UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

ALINE DE PAULA VITOR

**Determinação de aminoácidos por eletroforese
capilar com detecção UV/vis para o
estudo do perfil metabólico urinário
do refluxo vésico-ureteral.**

Versão corrigida da dissertação defendida

São Paulo

05/07/2012

ALINE DE PAULA VITOR

**Determinação de aminoácidos por Eletroforese Capilar com
detecção UV/vis para o estudo do perfil metabólico urinário do
refluxo vésico-ureteral.**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo –
Campus Capital para obtenção do Título de
Mestre em Ciência pelo Programa de Pós-
Graduação em Química.*

Orientador (a): Prof. Dra. Marina Franco Maggi Tavares.

**São Paulo
2012**

*Aos meus pais, Idelfonso e Maria Luzia, por tudo que moveram para minha
felicidade.*

*Aos sobrinhos Júnior, Maria Luiza, Laura, Guilherme e Antônio pelos momentos
abundantemente felizes ao lado de vocês.*

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Marina Franco Maggi Tavares, obrigada pelos ensinamentos, paciência e orientação e diversas oportunidades de amadurecimento profissional.

Ao professor Dr. João Pedro Simon Farah pela contribuição na parte estatística deste projeto. Agradeço também pelas aulas teóricas e inúmeros conselhos.

Ao professor Dr. Claudimir Lúcio do Lago pelas contribuições neste trabalho durante o afastamento por licença sabática da professora Dra. Marina Tavares.

Ao professor Dr. Marcelo Tavares pela parceria neste projeto, pelo esclarecimento nos assuntos biológicos e pela concessão das amostras.

Aos professores da UFJF Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos e Dr. Renato Camargo Matos, pelos incentivos em realizar o mestrado em São Paulo.

Aos professores doutores Jivaldo do Rosário Matos e Lúcio Agnes pelos ensinamentos em Química Analítica.

Aos membros do grupo LACE, Aline Klassen, Karina, Grazielle, Gisele, Maryane, Daniel Polesel, Lucas e recentemente ex membros do grupo Tatiana, Claudinei e Edgar. Muito obrigada pela troca de conhecimento e de experiências, e pelo companheirismo.

Aos funcionários do Instituto de Química que sempre demonstraram solícitos em me ajudar. Em destaque, o técnico especialista Daniel Rossado pelos ensinamentos muito úteis para esta dissertação. À técnica Simoni, pelo auxílio na rotina do laboratório.

Aos colegas do laboratório do professor Dr. Claudimir Lúcio do Lago, Carlos Neves e Denis Vidal pelo empréstimo ou doação de reagentes além das informações e

esclarecimentos extremamente valiosos na prática da técnica de eletroforese capilar. Ao laboratório da professora Dra. Aline Silva por parte do colega Wesley pelos esclarecimentos dos assuntos bioquímicos e biológicos do projeto e por parte do técnico Alexandre por me permitir utilizar a estrutura do laboratório para uma das etapas do processamento das amostras.

Ao técnico Jairo Lima pelas inúmeras manutenções realizadas nos equipamentos da Beckman e pelas dicas que facilitaram o dia-a-dia nestas máquinas. Ao técnico Roberto Nicihoka, pelos consertos dos equipamentos de rotina do laboratório.

Ao amigo Clayton pelo auxílio nos primeiros dias em São Paulo. À amiga Maryane pelo companheirismo no convívio da vida em república. As amigas da pós-graduação, Raquel e Renata que nunca hesitaram em me ajudar.

Aos meus pais Idelfonso e Maria Luzia por serem exemplos de persistência e pelo imenso apoio durante este período. Ao irmão André e cunhada Mikelle pelas realizações das mudanças domiciliares feitas neste período. Aos irmãos, Alan, Adriana e Alessandro pelo apoio e carinho.

A nova família, Antônio, Dona Jô, Carlos, Simoni, Marcelo por me oferecer seu lar durante o último período deste trabalho e me considerar como membro da família. A ajuda e o carinho de vocês foram imprescindíveis.

Agradeço a todos que ficaram em esquecimento durante esta escrita, mas que contribuíram em algum momento para este trabalho.

Às agências FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro.

À agência de financiamento CNPq pela bolsa concedida.

Vitor, A. P. **Determinação de aminoácidos por Eletroforese Capilar com detecção UV/vis para o estudo do perfil metabólico urinário do refluxo vesico-ureteral.** 2012. 92p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RESUMO

Uma avaliação da concentração dos aminoácidos primários em amostras de urina de crianças com refluxo vésico-ureteral (VUR) em busca de caminhos para o diagnóstico não invasivo desta doença. Dois métodos analíticos por eletroforese capilar com detecção UV/vis foram desenvolvidos para a quantificação dos analitos. No método **1** empregou-se a detecção UV/vis direta em 200 e 214 nm com as condições eletroforéticas eletrólito tampão fosfato 90 mmol L⁻¹ pH 2,1; tensão de +15 kV; injeção de 7 s a 0,5 psi; capilar de 75 µm de diâmetro interno; 40,2 cm de comprimento total e 30,0 cm de comprimento efetivo. No método **2**, fez-se uso da detecção indireta em 254 nm, com as condições eletroforéticas eletrólito tampão TEA 20 mmol L⁻¹ e DNB 10 mmol L⁻¹ pH 10,84; modificador de fluxo DDAB a 4 mmol L⁻¹; tensão de -15 kV; injeção de 7 s a 0,5 psi; capilar de 75 µm de diâmetro interno; 50,2 cm de comprimento total e 40,0 cm de comprimento efetivo. O método **1** apresentou parâmetros de validação linearidade, precisão intra-dia e inter-dia, seletividade, robustez e recuperação satisfatórios. A quantificação de creatinina, fenilalanina (Phe), histidina (His), triptofano (Trp), tirosina (Tyr) nas amostras de urina foi possível pelo método **1**, porém inviável para quantificação de arginina (Arg). O método **2** apresentou valores de robustez e recuperação satisfatórios para os

aminoácidos alanina (Ala), aspartato (Asp), glutamato (Glu) e glicina (Gly) satisfatórios, mas a quantificação dos mesmos na maioria das amostras de urina diluída não foi possível por estarem em nível de concentração abaixo da detecção ou quantificação. Para avaliar a potencialidade dos resultados como ferramenta no diagnóstico do VUR, os aminoácidos His, Phe, Trp e Tyr, quantificados em todas as amostras, foram empregados como variáveis na classificação das amostras em dois grupos distintos (1) grupo de crianças saudáveis e (2) grupo de crianças diagnosticadas com VUR. A classificação realizada pelo método de análise de componente principal (PCA) apresentou valores estatísticos satisfatórios e poder de predição: R^2 (capacidade de ajuste) e Q^2 (capacidade de predição) foram 0.9993 e 0.65, respectivamente com os dois componentes principais (PC1 e PC2). A separação total com valor de Q^2 desejável (acima de 0,8) poderia ser alcançada com uma quantidade maior de informação, sendo neste caso, número maior de aminoácidos quantificados. Assim, este trabalho abre caminho para estudos mais aprofundados na investigação da concentração dos aminoácidos primários em pacientes com VUR, objetivando o desenvolvimento de um potencial biomarcador para VUR.

Palavras-chave: aminoácidos, eletroforese capilar, refluxo vésico-ureteral, urina, biomarcadores, metaboloma.

ABSTRACT

Vitor, A. P. **Amino acids determination by capillary electrophoresis with UV/vis detection to vesicoureteral reflux urinary metabolic profiling.** 2012. (92p.). Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

An assessment of the concentration of primary amino acids in urine samples from children with vesicoureteral reflux (VUR) using capillary electrophoresis separation with UV/vis detection has been proposed to help establishing a means for non invasive diagnosis of the disease. Two analytical methods were developed. Method 1 used direct UV/vis detection at 200 and 214 nm, 90 mmol L⁻¹ phosphate buffer at pH 2.1, high voltage separation at +15 kV, injection of 0.5 psi during 7 s, and a fused-silica capillary of 75 µm inner diameter, 40.2 cm total length, and 30.0 cm effective length. Method 2 used indirect UV/vis detection at 254 nm, TEA at 20 mmol L⁻¹ and DNB at 10 mmol L⁻¹ electrolyte at pH 10.84, 4 mmol L⁻¹ DDAB as flow modifier, separation voltage at -15 kV, injection of 0,5 psi during 7 s, fused-silica capillary of 75 µm inner diameter, 50.2 cm total length, and 40,0 cm effective length. Method 1 presented satisfactory results for linearity, intra-day and inter-day precision, selectivity, robustness, and recovery. By method 1 it was possible to quantify creatinine, phenylalanine (Phe), histidine (His), tryptophan (Trp), tyrosine (Tyr) but not arginine (Arg) in the urine samples under investigation. Method 2 presented satisfactory robustness and recovery for alanine (Ala), aspartate (Asp), glutamate (Glu) and glycine (Gly), but the contents of these metabolites in the urine samples were not established because they lay below the limits of detection and quantitation.

To assess the potentiality of the results as diagnostic tool for VUR condition, the concentrations of the amino acids His, Phe, Trp and Tyr, quantified in all samples, were used as variables in a classification procedure where samples were divided in two distinct groups: (a) a group of healthy children and (b) a group of children diagnosed with VUR. The classification by principal component analysis (PCA) showed a partial separation with good statistics and prediction power: R^2 (goodness of fit) and Q^2 (goodness of prediction) were 0.9993 and 0.65, respectively with two components analysis (PC1 and PC2). Values of Q^2 greater than 0.8 are usually desired and it could be provided if more information was available, such as a greater number of amino acids being quantified. Thus, this research opens the way for further investigative studies of amino acids concentration in patients with primary VUR, aimed at developing a potential biomarker for VUR.

Keywords: amino acids, capillary electrophoresis, vesicoureteral reflux, urine, biomarker, metabolome.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPS: ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfônico

CAPS⁻: N-ciclohexil-3-aminopropanosulfonato

CRT: metabólito creatinina

CZE: Eletroforese Capilar por Zona

DDAB: brometo de didodecildimetilamônio

DNB: ácido 3,5-dinitrobenzóico

DNB⁻: 3,5-dinitrobenzoato

EOF: fluxo eletrosmótico

ITU: infecção do trato urinário

MS: detecção por espectrometria de massas

PCA: análise de componentes principais

PHE: camada de Stern ou Plano de Helmholtz Exterior

PHO: Plano de Helmholtz Exterior

PLS-DA: análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais

RIR: refluxo intrarenal

SPETC: extração em fase sólida por troca catiônica

UV/vis: região do ultravioleta e visível do espectro eletromagnético

VUR: refluxo vésico-ureteral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Metaboloma e Biomarcadores.....	15
1.2. Refluxo vésico-ureteral.....	18
1.3. Análise de aminoácidos primários.....	22
1.4. Determinação de Aminoácidos em fluidos biológicos.....	31

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipamentos.....	34
3.2. Reagentes, materiais e preparo de soluções e eletrólitos.....	34
3.3. Colunas Capilares.....	37
3.4. Amostras de Urina.....	38
3.5. Tratamento Estatístico.....	41

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Otimização da separação eletroforética em pH alto-detecção UV indireta.....	42
4.1.1. Inversão do fluxo eletrosmótico (EOF) e condicionamento da coluna capilar.....	43

4.1.2. Estudo da Composição do Eletrólito.....	46
4.1.3. Diferença do Potencial Aplicado.....	54
4.1.4. Temperatura de termostatização.....	55
4.1.5. Dimensões das Colunas Capilares.....	55
4.2. Otimização da separação eletroforética em pH baixo-detecção direta.....	55
4.2.1. Condicionamento da Coluna Capilar.....	56
4.2.2. Constituintes do Eletrólito e Condições Eletroforéticas.....	57
4.3. Desenvolvimento do método de tratamento das amostras de urina.....	59
4.3.1. Remoção de Proteínas da Matriz de Urina.....	59
4.3.2. Extração em fase sólida por troca catiônica.....	59
4.4. Obtenção dos parâmetros de validação dos métodos bioanalíticos.....	62
4.4.1. Seletividade.....	63
4.4.2. Limite de Detecção (LD) de Quantificação (LQ).....	65
4.4.3. Precisão Intradia e Precisão Interdia.....	66
4.4.4. Robustez.....	68
4.4.5. Linearidade.....	71
4.4.6. Recuperação.....	73

4.5. Análise das amostras.....	76
4.6. Tratamento estatístico.....	85
4.6.1. Classificação não supervisionada.....	85
4.6.2. Classificação supervisionada.....	88
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

1.1. Metaboloma e Biomarcadores

A medicina do século 21 apresenta como desafio o entendimento das relações e interações entre as variáveis genéticas e os fatores ambientais de uma doença. Em respostas a estes novos desafios, os sistemas biológicos conhecidos pelo genoma, proteoma, e mais recentemente pelo metaboloma fornecem uma nova visão para caracterizar as inúmeras causas envolvidas em uma doença (Holmes, Wilson *et al.* 2008).

O metaboloma representa a coleção de todos os metabólitos de um sistema biológico, sendo originado da atividade metabólica do organismo, a qual é regulada pela expressão gênica de enzimas e pela ativação/inibição de metabólitos via *feedback* (Terabe, Markuszewski *et al.* 2001). Em outras palavras, o metaboloma representa os produtos finais de uma série de reações bioquímicas oriundas da expressão gênica do organismo. Diferentemente do genoma que se modifica lentamente ao longo das gerações, o metaboloma sofre alterações constantes em resposta a diferentes fatores como por exemplo, ao uso de medicamentos, drogas de abuso, entre outros (Fialho, Moreno *et al.* 2008) .

Geralmente, os metabólitos são classificados de acordo com sua estrutura química. Com exceção de íons hidrogênio e água, são moléculas pequenas, muitas iônicas e não voláteis. Terabe e colaboradores (Terabe, Markuszewski *et al.* 2001) listam cerca de 300 metabólitos principais em uma célula. De acordo com a **Tabela 1.1**, observa-se que os aminoácidos é uma classe expressiva dentro do metaboloma.

Tabela 1.1: Classificação dos metabólitos principais em uma célula de acordo com sua estrutura química adaptado de (Terabe, Markuszewski et al. 2001).

Classes Químicas	Número de Compostos	Exemplos Típicos
Aminoácidos, aminas e derivados	54	L-glutamato, L-aspartato
Ácidos carboxílicos	35	Piruvato, 2-oxoglutarato
Alcoóis	3	glicerol
Aldeídos	10	acetaldeído, formaldeído
Ésteres fosfatados (com exceção dos nucleotídeos)	33	D-glucose, D-fosfato
Ácidos nucléicos e compostos relacionados	37	ATP, ADP
Carboidratos e compostos relacionados	16	D-glicose, D-frutose
Lipídeos, esteróides e gorduras saturadas	19	estrógeno, colesterol
Vitaminas e coenzimas	45	NAD ⁺ , NADH
Íons inorgânicos	10	fosfato, nitrato

As técnicas envolvidas na avaliação global e quantitativa dos metabólitos ainda estão em fase de desenvolvimento, pois o metaboloma apresenta grande complexidade química, bem como enorme variação de concentrações (da ordem de pmoles a mmoles) no sistema biológico. (Terabe, Markuszewski et al. 2001, Villas-Bôas and Gombert 2006). Em virtude destas discrepâncias, a análise dos

metabólitos se divide em cinco classes (Villas-Bôas and Gombert 2006, Garcia-Perez, Vallejo et al. 2008):

- **Análise alvo (*metabolite target analysis*)**: análise de um único metabólico específico;
- **Perfil metabólico (*metabolic profiling*)**: análise de um grupo pré-definido de metabólitos, classificados com base na classe de compostos (como aminoácidos, ácidos graxos, entre outros), ou com base na associação do metabólito com sua rota metabólica específica.
- **Impressão Digital Metabólica (*metabolic fingerprinting*)**: rápida classificação das amostras perante a análise sem identificação dos metabólitos.
- **Metabolômica (*metabolomics*)**: identificação e quantificação de todos os metabólitos em um sistema biológico.

O perfil metabólico de fluidos de um sistema biológico, como urina e plasma, fornece a leitura do estado metabólico do organismo e representa o produto da contribuição genética e ambiental (dieta, estilo de vida, atividade da flora intestinal) sob um conjunto de condições específicas do indivíduo (Holmes, Wilson *et al.* 2008). Portanto, o perfil metabólico é importante para a detecção de efeitos farmacológicos e toxicológicos após dosagem de algumas substâncias, além de possibilitar a descoberta de potenciais diagnósticos de várias doenças. Ao contrário dos métodos clássicos de rotina de laboratório, os quais focalizam na análise dos metabólitos endógenos específicos, a análise do conjunto de metabólitos fornece um número maior de informações sobre o estado fisiológico do organismo (Ramautar, Mayboroda *et al.* 2008).

A análise do perfil metabólico do organismo tratada com ferramentas quimiométricas possibilita o estudo de um potencial biomarcador, definido como um composto que indica uma alteração genética, celular, bioquímica ou molecular pela qual um processo biológico pode ser reconhecido ou monitorado. Eles apresentam potenciais aplicações na saúde pública como descoberta de fármacos, melhores precisões no monitoramento dos efeitos causados por intervenções médicas, e principalmente, descoberta precoce de doenças por meio do desenvolvimento de diagnósticos clínicos que visam ser minimamente invasivos (Huck, Bakry *et al.* 2006).

1.2. Refluxo Vésico-Ureteral

O refluxo vésico-ureteral (VUR) se constitui do retorno da urina da bexiga para o trato urinário superior, sendo resultante de uma anomalia congênita da junção uretero vesical (refluxo primário), da elevação anormal da pressão vesical ocasionada pela obstrução vésico-uretral mecânica ou pela disfunção neuromuscular da bexiga (refluxo secundário) (Nahas 1985), (Dénes and Arap 1995).

Em outras palavras, o refluxo primário consiste no mecanismo valvular incompetente devido à deficiência da musculatura longitudinal no trajeto intravesical do ureter. Por outro lado, o refluxo secundário se caracteriza por fatores que causam alta pressão intravesical, ultrapassando os limites do sistema valvular entre o ureter e a bexiga (Cooper 2009). Esta anomalia pode ser classificada em vários estágios. A classificação estabelecida internacionalmente está representada no esquema da **Figura 1.1.** (Zerati, Liguori *et al.* 2006).

Graus	Descrição
I	Contrastação do ureter não dilatado
II	Contrastação sem dilatação do ureter e pelve renal
III	Dilatação leve a moderada do ureter, cálices ureterais com mínimo baqueteamento dos cálices
IV	Moderada dilatação e tortuosidades da pelve renal e cálices
V	Grande dilatação do ureter, pélvis, e cálices com perda das impressões papilares e presença de tortuosidade ureteral

Figura 1.1. Esquema ilustrando os cinco graus do refluxo vésico-ureteral adaptado de (Zerati, Liguori et al. 2006).

O VUR ocorre na fase da infância, mais especificamente entre 0 a 6 anos (Cooper 2009) e a causa de sua incidência ainda não está claramente definida devido à escassez de estudos em crianças saudáveis. Alguns autores defendem que a causa está associada aos fatores genéticos, por conta da maior probabilidade de uma criança, com pais e irmãos portadores do VUR, de desenvolver esta doença (Dénes and Arap 1995)

A manifestação clínica mais frequente do refluxo vésico-ureteral ocorre com infecção do trato urinário (UTI). A associação do refluxo vésico-ureteral com UTI representa uma ameaça ao tecido renal, pois pode ocasionar pielonefrite, definida como UTI no estágio de alcance da pelve renal (afeta quase todas as estruturas do rim, incluindo túbulos, sistema recolector e interstício, com exceção do glomérulo, pelo menos até uma fase bem avançada). Esta pode ser revertida se identificada precocemente com a administração imediata de antibióticos, pois caso contrário pode evoluir para um quadro de cicatrização renal (Dénes and Arap 1995).

As cicatrizações são lesões, as quais podem ser focais ou difusas, e ocorrem com mais frequência nos pólos renais, região em que ocorre drenagem dos dutos coletores para as papilas complexas. Estas, por apresentarem anatomia favorável, permitem mais facilmente o refluxo pielotubular, ocasionando início do refluxo intrarrenal (RIR). Alguns autores defendem que o RIR de alta pressão da urina estéril já pode provocar danos aos rins (Dénes and Arap 1995).

A literatura apresenta controvérsias na citação da porcentagem de crianças com refluxo que possuem cicatrizes. Alguns autores afirmam 30 a 70%, outros 25 a 33% (Nahas, Mitre et al. 1985), (Cooper 2009). Em estudo internacional do refluxo, aproximadamente 50 % das crianças com refluxo de graus III ou IV apresentam cicatrizes (Cooper 2009). O risco de desenvolvimento das mesmas é maior durante o primeiro ano de vida da criança (Dénes and Arap 1995).

As lesões renais ocasionadas pelas cicatrizes podem promover um quadro designado de nefropatia de refluxo, a qual consiste na lesão e fibrose parenquimatosa, que provoca hiperfiltração dos glomérulos residuais cuja consequência para o organismo é hipertensão e proteinúria. Em estágios mais avançados da doença, pode ocorrer insuficiência renal (Dénes and Arap 1995)

O objetivo terapêutico principal no VUR é a prevenção de lesão renal causada pela pielonefrite com a finalidade de evitar complicações mais sérias descritas acima para o organismo. Estas anomalias são evitadas tanto por tratamento clínico por meio de profilaxia antibacteriana, que protege o trato urinário da infecção, como por cirurgia com correção do próprio refluxo (Dénes and Arap 1995).

No primeiro caso, o refluxo é resolvido espontaneamente e os antibióticos são responsáveis para evitar novas pielonefrites e cicatrizes renais. Mesmo assim, durante este tratamento, é possível aparecer novas pielonefrites acompanhadas de cicatrizes, porém apenas 10 % em crianças com VUR de grau I e em 28 % com VUR de grau II. Entretanto, somente uma baixa porcentagem deste grupo, apresentou anomalias mais graves como hipertensão, proteiúria ou insuficiência renal (Dénes and Arap 1995). Por outro lado, a porcentagem de cura espontânea do refluxo em crianças com graus elevados é muito baixa, sendo, portanto necessários procedimentos cirúrgicos.

Os danos renais gerados pelo refluxo vésico-ureteral podem modificar o funcionamento dos rins, alterando os processos que ocorrem neste órgão, como por exemplo, a reabsorção seletiva de aminoácidos, glicose e sódio. Na reabsorção seletiva, estes constituintes do filtrado glomerular são reabsorvidos quase que por completo de modo que suas concentrações caem para níveis muito baixos durante o processo de formação da urina. Com isso, estes metabólitos podem ser eliminados na urina em concentrações diferentes da urina de um organismo sem VUR (Guyton).

Há uma grande necessidade de acompanhar os pacientes que foram submetidos aos tratamentos clínicos ou cirúrgicos, uma vez que os mesmos estão sujeitos a mais episódios de UTI com pielonefrites e lesões renais com cicatrizes. Portanto, é de extrema importância que todas as crianças sejam acompanhadas

mesmo após a cura do VUR com a finalidade de descobrir hipertensão e/ou insuficiência renal tardias (Dénes and Arap 1995).

O diagnóstico para descobrir e monitorar o VUR consiste nas investigações por imagem que incluem a uretrocistografia miccional e cistografia. A primeira permite a classificação do VUR em graus I a IV enquanto que a segunda não oferece esta avaliação, permitindo somente caracterizar o VUR em leve, moderado e grave. Ambas as investigações por imagem são diagnósticos clínicos invasivos.

Assim, a análise em matrizes de urina de aminoácidos primários provenientes do processo de reabsorção seletiva alterado pelo VUR possibilitaria a investigação de diagnósticos não invasivos, os quais diminuem os transtornos gerados nas crianças portadoras desta doença.

1.3. Análise de aminoácidos primários

A classe dos aminoácidos é um alvo importante no desenvolvimento de biomarcadores, pois as suas concentrações em um sistema biológico são frequentemente empregadas no diagnóstico, monitoramento ou até mesmo tratamento de uma doença (Benedetto. 2008, Viglio, Fumagalli et al. 2010). Além disso, os aminoácidos podem se associar com o VUR pelas alterações ocorridas no processo de reabsorção seletiva quando esta doença provoca danos aos tecidos renais (Guyton). Ainda, a literatura cita os aminoácidos primários como potenciais biomarcadores da insuficiência renal (Lundin and Weinberger 2010).

Os aminoácidos pertencem a uma classe bioquímica de compostos que apresentam um grupo carboxila e um grupo amino, ligados ao mesmo átomo de carbono (denominado carbono α). Eles diferem entre si por suas cadeias laterais ou

grupos R, os quais variam em estrutura, em tamanho e carga elétrica e influenciam a solubilidade dos aminoácidos em água (Lehninger 2002).

Os 20 aminoácidos das proteínas são frequentemente referidos como os aminoácidos primários para distingui-los dos aminoácidos menos comuns (resíduos modificados no interior das proteínas, depois que estas são sintetizadas), e de muitos outros tipos de aminoácidos presentes nos organismos vivos, porém não nas proteínas. A **Tabela 1.2.** ilustra os aminoácidos primários, bem como suas abreviações de três letras, pka's e ponto isoelétrico (Lehninger 2002).

Tabela 1.2. Propriedades e convenções dos aminoácidos primários (Adaptado de (Lehninger 2002)).

Aminoácidos	Sigla	Valores de pka			Ponto Isoelétrico
GRUPOS R ALIFÁTICOS, NÃO POLARES		pka1	pka2	pka3	
Glicina	Gly	2,34	9,60		5,97
Alanina	Ala	2,34	9,69		6,01
Prolina	Pro	1,99	10,96		6,48
Valina	Val	2,32	9,62		5,97
Leucina	Leu	2,36	9,60		5,98
Isoleucina	Ile	2,36	9,68		6,02
Metionina	Met	2,28	9,21		5,74
GRUPOS R AROMÁTICOS					
Fenilalanina	Phe	1,83	9,13		5,48
Tirosina	Tyr	2,20	9,11	10,07	5,66
Triptofano	Trp	2,38	9,39		5,89
GRUPOS R NÃO CARREGADOS, POLARES					
Serina	Ser	2,21	9,15		5,68
Treonina	Thr	2,11	9,62		5,87
Cisteína	Cys	1,96	10,28	8,18	5,07
Asparagina	Asn	2,02	8,80		5,41
Glutamina	Gln	2,17	9,13		5,65
GRUPOS R CARREGADOS POSITIVAMENTE					
Lisina	Lys	2,18	8,95	10,53	9,74
Histidina	His	1,82	9,17	6,00	7,59
Arginina	Arg	2,17	9,04	12,48	10,76
GRUPOS R CARREGADOS NEGATIVAMENTE					
Aspartato	Asp	1,88	9,60	3,65	2,77
Glutamato	Glu	2,19	9,67	4,25	3,22

Diferentes métodos para análise dos aminoácidos são citados na literatura, os quais englobam cromatografia de alta eficiência (HPLC), cromatografia em fase gasosa (CG) e eletroforese capilar (CE) (Benedetto. 2008).

Aminoácidos são analisados por HPLC com emprego de colunas de troca iônica ou de interação hidrofílica (HILIC), pois estes compostos apresentam alta polaridade. Para análise por CG, são necessárias reações de derivatização (Benedetto. 2008).

Emprega-se detecção ultravioleta/visível (UV/vis) para análise dos aminoácidos aromáticos e de His e Arg ou detecção por fluorescência (LIF) para análise de todos aminoácidos. Nesta última, é necessária a derivatização dos aminoácidos, a qual é realizada pré-coluna ou pós-coluna. Ainda, a detecção pode ser feita com uso de espectrômetro de massas (Kaspar, Dettmer et al. 2009) com quantificação de todos aminoácidos (Benedetto. 2008).

A versatilidade da técnica de eletroforese capilar possibilitou grande número de trabalhos na análise dos aminoácidos. Por serem compostos anfóteros (apresentam caráter ácido proveniente do grupo carboxílico -COOH e caráter básico proveniente do grupo amino -NH_2 , existem inúmeros métodos de análise na literatura por eletroforese capilar de zona (CZE). Em eletrólitos de pH baixo; os aminoácidos são analisados na forma catiônica em polaridade normal, principalmente com o emprego de tampão fosfato pH 2,50; 2,00 ou 1,85 ou de ácido acético pH 2,1. Ácido fórmico pH 1,8 é empregado para a análise dos aminoácidos com detecção por espectrometria de massas (MS) e ionização *eletrospray*. Por outro lado, há também grande variedade de trabalhos que empregam eletrólitos de pH alto, promovendo a separação dos aminoácidos na forma aniônica. Empregam-

se tampão fosfato, carbonato, tetraborato, ciclohexilpropanosulfonato (CAPS) em pH que variam de 7,4 a 11,0. Em pH em torno de 11,0; o fluxo é invertido com uso de tensoativos catiônicos, como DDAB, CTAB, MTAB, CTAH e DMAB (para diminuir o tempo de análise) (Lee and Lin 1995; Chen, Xu et al. 1997; Soga and Ross 1999; Benedetto. 2008).

O fluxo eletrosmótico é formado pela ionização dos grupos silanóis da parede do capilar, o qual atrai espécies carregadas positivamente do tampão de corrida. A camada iônica formada tem densidade de carga positiva que diminui exponencialmente com a distância da parede do capilar. A dupla camada formada próxima à superfície do capilar, denominada de Camada de Stern ou Plano de Helmholtz Exterior (PHE), é essencialmente estática. Uma camada mais difusa formada em uma região distante da parede do capilar é denominada de Plano de Helmholtz Exterior (PHO). Sob aplicação de uma diferença de potencial, cátions na camada PHO migram em direção ao catodo carregando com eles moléculas de água de hidratação. Toda a solução do tampão é carregada até o catodo por meio da ligação de hidrogênio entre as moléculas de água de hidratação dos cátions e moléculas de água do seio da solução (Landers 1996).

O fluxo eletrosmótico pode ser invertido por meio da adsorção de tensoativos catiônicos na parede interna do capilar, seguida posteriormente pela interação por dispersão (forças de London) entre as caudas das moléculas do tensoativo. Ocorre a formação de bicamadas ou hemimicelas na superfície, onde as cabeças positivas das moléculas do tensoativo estão voltadas para a solução (**Figura 1.2.**) (Tavares 1997).

Figura 1.2. Representação esquemática da formação de subcamadas de tensoativo catiônico e da migração de ânions sob fluxo eletrosmótico invertido adaptado de (Tavares, 1997).

Os modos de detecção por CZE são os mesmos empregados em HPLC e CG, em adição da detecção condutométrica sem contato e UV/vis ou LIF indiretas. Nestas, os aminoácidos são quantificados sem a necessidade de reações de derivatização. Na detecção UV/vis indireta, emprega-se cromóforos como 3,5-dinitrobenzoato (Fujiya and Tavares 2003), salicilato e derivados (Chen, Xu *et al.* 1997), (Lee and Lin 1994) e piridina 2,6-dicarboxilato (Soga and Ross 1999). A detecção UV/vis direta é aplicada em trabalhos para a análise dos aminoácidos aromáticos (Phe, Trp e Tyr), His e Arg (Benedetto. 2008).

A detecção por fluorescência é amplamente empregada na análise de aminoácidos, visto que a mesma apresenta limites de detecção de um a três ordens de grandeza mais baixos do que o limite de detecção por absorbância. Além disso, poucas moléculas orgânicas fluorescem, tornando-se esta técnica de detecção mais seletiva (Baker 1995). Destacam-se 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Simo, Martin-Alvarez *et al.* 2004), o-fitaladeído (Smith 1999), 4-fluoro-7-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazol (NBD-F) (Tseng, Li *et al.* 2007) como reagentes derivatizantes.

A versatilidade da eletroforese permitiu o desenvolvimento de novos modos de derivatização dentro da coluna, nas diferentes maneiras *zone-passing*, *at-inlet* e *throughout capillary* e pós-coluna (Szulc and Krull 1994; Oguri, Yokoi *et al.* 1997; Taga, Sugimura *et al.* 1998; Latorre, Saurina *et al.* 2002; Rezenom, Lancaster *et al.* 2002; Wagner and McManus 2003; Komarova, Kamentsev *et al.* 2004).

As estratégias *zone-passing* e *at-line* consistem na introdução sucessiva da solução da amostra, do tampão de corrida e do reagente derivatizante respectivamente (**Figura 1.3.**). Após algum tempo, aplica-se a diferença de potencial entre as extremidades do capilar e a banda proveniente do reagente alcançará a banda proveniente da amostra no meio da coluna de separação se a zona do reagente for mais rápida que a zona da amostra. Em casos em que a zona da amostra é mais rápida do que a zona do reagente, a ordem de introdução das soluções de amostra e de reagentes devem ser invertidas para que ocorra mistura de ambas (Taga, Sugimura *et al.* 1998).

Figura 1.3. Esquema de introdução para derivatização na coluna capilar no modo *on line*. Estratégias *zone-passing* ou *at-line* adaptado de (Taga, Sugimura *et al.* 1998).

Na *zone-passing*, aplica-se a diferença de potencial da corrida eletroforética logo após a injeção da solução da amostra e da solução do reagente derivatizante. Esta estratégia é válida para reações de derivatização que apresentam processos cinéticos rápidos em que se alcançam altos rendimentos de reação em poucos segundos (Latorre, Saurina et al. 2002).

De outro modo, *na at-inlet*, é necessário um intervalo de um tempo para que a reação ocorra antes da realização da corrida eletroforética. Neste caso, a estratégia favorece as reações de cinética lenta e propicia a dispersão das zonas da amostra e do reagente derivatizante necessária para a mistura da amostra com a solução do reagente, iniciando com isso a reação de derivatização (Latorre, Saurina et al. 2002).

Por fim, a estratégia *throughout capillary* consiste na introdução do reagente derivatizante na solução do eletrólito, logo, a separação eletroforética e a derivatização ocorrem simultaneamente. A otimização do pH do tampão contido no eletrólito de corrida deve atender às exigências da separação eletroforética e da reação de derivatização. Oguri e colaboradores empregaram a estratégia *throughout capillary*, empregando o-ftalaldeído e N-acetilcisteína como reagentes derivatizantes. O pH ótimo para a reação de derivatização destes compostos com os aminoácidos foi 10,0 (Latorre, Saurina et al. 2002).

A derivatização pós-coluna é baseada na injeção da amostra diretamente no capilar de modo que os analitos não derivatizados sejam separados. Posteriormente, a derivatização *on-line* é realizada antes da passagem pela célula de detecção por meio de reator de passagem (*gap reactor*) (**Figura 1.4.**). Esta estratégia tem como vantagem realizar a separação antes da formação dos analitos derivatizados, obtendo-se melhores separações, já que os produtos derivatizados possuem entre si propriedades físico-químicas mais semelhantes (Latorre, Saurina et al. 2002).

Figura 1.4. Diagrama esquemático do reator de passagem (*gap reactor*). [1] capilar de separação, [2] capilar de reação, [3] reservatório de passagem, [4] tubo de *teflon* utilizado para a introdução do reagente derivatizante, [5] resina epóxi, [6] passagem entre os capilares e [7] plano inclinado microscópico adaptado de (Latorre, Saurina et al. 2002).

Além do modo CZE, os aminoácidos são analisados por cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), modo na qual o uso de micelas favorece a separação dos analitos com propriedades físico-químicas semelhantes pelo mecanismo adicional de partição entre soluto/micela (Tavares 1997). Muitos trabalhos fazem uso do eletrólito tampão borato e SDS em pH 9,2. O uso de solventes orgânicos também são citados neste eletrólito (Viglio, Fumagalli et al. 2010). Todos os modos de detecção já citados são possíveis para a análise dos aminoácidos por MEKC, com exceção da detecção UV ou LIF indireta (incompatível com uso de aditivos) e da MS.

Apesar do grande número de trabalhos na literatura, a análise que visa a determinação de vários aminoácidos em uma única corrida com limites de detecção baixo em matrizes biológicas apresenta-se como desafio, pois são compostos com propriedades físico-químicas semelhantes, além de apresentarem-se em concentrações baixas nestas matrizes (Shihabi and Friedberg 1997, Benedetto. 2008).

1.4. Determinação de Aminoácidos em fluidos biológicos

O tratamento das amostras biológicas como sangue e urina, empregando a detecção LIF consiste na ultrafiltração para remoção de proteínas, seguidas pelas reações de derivatização por um período de 24 h, 14h, 6h ou 20 min (Tseng, Li *et al.* 2007; Kaneta, Maeda *et al.* 2008; Zinellu, Sotgia *et al.* 2010). Este modo de detecção apresenta como vantagem, para amostras biológicas, baixos limites de detecção e quantificação (LD, LQ), porém este parâmetro é limitado pelo rendimento da reação de derivatização. Ainda, as reações de derivatização geram produtos de degradação. (Kaneta, Maeda *et al.* 2008) quantificaram três aminoácidos em matrizes de urina com LQ da ordem de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. (Tseng, Li *et al.* 2007) identificaram 20 aminoácidos em plasma e urina. (Zinellu, Sotgia *et al.* 2010) quantificaram cinco aminoácidos primários e taurina com LQ de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Entretanto, os três trabalhos descritos acima não avaliaram a seletividade destes analitos frente aos demais aminoácidos primários e outros interferentes constituintes de amostras de sangue e urina.

A quantificação dos aminoácidos com emprego de MS nas amostras biológicas é realizada sem pré-tratamento prévio devido a alta detectabilidade e seletividade conferida a esta técnica em relação à UV/vis (Poinsot, Bayle *et al.* 2003). A interface mais comum para acoplamento entre CE e MS faz uso de líquido auxiliar devido à maior estabilidade, versatilidade e disponibilidade comercial se comparado com as demais interfaces. No entanto, o emprego desta causa diminuição da detectabilidade pela junção do líquido auxiliar e o efluente da coluna capilar (Simionato, Moraes *et al.* 2008). (Ramautar, Mayboroda *et al.* 2008) encontrou LD da ordem de 20 nmol L^{-1} para todos os aminoácidos primários.

Quanto à detecção UV-vis direta, existe na literatura, poucos trabalhos de quantificação destes analitos em fluidos biológicos (Kopplin and Benedetto 2003). A baixa seletividade desta detecção pode necessitar de tratamentos com frequência analítica baixa destas amostras biológicas, visto que são matrizes complexas. (Chen, Xu et al. 1997) detectaram oito aminoácidos urinários, sem tratamentos prévio e sem obtenção de parâmetros de validação.

Assim, o desenvolvimento de métodos eficientes para análise de aminoácidos em matrizes urinárias por CE-UV/vis com otimização do tratamento da amostra necessitam ser melhorados.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo principal avaliar se o perfil de concentração dos aminoácidos na urina são metabólitos potencialmente úteis para o diagnóstico não invasivo do refluxo vésico-ureteral.

2.2. Objetivos Específicos

1. Desenvolver métodos de análise por eletroforese capilar com detecção UV-vis para quantificar o maior número de aminoácidos e o metabólito creatinina em amostras de urina de crianças saudáveis (sem VUR) e de crianças com refluxo vésico-ureteral;

2. Otimizar método de extração em fase sólida por troca catiônica (SPETC) dos aminoácidos em matrizes de urina e obter parâmetros de validação para os métodos desenvolvidos;

3. Quantificar os aminoácidos nas amostras controle e teste.

4. Comparar o perfil de concentração dos aminoácidos entre as amostras de crianças saudáveis e as crianças que apresentam refluxo vésico-ureteral por métodos de análise de componente principal (PCA) e análise de discriminante com método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipamentos

Foi empregado um sistema para eletroforese capilar Beckman MDQ equipado com os detectores UV (análise pH alto - detecção UV indireta) e de arranjo de diodos (DAD) (análise pH baixo – detecção UV direta), com fonte de alta tensão (0 - 30 kV), com sistema de refrigeração por *coolant* e injeção de amostra sob pressão e tensão. Um *software* 32 Karat™ 8.0 foi utilizado para aquisição e tratamento dos dados. Os capilares empregados foram de sílica fundida (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, USA), revestidos externamente com poli-imida com 75 µm de diâmetro interno.

Para o tratamento das amostras, empregou-se a centrífuga IEC modelo Micromax, o agitador VORTEX modelo QUIMIS Q220 e sistema para extração em fase sólida do tipo manifold SUPELCO com 12 bocas verticais.

As medidas de pH foram realizadas com eletrodo DIGIMED e pH metro DIGIMED DM-20. A água deionizada empregada em todos os experiemntos foi obtida de um aparelho Milli-Q marca Millipore, modelo Direct-quantumTMEX (Bedford, MA, USA), com resistividade específica de $18 \Omega \text{ cm}^{-1}$ a 25 °C.

3.2. Reagentes, materiais e preparo de soluções e eletrólitos

Toda vidraria e frascos do equipamento (*vials*) foram limpos primeiramente por imersão dos mesmos em um banho de álcool 90 %, seguidos de banho ultrassônico com detergente extran por 5 minutos, uma lavagem com água de uso

doméstico e de três lavagens sucessivas com água deionizada. Materiais utilizados nas amostras de urina foram descartados em lixo biológico.

Os padrões utilizados foram todos de grau analítico, e suas respectivas soluções foram preparadas em água deionizada. Algumas destas soluções, empregadas nos estudos de desenvolvimento do método de separação foram imersas em banho ultrassônico por 5 minutos para total solubilização do soluto. A concentração da solução estoque padrão dos aminoácidos variou de acordo com a solubilidade destes compostos em água e estão descritas na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1. Concentração dos aminoácidos e de creatinina nas soluções estoques empregadas para desenvolvimento do método de separação.

Aminoácidos	Concentração da solução estoque (mmol L ⁻¹)
Ala	11,2
Arg*	9,5
Asp	3,8
Glu	6,8
Gln	13,7
Gly	13,3
His	13,7
Leu	7,6
Isso	7,6
Lys*	10,9
Met	10,0
Phe	6,1
Ser	19,0
Thr	8,4
Trp	4,9
Tyr	1,1
Val	42,7
Creatinina	8,8

*Na forma de sal de cloreto hidratado

Para o preparo do eletrólito tampão ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfônico/N-ciclohexil-3-aminopropanosulfonato (CAPS/CAPS-)

10 mmol L⁻¹, 3,5-dinitrobenzoato (DNB⁻) 5 mmol L⁻¹ pH 10,6 partiram-se da adição de alíquotas das respectivas soluções estoques de DNB⁻ e CAPS seguida pela adição da alíquota de 300 µL de hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹ para o preparo de 50,0 mL de eletrólito.

A solução estoque de CAPS 50 mmol L⁻¹ foi preparada pela pesagem direta do sólido em balão volumétrico. O preparo de 100 mL da solução estoque de DNB⁻ 50 mmol L⁻¹ consiste na pesagem do ácido 3,5-dinitrobenzóico sólido em um béquer e solubilização em 60 mL água deionizada acrescida de 5 mL de hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹. A solubilização total é alcançada após o aquecimento da solução em uma chapa térmica a 100 °C, sob agitação constante. O conteúdo do béquer foi transferido para um balão volumétrico de 100,0 mL e o menisco do balão foi acertado. A solução de DNB foi preparada semanalmente devido às variações de pH por aumento da velocidade de solubilização do gás carbônico atmosférico em pH alto.

Já para o preparo dos eletrólitos trietilamina (TEA) – DNB⁻ pH 10.84 e dietilamina (DEA) – DNB pH 10,96; partiu-se diretamente da pesagem do ácido 3,5-dinitrobenzóico sólido ao invés da solução estoque de DNB⁻. À massa necessária do sólido, foi adicionada o volume teórico de solução comercial de DEA 99 % ou TEA 99% em balão volumétrico de 50,0 mL. O conteúdo do balão quase completo com água deionizada foi levado em ultrassom por 10 minutos para total solubilização do DNB⁻. Após solubilização total, acertou-se o menisco do balão volumétrico.

Todos os eletrólitos em pH alto foram armazenados em tubos tipo falcon com tampa para evitar a influência do gás carbônico atmosférico.

Tampão fosfato 90 mmol L⁻¹ pH 2,1 foi preparado pela adição de alíquotas de 1000 µL das soluções estoques de H₃PO₄ 2324 mmol L⁻¹ e NaH₂PO₄ 2126 mmol L⁻¹

em balão volumétrico de 50,0 mL. A solução estoque de 2374 mmol L⁻¹ foi preparada semanalmente do reagente comercial de H₃PO₄ 35 %, enquanto que a solução de NaH₂PO₄ 2126 mmol L⁻¹ foi preparada da pesagem direta do sólido.

Todas as soluções estoques envolvidas no preparo dos eletrólitos foram filtradas em membrana de 0,45 µm. Durante a etapa de otimização dos eletrólitos empregados na separação eletroforética, as medidas do pH e de condutividade da solução eram realizadas diariamente para certificar com os valores teóricos obtidos pelo *software* Peakmaster (Gas). Após otimização, durante a análise de rotina das amostras, estas medidas eram eventualmente realizadas e a repetibilidade dos resultados era garantida pela execução dos mesmos procedimentos de preparação do eletrólito descritos acima.

Os *vials* contendo eletrólitos utilizados na separação eletroforética foram trocados a cada seis corridas consecutivas para evitar a decomposição do eletrólito por eletrólise ocasionada pela alta diferença de potencial aplicada.

3.3. Colunas Capilares

O condicionamento de uma coluna capilar nova foi realizado pela lavagem sob pressão hidrodinâmica a 20 psi com NaOH 1 mol L⁻¹ por 15 minutos, seguida da lavagem com água deionizada por igual período de tempo. Os condicionamentos de início de trabalho e entre réplicas consecutivas foram otimizados de acordo com as necessidades de inversão de fluxo e do pH do eletrólito e serão discutidas no tópico

Resultados e Discussão.

Os capilares novos empregados no eletrólito tampão fosfato (caráter ácido) foram lavados da mesma maneira que os eletrólitos de caráter básico (CAPS, TEA,

DEA), com adição da etapa de lavagem com HCl 0,1 mol L⁻¹ por 10 minutos sob pressão hidrodinâmica de 20 psi.

3.4. Amostras de Urina

As amostras de urina foram cedidas pelo Professor Doutor Marcelo Sousa Tavares por meio de um projeto cadastrado na Pró-reitoria de Pesquisa e de Pós-graduação da Universidade de Londrina (UEL). Coletaram-se amostras de crianças sem VUR e de crianças que apresentam VUR diagnosticadas pelo método clínico atual (uretrocistografia miccional). Em cada coleta, alguns dados foram registrados na forma de protocolo, tais como idade em meses, sexo, presença ou ausência do refluxo, aparecimento de cicatrizes (**Tabela 3.2**).

Tabela 3.2. Informações das Amostras de Urina Coletadas.

Amostras	Iniciais do Nome	Sexo	Refluxo	Cicatriz	Idade em Meses	Observação
T1	JCC	F	S	S	31	
T2	RLBP	M	S	N	108	
T3	GS	F	S	N	33	
T4	CCC	M	S	S	46	
T5	RAC	F	S	S	107	
T6	GTL	F	S	N	37	PREGRESSO
T7	GEA	M	S	S	74	
T8	TCP	F	C	N	57	
T9	ABDM	F	S	S	55	
T10	KKN	F	S	S	60	
T11	ACS	F	S	S	144	PREGRESSO
T12	IOSL	F	S	N	27	
T13	THFN	M	S	S	77	
T14	MMS	F	S	S	69	
T15	ALSS	F	S	N	53	
T16	MDS	M	S	S	69	
T17	TCFS	F	S	S	108	
T18	JMA	F	S	N	47	

Amostras	Iniciais do Nome	Sexo	Refluxo	Cicatriz	Idade em Meses	Observação
T19	HGRM	M	S	S	24	
T20	JUS	F	S	N	38	
T21	YSO	F	S	S	61	
T22	GUF	F	S	S	50	
T23	ABR	F	S	S	31	
C24	LAM	M	N	N	42	
C25	MCB	M	N	N	75	
C26	MASB	M	N	N	62	
C27	TAM	F	N	N	116	
C28	JDU	F	N	N	180	
C29	ECS	M	N	N	114	
C30	EBSN	M	N	N	73	
C31	ECC	F	N	N	84	
C32	GA	M	N	N	133	
C33	NP	F	N	N	43	
C34	KLN	F	N	N	36	
C35	DAC	M	N	N	62	
T36	EMGL	F	S	N	33	
C37	MNA	F	N	N	116	
C38	MNO	M	N	N	57	

Para o estudo do tratamento das amostras e validação do método de separação, empregou-se uma das amostras acima definida como amostra controle, **C38**, a qual tem como procedência uma criança sem VUR.

As amostras foram processadas em cartucho de fase sólida STRATA-X-C (Phenomenex) com 30 mg de recheio com estrutura ilustrada na **Figura 3.1**.

Figura 3.1. Estrutura química do recheio das colunas de extração em fase sólida por troca catiônica.

O procedimento de SPETC se baseou no procedimento sugerido pelo fabricante das colunas. A concentração de hidróxido de amônio empregada para eluição se baseou em dados literários (Soga, Kakazu et al. 2004), os quais utilizam 3 mol L^{-1} de solução de amônio preparada em metanol. A **Figura 3.2** ilustra o procedimento otimizado empregado no tratamento das amostras de urina. A evaporação total da amostra foi realizada sob fluxo de nitrogênio.

Figura 3.2. Procedimento otimizado do tratamento das amostras de urina.

3.5. Tratamento Estatístico

Os gráficos de análise de componente principal (PCA) e de análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foram construídos pelo *software* SIMCA-P versão 11.5.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 1. OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA EM pH ALTO – DETECÇÃO INDIRETA

Os aminoácidos primários não absorvem luz suficiente na região do ultravioleta-visível (UV-vis), com exceção de fenilalanina, triptofano e tirosina. Com isso, empregou-se a detecção UV-vis indireta para a análise da maioria dos aminoácidos primários.

A escolha do pH de separação dos aminoácidos baseou-se na inspeção do gráfico de mobilidade efetiva versus pH (**Figura 4.1**) obtido pelo programa Simlace desenvolvido no grupo de pesquisa (Micke 2004). A região de pH acima de 10,0 apresenta vantagens para a separação eletroforética em relação às regiões de pH baixo, tais como menor variação da mobilidade efetiva frente à variação de pH, (diminuindo problemas de repetibilidade) e maior diferença entre suas mobilidades. Portanto, optou-se inicialmente por buscar eletrólitos de separação com pH próximos a esta região de pH, apesar da impossibilidade da separação completa em linha base dos 19 aminoácidos primários.

Figura 4.1. Curvas de mobilidade efetiva de 19 aminoácidos primários versus pH. Sem adição de arginina. Em pH alto, a carga líquida da molécula é zero e sua migração ocorre no EOF.

4. 1. 1. Inversão do fluxo eletrosmótico (EOF) e condicionamento da coluna capilar

Para estudos da inversão do EOF, empregou-se o eletrólito temporário tampão N-ciclohexil-3-aminopropanosulfônico/N-ciclohexil-3-aminopropanosulfonato (CAPS/CAPS⁻) 10 mmol L⁻¹, 3,5-dinitrobenzoato (DNB⁻) 5 mmol L⁻¹ pH 11,0.

A inversão do EOF se fez necessária para diminuir o tempo de análise e o mesmo foi invertido com a adição do tensoativo no eletrólito, realizando assim o recobrimento dinâmico (emprego de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)) ou através do condicionamento do capilar por 10 minutos à pressão hidrodinâmica de 20,0 psi com emprego de brometo de didodecildimetilamônio (DDAB).

Observou-se que apenas o DDAB é eficiente no recobrimento do capilar realizado através do condicionamento. O CTAB, mesmo em concentrações

relativamente elevadas, não proporciona a completa inversão do fluxo, a qual foi observada pela falta de repetibilidade dos eletroferogramas obtidos da injeção da solução padrão da mistura dos aminoácidos. Concentrações de 0,1 a 4,0 mmol L⁻¹ de DDAB foram estudadas em intervalos de 0,4 mmol L⁻¹, por meio de injeções eletroforéticas consecutivas da solução contendo mistura dos padrões dos 19 aminoácidos no mesmo dia, obtendo-se repetibilidade do perfil dos picos dos aminoácidos com a concentração de 4,0 mmol L⁻¹.

Estes resultados são consistentes com estudos prévios realizados por Nycole Baryla e colaboradores. Por meio da técnica de microscopia de força atômica (AFM), foi possível observar que o recobrimento do capilar com CTAB ocorre através da formação de micelas igualmente espaçadas ao passo que DDAB inverte o fluxo com a formação de bicamadas uniformes, sendo ambas estruturas adsorvidas na superfície de sílica do capilar. Esta diferença de estrutura é explicada por Israelachvili e colaboradores pela presença de uma única cadeia carbônica na estrutura do CTAB em contraste com a presença de duas cadeias carbônicas na estrutura do DDAB (Baryla, Melanson et al. 2001).

A formação de bicamadas com o uso do DDAB proporciona um recobrimento da parede do capilar muito mais estável do que a formação de micelas (uso CTAB), permitindo que DDAB realize a inversão do fluxo somente através da lavagem do capilar. Por outro lado, CTAB somente consegue reverter o EOF por meio do recobrimento dinâmico (Baryla, Melanson et al. 2001).

Logo, a utilização do DDAB foi escolhida preferencialmente frente ao CTAB, pois o fluxo pode ser revertido por meio da lavagem com uma solução de DDAB 4,0 mmol L⁻¹. Neste caso, esta substância não está presente na composição do eletrólito, o que evita a sua interação com as moléculas do analito e do tampão.

Após a lavagem com DDAB, a coluna era condicionada entre corridas consecutivas com eletrólito sob pressão hidrodinâmica reduzida pela metade para evitar flutuações no recobrimento, causada pela remoção de DDAB da parede do capilar. No início do dia de trabalho, realizou-se um condicionamento por um período mais prolongado, de acordo com o esquema da **Tabela 4.1**.

Tabela 4.1. Substância e soluções empregadas no condicionamento do capilar em pH alto com as respectivas duração e pressão aplicada.

Solução/Sub- stância	Tempo de condicionamento (minutos)		Pressão Hidrodinâmica Aplicada (psi)
	Início de Trabalho	Entre corridas	
NaOH 1,0 mol L⁻¹	2	0	20
H₂O	2	0	20
DDAB 4,0 mmol L⁻¹	10	3	20
Eletrólito temporário	10	3	10

A repetibilidade do perfil de aminoácidos diária foi atingida, mas ainda havia falta de repetibilidade em dias diferentes, podendo se associar com o uso da solução de NaOH empregada para o preparo do eletrólito. Esta solução poderia apresentar diminuição da concentração dos íons hidróxido como consequência da facilidade de absorção do gás carbônico atmosférico em regiões de pH elevado, sendo necessário o preparo diário da mesma. Logo, a solução de hidróxido de sódio foi preparada diariamente e a repetibilidade do perfil eletroforético dos aminoácidos entre dias diferentes foi atingida.

4. 1. 2. Estudo da Composição do Eletrólito

A separação eletroforética exige a utilização de eletrólitos tamponados devido à possibilidade de variação do pH ocasionada pela eletrólise da água, a qual ocorre com a aplicação de altas diferenças de potencial. Pode ocorrer uma diminuição do pH no anodo (pólo positivo) como consequência da formação de íons H^+ e aumento do pH da região do catodo (pólo negativo) pela formação de íons OH^- . A mudança de pH como uma variação pequena de 0,03 pode causar perda da resolução e mudança na seletividade para certos analitos. Além disso, o EOF e o tempo de migração do analito são dependentes do pH do eletrólito, exigindo que este contenha capacidade tamponante para promover a reprodutibilidade nas separações eletroforéticas (Johns, Macka et al. 2003). No caso particular de emprego de eletrólito com pH alto, o tamponamento também se faz necessário para evitar a diminuição do pH gerada pela solubilização do gás carbônico atmosférico (Lee and Lin 1994).

Com isso, em busca de obter eletrólitos de separação com capacidade tamponante, escolheu-se trabalhar com CAPS, composto com pK_a (10,4) próximo ao pH de trabalho (10,6). No entanto, CAPS/CAPS⁻ não absorve luz suficiente na região do UV-vis e a adição de um cromóforo à solução tamponante foi necessária. O DNB foi escolhido para esta finalidade, pois é um cromóforo bastante citado na literatura de separações eletroforéticas, apresenta absorção no comprimento de onda de análise de 254 nm, região mais seletiva aos interferentes da amostra de urina se comparado aos comprimentos de onda menores, além de apresentar absorvidade molar alta nesta região. Ainda, de acordo com o software Peakmaster (Gas), a mobilidade efetiva do DNB está dentro da faixa de mobilidade efetiva dos aminoácidos primários em pH 10,6, possibilitando a obtenção de picos simétricos.

Testaram-se concentrações de DNB^- que variaram de 5,0 a 20,0 mmol L^{-1} com variações de 2,5 mmol L^{-1} à concentração fixa de CAPS/CAPS $^-$ de 10 mmol L^{-1} e pH 10,6. Acima de 10 mmol L^{-1} de DNB, houve saturação do detector, explícita pela diminuição da relação sinal/ruído. Entre 5,0 e 10 mmol L^{-1} , não houve diferença significativa do perfil de separação. Logo, optou-se pela concentração mais baixa dentre elas com o objetivo de aumentar a capacidade tamponante de CAPS/CAPS $^-$.

A escolha da concentração do tampão CAPS/CAPS $^-$ foi realizada pelas análises eletroforéticas da mistura das soluções padrão em diferentes concentrações do tampão à concentração fixa de DNB, 5 mmol L^{-1} . Observou-se que as concentrações maiores, nas quais apresentavam boa capacidade tamponante, havia também perda da detectabilidade. Isto pode ser ilustrado pelo eletroferograma da **Figura 4.2**, a qual representa a separação de aminoácidos com uso do eletrólito tampão CAPS/CAPS $^-$ 20 mmol L^{-1} e DNB^- 5 mmol L^{-1} . Este sistema apresenta capacidade tamponante de 9 mmol L^{-1} (de acordo com Peakmaster), porém há diminuição do número de picos detectados. Já com o emprego de CAPS/CAPS $^-$ na concentração de 10 mmol L^{-1} , ocorre diminuição da capacidade tamponante, mas houve melhora da detectabilidade. Esta diminuição do número de picos pode ser justificada pelo maior influência da substituição competitiva dos íons do tampão pelos íons do analito na concentração de CAPS de 20 mmol L^{-1} . Este efeito ocorre na detecção indireta realizada com eletrólito contendo dois co-íons (tampão e cromóforo) e pode prejudicar o limite de detecção do método de análise (Johns, Macka et al. 2003). Portanto, optou-se pela concentração do tampão de 10 mmol L^{-1} .

Figura 4.2. Eletroferogramas da mistura padrão de 19 aminoácidos* 50 mg L⁻¹. Eletrólitos CAPS/CAPS⁻ na concentração de (A) 20 e (B) 10 mmol L⁻¹ com 3,5-dinitrobenzoato 5,0 mmol L⁻¹ a pH 10,6. Modificador de fluxo DDAB a 4 mmol L⁻¹. Tensão de -15 kV. Injeção de 3 s a 0,5 psi. Capilar de 75 µm de diâmetro interno; 50,2 cm de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivo. Detecção indireta em 254 nm. Corrente de -12,1 µA.

* O aminoácido arginina foi excluído da mistura, pois comigra com o EOF.

Logo, a composição CAPS/CAPS⁻ 10 mmol L⁻¹ e DNB 5 mmol L⁻¹ foi empregada como eletrólito temporário para a separação eletroforética dos aminoácidos primários. A **Figura 4.3** ilustra os eletroferogramas da solução da mistura dos padrões de 18 aminoácidos primários nas concentrações encontradas na urina de acordo com (Burtis, Ashwood et al. 2006). Estes valores de concentração foram extraídos dos intervalos de referência de concentração dos aminoácidos em urina de crianças com faixa etária de 3 a 12 anos (Burtis, Ashwood et al. 2006). Considerou-se a menor concentração do intervalo de referência (**Tabela 4.2**).

Figura 4.3. Eletroferogramas obtidos em dias diferentes da solução de mistura padrão de 18* aminoácidos em concentrações encontradas na urina de crianças com faixa etária de 3 a 12 anos. Eletrólito CAPS/CAPS⁻ 10,0 mmol L⁻¹; DNB⁻ 5,0 mmol L⁻¹ a pH 10,6. Modificador de fluxo DDAB a 4 mmol L⁻¹. Tensão de -15 kV. Injeção de 3 s a 0,5 psi. Capilar de 75 µm de diâmetro interno; 50,2 cm de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivo. Detecção indireta em 254 nm. Corrente de -12,1 µA.

* Arg comigra com EOF e Pro não é detectada por esta técnica por se encontrar em quantidades traço em matrizes de urina.

Tabela 4.2. Intervalo de Referência dos Aminoácidos na Urina adaptado de Burtis and Ashwood 2006.

Aminoácidos	Concentração Mínima (mmol L⁻¹)	Massa Molecular (g mol⁻¹)
Ala	0,06800	89,09
Arg	0,01933	174,20
Asn	0,02267	132,12
Trp	0,01667	204,21
Asp	0,02533	132,12
Cys	NE	121,16
Glu	0,15333	147,13
Gln	0,09333	146,15
Gly	0,12933	75,07
His	0,06867	155,16
Iso	0,01000	131,17
Leu	0,01530	131,17
Lys	0,04267	146,19
Met	0,01333	149,21
Phe	0,01600	165,18
Pro	traços	115,13
Ser	0,10333	105,09
Thr	0,05667	119,12
Tyr	0,02667	181,19
Val	0,01000	117,15

NE: não encontrado em valor de referência.

Após a obtenção do perfil eletroforético reproduzível dos analitos, foi possível identificar cada aminoácido (**Figura 4.4**).

Figura 4.4. Eletroferograma da solução de mistura padrão de 18* aminoácidos primários nas concentrações encontradas na urina de crianças com faixa etária de 3 a 12 anos. Eletrólito CAPS/CAPS⁻ 10,0 mmol L⁻¹; DNB⁻ 5,0 mmol L⁻¹ a pH 10,6. Modificador de fluxo DDAB a 4 mmol L⁻¹. Tensão de -15 kV. Injeção de 3 s a 0,5 psi. Capilar de 75 µm de diâmetro interno; 50,2 cm de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivo. Detecção indireta em 254 nm. Corrente de -12,1 µA.

* Arg comigra com EOF; e Pro não é detectada por esta técnica por se encontrar em quantidades traço em matrizes de urina.

○ Picos de sistema

Entretanto, há neste perfil eletroforético dois picos de sistema, os quais são circutados na **Figura 4.4**. Estes picos pode se associar com a presença de dois coíons, sendo CAPS⁻ e DNB⁻. Para eliminar estes picos, foi necessária a alteração do eletrólito pela substituição do co-íon do tampão CAPS⁻ por um contraíon do

cromóforo. Com isso, trietilamina (TEA) e dietilamina (DEA) foram estudadas como substâncias tamponantes. DEA e TEA são substâncias básicas com grupo amino cujo pKa é 10,93 e 10,86 respectivamente; logo é possível tamponar em regiões próximas a estas constantes.

As concentrações de DNB^- estudadas na separação dos aminoácidos foram mantidas na metade da concentração de TEA ou DEA, para obter maiores capacidades tamponantes de TEA ou DEA, desde que a concentração do cromóforo não ultrapassasse 10 mmol L^{-1} . Priorizaram-se concentrações mais altas do tampão no preparo do eletrólito para evitar a influência da protonação do cromóforo que alteraria o pH do eletrólito, já que o mesmo apresenta caráter ácido. Além disso, como previsto pelo software Peakmaster (Gas), em concentrações baixas de DEA, ocorre a formação de picos de sistema devido a proximidade em nível de concentração dos íons do cromóforo com os íons hidróxido do meio. Nesta situação, os íons hidróxido se comportam como coíons do cromóforo. Logo, é necessário o aumento da concentração do tampão para compensar o uso de concentrações mais altas do cromóforo.

Diante deste contexto, os eletrólitos TEA $20,0$ e DNB^- $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$; DEA $20,0$ e DNB^- $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foram avaliados (**Figura 4.5**). O primeiro foi escolhido, devido ao maior afastamento do pico de sistema.

Figura 4.5. Eletroferograma de mistura padrão de 17* aminoácidos nas concentrações da urina. Emprego eletrólito **(A)** tampão DEA/DEA⁺ 20 mmol L⁻¹ e DNB⁻ 10 mmol L⁻¹ 10,96 e **(B)** tampão TEA/TEA⁺ 20 mmol L⁻¹ e DNB⁻ 10 mmol L⁻¹ pH 10,84. Modificador de fluxo DDAB em 4 mmol L⁻¹. Tensão de -15 kV. Injeção de 3s a 0,5 psi. Capilar de 75 µm de diâmetro interno; 50,2 cm de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivo. Detecção indireta em 254 nm. Corrente de (A) - 16 µA e (B) -13 µA .

* Sem adição de prolina, cisteína e arginina. As duas primeiras não são detectáveis por UV-vis em amostras de urina e a última migra no EOF.

Em conclusão, escolheu-se como sistema de eletrólito (eletrólito otimizado) TEA 20 mmol L⁻¹ e DNB 10 mmol L⁻¹ para a separação dos 17 padrões de aminoácidos primários, com condicionamento conforme estudo no item **4.1.2**. A **Figura 4.6** ilustra estas condições, bem como a identificação dos picos. A solução padrão da mistura não contém os aminoácidos Arg, Cys e Pro, pois os dois últimos estão em níveis traços na urina e não podem ser detectados por UV-vis, enquanto que o primeiro migra com o EOF. O aminoácido Lys foi adicionado à mistura padrão, porém não é detectado devido a sua comigração com o pico de sistema em 12,1 minutos.

Figura 4.6. Eletroferograma da solução padrão da mistura de 17 aminoácidos primários nas concentrações da urina. Emprego eletrólito tampão TEA/TEA⁺ 20 mmol L⁻¹ e DNB⁻ 10 mmol L⁻¹ pH 10,84. Modificador de fluxo DDAB em 4 mmol L⁻¹. Tensão de -15 kV. Injeção de 3s a 0,5 psi. Capilar de 75 µm de diâmetro interno; 50,2 cm de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivo. Detecção indireta em 254 nm. Corrente de - 9 µA.

* Sem adição de prolina, cisteína e arginina.

4.1.3. Diferença do Potencial Aplicado

A polaridade foi mantida negativa na extremidade da injeção para que os analitos possam migrar no sentido do detector posicionado perto do anodo. No eletrólito otimizado, estudou-se o efeito da diferença de potencial aplicada. Buscaram-se diferenças de potenciais maiores para diminuir o tempo de análise. Porém o aumento da diferença de potencial para valores maiores (em módulo) de -15 kV causou elevação do EOF e da velocidade dos analitos, gerando comigrações. Portanto, este valor de -15 kV foi escolhido como valor ótimo.

4.1.4. Temperatura de termostatização

Diferentes temperaturas foram avaliadas para aumentar a separação dos aminoácidos, entretanto não houve nenhum efeito significativo sobre a resolução dos picos. Logo, a mesma foi mantida a 25 ° C.

4.1.5. Dimensões das Colunas Capilares

Optou-se pelo uso de colunas de 50,2 cm de comprimento total e 40 de comprimento efetivo. Empregaram-se capilares com diâmetro interno de 0,75 µm para obter alta detectabilidade. Capilares com 60,2 cm de comprimento total foram avaliados, porém não houve diferença significativa na resolução dos picos.

4. 2. OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA EM PH BAIXO– DETECÇÃO UV DIRETA

O desenvolvimento de um método de separação dos aminoácidos que absorvem no UV/vis em pH baixo com detecção UV direta proporcionaria a análise dos aminoácidos aromáticos, His e Arg (caso estes analitos comigrassem em pH alto –detecção indireta) e a análise de creatinina, constituinte empregado na normalização da concentração dos aminoácidos.

Este procedimento de normalização é necessário para permitir a comparação entre perfis de concentração de metabólitos de amostras de urina de diferentes pessoas. A normalização mais comum é dividir todos os sinais dos metabólitos pelo

sinal de creatinina, pois a concentração da creatinina é razoavelmente constante durante todo o dia e diretamente proporcional à massa muscular do indivíduo, sendo possível então utilizá-la para corrigir as diferentes diluições entre as amostras (Garcia-Perez, Vallejo et al. 2008).

O comprimento de onda de detecção dos aminoácidos foi escolhido com base no espectro em linha obtido pelo emprego do detector de arranjos de diodos. As análises foram realizadas em 200 nm para a Arg e 214 nm para os demais analitos, comprimentos de onda que proporcionaram maior detectabilidade dos aminoácidos nas amostras de urina.

4.2.1. Condicionamento da Coluna Capilar

As colunas capilares empregadas no método pH baixo – detecção UV direta foram condicionadas com ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ para evitar a desprotonação dos grupos silanóis da parede capilar. Os condicionamentos de início de trabalho e entre corridas consecutivas empregados estão detalhados na **Tabela 4.3**.

Tabela 4.3. Substância e soluções empregadas no condicionamento do capilar no método pH baixo – detecção UV direta com as respectivas duração e pressão aplicada.

Solução/substância	Tempo de condicionamento (minutos)		Pressão Hidrodinâmica Aplicada (psi)
	Início de Trabalho	Entre corridas	
HCl 0,1 mol L ⁻¹	3	1	20
H ₂ O	2	0	20
Eletrólito	7	1	20

4.2.2. Constituintes do Eletrólito e Condições Eletroforéticas

Tampão fosfato foi empregado para a separação eletroforética dos aminoácidos em pH baixo, sendo que a concentração e o pH do eletrólito foram estudados por meio do software Peakmaster (Gas). A escolha do pH ótimo para separação segundo o software foi de 2,1. Em relação à concentração do tampão, somente em valores acima de 65 mmol L⁻¹ de tampão fosfato havia a separação total de creatinina, arginina e histidina.

Com isso, foram estudadas experimentalmente as concentrações de 60 a 120 mmol L⁻¹ de tampão fosfato, com variações de 5 mmol L⁻¹. Concentrações acima de 60 mmol L⁻¹ proporcionaram a separação total de creatinina, histidina e arginina, porém havia comigração de fenilalanina e tirosina. Em valores de 90 mmol L⁻¹ de tampão fosfato, houve separação total de todos os picos (**Figura 4.7**).

Figura 4.7. Eletroferograma da mistura de soluções padrão de creatinina, Arg, His, Phe, Trp e Tyr nas concentrações da urina. Eletrólito tampão fosfato 90 mmol L⁻¹ pH 2,1. Tensão de +15 kV. Injeção de 7 s a 0,5 psi. Capilar de 75 µm de diâmetro interno; 40,2 cm de comprimento total e 30,0 cm de comprimento efetivo. Detecção direta em 200 e 214 nm. Corrente de +94 µA.

A temperatura termostatização foi mantida ao menor valor programável pelo equipamento, 15 °C, para evitar o aumento da corrente elétrica, a qual já se apresenta em valores altos. Pela mesma razão, a diferença de potencial aplicada foi mantida a +15 kV. Valores menores causaram eletrodispersão dos picos além de aumentar o tempo de análise. As análises foram realizadas em capilares de 75 µm de diâmetro, 40,2 cm de comprimento total e 30,0 cm de comprimento efetivo.

4.3. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE URINA

As duas propostas metodológicas de separação dos aminoácidos em pH baixo-detecção direta e em pH alto-detecção indireta foram aplicadas a análise das amostras de urina.

4.3.1. Remoção de Proteínas da Matriz de Urina

Foi necessária a eliminação de proteínas, as quais estão presentes em grandes concentrações nas amostras de urina, evitando assim a adsorção destas macromoléculas na parede do capilar que poderia afetar o EOF e influenciar os resultados da análise (Garcia-Perez, Vallejo et al. 2008). As proteínas foram removidas por filtros Milipore com corte de peso acima de 10 kD (10.000 MWCO).

4.3.2. Extração em fase sólida por troca catiônica

A concentração de sais em fluidos biológicos é bastante variável em matrizes de urina (50 a 1000 mmol L⁻¹), além de ser muito alta (Landers 1996). Para eliminar esta interferência, as amostras foram diluídas em água deionizada antes da injeção. A quantidade de diluente necessária para eliminar a interferência dos ânions inorgânicos no método pH alto – detecção indireta prejudicava a detectabilidade dos aminoácidos nas matrizes de urina.

A extração em fase sólida por troca catiônica (SPETC) permite reduzir a concentração de parte dos interferentes da matriz de urina, como ânions inorgânicos

e ácidos orgânicos. Contudo, algumas substâncias catiônicas são eluídas junto com os analitos, por também apresentarem afinidade com a coluna, tendo como vantagem a análise de creatinina.

O uso de trocadores catiônicos com grupos extremamente ácidos, como grupos sulfônicos, possibilita a retenção dos aminoácidos desde que os mesmos estejam em uma soluções extremamente ácidas, em que há protonação de todos grupos amina e carboxila.

Em relação ao volume de redissolução da amostra evaporada, optou-se pelo mínimo de volume de diluição para favorecer a detectabilidade ou até mesmo preconcentrar os analitos. Testaram-se as diluições de 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 , 5000 e 6000 μL de água deionizada para o emprego de 500 μL de amostra controle. O volume de 5000 μL manteve o compromisso de promover a separação dos analitos nos métodos pH baixo-deteccção direta e pH alto-deteccção indireta e a detectabilidade dos analitos. Logo, as amostras foram diluídas para um fator de diluição de 1/10.

Da mesma forma, o tempo de injeção eletroforética foi otimizado para 7 segundos sob pressão hidrodinâmica de 20 psi em ambos os métodos desenvolvidos. Em tempos de injeção maiores que este, houve influência negativa sobre a resolução dos picos.

O perfil de separação dos aminoácidos obtido após o tratamento da amostra controle está ilustrado na **Figura 4.8 (A) e (B)**.

Figura 4.8 (A). Identificação dos aminoácidos primários **(1)** imidazol*, **(2)** CRT, **(3)** Arg, **(4)** His **(5)** Trp **(6)** Phe e **(7)** Tyr na amostra teste **T5** diluída 1/10. Emprego eletrólito tampão fosfato 90 mmol L⁻¹, pH 2,1. Tensão de +15 kV. Injeção de 7 s a 0,5 psi. Capilar de 75 µm de diâmetro interno; 40,2 cm de comprimento total e 30,0 cm de comprimento efetivo. Detecção direta em 200 (análise arginina) e 214 nm (análise creatinina e demais aminoácidos). Corrente de +94 µA. *Emprego como padrão interno.

Figura 4.8 (B). Identificação dos aminoácidos primários (1) Asp, (2) Glu, (3) ácido glicólico*, (4) e (5) Tyr e Ser, (6) Gly, (7), (8) e (9) Asn, Thr ou impurezas, (10) Ala, (11) Gln, (12) Met, (13) His, (14) e (15) Phe e Val, (16), (17) e (18) Iso, Leu e Trp. na amostra **T1** diluída 1/10. Emprego do eletrólito tampão TEA 20 mmol L⁻¹ e DNB 10 mmol L⁻¹; pH 10,84. Modificador de fluxo: DDAB a 4 mmol L⁻¹. Tensão de -15 kV. Injeção de 3 s a 0,5 psi. Capilar de 75 µm de diâmetro interno; 50,2 cm de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivo. Detecção indireta em 254 nm. Corrente de -9 µA.
* Emprego como padrão interno.

4.4. OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Após obter perfil reprodutível dos analitos nas amostras de urina, os dois métodos desenvolvidos foram avaliados pela obtenção de parâmetros de validação de acordo com (Cassiano, Barreiro et al. 2009).

A ausência de um branco da amostra de urina foi resolvida com o preparo de um branco sintético de acordo com (Cassiano, Barreiro et al. 2009), cuja composição se encontra na **Tabela 4.4**. Este branco sintético foi diluído 2 vezes e empregado para a diluição das soluções utilizadas para obtenção dos parâmetros de validação dos métodos.

Tabela 4.4. Constituintes empregados no branco sintético adaptado de (Shmaefsky 1990)

Constituintes	Concentração (mmol L ⁻¹)
Albumina*	50
Cloreto de Potássio	201
Cloreto de Sódio	154
Dihidrogenofosfato de sódio	61,5
Uréia	602

* A concentração de albumina está em mg L⁻¹.

4.4.1. Seletividade

A seletividade de um método bioanalítico é, em geral, avaliada a partir da análise da amostra branco de 6 matrizes biológicas de procedências distintas (Cassiano, Barreiro et al. 2009). Nesta análise, a seletividade é alcançada quando não há interferente, visível pelo detector em uso, na região do analito de interesse.

Neste trabalho, a falta de disponibilidade de amostras isentas de aminoácidos foi contornada com a análise do branco sintético diluído 1/2 (**Figura 4.9**), diluição esta menor que a diluição das amostras de urina.

Figura 4.9. Eletroferogramas da solução do branco sintético corrida em **(A)** pH alto-deteção indireta e **(B)** em pH baixo-deteção direta. **(A)** Emprego do eletrólito tampão TEA 20 mmol L⁻¹ e DNB 10 mmol L⁻¹; pH 10,84. Modificador de fluxo: DDAB a 4 mmol L⁻¹. Tensão de -15 kV. Injeção de 3 s a 0,5 psi. Capilar de 75 µm de diâmetro interno; 50,2 cm de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivo. Deteção indireta em 254 nm. Corrente de -9 µA. **(B)** Emprego eletrólito tampão fosfato 90 mmol L⁻¹, pH 2,1. Tensão de +15 kV. Injeção de 7 s a 0,5 psi. Capilar de 75 µm de diâmetro interno; 40,2 cm de comprimento total e 30,0 cm de comprimento efetivo. Deteção direta em 200 (análise arginina) e 214 nm (análise creatinina e demais aminoácidos). Corrente de +94 µA.

A seletividade do método em pH baixo-deteção direta também foi avaliada pela pureza espectral dos analitos na amostra de urina sintética calculada pelo *software* do equipamento (**Tabela 4.5**). Este cálculo baseou-se na comparação da altura máxima dos picos dos analitos da amostra controle **C38** com a altura dos picos do padrão em água. Valores acima de 0,995 confirmam que o pico analisado corresponde ao analito desejado, ao passo que valores abaixo de 0,995 promove atribuição duvidosa dos analitos. Os valores abaixo de 0,995 para Trp e Phe pode ser justificados pelo nível de quantificação próximo ao limite de quantificação do método.

Tabela 4.5. Pureza espectral dos analitos calculada pelo software Beckman Coulter.

Analitos	Pureza Espectral
CRT	0,980
Arg	0,994

Analitos	Pureza Espectral
His	0,997
Trp	0,919
Phe	0,984
Tyr	0,991

4.4.2. Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

O limite de detecção é definido como a menor concentração do analito que o método é capaz de diferenciar confiavelmente do ruído de fundo. O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificado com níveis aceitáveis de precisão e exatidão (Cassiano, Barreiro et al. 2009).

O limite de quantificação foi calculado (**Tabela 4.6**) por meio da análise de diluições sucessivas de solução do branco dopada com os padrões de aminoácidos (nas concentrações mais baixas do intervalo de referência dos aminoácidos na matriz de urina) até obter sinal preciso e diferenciável do ruído da linha base. O limite de detecção foi calculado por $3/LD$.

Tabela 4.6. Limites de detecção e de quantificação (em mmol L^{-1}) dos aminoácidos.

Analitos	LD (mmol L^{-1})	LQ (mmol L^{-1})
Arg	5,33E-05	1,60E-04
CRT	2,57E-06	7,70E-06
His	5,24E-04	1,57E-03

Analitos	LD (mmol L ⁻¹)	LQ (mmol L ⁻¹)
Trp	2,78E-05	8,33E-05
Phe	1,33E-04	4,00E-04
Tyr	2,22E-04	6,67E-04
Asp	3,76,E-03	1,13,E-02
Glu	3,40,E-03	1,02,E-02
Gly	6,66,E-03	2,00,E-02
Ala	5,61,E-03	1,68,E-02

4.4.3. Precisão Intradia e Precisão Interdia

Foram avaliadas a precisão intradia (repetibilidade) e precisão interdia (intermediária), com emprego de soluções de mistura padrão dos analitos preparadas por fortificação do branco sintético em dois níveis de concentração diferentes. Cada nível de concentração foi preparado em triplicata e injetado no equipamento em duplicata. Na precisão intradia, as análises foram feitas no mesmo dia enquanto que na precisão interdia, as análises foram repetidas em 3 dias não consecutivos com analistas e equipamentos diferentes (**Tabela 4.7**) (Cassiano, Barreiro et al. 2009).

Tabela 4.7. Dados de precisão intradia e interdia expressos em coeficiente de variação dos métodos de análise.

Analito/Concentração (mmol L⁻¹)	Precisão Intradia % CV	Precisão Interdia (MDQ) % CV	Precisão Interdia (PA'800) % CV
Arg			
0,00387	10	11	12
0,01933	4,5	2,0	6,0
CRT			
0,07099	2,0	3,4	3,7
0,19400	1,0	1,5	2,3
His			
0,15099	2,6	3,9	3,2
0,63407	0,74	1,6	2,3
Trp			
0,00333	12	11,6	8,1
0,01667	2,2	4,6	6,2
Phe			
0,01600	3,3	6,5	5,8
0,07067	1,7	4,2	3,4
Tyr			
0,02667	9,5	4,6	10,6
0,11200	7,4	4,3	2,0

Pela observação dos valores obtidos para a precisão, conclui-se que o método é reprodutível nos modelos MDQ e PA'800 dos equipamentos da Beckman, com coeficientes de variação menores que 12%.

Os mesmos testes foram repetidos para o tratamento da amostra, com emprego da amostra controle **C38** sem fortificação com padrão, caracterizando a precisão intradia como três réplicas do procedimento de extração obtidas no mesmo dia, ao passo que a precisão interdia, três réplicas obtidas em dias não consecutivos (Cassiano, Barreiro et al. 2009). Os resultados foram obtidos no equipamento Beckman MDQ e estão ilustrados na **Tabela 4.8**.

Tabela 4.8. Dados de precisão intradia e interdia expressos em coeficiente de variação da relação área do analito/área do padrão interno obtidas de réplicas do procedimento de extração da amostra controle **C38** sem fortificação.

Analito/Concentração (mmol L⁻¹)	Precisão Intradia (%)	Precisão Interdia (%)
Arg	3,1	9,3
CRT	10	4,3
His	12	7,6
Trp	13	13
Phe	14	3,7
Tyr	12	7,1

O procedimento de extração apresentou repetibilidade e reprodutibilidade, demonstrado por coeficientes de variação menores que 15%, limite este justificável por se tratar de uma matriz complexa.

4.4.4. Robustez

A robustez de um método analítico mede pequenas variações ocorridas durante a análise de rotina (Cassiano, Barreiro et al. 2009). Assim, a robustez (Tabela 4.9 e 4.10) foi avaliada pela realização de pequenas variações das condições eletroforéticas temperatura, tensão aplicada, pH e concentração do eletrólito.

Tabela 4.9. Parâmetro robustez expressos em coeficiente de variação* (% CV) para os aminoácidos analisados em pH baixo-deteção direta.

Parâmetros Eletroforéticos	Valores	Arg	CRT	His	Trp	Phe	Tyr
Temperatura (° C)	16	3,7	6,8	7,2	7,7	12	20
	17	9,2	6,7	8,7	15	15	22
	18	1,6	7,9	8,3	11	12	19
	19	5,7	10	9,7	12	18	28
	20	3,3	9,5	8,8	11	15	28
Tensão Aplicada (kV)	11	20	4,6	8,6	16	12	16
	12	1,1	5,0	7,6	11	11	19
	13	6,0	4,6	6,6	7,8	10	22
	14	9,9	6,3	7,3	10	12	19
	16	0,63	7,2	7,3	7,8	13	23
	17	2,5	8,8	8,0	6,4	15	30
	18	4,4	8,6	7,5	9,4	13	29
Concentração de Eletrólito (mmol L ⁻¹)	86	3,2	4,4	7,1	6,7	10	19
	88	0,32	7,9	11	10	14	22
	92	5,8	13	16	16	19	28
	94	2,4	9,8	13	12	16	25
pH	1,9	-	-	-	24	21	26
	2,0	5,4	1,2	5,1	10	10	18
	2,2	4,7	5,2	7,1	11	11	19
	2,3	13	2,2	3,7	4,3	5,0	9,1

* Coeficiente de variação calculado pelo desvio padrão e média entre a relação área do analito/área do padrão interno obtida nas condições otimizadas para o método pH baixo-deteção direta e a

relação área do analito/área do padrão interno dos analitos obtida nas condições otimizadas para o método pH baixo-deteção direta com pequenas variações eletroforéticas.

- comigração de His e Arg.

Em geral, as pequenas variações influenciaram significativamente nas áreas correspondentes a todos os aminoácidos, sendo necessário o controle adequado destas variações do método pH baixo-deteção direta.

Tabela 4.10. Parâmetro robustez expressos em coeficiente de variação* (% CV) para os aminoácidos analisados em pH alto-deteção indireta.

Parâmetros Eletroforéticos	Valores	Asp	Glu	Gly	Ala
Temperatura (°C)	13	3,4	7,8	0,80	-
	14	6,8	5,8	8,9	-
	16	45	8,1	2,0	-
	17	28	4,5	11	-
Tensão Aplicada (kV)	13	9,9	8,0	0,82	-
	14	2,0	5,8	9,0	-
	16	3,0	8,1	8,2	-
	17	0,94	4,5	11	-
Concentração de TEA (mmol L⁻¹)	18	-	-	-	-
	19	-	-	-	-
	21	22	16	7,4	-
	22	34	16	9,5	-

*Coeficiente de variação calculado pelo desvio padrão e média entre a relação área do analito/área do padrão interno obtida nas condições otimizadas para o método pH alto-deteção indireta e a relação área do analito/área do padrão interno dos com pequenas variações eletroforéticas.

- Comigrações.

O método de análise pH alto-deteção indireta apresentou-se robusto nas variações de temperatura entre 13 a 15 °C, de tensão aplicada entre 13 a 15 kV. Por outro lado, a mudança da concentração de TEA proporcionou comigrações, indicando necessidade de controle rígido da força iônica e do pH do meio.

4.4.5. Linearidade

Para avaliar a linearidade, curvas analíticas de 6 concentrações distintas foram construídas para alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, fenilalanina, triptofano, arginina e curvas analíticas de 8 concentrações foram construídas para histidina e creatinina. Estes dois últimos analitos apresentam faixa de concentração na matriz de urina mais ampla que os demais analitos. As soluções empregadas na construção da curva foram diluídas no branco sintético, sendo as mesmas preparadas e injetadas em triplicata. A **Tabela 4.11** ilustra a faixa de concentração, a qual engloba desde o limite de quantificação até 120% do valor máximo de referência dos analitos encontrados na urina e os parâmetros da ANOVA, R^2 , F, e p obtidos a 95% de nível de confiança.

Tabela 4.11. Faixa de linearidade e parâmetros da curva analítica.

Analitos	Faixa de Linearidade (mmol L ⁻¹)	R ²	Intercepto	Coefficiente Angular	F	p
CRT	7,70E ⁻⁶ a 1,41000	0.995 ± 0.0360	0.0160 ± 0.00762	1.073 ± 0.0112	9223	2.2E ⁻²⁸
Arg	1,60E ⁻⁴ a 0,33000	0.998 ± 0.00900	0.00128 ±0.00294	1.77 ±0.0153	13431	3.2E ⁻⁴⁰
His	1,57E ⁻³ a 0,77000	0.992 ± 0.027	0.0108 ± 0.00567	0.896 ± 0.0114	6214	4.0E ⁻⁵⁴
Trp	8,33E ⁻⁵ a 0,24000	0.992 ± 0.068	-0.0160 ± 0.0260	10.03 ± 0.166	3659	2.3E ⁻³⁰
Phe	4,00E ⁻⁴ a 0,30000	0.985 ± 0.056	-0.0119 ± 0.0244	5.0101 ± 0.121	1724	1.4E ⁻²⁴
Tyr	6,67E ⁻⁴ a 1,40000	0.969 ± 0.046	0.0433 ± 0.0190	2.93 ± 0.103	796	1.8E ⁻²⁰
Asp	1,13E ⁻² a 0,09391	0,942 ± 0,695	-0,661 ± 0,23	73,02 ± 4,26	294	1.4E ⁻¹²
Ala	1,68E ⁻² a 0.76860	0.954 ± 3.48	-1,52 ± 1,27	98,4 ± 4,98	390	4.0E ⁻¹⁴
Glu	1,02E ⁻² a 0,08499	0,950 ± 0,400	-0,846 ± 0,179	56,9 ± 0,221	312	1.9E ⁻¹¹
Gly	2,00E ⁻² a 1,25760	0,938 ± 0,781	2,0070 ± 0,158	28,6 ± 0,638	304	1.5E ⁻¹³

As curvas analíticas apresentaram linearidade dentro da faixa de concentração dos aminoácidos na urina e parâmetros da ANOVA satisfatórios para os aminoácidos analisados pelo método pH baixo-deteccção direta. Por outro lado, as

curvas analíticas dos aminoácidos analisados em pH alto-detecção indireta não apresentaram linearidade satisfatória. Um intervalo menor de concentração deve ser avaliado para melhorar este parâmetro de validação.

4.4.6. Recuperação

A recuperação dos analitos frente ao método de extração da amostra foi avaliada por meio da amostra fortificada com solução padrão dos aminoácidos. Calculou-se a diferença da relação área do analito/área do padrão interno obtida da amostra fortificada pela relação área do analito/área do padrão da amostra controle sem fortificação. Esta diferença foi comparada em porcentagem com a relação da área do padrão/área do padrão interno, proveniente da solução diluída em água deionizada sem processamento na SPE.

Dois níveis de concentração foram avaliados, baixo e médio, com duas réplicas do procedimento de extração definido na **Figura 4.10**, as quais foram injetadas em triplicata. Para os aminoácidos analisados em pH alto, apenas um nível de concentração foi avaliado.

Figura 4.10. Procedimento inicial de extração.

Inicialmente, os valores de recuperação foram baixos e todo o procedimento da extração em fase sólida foi avaliado.

O volume recolhido durante a etapa de lavagem da coluna de extração foi injetado no equipamento. Havia sinal dos analitos na corrida eletroforética (**Figura 4.11 A**), comprovando a perda dos analitos nesta etapa. Para evitar esta perda, a vazão de eluição foi reduzida de aproximadamente 30 gotas para 15 gotas de solução por minuto. Ao monitorar novamente a solução de lavagem a vazão reduzida, observou-se ausência dos picos nos tempos de migração dos analitos.

Além disso, avaliou-se o volume necessário de NH_4OH na eluição dos analitos. Após eluir mais 1 mL, além de 1 mL definido pelo procedimento experimental, na mesma coluna, observou-se que a quantidade de NH_4OH não foi suficiente para a total eluição dos aminoácidos. Então, alíquotas sucessivas de 1 mL foram eluídas e imediatamente injetadas até obter ausência de sinal de absorbância no tempo de migração dos compostos (**Figura 4.11 B**), sendo esta ocorrida com 6 mL de eluente.

Figura 4.11. Estudo do procedimento de extração em fase sólida por troca catiônica. **(A)** Eletroferograma e espectro (em 3,63 minutos) da solução recolhida após lavagem da coluna de troca

catiônica sob vazão de 30 gotas por minuto. **(B)** Eletroferograma da sexta alíquota de NH_4OH durante a etapa de eluição da coluna de troca catiônica.

Com o aumento do volume de eluente e redução da vazão na etapa de lavagem, houve recuperação com valores acima de 75 %, observada na **Tabela 4.12**. A recuperação do padrão interno, imidazol, empregado no método em pH baixo foi realizada simultaneamente junto com os analitos.

Tabela 4.12. Valores de recuperação do padrão da matriz da amostra e seus respectivos valores de precisão expressos em coeficiente de variação.

Analitos (concentração em mmol L⁻¹)	Recuperação (%)	% CV
Arg		
0,00161	99,9	7,3
0,03866	97,2	5,5
CRT		
0,01796	110,8	17
0,02847	79,0	6,4
His		
0,06011	80,8	6,5
0,15099	98,4	4,9
Trp		
0,00137	101,6	1,3
0,03333	99,7	4,6
Phe		
0,00128	93,7	8,8
0,01600	92,6	3,5

Analitos (concentração em mmol L⁻¹)	Recuperação (%)	% CV
Tyr		
0,01060	80,5	7,1
0,02667	94,5	6,6
Asp		
0,02514	81,9	6,0
Glu		
0,15333	75,8	0,8
Gly		
0,11000	85,6	9,7
Ala		
0,06800	74,7	9,9
Imidazol		
0,73446	77,7	2,3

4.5. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Após os resultados precisos e aceitáveis de recuperação dos analitos na matriz de urina, as 38 amostras englobando a amostra controle foram submetidas ao processo de remoção de proteínas, e à extração em fase sólida. Após o tratamento, as mesmas foram diluídas 1/10 e analisadas no método em pH alto. O grande volume de diluição foi necessário para eliminar cloreto proveniente da etapa de lavagem da extração em fase sólida e sódio proveniente da matriz da amostra.

A identificação de cada aminoácido nas amostras de urina foi realizada por dopagem com solução padrão na concentração correspondente à metade da

concentração encontrada. No método pH alto-deteção indireta, os analitos foram identificados na amostra **C38** e na amostra **T1**. A identificação dos aminoácidos nas demais amostras foi realizada pela comparação com o perfil destas duas amostras. Já no método pH baixo-deteção direta, os analitos foram identificados pela comparação com o perfil da amostra **C38**.

A diluição de 1/10 reduziu o nível de concentração abaixo do limite de detecção para os aminoácidos Glu, Asp, Asn, Thr, Gln e Met em todas as amostras, com exceção da amostra **T1**, na qual foi possível a identificação destes analitos (**Figura 4.8 (B)**). A detecção dos aminoácidos Ala e Gly foi possível em todas as amostras, porém a quantificação foi possível em poucas amostras (**Tabela 4.12**). A quantificação de Ala e Gly foi realizada por comparação com uma solução padrão diluída no branco sintético.

Imediatamente após estas análises, as mesmas amostras foram analisadas no método em pH baixo-deteção direta. O fator de diluição de 1/10 não foi suficiente para eliminar a interferência da matriz na região de migração de Phe, Trp e Tyr e promover a separação em linha base de histidina e creatinina. Assim, as amostras foram diluídas novamente com fator de diluição de 1/12, diluição esta que promoveu a redução do nível de concentração de Arg para valor inferior ao limite de quantificação. A **Tabela 4.12** ilustra as concentrações em mmol L^{-1} das amostras extraídas em duplicatas (rélicas **a** e **b**). O cálculo da concentração dos analitos foi realizado por meio de curvas de calibração construídas a partir de soluções padrão diluídas no branco e injetadas no mesmo dia da análise das amostras.

Tabela 4.12. Concentrações em mmol L⁻¹ dos aminoácidos nas amostras de urina.

Amostras	CRT	His	Trp	Phe	Tyr	Arg	Ala	Gly
TS1a	2,638540	0,202433	0,005914	0,003745	0,013886	<LQ	<LQ	<LQ
TS1b	5,250721	0,317484	0,005836	0,004386	0,026423	<LQ	<LQ	<LQ
TS2a	6,581091	0,943621	0,005575	0,004793	0,070875	<LQ	<LQ	<LQ
TS2b	6,108854	0,950507	0,006183	0,005884	0,090656	<LQ	<LQ	<LQ
TS3a	5,661776	0,39208	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
TS3b	5,771039	0,320642	0,0061	0,005374	0,06013	<LQ	<LQ	<LQ
TS4a	1,187681	0,245545	0,005235	0,004076	0,006284	<LQ	<LQ	<LQ
TS4b	0,845538	0,15243	0,004376	0,004136	0,047592	<LQ	<LQ	<LQ
TS5a	3,365869	0,349401	0,006435	0,005469	0,045451	<LQ	<LQ	<LQ
TS5b	3,325902	0,323638	0,005865	0,004329	0,019041	<LQ	<LQ	<LQ
TS6a	1,487836	0,173485	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

Amostras	CRT	His	Trp	Phe	Tyr	Arg	Ala	Gly
TS6b	1,556473	0,16034	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
TS7a	3,496678	0,325429	0,005536	0,00435	0,046857	<LQ	<LQ	<LQ
TS7b	3,105292	0,265604	0,005382	0,004219	0,030382	<LQ	0,04538	0,04678
TS8a	2,411124	0,351229	0,005871	0,00372	0,054651	<LQ	<LQ	0,112239
TS8b	2,795087	0,309096	0,005882	0,003786	0,060585	<LQ	<LQ	0,051896
TS9a	1,74983	0,215397	0,005417	0,003865	0,032459	<LQ	<LQ	<LQ
TS9b	1,675519	0,21465	0,005349	0,00431	0,030301	<LQ	<LQ	<LQ
TS10a	3,302819	0,387728	0,00619	0,005155	0,097146	<LQ	<LQ	<LQ
TS10b	3,296731	0,393193	0,006385	0,00469	0,094922	<LQ	<LQ	<LQ
TS11a	8,370179	0,820969	0,009243	0,004911	0,17196	<LQ	<LQ	<LQ
TS11b	8,305071	0,845794	0,00959	0,007995	0,178348	<LQ	<LQ	<LQ
TS12a	1,786597	0,247585	0,005492	0,004458	0,032512	<LQ	<LQ	0,043781
TS12b	1,747682	0,320512	0,005806	0,004021	0,030677	<LQ	<LQ	0,053783

Amostras	CRT	His	Trp	Phe	Tyr	Arg	Ala	Gly
TS13a	4,186999	0,361045	0,007063	0,004915	0,057072	<LQ	<LQ	<LQ
TS13b	4,234811	0,450595	0,006978	0,005152	0,043937	<LQ	<LQ	<LQ
TS14a	5,350864	0,514964	0,00761	0,005212	0,206482	<LQ	<LQ	0,095112
TS14b	5,314792	0,561485	0,007564	0,004899	0,118219	<LQ	<LQ	0,088775
TS15a	5,905908	1,463536	0,012349	0,008731	0,220959	<LQ	<LQ	<LQ
TS15b	5,795721	0,833516	0,01284	0,007003	0,170695	<LQ	<LQ	<LQ
TS16a	4,145352	0,402971	0,007135	0,005362	0,085208	<LQ	<LQ	0,055226
TS16b	4,376081	0,64252	0,007596	0,005554	0,093515	<LQ	<LQ	0,052747
TS17a	11,55176	0,593981	0,008634	0,004789	0,243158	<LQ	0,036163	0,162309
TS17b	10,83091	0,564451	0,009191	0,00527	0,276244	<LQ	<LQ	<LQ
TS18a	2,545963	1E-10	0,006075	0,004055	0,057518	<LQ	<LQ	<LQ
TS18b	2,632154	0,452001	0,005847	0,004265	0,070505	<LQ	<LQ	<LQ
TS19a	2,468404	0,263582	0,005986	1E-10	0,059238	<LQ	<LQ	<LQ

Amostras	CRT	His	Trp	Phe	Tyr	Arg	Ala	Gly
TS19b	2,556852	0,275473	0,006055	0,003693	0,029819	<LQ	<LQ	<LQ
TS20a	1,01428	0,13676	0,006434	0,004275	0,031221	<LQ	<LQ	<LQ
TS20b	1,138618	0,138218	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
TS21a	1,49685	0,443195	0,006476	0,004612	0,12632	<LQ	<LQ	<LQ
TS21b	1,620463	0,510447	0,007145	0,004017	0,119452	<LQ	<LQ	<LQ
TS22a	3,734289	0,471292	0,006322	0,004439	0,081797	<LQ	<LQ	<LQ
TS22b	3,606175	0,488793	0,006575	0,004093	0,06968	<LQ	<LQ	<LQ
TS23a	2,073243	0,173201	0,005309	0,003737	0,027249	<LQ	<LQ	<LQ
TS23b	2,005746	0,185374	0,005321	0,004798	1E-10	<LQ	<LQ	<LQ
CS24a	10,37749	1,664338	0,010332	0,00827	0,289894	<LQ	<LQ	0,016751
CS24b	10,28588	1,551243	0,010369	0,008867	0,347292	<LQ	<LQ	<LQ
CS25a	5,556733	1,273449	0,011086	0,005986	0,348248	<LQ	<LQ	<LQ
CS25b	5,699895	1,373504	0,012157	0,006412	0,410092	<LQ	<LQ	<LQ

Amostras	CRT	His	Trp	Phe	Tyr	Arg	Ala	Gly
CS26a	10,29053	1,725765	0,010614	0,00953	0,380252	<LQ	<LQ	<LQ
CS26b	2,153493	0,191009	0,005621	0,004191	0,066184	<LQ	<LQ	<LQ
CS27a	1,782519	0,296428	0,005504	0,004217	0,039133	<LQ	0,045665	0,0682
CS27b	1,734112	0,32037	0,005502	0,0039	0,010459	<LQ	<LQ	<LQ
CS28a	8,965683	1,394452	0,010549	0,004399	0,090653	<LQ	<LQ	<LQ
CS28b	9,268676	1,43753	0,010198	0,004615	0,09669	<LQ	<LQ	<LQ
CS29a	5,618813	0,860438	0,006634	0,005132	0,133228	<LQ	<LQ	<LQ
CS29b	4,991777	0,821216	0,006558	0,005088	0,114909	<LQ	<LQ	<LQ
CS30a	5,095297	0,772447	0,006291	0,004609	0,101671	<LQ	<LQ	0,086121
CS30b	1,255136	0,300686	0,005828	0,003882	0,038379	<LQ	<LQ	<LQ
CS31a	2,800698	0,343663	0,005662	0,004115	0,06102	<LQ	<LQ	<LQ
CS31b	3,460503	0,261665	0,005616	0,003852	0,072212	<LQ	<LQ	<LQ
CS32a	10,41984	1,311468	0,011277	0,006615	0,365329	<LQ	<LQ	<LQ

Amostras	CRT	His	Trp	Phe	Tyr	Arg	Ala	Gly
CS32b	9,472184	1,184715	0,011042	0,006373	0,309826	<LQ	<LQ	<LQ
CS33a	1,304097	0,374388	0,00677	0,004026	0,062466	<LQ	<LQ	0,304156
CS33b	1,225642	0,364199	<LQ	0,004214	0,087538	<LQ	<LQ	0,252299
CS34a	0,893371	0,140979	0,005225	0,003783	0,018422	<LQ	<LQ	0,040797
CS34b	0,951508	0,17959	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
CS35a	10,28834	1,43088	0,007671	0,005875	0,135538	<LQ	<LQ	<LQ
CS35b	7,442019	1,092599	0,006873	0,004559	0,128504	<LQ	<LQ	<LQ
TS36a	8,434987	1,071412	0,009143	0,006527	0,318217	<LQ	<LQ	<LQ
TS36b	8,506983	1,105984	0,009276	0,006576	0,305284	<LQ	<LQ	<LQ
TS37a	11,56898	1,829316	0,007593	0,005872	0,198209	<LQ	<LQ	<LQ
TS37b	10,01234	1,590254	0,009476	0,008039	0,360713	<LQ	<LQ	<LQ
TS38a	12,40232	1,980094	0,013125	0,010213	0,584563	<LQ	<LQ	<LQ
TS38b	10,998	1,839976	0,010637	0,008784	0,437581	<LQ	<LQ	<LQ

< LQ: abaixo do limite de quantificação.

TS: amostras de urina provenientes de crianças que apresentam o refluxo vésico ureteral.

CS: amostras de urina provenientes de crianças que não apresentam o refluxo vésico-ureteral.

a, b: réplicas do procedimento de extração.

TS38: amostra controle.

4.6. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

O tratamento estatístico objetivou a classificação das amostras em dois grupos distintos, grupo de crianças saudáveis e grupo de crianças diagnosticadas com VUR. Foram consideradas somente como variáveis para o tratamento estatístico as concentrações dos aminoácidos Phe, His, Tyr e Trp, visto que estas variáveis foram obtidas em todas as 38 amostras analisadas.

Antes do tratamento estatístico, as amostras foram normalizadas pela divisão da concentração do analito pela concentração de creatinina. Este procedimento é necessário para que se possa comparar perfil de concentração de amostras de urina de diferentes pessoas. A normalização pela creatinina é mais empregada para amostras de urina, pois sua concentração é razoavelmente constante durante todo o dia e diretamente proporcional à massa muscular do indivíduo, sendo possível então utilizá-la para corrigir efeitos de diluição de outras substâncias presentes na urina (Garcia-Perez, Vallejo et al. 2008).

4.6.1. Classificação não supervisionada

A classificação de indivíduos em grupos pode ser supervisionada ou não supervisionada. Na classificação não supervisionada, os padrões de treino não se encontram classificados, e neste caso o algoritmo empregado na classificação encontra uma estrutura nos dados que permite dividi-los em grupos.

Foi construído gráfico de *scores* para os dois componentes principais (PC1 x PC2) de todas as quatro concentrações dos aminoácidos, o qual se encontra na **Figura 4.12**, junto com os valores de capacidade de ajuste (R^2) e capacidade de predição (Q^2) com os componentes principais PC1 e PC2. Pela observação visual do gráfico, há separação parcial entre indivíduos saudáveis e com VUR. Neste, há valor satisfatório de R^2 (valor satisfatório próximo de 1,000), porém o valor de Q^2 menor que 0,800 compromete a validação cruzada do método, ou seja, a probabilidade do método de distinguir uma nova amostra entre o grupo controle e o grupo de indivíduos com VUR é baixa. Os dados fora da região central definida pelo círculo podem ser consideradas como *outliers*, porém sua exclusão do tratamento estatístico comprometeria o resultado estatístico, pois a quantidade de dados foi pequena (apenas 38 amostras).

$$R^2_{PC1, PC2}: 0,999$$

$$Q^2_{PC1, PC2}: 0,617$$

Figura 4.12. Gráfico de *scores* PCA para os dois componentes principais (PC1 X PC2) construído com o emprego das concentrações normalizadas dos aminoácidos His, Phe, Trp e Tyr obtidas da análise por CE-UV. Os círculos azuis referem-se às amostras de urina de crianças sem VUR,

enquanto que os círculos vermelhos referem-se às amostras de urina de crianças com VUR. As letras **a** e **b** representam réplicas do procedimento de extração.

Gráficos de *scores* para os dois componentes principais (PC1 x PC2), empregando a concentração de cada par de aminoácidos foram construídos e obtiveram-se valores cumulativos satisfatórios de R^2 e Q^2 para o par Trp e Phe (**Figura 4.13 e 4.14**).

Figura 4.13. Gráfico de *scores* PCA construído com as concentrações normalizadas dos aminoácidos Phe e Trp obtidas da análise por CE-UV. Os círculos azuis referem-se às amostras de urina de crianças sem VUR, enquanto que os círculos vermelhos referem-se às amostras de urina de crianças com VUR. As letras **a** e **b** representam réplicas do procedimento de extração.

Figura 4.14. Representação da **Figura 4.22** em 3D.

4.6.2. Classificação Supervisionada

Na classificação supervisionada admite-se conhecida a classe dos indivíduos saudáveis e a classe dos indivíduos com VUR. Para tal classificação, empregou-se o método de PLS-DA. O gráfico de *scores* para os dois componentes principais (PC1 x PC2) das quatro variáveis foi construído e se encontra na **Figura 4.15**. Visualmente, há separação parcial dos grupos, mas os valores de R^2 e Q^2 foram menores que 0,900 e 0,800 respectivamente.

$$R^2(X)_{PC1, PC2}: 1,00$$

$$R^2(Y)_{PC1, PC2}: 0,128$$

$$Q^2_{PC1, PC2}: 0,051$$

Figura 4.15 Gráfico de scores PLS-DA construído com as concentrações normalizadas dos aminoácidos His, Phe, Trp e Tyr obtidas da análise por CE-UV. Os círculos azuis referem-se às amostras de urina de crianças sem VUR, enquanto que os círculos vermelhos referem-se às amostras de urina de crianças com VUR. As letras **a** e **b** representam réplicas do procedimento de extração.

O método PLS-DA também foi aplicado para as concentrações de pares de aminoácidos. Todos apresentaram separação parcial e valores insatisfatórios de R^2 e Q^2 .

Em síntese, com emprego dos métodos PCA e PLS-DA, foi possível obter separação parcial entre o grupo de crianças sem VUR e crianças com VUR apenas com a concentração de quatro aminoácidos, porém os parâmetros estatísticos Q^2 (PCA e PLS-DA) e R^2 (PLS-DA) precisam ser melhorados. Isto pode ser conseguido com o emprego de um maior número de variáveis (aminoácidos) e/ou amostras.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho apresentou como objetivo principal a avaliação do perfil de concentração de aminoácidos quantificáveis em amostras de urina de crianças com VUR e de crianças saudáveis (sem VUR), por meio da técnica analítica de eletroforese capilar com detecção UV/vis e a comparação estatística entre estes dois perfis, em busca de um diagnóstico clínico não invasivo.

A avaliação da concentração dos aminoácidos foi realizada pelo desenvolvimento de dois métodos denominados de pH baixo-deteção direta e pH alto-deteção indireta. O método pH alto-deteção indireta apresentou parâmetros de validação seletividade, precisão intradia e interdia, robustez e recuperação satisfatórios, porém os limites de detecção e quantificação altos prejudicou a quantificação de Ala, Asp, Glu e Gly em matrizes de urina, impossibilitando obter um número maior de variáveis para a classificação estatística. A alta diluição por conta da necessidade de eliminar os interferentes da matriz de urina proporcionou limites de quantificação altos.

Por outro lado, o método pH baixo-deteção direta se demonstrou eficiente para a quantificação de creatinina, histidina, fenilalanina, triptofano e tirosina nas matrizes de urina, apresentando parâmetros de validação satisfatórios. Com estes resultados, foi possível confrontar o perfil de concentração destes aminoácidos entre os grupos de crianças saudáveis e de crianças com refluxo vésico-ureteral.

A classificação estatística resultou na separação parcial entre o grupo de pacientes saudáveis e de pacientes com VUR por meio do emprego dos métodos PCA e PLS-DA. Valores de 0,999 e 0,993 para R^2 e Q^2 , respectivamente, foram

encontrados no método PCA para o par Phe e Trp, enquanto que R^2 de 0,999 e Q^2 de 0,617 foram obtidos para o PCA de Phe, Trp, His e Tyr. No método PLS-DA, $R^2(X)$, $R^2(Y)$ e Q^2 foram 1,000; 0,128 e 0,051 respectivamente. Valores de Q^2 maior que 0,800 para PCA e PLS-DA e valor de R^2 próximo de 1,000 para PLS-DA poderiam ser alcançados se um número maior de amostras e de aminoácidos fossem estudados por ambos os métodos estatísticos.

Para o processamento de grande número de amostras com pré-tratamentos de frequência analítica baixa e análise simultânea da maioria dos aminoácidos, faz-se necessário o emprego de um detector de espectrometria de massas, visto que a detecção UV/vis não possibilita a análise da maioria dos aminoácidos primários em matrizes de urina.

Se valores satisfatórios de R^2 e Q^2 fossem alcançados, a hipótese de que os aminoácidos primários apresentariam alterações no mecanismo de reabsorção seletiva em pacientes com VUR poderia ser motivada. Com isso, este trabalho abre caminho para estudos mais aprofundados da investigação da concentração dos aminoácidos primários em pacientes com VUR, no campo da descoberta de diagnósticos clínicos para esta doença.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baker, D. R. (1995). Capillary Electrophoresis. J. W. Sons. **4**: 119.

Baryla, N. E., J. E. Melanson, M. T. McDermott and C. A. Lucy (2001). "Characterization of surfactant coatings in capillary electrophoresis by atomic force microscopy." Analytical Chemistry **73**(19): 4558-4565.

Benedetto., G. E. D. (2008). Capillary Electrophoresis *Methods and Protocols*. Biomedical Applications of Amino Acid Detection by Capillary Electrophoresis. P. Schmitt-Kopplin. Totowa, NJ Humana Press **384**: 457.

Burtis, C. A., E. R. Ashwood and D. E. Bruns, Eds. (2006). Tiez Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.

Cassiano, N. M., J. C. Barreiro, L. R. Rocha Martins, R. V. Oliveira and Q. B. Cass (2009). "Chromatographic methods validation for analysis of small molecules in biological matrices." Quimica Nova **32**(4): 1021-1030.

Chen, H., Y. Xu and M. P. C. Ip (1997). "Determination of amino acids in urine by capillary electrophoresis with indirect UV detection." Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies **20**(15): 2475-2493.

Cooper, C. S. (2009). "Diagnosis and management of vesicoureteral reflux in children." Nature Reviews Urology **6**(9): 481-489.

Dénes, F. T. and S. Arap (1995). "Refluxo vésico-ureteral em crianças." Journal de Pediatria **71**(4): 183 -188.

Fialho, E., F. S. Moreno and T. P. Ong (2008). "Nutrition in the post-genome era: 'omic' tools basics and applications." Revista De Nutricao-Brazilian Journal of Nutrition **21**(6): 757-766.

Fujiya, N. M. and M. F. M. Tavares (2003). "Analysis of underivatized amino acids in protein hydrolysates for cosmetic application by capillary electrophoresis." Journal of Separation Science **26**(6-7): 562-568.

Garcia-Perez, I., M. Vallejo, A. Garcia, C. Legido-Quigley and C. Barbas (2008). "Metabolic fingerprinting with capillary electrophoresis." Journal of Chromatography A **1204**(2): 130-139.

Gas, B. Retrieved 09-26-2011, 2011, from <http://web.natur.cuni.cz/gas/>.

Guyton, A. C. Tratado de Fisiologia Médica. G. Koogan: 263.

Holmes, E., I. D. Wilson and J. K. Nicholson (2008). "Metabolic phenotyping in health and disease." Cell **134**(5): 714-717.

Huck, C. W., R. Bakry and G. K. Bonn (2006). "Progress in capillary electrophoresis of biomarkers and metabolites between 2002 and 2005." Electrophoresis **27**(1): 111-125.

Johns, C., M. Macka and P. R. Haddad (2003). "Enhancement of detection sensitivity for indirect photometric detection of anions and cations in capillary electrophoresis." Electrophoresis **24**(12-13): 2150-2167.

Kaneta, T., H. Maeda, M. Miyazaki, R. Miyake, H. Izaki, Y. Sakoda, S. Kinoshita and T. Imasaka (2008). "Determination of amino acids in urine by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis - Laser-induced fluorescence detection." Journal of Chromatographic Science **46**(8): 712-716.

Kaspar, H., K. Dettmer, Q. Chan, S. Daniels, S. Nimkar, M. L. Daviglus, J. Stamler, P. Elliott and P. J. Oefner (2009). "Urinary amino acid analysis: A comparison of iTRAQ (R)-LC-MS/MS, GC-MS, and amino acid analyzer." Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **877**(20-21): 1838-1846.

Kopplin, P. S. and G. E. D. Benedetto (2003). Capillary Electrophoresis - Methods and Protocols H. Press. Neuherberg, Germany: 457.

Landers, J. P. (1996). Handbook of Capillary Electrophoresis. C. Press. New York: 9.

Latorre, R. M., J. Saurina and S. Hernandez-Cassou (2002). "Continuous flow derivatization system coupled to capillary electrophoresis for the determination of amino acids." Journal of Chromatography A **976**(1-2): 55-64.

Lee, Y. H. and T. I. Lin (1994). "CAPILLARY ELECTROPHORETIC DETERMINATION OF AMINO-ACIDS WITH INDIRECT ABSORBENCY DETECTION." Journal of Chromatography A **680**(1): 287-297.

Lehninger, A. L. (2002). Princípios de Bioquímica. Sarvier: 90.

Lundin, U. and K. Weinberger (2010). Metabolic biomarker set, useful for e.g. assessing kidney diseases including chronic kidney disease, preferably diabetic nephropathy in a mammalian subject, comprises amino acids, acylcarnitines and biogenic amines, Biocrates Life Sci Ag. **WO2010139341-A1**.

Micke, G. A. (2004). Simulação computacional e otimização de separações por eletroforese capilar. Doutorado, Universidade de São Paulo.

Nahas, W. C., A. I. Mitre, S. Arap and G. M. d. Góes (1985). "Refluxo Vésico-Ureteral e Nefropatia de Refluxo." Pediatrics **7**: 121 - 126.

Poinsot, V., C. Bayle and F. Couderc (2003). "Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis." Electrophoresis **24**(22-23): 4047-4062.

Ramautar, R., O. A. Mayboroda, A. M. Deelder, G. W. Somsen and G. J. de Jong (2008). "Metabolic analysis of body fluids by capillary electrophoresis using noncovalently coated capillaries." Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **871**(2): 370-374.

Shihabi, Z. K. and M. A. Friedberg (1997). "Analysis of small molecules for clinical diagnosis by capillary electrophoresis." Electrophoresis **18**(10): 1724-1732.

Shmaefsky, B. R. (1990). "ARTIFICIAL URINE FOR LABORATORY TESTING." American Biology Teacher **52**(3): 170-172.

Simionato, A. V. C., E. P. Moraes, E. Carrilho, M. F. M. Tavares and E. Kenndler (2008). "Determination of amino acids by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry: An evaluation of different protein hydrolysis procedures." Electrophoresis **29**(10): 2051-2058.

Simo, C., P. J. Martin-Alvarez, C. Barbas and A. Cifuentes (2004). "Application of stepwise discriminant analysis to classify commercial orange juices using chiral micellar electrokinetic chromatography-laser induced fluorescence data of amino acids." Electrophoresis **25**(16): 2885-2891.

Smith, J. T. (1999). "Recent advancements in amino acid analysis using capillary electrophoresis." Electrophoresis **20**(15-16): 3078-3083.

Soga, T., Y. Kakazu, M. Robert, M. Tomita and T. Nishioka (2004). "Qualitative and quantitative analysis of amino acids by capillary electrophoresis-electrospray ionization-tandem mass spectrometry." Electrophoresis **25**(13): 1964-1972.

Soga, T. and G. A. Ross (1999). "Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis." Journal of Chromatography A **837**(1-2): 231-239.

Taga, A., M. Sugimura and S. Honda (1998). "Derivatization of amino acids in a moving zone of o-phthalaldehyde in the middle of a capillary for amino acid analysis by capillary electrophoresis." Journal of Chromatography A **802**(1): 243-248.

Tavares, M. F. M. (1997). "Separation mechanisms in capillary electrophoresis." Quimica Nova **20**(5): 493-511.

Terabe, S., M. J. Markuszewski, N. Inoue, K. Otsuka and T. Nishioka (2001). "Capillary electrophoretic techniques toward the metabolome analysis." Pure and Applied Chemistry **73**(10): 1563-1572.

Viglio, S., M. Fumagalli, F. Ferrari and P. Iadarola (2010). "MEKC: A powerful tool for the determination of amino acids in a variety of biomatrices." Electrophoresis **31**(1): 93-104.

Villas-Bôas, S. G. and A. K. Gombert (2006). "Análise do metaboloma, uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica." Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento **36**: 58 - 69.

Zerati, F. M., R. L. S. Liguori, A. A. Calado and S. B. d. Urologia (2006). "Refluxo Vésico-Ureteral." Projeto Diretrizes.

Zinellu, A., S. Sotgia, E. Pisanu, B. Scanu, M. Sanna, M. F. Usai, R. Chessa, L. Deiana and C. Carru (2010). "Quantification of neurotransmitter amino acids by capillary electrophoresis laser-induced fluorescence detection in biological fluids." Analytical and Bioanalytical Chemistry **398**(5): 1973-1978.