W. J. M., Somsen, G. W., de Jong, G. J., *Electrophoresis* 2008, 29, 108–128.
- [61] Veraart, J. ., Lingeman, H., Brinkman, U. A. T., *J. Chromatogr. A* 1999, 856, 483–514.
- [62] Li, W., Fries, D., Alli, A., Malik, A., *Anal Chem* 2004, 76, 218–227.
- [63] Breadmore, M. C., *Anal. Chim. Acta* 2006, 556, 121–126.
- [64] Botello, I., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *Electrophoresis* 2012, 33, 528–535.
- [65] Chan, K. C., Janini, G. M., Muschik, G. M., Issaq, H. J., *J. Chromatogr. A* 1993, 653, 93–97.
- [66] Jámbor, A., Molnár-Perl, I., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 3064–3077.
- [67] “Chemicalize,” disponível em <http://www.chemicalize.org/>. Acesso em agosto de 2016
- [68] Tavares, M. F. M., *Quim. Nova* 1997, 20, 493–511.
- [69] “Human Metabolome Database,” disponível em <http://www.hmdb.ca/>. Acesso em agosto de 2016
- [70] “Oasis,” disponível em <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000109.pdf>. Acesso em julho de 2016
- [71] Zemmann, A. J., Schnell, E., Volgger, D., Bonn, G. K., *Anal. Chem.* 1998, 70, 563–567.
- [72] Fracassi da Silva, J. A., do Lago, C. L., *Anal. Chem.* 1998, 70, 4339–4343.

- [73] Brito-Neto, J. G. A., Fracassi da Silva, J. A., Blanes, L., do Lago, C. L., *Electroanalysis* 2005, 17, 1198–1206.
- [74] Carvalho, L. M. De, Spengler, C., Lima, A. P. S. De, Raabe, A., Martini, M., Nascimento, P. C. do, Bohrer, D., *Quim. Nova* 2009, 32, 2203–2208.
- [75] Kuban, P., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2004, 25, 3387–3397.
- [76] Tanyanyiwa, J., Schweizer, K., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2003, 24, 2119–2124.
- [77] Campos, C. D. M., Decampos Braga, P. A., Reyes, F. G. R., Dasilva, J. A. F., *J. Sep. Sci.* 2015, 38, 3781–3787.
- [78] Tůma, P., Opekar, F., Samcová, E., Štulík, K., *Electroanalysis* 2008, 20, 477–484.
- [79] Shihabi, Z., *Curr. Pharm. Anal.* 2006, 2, 9–15.
- [80] “Portal ANVISA” disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>. Acesso em julho de 2016
- [81] Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, T. P. E. M., *J. Chromatogr. A* 1979, 169, 11–20.
- [82] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Science (80-)*. 1983, 222, 266–272.
- [83] Mack, L. L., Kralik, P., Rheude, A., Dole, M., *J. Chem. Phys.* 1970, 52.
- [84] Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., Fenn, J. B., *Anal. Chem.* 1985, 57, 675–679.
- [85] Olivares, J. A., Nguyen, N. T., Yonker, C. R., Smith, R. D., *Anal. Chem.* 1987, 59, 1230–1232.
- [86] Schmitt-Kopplin, P., Frommberger, M., *Electrophoresis* 2003, 24, 3837–3867.
- [87] Ivanov, A. ., Nazimov, I. ., Baratova, L. ., *J. Chromatogr. A* 2000, 895, 167–171.
- [88] Guo, K., Li, L., *Anal. Chem.* 2009, 81, 3919–3932.
- [89] Jin, Y., Luo, G., Oka, T., Manabe, T., *Electrophoresis* 2002, 23, 3385–3391.
- [90] Landers, J. P., *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC Press 1996.
- [91] Fernandez, C., Santos, H. M., Ruiz-Romero, C., Blanco, F. J., Capelo-Martinez, J.-L., *Electrophoresis* 2011, 32, 2966–2974.

- [92] <http://agscientific.com/blog/index.php/2013/01/11/dithiothreitol-ddt-application-you-must-know/>. Acesso em agosto de 2016
- [93] Atherton, J. C., *Anaesth. Intensive Care Med.* 2003, 4, 419–422.
- [94] Cleland, W. W., *Biochemistry* 1964, 3, 480–482.
- [95] Hill, B. G., Reily, C., Oh, J., Johnson, M. S., Landar, A., *Free Radic Biol Med* 2009, 47, 675–683.
- [96] Hirs, C. H. W., *Methods Enzymol.* 1967, 11, 199–203.
- [97] Orsini, M., Freitas, M. R. G. De, Mello, M. P., Botelho, J. P., *Rev. Neurociências* 2008, 16, 144–151.
- [98] Maria, N., Vieira, F., Guerra, C. C., Teixeira, L. D. C., Bruno, L., Silva, D. C., Sordi, M., Mourão, L., Nucci, A., *Fisioter. e Pesqui.* 2009, 16, 316–322.
- [99] Hunter, D. J., Losina, E., Guermazi, A., Burstein, D., Lasserre, M. N., Kraus, V., *Curr. Drug Targets* 2010, 11, 536–545.
- [100] Xia, J., Sinelnikov, I. V., Han, B., Wishart, D. S., *Nucleic Acids Res.* 2015, 43, W251–W257.
- [101] Ghasemi, A., Zahediasl, S., *Int J Endocrinol Metab* 2012, 10, 486–489.
- [102] <http://www.portalaction.com.br/inferencia/64-teste-de-shapiro-wilk><http://www.portalaction.com.br/inferencia/64-teste-de-shapiro-wilk>. Acesso em agosto de 2016
- [103] Martinez, E. Z., Louzada-Neto, F., Pereira, B. de B., *Cad. Saúde Coletiva* 2003, 11, 7–31.
- [104] Hajian-Tilaki, K., *Casp. J. Intern. Med.* 2013, 4, 627–635.
- [105] Ringnér, M., Ringner, M., *Nat Biotechnol* 2008, 26, 303–304.

CAPÍTULO 9

ANEXO

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de biomoléculas de diferentes classes metabólicas como potenciais biomarcadores da esclerose lateral amiotrófica

Pesquisador: Zuzana Cieslarova

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 16434313.6.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 427.403

Data da Relatoria: 14/10/2013

Apresentação do Projeto:

A esclerose lateral amiotrófica (ALS) é uma doença neurodegenerativa fatal, causada basicamente pela perda progressiva dos neurônios motores do córtex cerebral, tronco encefálico e medula espinhal. Apesar de quase 90% dos casos da ALS serem esporádicos, sua etiologia é ainda pouco compreendida e os biomarcadores específicos para o diagnóstico da ALS não foram ainda estabelecidos. Neste projeto, pretende-se determinar os níveis plasmáticos de homocisteína, cisteína, metionina e 5-metiltetrahidrofolato, em pacientes em diferentes estágios de ALS e também em indivíduos saudáveis. Estas moléculas estão

envolvidas no metabolismo da homocisteína e algumas delas já foram propostas citadas como potenciais marcadores da ALS. No entanto, não existe nenhum estudo completo sobre a influência de concentrações desses metabólitos na progressão da doença.

Objetivo da Pesquisa:

- Identificar os metabólitos oriundos do metabolismo de homocisteína (e.g. homocisteína, cisteína, metionina e 5-metiltetrahidrofolato), através de eletroforese capilar, com detecção em UV-visível, em dois grupos de estudo: 1- portadores de esclerose lateral amiotrófica; 2- indivíduos saudáveis.
- Determinar as concentrações destes metabólitos no dois grupos de estudo.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 427.403

- Comparar os tipos e as concentrações dos metabólitos da homocisteína presentes nos dois grupos sob estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pacientes/voluntários foram submetidos, previamente, a simples e convencionais coletas de sangue, não havendo riscos adicionais à saúde dos mesmos. No presente projeto, deverão apenas confirmar sua anuência para utilização das amostras em método de análise adicional aos que já foram feitos. Não há benefícios diretos previsíveis para os sujeitos da pesquisa. Como benefícios sociais, obtidos através da ampliação de conhecimento na área, espera-se que os resultados do presente estudo possam contribuir para a identificação de marcadores de diagnóstico e de prognóstico, o que seria extremamente útil do ponto de vista clínico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores utilizarão amostras remanescentes de outros projetos de pesquisa, aprovados pelo CEP/UNICAMP. Não serão solicitadas amostras e procedimentos adicionais para nenhum paciente e, eventualmente, haverá contato dos pesquisadores com os pacientes apenas para concordância da utilização do material biológico para desenvolvimento de um novo método de análise.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Pesquisadores apresentaram, nesta versão, a folha de rosto com as assinaturas do pesquisador responsável e do superintendente do Hospital de Clínicas da Unicamp, sendo este o local de origem dos pacientes do estudo.

Foram apresentados ainda: projeto detalhado, formulário com informações básicas do projeto e TCLE reestruturado. Todos os documentos estão adequados e atendem à Resolução 466-2012, CNS/MS.

Adicionalmente, pesquisadores anexaram carta ao CEP, visando informar e responder às pendências emitidas em parecer anterior. Assim, autores esclareceram sobre riscos e benefícios relativos ao estudo, embora esta informação não tenha sido inserida no TCLE.

Esclareceram ainda que este projeto corresponde a uma extensão de projeto anteriormente aprovado por este CEP (parecer 277-2011), cabendo a este projeto o emprego da eletroforese capilar de amostras de plasma e, por isso, não requer nova coleta de sangue, mas a autorização adicional para estudo de biomarcadores propostos. Nesse sentido, autores mencionam conhecimento e familiaridade com a Resolução CNS441-2011, informando que não haverá

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 427.403

retenção de amostras para o presente projeto.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado sem restrições, após resolução de pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Cabe ao pesquisador desenvolver o projeto conforme delineado, elaborar e apresentar os relatórios parciais e final, bem como encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (Resolução 466/2012 CNS/MS).

CAMPINAS, 17 de Outubro de 2013

Assinador por:
Fátima Aparecida Bottcher Luiz
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br