UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

ELETROFORESE CAPILAR APLICADA AO DIAGNÓSTICO CLÍNICO

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
ALGUNS METABÓLITOS DE CONTROLE DO DIABETES MELLITUS

ALESSANDRA VINCENZI JAGER

Dissertação de mestrado

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^a Marina F. M. Tavares

SÃO PAULO
03/10/2000

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

J24e Jager, Alessandra Vincenzi
Eletroforese capilar aplicada ao diagnóstico clínico :
desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para alguns
metabólicos de controle do diabetes mellitus / Alessandra
Vincenzi Jager. -- São Paulo, 2000.
104p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Tavares, Marina Franco Maggi

1. Eletroforese capilar : Química analítica 2. Diabetes
mellitus : Medicina I. T. II. Tavares, Marina Franco Maggi,
orientador.

543.0871 CDD

**"Eletroforese Capilar Aplicada ao Diagnóstico Clínico.
Desenvolvimento e Aplicação de Métodos Analíticos
para Alguns Metabólitos de Controle do Diabetes
Mellitus".**

ALESSANDRA VINCENZI JAGER

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS - ÁREA: QUÍMICA ANALÍTICA

Aprovada por:

Profa. Dra. MARINA FRANCO MAGGI TAVARES
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. CLAUDIMIR LÚCIO DO LAGO
IQ - USP

Profa. Dra. DULCINEIA SAES PARRA ABDALLA
FCF - USP

SÃO PAULO
3 DE OUTUBRO DE 2000.

“... mas é preciso ter manha, é preciso ter graça, é preciso ter sonho sempre, quem traz na pele essa marca possui a estranha mania de ter fé na vida.”

Milton Nascimento

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Marina Tavares pela orientação, dedicação, compreensão e apoio, fundamentais para o meu aprendizado

À minha mãe pela demonstração de força e coragem

Aos amigos e familiares que muitas vezes sem saber me ajudaram a superar os momentos mais difíceis

À Elena do Hospital Albert Einstein e Ari do Laboratório Campana pelo fornecimento de amostras

Ao Magnanelli do Hemocentro de São Paulo pelo empréstimo do equipamento, sem o qual o término de parte deste projeto não teria sido possível

Aos colegas de grupo Clóvis 'Clayton', Elisabete 'Cristina', Elizabeth 'Eduarda', Fabiana 'Patrícia', Gustavo 'José', Lourdes 'Amélia', Marccone 'Aurelium', Neide 'Aparecida' e ao Wilson, por agüentarem a Alessandra 'Maria'

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE SÍMBOLOS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE GRÁFICOS.....	xiii
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xvi
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1 Diabetes mellitus.....	2
I.1.1 Metabólitos de Interesse Clínico.....	4
I.1.1.1 Glicose.....	4
I.1.1.2 Corpos cetônicos.....	6
I.1.1.3 Uréia.....	8
I.1.1.4 “Anion gap”.....	10
I.1.1.5 Hemoglobina glicada.....	12
I.1.1.6 Insulina e peptídeo-C.....	16
I.2 Eletroforese capilar.....	18
I.2.1 Princípio de separação.....	21
I.2.2 Modos da eletroforese capilar.....	23
I.2.2.1 Eletroforese capilar em solução livre (FSCE).....	24
I.2.2.2 Focalização isoeletrica capilar (cIEF).....	28
I.3 Referências bibliográficas.....	34
II. OBJETIVOS.....	36
III. DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE.....	38
III.1 Equipamento e materiais.....	39
III.2 Potássio e sódio.....	40
III.3 Cloreto e bicarbonato.....	45
III.5 Hemoglobinas glicadas.....	52
III.6 Resumo dos procedimentos dos métodos de análise desenvolvidos.....	57
III.6.1 Sódio e potássio.....	57
III.6.2 Cloreto e bicarbonato.....	58
III.6.3 Acetoacetato, lactato e β -hidroxibutirato.....	58
III.6.4 Hemoglobina glicada.....	58
III.7 Referências bibliográficas.....	60
IV. APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE DESENVOLVIDOS.....	62
IV.1 Sódio, potássio, cloreto, bicarbonato, acetoacetato, lactato e β -hidroxibutirato.....	63
IV.1.1 Linearidade.....	63
IV.1.3 Análise de soro controle.....	76
IV.1.4 Análise das amostras reais.....	81
IV.2 Hemoglobinas glicadas.....	83
IV.2.1 Análise de amostras de hemolisado.....	83
IV.2.2 ANOVA.....	86
IV.3 Referências bibliográficas.....	91
V. DISCUSSÃO.....	92

V.1 Sódio, potássio, cloreto, bicarbonato, acetoacetato, lactato e β -hidroxibutirato	93
V.2 Hemoglobina glicada	97
V.3 Referências Bibliográficas	101
VI. CONCLUSÃO.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS

β -HB	ácido beta-hidroxibutírico
AcAc	acetoacetato
ANOVA	“One-way analysis of variance”
C.V.	coeficiente de variação
– CE	eletroforese capilar
cIEF	focalização isoeletrica capilar
CoA	coenzima A
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
d.i.	diâmetro interno
DB-1	revestimento de dimetilpolisiloxano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EIA	Imunoensaio enzimático
FSCE	Eletroforese capilar em solução livre
GLDH	Glutamato desidrogenase
Hb	hemoglobina
HbA	hemoglobina A
HbA _{1c}	hemoglobina A _{1c}
HbA ₂	hemoglobina A ₂
HbC	hemoglobina C
HbF	hemoglobina Fetal
HbS	hemoglobina S
HIBA	ácido hidroxibutírico
HPCE	eletroforese capilar de alta eficiência
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IEMA	ensaio imunoenzimométrico
LD	lactato desidrogenase
LIAI	inibição por imunoaglutinação ao látex
LO	lactato oxidase
MEIA	imunoensaio de micropartículas de enzima
NIH	National Institutes of Health

OMS	Organização Mundial de Saúde
P _{CO2}	pressão parcial de CO ₂
pl	ponto isoelétrico
RIA	radioimunoensaio
TINIA	imunoensaio por inibição turbidimétrica
v	volume

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	comprimento de onda
μm	micrômetro
cm	centímetro
E	campo elétrico
kV	quilovolt
min	minuto
nm	nanômetro
°C	grau Celsius
psi	“pressure square inch”
s	segundo

LISTA DE FIGURAS

FIGURA I.1. - Formação dos corpos cetônicos.....	6
FIGURA I.2. - Estrutura da molécula de hemoglobina	12
FIGURA I.3. - Formação da base de Schiff para produzir a HbA _{1c}	13
FIGURA I.4. - Seqüência de aminoácidos da pré-pró-insulina.....	17
FIGURA I.5. - Esquema de um sistema de eletroforese capilar.....	18
FIGURA I.6. - Representação do fluxo eletroosmótico e da migração eletroforética no interior de um capilar.....	22
FIGURA I.7. - Representação da inversão do fluxo eletroosmótico pela adição de uma amina quaternária.....	26
FIGURA I.8. - Preenchimento do capilar com solução de anfólito.....	30
FIGURA I.9. - Injeção da amostra por pressão.....	30
FIGURA I.10. - Etapa de focalização em cIEF.....	31
FIGURA I.11. - Mobilização por pressão em cIEF.....	31
FIGURA I.12. - Mobilização química em cIEF.....	33
FIGURA III.1. - Eletroferograma de soro liofilizado, diluído 1:50 v/v. Eletrólito: 10,0 mmol/L imidazol, 5,0 mmol/L HIBA, 1,0 mmol/L éter 18-coroa-6, pH 4,50.....	43
FIGURA III.2. - Eletroferograma de soro liofilizado diluído 1:50 v/v. Eletrólito: 15,0 mol/L imidazol, 5,0 mmol/L ácido láctico, 1,0 mmol/L éter 18-coroa-6, pH 4,50.....	44
FIGURA III.3. - Eletroferograma de soro liofilizado diluído 1:20 v/v. Eletrólito: 5,0 mmol/L cromato de sódio, 0,10 mmol/L CTAB, pH 8,50.....	46
FIGURA III.4. - Eletroferograma de amostra de soro humano diluído 1:20. Eletrólito: 5,0 mmol/L cromato de sódio, 0,1 mmol/L CTAB, pH 9,00.....	47

FIGURA III.5. - Eletroferograma de soro humano. Eletrólito: 15,0 mmol/L ácido 3,5 dinitrobenzóico, 0,10 mmol/L CTAB, pH 3,50.....	50
FIGURA III.6. - Eletroferograma de soro humano. Eletrólito: 10,0 mmol/L hidrogenoftalato de potássio, 0,10 mmol/L CTAB, pH 3,50.....	51
FIGURA III.7. - Análise de hemoglobinas em hemolisado por cIEF com mobilização por pressão.....	53
FIGURA III.8. - Análise de hemoglobinas em hemolisado por cIEF com mobilização química.....	55
FIGURA III.9. - Análise de mistura de hemoglobinas por cIEF.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA I.1	- Métodos de análise de glicose.....	5
TABELA I.2	- Métodos para análise de corpos cetônicos.....	7
TABELA I.3	- Métodos de análise de lactato.....	8
TABELA I.4	- Métodos de análise de uréia.....	9
TABELA I.5	- Métodos de análise de cloreto.....	11
TABELA I.6	- Métodos de análise para sódio e potássio.....	11
TABELA I.7	- Hemoglobinas humanas normais.....	13
TABELA I.8	- Métodos de análise para hemoglobinas glicadas.....	15
TABELA I.9	- Características da eletroforese capilar.....	19
TABELA III.1	- Valores de pl das hemoglobinas analisadas.....	56
TABELA IV.1	- Valores de referência para os metabólitos estudados em soro humano de indivíduos sadios.....	63
TABELA IV.2	- Valores médios de tempo de migração, área, altura e respectivos coeficientes de variação obtidos nas repetições de determinação para o potássio.....	72
TABELA IV.3	- Valores médios de tempo de migração, área, altura e respectivos coeficientes de variação obtidos nas repetições de determinação para o sódio.....	72
TABELA IV.4	- Valores médios de tempo de migração, área, altura e respectivos coeficientes de variação obtidos nas repetições de determinação para o cloreto.....	73
TABELA IV.5	- Valores médios de tempo de migração, área, altura e respectivos coeficientes de variação obtidos nas repetições de determinação para o bicarbonato.....	73
TABELA IV.6	- Valores médios de tempo de migração, área, altura e respectivos coeficientes de variação obtidos nas repetições de determinação para o acetoacetato.....	74

TABELA IV.7 - Valores médios de tempo de migração, área, altura e respectivos coeficientes de variação obtidos nas repetições de determinação para o lactato.....	74
TABELA IV.8 - Valores médios de tempo de migração, área, altura e respectivos coeficientes de variação obtidos nas repetições de determinação para β -hidroxibutirato.....	75
TABELA IV.9 - Coeficientes de correlação das curvas de calibração dos metabólitos analisados.....	75
TABELA IV.10 - Concentrações dos analitos no soro controle (Control-serum N - Human – Roche) fornecidas pelo fabricante	76
TABELA IV.11 - Resultados das análises de potássio, sódio, cloreto e lactato no soro controle calculados pela área e altura do pico.....	78
TABELA IV.12 - Resultados da análise de acetoacetato e β -hidroxibutirato.....	79
TABELA IV.13 - Resultados do teste t para os metabólitos analisados no soro controle.....	80
TABELA IV.14 - Resultado das análises de sódio, potássio, cloreto, bicarbonato, “anion-gap”, acetoacetato, lactato e β -hidroxibutirato das amostras de soro humano.....	82
TABELA IV.15 - Resultados das análises de hemoglobinas glicadas por cIEF	83
TABELA IV.16 - Resultados dos cálculos de erro, limite de confiança e teste t para a curva de correlação entre os métodos cIEF e Variant (Bio-Rad).....	86
TABELA IV.17 - Resultados de concentração das análises de hemoglobina utilizados no método ANOVA.....	87
TABELA IV.18 - Resultados calculados pelo método ANOVA para as concentrações de hemoglobina glicada.....	88
TABELA IV.19 - Resultados de tempo de migração das análise utilizados no cálculo ANOVA.....	89

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO III.1	- Mobilidade efetiva em função do pH de alguns ânions orgânicos presentes no soro humano.....	48
GRÁFICO III.2	- Ponto isoelétrico de hemoglobinas normais e variantes em função do tempo de migração.....	56
GRÁFICO IV.1	- Área do pico em função da concentração de potássio na mistura padrão.....	65
GRÁFICO IV.2	- Altura do pico em função da concentração de potássio na mistura padrão.....	65
GRÁFICO IV.3	- Área do pico em função da concentração de sódio na mistura padrão.....	66
GRÁFICO IV.4	- Altura do pico em função da concentração de sódio na mistura padrão.....	66
GRÁFICO IV.5	- Área do pico em função da concentração de cloreto na mistura padrão.....	67
GRÁFICO IV.6	- Altura do pico em função da concentração de cloreto na mistura padrão.....	67
GRÁFICO IV.7	- Área do pico em função da concentração de bicarbonato na mistura padrão.....	68
GRÁFICO IV.8	- Altura do pico em função da concentração de bicarbonato na mistura padrão.....	68
GRÁFICO IV.9	- Área do pico em função da concentração de acetoacetato na mistura padrão.....	69
GRÁFICO IV.10	- Altura do pico em função da concentração de acetoacetato na mistura padrão.....	69
GRÁFICO IV.11	- Área do pico em função da concentração de lactato na mistura padrão.....	70
GRÁFICO IV.12	- Altura do pico em função da concentração de lactato na mistura padrão.....	70

GRÁFICO IV.13 - Área do pico em função da concentração de β -hidroxibutirato na mistura padrão.....	71
GRÁFICO IV.14 - Área do pico em função da concentração de cloreto na mistura padrão.....	71
GRÁFICO IV.15 - Correlação entre os resultados de concentração de hemoglobina glicada analisada por cIEF e o método Variant (Bio-Rad).....	85

RESUMO

O *diabetes mellitus* não é uma doença única, mas um conjunto de doenças que exibem como característica a intolerância à glicose, resultante da deficiência na secreção ou na ação do hormônio pancreático, a insulina, produzindo severas anormalidades no metabolismo. As dosagens bioquímicas de alguns metabólitos específicos no sangue e urina são indicadores importantes do estado metabólico do indivíduo diabético e, são usadas tanto no diagnóstico da doença como na avaliação do tratamento. Métodos analíticos para alguns metabólitos de controle do *diabetes mellitus*, entre eles sódio, potássio, cloreto, bicarbonato, acetoacetato, lactato, β -hidroxibutirato em soro humano e hemoglobina glicada em sangue total, foram desenvolvidos utilizando a eletroforese capilar como técnica única de análise. Os métodos para a análise simultânea de sódio e potássio, cloreto e bicarbonato, acetoacetato, lactato e β -hidroxibutirato foram desenvolvidos por eletroforese capilar em solução livre e detecção indireta. Estudos de seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e aplicação dos métodos a amostras reais foram realizados. Os resultados mostraram a possibilidade de aplicação dos métodos a amostras de soro humano, com resultados analíticos equivalentes a métodos de referência para os metabólitos sódio, potássio, cloreto e lactato. A focalização isoeletrica capilar foi utilizada no desenvolvimento do método de análise para a hemoglobina glicada. O método desenvolvido foi aplicado à análise de 31 amostras de hemolisado e os resultados comparados a um método de referência que utiliza cromatografia líquida de alta eficiência. A comparação de métodos apresentou boa correlação, e estudos estatísticos indicaram boa precisão inter e intra-ensaio e estabilidade na preservação da amostra. Resolução completa de hemoglobinas com diferença de ponto isoeletrico de 0,03 foi obtida, além da possibilidade de análise de hemoglobinas variantes, como a S e C.

SUMMARY

Diabetes Mellitus is considered a class of diseases that exhibits a sole characteristic: intolerance to glucose. This condition results from a deficiency in the secretion or action of a pancreatic hormone, the insulin, causing severe metabolic disorders. Typically, high levels of glucose are found in blood, in addition to excessive production of the so called ketonic bodies (pyruvic, acetoacetic acids, acetone and the reduced forms: lactic and β -hydroxybutyric acids). The increase in production of ketonic bodies causes an imbalance in the anion gap, given by the expression: $[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] - [\text{Cl}^-] - [\text{HCO}_3^-]$. In addition to these metabolites, an amount of glycosilated hemoglobin (HbA_{1c}) is formed. HbA_{1c} can be used as indicative of the glucose concentration in the blood during the period of time red cells have been exposed to. For clinical diagnostics, each of the ions of the anion gap, the ketonic bodies and HbA_{1c} are determined by isolated methodologies. In this work, capillary electrophoresis was explored as a single analytical technique for the evaluation of sodium, potassium, chloride, bicarbonate, acetoacetate, lactate, β -hydroxybutyrate and HbA_{1c} . The ionic species were determined by free solution capillary electrophoresis with indirect detection while HbA_{1c} was evaluated by capillary isoelectric focusing. The proposed methodologies were validated for sodium, potassium, chloride and lactate, with respect to the following parameters: selectivity, sensitivity, linearity, precision and accuracy showing equivalent results when compared to standard methods applied to control samples. All proposed methodologies were applied to the quantitative analysis of real samples (serum and hemolysate of diabetic and non-diabetic individuals). In addition, HbA_{1c} determinations were contrasted to a chromatographic procedure adopted in a clinical laboratory, showing good correlation (31 samples). Baseline resolution of hemoglobins with pI differing by 0.03 units was achieved, and the possibility of simultaneous analysis of variant hemoglobins, such as S and C was also demonstrated.

I. INTRODUÇÃO

I.1 Diabetes mellitus

Dados recentes mostram que existem cerca de 140 milhões de pessoas que sofrem de *diabetes mellitus* no mundo todo, e que este número pode dobrar no ano de 2025, projetando o diabetes como uma das doenças que mais mata e incapacita. A maior parte deste aumento ocorrerá em países desenvolvidos e está relacionado com os maus hábitos da vida moderna, como o sedentarismo, o estresse, e as dietas repletas de gorduras.¹

Os custos diretos do diabetes para os sistemas de saúde incluem hospitais, serviços médicos, testes de laboratório e produtos como insulina, seringas e agentes hipoglicêmicos de administração oral.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), somente a prevenção através da educação e um estilo de vida sadio, assim como o tratamento adequado no início do desenvolvimento do diabetes, são medidas realmente efetivas, e podem melhorar drasticamente a qualidade de vida do diabético.

Quarta causa de morte no mundo, o diabetes mata quase 3 milhões de pessoas por ano. No Brasil, dos 9 milhões de diabéticos, apenas metade sabe que está doente. Deles, 23% não se tratam. O resultado é que o país perde 24000 vidas por ano por causa do diabetes.¹

Pesquisas médicas têm demonstrado que o *diabetes mellitus* não é uma doença única, mas um conjunto de doenças que exibem como característica única a intolerância à glicose, resultante da deficiência na secreção ou na ação do hormônio pancreático, a insulina, produzindo severas anormalidades no metabolismo.²

Do ponto de vista de metabolismo, existe uma super-produção de glicose pelo fígado e uma sub-utilização da mesma pelos demais órgãos, gerando um estado de hiperglicemia, útil no diagnóstico da doença. A falha do controle da insulina sobre a disponibilidade e estocagem da glicose provoca uma dependência no metabolismo dos triglicéridos como fonte de combustível, e das proteínas, como fontes dos precursores da glicose. Portanto, em jejum, o diabético pode ter um alto nível de ácidos graxos e

cetonas no sangue. Após uma refeição, a liberação da glicose hepática no diabético não é inibida. Este fato, combinado com a diminuição na produção ou ação da insulina resulta em um aumento anormal de glicose no sangue. Em resumo, o metabolismo de carboidratos em diabéticos é similar ao metabolismo dos indivíduos normais em estado de jejum. Em ambos os casos o metabolismo dos ácidos graxos substitui o metabolismo da glicose-6-fosfato como principal fonte de energia da célula.

Em 1979, o instituto americano, National Institutes of Health (NIH), estabeleceu um esquema de classificação da *diabetes mellitus* e outros tipos de intolerância à glicose baseado no atual conhecimento da bioquímica da doença, a saber:

Diabetes Tipo I:	causada pela deficiência na produção de insulina; dependência da injeção de insulina para controle do metabolismo da glicose; propensão à cetoacidose; pacientes menores de 40 anos.
Diabetes Tipo II:	não tem relação com os níveis de insulina; não há propensão à cetoacidose; geralmente pacientes obesos, acima de 40 anos.
Diabetes Secundária:	causada por doenças diversas no pâncreas e fígado, e doenças relacionadas com o uso de certos medicamentos e drogas.
Intolerância anormal:	reposta anormal ao teste de tolerância à glicose, dando resultados intermediários entre o nível normal (800-900 mg/L) e o nível do diabético (1100-1400 mg/L)
Diabetes Gestacional:	ocorre temporariamente durante a gravidez.

I.1.1 Metabólitos de Interesse Clínico

As dosagens bioquímicas de componentes específicos do sangue e urina funcionam como indicadores importantes do estado metabólico do indivíduo e são usadas tanto no diagnóstico de doenças como na avaliação do tratamento.

I.1.1.1 Glicose³

Os sintomas característicos do diabetes são sede excessiva, levando à ingestão de grandes volumes de água (polidipsia), e freqüente micção (poliúria). Estas alterações são devidas à excreção de grandes quantidades de glicose na urina, uma condição conhecida como glicosúria. O termo *diabetes mellitus* significa “excreção excessiva de urina doce”. No *diabetes mellitus* severo, não controlado, a quantidade de glicose na urina pode exceder 100 g por 24 h, enquanto que nos indivíduos normais apenas traços de glicose são excretados. O grande volume de urina no diabetes reflete a necessidade do rim de excretar uma certa quantidade de água junto com a glicose, pois a capacidade do rim em concentrar os solutos na urina tem um limite máximo. A dosagem da quantidade de glicose excretada na urina num período de 24 horas é um dos testes diagnósticos para o diabetes.

Mais revelador é o nível da glicose sangüínea e a maneira pela qual ele responde à ingestão da glicose (teste de tolerância oral à glicose). Os diabéticos usualmente possuem uma concentração de glicose no sangue anormalmente alta, condição chamada de hiperglicemia. No diabetes muito severo, não controlado, o nível sangüíneo da glicose pode estar muito elevado, até 100 mmol/L, ou seja 25 vezes mais do que a concentração normal de cerca de 4 mmol/L.

A hiperglicemia e glicosúria refletem uma outra alteração no metabolismo do diabetes mellitus: a quase completa cessação da conversão do excesso de glicose em ácidos graxos, para serem armazenados como triacilgliceróis. Diabéticos severos podem perder peso, mesmo se o

conteúdo calórico da dieta for alto, pois ao invés de ser armazenado como gordura, o excesso de glicose é excretado na urina.

A tabela I.1 apresenta o resumo dos métodos de análise de glicose mais comuns.

TABELA I.1 – MÉTODOS DE ANÁLISE DE GLICOSE

MÉTODO	PRINCÍPIO DE ANÁLISE
1. Glicose oxidase (consumo de oxigênio)	$\text{Glicose} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{ácido glucônico} + \text{H}_2\text{O}_2$ O consumo de O_2 é medido polarograficamente.
2. Glicose oxidase acoplada com reação enzimática ("Trinder")	$\text{Glicose} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{ácido glucônico} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{indicador reduzido} \longrightarrow \text{indicador oxidado (colorido)} + \text{H}_2\text{O}$
3. Hexoquinase acoplada com reação enzimática	$\text{Glicose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Glicose-6-fosfato} + \text{ADP}$ $\text{Glicose-6-fosfato} + \text{NADP}^+ \longrightarrow \text{6-fosfogluconato} + \text{NADPH} + \text{H}^+$ Aumento de absorbância a 340 nm, devido ao aumento na concentração de NADPH, está diretamente relacionada com a concentração de glicose.

FONTE: adaptada da referência 3

I.1.1.2 Corpos cetônicos

Uma outra alteração metabólica característica do diabetes é a oxidação incompleta dos ácidos graxos no fígado, resultando na produção excessiva dos corpos cetônicos. Os corpos cetônicos no soro incluem acetoacetato, acetona e β -hidroxibutirato.

A figura I.1 apresenta um esquema simplificado da formação dos corpos cetônicos. A acetil coenzima A (acetil CoA) formada na oxidação dos ácidos graxos é consumida pelo ciclo do ácido cítrico quando a degradação de carboidratos e gordura está balanceada. Entretanto, se a oxidação dos ácidos graxos predomina, ocorre formação de quantidade excessiva de acetil CoA, que é metabolizada para a formação de acetoaceto, β -hidroxibutirato e acetona.³

FIGURA I.1. Formação dos corpos cetônicos

A acetona resulta da descarboxilação espontânea do acetoacetato e está presente no hálito dos diabéticos, aos quais confere um odor

característico. Um diabético em coma é ocasionalmente confundido com um bêbado por causa do odor da acetona no hálito. A super-produção de corpos cetônicos, conhecida como cetose, é identificada pelo aparecimento de concentrações elevadas no sangue (cetonemia) e na urina (cetonúria).

O descontrole do metabolismo dos carboidratos e gorduras também provoca o aumento da concentração de piruvato e lactato.

As tabelas I.2 e I.3 apresentam um resumo dos principais métodos de análise para os corpos cetônicos e ácido láctico respectivamente.

TABELA I.2 – MÉTODOS PARA ANÁLISE DE CORPOS CETÔNICOS

MÉTODO	ANALITO	PRINCÍPIO
1. Colorimétrico	Acetoacetato, acetona	$\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} + \text{acetona/acetoacetato} \rightarrow \text{cor púrpura}$
2. Enzimático	AcAc, β -HB	$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{AcAc} \xrightleftharpoons[\text{pH 8.5 - 9.5}]{\text{pH 7.0, } \beta\text{-hidroxibutirato desidrogenase}} \beta\text{-HB} + \text{NAD}^+$ O decréscimo da absorbância causada pelo consumo de NADH é monitorado a 340 nm.
3. Cromatografia gasosa	Acetona, AcAc, β -HB	Acetona é detectada por detector de ionização em chama; Acetoacetato é estimado pela medida da acetona antes e depois do aquecimento da amostra. O acetoacetato é convertido em acetona pelo aquecimento.
4. Eletroforese capilar	β -HB	Separação eletroforética de β -HB.

FONTE: adaptada da referência 3

NOTA: AcAc, acetoacetato; β -HB, ácido β -hidroxibutírico.

TABELA I.3 – MÉTODOS DE ANÁLISE DE LACTATO

MÉTODO	PRINCÍPIO
1.Enzimático	$\text{Lactato} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{LD}} \text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+$ A formação de NADH pode ser monitorada a 340 nm.
2.Biosensor enzimático	$\text{Lactato} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{LO}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Piruvato}$ $\text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + \text{O}_2 + 2\text{e}^-$ A corrente medida é proporcional à concentração de H_2O_2.
3.Eletroquímico	$\text{Lactato} + 2 \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} \longrightarrow \text{Piruvato} + 2\text{H}^+ + 2 \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ $2 \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} \xrightarrow[\text{Eletrodo de Pt}]{} 2 \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} + 2\text{e}^-$ O ferrocianeto é oxidado no eletrodo de platina, e a corrente gerada é proporcional à concentração de ferrocianeto formado na reação anterior.

FONTE: adaptada da referência 3

NOTA: LD, lactato desidrogenase; LO, lactato oxidase.

I.1.1.3 Uréia

Uma outra característica do diabetes severo é uma excreção elevada de uréia, principal produto de excreção nitrogenada da degradação oxidativa de aminoácidos. A quantidade de uréia excretada por dia é uma medida da quantidade total de aminoácidos degradada oxidativamente, que por sua vez reflete o balanço entre a ingestão e a quebra diária normal das proteínas do organismo. A concentração de uréia no sangue do diabético pode ser tão alta quanto 25 mmol/L ou cerca de 5 vezes maior que o valor normal de 5 mmol/L.³

A degradação oxidativa excessiva dos aminoácidos nos diabéticos reflete um grande aumento na taxa de neoglicogênese a partir dos aminoácidos. Na ausência de insulina, o fígado tende a lançar glicose no sangue. Em consequência, os estoques do glicogênio são muito mais baixos e todos os aminoácidos disponíveis capazes de produzir carbono para a neoglicogênese são degradados, a fim de formar mais glicose sangüínea. Desta forma, a dosagem de uréia no sangue e na urina fornece valiosas informações sobre o estado metabólico dos pacientes diabéticos.

Os métodos mais comuns de análise de uréia são apresentados na tabela I.4.

TABELA I.4 – MÉTODOS DE ANÁLISE DE URÉIA

MÉTODO	PRINCÍPIO
1. Enzimático acoplado	$\text{Uréia} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Urease}} 2\text{NH}_4^+ + \text{CO}_3^{2-}$ $\text{NH}_4^+ + \text{ácido } \alpha\text{-cetoglutárico} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{GLDH}} \text{ADP} + \text{H}^+ + \text{NAD}^+ + \text{ácido glutâmico}$ A reação indicadora, empregando a enzima GLDH, é utilizada para medir a concentração de NH_4^+ formado.
2. Indicador ácido-base	$\text{Uréia} \xrightarrow{\text{Urease}} 2\text{NH}_4^+ + \text{CO}_3^{2-}$ $\text{NH}_3 + \text{pH indicador} \rightarrow \text{mudança no espectro de absorção do indicador}$
3. Condutométrico	$\text{Uréia} \xrightarrow{\text{Urease}} 2\text{NH}_4^+ + \text{CO}_3^{2-}$ Aumento da condutividade devido a formação de carbonato de amônio

FONTE: adaptada da referência 3

NOTA: GLDH, glutamato desidrogenase.

I.1.1.4 “Anion gap”

Uma medida do balanço de eletrólitos no organismo é obtida pela expressão:

$$\text{“Anion gap”} = [\text{Na}^+] + [\text{K}^+] - [\text{Cl}^-] - [\text{HCO}_3^-]$$

Normalmente, em indivíduos sadios, existe um aparente excesso de cátions, uma vez que a fórmula acima desconsidera outros ânions presentes no organismo, como fosfato, lactato, sulfato, etc. No diabético, com o aumento da produção de corpos cetônicos, o balanço ácido-base é ainda mais descompensado, gerando também uma séria diminuição do pH sangüíneo e perda da capacidade tamponante do sangue, condição conhecida como acidose.

Em média, o “anion gap” é estimado em aproximadamente 12 mEq/L. A cetoacidose diabética é a causa mais comum da alteração pronunciada deste valor. A administração de insulina, para corrigir a deficiência endócrina, e a administração de bicarbonato de sódio para corrigir a capacidade tamponante do sangue pode trazer toda a química do organismo de volta ao normal dentro de 12 a 24 horas. Para seguir o curso de tal tratamento, as dosagens de glicose, pH e CO_2 sangüíneo são realizadas freqüentemente.²

As medidas de pH e P_{CO_2} (pressão parcial de CO_2) são usualmente realizadas com eletrodos seletivos, e a partir dos valores obtidos, a concentração de bicarbonato é calculada pela equação I.1:

$$\text{HCO}_3^- = [\alpha \text{P}_{\text{CO}_2}] \text{ antilog } [\text{pH} - \text{pK}'_a] \quad (\text{I.1})$$

onde o pK'_a está relacionado ao equilíbrio entre o CO_2 dissolvido e o HCO_3^- , cujo valor no plasma humano é 6,1 a 37 °C.⁴

A tabela I.5 apresenta os métodos de análise de cloreto e a tabela I.6 apresenta os métodos de análise para sódio e potássio empregados com maior freqüência.

TABELA I.5 – MÉTODOS DE ANÁLISE DE CLORETO

MÉTODO	PRÍNCÍPIO
1. Tiitulação coulométrica	$\text{Ag}^+ + \text{Cl}^- \longrightarrow \text{AgCl} \downarrow$ Os íons pratas são gerados através da reação de um dos eletrodos. O ponto final é detectado amperometricamente pelo aumento da concentração de íons Ag^+ livres, que ocorre após todo o consumo de Cl^-.
2. Eletrodo íon seletivo	$\text{Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)} \text{ e } \text{Cl}^- + \text{AgCl}/\text{Ag}_{(s)}$ solução teste eletrodo de referência

FONTE: adaptada da referência 3

TABELA I.6 – MÉTODOS DE ANÁLISE PARA SÓDIO E POTÁSSIO

MÉTODO	PRÍNCÍPIO
1. Espectroscopia de emissão atômica em chama	Átomos excitados emitem fótons
2. Eletrodo íon seletivo	O eletrodo íon seletivo mede a mudança potenciométrica em função da concentração do íon.

FONTE: adaptada da referência 3

I.1.1.5 Hemoglobina glicada

FIGURA I.2. Estrutura da molécula de hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é um pigmento avermelhado, transportador de oxigênio, encontrado nos glóbulos vermelhos. Estruturalmente, a hemoglobina é um tetrâmero globular, consistindo de dois pares de cadeias peptídicas de seqüência distinta, denominadas globinas (Figura I.2). Cada cadeia carrega um derivado da porfirina contendo ferro, chamado de grupo heme, no qual o átomo de ferro é ligado à cavidade central do macrociclo. As cadeias polipeptídicas são designadas por letras gregas α (alfa), β (beta), γ (gama), δ (delta), ϵ (epsilon) e ζ (zeta). Em indivíduos normais, duas cadeias do tipo α ligam-se a duas cadeias β , formando a hemoglobina normal adulta ($\text{HbA} = \alpha_2\beta_2$), enquanto que duas cadeias alfa ligam-se a duas gama formando a hemoglobina fetal ($\text{HbF} = \alpha_2\gamma_2$), ou a duas cadeias delta, formando a hemoglobina HbA_2 ($\text{HbA}_2 = \alpha_2\delta_2$). A tabela I.7 apresenta a proporção de cada hemoglobina em relação a concentração de hemoglobina total em um indivíduo normal.

TABELA I.7 - HEMOGLOBINAS HUMANAS NORMAIS

HEMOGLOBINA	HEMOLISADO (%)	
	Adulto	Recém - nascido
Adulto		
HbA	95 - 98	20 - 30
HbA ₂	2 - 3	0,2
Fetal		
HbF	<1	80

FONTE: adaptada da referência 3

Em condições fisiológicas normais, uma reação de glicosilação da hemoglobina HbA ocorre, resultando na formação de vários componentes minoritários: HbA_{1a1}, HbA_{1a2}, HbA_{1b} e o HbA_{1c}, conhecidos coletivamente como HbA₁. O HbA_{1c} é produto da reação da glicose com o nitrogênio terminal da cadeia beta, como demonstrado na figura I.3.

FIGURA I.3. Formação da base de Schiff para produzir a HbA_{1c}

Considerando que os glóbulos vermelhos são completamente permeáveis à glicose e possuem uma meia-vida de 120 dias, a quantidade de hemoglobina HbA_{1c} é um registro do teor de glicose no sangue em que os as células vermelhas estiveram expostas. Em indivíduos normais, HbA_{1a1}, HbA_{1a2} e HbA_{1b} constituem 0,4 a 0,8 % da hemoglobina total. O HbA_{1c} constitui 4-5 % da hemoglobina total. HbA₁ total é normalmente 5-7 %. Nos diabéticos, as porcentagens de HbA₁ total como HbA_{1c} são significativamente elevadas. Estas elevações estão diretamente relacionadas com o grau de hiperglicemia.²

Durante décadas, o principal teste para diagnóstico do diabetes foi o teste oral de glicose, um teste que mede a capacidade do organismo em estocar a glicose. Este teste possui vários inconvenientes: é necessário que o paciente esteja em jejum, beba uma solução de glicose de sabor desagradável e aguarde no mínimo duas horas para a coleta de amostras de sangue.⁵

O teste oral da glicose é pouco reprodutivo e alguns fatores podem produzir resultado anormal, entre eles, inatividade física e dieta pobre em carboidratos. Esses problemas talvez expliquem porque menos de 20% das pessoas com diabetes são diagnosticadas utilizando este método.

Atualmente o teste de hemoglobina glicada já é bastante utilizado para controlar o diabetes, pois é uma maneira rápida e fácil de saber como os níveis de glicose tem sido controlados nos últimos três meses.

Os princípios de separação e de análise dos métodos utilizados na determinação dos diferentes tipos de hemoglobinas são apresentados na tabela I.8.

TABELA I.8 - MÉTODOS DE ANÁLISE PARA HEMOGLOBINAS GLICADAS

MÉTODO	PRINCÍPIO DE SEPARAÇÃO DA Hb	PRINCÍPIO DE ANÁLISE	TIPO DE HEMOGLOBINA GLICADA MEDIDA
1. Minicoluna	Cromatografia de troca iônica	Absorbância espectral das Hb separadas	A ₁ ou A _{1c}
2. Eletroforese	Diferença de cargas	Absorbância espectral das Hb separadas	A ₁ ou A _{1c} ; S ₁ , C ₁ ; S ₁ , C _{1c} também podem ser medidos
3. HPLC	Cromatografia de troca iônica	Absorbância espectral das Hb separadas	A _{1c}
4. Imunoensaio	Afinidade a anticorpo	EIA, TINIA, LIAI	A _{1c}
5. Minicoluna	Cromatografia de afinidade	Absorbância espectral das Hb separadas	A _{1c}
6. Colorimetria	Hidrólise ácida	Formação de composto colorido	A _{1c}

FONTE: adaptada da referência 3

NOTA: EIA, imunoensaio enzimático; TINIA, imunoensaio por inibição turbidimétrica; LIAI, inibição por imunoaglutinação ao látex.

I.1.1.6 Insulina e peptídeo-C

A insulina é sintetizada no pâncreas pelas células beta das *ilhas de Langerhans*, como um precursor de alto peso molecular, a pré-pró-insulina. A sequência de aminoácidos da pré-pró-insulina é mostrada na Figura I.4. A ruptura da molécula na ligação marcada pela seta número 1 resulta na pró-insulina (9000 daltons), que consiste de duas cadeias peptídicas A e B interligadas por pontes de dissulfeto e conectadas pelo peptídeo-C. A remoção do peptídeo-C, pela clivagem nas ligações marcadas pelas setas 2 e 3, leva à formação da insulina. Quantidades iguais de peptídeo-C são liberadas na circulação após estímulo neurológico, da dieta ou hormonal. A determinação do peptídeo-C da pró-insulina fornece uma medida confiável da insulina endógena. Além disto, o peptídeo-C não se correlaciona com a insulina exógena administrada em pacientes diabéticos sob terapia de insulina, e sua determinação não está sujeita a interferências de anticorpos ligados à insulina. A técnica mais comum para a determinação do peptídeo C e insulina é o radioimunoensaio (RIA). Insulina pode ainda ser medida por ensaio imunoenzimométrico (IEMA) e imunoensaio de micropartículas de enzima (MEIA).

FIGURA I.4. Sequência de aminoácidos da pré-pró-insulina

I.2 Eletroforese capilar

Eletroforese é o movimento de partículas ou moléculas eletricamente carregadas em um meio líquido condutivo, geralmente aquoso, sobre a influência de um campo elétrico.⁶

Eletroforese capilar é uma técnica instrumental em que os compostos são separados com base na diferença entre as mobilidades eletroforéticas, que estão relacionadas com a razão carga-massa, e fatores estruturais.

Um sistema de eletroforese capilar é composto essencialmente de um capilar de sílica fundida, preenchido com uma solução de eletrólito. As extremidades do capilar estão imersas em reservatórios contendo eletrólito, onde ainda estão colocados dois eletrodos de platina, conectados a uma fonte de alta tensão, para a aplicação da diferença de potencial. Um sistema de detecção, e um dispositivo que permita a introdução da amostra no capilar também são necessários.

O interesse crescente pela técnica nos últimos anos promoveu o desenvolvimento de instrumentos comerciais dotados de sistemas sofisticados de injeção de amostra, detecção em linha e aquisição de dados, que tornam a técnica atraente para a utilização em análises de rotina. A figura I.5 ilustra uma possível configuração para um sistema de eletroforese capilar.

FIGURA I.5. Esquema de um sistema de eletroforese capilar

A eletroforese capilar moderna é uma família de microtécnicas relacionadas, chamadas de tecnologias de fluido-móvel, baseadas no movimento gerado por campo elétrico, que tem emergido como técnicas de grande utilidade, e têm sido aplicadas para resolver problemas analíticos relacionados a análise forense, química de alimentos, análise clínica, bioquímica, análise de medicamentos, neurociência, biologia molecular e química ambiental. Alta resolução, rapidez de análise, alta eficiência, excelente sensibilidade de massa, necessidade de pequenos volumes de amostra, pequena quantidade de resíduos produzidos, e baixo custo de operação estão entre as características únicas destas tecnologias.⁷ A tabela I.9 resume as principais qualidades da eletroforese capilar.

TABELA I.9 - CARACTERÍSTICAS DA ELETROFORESE CAPILAR

CARACTERÍSTICA	DESCRIÇÃO
Nanotécnica	A quantidade de material introduzido varia entre 1-40 nL. É possível injetar quantidades tão pequenas quanto picolitros e acima de microlitros (utilizando sistemas de pré-concentração).
Rapidez de análise	Muitas substâncias são analisadas em 10-40 min. usando capilares de 50-75 μm de diâmetro interno (d.i.) e comprimentos de 30-100 cm. É possível conseguir separações em menos de 2 min com capilares de menor comprimento.
Alta reprodutibilidade	Pode-se obter tempos de migração com reprodutibilidade menor que 0,5% e áreas com menos de 2,0% de coeficiente de variação.

continua

continuação

CARACTERÍSTICA	DESCRIÇÃO
Alta resolução	É possível atingir 1 milhão de pratos, usualmente 10^5 pratos.
Alta sensibilidade	Eletroforese capilar tem sido capaz de atingir limites de detecção de 10^{-15} mol/L ou 10^{-23} moles, dependendo do sistema de detecção empregado.
Sem limite de massa molecular	Substâncias pequenas podem ser separadas no mesmo capilar utilizado para separar macromoléculas complexas.
Codições amenas	O tampão de separação normalmente varia de soluções moderadamente ácidas a moderadamente básicas. Meios não aquosos também são usados. Uma variedade de aditivos podem ser usados para melhorar a resolução.
Compatibilidade com sistemas biológicos	Faixas de pH que são coerentes com o ambiente natural de macromoléculas podem ser usadas.
Instrumentação	Completamente automatizado. Sistemas de eletroforese totalmente controlados por computador estão disponíveis.
Coleta micropreparativa	É possível coletar microgramas de material purificado.
Consumo mínimo de reagentes	Nanolitros de amostra e mililitros de soluções tampão são consumidos. Resíduo mínimo de solventes utilizados.

I.2.1 Princípio de separação

Se uma mistura contendo moléculas neutras e carregadas de diferentes tamanhos e cargas é colocada na extremidade anódica do capilar, a extremidade com carga positiva, e um campo elétrico for aplicado através do líquido, os íons da mistura migram através do capilar em diferentes direções. A taxa e direção de migração dependem do tamanho dos íons e da magnitude e sinal das cargas.

Espécies positivamente carregadas migrarão em direção ao eletrodo negativamente carregado, o catodo, e as espécies negativamente carregadas migrarão em direção ao eletrodo positivamente carregado, o anodo. A velocidade com que os íons irão migrar depende da relação carga-massa, os íons menores migrarão mais rápido do que íons maiores de mesma carga. Um íon com mais carga irá migrar mais rápido do que um com menor carga, se eles tiverem o mesmo tamanho.

Quando um tampão é colocado dentro do capilar, a superfície interna do capilar adquire carga. Isto pode ser causado pela ionização da superfície do capilar ou pela adsorção de íons do tampão no capilar. No caso dos capilares de sílica, os grupos silanóis (Si-OH) da superfície são ionizados a grupos silanoatos (Si-O^-) negativamente carregados em pH acima de três. Estes grupos silanoatos atraem os cátions do tampão, que formam uma camada interna de cátions na parede do capilar. A camada interna é fortemente atraída pelos grupos silanoatos e é chamada de camada fixa. A camada mais externa de cátions não é fortemente atraída, porque está mais distante dos grupos silanoatos e é chamada de camada difusa. Estas duas camadas formam a dupla camada de cátions. Quando o campo elétrico é aplicado, parte da camada externa de cátions é atraída para o catodo. O plano de cisalhamento delimita a fração móvel e imóvel da camada difusa. Como estes cátions estão solvatados, eles arrastam todo o corpo da solução tampão, gerando o fluxo eletroosmótico. Os fenômenos descritos estão ilustrados na figura I.6.

FIGURA I.6. Representação do fluxo eletroosmótico e da migração eletroforética no interior de um capilar.

No modo normal de operação a amostra é introduzida no capilar pela extremidade onde se encontra o anodo. Apesar dos ânions migrarem em direção ao eletrodo positivo, pela ação do fluxo eletroosmótico, a maioria é carregada para o eletrodo negativo. Cátions migram mais rápido do que o fluxo eletroosmótico, neutros na mesma velocidade, e os ânions migram mais lentamente, e a ordem de eluição é cátions, neutros e ânions (Figura I.6). Cátions divalentes se movem mais rápido do que cátions monovalentes do mesmo tamanho, e ambos migram mais rápido do que cátions monovalentes de maior tamanho. A velocidade de migração de ânions em direção ao eletrodo negativo é o oposto da apresentada para cátions, com ânions pequenos e altamente carregados eluindo por último. Neste exemplo, as moléculas neutras moveriam todas com a mesma velocidade e não seriam separadas. Moléculas neutras podem ser separadas em um modo de eletroforese conhecido como cromatografia capilar eletrocinética micelar, onde micelas são adicionadas ao tampão.⁸

As moléculas separadas podem ser analisadas colocando algum tipo de detector próximo à extremidade final do capilar. A resposta do detector é

um gráfico do sinal do detector em função do tempo, e é chamado de eletroferograma.

I.2.2 Modos da eletroforese capilar

O termo eletroforese capilar (CE) ou eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE) representa os vários modos da eletroforese capilar. Os modos eletroforéticos são tipicamente usados para analisar macromoléculas, enquanto os modos cromatográficos são frequentemente usados na análise de moléculas pequenas. Os modos podem ser agrupados em subclasses:

Modos eletroforéticos:

- Eletroforese capilar em solução livre
- Focalização isoeletrica capilar
- Eletroforese capilar em gel
- Isotacoforese capilar

Modos cromatográficos ou de partição:

- Cromatografia eletrocinética micelar
- Cromatografia capilar quiral
- Eletrocromatografia capilar

Neste trabalho foram utilizados os modos de eletroforese capilar em solução livre e focalização isoeletrica capilar, que são apresentados com maior detalhe a seguir.

1.2.2.1 Eletroforese capilar em solução livre (FSCE)

Este modo comumente usado é caracterizado por um tubo capilar oco preenchido com um eletrólito. Na grande maioria dos casos, o eletrólito é uma solução tampão. O capilar pode ser feito de vidro, Teflon ou sílica fundida. O capilar mais comumente usado atualmente é o de sílica fundida, por ser transparente na região ultravioleta e visível do espectro, além de dissipar eficientemente o aquecimento gerado pelo efeito Joule. Durante a separação, os eletrodos são imersos em recipientes separados, contendo o mesmo eletrólito. Estes recipientes são interligados pelo capilar, permitindo assim a continuidade elétrica.

O princípio de separação neste modo é baseado na mobilidade eletroforética do analito. A mobilidade eletroforética (μ_{ef}) pode ser definida a grosso modo como sendo proporcional à densidade de carga do analito, e está relacionada com a velocidade eletroforética (v_{ef}) e o campo elétrico (E) pela equação 1.2.

$$\mu_{ef} = \frac{v_{ef}}{E} \quad (1.2)$$

A velocidade eletroforética e o campo elétrico podem ser expressos pelas equações 1.3 e 1.4, respectivamente:

$$v_{ef} = \frac{L_{det}}{t_m} \quad (1.3)$$

$$E = \frac{V}{L_{tot}} \quad (1.4)$$

onde L_{det} é a distância da extremidade de injeção até a posição onde está localizado o detector no capilar, t_m é o tempo de migração do íon, V é a diferença de potencial aplicada e L_{tot} é o comprimento total do capilar. Assim sendo, a mobilidade eletroforética pode ser expressa pela equação 1.5.

$$\mu_{ef} = \frac{L_{det} L_{tot}}{V t_m} \quad (1.5)$$

A migração de todas as substâncias na FSCE é também influenciada pelo fluxo eletroosmótico. A mobilidade observada de um analito (μ_{obs}) pode ser expressa como a soma da mobilidade eletroforética do analito (μ_{ef}) com a mobilidade devido ao fluxo eletroosmótico do sistema (μ_{osm}), equação 1.6.

$$\mu_{obs} = \mu_{ef} + \mu_{osm} \quad (1.6)$$

A mobilidade do fluxo eletroosmótico é constante e depende das propriedades da solução, como a constante dielétrica e viscosidade.⁹ A velocidade do fluxo eletroosmótico é expressa pela equação 1.7:

$$V_{osm} = \mu_{osm} \frac{V}{L_{tot}} \quad (1.7)$$

A superfície interna do capilar pode ser revestida ou não. Capilares revestidos são produzidos por modificações químicas na superfície do capilar. Esta modificação poderá reduzir, eliminar ou reverter o fluxo eletroosmótico. Esta redução, eliminação, ou reversão do fluxo eletroosmótico é crucial em alguns modos de CE para atingir um bom desempenho. O eletrólito também pode conter uma variedade de aditivos e modificadores para melhorar a eficiência da separação e resolução dos analitos.

Quando se quer analisar somente ânions é desejável que ocorra uma eluição mais rápida, decrescendo o tempo de separação. Isto pode ser feito invertendo a direção do fluxo eletroosmótico, de modo que ele flua do catodo para o ânodo.

Se apenas a direção do fluxo eletroosmótico é invertida, os solutos não migrarão através do capilar para o detector, eles irão para dentro do reservatório da amostra, uma vez que a direção do fluxo seria do detector

para o recipiente da amostra. Revertendo também a polaridade da fonte de alta tensão, de modo que a extremidade do capilar onde está o detector seja o anodo, os solutos aniônicos migrarão através do capilar e os catiônicos e neutros serão arrastados devido ao fluxo eletroosmótico e a ordem de eluição será ânions, neutros e cátions.^{6,10}

Um método simples de mudar a direção do fluxo eletroosmótico é adicionar ao eletrólito uma amina quaternária, como um sal de alquil amônio (Figura I.7). A extremidade positivamente carregada da amina quaternária adsorve nas paredes do capilar através de interações coulômbicas com os grupos silanatos da parede do capilar. As extremidades hidrofóbicas destas aminas quaternárias se associam a outras extremidades hidrofóbicas de aminas em solução através de interações de dispersão do tipo dipolo induzido-dipolo induzido (forças de London). A extremidade hidrofílica positivamente carregada das aminas associadas atraem então os ânions do tampão. Com o estabelecimento do campo elétrico, estes ânions são atraídos para o eletrodo positivo, resultando na inversão do fluxo eletroosmótico.

FIGURA I.7. Representação da inversão do fluxo eletroosmótico pela adição de uma amina quaternária

Ao desenvolver um método usando FSCE para análise de solutos compostos por ácido ou base fracos é interessante tentar utilizar um tampão em que o pH é próximo ou um pouco abaixo dos valores de pK_a dos solutos que se quer separar. Um procedimento útil na escolha do pH é a construção de um gráfico de mobilidade efetiva em função do pH, que pode ser feito a partir das equações I.8 apresentada a seguir:

$$\mu_{\text{eff}} = \sum (\mu_j \alpha_j) \quad (\text{I.8})$$

onde, μ_{eff} é a mobilidade efetiva, α_j e μ_j são a fração molar e a mobilidade eletroforética de cada espécie individual presente em solução respectivamente. Os valores de fração molar podem ser calculados pelas equações I.9 a I.12 apresentadas a seguir:

$$\alpha_0 = \frac{[H^+]^n}{[H^+]^n + K_1 [H^+]^{n-1} + K_1 K_2 [H^+]^{n-2} + \dots + K_1 K_2 \dots K_n} \quad (\text{I.9})$$

$$\alpha_1 = \frac{K_1 [H^+]^{n-1}}{[H^+]^n + K_1 [H^+]^{n-1} + K_1 K_2 [H^+]^{n-2} + \dots + K_1 K_2 \dots K_n} \quad (\text{I.10})$$

$$\alpha_2 = \frac{K_1 K_2 [H^+]^{n-2}}{[H^+]^n + K_1 [H^+]^{n-1} + K_1 K_2 [H^+]^{n-2} + \dots + K_1 K_2 \dots K_n} \quad (\text{I.11})$$

$$\alpha_n = \frac{K_1 K_2 \dots K_n}{[H^+]^n + K_1 [H^+]^{n-1} + K_1 K_2 [H^+]^{n-2} + \dots + K_1 K_2 \dots K_n} \quad (\text{I.12})$$

Os valores de μ_j e pK_a podem ser obtidos na compilação de Hirokawa et al..¹¹ O melhor pH é aquele em que a diferença de mobilidade entre os solutos analisados seja máxima.

1.2.2.2 Focalização isoelétrica capilar (cIEF)

A focalização isoelétrica capilar é um modo de eletroforese em que o capilar é preenchido com uma solução de anfólitos e o campo elétrico é aplicado, gerando um gradiente de pH. Os anfólitos são compostos anfotéricos que existem ou como ânions, neutros, ou como cátions, dependendo do pH da solução. O pH em que o anfólito é neutro é conhecido com seu ponto isoelétrico, pI . Esta técnica é aplicada geralmente na análise de proteínas, que são separadas a partir das diferenças em seus pontos isoelétricos.¹²

A principal característica desta técnica é a de que a migração prossegue até o momento em que o estado estacionário é atingido (etapa de focalização), e nenhuma resolução posterior é atingida após o término deste estágio. O alto poder de resolução da cIEF depende do efeito de focalização da técnica, e este é fator de grande relevância na tentativa de melhorar a resolução.

No estado estacionário, a distribuição de anfólitos forma um gradiente de pH em que as proteínas focalizam na posição onde possuem carga líquida zero, isto é onde o $pH = pI$. A difusão de proteínas na direção do ânodo (eletrodo positivo) resultará na aquisição de carga positiva, resultando no retorno à banda focalizada. Desde que o campo elétrico seja mantido, a migração eletroforética produz efeito contrário ao da difusão.

Como a instrumentação em eletroforese capilar permite a detecção em linha em um ponto fixo ao longo do capilar, a cIEF deve incluir um modo de transportar as zonas focalizadas até o ponto de detecção. Este processo, conhecido como mobilização, pode ocorrer como um estágio independente ou ser combinado com a focalização dos componentes da amostra e

anfólitos. Existem diversas variações no procedimento para realizar a focalização isoeletrica capilar:

1. cIEF em etapas múltiplas: Este modo de cIEF é caracterizado pela presença de dois estágios distintos, a focalização e a mobilização. A mobilização pode ser conseguida por adição de íon aos reservatórios contendo o ânodo (anólito) ou catodo (católito), ou pela aplicação de uma força hidráulica (pressão, vácuo ou gravidade). Este modo requer que o fluxo eletroosmótico seja reduzido a níveis muito baixos. Embora alguma resolução possa ser perdida devido a deformação pelo perfil de fluxo parabólico durante mobilização hidráulica (ou difusão durante a mobilização por adição de íon), a resolução é ainda muito alta.
2. cIEF em etapa única: a focalização ocorre enquanto as zonas de proteínas estão sendo transportadas em direção ao ponto de detecção. As forças disponíveis para transportar as zonas são as mesmas do modo anterior, mas neste caso o fluxo eletroosmótico pode também ser usado, sozinho ou em combinação com qualquer uma das outras forças.

Cada um dos procedimentos adotados requer uma configuração da instrumentação diferente, e diferentes estratégias de otimização. A seguir são apresentados e discutidos os passos da cIEF em múltiplas etapas.

Condicionamento do capilar: Os capilares normalmente utilizados são revestidos internamente para a eliminação do fluxo eletroosmótico. Estes capilares devem ser condicionados com lavagens de metanol e água, e não devem ser expostos a soluções de pH alto, como hidróxido de sódio, pois danificam o revestimento.

Injeção: Em alguns procedimentos, a amostra é preparada em mistura com a solução de anfólitos, porém esta etapa depende da sensibilidade desejada e da solubilidade da amostra na solução de anfólitos. Na análise de amostras

concentradas, a injeção de amostra e solução de anfólitos pode ser feita separadamente, como se faz na eletroforese em solução livre. A composição do anfólito deve ser selecionada de acordo com a faixa de pI dos componentes a serem separados. Uma vez preparada a solução de anfólitos e amostra, a injeção no capilar é feita pela aplicação de pressão ou vácuo, como ilustrado nas figuras I.8 e I.9.

FIGURA I.8. Preenchimento do capilar com solução de anfólito

FIGURA I.9. Injeção da amostra por pressão

Focalização: O gradiente de pH necessário para realizar a cIEF é criado pela solução de anfólitos. Os anfólitos são misturas de vários compostos sintéticos que contêm grupos amino e ácidos carboxílicos e possuem pI diferentes. Durante a realização de uma análise por cIEF, a etapa de focalização é iniciada com a imersão do capilar no anfólito, solução contida no reservatório anódico, e católito, solução contida no reservatório catódico, seguida pela aplicação da voltagem. O gradiente de pH é então formado, com valores de pH baixos no ânodo e valores de pH altos na direção do catodo, como ilustrado na figura I.10. A faixa de gradiente de pH é definida pela composição da mistura de anfólitos. Ao mesmo tempo, as proteínas da amostra migram até o estado estacionário ser atingido. Nesta posição, cada proteína permanece focalizada em uma zona estreita de pH correspondente ao seu ponto isoelétrico. O estado de focalização é atingido rapidamente e é

acompanhado por uma queda exponencial da corrente. Quando os anfólitos e proteínas atingem regiões correspondentes a seus pontos isoeletricos, a carga líquida é zero e, portanto o valor de corrente estabiliza.

FIGURA I.10. Etapa de focalização em cIEF

Mobilização:

Mobilização hidráulica: Este tipo de mobilização utiliza pressão positiva ou vácuo como força para mover as bandas de proteínas focalizadas em direção ao ponto de detecção. Durante a mobilização hidráulica, é necessário que o campo elétrico permaneça aplicado para manter as proteínas em zonas estreitas, focalizadas na etapa anterior, demonstrado na figura I.11. A desvantagem deste tipo de mobilização é o perfil parabólico do fluxo hidrodinâmico, que pode causar um certo alargamento das bandas e diminuir a resolução.

FIGURA I.11. Mobilização por pressão em cIEF

Mobilização química: Após o término da etapa de focalização, a voltagem é interrompida e o católito ou o anólito é trocado pelo reagente de mobilização. A voltagem é novamente aplicada para o início da mobilização. A escolha de mobilização direcionada ao catodo, (mobilização catódica) ou ao anodo (mobilização anódica) e da composição do reagente de mobilização depende dos pontos isoeletricos das proteínas analisadas.

O método mais comum de mobilização química é a adição de um sal neutro como cloreto de sódio ao anólito ou ao católito. No início da mobilização, a corrente permanece nos valores baixos observados no término da focalização, mas gradualmente começa a aumentar, a medida que os íons cloreto ou sódio entram no capilar. Após algum tempo de mobilização, quando o íons do sal estão presentes em grande concentração no tubo capilar, um aumento rápido no sinal da corrente sinaliza o término da mobilização. Proteínas neutras e básicas são eficientemente mobilizadas na direção do catodo com cloreto de sódio, e o tempo de mobilização apresenta boa correlação com o pI.

No estado estacionário, a condição de eletroneutralidade no capilar durante a focalização pode ser expressa como:

$$C_H^+ + \sum C_{NH_3^+} = C_{OH^-} + \sum C_{COO^-} \quad (I.13)$$

onde C_H^+ , C_{OH^-} , $C_{NH_3^+}$ e C_{COO^-} são as concentrações de prótons, íons hidroxila, e concentração dos anfólitos com caráter básico e ácido, respectivamente. Na mobilização catódica, a adição de um ânion diferente do ânion hidroxila ao católito introduz um outro termo no lado direito da equação I.13, e a equação de balanço de carga pode ser expressa como:

$$C_H^+ + \sum C_{NH_3^+} = C_{OH^-} + \sum C_{COO^-} + C_{Cl^-} \quad (I.14)$$

A migração do cloreto para o interior do capilar resulta no decréscimo da concentração de hidroxila. O fluxo progressivo de ânions cloreto causa o decréscimo de pH ao longo do capilar, mobilizando as proteínas em

seqüência, na direção do detector, como ilustrado na figura I.12. A mudança de pH ocorre inicialmente próxima à extremidade do capilar, mas devido a alta mobilidade dos íons pequenos, como OH^- , H^+ , Na^+ , Cl^- , a queda do valor de pH é propagada rapidamente para o restante do gradiente.

FIGURA I.12. Mobilização química em cIEF

I.3 Referências bibliográficas

- 1) WHO. World Health Organization. Diabetes mellitus. [Online].
Available: <http://www.who.int/inf-fs/enfact138.html> [November, 1999].
- 2) KAPLAN, L.A.; PESCE, A. *Clinical Chemistry. Theory, Analysis, Correlation*. 3 ed. New York, Mosby, 1996. Cap. 32, p.613-641: *Diabetes mellitus*.
- 3) STRYER, L. *Biochemistry*. 3 ed. New York, Freeman, 1988. Cap. 20, p. 479: Fatty acids metabolism.
- 4) KAPLAN, L.A.; PESCE, A. *Clinical Chemistry. Theory, Analysis, Correlation*. 3 ed. New York, Mosby, 1996. Cap. 25, p. 464-483: Acid-base control and acid-base disorders.
- 5) American diabetes association. [Online]
Available: <http://www.diabetes.com/NEWS/NEWST-119.HTM>
[June, 1998].
- 6) BAKER, D.R. *Capillary Electrophoresis*. New York, John Wiley, 1995. 244p.
- 7) BLANC, T.; SCHAUFELBERGER, D.E.; GUZMAN, N.A. *Analytical Instrumentation Handbook*. Las Vegas, Galen Wood Ewing, 1996. Cap. 25, p. 1351-1431: Capillary electrophoresis.
- 8) TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. *Quim. Nova*, v. 20, n.5, p. 493-511, 1997.
- 9) TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. *Quim. Nova*, v. 19, p. 173-181, 1996.
- 10) COLOMBARA, R.; TAVARES, M.F.M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: Características e aplicações. *Quim. Nova*, v. 20, n. 5, p. 512-518, 1997.
- 11) HIROKAWA, T.; NISHINO, M.; AOKI, N.; KISO, Y.; SAWAMOTO, Y.; YAGI, T.; AKIYAMA, J. Table of isotacophoretic indices. *J. Chromatogr.*, v. 271, D1-D106, 1983.

- 12) RODRIGUEZ-DIAZ, R.; WEHR, T.; ZHU, M.; LEVI, V. Capillary isoelectric focusing . In: LANDERS, J.P. *Handbook of High Performance Capillary Electrophoresis*. Boca Raton, CRC Press, 1993. Cap. 4, p. 101-138.

II. OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo desenvolver e aplicar métodos de análise para alguns metabólitos de controle do diabetes mellitus, explorando os recursos da eletroforese capilar como técnica única de análise. Entre os metabólitos escolhidos estão os cátions e ânions inorgânicos (sódio, potássio, cloreto e bicarbonato), os ânions orgânicos (acetoacetato, lactato e β -hidroxibutirato) e a hemoglobina glicada.

III. DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE

III.1 Equipamento e materiais

O desenvolvimento dos métodos propostos foram realizados em um sistema de eletroforese capilar Beckman P/ACE 5510 equipado com detector de arranjo de diodos (190 a 600 nm). O software P/ACE Station foi utilizado no controle do aparelho e aquisição de dados. O aparelho possui sistema de refrigeração do capilar por circulação de líquido refrigerante, e a temperatura foi mantida a 25 °C.

Os sais utilizados são de grau analítico e os solventes de grau cromatográfico. No preparo das soluções foram utilizadas balança analítica e água deionizada.

Os capilares utilizados nos métodos de FSCE são de sílica fundida (Polymicro Technology), revestidos externamente com poliimida, de 75 µm de diâmetro interno, 47 cm de comprimento total e 40 cm até o detector. A remoção do revestimento externo, para a abertura da janela de detecção, foi feita com um queimador específico para esta finalidade. Quando usados pela primeira vez, os capilares foram condicionados com lavagens de hidróxido de sódio 1,0 mol/L 20 psi/30 min, água deionizada 20 psi/10 min e finalmente com eletrólito apropriado 20 psi/30 min.

Diariamente, no início do trabalho, o capilar foi lavado com hidróxido de sódio 1,0 mol/L 20 psi/5 min, água deionizada 20 psi/5 min e eletrólito 20 psi/30 min. No intervalo entre corridas o capilar foi recondicionado com lavagens de 20 psi/2 min com eletrólito. Ao término do dia de trabalho o capilar foi lavado com hidróxido de sódio 1,0 mol/L 20 psi/5 min e água deionizada 20 psi/5 min e armazenado preenchido com água.

Os capilares utilizados para o desenvolvimento do método por cIEF são revestidos internamente com dimetilpolisiloxano (DB-1, J&W Scientific), de 50 µm de diâmetro interno, 27 cm de comprimento total e 20 cm até o detector. Estes capilares foram condicionados diariamente no início do trabalho com lavagens de metanol 20 psi/10 min e água deionizada 20 psi/10 min. Para o armazenamento destes capilares foram feitas lavagens com água deionizada 20 psi/5 min, metanol 20 psi/5 min e ar 5 psi/5 min. A

remoção do revestimento de poliimida destes capilares foi feita por aquecimento da região com queimador, após o capilar ter sido preenchido com água deionizada.

Os testes foram feitos com soro liofilizado (Roche), amostras de soro humano e amostras de sangue total. As amostras de soro humano foram fornecidas pelo Hospital Albert Einstein e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise. As amostras de sangue total foram fornecidas pelo laboratório Campana. O soro liofilizado foi reconstituído de acordo com as indicações do fabricante: ao conteúdo do frasco foram adicionados 5,00 mL de água deionizada, após 20 minutos o frasco é agitado para garantir completa dissolução dos componentes.

III.2 Potássio e sódio

Durante o desenvolvimento de método de análise por eletroforese capilar em solução livre, a principal escolha para o início dos experimentos é o eletrólito de corrida. Esta escolha deve estar baseada, entre outros fatores, na proximidade de mobilidade eletroforética do cátion do tampão com o cátion a ser analisado. A discrepância entre estes valores causa picos assimétricos, o que é indesejável para a análise quantitativa. Entre os outros fatores que devem ser observados, estão a faixa de pH em que o eletrólito pode ser utilizado e a necessidade da adição de agentes complexantes para auxiliar na separação dos cátions. O tipo de detecção, modo e tempo de injeção da amostra e voltagem aplicada também devem ser escolhidos com cuidado, porém, com exceção do detector, podem ser modificados facilmente durante os experimentos.

W. Buchberger et. al. utilizaram solução de sulfato de cobre como eletrólito na análise de cátions em soro humano, e os picos para sódio e potássio aparecem assimétricos nos eletroferogramas apresentados¹. Tsung-I Lin et. al. utilizaram 4-aminopiridina como eletrólito de corrida e os agentes complexantes ácido malônico ou oxálico e éter 18-coroa-6, mas não obtiveram separação completa entre os picos de cálcio e magnésio.²

Para o desenvolvimento do método para análise dos cátions sódio e potássio em soro humano, foi escolhido inicialmente o eletrólito de composição 5,0 mmol/L imidazol, 5,0 mmol/L HIBA (ácido hidroxiiisobutírico) e 1,0 mmol/L de éter 18-coroa-6 em pH 4,50.

Neste sistema, o imidazol foi escolhido não só por possuir mobilidade eletroforética próxima aos cátions analisados, mas também por ser um cromóforo, o imidazol apresenta absorvância máxima em 214 nm, e o modo de detecção escolhido foi o de absorção indireta. O HIBA é um agente complexante geralmente adicionado a eletrólitos com a finalidade de melhorar a separação dos cátions.

Potássio e amônio migram com a mesma velocidade eletroforética. Para evitar a co-migração destes cátions, utiliza-se éter coroa, que forma um complexo mais estável com o potássio, que por sua vez adquire uma menor velocidade de migração, e propicia a separação do par potássio/amônio. O amônio está presente no soro em quantidade traço (30 $\mu\text{mol/L}$), neste caso a co-migração poderia não interferir significativamente na quantificação do potássio. Em alguns eletroferogramas iniciais de soro liofilizado, o pico do amônio pode ser notado, neste caso, a adição do éter coroa no eletrólito foi mantida. Além disso, o éter coroa também complexa outros metais, com menor afinidade quando comparado ao potássio, mas pode auxiliar na seletividade das separações.

Os testes de análise de soro liofilizado diluído com água deionizada na proporção 1:20 v/v, com o eletrólito descrito anteriormente, não apresentaram boa separação entre os picos de sódio e magnésio. A alteração da voltagem aplicada para valores menores melhorou a separação, mas não foi suficiente para promover a separação completa dos picos.

A principal causa da proximidade dos picos de sódio e magnésio está na alta concentração do sódio na amostra, que mesmo diluída apresenta pico do sódio em concentração muito elevada. O aumento da diluição com a finalidade de diminuir a banda do sódio causaria a perda de sinal para o potássio, em menor concentração no soro, que também deve ser

quantificado. Mesmo assim, a diluição da amostra foi modificada para 1:50 v/v, sem perda significativa de sinal do potássio.

A composição do eletrólito foi modificada para 10,0 mmol/L imidazol, 5,0 mmol/L HIBA e 1,0 mmol/L 18-coroa-6. A voltagem aplicada foi reduzida para valores de 15 e 10 kV. Estas modificações causam a diminuição do fluxo eletroosmótico e, dependendo do sistema, proporcionam a separação de picos, pois migrando a uma velocidade menor, as bandas que antes estavam juntas podem se separar. A figura III.1 mostra o eletroferograma obtido nestas condições. Os picos foram identificados por adição de padrão.

Com voltagem aplicada de 10 kV foi possível a separação dos picos de sódio e magnésio. Vários testes foram feitos para se testar a estabilidade e reprodutibilidade desta condição, porém esta não apresentou reprodutibilidade de áreas quando injeções consecutivas foram feitas, não podendo ser usado para quantificação. A causa desta discrepância pode ser devida à instabilidade na separação dos picos do sódio e magnésio, pois foi observado que em algumas corridas os picos estavam mais próximos e em outras mais separados. As tentativas de condicionamento e lavagem do capilar entre corridas com hidróxido de sódio 0,1 mol/L, água e eletrólito não solucionaram o problema. O tempo de migração foi mantido constante, porém as áreas apresentaram grande variação.

FIGURA III.1. Eletoferograma de soro liofilizado, diluído 1:50 v/v. Eletrólito: 10,0 mmol/L imidazol, 5,0 mmol/L HIBA, 1,0 mmol/L éter 18-coroa-6, pH 4,50; Injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/1 s; Voltagem: variada; Detecção: indireta, $\lambda = 214$ nm.

Em sequência a essas tentativas, foram feitas diversas modificações, como o aumento da concentração de imidazol e HIBA separadamente, mantendo os outros parâmetros constantes, e aumento do pH. Todas as alternativas testadas foram baseadas em dados consultados na literatura, que demonstram a variação da mobilidade dos cátions estudados em função do pH, concentração do eletrólito e do agente complexante.^{3,4} Mesmo com as condições experimentais selecionadas para se obter o máximo de diferença entre as mobilidades de sódio e magnésio, não foi observada melhora em nenhum dos experimentos.

O HIBA foi retirado da composição do eletrólito para se verificar qual o efeito deste agente complexante na mobilidade dos cátions em estudo. O eletroferograma resultante leva a conclusão que a presença do HIBA no eletrólito afeta muito pouco a mobilidade dos cátions potássio, cálcio, sódio e magnésio. De fato, em artigos pesquisados, o efeito da redução da mobilidade com a complexação com HIBA é mais pronunciado para os metais de transição.⁵

Com a retirada do HIBA da composição do eletrólito, foi necessária a adição de outro agente complexante capaz de modificar a mobilidade do

sódio e/ou magnésio e auxiliar a separação destes picos. Um eletrólito preparado com 15,0 mmol/L imidazol, 5,0 mmol/L ácido láctico, 1,0 mmol/L éter coroa, pH 4,50, proporcionou boa separação dos picos, como ilustrado na figura III.2.

O modo de injeção também foi modificado. Os experimentos anteriores utilizaram a injeção por pressão, onde uma pressão constante e controlada é aplicada por um período de tempo. Nos experimentos seguintes, a amostra foi injetada eletrocineticamente, ou seja, a voltagem é aplicada por um período de tempo. Este modo de injeção apresenta a vantagem de pré-concentrar os cátions de maior mobilidade, pois eles migram para o capilar com maior velocidade no momento da injeção.⁶ Neste método de análise, podemos tirar vantagem deste fato, pois o cátion de maior mobilidade é o potássio, que poderia ter o sinal prejudicado por causa da diluição, e neste caso seria injetado em maior quantidade.

FIGURA III.2. Eletroferograma de soro liofilizado diluído 1:50 v/v. Eletrólito: 15,0 mol/L imidazol, 5,0 mmol/L ácido láctico, 1,0 mmol/L éter 18-corona-6, pH 4,50; Injeção eletrocinética: 10 kV/2 s; Voltagem: 10 kV; Detecção: indireta, $\lambda = 214$ nm.

Uma vez provada a eficácia do ácido láctico na separação dos picos de sódio e magnésio foi preparado um eletrólito com 10 mmol/L ácido láctico, mantendo os outros parâmetros constantes, visando observar se o aumento da concentração do ácido láctico poderia separar ainda mais os picos de sódio e magnésio. O ácido láctico modifica não só a mobilidade do magnésio, mas também a do cálcio, neste caso, com um aumento de concentração acima de 5 mmol/L, o pico do magnésio afasta-se mais do pico do sódio mas também causa a aproximação do pico do cálcio ao pico do sódio, comprometendo a separação destes últimos.

As condições experimentais apresentadas na figura III.2 foram escolhidas, para a análise de cátions em soro humano.

III.3 Cloreto e bicarbonato

Para a análise de cloreto e bicarbonato foi escolhido inicialmente o eletrólito composto de 5,0 mmol/L cromato de sódio, 0,10 mmol/L CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) em pH 8,50. Assim como no desenvolvimento do método de análise para sódio e potássio, aqui, a escolha do eletrólito foi baseada na semelhança dos valores de mobilidade dos analitos e do eletrólito. Em se tratando da análise de ânions, devem ser observadas as mobilidades do ânion do eletrólito e dos ânions do analito que se quer determinar, neste caso cloreto e bicarbonato.

Neste sistema também foi utilizada a detecção indireta, com o cromato como cromóforo, absorvendo em 254 nm. O CTAB é utilizado na inversão do fluxo eletroosmótico, conforme explicação anterior (capítulo I.2.2.1).

O soro liofilizado foi diluído com água deionizada na proporção 1:20 v/v e o primeiro resultado obtido com aplicação de voltagem de -30 kV, não foi satisfatório para a separação dos picos de cloreto e sulfato. O pico de cada composto foi identificado por adição de padrão. A voltagem aplicada foi reduzida a -25 kV, e somente com esta modificação foi possível a

separação dos picos desejados em menos de 2 minutos, como exemplificado na figura III.3.

FIGURA III.3. Eletroferograma de soro liofilizado diluído 1:20 v/v. Eletrólito: 5,0 mmol/L cromato de sódio, 0,10 mmol/L CTAB, pH 8,50; Injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/2 s; Voltagem: -25 kV ; Detecção: indireta, $\lambda = 254$ nm.

O pico do bicarbonato, na análise feita com o eletrólito em pH 8,50, apresentou formato assimétrico e largo. Este problema foi minimizado com o aumento do pH para 9,00, porque neste pH a mobilidade efetiva do sistema aumenta. A figura III.4 ilustra a melhora na simetria do pico do bicarbonato. O soro humano foi preferido nesta etapa do trabalho pois nos soros liofilizados congelados, não foi identificado o pico do bicarbonato, provavelmente devido a decomposição no período de estocagem.

FIGURA III.4. Eletroferograma de amostra de soro humano diluído 1:20. Eletrólito: 5,0 mmol/L cromato de sódio, 0,1 mmol/L CTAB, pH 9,00; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/2 s; Voltagem: -25 kV; Detecção: indireta, $\lambda = 254$ nm.

As condições de análise apresentadas na figura III.4 foram escolhidas para análise de cloreto e bicarbonato em soro humano.

III.4 Acetoacetato, lactato e β -hidroxibutirato

V. Dolnik et al. demonstraram a separação de ácidos orgânicos em soro humano por isotacoforese e FSCE.^{7,8} A implementação de métodos por isotacoforese não é muito difundida, pois demanda o conhecimento prévio da composição da amostra, o que no caso de soro humano, é difícil de se obter com certeza. O método por FSCE proposto pelos autores não contempla a separação simultânea de todos os ânions, e neste artigo, nenhum estudo quantitativo é conduzido.

No desenvolvimento do método de análise para ânions orgânicos, além da escolha inicial da composição do eletrólito, a seleção do pH do eletrólito merece maior atenção do que nos métodos de cátions e ânions inorgânicos. A variação de mobilidade dos íons inorgânicos com o pH não é

muito expressiva, com algumas exceções, como o bicarbonato, e outros ânions, base conjugada de ácidos fracos.

A construção de uma curva de mobilidade efetiva dos analitos em função do pH é de grande utilidade na seleção da natureza e pH do eletrólito que será empregado. As expressões necessárias para o cálculo dos valores de mobilidade já foram apresentadas no capítulo I.2.2.1.

O gráfico III.1 apresenta a curva de mobilidade efetiva dos analitos em estudo e de outros ânions que podem estar presentes no soro humano. O acetoacetato não foi incluído no gráfico porque os dados de mobilidade e pK_a deste composto não estão contidos na literatura consultada.⁹

GRÁFICO III.1 – MOBILIDADE EFETIVA EM FUNÇÃO DO pH DE ALGUNS ÂNIONS ORGÂNICOS PRESENTES NO SORO HUMANO

Inicialmente foi escolhida como condição de análise, um eletrólito composto de 5,0 mmol/L ácido 3,5 dinitrobenzóico, 0,10 mmol/L CTAB em pH 3,80. O ácido 3,5 dinitrobenzóico já foi usado com sucesso para análise de ácidos orgânicos e possui mobilidade efetiva próxima a dos ácidos que se quer determinar.¹⁰ O modo de detecção utilizado foi o de detecção indireta, o ácido 3,5 dinitrobenzóico é um cromóforo e absorve em 254 nm.

A escolha inicial do pH se deu a partir do gráfico III.1, onde pode ser observado que em pH 3,80, nenhum dos ânions em estudo possui a mesma mobilidade dos outros ânions incluídos no gráfico, e a diferença entre as mobilidades é satisfatória para permitir a separação dos compostos. A observação do gráfico não descarta a possibilidade de co-migração de algum outro ânion presente no soro, fato que deve então ser pesquisado durante as corridas.

O gráfico III.1 mostra que em pH 4,70 também não existe co-migração dos ânions em estudo, porém com o aumento do pH, ocorre o aumento do fluxo eletroosmótico, que pode dificultar a separação dos analitos, como foi observado em experimentos realizados posteriormente com eletrólitos que apresentam maior velocidade de fluxo eletroosmótico.

Os eletroferogramas iniciais de soro humano liofilizado, sem diluição, apresentaram picos largos e disformes. O aumento da concentração do eletrólito e redução do pH foram feitos com o objetivo principal de reduzir o fluxo eletroosmótico e permitir a separação dos picos.

A figura III.5 apresenta o eletroferograma de soro humano obtido com o eletrólito composto por 15,0 mmol/L ácido 3,5 dinitrobenzóico e 0,10 mmol/L CTAB, em pH 3,50.

FIGURA III.5. Eletroferograma de soro humano. Eletrólito: 15,0 mmol/L ácido 3,5 dinitrobenzóico, 0,10 mmol/L CTAB, pH 3,50; Injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/2s; Voltagem: -15 kV; Detecção: indireta, $\lambda = 254$ nm; mistura padrão: 1,0 mmol/L piruvato, 1,0 mmol/L acetoacetato, 15 mmol/L lactato e 1,0 mmol/L β -hidroxibutirato.

O limite de detecção para este método foi determinado como sendo 0,5 mmol/L para piruvato e 0,1 mmol/L para o acetoacetato, lactato e β -hidroxibutirato, considerando relação sinal ruído de 3:1.

Outros eletrólitos, como o ácido 3,5 dihidroxibenzóico e cromato, também foram testados com a finalidade de melhorar a sensibilidade do método e o formato do pico do piruvato que mesmo com aumento de concentração de eletrólito continuou assimétrico e com pouca sensibilidade. Nenhum bom resultado foi observado com estes eletrólitos.

O eletrólito composto por 10,0 mmol/L hidrogenoftalato de potássio e 0,10 mmol/L CTAB forneceu bons resultados. Os picos aparecem separados, porém o problema de sensibilidade para o piruvato não foi resolvido, como demonstrado na figura III.6. O tempo de análise estimado em 9 minutos, menor quando comparado com o uso do ácido 3,5 dinitrobenzóico, porém a maior proximidade de alguns picos aumenta a possibilidade de co-migração.

FIGURA III.6. Eletroferograma de soro humano. Eletrólito: 10,0 mmol/L hidrogenoftalato de potássio, 0,10 mmol/L CTAB, pH 3,50; Injeção hidrodinâmica: 0,5 psi/2s; Voltagem: -10 kV; Detecção: indireta, $\lambda = 254$ nm; mistura padrão: 1,0 mmol/L piruvato, 1,0 mmol/L acetoacetato, 15 mmol/L lactato e 1,0 mmol/L β -hidroxibutirato.

O objetivo inicial do trabalho era a determinação dos três ânions citados anteriormente e o piruvato. A redução do pH foi adotada principalmente pela procura de uma condição de análise que permitisse a separação do piruvato e o cloreto presente no soro humano. Já nos primeiros testes foi observado que o pico do piruvato estava muito próximo do primeiro pico do eletroferograma, composto na sua maior parte por cloreto. A redução do pH, de acordo com o gráfico III.1, diminui a mobilidade efetiva do piruvato mas não altera a dos ânions inorgânicos e, conseqüentemente melhora a separação destes picos. A separação dos picos de cloreto e piruvato foi obtida, porém a determinação de piruvato foi posteriormente abandonada, principalmente por não ter sido possível a detecção do piruvato em nenhuma das amostras de soro humano analisadas após o desenvolvimento do método. Outro motivo é que a análise de piruvato requer cuidados especiais de preservação da amostra, como tratamento com ácido metafosfórico e armazenamento da amostra a 4°C até o momento da análise. Como estes procedimentos não são comumente utilizados em análises de rotina, a obtenção de amostras tratadas da

maneira adequada não foi possível, e os testes para o piruvato foram excluídos das análises.

As condições de análise descritas na figura III.5 foram escolhidas para análise de acetoacetato, lactato e β -hidroxibutirato em soro humano.

III.5 Hemoglobina glicada

A focalização isoeétrica capilar tem sido utilizada na análise de hemoglobinas normais e variantes em laboratórios clínicos.^{11,12,13} Inicialmente, um dos métodos de focalização isoeétrica capilar para hemoglobinas descrito na literatura foi reproduzido, com o objetivo de avaliar a separação da hemoglobina A_{1c} das demais hemoglobinas e a possibilidade de quantificação, conforme apresentado pelo autor.

O método está descrito a seguir:

Capilar: DB-1 (J&W Scientific), 50 μ m d.i., 27 cm de comprimento

Condicionamento inicial: 5 min metanol, 5 min água e 5 min mistura de anfólitos

Condicionamento entre corridas: 1 min metanol, 1 min água e 3 min mistura de anfólitos

Amostra: sangue coletado em EDTA (1 mg EDTA / 1 mL de sangue)

Preparo da amostra: após 5 min de centrifugação, 5 a 15 μ L de células vermelhas do sangue são adicionadas a 200 μ L de reagente hemolisante (5 mmol/L de EDTA, e 10 mmol/L KCN)

Mistura de anfólitos: 2% (pH 6-8:3-10, 10:1 v/v), Pharmacia Biotech, em 0,375% de metilcelulose, Applied Biosystems.

Solução católito: 20 mmol/L de hidróxido de sódio

Solução anólito: 100 mmol/L de ácido fosfórico em 0,375% de metilcelulose

Injeção: 0,5 psi / 5 a 20 s

Focalização: 30 kV / 5 min

Mobilização por pressão: 0,5 psi / 10 min, mantendo a voltagem de 30 kV

Temperatura: 25 °C

Deteção: direta, λ = 415 nm

A detecção direta em 415 nm é específica para o grupo heme da molécula de hemoglobina.

Os resultados não foram satisfatórios, ou seja, a separação entre a HbA_{1c} e a HbA não era total e de difícil reprodução, conforme apresentado na Figura III.7, onde a melhor separação obtida é ilustrada

FIGURA III.7. Análise de hemoglobinas em hemolisado por cIEF com mobilização por pressão

Frente a esta dificuldade, a concentração de metilcelulose e a concentração e composição da mistura de anfólitos foram modificadas e testadas, porém, nenhuma melhora foi observada.

Outra alternativa possível no desenvolvimento de métodos de análise para cIEF é a utilização da mobilização química. Na mobilização por pressão existe uma força mecânica agindo sobre a solução, que gera o perfil parabólico do fluxo, como ocorre em cromatografia à líquido, que pode ser o causador da perda de resolução das bandas focalizadas na etapa anterior da análise. Na mobilização química não existe nenhuma força mecânica agindo sobre a solução, e o resultado esperado é a permanência do estado da alta resolução obtido na etapa anterior de focalização, principal característica desta técnica.

O novo método proposto é apresentado a seguir:

Capilar: DB-1 (J&W Scientific), 50 μm d.i., 27 cm de comprimento

Condicionamento inicial: 5 min metanol, 5 min água e 5 min mistura de anfólitos

Condicionamento entre corridas: 4 min mistura de anfólitos

Amostra: sangue coletado em EDTA (1 mg EDTA / 1 mL de sangue)

Preparo da amostra: após 5 minutos de centrifugação, 15 μL de células vermelhas do sangue são adicionadas a 200 μL de reagente hemolisante (5 mmol/L de EDTA e 10 mmol/L KCN)

Mistura de anfólitos: 4% (pH 6-8:3-10, 10:1 v/v), em 0,30% de metilcelulose.

Solução católito: 40 mmol/L de hidróxido de sódio

Solução anólito: 100 mmol/L de ácido fosfórico

Injeção: 0,5 psi / 10 s

Focalização: 30 kV / 5 min

Mobilização química: troca da solução do católito para uma solução que contém 40 mmol/L hidróxido de sódio e 80 mmol/L cloreto de sódio, mantendo a voltagem aplicada de 30 kV / 5 min

Temperatura: 25 °C

Deteção: direta, $\lambda = 415 \text{ nm}$

Apesar do aumento da concentração de anfólito não ter produzido bons resultados nos testes realizados, o uso de 4% de anfólitos na solução anfólito/metilcelulose foi adotado, porque produziu resultados melhores neste modo de mobilização. O aumento da concentração dos anfólitos pode ajudar a diminuir a adsorção de proteínas na parede do capilar, melhorando a resolução.

Após os experimentos de variação da concentração de metilcelulose, foi escolhido para o preparo mistura de anfólitos, a concentração de 0,30 % de metilcelulose. Apesar da variação da concentração não produzir melhora na resolução dos picos, uma solução de menor viscosidade permite que o preenchimento do capilar, através da aplicação de pressão, seja feito com maior facilidade.

A figura III.8 apresenta o eletroferograma obtido com a utilização do método modificado.

FIGURA III.8. Análise de hemoglobinas em hemolisado por cIEF com mobilização química

Uma mistura de hemoglobinas foi preparada a partir de amostras de sangue total contendo hemoglobinas F, S e C, fornecidas pelo Centro de Hematologia de São Paulo. Esta mistura foi analisada pelo método proposto e o eletroferograma resultante é mostrado na figura III.9.

FIGURA III.9. Análise de mistura de hemoglobinas por cIEF

Com os dados de literatura de ponto isoelétrico de cada hemoglobina e o tempo de migração, foi construído o gráfico III.2. Esta curva permite a identificação de hemoglobinas variantes com os valores do tempo de migração obtido nos eletroferogramas. Os valores de pI de cada hemoglobina estão listados na tabela III.1.

GRÁFICO III.2 – PONTO ISOELÉTRICO DE HEMOGLOBINAS NORMAIS E VARIANTES EM FUNÇÃO DO TEMPO DE MIGRAÇÃO

TABELA III.1 – VALORES DE pI DAS HEMOGLOBINAS ANALISADAS

Hemoglobina	pI
HbC	7,445
HbA ₂	7,412
HbS	7,210
HbF	7,060
HbA	6,972
HbA _{1c}	6,935

FONTE: Referência 11

A observação dos pontos isoelétricos das hemoglobinas mostra que pode se obter resolução completa entre hemoglobinas com diferença de pI de 0,033 como é o caso das hemoglobinas HbC e HbA₂, assim como entre as hemoglobinas HbA e HbA_{1c}, sendo que a HbA encontra-se em média na concentração aproximada de 90% e a HbA_{1c} a aproximadamente 10%, o que dificulta ainda mais a separação. Se considerarmos concentrações na proporção 1:1 é possível obter boa resolução entre hemoglobinas com diferença de pI de 0,01.

Um problema ocorrido durante os experimentos de otimização deste método, e que deve ser citado, foi o surgimento de outro pico após a HbA_{1c}, como apresentado na figura III.6. Este pico corresponde a um aduto da HbA, conhecida como “banda envelhecida”, denominada HbA₃, formada devido à estocagem inadequada da amostra de sangue total. O hemolisado deve ser preparado com amostras de sangue total coletadas no mesmo dia e mantido congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise.

Os parâmetros de análise do procedimento modificado foi escolhido para o estudo estatístico de amostras de hemolisado.

III.6 Resumo dos procedimentos dos métodos de análise desenvolvidos

III.6.1 Sódio e potássio

Capilar: sílica fundida, 47 cm de comprimento total, 40 cm até o detector

Eletrólito: 15 mmol/L imidazol, 5 mmol/L ácido láctico, 1 mmol/L éter coroa 18-crown-6, pH 4,50 com ácido clorídrico

Voltagem: 10 kV

Injeção: eletrocinética, 10 kV / 2 s

Condicionamento entre corridas: 2 min com eletrólito

Temperatura: 25 °C

Deteção: indireta, $\lambda=214\text{ nm}$

III.6.2 Cloreto e bicarbonato

Capilar: sílica fundida, 47 cm de comprimento total, 40 cm até o detector

Eletrólito: 5 mmol/L cromato, 0,1 mmol/L, pH 9,00

Voltagem: – 25 kV

Injeção: pressão, 0,5 psi/ 2 s

Condicionamento entre corridas: 2 min com eletrólito

Temperatura: 25 °C

Deteção: indireta, $\lambda=254$ nm

III.6.3 Acetoacetato, lactato e β -hidroxibutirato

Capilar: sílica fundida, 47 cm de comprimento total, 40 cm até o detector

Eletrólito: 15 mmol/L ácido 3,5 dinitrobenzóico, 0,1 mmol/L CTAB, pH 3,50 com ácido clorídrico

Voltagem: –15 kV

Injeção: pressão, 0,5 psi/2 s

Condicionamento entre corridas: 2 min com eletrólito

Temperatura: 25 °C

Deteção: indireta, $\lambda=254$ nm

III.6.4 Hemoglobina glicada

Capilar: DB-1 (J&W Scientific), 50 μ m d.i., 27 cm de comprimento

Condicionamento inicial: 5 min metanol, 5 min água e 5 min mistura de anfólitos

Condicionamento entre corridas: 4 min mistura de anfólitos

Amostra: sangue coletado em EDTA (1 mg EDTA / 1 mL de sangue)

Preparo da amostra: após 5 minutos de centrifugação, 15 μ L de células vermelhas do sangue são adicionadas a 200 μ L de reagente hemolisante (5 mmol/L de EDTA e 10 mmol/L KCN)

Mistura de anfólitos: 4% (pH 6-8:3-10, 10:1 v/v), em 0,30% de metilcelulose.

Solução católito: 40 mmol/L de hidróxido de sódio

Solução anólito: 100 mmol/L de ácido fosfórico

Injeção: 0,5 psi / 10 s

Focalização: 30 kV / 5 min

Mobilização química: troca da solução do católito para uma solução que contém 40 mmol/L hidróxido de sódio e 80 mmol/L cloreto de sódio, mantendo a voltagem aplicada de 30 kV / 5 min

Temperatura: 25 °C

Deteção: direta, $\lambda = 415 \text{ nm}$

III.7 Referências bibliográficas

- 1) BUCHBERGER, W.; WINNA, K.; TURNER, M. Determination of capillary electrophoresis in clinical chemistry. Determination of low-molecular mass ions in body fluids. *J. Chromatogr. A*, v. 671, p. 375-382, 1994.
- 2) LIN, T.; CHEN, Y.; LEE, Y.; KAO, T. Determination of metal cations in serum by capillary electrophoresis. *Clin. Chem.*, v. 41, p. S157, 1995.
- 3) FRANCOIS, C.; MORIN, P.; DREUX, M. Effect of the concentration of 18-crown-6 added to the electrolyte upon the separation of ammonium, alkali and alkaline-earth cations by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr A*, v. 706, p. 535-553, 1995.
- 4) YANG, Q.; SMEYERS-VERBEKE, J.; WU, W.; KHOTS, M.S.; MASSART, D.L. Simultaneous separation of ammonium and alkali, alkaline earth and transition metal ions in aqueous-organic media by capillary ion analysis. *J. Chromatogr A*, v. 688, p. 339-349, 1994.
- 5) CHEN, M.; CASSIDY, R.M.; Separation of metal ions by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.*, v. 640, p. 425-431, 1993.
- 6) BAKER, D.R. Capillary electrophoresis. New York, John Wiley, 1995. 244p.
- 7) DOLNÍK, V.; BOCEK, P. Determination of pyruvate, lactate, acetoacetate and 3-hydroxybutyrate in serum by capillary isotachopheresis. *J. Chromatogr*, v. 255, p. 455-458, 1981.
- 8) DOLNÍK, V.; DOLNÍKOVÁ, J. Capillary zone electrophoresis of organic acids in serum of critically ill children. *J. Chromatogr. A*, v. 716, p. 269-277, 1995.
- 9) HIROKAWA, T.; NISHINO, M.; AOKI, N.; KISO, Y.; SAWAMOTO, Y.; YAGI, T.; AKIYAMA, J. Table of isotacophoretic indices. *J. Chromatogr.*, v. 271, D1-D106, 1983.
- 10) COLOMBARA, R.; TAVARES, M.F.M.; MASSARO, S.; RUBIM, J.C., Method development strategy for the analysis of anionic solutes by capillary electrophoresis. *J. Cap. Elec.*, v. 3, p. 147-153, 1996.
- 11) HEMPE, J.M.; CRAVER, R.D. Quantification of hemoglobin by capillary isoelectric focusing. *Clin. Chem.*, v. 40, p. 2288-2295, 1994.

- 12) HEMPE, J.M.; GRANGER, J.N.; CRAVER, R.D. Capillary isoelectric focusing of hemoglobin pediatric clinical laboratory. *Electrophoresis*, v. 18, p. 1785-1795, 1997.
- 13) DOELMAN, C.J.A.; SIEBELDER, C.W.M.; NIJHOF, W.A.; WEYKAMP, C.W.; JANSSENS, J.; PENDERS, T. Capillary electrophoresis system for hemoglobin A_{1c} determination evaluated. *Clin. Chem.*, v. 43, p. 644-648, 1997.

IV. APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE DESENVOLVIDOS

IV.1 Sódio, potássio, cloreto, bicarbonato, acetoacetato, lactato e β -hidroxibutirato

IV.1.1 Linearidade

Os métodos de análise desenvolvidos foram testados em relação a linearidade de resposta do detector em 6 diferentes concentrações para cada metabólito. Os testes foram feitos na faixa de concentração dos metabólitos normalmente encontrada em indivíduos sadios e também para valores encontrados em indivíduos com metabolismo alterado.

A tabela IV.1 apresenta os valores de referência dos metabólitos estudados no soro humano.

TABELA IV.1 – VALORES DE REFERÊNCIA PARA OS METABÓLITOS ESTUDADOS EM SORO HUMANO EM INDIVÍDUOS SADIOS

METABÓLITO	CONCENTRAÇÃO (mmol/L)
Sódio	135 -145
Potássio	3,6 - 5,0
Cloreto	98 – 107
Bicarbonato	23 – 27
“anion – gap”	8 – 16
Acetoacetato	< 0,10
Lactato	< 2,8
β -hidroxibutirato	0,02 – 0,27

FONTE: adaptada da referência 1

Os gráficos IV.1 a IV.14 apresentam as curvas de área ou altura em função da concentração do analito. As soluções padrão utilizadas foram preparadas como uma mistura dos analitos em estudo em cada método, ou seja, os padrões utilizados na curva de sódio e potássio por exemplo, foram preparados em uma mesma solução, deste modo não há necessidade de fazer corridas separadas para cada composto. Cada solução foi analisada em triplicata.

As análises de sódio, potássio, cloreto e bicarbonato foram realizadas em um equipamento Beckman P/ACE 5510 com detector de arranjo de diodos (190-600), semelhante ao utilizado no desenvolvimento dos métodos.

As análises de acetoacetato, lactato e β -hidroxibutirato foram realizadas em um equipamento Beckman P/ACE 5510 equipado com detector UV com filtro de 254 nm. O uso deste detector para este método de análise proporcionou um aumento de sensibilidade. O limite de detecção com o detector de arranjo de diodos foi determinado como 0,1 mmol/L para os ânions orgânicos, considerando relação sinal ruído 3:1. O limite de detecção encontrado com o detector UV com filtro foi de 0,02 mmol/L para acetoacetato, lactato e β -hidroxibutirato considerando relação sinal/ruído 3:1. O limite de quantificação determinado foi de 0,05 mmol/L considerando relação sinal ruído 10:1.

GRÁFICO IV.1 – ÁREA DO PICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO NA MISTURA PADRÃO

GRÁFICO IV.2 – ALTURA DO PICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO NA MISTURA PADRÃO

GRÁFICO IV.3 – ÁREA DO PICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓDIO NA MISTURA PADRÃO

GRÁFICO IV.4 – ALTURA DO PICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓDIO NA MISTURA PADRÃO

GRÁFICO IV.5 – ÁREA DO PICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NA MISTURA PADRÃO

GRÁFICO IV.6 – ALTURA DO PICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NA MISTURA PADRÃO

GRÁFICO IV.7 – ÁREA DO PICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BICARBONATO NA MISTURA PADRÃO

GRÁFICO IV.8 – ALTURA DO PICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BICARBONATO NA MISTURA PADRÃO

GRÁFICO IV.9 – ÁREA DO PICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ACETOACETATO NA MISTURA PADRÃO

GRÁFICO IV.10 – ALTURA DO PICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ACETOACETATO NA MISTURA PADRÃO

GRÁFICO IV.11 – ÁREA DO PICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LACTATO NA MISTURA PADRÃO

GRÁFICO IV.12 – ALTURA DO PICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LACTATO NA MISTURA PADRÃO

GRÁFICO IV.13 – ÁREA DO PICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE β -HIDROXIBUTIRATO NA MISTURA PADRÃO

GRÁFICO IV.14 – ALTURA DO PICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE β -HIDROXIBUTIRATO NA MISTURA PADRÃO

A reprodutibilidade dos métodos em termos de área, altura e tempo de migração estão compilados nas tabelas IV.2 a IV.8.

TABELA IV.2 – VALORES MÉDIOS DE TEMPO DE MIGRAÇÃO, ÁREA, ALTURA E RESPECTIVOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO OBTIDOS NAS REPETIÇÕES DE DETERMINAÇÃO PARA O POTÁSSIO

C (mmol/L)	t _m MÉDIO	C.V. %	ÁREA MÉDIA	C.V. %	ALTURA MÉDIA	C.V. %
0,0680	4,57	2,07	5189	3	2161	2
0,0785	4,55	1,37	5655	2	2317	2
0,0889	4,54	1,17	5891	2	2391	1
0,0974	4,53	0,96	6046	4	2453	2
0,110	4,52	0,71	6391	1	2543	1
0,120	4,52	0,59	6861	2	2692	2

NOTA: C, concentração; t_m, tempo de migração; C.V., coeficiente de variação; análise em triplicata.

TABELA IV.3 – VALORES MÉDIOS DE TEMPO DE MIGRAÇÃO, ÁREA, ALTURA E RESPECTIVOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO OBTIDOS NAS REPETIÇÕES DE DETERMINAÇÃO PARA O SÓDIO

C (mmol/L)	t _m MÉDIO	C.V. %	ÁREA MÉDIA	C.V. %	ALTURA MÉDIA	C.V. %
1,00	5,49	2,10	243999	0,6	31994	1
2,01	5,47	1,96	257951	2	33707	2
3,01	5,46	1,80	267408	0,3	35223	2
4,02	5,45	1,75	276360	1	36206	2
5,02	5,44	1,59	285741	0,7	37285	2
6,03	5,44	1,54	291011	0,7	38112	1

NOTA: C, concentração; t_m, tempo de migração; C.V., coeficiente de variação; análise em triplicata.

TABELA IV.4 – VALORES MÉDIOS DE TEMPO DE MIGRAÇÃO, ÁREA, ALTURA E RESPECTIVOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO OBTIDOS NAS REPETIÇÕES DE DETERMINAÇÃO PARA O CLORETO

C (mmol/L)	t _m MÉDIO	C.V. %	ÁREA MÉDIA	C.V. %	ALTURA MÉDIA	C.V. %
1,00	1,16	0,86	5424	6	10212	17
2,01	1,16	0,50	10523	5	18425	4
3,01	1,17	0,49	15907	3	25542	8
4,02	1,17	0,99	20776	4	31803	4
5,02	1,16	0,50	26407	2	36254	7
6,03	1,16	0,00	31412	1	40170	1

NOTA: C, concentração; t_m, tempo de migração; C.V., coeficiente de variação; análise em triplicata.

TABELA IV.5 – VALORES MÉDIOS DE TEMPO DE MIGRAÇÃO, ÁREA, ALTURA E RESPECTIVOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO OBTIDOS NAS REPETIÇÕES DE DETERMINAÇÃO PARA O BICARBONATO

C (mmol/L)	t _m MÉDIO	C.V. %	ÁREA MÉDIA	C.V. %	ALTURA MÉDIA	C.V. %
0,515	1,86	0,93	4594	15	2806	7
1,03	1,82	0,00	10327	17	4363	7
1,29	1,82	0,64	12267	12	4785	4
1,54	1,80	1,40	14613	4	5560	7
1,80	1,80	1,70	15894	22	5996	18
2,06	1,77	1,98	19756	6	7013	12

NOTA: C, concentração; t_m, tempo de migração; C.V., coeficiente de variação; análise em triplicata.

TABELA IV.6 – VALORES MÉDIOS DE TEMPO DE MIGRAÇÃO, ÁREA, ALTURA E RESPECTIVOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO OBTIDOS NAS REPETIÇÕES DE DETERMINAÇÃO PARA O ACETOACETATO

C (mmol/L)	t _m MÉDIO	C.V. %	ÁREA MÉDIA	C.V. %	ALTURA MÉDIA	C.V. %
0,0461	5,66	0,84	741	16	353	14
0,184	5,62	0,74	3322	13	1447	9
0,369	5,60	0,52	6320	4	2429	3
0,522	5,57	0,99	9285	8	3265	6
0,676	5,57	0,75	11510	5	3803	3
0,830	5,56	0,65	13800	2	4333	1

NOTA: C, concentração; t_m, tempo de migração; C.V., coeficiente de variação; análise em triplicata.

TABELA IV.7 – VALORES MÉDIOS DE TEMPO DE MIGRAÇÃO, ÁREA, ALTURA E RESPECTIVOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO OBTIDOS NAS REPETIÇÕES DE DETERMINAÇÃO PARA O LACTATO

C (mmol/L)	t _m MÉDIO	C.V. %	ÁREA MÉDIA	C.V. %	ALTURA MÉDIA	C.V. %
0,531	6,50	0,76	12281	9	3066	7
1,59	6,39	0,80	38375	10	6192	5
2,65	6,35	0,57	59431	14	7994	2
3,72	6,28	1,17	90104	11	10171	5
4,78	6,26	0,80	111369	4	11485	3
5,84	6,24	0,73	133786	1	12731	0,4

NOTA: C, concentração; t_m, tempo de migração; C.V., coeficiente de variação; análise em triplicata.

TABELA IV.8 – VALORES MÉDIOS DE TEMPO DE MIGRAÇÃO, ÁREA, ALTURA E RESPECTIVOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO OBTIDOS NAS REPETIÇÕES DE DETERMINAÇÃO PARA O β -HIDROXIBUTIRATO

C (mmol/L)	t _m MÉDIO	C.V. %	ÁREA MÉDIA	C.V. %	ALTURA MÉDIA	C.V. %
0,0481	8,91	0,52	1098	13	345	9
0,192	8,83	0,75	5771	9	1556	8
0,385	8,82	0,52	10784	8	2663	2
0,545	8,79	0,99	16436	11	3682	7
0,706	8,77	0,74	20341	3	4345	3
0,866	8,78	0,75	24422	10	4923	0,1

NOTA: C, concentração; t_m, tempo de migração; C.V., coeficiente de variação; análise em triplicata.

Os coeficientes de correlação (r), para as curvas de calibração dos gráficos IV.1 a IV.14 são apresentados na tabela IV.9.

TABELA IV.9 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS METABÓLITOS ANALISADOS

METABÓLITO	r	r
	ÁREA	ALTURA
Potássio	0,9906	0,9901
Sódio	0,9918	0,9907
Bicarbonato	0,9935	0,9952
Cloreto	0,9999	0,9902
Acetoacetato	0,9990	0,9895
Lactato	0,9989	0,9868
β -hidroxibutirato	0,9987	0,9910

NOTA: r, coeficiente de correlação.

IV.1.2 Análise de soro controle

IV.1.2.1 Resultados das análises

O soro controle (Control Serum N – human) fornecido pela Roche foi analisado pelos métodos propostos. A tabela IV.10 apresenta os valores determinados por métodos de referência fornecidos pelo fabricante.

TABELA IV.10 – CONCENTRAÇÕES DOS ANALITOS NO SORO CONTROLE (CONTROL SERUM N – HUMAN – ROCHE) FORNECIDAS PELO FABRICANTE

CONSTITUINTE	MÉTODO DE ANÁLISE	VALOR DETERMINADO (mmol/L)	FAIXA DE CONFIANÇA	FAIXA PERMITIDA
Sódio	Fotometria de chama	136	-	128-144
	ISE - direto (Cobas Mira)	141	134-148	133-149
	ISE - indireto (Cobas integra)	136	129-143	128-144
Potássio	Fotometria de chama	4,28	-	3,94-4,62
	ISE - direto (Cobas Mira)	4,40	4,18	4,05-4,75
	ISE - indireto (Cobas Integra)	4,24	4,03 – 4,45	128-144
continua				

continuação				
CONSTITUINTE	MÉTODO DE ANÁLISE	VALOR DETER- MINADO (mmol/L)	FAIXA DE CONFIANÇA	FAIXA PERMITIDA
Cloreto	Coulometria	100	-	94-106
	ISE - direto (Cobas Mira)	103	98-108	97-109
	ISE - direto (Cobas Inte- gra)	98	93-103	92-104
	ISE - indireto (Cobas Inte- gra)	98	93-103	92-104
Lactato	Lactato oxi- dase (Cobas Inte- gra)	1,02	0,92-1,12	0,82-1,22

NOTA: ISE, eletrodo íon-seletivo.

As amostras de soro foram analisadas 20 vezes, em um mesmo dia, por cada método proposto. Os resultados são apresentados na tabela IV.11.

TABELA IV.11 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE POTÁSSIO, SÓDIO, CLORETO E LACTATO NO SORO CONTROLE CALCULADOS PELA ÁREA E ALTURA DO PICO

METABÓLITO	t_m MÉDIO	C.V. %	C (mmol/L) ÁREA	C.V. %	C (mmol/L) ALTURA	C.V. %
Potássio	4,60	1,32	4,40	4,71	4,26	4,27
Sódio	6,38	1,88	137	4	137	3
Cloreto	1,27	4,66	96	5	96	5
Lactato	6,89	3,64	1,17	9,98	1,28	4,86

NOTA: C, concentração; t_m , tempo de migração; C.V., coeficiente de variação (n=20).

A uma alíquota do soro controle foi adicionada solução padrão de acetoacetato e β -hidroxibutirato, e a concentração final dos analitos no soro controle foi de 0,0922 mmol/L de acetoacetato e 0,0962 mmol/L de β -hidroxibutirato.

O soro controle “fortificado” com padrão foi analisado pelo método proposto com a finalidade de verificar a recuperação, o coeficiente de variação do tempo de migração e da concentração de 20 análises consecutivas em um mesmo dia, seguindo o mesmo procedimento adotado com o soro controle para os outros métodos. A recuperação do método é calculada pelo quociente da resposta do analito na amostra com respeito à resposta do analito no padrão, multiplicado por 100.

A tabela IV.12 apresenta os resultados obtidos para as análises de acetoacetato e β -hidroxibutirato no soro controle.

TABELA IV.12 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE ACETOACETATO E β -HIDROXIBUTIRATO NO SORO CONTROLE CALCULADOS PELA ÁREA E ALTURA DO PICO

METABÓ- LITO	t_m MÉDIO	C.V %	C (mmol/L) ÁREA	C.V %	C (mmol/L) ALTURA	C.V %	RECUPE- RAÇÃO %
Acetoace- tato	6,01	2,40	0,0745	12,6	0,074	7,10	Área: 81 Altura: 81
β -hidroxi- butirato	9,48	2,17	0,0649	13,5	0,0589	14,3	Área: 68 Altura: 61

NOTA: C, concentração; t_m , tempo de migração; C.V., coeficiente de variação (n=20).

A análise de bicarbonato em soro controle deve ser feita com um soro padrão específico, fabricado especialmente para análise de amônia, CO₂ e etanol. Este soro não estava disponível para a comparação de métodos para o bicarbonato.

IV.1.2.2 Comparação dos resultados das análise com os valores certificados utilizando o teste *t*

O teste *t* é usado para checar se existem diferenças estatísticas entre uma média experimental e um valor estabelecido por outro método.²

A tabela IV.13 apresenta os valores do teste *t* calculados para os metabólitos potássio, sódio, cloreto e lactato, para a concentração calculada pela área e pela altura do pico. Os valores estabelecidos por outros métodos também utilizados no cálculo foram apresentados na tabela IV.10.

TABELA IV.13 - RESULTADOS DO TESTE *t* PARA OS METABÓLITOS ANALISADOS NO SORO CONTROLE

METABÓLITO	MÉTODO DE REFERÊNCIA	VALOR DE <i>t</i>	
		Área	Altura
Potássio	Fotometria de chama	2,55	0,49
	ISE - direto (Cobas Mira)	0	3,41
	ISE - indireto (Cobas Integra)	3,40	0,49
Sódio	Fotometria de chama	0,8	1,04
	ISE - direto (Cobas Mira)	3,2	4,2
	ISE - indireto (Cobas Integra)	0,8	1,04

continua

continuação

METABÓLITO	MÉTODO DE REFERÊNCIA	VALOR DE t	
		Área	Altura
Cloreto	Coulometria	3,57	3,57
	ISE - direto (Cobas Mira)	6,25	6,25
	ISE - direto (Cobas Integra)	1,78	1,78
	ISE - indireto (Cobas Integra)	1,78	1,78
Lactato	Lactato oxidase (Cobas Integra)	5,5	17,8

NOTA: Valor de t para 19 graus de liberdade e 95% de nível de confiança é 2,10.

IV.1.3 Análise das amostras reais

Após o desenvolvimento dos métodos de análise, 8 amostras de pacientes diabéticos foram analisadas em duplicata. Os resultados são apresentados na tabela IV.14. Todas as análises foram feitas utilizando o equipamento Beckman PACE/5510, com detector de arranjo de diodos (190-600 nm). Mesmo com o limite de quantificação maior que 0,1 mmol/L, determinado com este tipo de detector, os ânions acetoacetato e β -hidroxibutirato foram quantificados para que se tivesse uma estimativa dos valores encontrados em amostras de indivíduos diabéticos.

TABELA IV.14 – RESULTADO DAS ANÁLISES DE SÓDIO, POTÁSSIO, CLORETO, BICARBONATO, “ANION – GAP”, ACETOACETATO, LACTATO E β -HIDROXIBUTIRATO DAS AMOSTRAS DE SORO HUMANO

SORO	Na ⁺ mmol/L	C.V %	K ⁺ mmol/L	C.V %	Cl ⁻ mmol/L	C.V %	HCO ₃ ⁻ mmol/L	C.V %	“Anion- Gap” mmol/L	C.V %	Lactato mmol/L	C.V %	Aceto- acetato mmol/L	C.V %	β - hidroxi- butirato mmol/L	C.V %
01	4,9	1,7	151	6	92	7	13	4	51	12	2,6	8,8	0,2	3,0	0,2	4,0
02	4,9	2,6	151	5	112	7	21	5	22	11	2,6	0,8	<l.d.	-	<l.d.	-
03	5,5	7,4	147	7	97	7	25	9	30	13	2,4	5,0	0,2	14,9	0,1	5,7
04	4,3	2,7	157	7	102	7	19	5	40	13	4,3	4,7	<l.d.	-	0,1	6,7
05	4,3	3,8	169	11	97	7	24	7	52	19	1,5	0,9	<l.d.	-	<l.d.	-
06	4,6	6,7	163	6	85	8	38	27	45	15	2,1	6,5	0,2	13,2	0,1	12,9
07	4,2	1,9	168	9	95	3	28	21	49	16	2,8	4,2	<l.d.	-	0,3	9,1
08	4,6	11,2	150	4	100	4	24	20	30	9	1,8	1,0	<l.d.	-	0,1	6,7
I.d.											0,1		0,1		0,1	

NOTA: I.d., limite de detecção; C.V., coeficiente de variação; análise em duplicata; valores calculados pela área do pico.

IV.2 Hemoglobina glicada

IV.2.1 Análise de amostras de hemolisado

O método desenvolvido por cIEF foi aplicado na análise de hemolisado preparados conforme procedimento descrito anteriormente. A tabela IV.15 apresenta a média do tempo de migração e a porcentagem de hemoglobina glicada das amostras analisadas em triplicata. Os resultados da hemoglobina glicada fornecido pelo laboratório Campana, analisados pelo método Variant (Bio-Rad), para cada amostra também são apresentados.

O método Variant – Hemoglobin A_{1c} Program (Bio-Rad) utiliza o princípio de troca iônica da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A amostra preparada (5 µL de sangue total adicionados a 1,0 mL de reagente hemolisante) é automaticamente injetada em fluxo e aplicada à coluna de troca catiônica, onde a hemoglobina é separada baseada na interação da hemoglobina A_{1c} com o material da coluna. A hemoglobina separada passa por uma célula de fotômetro de filtro e a variação de absorbância em 415 nm é medida. O tempo de análise é de 3 minutos por amostra.³

TABELA IV.15 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE HEMOGLOBINAS GLICADAS POR cIEF

AMOSTRA	t _m MÉDIO	C.V. %	HbA _{1c} % cIEF	C.V. %	HbA _{1c} % Variant
09	7,23	3,01	8,9	14,1	5,6
10	7,02	1,31	7,1	3,9	5,1
11	7,16	1,21	8,1	14,1	5,2
12	6,95	0,72	6,2	2,6	4,8
13	6,82	0,42	7,1	10,7	4,9

continua

continuação

AMOSTRA	t _m MÉDIO	C.V. %	HbA _{1c} % cIEF	C.V. %	HbA _{1c} % Variant
14	6,69	0,84	6,5	5,0	5,3
15	6,87	0,14	6,5	2,0	5,2
16	7,13	1,24	7,5	6,2	4,5
17	7,17	1,34	13,5	7,7	12,1
18	7,44	3,23	12,4	6,4	11,2
19	7,53	5,29	13,4	10,7	12,2
20	7,22	2,1	13,9	10,5	11,0
21	7,14	0,40	6,3	0,7	4,9
22	7,05	2,50	9,4	11,4	7,4
23	7,12	1,13	9,9	7,8	10,3
24	7,03	0,25	12,6	4,8	13,1
25	6,95	0,58	7,3	7,9	7,1
26	6,90	0,22	7,8	0,6	5,8
27	7,27	5,33	10,4	6,9	9,4
28	7,67	3,79	11,6	9,3	8,5
29	7,32	1,10	11,8	3,9	9,3
30	7,06	4,91	12,9	5,7	10,2
31	7,22	4,60	12,8	10,1	11,8
32	7,11	3,77	11,8	4,0	11,2
33	7,09	1,69	11,8	6,6	9,2
34	7,07	2,45	11,6	2,6	11,6
35	6,93	0,17	13,7	0,4	11,0
36	7,67	1,92	12,6	3,2	11,0
37	7,68	3,17	15,8	0,3	13,1
38	6,98	0,50	12,8	1,2	10,4
39	6,93	0,22	12,8	3,1	11,7

NOTA: t_m, tempo de migração; C.V., coeficiente de variação; níveis de HbA_{1c} de indivíduos não-diabéticos para o método Variant é < 6% e para diabéticos sob controle é de 7 – 8 %.³

A quantificação de hemoglobinas é baseada na integração de pico em 415 nm, com os valores expressos como porcentagem de hemoglobina total, isto é, a área da HbA_{1c} ou outra hemoglobina variante dividida pela área total dos picos.

Com os dados da tabela IV.15 foi construído o gráfico de correlação IV.15 entre os resultados obtidos por cIEF e pelo método Variant (Bio-Rad).

GRÁFICO IV.15 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA GLICADA ANALISADA POR CIEF E O MÉTODO VARIANT (Bio-Rad)

Quando a comparação de dois métodos de análise é feita através de uma curva de correlação como a apresentada anteriormente, se os dois métodos fornecerem resultados idênticos, a equação da curva de regressão linear terá zero como valor de coeficiente linear, e coeficiente angular e coeficiente de correlação (r) igual a 1. Ao construir um gráfico de correlação com valores experimentais, o coeficiente linear e angular devem ser avaliados para se verificar se os resultados são estatisticamente diferentes de 0 e 1 respectivamente. Este teste pode ser feito calculando o limite de confiança para os coeficientes ou utilizando o teste t .^{4,5}

Para os coeficientes da equação do gráfico IV.15 foram calculados os erros, limites de confiança a 95% de probabilidade e os valores de t . Os resultados estão resumidos na tabela IV.16.

TABELA IV.16 – RESULTADOS DOS CÁLCULOS DE ERRO, LIMITE DE CONFIANÇA E TESTE t PARA A CURVA DE CORRELAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS cIEF e VARIANT (Bio-Rad).

COEFICIENTE	VALOR	ERRO	LIMITE DE CONFIANÇA	t
Angular	0,893	0,0629	0,128	1,69
Linear	2,64	0,58	1,19	4,52

NOTA: Valor de t para 29 (n-2) graus de liberdade e 95% de nível de confiança é 2,04.

IV.2.2 ANOVA

Para a validação de um novo método bioanalítico para análise de rotina em estudos clínicos é sugerido que a precisão seja testada em quatro concentrações diferentes, em replicatas de seis, em quatro dias diferentes. Este procedimento permite que o método seja analisado pelo ANOVA (“One-way analysis of variance”) que fornece a estimativa da precisão intra-ensaio e inter-ensaio do método.²

Quatro amostras de diferentes concentrações foram escolhidas e analisadas seis vezes em quatro dias diferentes. Estes resultados foram analisados pelo método ANOVA no programa Origin 5.0 (Microcal Software). O cálculo também pode ser feito pelo programa EXCEL 97 (Microsoft), onde é fornecido o valor de F crítico e o valor de F calculado para os valores selecionados. Se o F determinado for maior do que o valor crítico, as médias de cada dia são estatisticamente diferentes. Os resultados das análises são apresentados na tabela IV.17.

TABELA IV.17 – RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DAS ANÁLISES UTILIZADOS NO CÁLCULO ANOVA

AMOSTRA	HbA _{1c} %			
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
40	6,4	6,1	6,3	6,9
	6,7	7,1	5,3	5,8
	6,5	7,1	6,0	8,2
	8,0	7,3	5,5	6,3
	7,2	6,4	5,8	6,3
	6,9	6,4	7,2	6,3
41	9,9	9,6	10,0	9,5
	9,8	10,6	10,6	11,8
	9,6	10,4	9,8	11,7
	9,7	10,5	9,7	10,5
	10,3	9,8	9,2	10,6
	10,0	7,5	10,4	10,5
42	12,5	12,8	14,2	11,3
	13,9	14,1	12,8	12,0
	11,6	12,9	13,2	11,4
	12,5	13,4	12,3	12,5
	11,5	10,8	13,3	12,1
	13,5	13,6	12,2	11,6

continua

continuação

AMOSTRA	HbA _{1c} %			
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
43	7,8	6,2	6,9	7,7
	7,1	6,5	6,9	7,9
	7,2	6,8	7,1	6,4
	6,5	6,8	7,1	6,7
	7,4	7,3	7,8	6,5
	6,1	7,5	7,8	8,2

Os valores das médias, variâncias e F fornecidos pelo programa para os valores contidos na tabela IV.17 são apresentados na tabela IV.18.

TABELA IV.18 – RESULTADOS CALCULADOS PELO MÉTODO ANOVA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE HEMOGLOBINA GLICADA

AMOSTRA	HbA _{1c} MÉDIA %				VARIÂNCIA				F
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	
40	7,0	6,7	6,0	6,6	0,4	0,2	0,5	0,7	2,21
41	9,9	9,7	10,0	10,7	0,1	1,4	0,2	0,8	2,00
42	12,6	12,9	13,0	11,8	0,9	1,3	0,5	0,2	2,30
43	7,0	6,8	7,3	7,2	0,3	0,2	0,2	0,6	0,66

NOTA: F crítico = 3,09; 95 % de nível de confiança.

Os valores de tempo de migração das hemoglobinas glicadas também foram analisadas pelo método ANOVA. Os dados são apresentados na tabela IV.19.

TABELA IV.19 – RESULTADOS DE TEMPO DE MIGRAÇÃO DAS ANÁLISES UTILIZADOS NO CÁLCULO ANOVA

AMOSTRA	t_m (minutos)			
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
40	7,12	7,03	7,18	7,15
	7,14	6,94	7,15	7,20
	7,13	6,94	7,28	7,15
	7,10	7,02	7,10	7,17
	7,09	7,25	7,10	7,12
	7,12	6,95	7,23	7,12
41	7,13	7,01	7,32	7,24
	7,04	6,95	7,32	7,05
	7,06	6,84	7,32	7,01
	7,02	6,92	7,22	7,21
	6,94	7,05	7,29	7,07
	7,10	7,39	7,17	7,07
42	7,02	7,33	7,47	7,01
	6,98	7,09	7,37	7,13
	6,93	7,19	7,09	7,00
	6,94	7,11	7,02	6,99
	6,94	7,32	7,02	6,91
	6,91	7,06	7,05	6,93

continua

continuação

AMOSTRA	t_m (minutos)			
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
43	6,97	6,94	6,88	6,97
	6,98	6,92	6,90	6,99
	6,98	6,94	6,90	6,97
	6,97	6,90	6,88	7,04
	6,96	6,91	6,90	7,05
	6,96	6,92	6,88	7,09

NOTA: t_m , tempo de migração.

Os valores das médias, variâncias e F fornecidos pelo programa para os valores contidos na tabela IV.19 são apresentados na tabela IV.20.

TABELA IV.20 – RESULTADOS CALCULADOS PELO MÉTODO ANOVA PARA OS TEMPOS DE MIGRAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA

AMOSTRA	t _m (minutos)				VARIÂNCIA				F
	%								
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	
40	7,12	7,02	7,17	7,15	0,0003	0,01	0,005	0,0009	5,22
41	7,05	7,03	7,27	7,11	0,004	0,04	0,004	0,009	5,51
42	6,95	7,18	7,17	7,00	0,002	0,01	0,04	0,006	5,53
43	6,97	6,92	6,89	7,02	0,0005	0,0002	0,0001	0,002	26,4

NOTA: F crítico = 3,09; 95% de nível de confiança.

IV.3 Referências bibliográficas

- 1) KAPLAN, L.A.; PESCE, A. *Clinical Chemistry. Theory, Analysis, Correlation*. 3 ed. New York, Mosby, 1996. Cap. 32, p. 613 – 641: Diabetes mellitus.
- 2) KAPLAN, L.A.; PESCE, A. *Clinical Chemistry. Theory, Analysis, Correlation*. 3 ed. New York, Mosby, 1996. Cap. 19, p. 342 – 364: Laboratory statistics.
- 3) BIO-RAD. *Variant Hemoglobin A_{1c} Program. Instruction Manual*. Hercules, Bio-Rad Laboratories, October, 1997.
- 4) MILLER, J.C.; MILLER, J.N. *Statistics for analytical chemistry*. 3 ed. New York, Ellis Horwood, 1993. 233p.
- 5) DEVORE, J.L. *Probability and Statistics for Engineering and the Sciences*. 2 ed. Monterey, Brooks, 1987. Cap. 12, p. 450 – 496: Simple Linear Regression and Correlation.

V. DISCUSSÃO

V.1 Sódio, potássio, cloreto, bicarbonato, acetoacetato, lactato e β -hidroxibutirato

A eletroforese capilar tem sido desenvolvida e aplicada à análise simultânea de uma grande variedade de cátions e ânions em diversas matrizes.^{1,2} A determinação de cátions e ânions em matrizes biológicas apresenta a vantagem da utilização de um mesmo método de análise para vários analitos, prática menos comum nas técnicas convencionais. O fato de não ser necessário um pré-tratamento das amostras, utilização de volumes pequenos de amostra e a rapidez com que a análise pode ser conduzida estão entre os motivos a favor do uso da eletroforese capilar em análises clínicas.

Roger Causon em artigo publicado no *Journal of Chromatography* sugere um procedimento para validação de métodos cromatográficos bioanalíticos. Este procedimento foi baseado em um consenso sobre as exigências necessárias para validação de método analítico durante a conferência sobre Validação de Métodos Analíticos, realizada em Washington, 1990.³ Neste artigo, o autor apresenta os fatores que devem ser avaliados: recuperação, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, seletividade, estabilidade e aplicação do método a amostras reais.

Os métodos desenvolvidos neste trabalho foram avaliados em relação à seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão e recuperação. A análise de amostras de soro humano também foram incluídas no estudo.

A seletividade é demonstrada em métodos cromatográficos e eletroforéticos pela separação de picos dos analitos em estudo presentes na amostra e foi apresentada no desenvolvimento dos métodos. Na análise de soro humano, a complexidade da amostra e a presença de possíveis interferentes dificultam o desenvolvimento do método. Outro agravante inclui a variedade de metabólitos que podem ser gerados por exemplo, pelo uso de medicamentos, e que pode variar de um indivíduo para outro. Durante o desenvolvimento e aplicação dos métodos desenvolvidos, foram avaliadas

diversas amostras, e apesar da ocorrência de picos não identificados, não foi observada a co-migração de analitos (Capítulo III).

A sensibilidade é expressa por limites de detecção e quantificação. O limite de detecção e quantificação para o sódio, potássio, cloreto e bicarbonato não foram determinados. A concentração destes analitos no soro apresentam valores elevados, e a análise requer a diluição da amostra.

A sensibilidade obtida para os ânions orgânicos (acetoacetato, lactato e β -hidroxibutirato) com o uso do detector UV com filtro foi melhor do que a determinada com detector de arranjo de diodos, conforme descrito nos resultados apresentados (Capítulo IV.1.1). Portanto, a escolha criteriosa do tipo de detector, para a análise de ânions orgânicos pelo método de detecção indireta proposto, é de fundamental importância para a análise de amostras reais, como ficou demonstrado nas concentrações estimadas de acetoacetato e β -hidroxibutirato em amostras de soro de pacientes diabéticos. Os limites de quantificação determinados para os ânions orgânicos com o uso do detector UV com filtro, de maior sensibilidade, está próximo aos níveis encontrados em indivíduos saudáveis, conforme valores apresentados na tabela IV.1.

As curvas de calibração apresentaram boa linearidade na faixa de concentração estudada, com coeficiente de correlação acima de 0,99, com exceção das curvas de altura do pico em função da concentração para o acetoacetato (gráfico IV.10) e lactato (gráfico IV.12). A construção das curvas de área e altura de pico em função da concentração teve como objetivo verificar qual parâmetro apresenta menor coeficiente de variação (C.V) e maior coeficiente de correlação, e conseqüentemente, ser escolhido para a quantificação das amostras.

O coeficiente de variação para o ponto de menor concentração da curva de altura em função da concentração do cloreto apresentou coeficiente de variação maior do que 15% (tabela IV.4), o máximo permitido de acordo com a referência pesquisada.³ A curva de calibração para o cloreto foi construída com valores excessivamente abaixo e acima dos valores normais de concentração de indivíduos normais (tabela IV.1), considerando a diluição

da amostra de 1:20, v/v. Neste caso a exclusão do primeiro ponto não causa a inutilidade do método para a análise de cloreto em soro humano. O mesmo não ocorre com a curva do bicarbonato, onde o C.V. é alto em vários pontos da curva (tabela IV.5), o que compromete a utilização do método em análises de rotina, antes de se fazer um estudo para se determinar a causa dos altos valores de C.V., como a instabilidade da amostra por exemplo, e de providências para diminuir os valores de desvio. A curva de área em função da concentração para o acetoacetato apresenta C.V de 16% para o primeiro ponto da curva, como apresentado na tabela IV.6. Neste caso, a concentração de aproximadamente 0,05 mmol/L de acetoacetato deve ser mantida na curva, pois para este metabólito é importante a análise de concentrações abaixo de 0,1 mmol/L.

Em relação às curvas de calibração de sódio e potássio, é nítido que ao dobrar a concentração do analito, a respectiva área ou altura não aumenta na mesma proporção (tabelas IV.2 e IV.3). Nestes casos as equações destas curvas não apresentam coeficiente linear próximo de zero, o que seria de se esperar, pois a injeção de água deionizada não apresenta picos relativos a estes analitos. No método de análise para sódio e potássio foi utilizada a injeção por voltagem, e neste modo de injeção não ocorre uma transferência de massa representativa da composição total da solução analisada, como ocorre nos métodos de injeção hidrodinâmicos. Ao aplicar a tensão para a injeção da amostra, o início do processo é marcado pela etapa de pré-concentração, ou seja, a transferência seletiva dos cátions para o interior do capilar. A capacidade desta pré-concentração é limitada, e eventualmente ocorre a injeção de todos os componentes presentes da amostra, em detrimento dos íons de menor mobilidade. O fenômeno descrito é possivelmente a causa do aumento das áreas e alturas de picos em função da concentração não ocorrer da mesma maneira quando a injeção hidrodinâmica é utilizada.

As análises de potássio, sódio, cloreto realizadas no soro controle Roche forneceram resultados equivalentes aos valores fornecidos pelo fabricante, com no mínimo um dos métodos de referência para cada analito,

de acordo com valores de t calculados, menores do que o valor t crítico para 95 % de nível de confiança, como apresentado na tabela IV.13.

Os valores de concentração de potássio calculados a partir da altura do pico, concordam com os valores fornecidos para fotometria de chama e ISE-indireto, e os cálculos por área apresentam resultados equivalentes somente quando comparado a ISE-direto.

A análise de sódio no soro controle apresentou resultados equivalentes aos métodos de fotometria de chama e ISE-indireto, tanto com cálculos a partir de área como altura de pico.

As concentrações de cloreto analisadas no soro controle forneceram resultados equivalentes aos métodos ISE-direto e ISE indireto (Cobas Integra), com o uso de área e altura de pico para os cálculos.

A concentração de lactato analisada pelo método proposto não concorda com o valor certificado no soro controle, pois o valor de t calculado excede o valor de t crítico. Porém, se o cálculo de exatidão, comparado ao valor certificado for feito pelo método exposto na referência 1 (equação V.1), o resultado do desvio entre a concentração analisada e a concentração estabelecida pelo fabricante é de 14,7%. O máximo aceitável é de 15% de acordo com a referência pesquisada, portanto o valor pode ser aceito. Além disso, o valor determinado está dentro da faixa permitida para o lactato pelo método de referência (tabela IV.10).

$$\% \text{ desvio} = \frac{\text{valor medido} - \text{valor verdadeiro}}{\text{valor verdadeiro}} \times 100 \quad [\text{V.1}]$$

O coeficiente de variação dos tempos de migração das soluções padrão e no soro controle apresentaram valores abaixo de 5%, o que indica ser possível a identificação dos metabólitos no soro através do tempo de migração.

O acondicionamento entre corridas para todos os métodos foi feito apenas com solução de eletrólito, e não houve a necessidade de lavagens

com hidróxido de sódio por exemplo, para a manutenção da estabilidade das separações e do tempo de migração.

O método de análise de ânions orgânicos utiliza soro sem diluição, o que pode causar entupimento do capilar e adsorção de proteínas na paredes interiores do capilar, provocando variações elevadas no tempo de migração. Porém, este fato não foi observado. Durante os experimentos de desenvolvimento do método, foram utilizadas amostras de plasma, e neste caso, foi observada uma maior incidência de entupimento do capilar durante as análises, e a partir de então, somente amostras de soro foram utilizadas.

A recuperação calculada para o acetoacetato e β -hidroxibutirato soro controle ao qual foram adicionados concentrações conhecidas do metabólito apresentaram valores acima de 50%, sugerido pela referência pesquisada, apesar de valores de recuperação maiores são desejáveis pois melhoram a sensibilidade do método.³

A aplicação dos métodos de análise a amostras de soro humano de indivíduos diabéticos (tabela IV.14), apresentou valores acima do normal (tabela IV.1) para o “anion-gap”. A presença de acetoacetato e β -hidroxibutirato também indicam alterações do metabolismo. Dados a respeito da concentração de glicose nas amostras, idade, sexo e raça destes indivíduos não foram fornecidos, e estas análises tiveram o único objetivo de avaliar a aplicabilidade dos métodos desenvolvidos em relação aos metabólitos estudados.

Os metabólitos estudados estão relacionados não apenas ao diabetes, mas também a outras doenças. Os níveis de sódio e cloreto estão relacionados à doenças do fígado e coração, problemas renais e anormalidades gastrointestinais, por exemplo. A concentração de potássio é indicativo de acidose, alcalose, aumento da insulina plasmática, ingestão de diuréticos, entre outras.⁴

Outros metabólitos observados nos eletroferogramas, como cálcio, magnésio, e fosfato, também estão relacionados a doenças e desordens metabólicas.⁴ A resolução completa entre estes íons e os outros

componentes presentes no soro humano, favorece a aplicação dos métodos desenvolvidos também na análise destes analitos.

V.2 Hemoglobina glicada

A identificação e quantificação precisa de hemoglobinas variantes normais e anormais são clinicamente importantes para o diagnóstico de hemoglobinopatias e no controle de muitas doenças. A quantificação de hemoglobinas variantes normais como a HbA₂ e HbF fornece importantes informações para o diagnóstico de pacientes com síndrome de talassemia, por exemplo, e a quantificação da HbA_{1c} é largamente utilizada para monitorar o diabetes, porque a quantidade de HbA_{1c} formada está relacionada ao controle da glicose sanguínea dos últimos três meses.

A maioria dos laboratórios emprega diferentes ensaios para atender as múltiplas análises necessárias: cromatografia de troca iônica ou de afinidade para a HbA₂ e HbA_{1c}, desnaturação alcalina para HbF, e focalização isoelétrica capilar e HPLC para uma grande variedade de hemoglobinas variantes normais e anormais. Dos métodos existentes, a cromatografia líquida de alta eficiência é a mais empregada, devido a sensível detecção em linha e a versatilidade das colunas. As desvantagens incluem custo elevado da instrumentação e da manutenção das colunas e reagentes.

Apesar do reconhecimento da alta resolução da focalização isoelétrica, o método clássico em gel é laborioso e demorado, impedindo o uso em análises de rotina. A focalização isoelétrica capilar (cIEF) alia a alta resolução com a automação da instrumentação comercial.

O método proposto foi comparado a um método de HPLC de referência e avaliado em relação a precisão inter e intra-ensaio para a hemoglobina variante normal HbA_{1c}.

A curva de correlação entre o método de cIEF e o método de referência (gráfico IV.15) apresentou coeficiente de correlação (r) 0,9338, coeficiente linear 2,64 e coeficiente angular 0,89. O valor do coeficiente

angular não é estatisticamente diferente de 1,00 e o coeficiente linear é estatisticamente diferente de zero, conforme os valores de limite de confiança e *t* calculados (tabela IV.16).

O coeficiente angular equivalente a 1 indica que existe correlação entre os métodos, e o valor do coeficiente de correlação de 0,9338 reforça o modelo de regressão linear adotado.³ Porém, o coeficiente linear diferente de zero indica que o método desenvolvido por cIEF fornece resultados maiores quando comparado ao método Variant para uma dada concentração de hemoglobina A_{1c}. Esta observação indica a necessidade de se determinar a faixa de referência para o método proposto, ou seja, qual a concentração média de HbA_{1c} em indivíduos sadios, pois o valor normal para o método Variant (4,7-6,4%) não corresponde ao valor determinado pelo método proposto. A faixa de concentração de HbA_{1c} para indivíduos sadios varia com o método, como exemplificado na referência 4, onde são apresentados os valores de referência para diferentes métodos.⁵ Uma possibilidade, é a partir da curva de correlação, se determinar a faixa normal para o método de cIEF. Este cálculo, fornece a faixa de 6,8 - 8,4%.

O resultado obtido para a quantificação da HbA_{1c} pelo método ANOVA, para as quatro concentrações estudadas foi de que as médias das concentrações dos quatro dias não são estatisticamente diferentes, para 95% de nível de confiança (tabela IV.18). O período dos testes foi de 4 semanas, o que indica que o hemolisado pode ser conservado no mínimo por um mês a -20 °C.

O resultado obtido para o tempo de migração pelo método ANOVA, para as quatro concentrações estudadas foi de que as médias dos tempos de migração dos quatro dias são estatisticamente diferentes, em 95% de nível de confiança, conforme valores de *F* apresentados na tabela IV.20.

Os tempos de migração apesar de apresentarem coeficientes de variação abaixo de 6% não são equivalentes em dias de análise diferentes. O problema pode ser contornado com o uso diário de uma amostra controle de hemoglobinas. A variação diária do tempo de migração é pequena e a análise de um controle no início do dia de trabalho, ou uma mistura de

hemoglobinas como a apresentada no desenvolvimento dos métodos, é suficiente para a identificação correta dos picos. Após o término do dia de trabalho, o capilar foi armazenado seco, como procedimento apresentado anteriormente (Capítulo III.5). O uso contínuo do capilar, e a sucessão de lavagens podem causar modificações na superfície interna do capilar que podem ser a causa da maior variação do tempo de migração de um dia para o outro, mas não é suficiente para causar valores elevados de coeficiente de variação em um único dia de análise.

Os métodos descritos na literatura utilizam lavagem entre corridas com metanol e água, como descrito no desenvolvimento do método.^{6,7} Este procedimento não foi adotado, pois foi observado que ocorre a deterioração do capilar com maior frequência, quando estas lavagens são utilizadas. O condicionamento entre corridas apenas com a solução de anfólitos foi suficiente para a limpeza do capilar e manutenção diária dos tempos de migração, apesar da alta viscosidade da solução.

O maior problema enfrentado na utilização do método foi a perda da eficiência na separação dos picos e o aumento do tempo de migração das hemoglobinas na etapa de mobilização, provavelmente causados pela deterioração do revestimento interno do capilar. A troca do capilar foi suficiente para a volta ao desempenho normal do método.

As lavagens no início e término do dia de trabalho, de acordo com o procedimento descrito (Capítulo III.5), foram essenciais na preservação da integridade do revestimento e no aumento do tempo de vida útil do capilar. O mesmo capilar pode ser utilizado em mais de 200 corridas.

O método desenvolvido oferece a opção de determinação de ponto isoelétrico (pI) de hemoglobinas variantes, como demonstrado no gráfico III.2, útil no diagnóstico de doenças relacionadas a estas hemoglobinas.⁶ Importante ressaltar que a curva é construída com as próprias amostras de sangue de indivíduos com hemoglobinas variantes, e uma vez feita a comparação da identificação com outra metodologia, não é necessário a utilização de padrões para a construção da curva de pI em função do tempo de migração.

V.3 Referências Bibliográficas

- 1) COLOMBARA, R.; TAVARES, M.F.M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: Características e aplicações. *Quim. Nova*, v. 20, n. 5, p. 512-518, 1997.
- 2) JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. *Quim. Nova*. (artigo submetido)
- 3) CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B*, v. 689, p.175-180, 1997.
- 4) KAPLAN, L.A.; PESCE, A. *Clinical Chemistry. Theory, Analysis, Correlation*. 3 ed. New York, Mosby, 1996. Cap. 24, p. 439-463: Physiology and pathophysiology of body water and electrolytes.
- 5) KAPLAN, L.A.; PESCE, A. *Clinical Chemistry. Theory, Analysis, Correlation*. 3 ed. New York, Mosby, 1996. Cap. 32, p. 613 – 641: Diabetes mellitus.
- 6) HEMPE, J.M.; CRAVER, R.D. Quantification of hemoglobin by capillary isoelectric focusing. *Clin, Chem.*, v. 40, p. 2288-2295, 1994.
- 7) HEMPE, J.M.; GRANGER, J.N.; CRAVER, R.D. Capillary isoelectric focusing of hemoglobin pediatric clinical laboratory. *Electrophoresis*, v. 18, p. 1785-1795, 1997.

VI. CONCLUSÃO

Neste trabalho, o desenvolvimento de métodos de análise para sódio, potássio, cloreto, bicarbonato, acetoacetato, lactato, β -hidroxibutirato e hemoglobina glicada por eletroforese capilar foi demonstrado e os métodos foram aplicados com sucesso a amostras reais de soro humano. As prioridades durante o desenvolvimento das metodologias, de reduzir o tempo de análise e eliminar o pré-tratamento das amostras foram atingidas, incluindo os ácidos orgânicos presentes em baixas concentrações.

A validação completa dos métodos analíticos para todos os analitos não foi realizada, porém os resultados apresentados mostraram a concordância dos resultados com padrões certificados para potássio, sódio, cloreto e lactato. Os ânions orgânicos acetoacetato e β -hidroxibutirato foram avaliados em uma amostra “fortificada” e apresentaram bons resultados em relação a recuperação e aos coeficientes de variação de área e altura de pico e tempo de migração.

Para a análise dos ânions orgânicos selecionados neste trabalho, foi relevante a contribuição do estudo de quantificação, pois os métodos por eletroforese capilar, relatados anteriormente na literatura, não apresentam resultados quantitativos ou de comparação com outras metodologias. A aplicação na rotina de um laboratório clínico dos métodos analíticos propostos são dependentes de um estudo mais detalhado de validação.

O método desenvolvido para a hemoglobina glicada foi comparado ao método de referência Variant (Bio-Rad) e provada a possibilidade de utilização do método para avaliação dos níveis de HbA_{1c}. As modificações no modo de mobilização da focalização isoeletrica capilar foram decisivos na melhora da resolução da separação e possibilidade de quantificação da HbA_{1c}.

Os métodos propostos são alternativos aos já existentes e apresentam a vantagem de utilizar um único equipamento analítico, em comparação com as diversas técnicas necessárias para a análise dos metabólitos estudados.

Além dos metabólitos relacionados ao diabetes, a separação eletroforética dos componentes do soro humano e sangue total, indicaram a utilidade do método na determinação de outros metabólitos, entre eles cálcio, magnésio, fosfato e as hemoglobinas A, A₂, F, S e C.