

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Aplicação da cromatografia a gás associada à espectrometria de massas em
tandem no diagnóstico da deficiência de 3 β -hidroxidesidrogenase**

Thais Rodrigues Presutti

Dissertação para obtenção do título de
MESTRE

Orientador: Dr. Valdemir Melechco Carvalho

SÃO PAULO

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Aplicação da cromatografia a gás associada à espectrometria de massas em
tandem no diagnóstico da deficiência de 3 β -hidroxidesidrogenase**

Thais Rodrigues Presutti

Versão corrigida da dissertação conforme resolução CoPGr 6018. O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do título de
MESTRE.

Orientador: Dr. Valdemir Melechco Carvalho

SÃO PAULO

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Farmacêutica
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

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

P942a Presutti, Thais Rodrigues
Aplicação da cromatografia a gás associada à espectrometria de massas em tandem no diagnóstico da deficiência de 3B-hidroxidesidrogenase / Thais Rodrigues Presutti. -- São Paulo, 2017.
76p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Carvalho, Valdemir Melechco

1. Método laboratorial : Medicina 2. Cromatografia a gás 3. Esteróides
I. T. II. Carvalho, Valdemir Melechco, orientador.

616.0756-9 CDD

Thais Rodrigues Presutti

**Aplicação da cromatografia a gás associada à espectrometria de massas em
tandem no diagnóstico da deficiência de 3 β -hidroxidesidrogenase**

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Valdemir Melechco Carvalho
(Orientador / Presidente)

Dra. Marlene de Freitas Madeira
1º. Examinador

Dra. Helena Panteliou Lima Valassi
2º. Examinador

São Paulo, 10 de abril de 2017.

APOIO FINANCEIRO

Agradecemos ao Grupo Fleury pelo financiamento integral do presente projeto.

DEDICATÓRIA

Mãe, Pai

Este trabalho é dedicado a vocês.

Sem seu carinho e confiança nada seria possível

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Valdemir Melechco, minha evolução ao longo do trabalho é imensurável. Aprendi muito com você e sua presença foi fundamental para meu desenvolvimento profissional. Muito obrigada!

À Dra. Karina Cardozo, sua contribuição neste trabalho foi muito importante e significativa para a conclusão. Agradeço muito por compartilhar seu tempo e conhecimento comigo.

À Marisa Funayama e Andrea Lotério, o apoio e amizade de vocês foi essencial em todo processo. Não poderia ter sorte maior ao dividir o trabalho e todas as alegrias com vocês.

À todos os colegas do setor de Cromatografia do Grupo Fleury, sem o suporte e a deliciosa convivência com vocês eu não poderia ter conseguido.

Ao Dr. Emerson Cavassin, pelo apoio e incentivo, além da chance de transformar meu ambiente de trabalho em um ambiente de aprendizado.

Ao Grupo Fleury pela grande oportunidade que me foi concedida.

Aos meus familiares, o carinho de todos é fundamental para mim. Agradeço em especial minha tia Margarete, por todo apoio, por toda calma e por sempre acreditar que eu estou fazendo meu melhor.

Aos meus muito queridos amigos Lais, Vinicius e Raphaela. Nossa convivência é tanta que são os que mais suportam minhas lamúrias e chatices. Obrigada por todos nossos encontros, e por tanta felicidade que vem deles!

Por fim meu amor Wagner, seu amor, confiança, apoio e paciência é surpreendente. Não há nada que você não faça para me deixar bem e saber isso é muito reconfortante.

Obrigada por todos os nossos momentos.

RESUMO

Presutti, T. R. **Aplicação da cromatografia a gás associada à espectrometria de massas em tandem no diagnóstico da deficiência da 3 β -hidroxidesidrogenase.** 2017. 91f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Pregnenolona (PREG) e 17-alfa-hidroxipregnenolona (17OHPREG) são dois esteroides produzidos pela glândula adrenal e precursores de vários hormônios esteroidais. A dosagem desses compostos tem aplicações clínicas, como o diagnóstico de doenças relacionadas aos corticosteroides e mineralocorticóides e especialmente na avaliação da atividade da enzima 3- β -hidroxidesidrogenase que é decisiva no diagnóstico de um dos tipos de hiperplasia da glândula adrenal que causa defeitos severos na síntese de esteroides. Métodos cromatográficos associados à espectrometria de massas superaram a especificidade reduzida dos imunoenaios e tem sido crescentemente utilizados na quantificação de esteroides. Os últimos anos tem sido marcados pela hegemonia da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) em grande parte devido à velocidade e possibilidade da análise direta de vários analitos. Porém, no caso específico dos esteroides de tipo 3-hidroxi-5-eno, que apresentam baixa afinidade protônica e, portanto, baixa eficiência de ionização, são necessárias muitas etapas para a conversão em derivados mais detectáveis. Embora desfavorecida em relação ao LC-MS/MS nos últimos anos, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) apresenta várias características favoráveis para a análise de esteroides como a eficiência cromatográfica ainda insuperável. Adicionalmente, a incorporação da espectrometria de massas em tandem ao CG (CG-MS/MS) torna a técnica tão seletiva quanto LC-MS/MS. No presente trabalho, foi desenvolvido um novo método que permite a extração e derivatização simultâneas da PREG e 17OHPREG de amostras de soro tornando o método de preparo da amostra tão simples quanto os descritos para LC-MS/MS. O método de detecção desenvolvido baseado em ionização química no modo negativo obteve a sensibilidade necessária para o diagnóstico da deficiência da enzima 3-beta-hidroxidesidrogenase utilizando apenas 250 μ L de amostra.

Palavras-chaves: Pregnenolona, 17-hidroxi-pregnenolona, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em tandem, extração em fase sólida, ionização química em modo negativo.

ABSTRACT

Presutti, T. R. **Application of gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry in the diagnosis of 3 β -hidroxidesidrogenase deficiency**. 2017. 91f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Pregnenolone (PREG) and 17 α -hydroxypregnenolone (17OHPREG) are two steroid precursors produced by the adrenal gland. The quantification of these compounds is essential for the evaluation of 3- β -hidroxidesidrogenase enzyme activity, which promotes the conversion of PREG in 17OHPREG. The 3- β -hidroxidesidrogenase deficiency is a rare but severe type of adrenal hyperplasia that causes serious defects in steroid synthesis. Chromatographic methods coupled to mass spectrometry overcame immunoassays limitations such as reduced specificity, and have been widely used for steroids quantification. Recent years have been marked by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) hegemony due to the speed and possibility to analyze directly several analytes. However, in the case of type 3-hydroxy-5-ene steroids, which have low affinity for protons and, therefore, low ionization efficiency, many steps are required for conversion to detectable products. Notwithstanding, gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) has some favorable features for steroid analysis such as unbeatable chromatographic efficiency. In addition, the incorporation of tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) makes it as selective as LC-MS/MS. In this study, a new method for simultaneous extraction and derivatization of PREG and 17OHPREG from serum was developed. This procedure makes sample preparation for GC-MS/MS as simples as those described for LC-MS/MS. The detection method based on negative mode chemical ionization achieved the sensitivity required for the diagnosis of 3- β -hidroxidesidrogenase defficiency using only 250 μ L of sample.

Keywords: Pregnenolone, 17- α -hydroxypregnenolone, solid phase extraction, gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry, negative chemical ionization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: GLÂNDULA ADRENAL - DIVISÃO HISTOLÓGICA.	17
FIGURA 2: ESTEROIDOGÊNESE - FORMAÇÃO DOS ESTEROIDES A PARTIR DA MOLÉCULA DE COLESTEROL	19
FIGURA 3: ESTRUTURA BÁSICA DOS ESTEROIDES.....	20
FIGURA 4: BIOSÍNTESE DA PREGNENOLONA A PARTIR DO COLESTEROL	21
FIGURA 5: VIAS DE BIOSÍNTESE DE ESTEROIDES MEDIADAS PELA ENZIMA 3 β -HSD.	24
FIGURA 6: RETROALIMENTAÇÃO NEGATIVA DO CORTISOL.	25
FIGURA 7: COMPONENTES PRINCIPAIS DE UM SISTEMA DE CROMATOGRAFIA A GÁS.	31
FIGURA 8: ESQUEMA DE UMA FONTE DE IONIZAÇÃO POR IMPACTO DE ELÉTRONS.....	32
FIGURA 9: PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO APÓS A INJEÇÃO DO DERIVADO PREG-PFB COM DETECÇÃO NO MODO FULLSCAN.	48
FIGURA 10: ESPECTRO DE MASSAS FULLSCAN DAPREG	49
FIGURA 11: CONVERSÃO DA PREG E 17OHPREG A SEU RESPECTIVO DERIVADO OXIMA PELA REAÇÃO COM A PFBHA.	50
FIGURA 12: TENTATIVA DE ATRIBUIÇÃO DOS ÍONS OBSERVADOS DO DERIVADO OXIMA DA 17OHPREG.	50
FIGURA 13: A. PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO APÓS A INJEÇÃO DA PREG-PFBHA COM DETECÇÃO NO MODO FULLSCAN	51
FIGURA 14: A. PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO APÓS A INJEÇÃO DA 17OHPREG-PFBHA COM DETECÇÃO NO MODO FULLSCAN	52
FIGURA 15: ESTRUTURAS DOS PROVÁVEIS DERIVADOS DA 17OHPREG APÓS DERIVATIZAÇÃO COM PFBHA E MSTFA.	53
FIGURA 19: ANÁLISE DOS ÍONS PRODUTOS GERADOS PELO ÍON DE M/Z 491 ASSOCIADO AO DERIVADO PREG-PFBHA.	59
FIGURA 20: ANÁLISE DOS ÍONS PRODUTOS GERADOS PELO ÍON DE M/Z 450 ASSOCIADO AO DERIVADO PREG-PFBHA.	60
FIGURA 23: ANÁLISE DOS ÍONS PRODUTOS GERADOS PELO ÍON DE M/Z 315 ASSOCIADO AO DERIVADO 17OHPREG-PFBHA.	63
FIGURA 24: ANÁLISE DOS ÍONS PRODUTOS GERADOS PELO ÍON DE M/Z 318 ASSOCIADO AO DERIVADO 17OHPREG-D3-PFBHA.	64
FIGURA 25: ANÁLISE DOS ÍONS PRODUTOS GERADOS PELO ÍON DE M/Z 345 ASSOCIADO AO DERIVADO 17OHPREG-PFBHA.	65

FIGURA 26: ANÁLISE DOS ÍONS PRODUTOS GERADOS PELO ÍON DE M/Z 348 ASSOCIADO AO DERIVADO 17OHPREG-D3-PFBHA.	66
FIGURA 28: RELAÇÃO ENTRE A ÁREA BRUTA OBTIDA COM DIFERENTES ENERGIAS DO ELÉTRON PARA PREG.....	69
FIGURA 29: RELAÇÃO ENTRE ÁREA BRUTA OBTIDA COM DIFERENTES ENERGIAS DO ELÉTRON PARA 17OHPREG.....	69
FIGURA 30: ABUNDÂNCIA DOS ÍONS PRODUTOS EM ÁREA BRUTA EM RELAÇÃO A PORCENTAGEM DO FLUXO DE METANO UTILIZADA NA IONIZAÇÃO.	70
FIGURA 31: ABUNDÂNCIA DOS ÍONS PRODUTOS EM ÁREA BRUTA EM RELAÇÃO A DIFERENTES ENERGIAS DE CORRENTE DE EMISSÃO.	71
FIGURA 38: CURVA DE CALIBRAÇÃO UTILIZADA PARA QUANTIFICAR AMOSTRAS DE PREG.....	79
FIGURA 39: LINEARIDADE OBTIDA PARA 17OHPREG.	80
FIGURA 40: AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE DA PREG	82
FIGURA 41: AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE DA 17OHPREG	82

LISTA DE QUADROS E TABELAS

TABELA 1: COMPARAÇÃO DE VALOR DE REFERÊNCIA PARA 17OHPREG	28
TABELA 2: COMPARAÇÃO DE VALOR DE REFERÊNCIA PARA PREG	29
TABELA 3: PARÂMETROS DO CROMATÓGRAFO PARA PURIFICAÇÃO DAS MOLÉCULAS.....	42
TABELA 4: PARÂMETROS DO CG-MS/MS UTILIZADOS NA ANÁLISE DOS ANALITOS.	43
TABELA 5: PROGRAMAÇÃO DA TEMPERATURA UTILIZADA NAS INJEÇÕES REALIZADAS NA COLUNA DB-5MS.	43
TABELA 6: PROGRAMAÇÃO DE TEMPERATURA UTILIZADA NAS INJEÇÕES REALIZADAS NA COLUNA DB-17HT.....	43
TABELA 7: PROGRAMAÇÃO DE TEMPERATURA UTILIZADA NAS INJEÇÕES REALIZADAS NA COLUNA DB-17HT.....	43
TABELA 8: PROGRAMAÇÃO DE TEMPERATURA UTILIZADA NAS INJEÇÕES REALIZADAS NA COLUNA DB-17HT, PARA EXTRAÇÕES EM SORO.	44
TABELA 9: PROGRAMAÇÃO DE TEMPERATURA UTILIZADA NAS INJEÇÕES REALIZADAS NA COLUNA DB-17HT, PARA EXTRAÇÕES EM SORO UTILIZANDO SPE.	44
TABELA 10: PROGRAMAÇÃO DE TEMPERATURA UTILIZADA NAS INJEÇÕES REALIZADAS NA COLUNA DB-17HT, PARA EXTRAÇÕES EM SORO UTILIZANDO SPE.	44
TABELA 11: PREPARO DAS SOLUÇÕES INTERMEDIÁRIAS E LINEARIDADE.....	45
TABELA 12: SELEÇÃO DOS ÍONS PRECURSORES E PRODUTOS PARA CONSTRUÇÃO DOS MRM E PADRONIZAÇÃO DAS ENERGIAS DE COLISÃO PARA OS DERIVADOS COM PFB OXIMA DOS ESTEROIDES PREG, 17OHPREG E 17OHPREG-D ₃	67
TABELA 13: RESULTADOS DE PRECISÃO OBTIDOS PARA PREG.	81
TABELA 14: RESULTADOS DE PRECISÃO OBTIDOS PARA 17OHPREG.....	81
TABELA 15: RECUPERAÇÃO DA PREG EM TRÊS CONCENTRAÇÕES DISTINTAS	83
TABELA 16: RECUPERAÇÃO DA 17OHPREG EM TRÊS CONCENTRAÇÕES DISTINTAS.	83

LISTA DE ABREVIATURAS

17OHPREG	17 α -hidroxipregnenolona
3 β -HSD	Enzima 3 β -hidroxidesidrogenase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> (Ionização química por pressão atmosférica)
APPI	<i>Atmospheric pressure photoionization</i> (Ionização química por fotoionização)
CG	Cromatografia gasosa
CRH	<i>Corticotropin releasing hormone</i> (Hormônio liberador de corticotrofina)
CuSO ₄	Sulfato de cobre
DHEA	Dehidroepiandrosterona
ECNCI	<i>Electron capture negative chemical ionization</i> (ionização química em modo negativo com captura de elétrons)
EI	<i>Electron impact</i> (Impacto de elétrons)
ESI	<i>Eletrospray ionization</i> (Ionização do tipo eletrospray)
eV	Eletronvolt
GC	<i>Gas chromatography</i> (Cromatografia a gás)
HAC	Hiperplasia adrenal congênita
HClO ₄	Ácido perclórico
HF	Fluoreto de hidrogênio
LC	<i>Liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
MSTFA	<i>N-Methyl-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida</i> .
MTBE	Éter metil-terc-butílico
NCI	<i>Negative chemical ionization</i> (Ionização química negativa)
PCI	<i>Positive chemical ionization</i> (Ionização química positiva)
PFBHA	Pentafluorobenzil hidroxilamina
PREG	Pregnenolona
sDHEA	Sulfato de dehidroepiandrosterona
SPE	<i>Solid-phase extraction</i> (Extração em fase sólida)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	6
RESUMO.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE QUADROS E TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Esteroidogênese	17
1.1.1 A glândula adrenal	17
1.1.2 Esteroidogênese do córtex adrenal.....	18
1.1.3 Hiperplasia da glândula adrenal	23
1.1.4 Deficiência de 3 β -hidroxidesidrogenase	23
1.2 Técnicas cromatográficas associadas a espectrometria de massas na análise de esteroides.....	30
1.2.1 Cromatografia a gás	30
1.2.2 Técnicas de ionização em GC-MS	31
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 MATERIAL.....	38
3.1.1 Reagentes e solventes.....	38
3.1.2 Padrões dos esteroides.....	38
3.1.3 Instrumentos	38
3.1.4 Materiais para extração	39
3.1.5 Colunas.....	39
3.2 MÉTODOS	39
3.2.1 Protocolos de extração e derivatização	39
3.2.2 Purificação e caracterização dos derivados oxima por LC-MS	42

3.2.3	Caracterização dos derivados por CG-MS/MS	42
3.2.4	Condições cromatográficas analisadas.....	43
3.2.5	Planejamento e preparo das amostras para a validação.....	44
3.2.5.1	Preparo das soluções padrão.....	44
3.2.5.2	Amostras para avaliação da precisão.....	45
3.2.5.3	Amostras para avaliação da sensibilidade	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	Caracterização dos derivados pentafluorobenzila oxima e desenvolvimento do método de detecção por espectrometria de massas.....	48
4.2	Desenvolvimento do método de detecção por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas em tandem	57
4.3	Avaliação de protocolos de extração	72
4.3.1	Extração líquido-líquido.....	72
4.3.2	Extração em fase sólida.....	74
4.4	Dados preliminares da validação bioanalítica.....	78
4.4.1	Calibração e linearidade	78
4.4.2	Precisão	80
4.4.3	Sensibilidade	81
4.4.4	Recuperação	83
5	CONCLUSÃO.....	85
6	REFERENCIAS	87

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esteroidogênese

1.1.1 A glândula adrenal

As adrenais são duas glândulas achatadas com formato de meia lua situadas acima dos rins. Nitidamente, a glândula é dividida em duas partes: a parte periférica, denominada de camada cortical (córtex da adrenal) e uma parte central, denominada camada medular (medula da adrenal) (Figura 1: Glândula adrenal) (L. C. Junqueira, 2013).

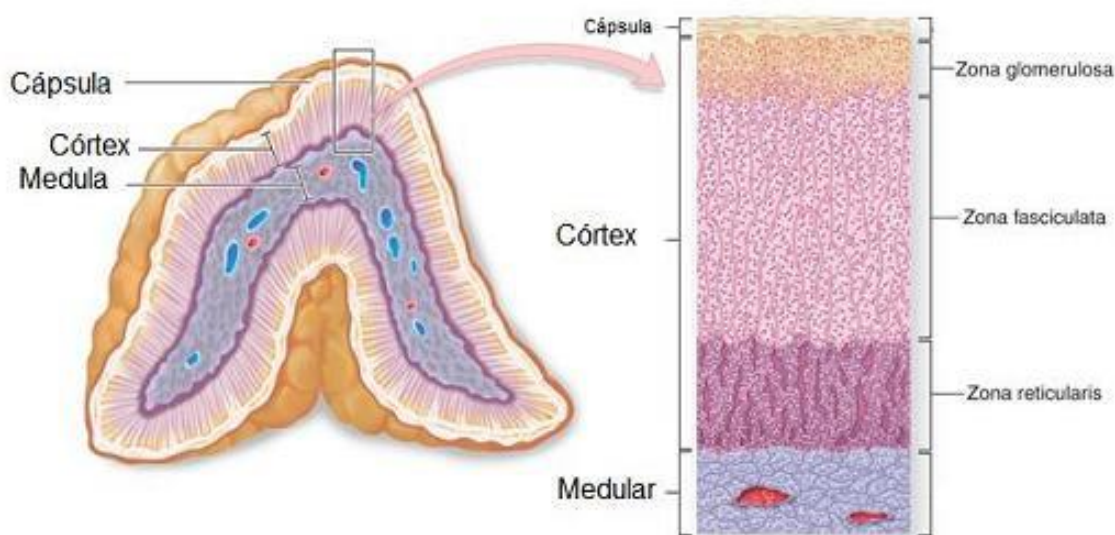


Figura 1: Glândula adrenal - divisão histológica. Disponível em: <<http://www.medicinageriatrica.com.br/wp-content/uploads/2008/08/adrenal4.jpg>> acesso em 02.07.2016.

As duas camadas possuem origens embriológicas diferentes e, portanto, funções e morfologias diferentes. A região medular é composta por células poliédricas organizadas em cordões sustentados por uma rede de fibras reticulares. Os hormônios são armazenados em grânulos, sendo os principais as catecolaminas que contemplam a epinefrina e a norepinefrina (Apen, 2001; L. C. Junqueira, 2013). A região cortical é secretora de esteroides, sendo que a maior parte dos hormônios esteroides são sintetizados após estímulo e secretados em seguida. Devido ao fato dos esteroides serem moléculas de baixo peso molecular e solúvel em lipídios, difundem-se pela membrana plasmática sem necessitar sofrer exocitose para sua liberação. Os esteroides secretados pelo córtex da adrenal são divididos em três

grupos: glicocorticoides, mineralocorticoides e andrógenos (GUYTON, Arthur C. ; HALL, 2011; L. C. Junqueira, 2013).

Cada grupo é produzido por uma zona distinta. A zona glomerulosa, a mais externa, é responsável por sintetizar mineralocorticoides. A zona fasciculada, a zona média, é produtora de glicocorticoides e a zona reticular, a mais interna, produz pequenas quantidades de androgênios e de glicocorticoides (Cardoso e Palma, 2009)

1.1.2 Esteroidogênese do córtex adrenal

A esteroidogênese é regulada por dois circuitos endócrinos: o sistema renina - angiotensina - aldosterona que controla a produção e liberação da aldosterona e o sistema do eixo hipotálamo - hipófise - adrenal que promove a síntese dos glicocorticoides e dos andrógenos. A regulação da síntese de aldosterona nas células da zona glomerulosa da glândula adrenal é associada às concentrações de angiotensina II e potássio (Apen, 2001).

O eixo hipotálamo – hipófise – adrenal controla a esteroidogênese, o hipotálamo libera o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e também a vasopressina que ativam a liberação de do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise, o qual estimula a secreção de glicocorticóides pelo córtex adrenal. Os glicocorticoides agem nos tecidos alvo, sendo um deles o próprio eixo hipotálamo – hipófise – adrenal, onde inibem a secreção de ACTH e CRH, processo chamado de retroalimentação negativa (Juruena, Cleare e Pariente 2004; Pang, 1998).

Os glicocorticoides regulam a função de quase todos os tecidos do corpo, porém o efeito fisiológico mais conhecido é a regulação do metabolismo energético através da estimulação da gliconeogênese. Além disso, também possuem efeito anti-inflamatório e imunossupressor intenso (Juruena, Cleare e Pariente 2004; Pang, 1998).

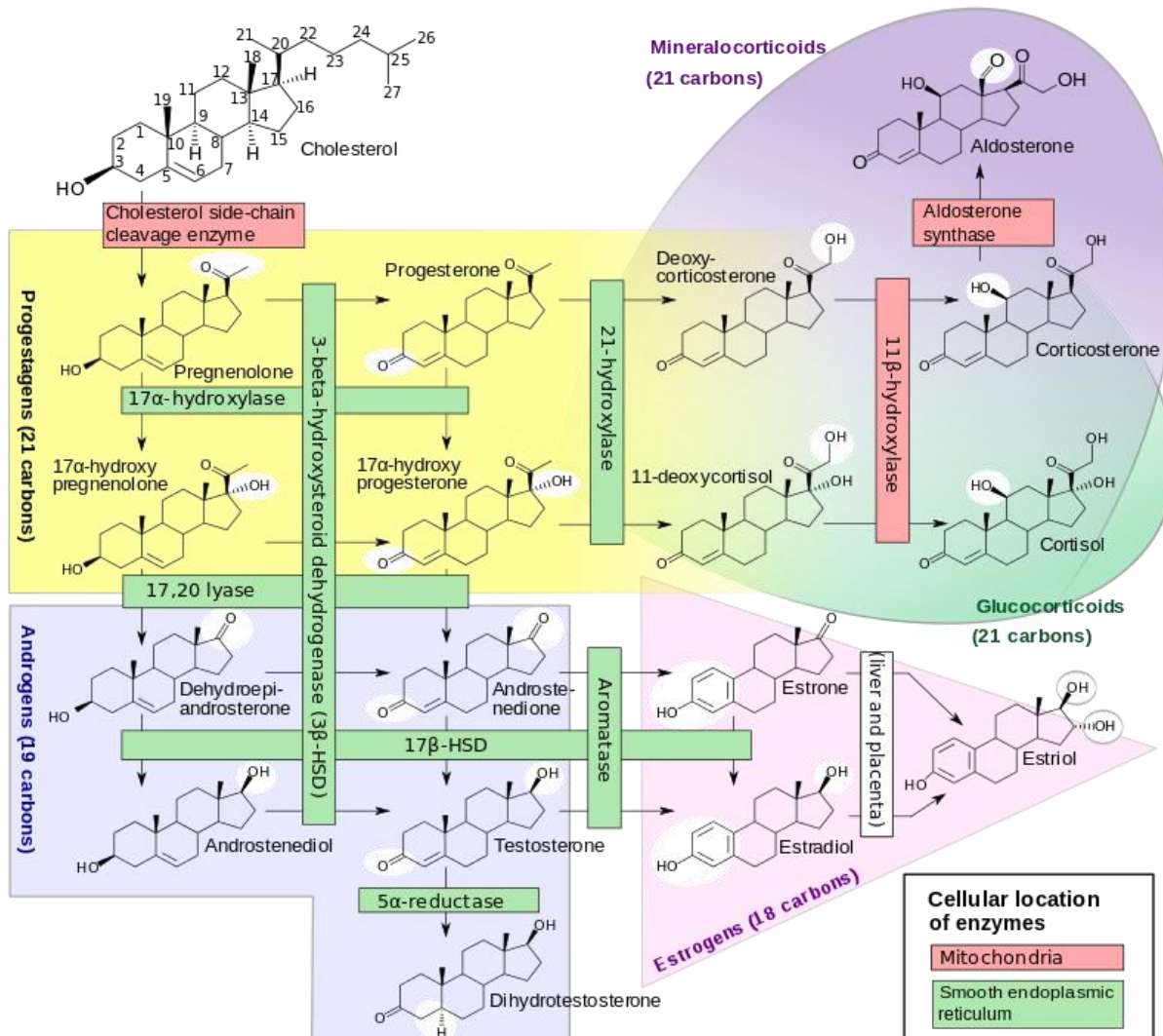


Figura 2: Esteroidogênese - formação dos esteroides a partir da molécula de colesterol (Hägström, 2016).

Os esteroides são moléculas que possuem como estrutura básica um anel ciclopentanoper-hidrofenantreno como seu núcleo (Figura 3). São sintetizados a partir de modificações enzimáticas do colesterol, geralmente hidroxilações, desidrogenação ou reação liase (White A, 2009). As enzimas esteroidogênicas residem no interior da membrana mitocondrial e no retículo endoplasmático liso. Desta forma, as células do órgão produtor de hormônios esteroides contêm alto teor de mitocôndrias e retículo endoplasmático liso. Além disso, possuem em seu interior um depósito de gotículas de lipídeo que funcionam como estoque de ésteres de colesterol.

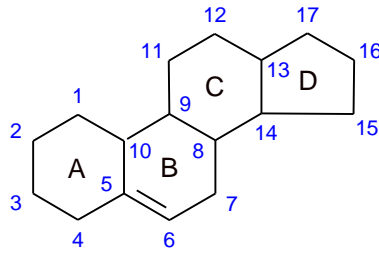


Figura 3: Estrutura básica dos esteroides.

O colesterol necessário para síntese hormonal é provido pela dieta. O ACTH ativa a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, que determina a velocidade da síntese de colesterol, estimula a captura de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para serem convertidos em colesterol livre e participar da esteroidogênese ou serem armazenados. O ACTH também estimula a lipase hormônio sensível que hidrolisa os triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol e inibe a acetil coenzima, aumentando a concentração de colesterol livre para a biossíntese dos hormônios (Ruggiero e Lalli, 2016).

Transportado por lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o colesterol é internalizado por endocitose para as células do córtex da glândula adrenal através dos receptores de LDL. É armazenado em vacúolos citoplasmáticos e esterificado. A molécula de colesterol é transportada pela proteína regulatória esteroidogênica aguda (StAR) para a membrana interna da mitocôndria onde será convertida em pregnenolona (PREG) pela hidroxilação nos carbonos 20 e 22 e consequente clivagem da cadeia lateral (Figura 4) (Sanderson, 2006).

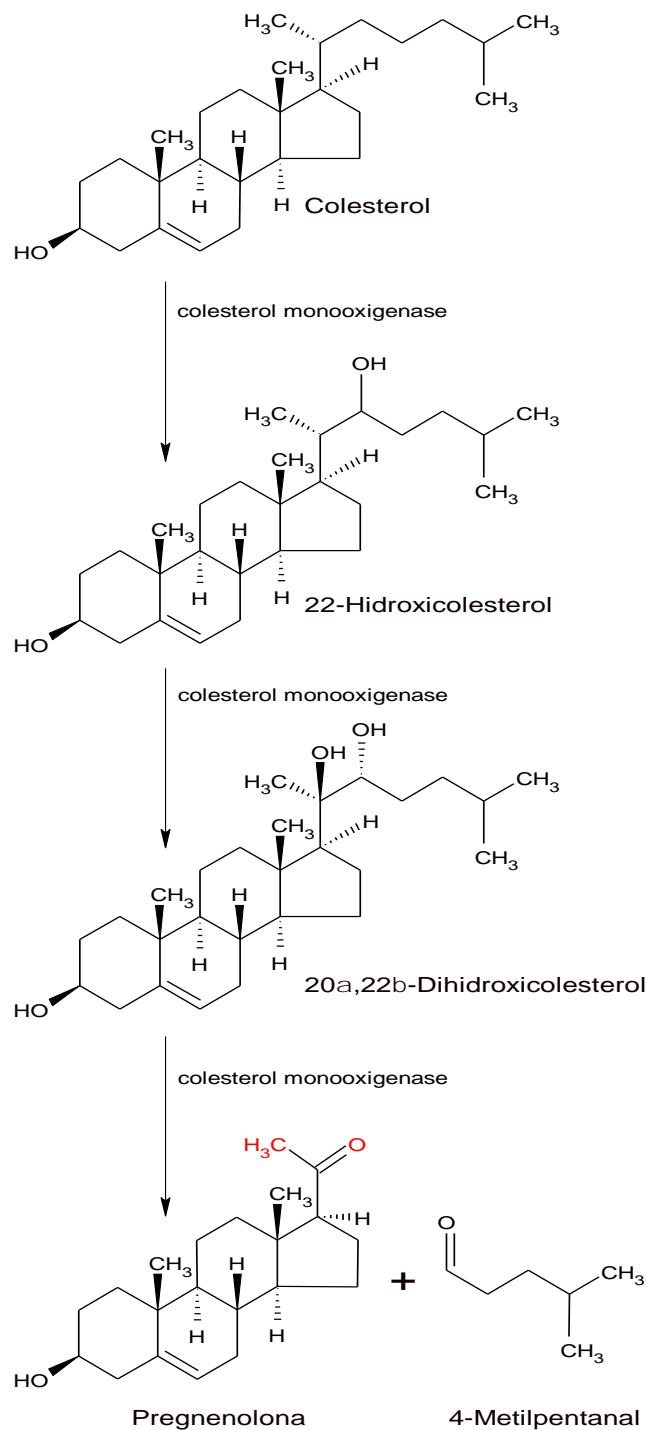


Figura 4: Biossíntese da pregnenolona a partir do colesterol. Modificado de Kegg pathway (map00140).

No retículo endoplasmático das células da zona fasciculada da glândula adrenal, onde são produzidos os glicocorticoides, a pregnenolona sofre uma desidrogenação pela ação da enzima 3- β -hidroxidesidrogenase (3 β -HSD), formando a progesterona (Lima et al., 2000; Sanderson, 2006).

A enzima microssomal 17 α -hidroxilase (CYP17) introduz um grupo hidroxila (-OH) na posição C17 α da PREG e da progesterona, formando 17-

hidroxipregnenolona (17OHPREG) e 17-hidroxiprogesterona, respectivamente. A 17-hidroxiprogesterona também pode ser sintetizada a partir da ação da enzima 3β -HSD na molécula de 17OHPREG (Apen, 2001; Turcu e Auchus, 2015).

A 17-hidroxiprogesterona sofre hidroxilação na posição 21 pela enzima 21-hidroxilase formando o 11-desoxicortisol, que é transportado para a membrana interna da mitocôndria, onde sofre uma hidroxilação na posição 11 pela enzima 11β -hidroxilase formando o cortisol, que irá regular a produção hormonal através do eixo hipotálamo - pituitária - adrenal por meio de retroalimentação (Sanderson, 2006).

A progesterona sofre uma hidroxilação no carbono 21 pela enzima CYP21A2 formando a 11-desoxicorticosterona que é convertida subsequentemente em corticosterona pela enzima aldosterona sintase. Após hidroxilação na posição 18 e uma metil oxidação na posição 18 promovida também pela aldosterona sintase, a corticosterona é convertida finalmente em aldosterona (Kamrath, Wudy e Krone, 2014; Sanderson, 2006).

Os andrógenos são produzidos na zona reticulada a partir das moléculas de 17OHPREG e 17-hidroxiprogesterona. Ambas sofrem remoção da cadeia lateral C20-21 pela enzima CYP17 formando a molécula de dehidroepiandrosterona (DHEA) que é convertida em androstenediona quando sofre ação da enzima 3β -hidroxidesidrogenase (3β -HSD) (Sanderson, 2006).

Mais de 99% do DHEA produzido é mantido em sua forma sulfatada (sDHEA), pois os compostos sulfatados são mais resistentes à degradação enzimática aumentando assim a meia vida no organismo. O DHEA e a androstenediona são andrógenos pouco potentes, porém a androstenediona pode sofrer ação da enzima 17-cetoesteróide redutase e ser convertida em testosterona, principal hormônio de modulação das características sexuais masculinas (Kamrath, Wudy e Krone, 2014).

Todas essas modificações enzimáticas tem o objetivo de produzir um derivado para ser reconhecido por um receptor específico. No organismo, são cinco tipos de receptores, os de progesterona, mineralocorticoide, glicocorticoide, androgênio e estrogênio. A complexidade das ações hormonais devem-se as expressões de formas múltiplas de receptores, tanto que glicocorticoides possuem uma afinidade alta por receptores de mineralocorticoides e as progestinas, glicocorticoides e androgênios interagem em algum grau com os receptores de progesterona, glicocorticoides e androgênico (White, A., 2009).

A esteroidogênese é regulada por consumo, estocagem e mobilização do colesterol, clinicamente essa regulação gera alto níveis de precursores liberados no sangue quando há inativação ou ausência de enzimas envolvidas no processo.

1.1.3 Hiperplasia da glândula adrenal

A hiperplasia é caracterizada por um aumento do número de células, com consequente aumento da massa do órgão ou do tecido. Pode ser apresentada como uma hiperplasia fisiológica onde ocorre um aumento hormonal conforme a necessidade do organismo ou compensatória onde ocorre o aumento celular para suprir o tecido após lesão ou secção parcial. A hiperplasia patológica é usualmente causada por excesso de hormônios ou fatores de crescimento que ficam acumulados no órgão ou tecido (Robbins, Leonard e Cotran, 2010).

A hiperplasia congênita da glândula adrenal pode ser causada pela deficiência das enzimas 21-hidroxilase, 11 β -hidroxilase, 17 α -hidroxilase ou 3 β -hidroxidesidrogenase. Em todas essas deficiências enzimáticas, a produção de cortisol é prejudicada resultando em uma hiperplasia por estímulo contínuo da glândula e acúmulo dos esteroides precursores do cortisol (Mello et al., 2002).

A deficiência enzimática mais comum causadora da hiperplasia da glândula adrenal é a deficiência da 21-hidroxilase, que corresponde por cerca de 95% dos casos, seguida da deficiência de 11-betahidroxilase, 20,22-desmolase, 17-alfa-hidroxilase, 3-beta-hidroxisreróide-desidrogenase e aldosterona sintase (Ministério da Saúde, 2009).

Todas as deficiências enzimáticas citadas possuem o mesmo quadro clínico, por isso a importância de caracterizar o diagnóstico laboratorial para cada deficiência enzimática.

1.1.4 Deficiência de 3 β -hidroxidesidrogenase

A enzima 3 β -hidroxidesidrogenase (3 β -HSD, UniProt P14060) é expressa pelo cromossomo 1 (região p11-13), sendo que os humanos possuem dois tipos de genes que podem ser transcritos: o gene HSD3B1 localizado no tecido epitelial, mamário e na placenta e o gene HSD3B2 localizado nas gônadas e nas glândulas adrenais. Ambos os genes possuem uma região flanqueadora 5', 4 éxons e 3 íntrons (Lima et al., 2000; Mello et al., 2002; Pang, 1998).

A 3 β -HSD é essencial para conversão dos Δ 5-3 β -hidroxiesteroides (como PREG, 17OHPREG, DHEA e androstenediol) em Δ 4-3 β -ketoesteroides (como 17-hidroxiprogesterona, androstenediona e testosterona) nas glândulas adrenais e nas gônadas e com menor frequência em alguns tecidos como pele, e tecido mamário. Portanto, essa atividade enzimática é de vital importância na síntese de toda a classe de esteroides ativos como a progesterona, os mineralocorticoides, os glicocorticoides, os andrógenos e os estrógenos (Mello et al., 2002; Pang, 1998).

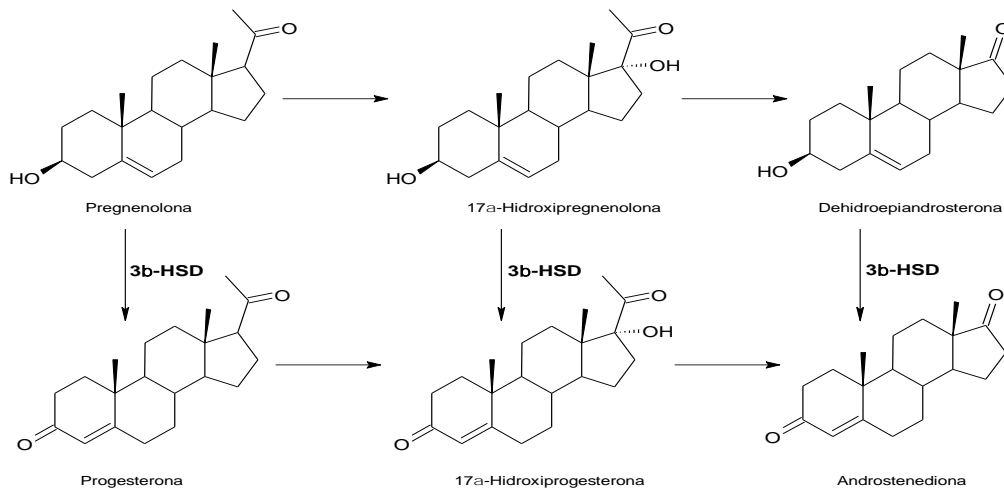


Figura 5: Vias de biossíntese de esteroides mediadas pela enzima 3 β -HSD.

A deficiência da enzima 3 β -HSD é uma doença autossômica recessiva rara descrita pela primeira vez em 1962 por Alfred M. Bongiovanni (Bongiovanni e Kellenbenz, 1962). A deficiência da enzima 3 β -HSD do tipo I não é associada a nenhuma deformidade e por ser expressa na placenta acredita-se que uma mutação neste gene seria letal para o embrião. Já a deficiência da enzima 3 β -HSD do tipo II acarreta uma forma incomum e congênita de hiperplasia da glândula adrenal (HAC) (Mello et al., 2002).

Quando a atividade da enzima 3 β -HSD é diminuída ou anulada ocorre uma diminuição de cortisol circulante (Figura 6: Retroalimentação negativa do cortisol.). O cortisol diminuído estimula o hipotálamo a produzir o hormônio adrenocorticotrofina (ACTH) que por sua vez estimula o córtex da glândula adrenal a produzir cortisol (retroalimentação negativa) (Moraes, 2009). Esse excessivo estímulo da glândula adrenal causa acúmulo de precursores de cortisol o que leva a uma hiperplasia das células do córtex da adrenal (Douglas 2002; GUYTON, Arthur C. e HALL, 2011).

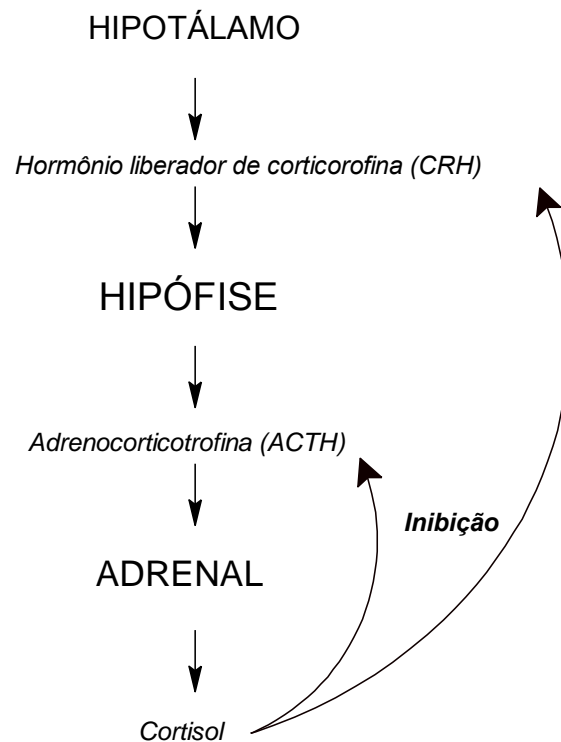


Figura 6: Retroalimentação negativa do cortisol.

A HAC possui duas formas, a forma clássica reconhecida no nascimento ou mesmo no período pré-natal que pode ser com ou sem a perda de sal e uma forma não clássica onde o desenvolvimento da doença é mais tardio e os sintomas são mais brandos (Lima et al. 2000; Mello et al., 2002).

Na forma clássica, em recém nascidos do sexo feminino, genitália externa terá um desenvolvimento normal ou sinais brandos de virilização, como clitoromegalia, causado pelo acúmulo de DHEA circulante. Nos recém nascidos do sexo masculino, devido à baixa produção de androgênios a genitália externa tem desenvolvimento incompleto podendo apresentar um pseudo-hermafroditismo masculino, resultando em ambigüidade reconhecível ao nascimento (Mello et al., 2002). Quando há perda de sal a síndrome é facilmente identificada em ambos os sexos, porém devido a desidratação intensa debilita rapidamente o recém-nascido tendo um alto risco de óbito (Lutfallah et al., 2002; Mello et al., 2002). A forma perdedora de sal da doença é causada por várias deleções no gene, já a forma não perdedora de sal possui menos deleções e consegue manter de 2 a 11,9 % da atividade enzimática, o suficiente para produzir aldosterona e evitar a perda de sal (Pang, 1998).

A forma tardia é caracterizada pelo aparecimento de pubarca precoce, hirsurtismo, acne e irregularidades menstruais causadas pelo excesso de andrógenos no organismo (Elias, Lucila e Castro, 2003; Mello et al., 2002).

O diagnóstico é feito através de biologia molecular com a pesquisa do gene da enzima, ou pode ser realizado de forma indireta, através da dosagem dos Δ^5 esteroides, que estarão mais concentrados já que sem a produção de cortisol, as adrenais estarão constantemente sendo estimuladas a produzir os precursores esteroidais (Mello et al., 2002; Pang, 1998). Em alguns casos pode ocorrer um aumento nos níveis de Δ^4 esteroides, pois a enzima 3β -HSD possui uma isoforma ativa nos tecidos periféricos (Araújo e Oliveira, 2014).

Na forma clássica da doença, o diagnóstico é realizado baseado principalmente na dosagem de 17OHPREG que estará em níveis muito elevados comparados a média da população (cerca de três vezes mais alta em relação à média de pessoas saudáveis). A forma não clássica é diagnosticada dosando a 17OHPREG e o DHEA após estímulo de ACTH, sendo que para conclusão de diagnóstico os valores deverão ser mínimo dois desvios-padrões acima dos valores médios dos indivíduos normais. Na forma perdedora de sal o organismo apresenta acidose metabólica hiponatrêmica e hipercalêmica e por isso é comum também a dosagem de sódio, potássio e gasometria arterial (Lima et al., 2000; Mello et al., 2002; Vieira et al., 2011).

O tratamento consiste no uso de glicocorticoides com ou sem mineralocorticoides, visando a diminuição dos níveis séricos de ACTH circulante e consequentemente dos andrógenos. Quanto mais precoce for o início do tratamento, melhores são os prognósticos para evitar a virilização dos genitais e também para evitar o avanço da doença para a forma com perda de sal (Mello et al., 2002).

Não foi possível encontrar na literatura valores de referência para a população dos níveis de 17OHPREG e PREG quando dosados por cromatografia à gás associado à espectrometria de massas em tandem, sendo necessário determinar futuramente esses valores. Porém, para comparação, Kushnir et al, 2006, realizou um estudo do range analítico de vários esteroides, entre eles de PREG e 17OHPREG, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, sendo utilizado como referência por vários laboratórios, (Tabela 1 e Tabela 2: Comparação de valor de referência para PREG).

Neste estudo, as amostras de soro foram coletadas de voluntários saudáveis, sendo que os que utilizam de medicamentos hormonais foram excluídos (Kushnir et al., 2006). Mais recentemente, a Endocrine Sciences e a Quest Diagnostics determinaram um novo intervalo de referência (Tabela 1 e Tabela 2). Vale ressaltar que as três referências referem-se a dosagens de PREG e 17OHPREG por cromatografia líquida associada a espectrometria de massas em tandem.

Tabela 1: Comparação de valor de referência para 17OHPREG

	Kushinir (ng/dL)	Quest Diagnostics (ng/dL)	Endocrine Sciences (ng/dL)
Prematuros			
26 - 28 semanas			375 – 3559
31 - 35 semanas		< 360	64 – 2380
Recém nascidos			
3 dias		< 420	10 – 829
Lactente			
1 - 5 meses			36 – 763
6 - 11 meses		11 - 170	42 – 540
Crianças pré – puberes			
12 - 23 meses			14 – 207
24 meses - 5 anos		4 - 115	10 – 106
6 - 9 anos	F - < 212 M - < 187	< 90	10 – 186
Puberdade			
10 - 11 anos	F - < 320 M - < 387		
12 - 13 anos	F - < 362 M - < 362	< 169	
14 - 15 anos	F - 28 - 422 M - 32 - 428		44 – 235
16 - 17 anos	F - 25 - 419 M - 31 - 478	16 - 283	
Adultos			
18 - 30 anos		M - 32-307 F Fase Folicular - < 185 Fase Lútea - < 285 Pós Menopausa - < 45	
31 - 40 anos		M - 42-196 F Fase Folicular - < 185 Fase Lútea - < 285 Pós Menopausa - < 45	
41 - 50 anos	F - < 208 M - 36 - 409	M - 33-195 F Fase Folicular - < 185 Fase Lútea - < 285 Pós Menopausa - < 45	53 – 357
51 - 60 anos		M - 37-129 F Fase Folicular - < 185 Fase Lútea - < 285 Pós Menopausa - < 45	

É possível observar que os valores de referência para 17OHPREG são discrepantes desde a fase pré-matura até a fase lactente, fases onde o diagnóstico da doença é mais crucial. Para outras faixas etária, os valores de referência são similares, pois as pequenas variações observadas não seriam clinicamente relevantes.

Tabela 2: Comparação de valor de referência para PREG

	Kushinir (ng/dL)	Quest (ng/dL)	Endocrine Sciences (ng/dL)
Prematuros			
26 - 28 semanas			260 – 2104
31 - 35 semanas		< 360	203 – 1024
Recém nascidos			
		12 - 1331 (Obs: 1 a 59 dias)	150 - 2000 (Obs: 1 a 7 dias)
Lactente			
1 - 5 meses			
6 - 11 meses		< 170	
Crianças pré – puberes			
12 - 23 meses			20 – 140
24 meses - 5 anos		< 107	
6 - 9 anos	F - 14 - 150 M - 13 - 205	< 114	
Puberdade			
10 - 11 anos	F - 15 - 197 M - 12 - 151		
12 - 13 anos	F - 22 - 220 M - 18 - 170	< 163	
14 - 15 anos	F - 23 - 214 M - 17 - 198		< 151
16 - 17 anos	F - 22 - 229 M - 16 - 229	< 325	
Adultos			
18 - 58 anos	F - 17 - 130 M - 28 - 165	M - 13 - 208 Feminino Pré Menopausa - 7 - 188 Pós Menopausa - 13 - 111	< 151

Os valores de referência para PREG são similares entre as três referências utilizadas para comparação.

1.2 Técnicas cromatográficas associadas a espectrometria de massas na análise de esteroides

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) por sua alta seletividade e sensibilidade tem sido usada crescentemente na quantificação de esteroides, já que a elevada especificidade de LC-MS/MS superou as limitações intrínsecas dos imunoenaios como especificidade reduzida, reações cruzadas, necessidade de mais de uma metodologia para confirmação de resultado e procedimentos longos e trabalhosos para a obtenção dos resultados. A combinação desses aspectos favoráveis tornou a LC-MS/MS no padrão ouro para a determinação de hormônios esteroidais (Carvalho et al., 2008; Lutfallah et al., 2002; Tai e Welch, 2004; Tai et al., 2007).

Entretanto, os esteroides de estrutura 3-hidroxi-5-eno (Δ^5), como as pregnenolonas, apresentam baixa afinidade por próton e conseqüentemente baixa eficiência de ionização pelas técnicas de eletrospray (ESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) ou fotoionização a pressão atmosférica (APPI) (Barbosa et al., 2010). Conseqüentemente, seriam necessárias etapas adicionais para a conversão destes esteroides em derivados com melhor detecção.

As limitações da LC-MS/MS na análise desse grupo específico de esteroides justificaria a aplicação da cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-MS). Embora CG-MS atualmente seja tida como técnica mais antiga e limitada, essa interpretação é claramente equivocada. À medida que etapas adicionais de preparo de amostra são incorporadas aos procedimentos de LC-MS/MS, as duas técnicas acabam se equalizando. Por outro lado, a despeito dos avanços recentes da LC, em particular em relação à ultra eficiência cromatográfica, a eficiência da CG ainda é insuperável principalmente quando é necessária a separação de formas isoméricas e a quantificação de analitos em concentrações muito baixas (Barbosa et al., 2010; Krone et al., 2010).

1.2.1 Cromatografia a gás

A separação por cromatografia a gás se baseia na distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel gasosa. A amostra, em sua forma gasosa ou líquida, por meio de um sistema de injeção é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. Uma corrente de gás passa continuamente pela coluna e arrasta a substância volatilizada através da

coluna. A interação entre as substâncias da amostra e a fase estacionária possibilita que os analitos tenham velocidade de migração diferentes, desta forma separando as substâncias da amostra. No detector, geram um sinal para o sistema de registro (Rose, 1959).

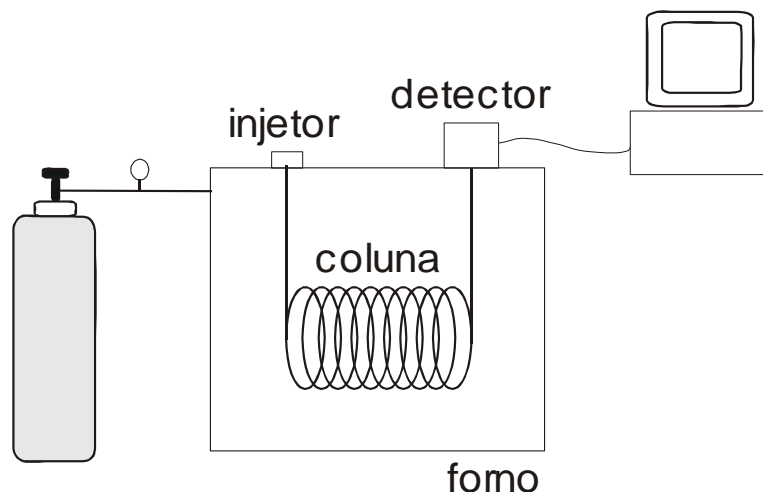


Figura 7: Componentes principais de um sistema de cromatografia a gás.

A cromatografia a gás é uma técnica com um poder de resolução excelente o que torna possível a análise de dezenas ou até mesmo centenas de componentes de uma amostra. Também é uma técnica associada a limites de detecção baixos o que permite a utilização de pequenas quantidades de amostras mesmo em analitos de concentração na ordem de picogramas por mililitro ou ainda menores (Eiceman et al., 1994).

Apesar de todas as vantagens, algumas considerações devem ser avaliadas para obtenção dos melhores resultados. Os analitos que serão quantificados por essa técnica devem ser facilmente volatilizados e termicamente estáveis, sendo que técnicas de derivatização podem ser utilizadas para melhorar essas características nas substâncias que serão analisadas (Rose, 1959).

1.2.2 Técnicas de ionização em GC-MS

O método de ionização mais utilizado em GC-MS é o impacto de elétrons (EI) (Figura 7). Nesta técnica, elétrons de alta energia (tipicamente 70 eV) colidem com as moléculas dos analitos produzindo primeiramente íons positivos. O excesso de energia utilizado para promover a ionização é transferido para as ligações químicas gerando extensa fragmentação. Os perfis de fragmentação foram extensivamente estudados na última décadas e o conhecimento acumulado permite certa facilidade na interpretação desses perfis (Dougherty, 1981).

A característica universal da ionização por EI traz uma desvantagem na análise de compostos traços em matrizes complexas, pois a ionização dos componentes da matriz aumenta o ruído químico nas análises dificultando alcançar baixos limites de detecção (Ong, Voon S.; Hites, 1986)

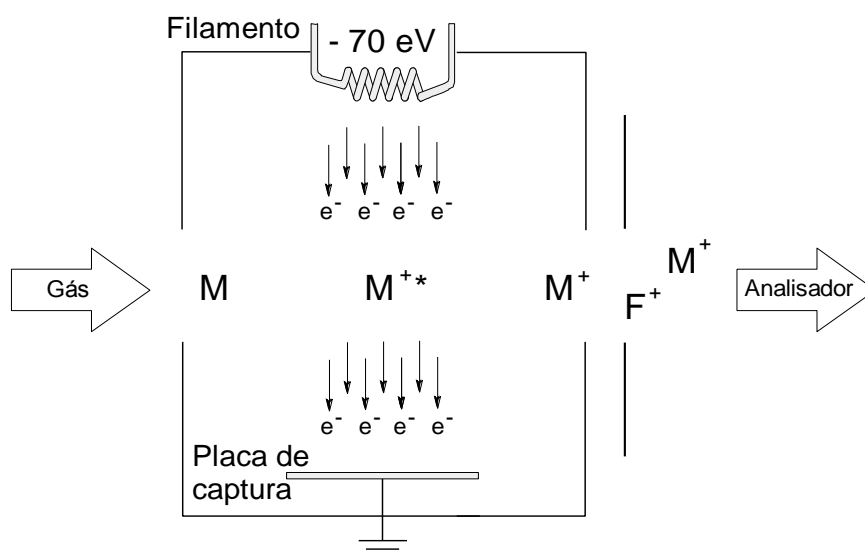
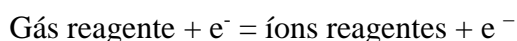
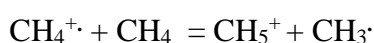
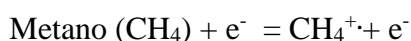


Figura 8: Esquema simplificado de uma fonte de ionização por impacto de elétrons.

A ionização química é uma técnica derivada do EI onde a fonte de íons é modificada para operar em pressões mais elevadas. Nessa técnica é introduzido um gás reagente na fonte de íons como metano, amônia e isobutano. Como o número de moléculas do gás reagente é muito maior que as dos analitos, a maioria dos elétrons emitidos pelo filamento irá reagir com o gás resultando em uma série de reações na fase gasosa produzindo íons reagentes. (vide esquema abaixo) (Munson, M. S. B., 1966):



Se o gás reagente utilizado é o metano, a reação é a seguinte: (Dougherty, 1981; Gross, 2004):



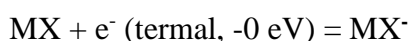
Os elétrons formados na reação são termiais, ou seja, possuem uma energia menor do que quando foram emitidos pelo filamento. Como a ionização química

resulta em menor fragmentação na fonte ela é tida como uma técnica de ionização suave.

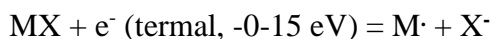
Uma modalidade ainda menos explorada é a ionização química no modo negativo (NCI). Embora um grupo reduzido de substâncias possam ser ionizadas eficientemente por meio dessa modalidade, por meio do processo de derivatização química é possível introduzir as características necessárias aos analitos como átomos de elementos eletronegativos como o flúor e o cloro. Esses elementos promovem a captura de elétrons podendo resultar em seguida na dissociação do grupo introduzido na derivatização química. Essa técnica pode aumentar a sensibilidade de 10 até 1000 vezes mais quando comparado com a técnica de ionização química positiva (Krone et al., 2010).

Na NCI, os íons podem ser formados por interações entre elétrons e moléculas neutras e/ou, semelhantemente à PCI, entre íons e moléculas neutras. Há três mecanismos de formação de íons negativos pela interação molécula-elétron e o predomínio de um ou outro depende essencialmente da energia do elétron e da natureza da molécula.

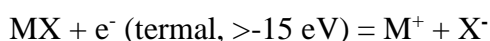
Na captura de elétron ressonante, o gás reagente promove a termalização dos elétrons a energias próximas de zero que ao reagir diretamente com os analitos geram ânions moleculares sem dissociação. (Knighton, Sears, e Grimsrud, 1995):



Na captura dissociativa ressonante, elétrons com energias entre 0 - 15 eV ao interagirem com as moléculas resultam em dissociação unimolecular (Ong, Voon S.; Hites, 1986)



Na formação de pares iônicos, quando elétrons de energias superiores a 15 eV são utilizadas, o elétron não é capturado mas fornece energia para a excitação e dissociação da molécula no par ânion e cátion. Esse processo não é observado em fontes operando em pressões corretas.



Na ionização química em modo negativo com captura de elétrons (ECNCI) o gás reagente poderia ser chamado mais apropriadamente de gás tampão, pois promove não apenas o esfriamento dos elétrons como também a estabilização dos íons moleculares negativos pela redução da fragmentação (Ong, Voon S.; Hites, 1986).

O monitoramento dos íons gerados por ECNCI por ser efetuado por um dos vários tipos de analisadores de massas. Para análises quantitativas um dos mais adequados é a espectrometria de massas em tandem por meio de analisadores do tipo triplo quadrupolo (MS-MS). Nesta técnica, os íons são direcionados para um primeiro quadrupolo que isola íons de determinada relação massa/carga (m/z), chamados de íons precursores. Os íons precursores são direcionados para uma câmara de colisão onde são fragmentados, sendo os fragmentos chamados de íons produtos. No segundo quadrupolo, são isolados íons produtos com uma m/z específica. Esta técnica é altamente seletiva, pois a probabilidade de duas substâncias serem eluidas ao mesmo tempo da coluna analítica, possuírem a mesma m/z e o mesmo perfil de fragmentação é muito pequena (Glish e Vachet, 2003).

Macherone et al. (2010), no desenvolvimento de um método para quantificação de estrona cuja concentração endógena está na ordem de unidades de picogramas por mililitro, não obtiveram a sensibilidade necessária para dosagens nesta ordem de concentração aplicando GC-EI-MS/MS em grande parte devido à extensa fragmentação promovida pelo impacto de elétrons. Ao aplicar GC-ECNCI-MS/MS alcançaram o impressionante limite de detecção de 0,15 pg/mL, combinados a alta seletividade e sensibilidade e baixo sinal ruído (Macherone A., 2010).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um método bioanalítico para análise indireta da atividade da enzima 3 β -HSD por meio da determinação dos esteroides PREG e 17OHPREG.

As etapas do trabalho consistiram em:

1. Aplicação da cromatografia a gás para a separação desses analitos;
2. Aplicação de técnicas de extração diversas;
3. Desenvolvimento de um método de detecção baseado em espectrometria de massas em tandem por ionização química negativa e captura de elétrons.
4. Desenvolvimento de um processo de extração baseado em extração em fase sólida;
5. Desenvolvimento de estratégias de derivatização;
6. Pré - validação analítica em amostras descaracterizadas de soro.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Reagentes e solventes

Os reagentes cloridrato de O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzila) hidroxilamina (PFBHA), piridina anidra, N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) e dodecano foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). Hexano e acetato de etila foram obtidos da Tedia (Arizona, EUA). Ácido perclórico (HClO₄), isooctano, metanol, éter – metil – terc – butílico (MTBE) e acetonitrila todos de grau HPLC foram obtidos da J.T. BAKER (Center Valley, USA). Diclorometano foi obtido da Macron (Center Valley, USA), Sulfato de cobre (CuSO₄) e fosfato de sódio foram obtidos da Neon Comercial (São Paulo, Brasil). A água ultrapura foi obtida do sistema de purificação Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, EUA).

3.1.2 Padrões dos esteroides

Os padrões 17OHPREG e PREG foram obtidos da Steraloids (Newport, EUA). 17-alfa-hidroxipregnenolona-21,21,21-*d*₃ (97% D) foi adquirida da CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada). Pregnenolona-¹³C₂, ²H₂ foi obtido da Isosciences (Pensilvânia, EUA).

3.1.3 Instrumentos

Os seguintes sistemas foram utilizados:

- Sistema de cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas em tandem composto por duas bombas binárias Shimadzu LC-10ATvp, injetor manual e espectrômetro de massas em tandem Quattro Micro (Waters) equipado com sonda de ESI. O controle, aquisição e processamento dos dados foi feito pelo programa MassLynx MS V.4.1 (Waters).
- Sistema de cromatografia a gás Agilent 7890 acoplado a um espectrômetro de massas em tandem 7000B equipado com fonte de ionização química, sistema de injeção CTC e programa MassHunter para controle, aquisição e processamento dos dados.
- Thermomixer Comfort - Eppendorf.
- Speedvac Savant SPD131DDA - Thermo Scientific.
- Sistema de purificação de água Milli-Q da Millipore.

- Vórtex para tubos e microtubos.

3.1.4 Materiais para extração

- Pipetas de volumes variados calibradas,
- Ponteiras com filtro
- Frascos para HPLC de vidro 2,0 mL
- Microtubos 1,5 mL
- Nitrogênio líquido
- Parafim
- Inserts de vidro 300 μ L
- Coluna para extração em fase sólida Strata X (Phenomenex) em tubos e em placas.

3.1.5 Colunas

- Coluna semipreparativa (Gemini, C18, 150 x 10 mm, Phenomenex)
- DB-5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m (Agilent Technologies)
- DB-17 HT 30 m x 0,25 mm x 0,15 μ m (Agilent Technologies)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Protocolos de extração e derivatização

Foram avaliados os seguintes protocolos de derivatização:

Protocolo 1 (Caracterização dos compostos)

Foram transferidos 100 μ L das soluções de 17OHPREG e/ou PREG a 100 μ g/mL em etanol em um vial de 1 mL. Em seguida foram adicionados 50 μ L de uma solução 10 mg/mL de PFBHA em piridina anidra e a mistura resultante foi agitada durante 1 minuto em vórtex. A seguir, a mistura foi incubada a 40°C em Thermomixer por 30 minutos sob agitação de 400 rpm. O conteúdo foi seco em speedvac e o resíduo foi ressuspenso em 100 μ L de isooctano.

Protocolo 2 (Continuação do protocolo 1 – dupla derivatização com PFBHA e MSTFA)

Foram transferidos 20 µL do derivado do protocolo 1 para outro vial e o solvente foi removido por speedvac. Em seguida, foram adicionados 40 µL de piridina anidra e 20 µL de MSTFA. A mistura foi incubada a 50°C em Thermomixer com agitação de 300 rpm durante 60 minutos.

Protocolo 3 (Primeiro protocolo com extração líquido – líquido)

Foram transferidos 100 µL das soluções de 17OHPREG e/ou PREG a 100 µg/mL em etanol para um microtubo de 1,5 mL. Em seguida foram adicionados 40 µL de solução PFBHA 10 mg/mL em piridina anidra. A mistura foi incubada a 65°C em Thermomixer durante 30 minutos e sob 500 rpm de agitação. Ao final da incubação, a mistura foi lavada com 100 µL de HClO₄ 10% (v/v). O derivado final foi extraído por extração líquido-líquido com 200 µL de isooctano e agitação por 3 minutos utilizando congelamento em nitrogênio líquido para a separação das fases.

Protocolo 4 (extração líquido-líquido em amostras de soro)

Foram transferidos 200 µL do pool de soro adicionado com 10 ng/mL de 17OHPREG e PREG para um microtubo de 1,5 mL. A seguir foram adicionados 600 µL do solvente orgânico (MTBE, N-hexano, acetato de etila ou diclorometano) e 20 µL do padrão interno a 100 ng/mL (17-hidroxipregnenolona-21,21,21-²H₃ e pregnenolona-¹³C₂,²H₂ a 10 ng/mL em DMSO). A mistura foi agitada em agitador manual durante 2 minutos e em seguida centrifugada a 17200 ×g durante 5 minutos. A fase aquosa foi congelada e a orgânica transferida a outro microtubo e o extrato orgânico foi evaporado em speedvac. Os analitos foram convertidos aos derivados oxima pela adição de 40 µL de uma solução PFBHA 10 mg/mL em piridina seguida de incubação a 85°C em Thermomixer durante 90 minutos com agitação a 500 rpm. A mistura foi lavada com 100 µL de HClO₄ 10% (v/v) e 100 µL de CuSO₄ por agitação a 500 rpm durante 1 minuto. Os derivados foram extraídos com 200 µL de hexano durante 2 minutos. Uma nova separação de fases foi obtida por congelamento. O extrato orgânico foi evaporado e o resíduo ressuspense em 20 µL de dodecano.

Protocolo 5 (extração em fase sólida em amostras de soro – otimização dos solventes de eluição)

Para o desenvolvimento do método de extração em fase sólida inicialmente a derivatização dos analitos foram feitas em tubos separados. Todas as frações eluídas foram reservadas, derivatizadas com 200 μL da solução de derivatização (PFBHA 10 mg/mL em metanol/tampão fosfato de sódio pH 4,5 25 mmol/L, 1:4 v/v) e analisadas por GC-MS/MS. O protocolo geral foi baseado na ativação da fase estacionária com 0,5 mL de metanol seguida de equilíbrio com 1 mL de água. Para o desenvolvimento foi utilizada uma solução aquosa dos padrões à 100 ng/mL. Lavagens e/ou eluições com 1 mL de metanol 25%, metanol 50%, metanol 100%, acetonitrila, MTBE e acetonitrila/ MTBE (1/1, v/v) foram avaliados.

Protocolo 6 (extração em fase sólida em amostras de soro – em colunas tubulares e microplacas de extração)

Foram transferidos 250 μL de pool de soro adicionado de 20 μL de uma solução 100 ng/mL dos padrões internos a um microtubo de 1,5 mL e a seguir foram adicionados 500 μL de acetonitrila. A mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto e centrifugada a 17200 $\times g$ durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos a outros microtubos contendo 500 μL de água ultrapura. As colunas extração Strata X (Phenomenex) foram ativadas com 500 μL de metanol e equilibradas com 1 mL de água ultrapura. Os soros desproteinizados e diluídos em água foram aplicados nas colunas. A eluição foi feita por centrifugação a 400 $\times g$ durante 1 minuto. As colunas foram sequencialmente lavadas com 1 mL de água ultrapura e 1 mL de metanol 25 % por centrifugação a 400 $\times g$ durante 1 minuto. Foram aplicados na coluna 200 μL de uma solução de PFBHA 10 mg/mL em metanol e tampão de fosfato de sódio (1/4, v/v). As colunas foram centrifugadas 1 minuto em 160 $\times g$, o suficiente para que o derivatizante ficasse em contato com o sorbente da coluna. As colunas foram vedadas com Parafilm em ambas as extremidades e ficaram em incubação em temperatura ambiente durante 24 h. Após incubação, as colunas foram lavadas sequencialmente com 1 mL de metanol 25% e 1 mL de metanol 50 % por centrifugação a 400 $\times g$ durante 1 minuto. Para eluição, as colunas foram inseridas em tubos de vidro limpos e foi pipetado 500 μL de acetonitrila e centrifugada a 400 $\times g$ durante 1 minuto, em seguida foi pipetado 500 μL de MTBE e centrifugada a 400 $\times g$ durante 1 minuto. Os tubos foram secados em speedvac e os resíduos foram ressuspensos com 25 μL de

dodecano. A amostra foi transferida para um vial com insert de vidro e injetada no GC.

3.2.2 Purificação e caracterização dos derivados oxima por LC-MS

Os derivados obtidos a partir do protocolo de extração 1 foram purificados por HPLC utilizando uma coluna semipreparativa (Gemini, C18, 150 x 10 mm, Phenomenex) eluída com um gradiente binário composto pelas fases móveis água (A) e metanol (B). O método empregado foi: 0-7 min a 75% de B; 7-10 min de 75% de B a 100% de B; retornando a condição inicial por mais 3 min. O fluxo foi ajustado em 6 mL/min.

A coleta dos derivados purificados foi feita no modo *split* utilizando uma conexão em "T", onde 90% do fluxo foi coletado e 10% seguia para o espectrômetro de massas para aquisição e monitoramento dos dados. Os parâmetros do cromatógrafo podem ser observados na tabela abaixo.

Tabela 3: Parâmetros do cromatógrafo para purificação das moléculas.

Ionização	Eletrospray em modo positivo
Monitoramento de íons	Fullscan (300 – 1000 m/z)
Temperatura da fonte	150 °C
Temperatura de dessolvatação	70 °C
Voltagem do capilar	3,2 kV
Fluxo do gás de dessolvatação (Nitrogênio)	500 L/h
Fluxo da célula de colisão (Argônio)	0,15 mL/min
Volume de injeção	10 µL

3.2.3 Caracterização dos derivados por CG-MS/MS

Os derivados purificados por HPLC foram analisados por CG-MS/MS. Os parâmetros do equipamento podem ser observados na tabela abaixo. Os parâmetros sinalizados em negrito, foram otimizados e sua condição final é descrita em parênteses.

Tabela 4: Parâmetros do CG-MS/MS utilizados na análise dos analitos.

Ionização	Ionização química no modo negativo
Modo de injeção	Splitless
Volume de injeção	1 μ L (2 μ L)
Temperatura do injetor	280 °C
Gás de arraste e fluxo	Hélio 1,2 mL/min
Temperatura da linha de transferência	310 °C (290 °C)
Gás reagente e fluxo	Metano 40%, 2 mL/min
Energia de ionização	- 240 eV (- 90 °C)
Temperatura da fonte	150 °C
Temperatura dos quadrupolos (Q1 e Q2)	150 °C
Gás de colisão e fluxo	Nitrogênio (1,5 mL/min)

3.2.4 Condições cromatográficas analisadas

Durante o desenvolvimento, diferentes isotermas e rampas de temperatura foram testadas em duas colunas capilares (DB-5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m e DB-17 HT 30 m x 0,25 mm x 0,15 μ m). As diferentes rampas utilizadas são descritas nas Tabelas 5 a 10.

Tabela 5: Programação da temperatura utilizada nas injeções realizadas na coluna DB-5MS.

Temperatura inicial (°C)	Rampa (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo de estabilização (min)
150			2
150	20	320	10

Tabela 6: Programação de temperatura utilizada nas injeções realizadas na coluna DB-17HT.

Temperatura inicial (°C)	Rampa (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo de estabilização (min)
150			2
150	10	340	5

Tabela 7: Programação de temperatura utilizada nas injeções realizadas na coluna DB-17HT.

Temperatura inicial (°C)	Rampa (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo de estabilização (min)
200			1
	20	320	0
	10	340	2

Tabela 8: Programação de temperatura utilizada nas injeções realizadas na coluna DB-17HT, para extrações em soro.

Temperatura inicial (°C)	Rampa (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo de estabilização (min)
200			0,5
	20	300	0
	10	340	3

Tabela 9: Programação de temperatura utilizada nas injeções realizadas na coluna DB-17HT, para extrações em soro utilizando SPE.

Temperatura inicial (°C)	Rampa (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo de estabilização (min)
200			0,5
	20	300	0
	10	340	5

Tabela 10: Programação de temperatura utilizada nas injeções realizadas na coluna DB-17HT, para extrações em soro utilizando SPE.

Temperatura inicial (°C)	Rampa (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo de estabilização (min)
195			0,5
	30	300	0
	10	340	2

3.2.5 Planejamento e preparo das amostras para a validação

3.2.5.1 Preparo das soluções padrão

- **Preparo da solução-padrão primária PREG e 17OHPREG (0,1 mg/mL)**

Foram pesados em uma balança analítica de precisão digital 10 mg de cada um dos padrões. Os sais foram transferidos para balões volumétrico de 100 mL e os volumes foram completado com DMSO.

- **Preparo da solução-padrão secundária A: PREG (1000 ng/mL) e 17OHPREG (2000 ng/mL)**

Com um pipetador de 1 mL calibrado e aferido no momento do uso foi transferido 1 mL da solução-padrão primária de PREG e 17OHPREG para um balão de 100 mL que foi completado com DMSO.

- **Preparo da solução-padrão secundária B: PREG (25 ng/mL) e 17OHPREG (50 ng/mL)**

Com um pipetador de 1 mL calibrado e aferido no momento do uso foi transferido 0,625 mL do estoque terciário A de PREG e 17OHPREG para um balão de 25 mL que foi completado com DMSO.

- **Preparo das soluções estoque 50 x (50 vezes concentradas) da linearidade e curva de calibração**

Para o preparo das soluções 50 vezes concentradas, foram utilizados os estoques intermediários A e B conforme a Tabela 11. Os estoques finais 50 vezes concentrados foram diluídos em soro livre por meio de gravimetria pesando em uma balança analítica digital a massa correspondente a 9,8 mL de soro livre de esteroides para cada ponto de linearidade. A seguir, com uma pipetada calibrada, foi transferido 200 µL de cada solução 50 vezes concentrada para o soro livre de esteroides.

Tabela 11: Preparo das soluções intermediárias e linearidade

Amostra	PREG	17OHPREG	Estoque finais 50x em DMSO, ng/mL		Para preparar as soluções 50x concentrada, pipetar da seguinte forma:		
	[no soro, ng/mL]	[no soro, ng/mL]			Estoque (µL)	DMSO (µL)	
LINE01	20,00	40,00	1000,00	2000,00	Estoque intermediário A (Preg 1000 ng/mL e 17OHPREG 2000 ng/mL)	2000	0
LINE02	10,00	20,00	500,00	1000,00		1000	1000
LINE03	8,00	16,00	400,00	800,00		800	1200
LINE04	6,00	12,00	300,00	600,00		600	1400
LINE05	4,00	8,00	200,00	400,00		400	1600
LINE06	2,00	4,00	100,00	200,00		200	1800
LINE07	1,00	2,00	50,00	100,00		100	1900
LINE08	0,50	1,00	25,00	50,00	Estoque intermediário B (Preg 25 ng/mL e 17OHPREG 50 ng/mL)	2000	0
LINE09	0,35	0,75	18,75	37,50		1500	500
LINE10	0,25	0,50	12,25	25,00		1000	1000
LINE11	0,125	0,25	6,25	12,50		500	1500
LINE12	0,05	0,10	2,50	5,00		200	1800
LINE13	0,00	0,00	0,00	0,00		0	2000

3.2.5.2 Amostras para avaliação da precisão

Para a extração das amostras, foi utilizado o protocolo 6. O experimento foi realizado em um dia de análise.

Nível baixo (PREC1): foram utilizados 50 mL de pool de soro coletado com gel separador e armazenado em temperatura de 4 a 8 °C.

Nível alto (PREC2): foram adicionados 500 µL das soluções concentradas LINE 3 e LINE 4 a 49 mL de pool de soro coletado com gel separador e armazenado em temperatura de 4 a 8 °C.

Nível intermediário (PREC3): foram adicionados 500 µL das soluções concentradas LINE 7 e LINE 8 a 49 mL de pool de soro coletado com gel separador e armazenado em temperatura de 4 a 8 °C.

3.2.5.3 Amostras para avaliação da sensibilidade

Para a extração das amostras, foi utilizado o protocolo 6. O experimento foi realizado em um dia de análise.

Uma amostra derivada de um pool de soro foi diluída 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20 v/v em solução salina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos derivados pentafluorobenzila oxima e desenvolvimento do método de detecção por espectrometria de massas

Os padrões de PREG e de 17OHPREG derivados seguindo o protocolo 1 (3.2.1) foram analisados por LC-MS. Na

Figura 9 são apresentados os cromatogramas obtidos após a injeção de 30 μ L de cada derivado individualmente empregando o gradiente descrito no item 3.2.2.

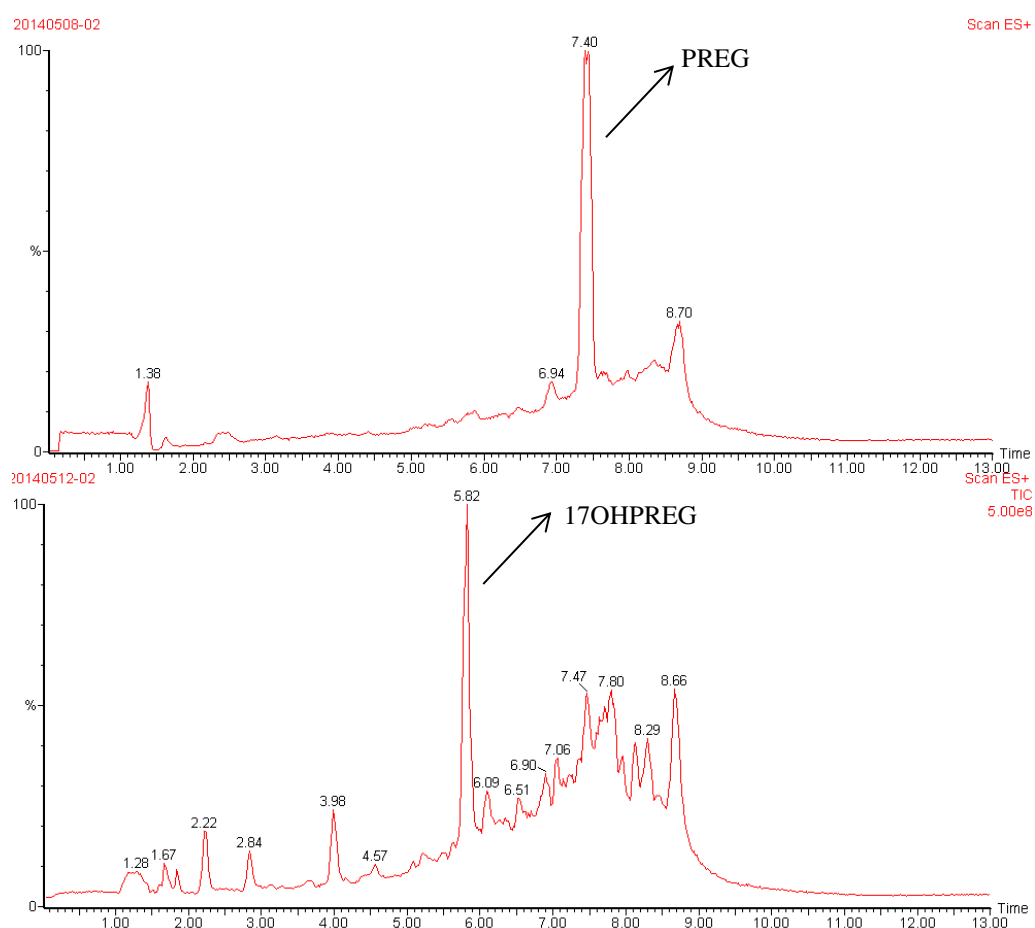


Figura 9: A. Perfil cromatográfico obtido após a injeção do derivado PREG-PFB com detecção no modo *fullscan* (m/z 300-1000). B. Perfil cromatográfico obtido após a injeção do derivado resultante da 17OHPREG-PFB com detecção no modo *fullscan* (m/z 300-1000). Detalhes experimentais vide item 3.2.2 - protocolo de extração 1 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 5.

Os espectros de massas referentes aos picos majoritários (tempos de retenção 7,4 min e 5,8 min para PREG-PFB e 17OHPREG-PFB, respectivamente), estão apresentados na Figura 10.

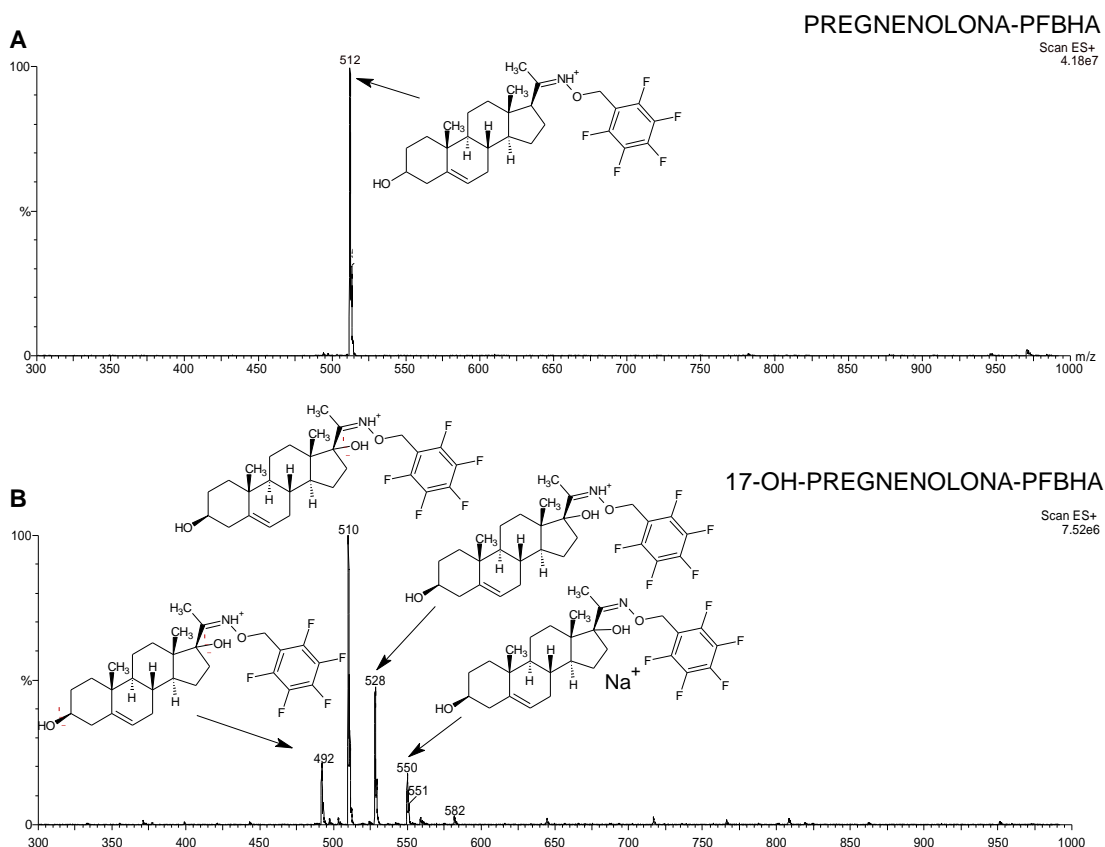


Figura 10: A. Espectro de massas *fullscan* (m/z 300-1000) referente ao pico de tempo de retenção (TR) = 7,4 min do derivado resultante da PREG pelo protocolo 1. B: Espectro de massas *fullscan* (m/z 300-1000) referente ao pico de TR= 5,8 min do derivado resultante da 17OHPREG pelo protocolo 1.

O espectro de massas da Figura 10 apresenta como pico base m/z 512 que confirma a adição do grupo PFBHA à PREG (protocolo 1), conforme mostrado no esquema indicado na Figura 11.

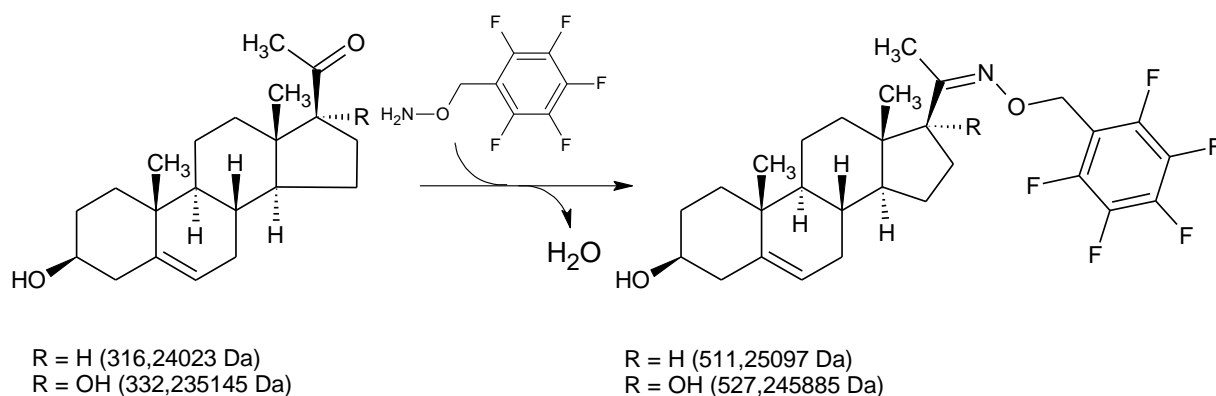


Figura 11: Conversão da PREG e 17OHPREG a seu respectivo derivado oxima pela reação com a PFBHA.

Na análise por ESI em modo positivo observamos uma predominância do íon de m/z 512 que poderia ser atribuído à molécula protonada ($[M+H]^+$) do derivado oxima da PREG (PREG-PFB).

Curiosamente, na análise do derivado equivalente da 17OHPREG foram observados, além do íon de m/z 528 que poderia ser atribuído à molécula protonada do derivado 17OHPREG-PFB, outros íons de m/z 492, 510 e 550 que corresponderiam, respectivamente, a $[17OHPREG-PFB+H^+-2H_2O]$, $[17OHPREG-PFB+H^+-H_2O]$ e $[17OHPREG-PFB+Na^+]$ (Figura 12). A observação do íon resultante da perda de H_2O mais abundante que a molécula protonada indica uma menor estabilidade desse íon na fase gasosa comparado ao equivalente da PREG.

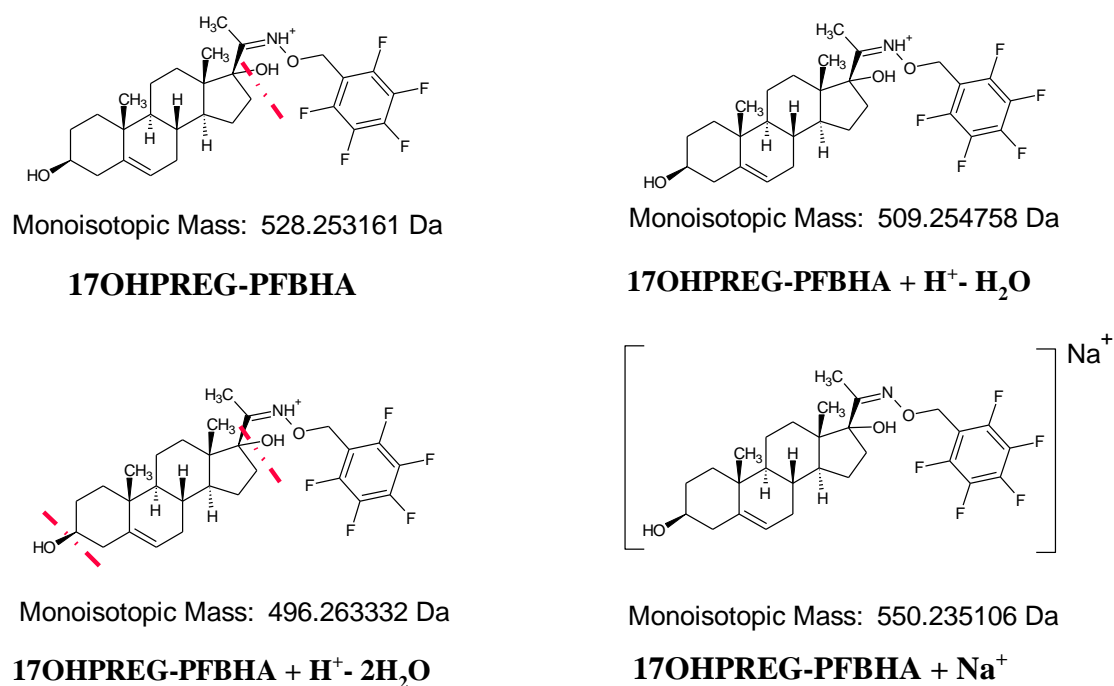


Figura 12: Tentativa de atribuição dos íons observados do derivado oxima da 17OHPREG.

Após a caracterização por LC-MS, os derivados foram analisados por CG-MS/MS segundo os parâmetros descritos no item 3.2.3 empregando a coluna capilar DB-5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm . Os cromatogramas e espectros de massas obtidos estão apresentados nas Figura 13 e 14, respectivamente.

O espectro de massas do pico principal da análise dos produtos da reação de PREG com PFBHA é observado um íon de m/z 491. Esse íon resultante da perda de 20 unidades de massa poderia ser atribuído à perda de fluoreto de hidrogênio (HF) do derivado PREG-PFB. Essa perda de HF na fonte de ionização é um fenômeno comum em amostras derivatizadas com reagentes contendo o grupo pentafluorbenzila (PFB) (Hsu et al., 1999).

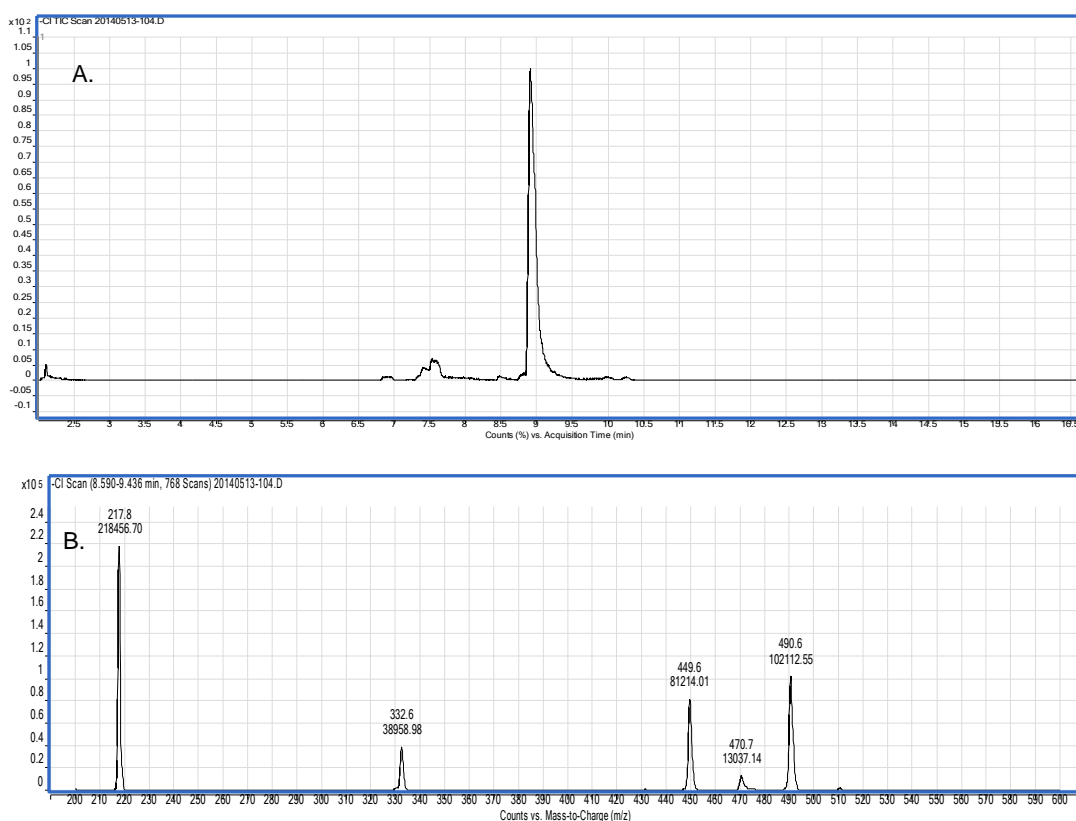


Figura 13: A. Perfil cromatográfico obtido após a injeção da PREG-PFBHA com detecção no modo *fullscan* (m/z 200-600). B. Espectro de massas referente ao pico em TR= 8,8 min obtido empregando método descrito no item 3.2.3 – protocolo 1, rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 5 .

No entanto, provavelmente devido à polaridade mais elevada da 17OHPREG não foi possível eluir o derivado 17OHPREG-PFB nas condições inicialmente empregadas (Figura 14) sugerindo assim interação forte com a fase estacionária. Nos espectros extraídos do cromatograma principal, nenhum dos picos verificados foi atribuído ao derivado ou a possíveis fragmentos esperados (-HF).

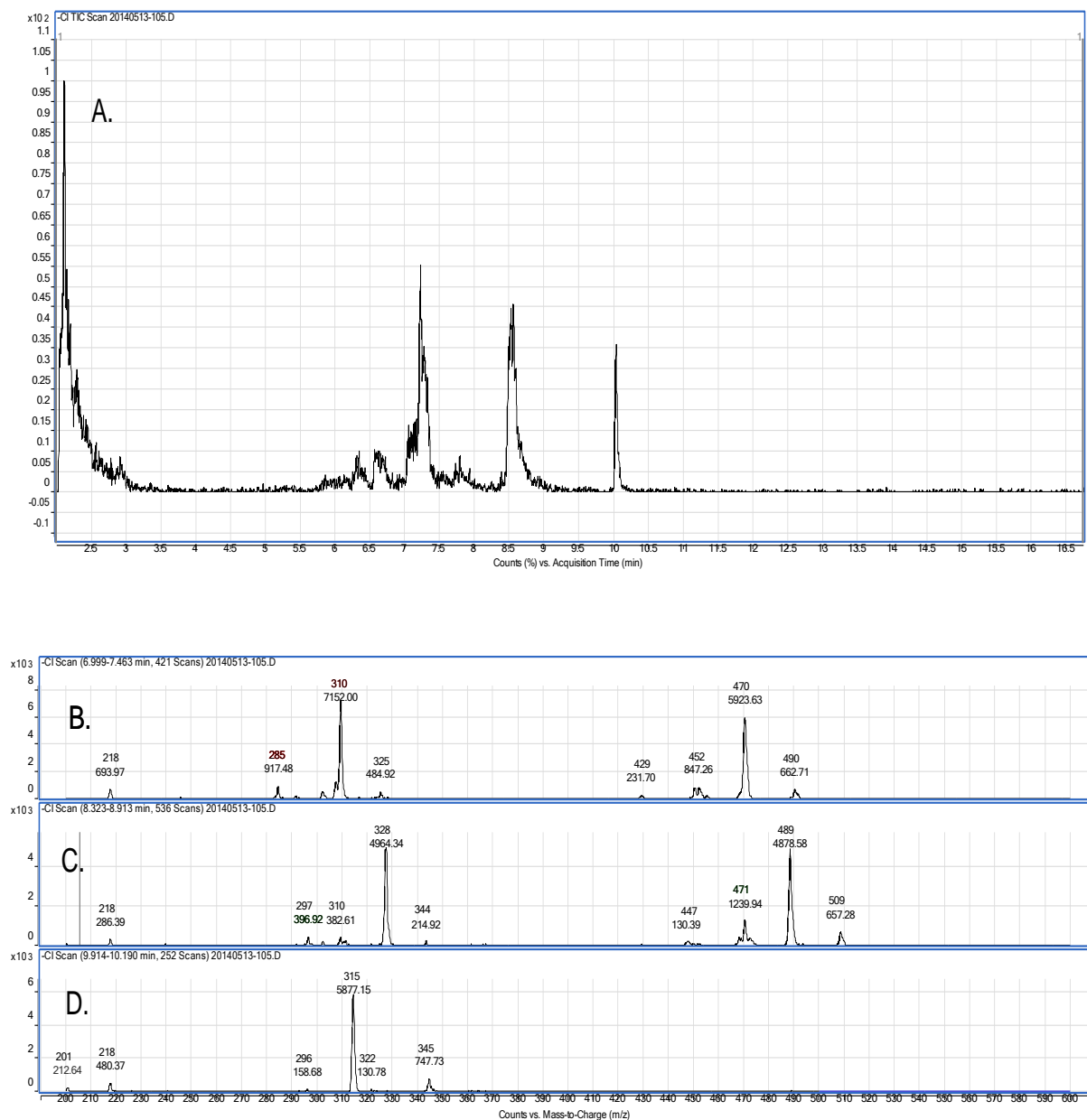


Figura 14: A. Perfil cromatográfico obtido após a injeção da 17OHPREG-PFBHA com detecção no modo *fullscan* (m/z 200-600) empregando método descrito no item 3.2.1 de Métodos – protocolo 1 rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 5. Espectro de massas referente ao pico em TR= 7,3 min. C. Espectro de massas referente ao pico em TR= 8,5 min. D. Espectro de massas referente ao pico em TR= 10,5 min.

Com o objetivo de reduzir a polaridade da 17OHPREG e consequentemente possibilitar a eluição do derivado 17OHPREG-PFB, foi avaliado um passo de conversão em derivados silila (protocolo 2), por meio da reação com MSTFA (Figura 15).

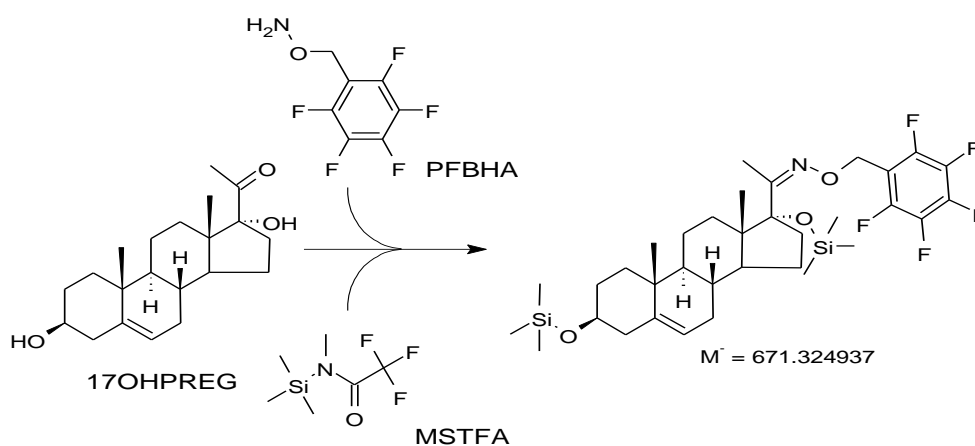


Figura 15: Estruturas dos prováveis derivados da 17OHPREG após derivatização com PFBHA e MSTFA.

A estratégia teve sucesso parcial, pois foi possível verificar o derivado esperado da 17OHPREG (Figura 16) e a abreviação do tempo de retenção da PREG quando comparada a derivatização apenas com PFBHA. No entanto, a sensibilidade obtida para a PREG foi muito inferior comparada à derivatização apenas com PFBHA. Adicionalmente, a necessidade de manipulação em condições anidras dificultaria a transferência do método para a rotina clínica, já que requereria um ambiente com umidade controlada e armazenamento dos reagentes em dessecadores.

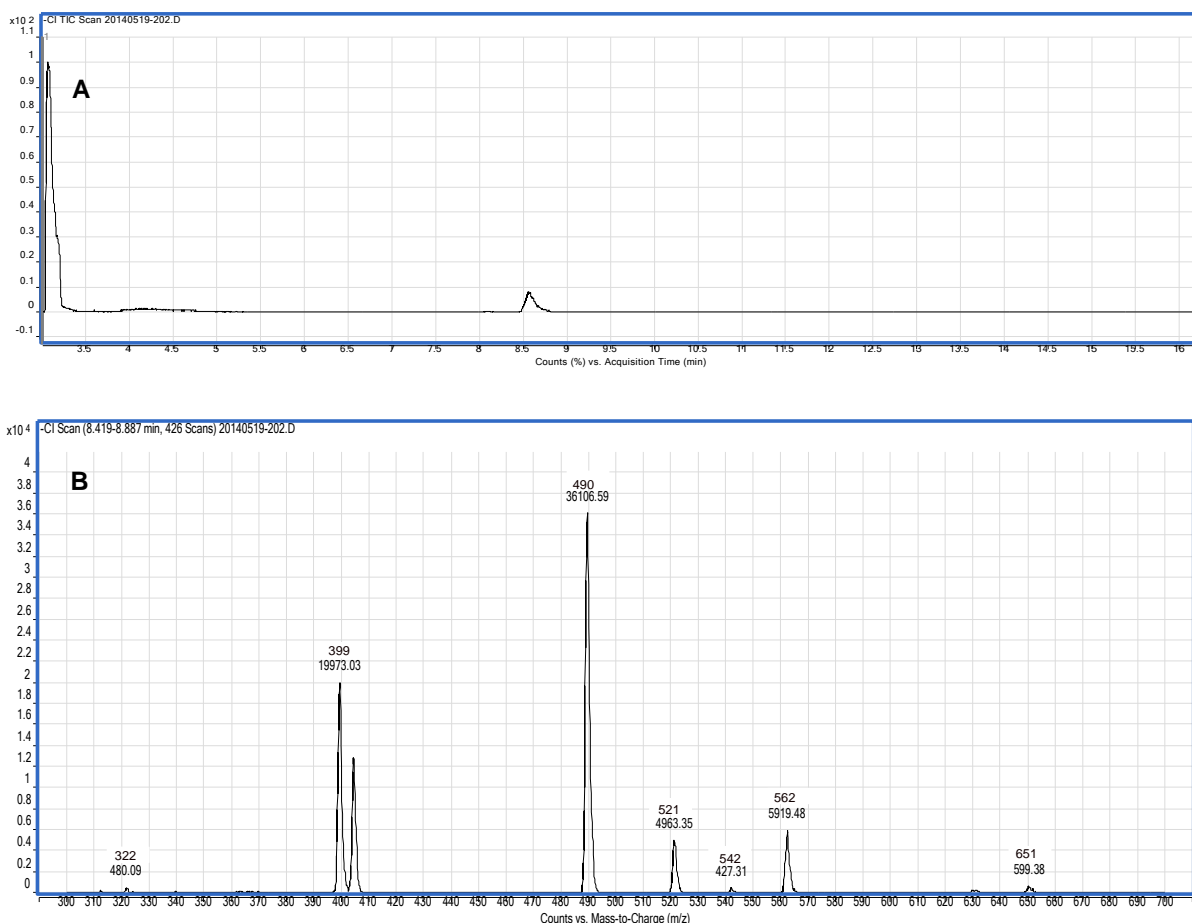


Figura 16: A. Perfil cromatográfico obtido após a injeção da 17OHPREG derivada com PFBHA e MSTFA empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 2 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 5. Espectros de massas da 17OHPREG referente ao pico em TR= 8,7 min.

No intuito de simplificar o preparo da amostra usando uma única etapa de derivatização que adicionalmente resultaria em maior sensibilidade devido à menor manipulação do analito e/ou maior estabilidade e/ou detectabilidade do derivado, buscou-se uma coluna com características químicas que resultassem em menor retentividade para os analitos estudados. Adicionalmente, buscou-se também colunas estáveis em temperaturas mais altas. A coluna capilar de sílica fundida DB-17HT (Agilent Technologies), composta por (50%-fenil-metilpolisiloxano), com dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,15 μm já foi utilizada em metodologias similares na

literatura (Chiaradia, Collins e Jardim, 2008; Macherone, 2012; Pereira e Aquino, 2000).

Enquanto a coluna DB-5MS é aplicável para analitos de baixa concentração, já que os picos obtidos são mais resolvidos e a separação produz relação sinal ruído mais baixos quando comparados a outras colunas, a coluna DB-17HT é mais indicada para análise de triglicérides e para que compostos de alta temperatura de ebulição sejam eluídos mais rapidamente.

De fato, a substituição da coluna permitiu a eluição e detecção dos dois derivados sem sililação (Figura 17). Para acelerar a eluição dos compostos, a rampa de temperatura foi alterada para atingir 340°C. A eluição de 17OHPREG também foi confirmada pela observação do derivado respectivo do isotópologo 17OHPREG- d_3 que será utilizado como padrão interno. Uma vez definida a coluna e as condições iniciais de análise, o foco voltou a ser o processo de preparo das amostra, visando este objetivo, passou-se a utilizar o protocolo 3 em amostras de soro, pois incluía etapas de lavagem para diminuição dos interferentes e a extração líquido-líquido com separação de fases por meio do congelamento em nitrogênio líquido.

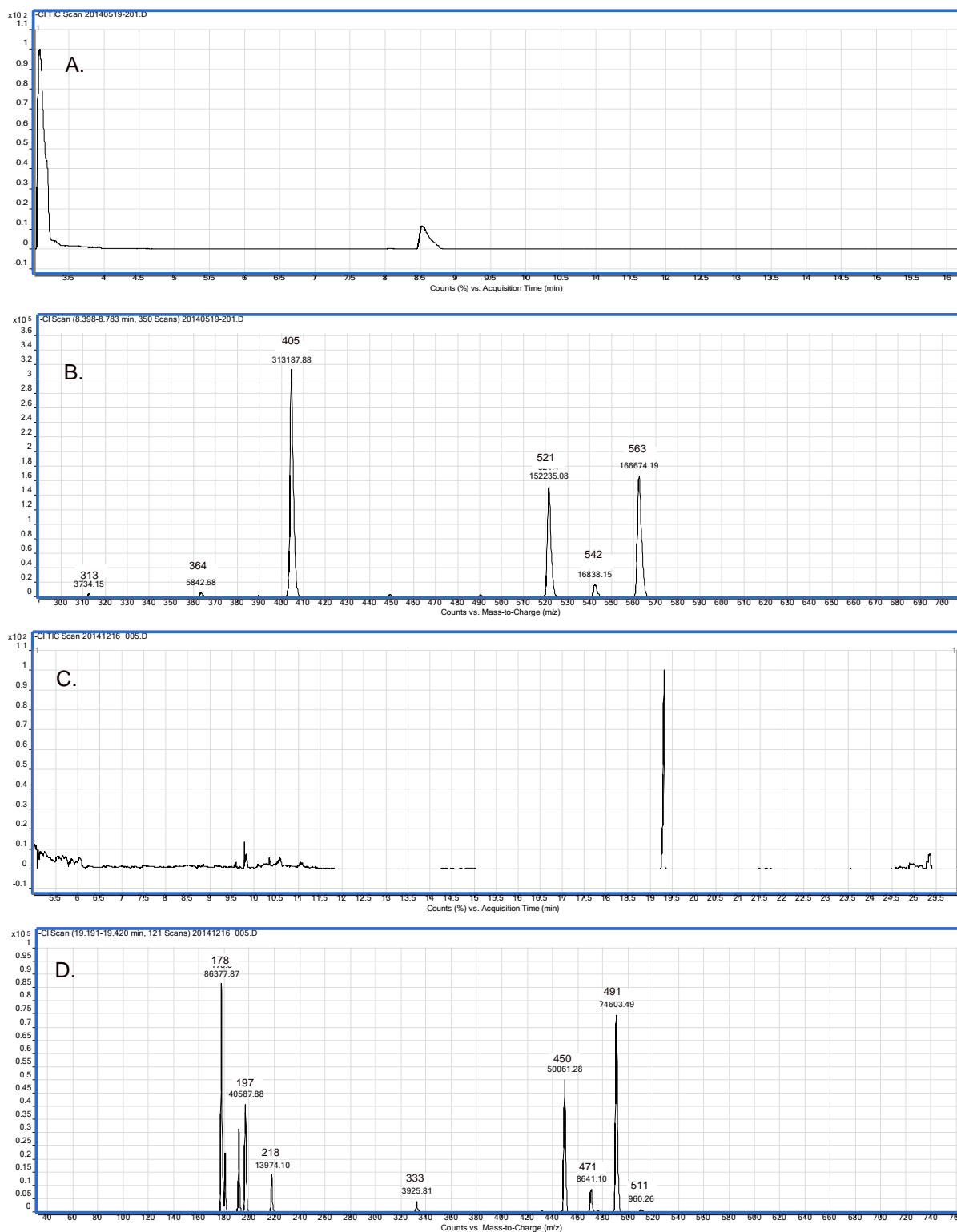


Figura 17: Comparação do perfil cromatográfico dos derivados resultantes da PREG com MSTFA-PFBHA (A e B) empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 2 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 5 e somente com PFBHA (C e D) obtido empregando método descrito no item 3.2.31 – protocolo de extração 3 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 6.

4.2 Desenvolvimento do método de detecção por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas em tandem

A partir dos dados de caracterização dos derivados descritos anteriormente foram realizados experimentos para a determinação dos melhores fragmentos e respectivas energias de colisão.

Após a identificação dos derivados por meio de análise por um único estágio de espectrometria de massas, passou-se à padronização das condições de análise por espectrometria de massas em *tandem*. O principal parâmetro a ser ajustado é a energia de colisão por meio da monitoração das intensidades dos íons produto.

O experimento consistiu em analisar a solução dos padrões no modo *fullscan* para determinar a m/z dos íons precursores e em seguida realizar um *fullscan* dos íons produtos em diferentes energias de colisão. Para isso, foi selecionado no espectro *fullscan* da PREG o íon precursor de m/z 491 que se refere, possivelmente, a perda de uma molécula de HF do derivado PREG-PFB (Hsu et al., 1999) e 450 (Figura 18). A análises de íons produto foram adquiridos em diferentes energias de colisão e os dois íons produtos mais abundantes foram selecionados para a construção das transições de massas a serem monitoradas por MRM (monitoramento de reações múltiplas).

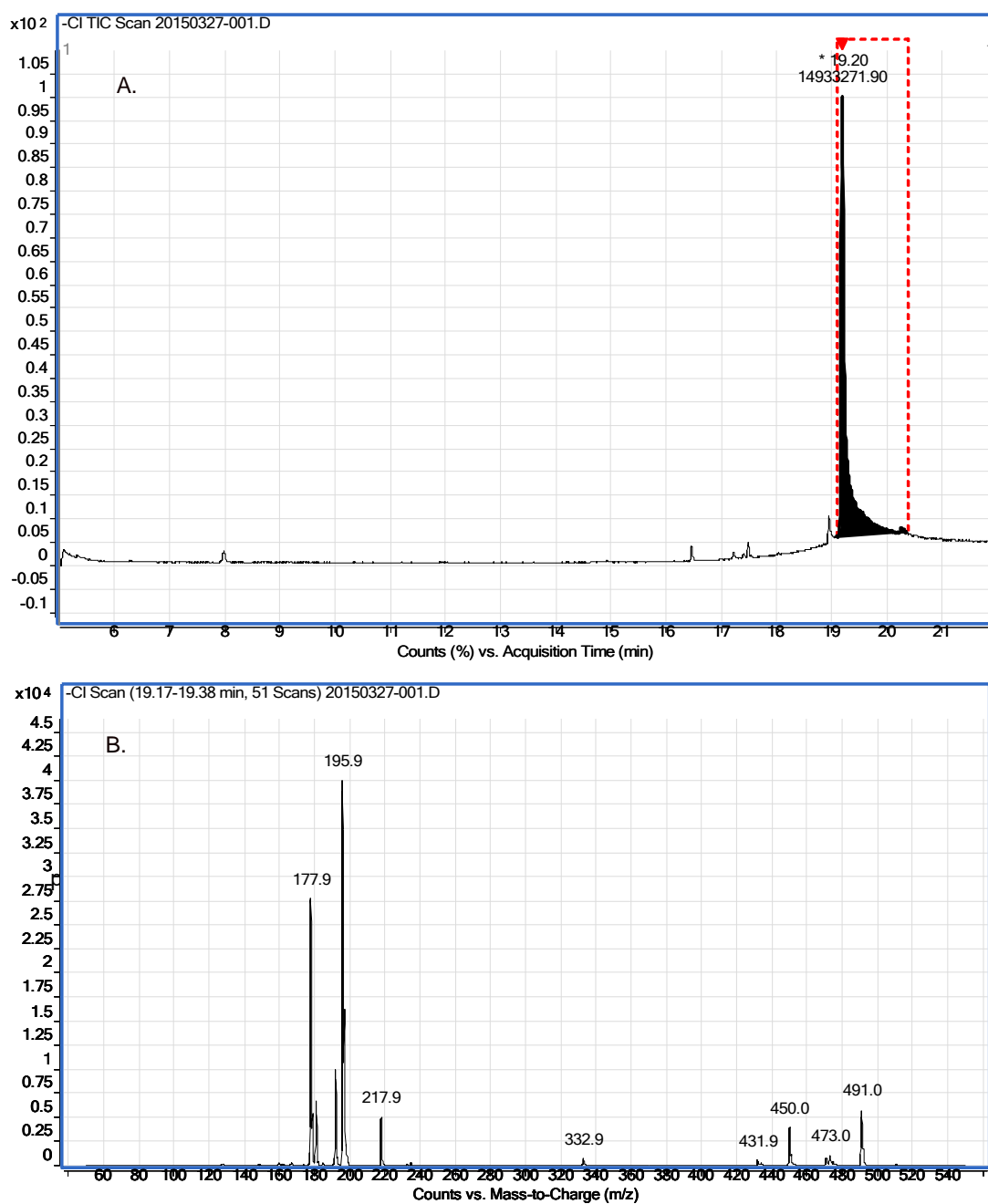


Figura 18: A. Cromatograma referente ao derivado PREG. B. *Fullscan* do pico obtido no TR = 19,20 do derivado PREG. Foram seleccionados os íons 491 e 450 para análise dos íons produtos. Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 1 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 6.

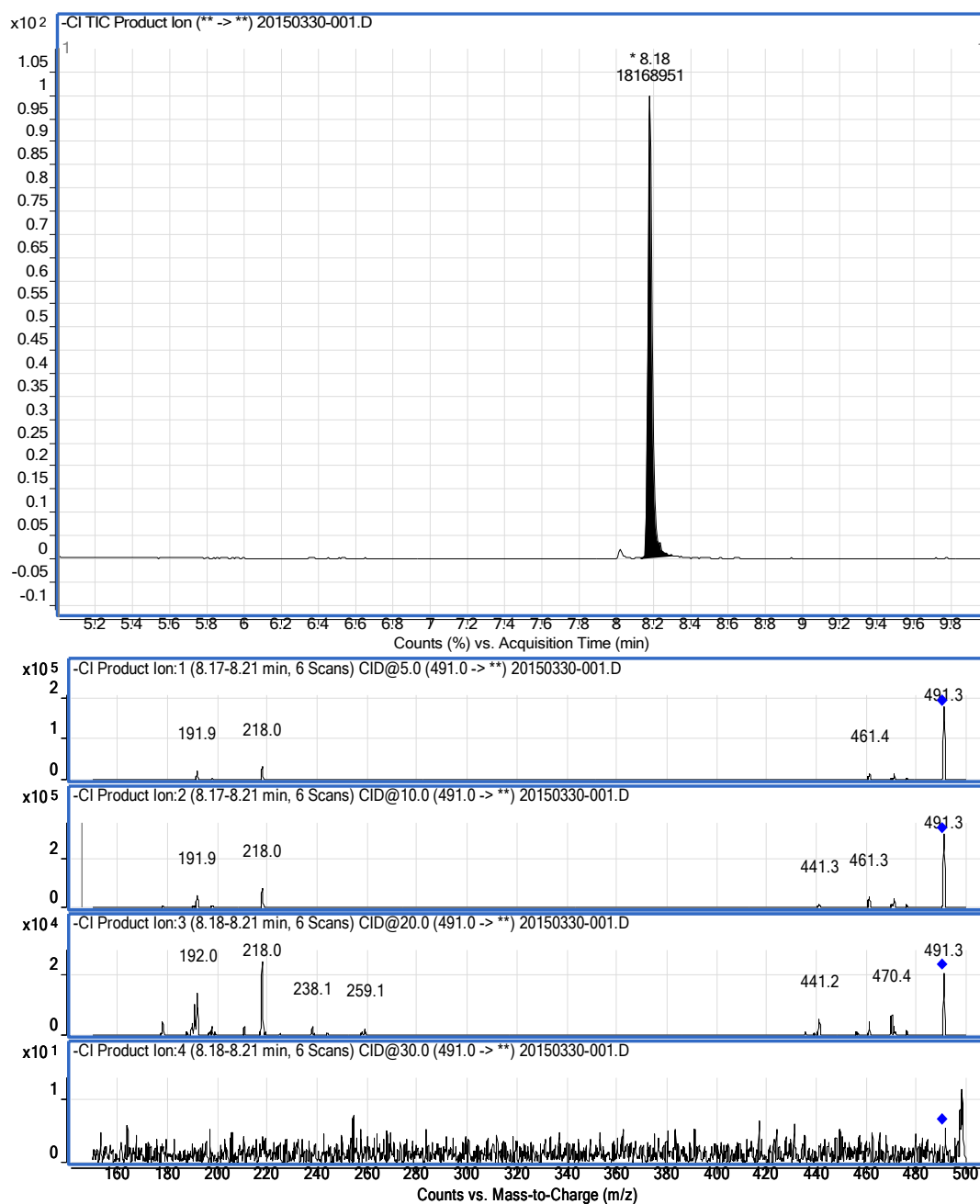


Figura 19: Análise dos íons produtos gerados pelo íon de m/z 491 associado ao derivado PREG-PFBHA. Foram analisadas as energias de colisão 5, 10, 20 e 30 V. Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 1 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 7.

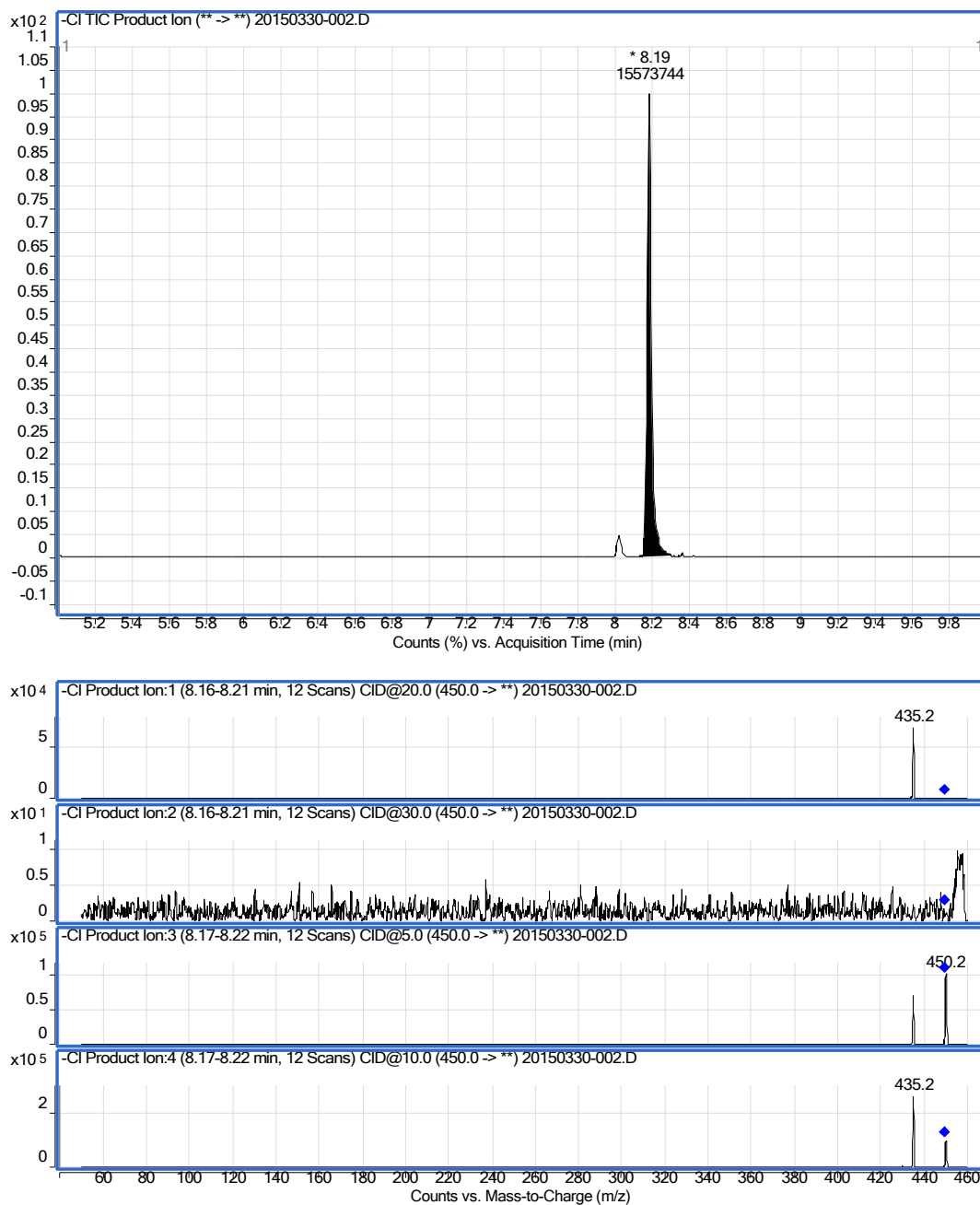


Figura 20: Análise dos íons produtos gerados pelo íon de m/z 450 associado ao derivado PREG-PFBHA. Foram analisadas as energias de colisão 5, 10, 20 e 30 V. Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 1 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 7.

A hidroxila presente na posição 17 da 17OHPREG reduziu a estabilidade do composto como anteriormente descrito no item 4.1 para LC-MS/MS. Na análise por ionização química no modo negativo não foi possível observar o íon molecular, a molécula desprotonada nem mesmo o íon resultante da perda de HF. Por meio da comparação do derivado 17OHPREG-PFB com seu respectivo isotópologo (17OHPREG- d_3 -PFB), verificou-se a eluição de picos cromatográficos a 20,3

minutos. Os espectros no modo *fullscan* apresentaram picos base a m/z 315 e 318 e menos intensos a m/z 345 e 348 (Figura 18 e Figura 19).

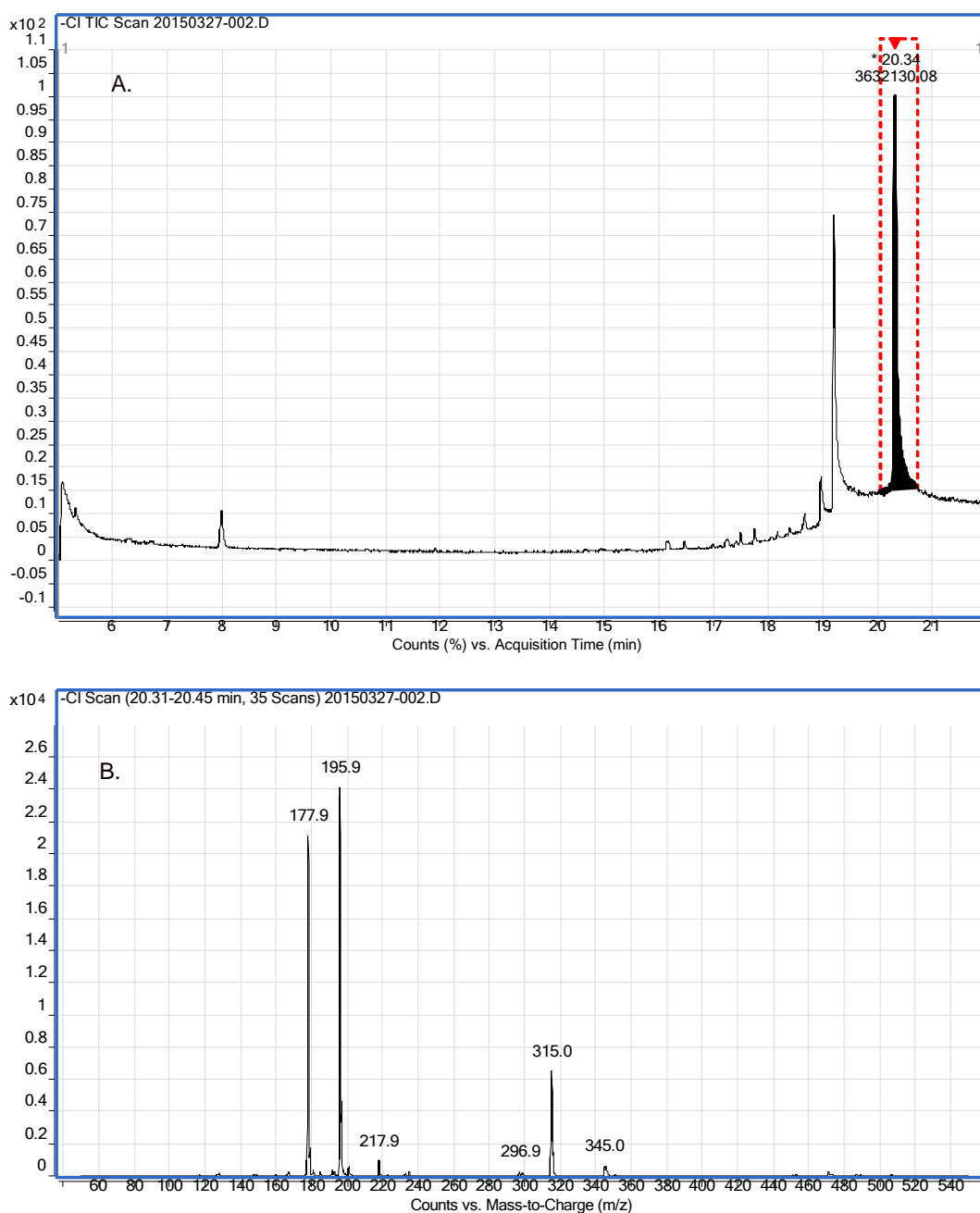


Figura 21: A. Cromatograma referente ao derivado 17OHPREG. B. *Fullscan* do pico obtido no TR = 20,34 do derivado 17OHPREG. Foram selecionados os íons 315 e 345 para análise dos íons produtos. Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 1 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 6.

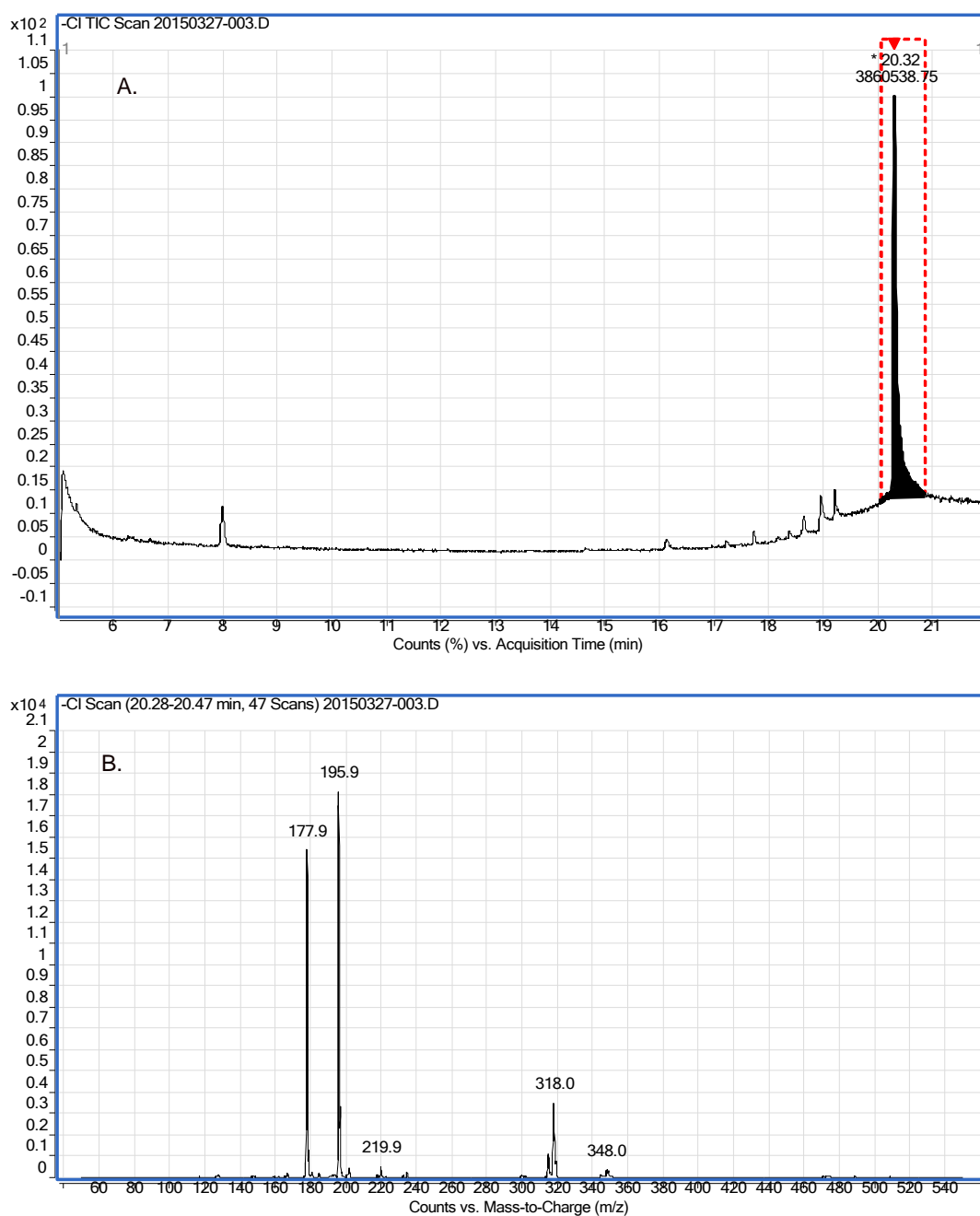


Figura 22: A. Cromatograma referente ao derivado 17OHPREG-d3. B. *Fullscan* do pico obtido no TR = 20,34 do derivado 17OHPREG-d3. Foram selecionados os íons 318 e 348 para análise dos íons produtos. Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 1 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 6.

Após a caracterização da molécula de 17OHPREG no modo *fullscan*, foram selecionados os íons de m/z 315 e 345 para a análise dos íons produtos. Os íons produtos gerados pelos precursores da molécula de 17OHPREG-*d3* com m/z 318 e 348 também foram analisados.

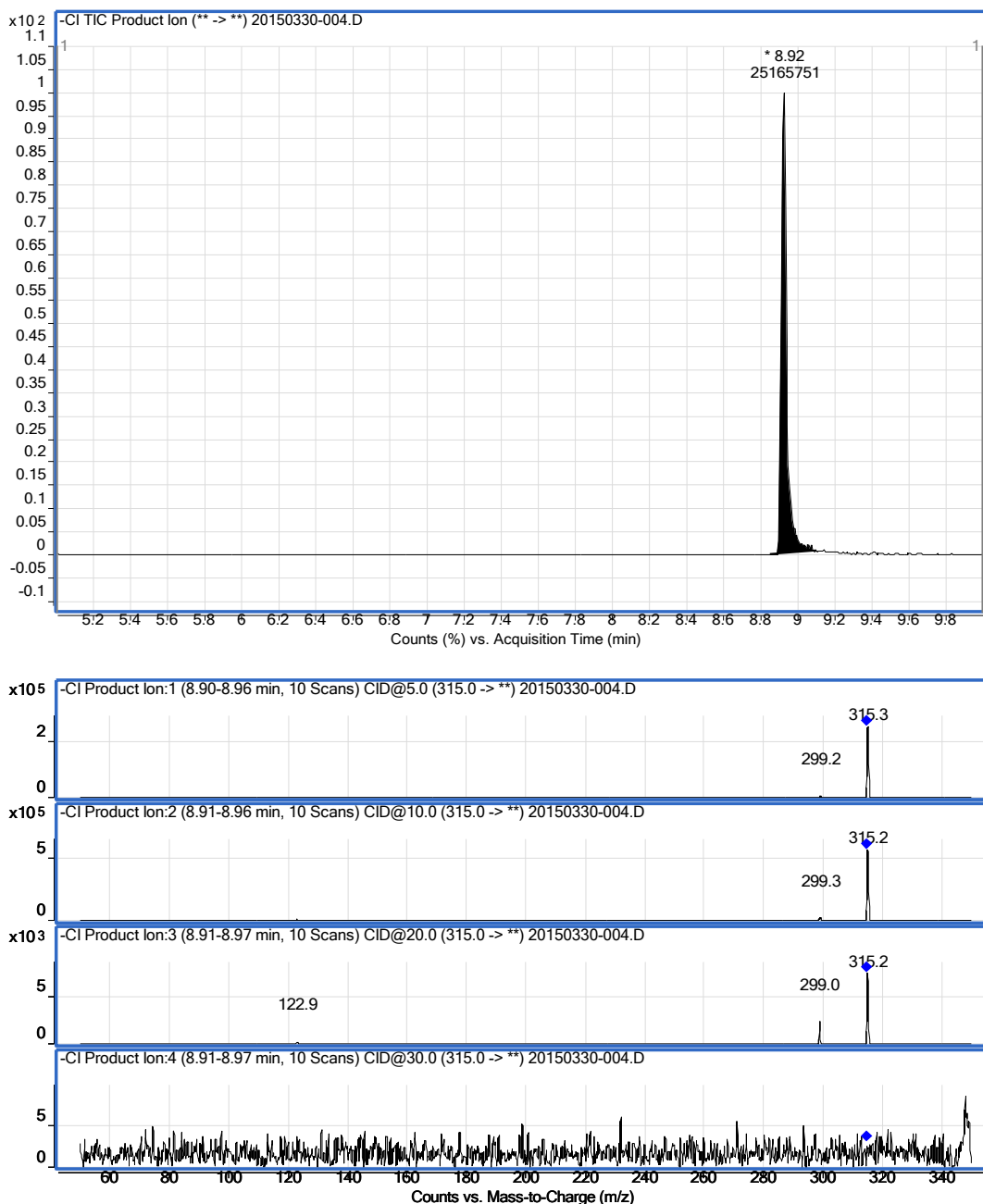


Figura 23: Análise dos íons produtos gerados pelo íon de m/z 315 associado ao derivado 17OHPREG-PFBHA. Foram analisadas as energias de colisão 5, 10, 20 e 30 V. Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 1 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 7.

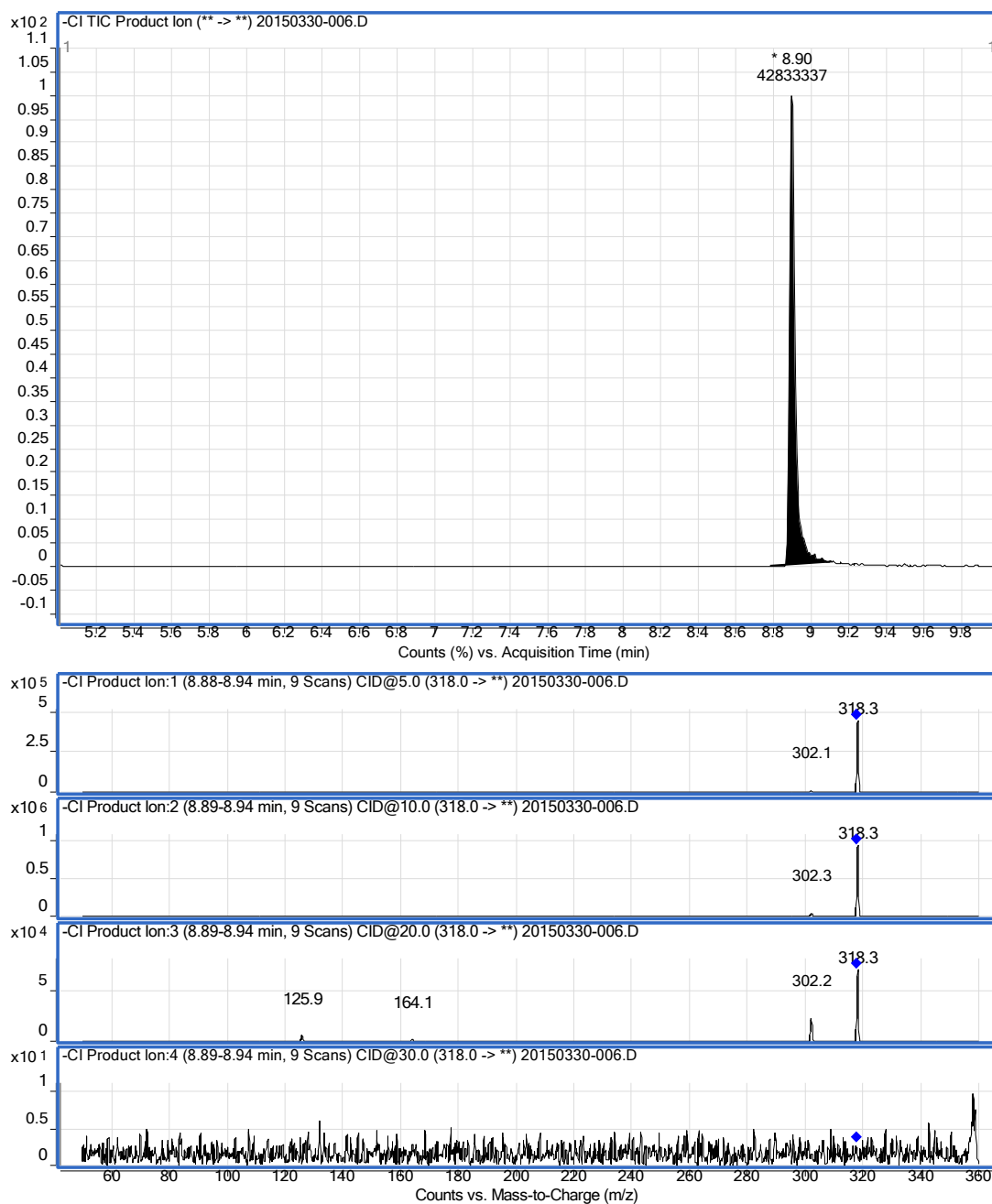


Figura 24: Análise dos íons produtos gerados pelo íon de m/z 318 associado ao derivado 17OHPREG-*d3*-PFBHA. Foram analisadas as energias de colisão 5, 10, 20 e 30 V. Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 1 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 7.

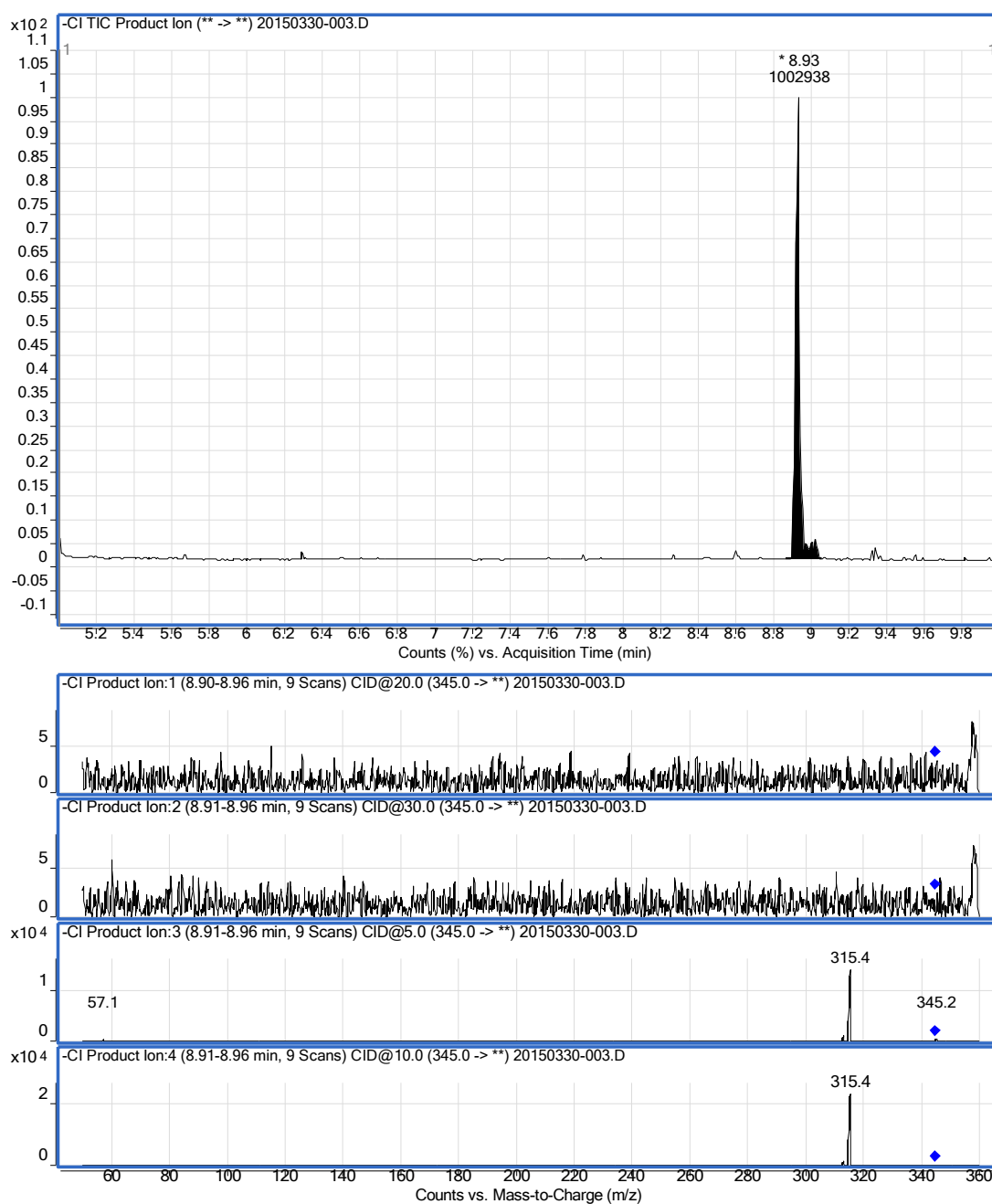


Figura 25: Análise dos íons produtos gerados pelo íon de m/z 345 associado ao derivado 17OHPREG-PFBHA. Foram analisadas as energias de colisão 5, 10, 20 e 30 V. Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 1 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 7.

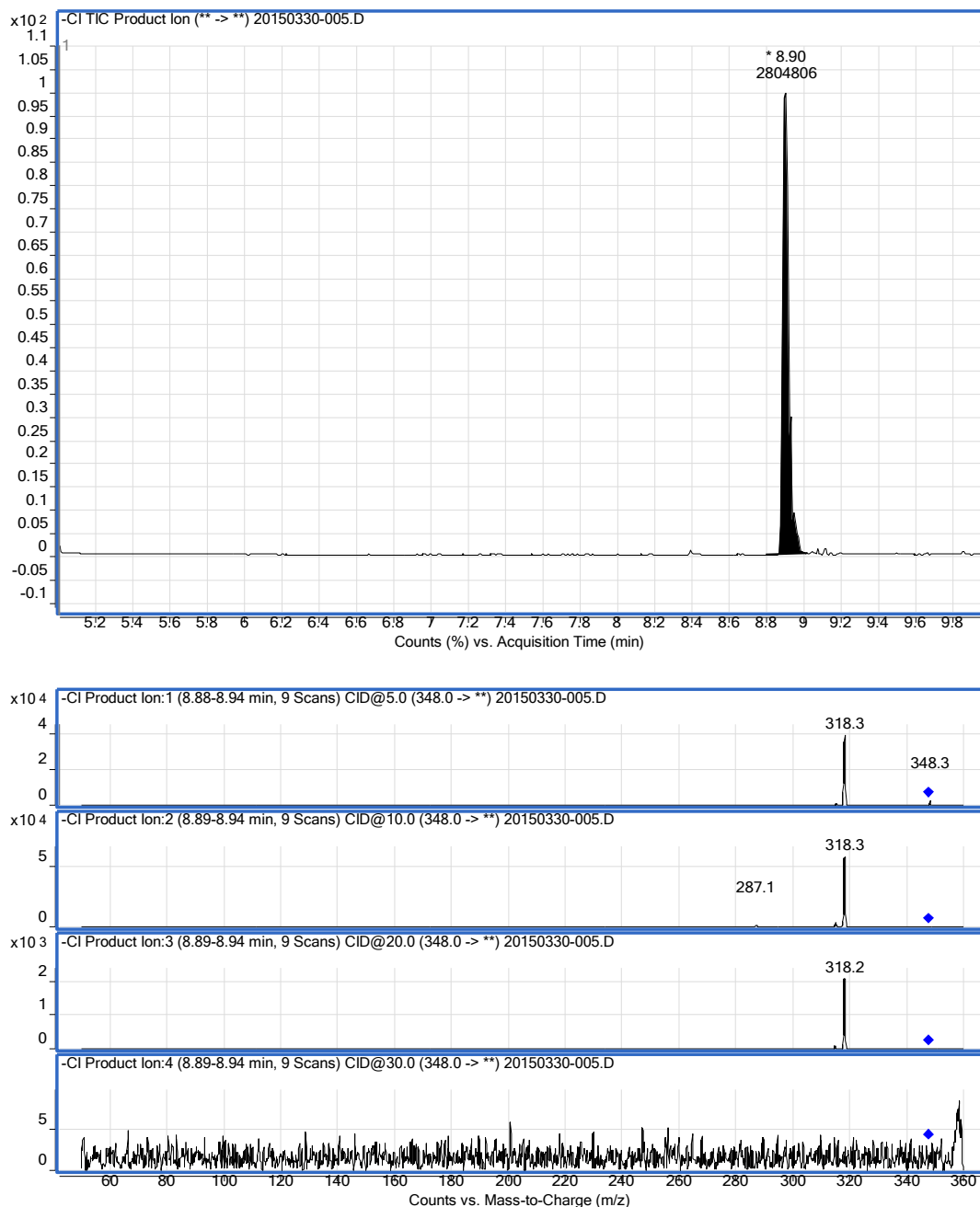


Figura 26: Análise dos íons produtos gerados pelo íon de m/z 348 associado ao derivado 17OHPREG-*d*3-PFBHA. Foram analisadas as energias de colisão 5, 10, 20 e 30 V. Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 1 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 7.

A diferença de 3 unidades de massa tanto na análise *fullscan* para seleção dos íons precursores quanto na análise dos íons produtos confirmam que esses íons são derivados, respectivamente, de 17OHPREG-PFB e 17OHPREG-*d*₃-PFB. Apesar da ionização química ser uma técnica de ionização “suave” a instabilidade dos íons dos derivados de 17OHPREG impediu a detecção dos íons moleculares ou moléculas desprotonadas, que seriam formadas respectivamente por captura de elétrons ou desprotonação. Tampouco os íons equivalentes ao observado para a PREG-PFB ([M-HF]⁻) foram observados. Os íons observados provavelmente resultam da perda do grupo PFB. A interpretação dos mecanismos envolvidos na geração dos íons supramencionados ainda não foi finalizada, mas a diferença de massas entre os dois isotopólogos indica que a estrutura ciclopentanoperidrofenantreno e a cadeia lateral C₂₀-C₂₁ foram preservadas. A informação mais relevante desse experimento é que esses íons são bons qualificadores para a detecção de 17OHPREG.

Para cada um dos analitos duas transições foram selecionadas (Tabela 12). Para PREG-PFB, foi selecionado o íon precursor de *m/z* 491 e os íons produtos com *m/z* 461 e 218. Para 17OHPREG-PFB, foi selecionado o íon precursor de *m/z* 314 e o íon produto de *m/z* 218 e finalmente para 17OHPREG-*d*₃-PFB, usada como padrão interno, o íon precursor *m/z* 317 e o íon produto de *m/z* 221.

Tabela 12: Seleção dos íons precursores e produtos para construção dos MRM e padronização das energias de colisão para os derivados com PFB oxima dos esteroides PREG, 17OHPREG e 17OHPREG-*d*₃.

Derivados PFB oxima	MS1	MS2	<i>Dwell time</i> (ms)	Energia de colisão (eV)	
PREG	491	218	75	22	Qualificador
PREG	450	435	75	15	Quantificador
PREG- ¹³ C ₂ , ² H ₂	452	437	75	15	
17OHPREG	345	315	75	6	Qualificador
17OHPREG	315	299	75	27	Quantificador
17OHPREG- ² H ₃	318	302	75	27	

Na Figura 27 estão representados os cromatogramas adquiridos no modo MRM.

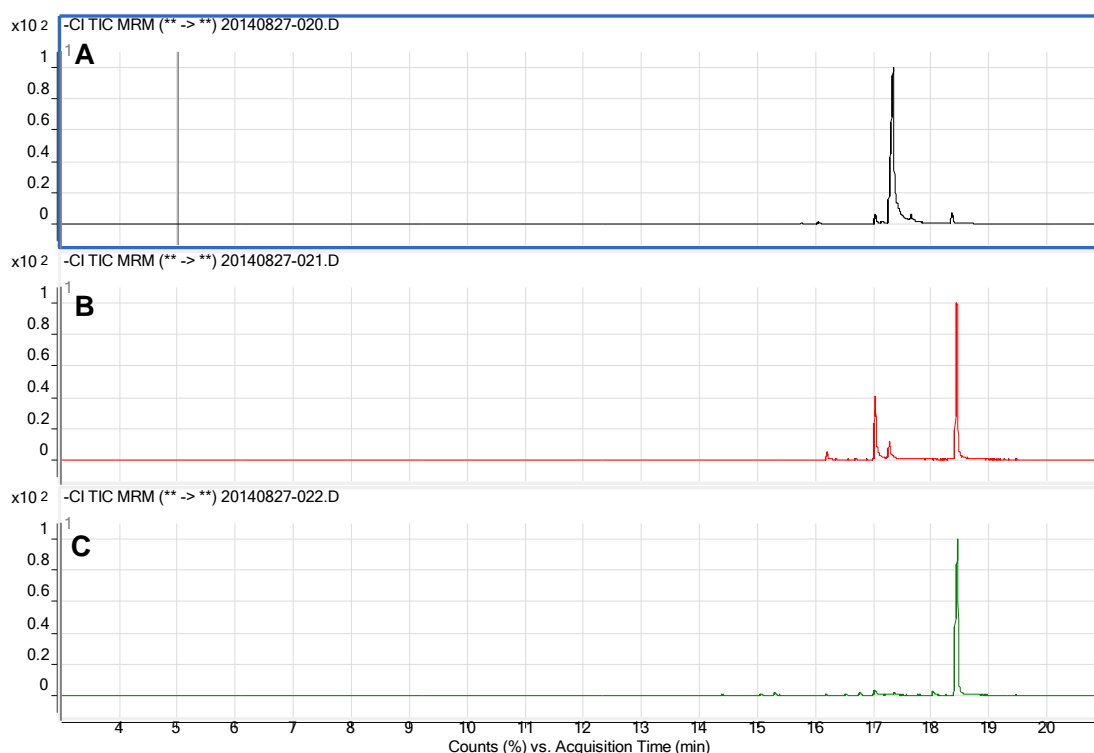


Figura 27: A. Perfil cromatográfico obtido com detecção por MRM dos derivados PREG-PFB; TR= 17,5 min (A), 17OHPREG-PFB; TR= 18,5 min (B) 17OHPREG-²H₃-PFB (C); TR= 18,5 min. Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 1 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 6.

Vários parâmetros instrumentais têm forte influência na geração dos íons na ionização química em modo negativo (Ong, Voon S.; Hites, 1986). A temperatura da fonte, por exemplo, afeta diretamente a proporção da fragmentação dos íons. Embora todos os componentes do cromatógrafo a gás operem em temperaturas elevadas, como o injetor a 280 °C, o forno atingindo a temperatura máxima de 340 °C e a linha de transferência a 300 °C, a fonte de íons é mantida a 150 °C. Os demais parâmetros precisam ser otimizados individualmente para obter a melhor resposta possível para os analitos. A otimização de múltiplos parâmetros instrumentais é uma necessidade atípica para a maioria dos operadores de GC-MS, visto que no trabalho em impacto de elétrons as condições instrumentais são fixas.

Um parâmetro com forte impacto na sensibilidade é a energia do elétron. Como apresentado na introdução, esse parâmetro modula a eficiência de geração de íons e o grau de fragmentação molecular. Normalmente, valores altos costumam ser mais vantajosos (Agilent Technologies, 2002).

Para otimização da energia do elétron **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, foram testadas energias entre -30 e -300 eV e comparada a área bruta detectada em quatro transições para PREG e três para 17OHPREG. A massa de analito injetada na coluna foi de 5 ng.

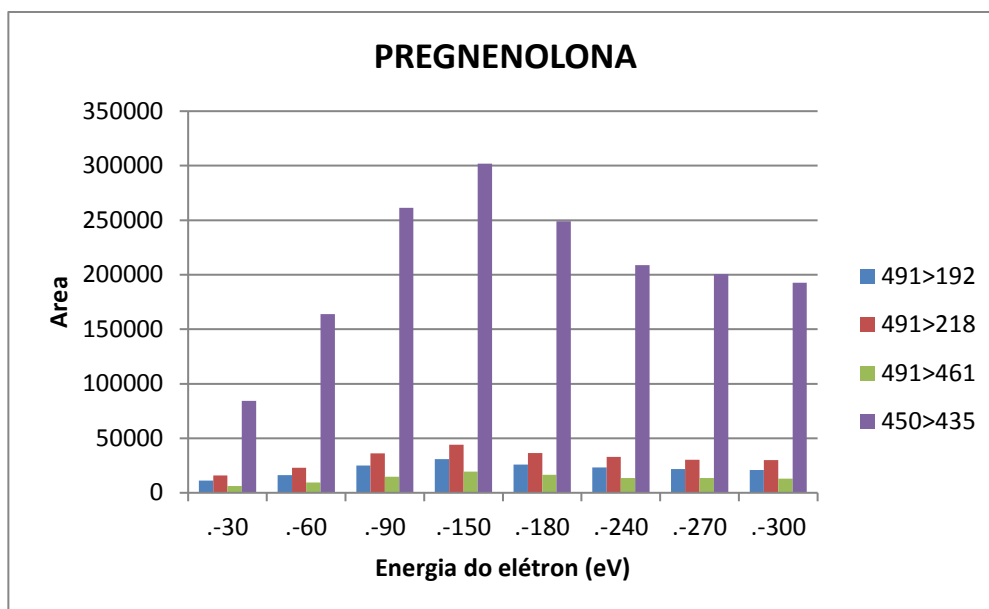


Figura 28: Relação entre a área bruta obtida com diferentes energias do elétron para PREG. Foram relacionadas as áreas de três íons produtos obtidos a partir do íon precursor de m/z 491 e um íon produto do íon precursor de m/z 450.

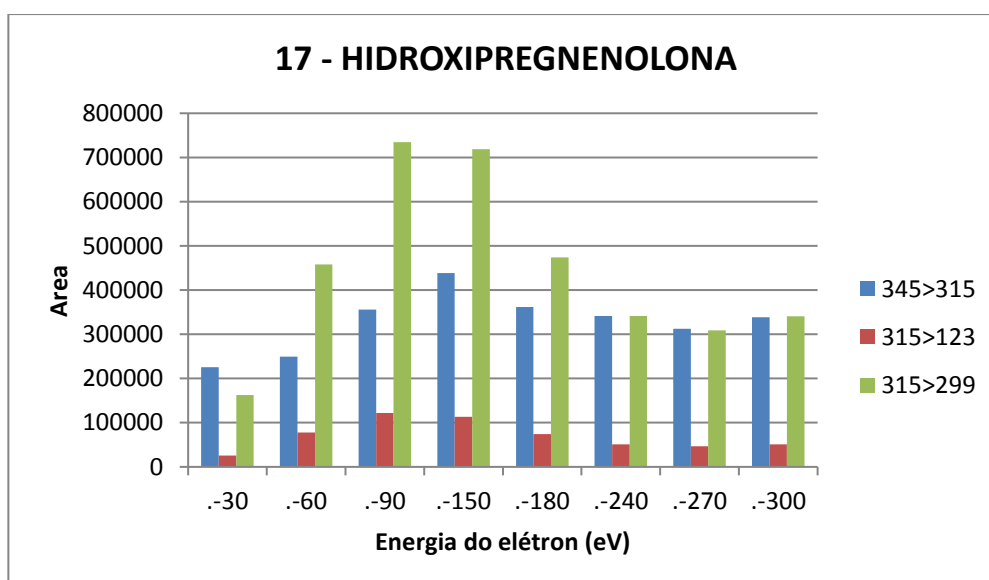


Figura 29: Relação entre a área bruta obtida com diferentes energias do elétron para 17OHPREG. Foram relacionadas as áreas de dois íons produtos obtidos a partir do íon precursor de m/z 315 e um íon produto do íon precursor de m/z 345.

Para o derivado de PREG, a energia de elétron que gerou íons mais abundantes foi a de -150 eV (Figura 28) e para a 17OHPREG foi a de -90 eV (Figura 29). Contudo, este parâmetro necessita ser compartilhado entre ambas as moléculas, portanto foi escolhida a energia de -150 eV. Como referência, o parâmetro padrão do equipamento e utilizado para afinação e calibração é de -240 eV, apenas esta modificação resultou em um aumento de 25% na área da PREG e de 133% na área da 17OHPREG.

O fluxo de metano que atua como gás reagente na fonte de ionização também foi avaliado (Figura 30). Tanto a área bruta da PREG quanto da 17OHPREG, foram maiores utilizando a configuração padrão do fabricante de 40 % do fluxo de 2 mL/min de metano para ser usado como gás reagente na fonte de ionização.

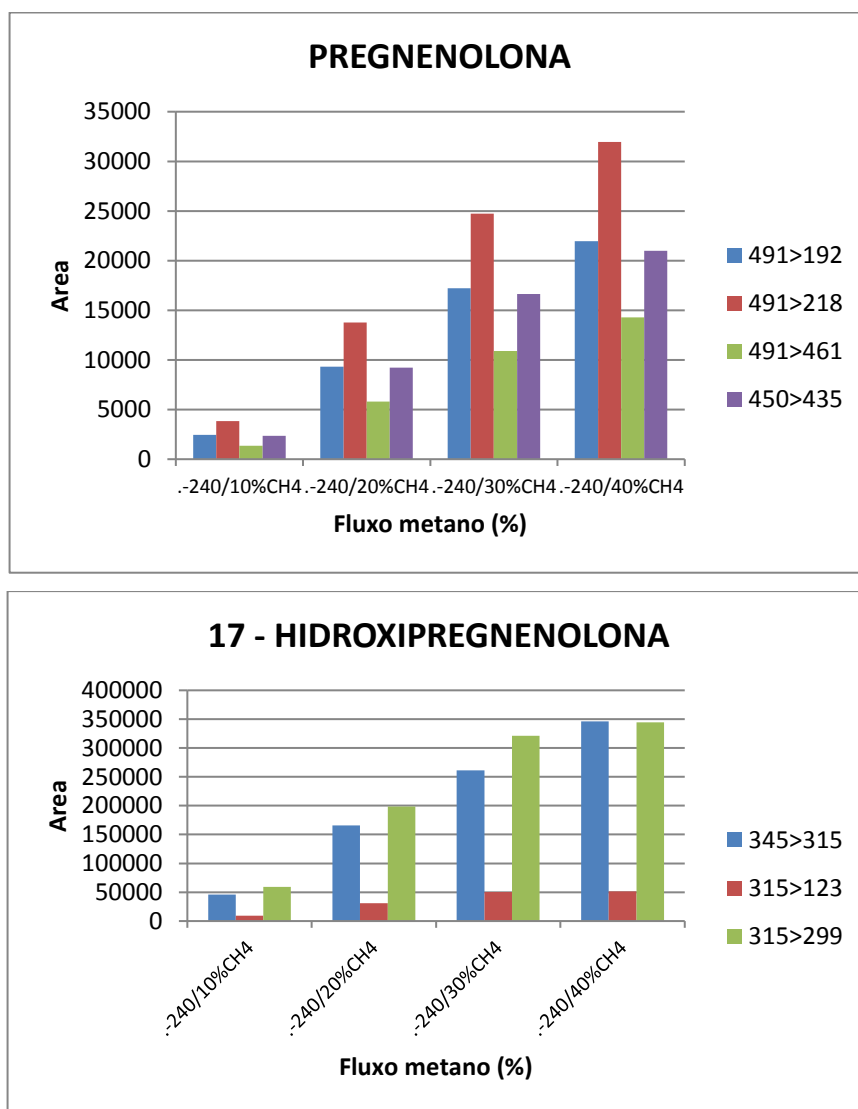


Figura 30: Abundância dos íons produtos em área bruta em relação a porcentagem do fluxo de metano utilizada na ionização. A energia de elétrons utilizada foi a referência do fabricante equivalente a -240 eV.

Na fonte de ionização por impacto de elétrons (EI), dois filamentos são localizados em lados opostos da parte externa da fonte. O filamento ativo carrega uma corrente de emissão alternada (AC) que pode ser ajustável. A corrente de emissão aquece o filamento que, em consequência, emite elétrons que ionizam as moléculas da amostra. Essa voltagem aplicada ao filamento determina a energia do elétron e na técnica de EI o padrão é a utilização de -70 eV (Agilent Technologies, 2013). Na fonte de ionização química (CI) há um filamento e um falso filamento que funciona como uma extensão do filamento (Agilent Technologies, 2013). A corrente de emissão produzida pelo filamento tem relação proporcional com a eficiência da geração dos íons, no entanto, correntes muito elevadas resultam em desgaste rápido do filamento. Foram avaliadas diferentes correntes de emissão para avaliar o valor ideal para PREG e 17OHPREG. O ganho em área bruta obtido otimizado a energia da corrente de emissão foi quatro vezes maior quando comparado com a energia padrão determinada pelo fabricante (30 uA).

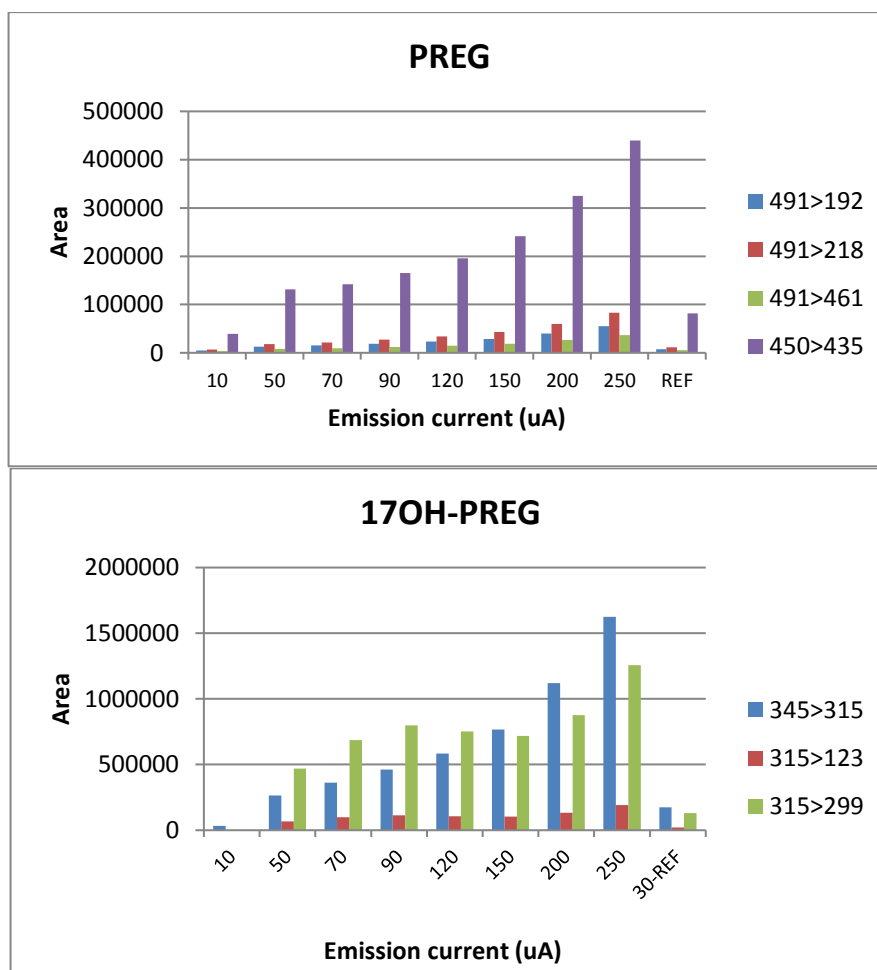


Figura 31: Abundância dos íons produzidos em área bruta em relação a diferentes energias de corrente de emissão.

4.3 Avaliação de protocolos de extração

4.3.1 Extração líquido-líquido

No desenvolvimento de um método analítico, os procedimentos de preparo da amostra são fundamentais para a obtenção de desempenho analítico desejável (Makin et al., 2010). A extração líquido/líquido (LLE) é uma das técnicas mais empregada nas análises de esteroides. Tal popularidade pode ser atribuída a características como rapidez, simplicidade e baixo custo aliada a boa eficiência promovendo redução da complexidade da amostra e do efeito da matriz com consequente ganho de sensibilidade (Kushnir et al., 2011).

A LLE explora as diferenças nas solubilidades do analito e seus interferentes. No caso dos esteroides, em decorrência das baixas polaridades são empregados solventes orgânicos apolares. Tipicamente é adicionado ao soro alguns volumes de solvente orgânico seguido de agitação vigorosa em agitador manual durante alguns minutos. A separação das fases pode ser acelerada por centrifugação resultando na formação de duas fases distintas que podem ser facilmente separadas após o congelamento da fase aquosa (Kushnir et al., 2011).

Para realizar o experimento, foi utilizado um *pool* de soro de 10 ng/mL de PREG e de 17OHPREG que foi submetido ao protocolo de extração 04. Foram testados quatro solventes orgânicos, éter metil tert-butilico (MTBE), hexano, acetato de etila e diclorometano. Cada solvente foi extraído em quadruplicata e sua média foi utilizada para análise dos dados.

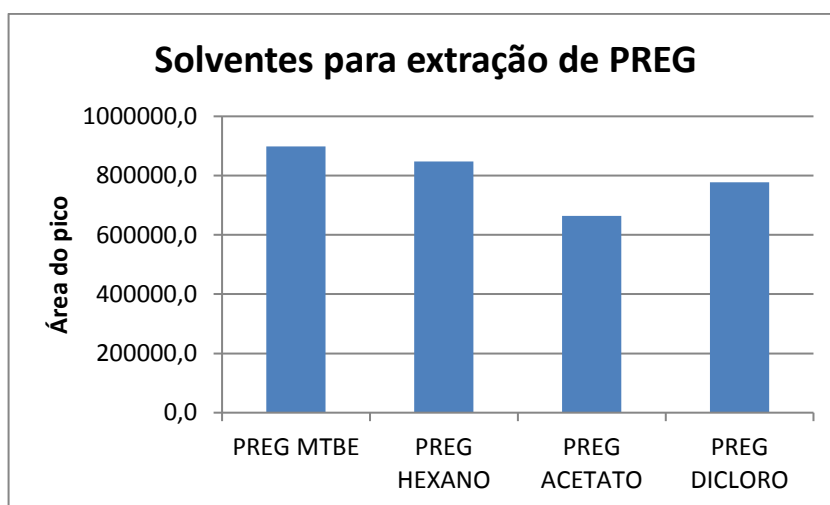


Figura 32: Média da área bruta dos picos cromatográficos obtido na extração da PREG com diferentes solventes orgânicos. Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 4 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 8.

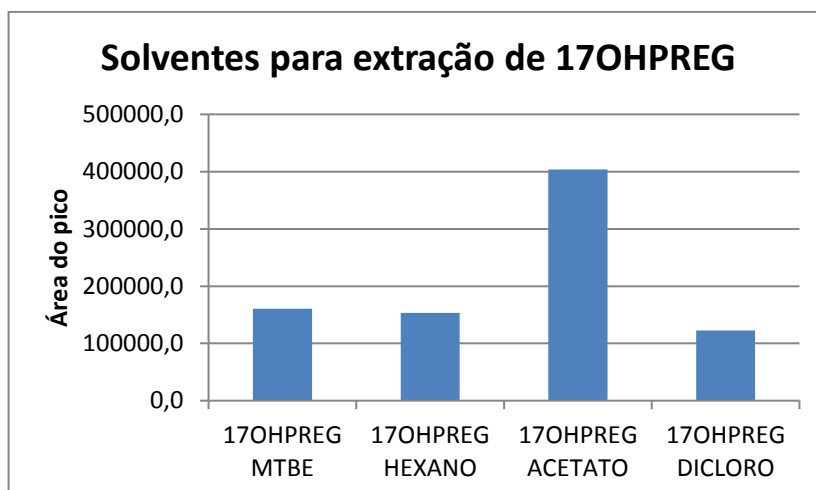


Figura 33: Média da área bruta dos picos cromatográficos obtido na extração da 17OHPREG com diferentes solventes orgânicos. Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 4 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 8.

Ao observar a Figura 32 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** que mostra a eficácia dos solventes na extração da PREG, nota-se que o solvente acetato de etila possui uma média de área bruta do pico cromatográfico ligeiramente menor quando comparados aos demais solventes. Porém, foi verificado que na extração da 17OHPREG o ganho na recuperação com acetato de etila é duas vezes maior quando comparada com os demais solventes (Figura 33). Adicionalmente, o acetato de etila foi o solvente que apresentou menor variabilidade como pode ser constatado na Figura 34.

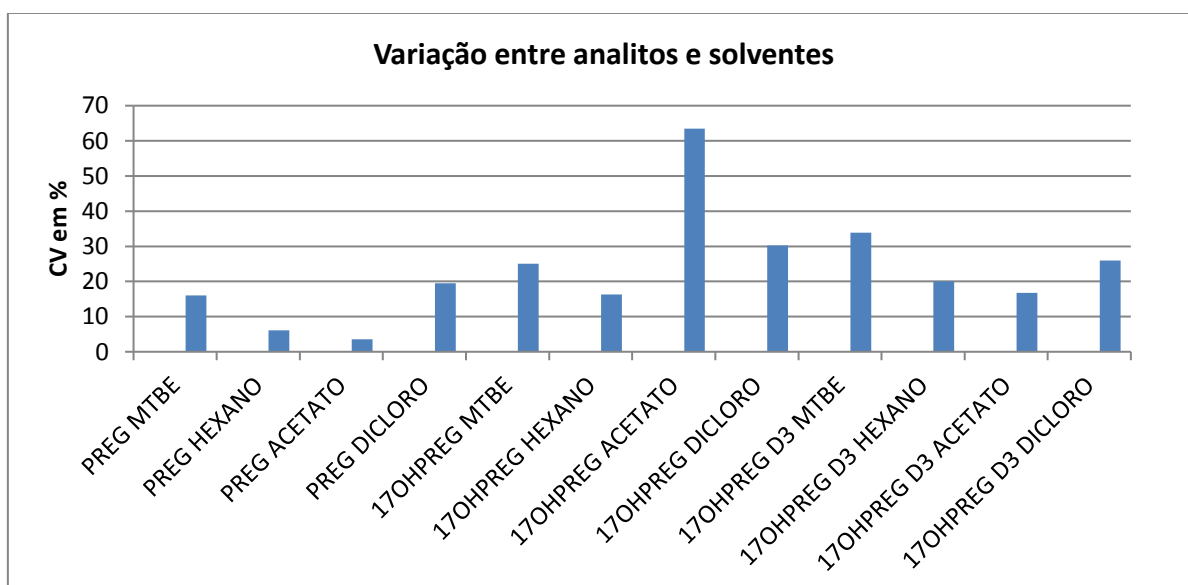


Figura 34: O gráfico mostra o coeficiente de variação em porcentagem (CV %) entre as quadruplicatas para cada solvente e analito. Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 4 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 8.

Apesar de ter sido desenvolvido um protocolo funcional para extração e derivatização dos analitos por extração líquido-líquido foi verificada uma baixa robustez do método que danificou três colunas cromatográficas. Assim, decidiu-se abandonar a extração líquido e desenvolver um novo protocolo que gerasse extratos mais limpos e idealmente sem o excesso do reagente derivatizante para preservar o sistema cromatográfico.

4.3.2 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE) é muito utilizada no preparo de amostras que serão analisadas por cromatografia, pois purifica as amostras e as fraciona se for necessário. O princípio da técnica é a afinidade do analito pela fase estacionária (sorbente), permitindo que várias lavagens sejam feitas para retirar todas as impurezas vindas matriz. Por fim, é utilizado um solvente para eluir o analito do sorbente (Biziuk, 2006).

Para o protocolo de extração, foi utilizada a coluna Strata X[®], fabricada pela Phenomenex. Neste cartucho de fase sólida, o suporte cromatográfico é um polímero funcionalizado que promove três mecanismos de retenção: interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e interações pi-pi.

Como pode ser verificado nas Figura 35 e Figura 36, metanol 100% não era suficiente para eluir completamente os analitos (não derivatizados), dessa forma optou-se por efetuar a eluição com uma mistura de acetonitrila e MTBE.

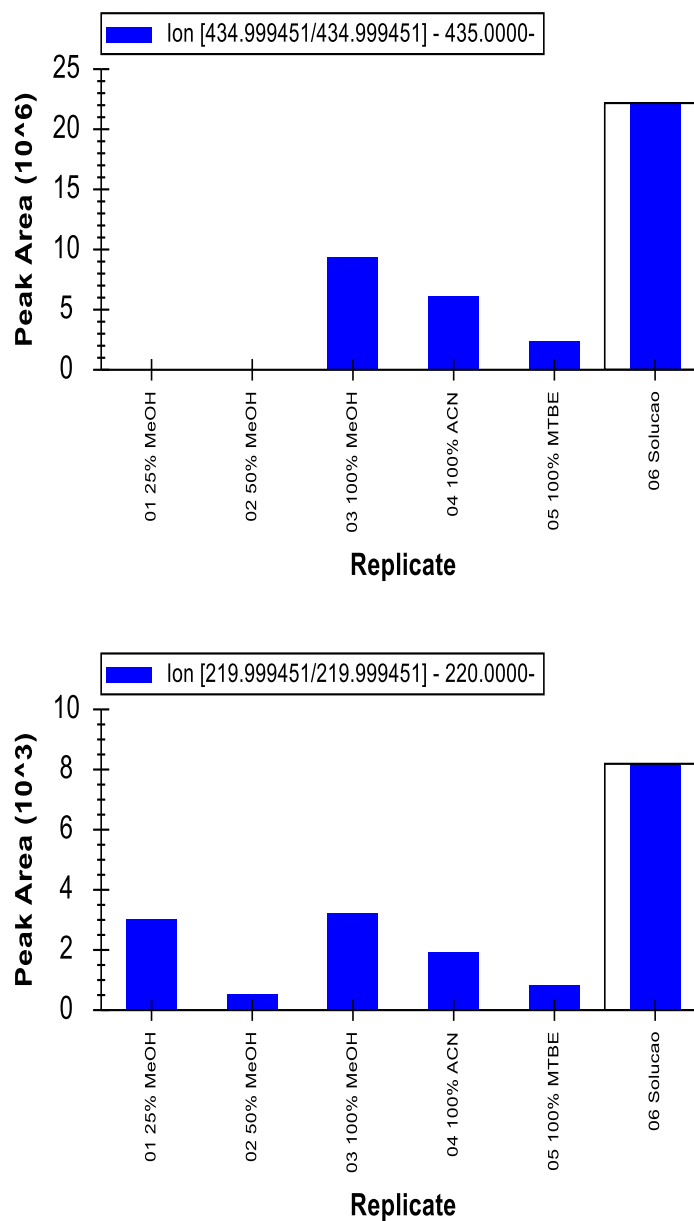


Figura 35: Gráfico mostra as áreas obtidas para os íons de PREG e PREG- c_2,d_2 , respectivamente, eluídas com solventes orgânicos em diferentes proporções. A barra denominada solução, é uma eluição dupla realizada com ACN e MTBE. Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 5 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 9.

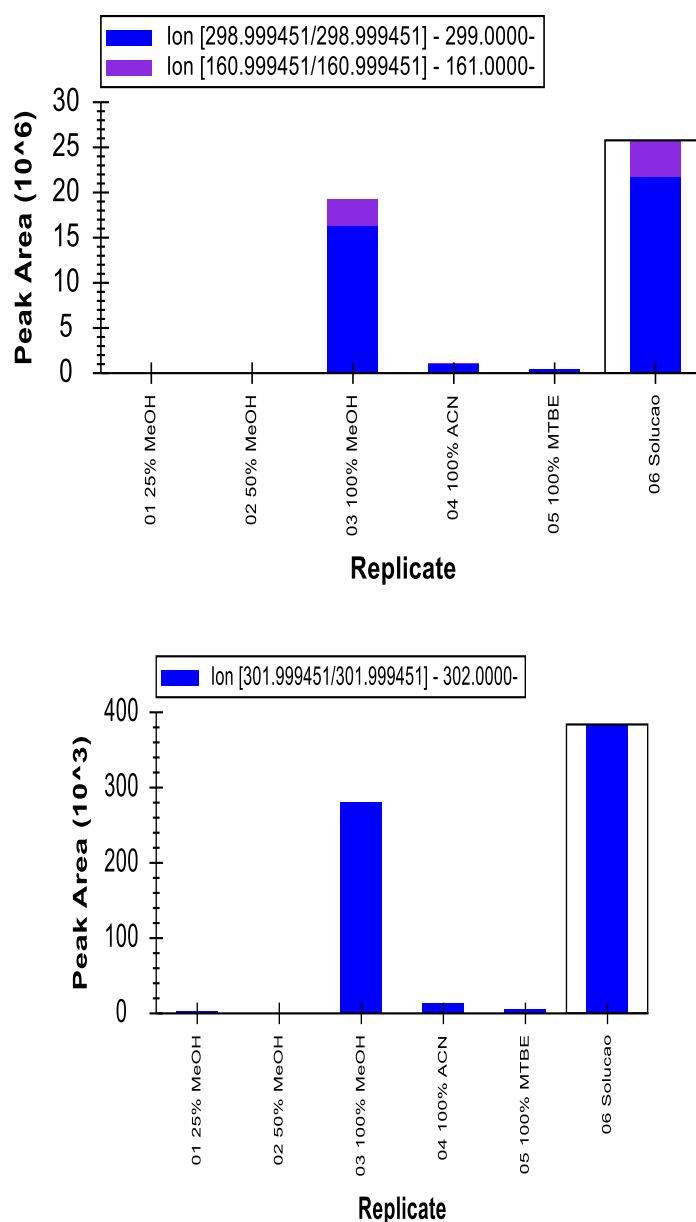


Figura 36: Gráfico mostra as áreas obtidas para os íons de 17OHPREG e 17OHPREG- d_3 , respectivamente, eluídas com solventes orgânicos em diferentes proporções. A barra denominada solução, é uma eluição dupla realizada com ACN e MTBE. Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 5 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 9.

Como a remoção do derivatizante seria desejável para preservar a coluna cromatográfica e reduzir o ruído químico, decidimos testar a derivatização na própria coluna utilizando a retenção cromatográfica para imobilizar os analitos. Como os derivados seriam ainda mais hidrofóbicos em relação aos analitos e ao reagente de derivatização haveria a possibilidade de remover a PFBHA com etapas adicionais de lavagens.

O procedimento foi bem-sucedido logo na primeira tentativa. Assim, após a aplicação das amostras no cartucho de SPE e subsequentes lavagens para retirada da matriz, foi realizada a derivatização dos analitos "in situ". Para isso, uma solução do derivatizante em tampão fosfato foi aplicada no cartucho vedado e deixado em incubação durante 24 h em temperatura ambiente.

Essa técnica permitiu a redução de procedimentos na extração e se mostrou bastante eficiente. A técnica apresenta várias vantagens com relação a micro extração em fase sólida (SPME) onde a fibra inserida na amostra para extração é pré-saturada com derivatizante, fazendo com que extração e derivatização ocorram simultaneamente (Bao et al., 1998; Costa-Barbosa et al., 2010; Iglesias, Gallardo e Medina, 2010; Saison et al., 2009). No protocolo desenvolvido, parte dos interferentes são eliminados antes dos analitos receberem o derivatizante. Dessa forma, o número de compostos convertidos a derivados PFB é menor o que deve resultar em menor interferência e conseqüentemente maior sensibilidade. Nosso protocolo, adicionalmente permite a remoção do excesso de derivatizante evitando a sobrecarga da coluna e geração de ruído químico. Além disso, o protocolo foi adaptado para microplacas podendo ser totalmente automatizado em plataformas de alta produtividade. Não foi localizado na literatura científica um método semelhante.

Após a otimização de todos os parâmetros supra-mencionados, o método cromatográfico foi encurtado a 10 minutos seguindo a programação indicada no Tabela 10. Um cromatograma típico está apresentado na Figura 37.

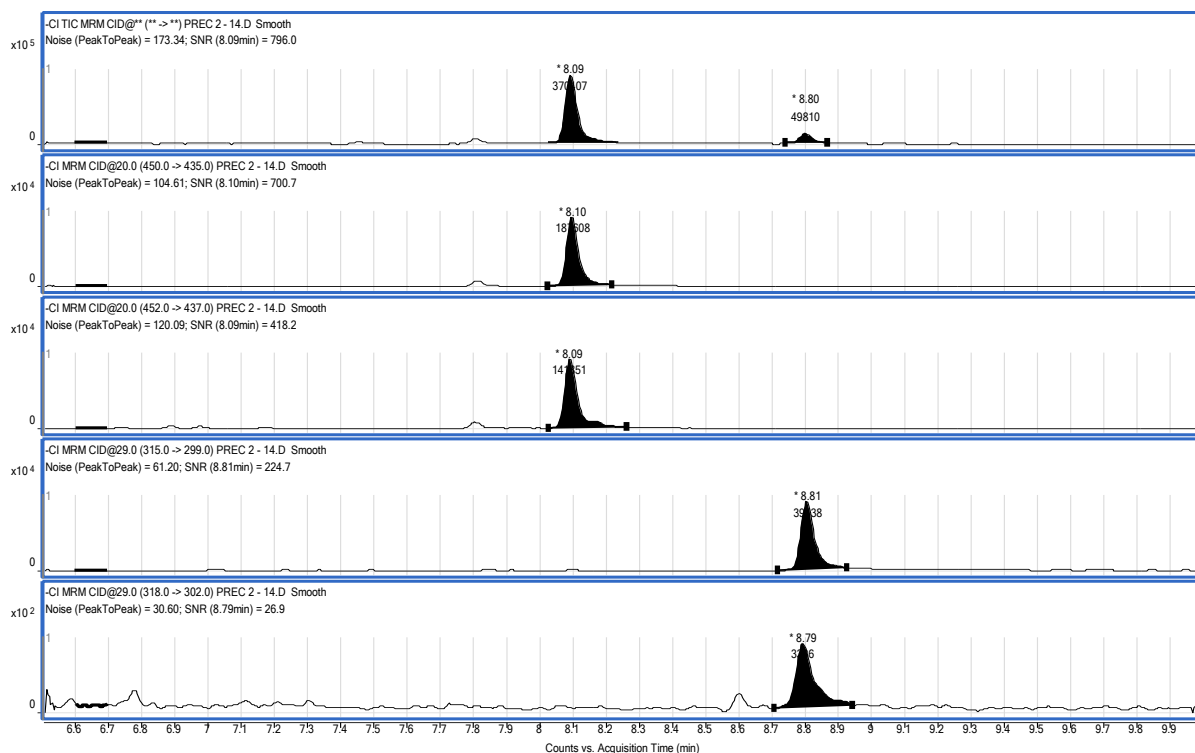


Figura 37: Cromatograma do método final indicando as transições quantitativas dos dois analitos e seus respectivos padrões internos isotópicos (450>435, PREG; 452>437, PREG-¹³C₂, ²H₂; 315>299, 17OHPREG; 318>302, 17OHPREG-²H₃). Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 6 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 10.

4.4 Dados preliminares da validação bioanalítica

Nessa fase da validação analítica foram utilizados exclusivamente *pools* de soro (amostras totalmente descaracterizadas) acrescidas dos analitos por *spiking*.

4.4.1 Calibração e linearidade

Linearidade é a capacidade de um analito manter uma proporcionalidade do sinal produzido em relação a uma concentração em um intervalo analítico (Huber, 2007). A inclinação da reta está diretamente relacionada com a sensibilidade. Um método sensível é aquele que gera grandes variações de resposta em função de pequenas variações na concentração do analito, ou seja, maior inclinação (Instituto Nacional de Metrologia, 2010). Na avaliação da linearidade, devem ser apresentados gráfico de dispersão para avaliação visual da linearidade, e os coeficientes linear, angular e de correlação (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, 2016).

A PREG se mostrou linear no intervalo entre 125 e 2100 ng/dL, com um coeficiente de correlação de 0,99 (Figura 38). A 17OHPREG apresentou linearidade em um intervalo mais amplo (50 e 2000 ng/dL), com um coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,99 (Figura 39). Os experimentos de linearidade são preliminares pois foram realizados em um único dia.

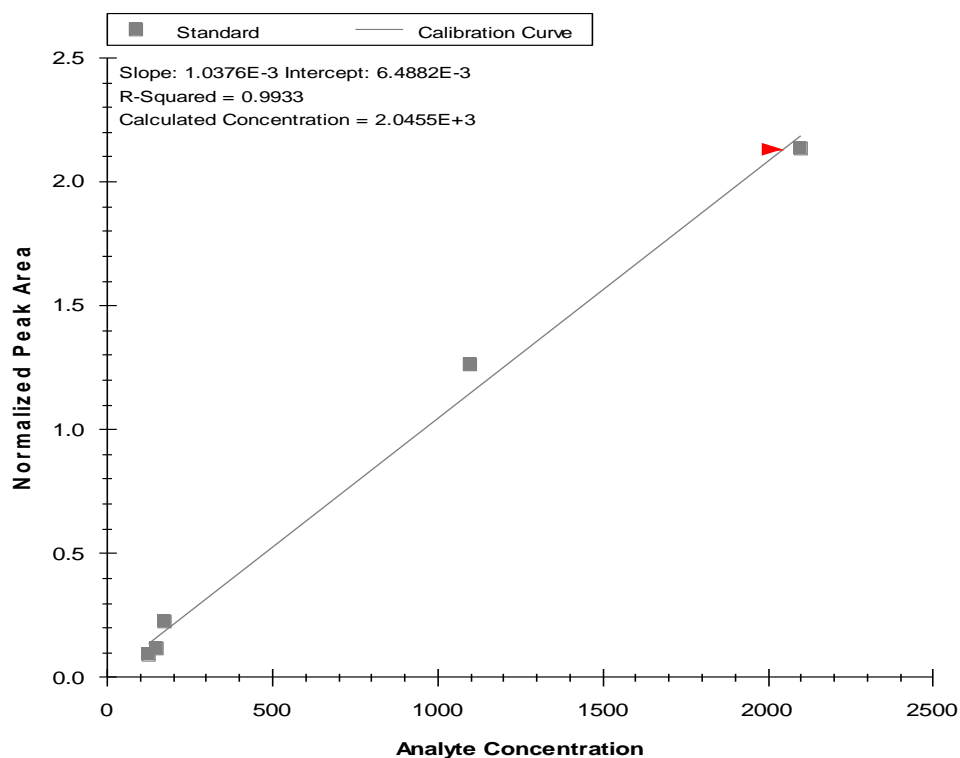


Figura 38: Curva de calibração utilizada para quantificar amostras de PREG.

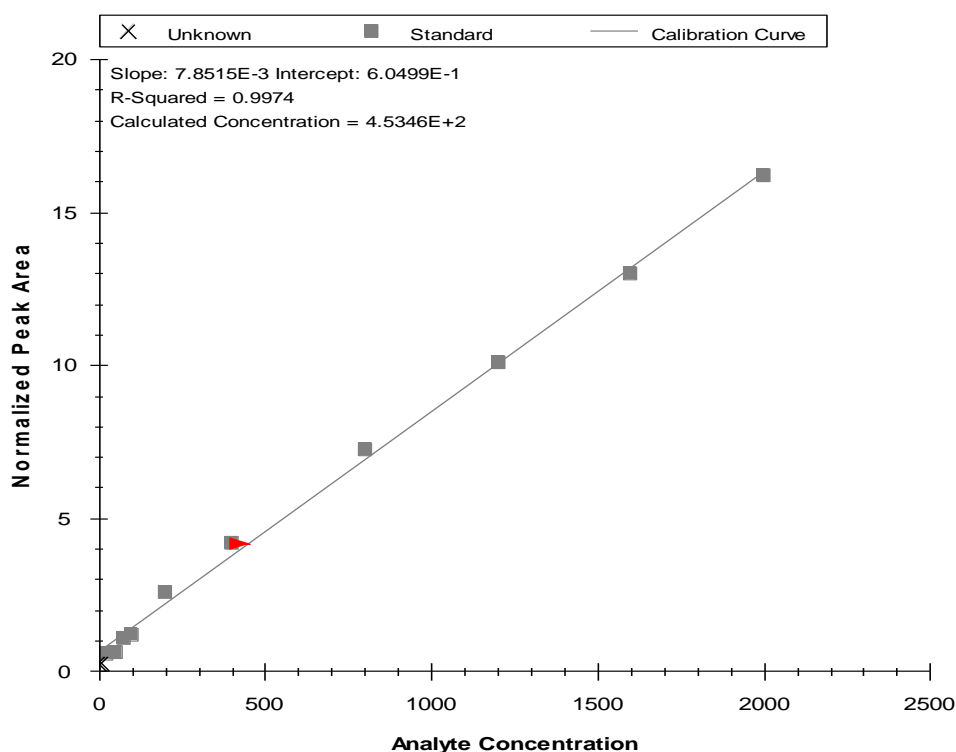


Figura 39: Linearidade obtida para 17OHPREG.

Ao longo do desenvolvimento, tudo indicava que a PREG era um analito mais simples de quantificar quando comparado com a 17OHPREG, pois as relações sinal/ruído são maiores para PREG, além de apresentar um íon molecular com pouca fragmentação na fonte e não necessitar de temperaturas tão altas para eluição na coluna. Porém, neste experimento preliminar constatamos maior dificuldade para quantificá-la em amostras biológicas.

4.4.2 Precisão

O termo precisão refere-se a capacidade do método de reproduzir um mesmo resultado com pouca variação entre os dados (Mendes, 2010). A validação da precisão é realizada analisando replicatas de uma mesma amostra ao longo do tempo, por exemplo, durante dez dias (Edition e Rhoads, 1983; Mendes, 2010). Geralmente são utilizados de dois a três níveis de concentração para a determinação da precisão. As concentrações dos níveis devem ser escolhidas baseadas nos pontos críticos para a decisão médica. A quantidade de níveis testadas depende dos pontos de decisão médica (Westgard). A precisão é um parâmetro continuamente avaliada em um

método em produção por meio da monitoração de controles internos de qualidade (Mendes, 2010).

O experimento preliminar indicou imprecisões mais altas para a PREG, porém inferiores a 20% (Tabela 13). No entanto, analisando os valores de referência para a PREG nota-se que uma variação de 18 %, não teria impacto no diagnóstico.

Tabela 13: Resultados de precisão obtidos para PREG.

	PREC 1	PREC 2	PREC 3
n	7	7	7
MEDIA	239,2	833,9	378,0
DESVPAD	34,9	39,1	68,0
CV	14,6	4,7	18,0

Os dados preliminares de validação da 17OHPREG apontam para um desempenho analítico superior desse analito. Os coeficientes de variação para as concentrações baixa, média e alta foram, respectivamente, 7,3, 3,4 e 10,6 % (Tabela 14).

Tabela 14: Resultados de precisão obtidos para 17OHPREG

	PREC 1	PREC 2	PREC 3
N	4	5	4
MÉDIA	88,4	298,1	1375,3
DESVPAD	6,4	10,1	146,2
CV (%)	7,3	3,4	10,6

4.4.3 Sensibilidade

Uma das formas de avaliar a sensibilidade de um método é por meio da determinação do limite de detecção (LOD) que corresponde à menor concentração de um analito que pode ser diferenciado de zero (Thompson, Michael, Ellison, Stephen L. R., Wood, 2002). No caso dos métodos cromatográficos, isso pode ser determinado por meio da relação sinal/ruído.

As avaliações preliminares da PREG e 17OHPREG indicaram LODs, respectivamente, de 12 e 45 ng/dL (Figura 40 e Figura 41). No caso específico da avaliação da atividade da enzima 3 β -HSD, valores baixos não são clinicamente relevantes para o diagnóstico visto que as deficiências resultaram em grande elevação

nas concentrações de 17OHPREG. Limites de detecção menores poderão ser obtidos ressuspensando os extratos em volumes menores de dodecano.

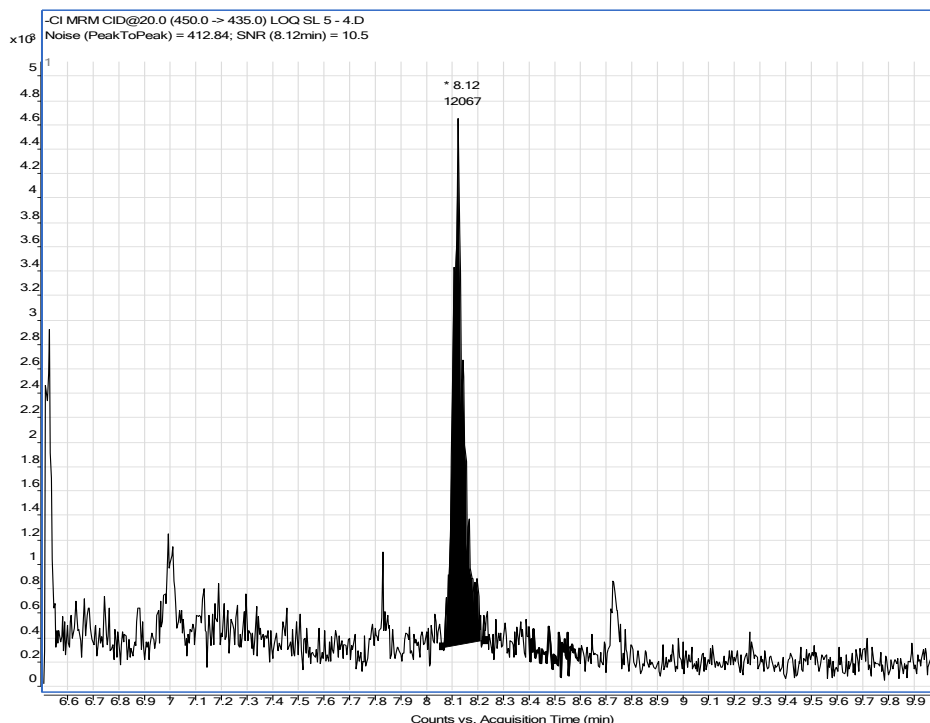


Figura 40: Avaliação de sensibilidade por meio da determinação da relação sinal/ruído da transição quantificadora da PREG (450>435) obtida na análise de uma amostra contendo 12 ng/dL (soro). Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 6 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 10.

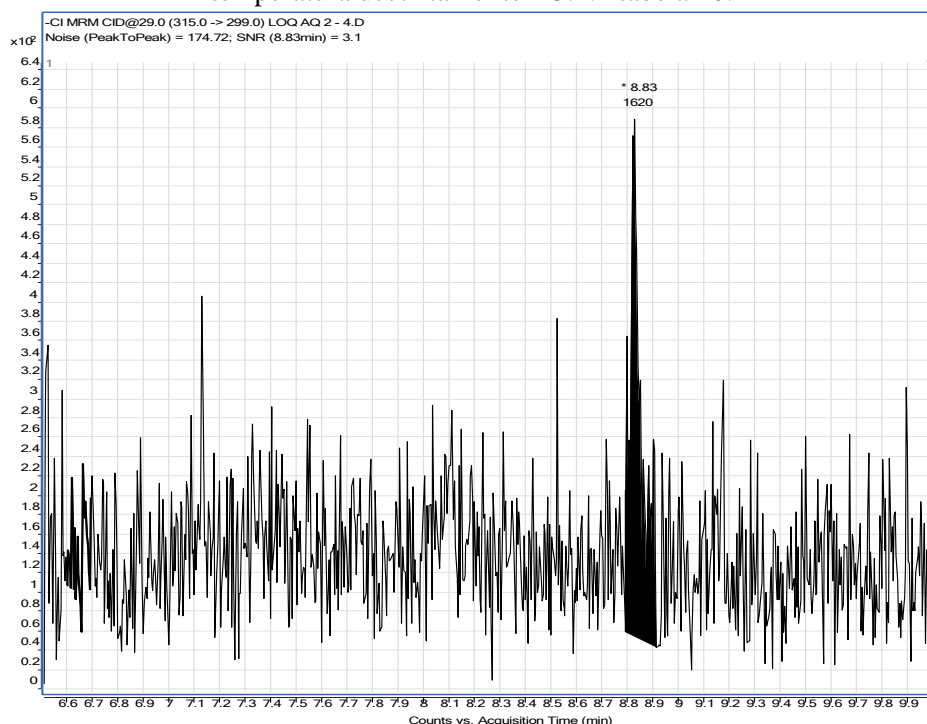


Figura 41: Avaliação de sensibilidade por meio da determinação da relação sinal/ruído da transição quantificadora da 17OHPREG (315>299) obtida na análise de uma amostra contendo 45 ng/dL (soro). Foi empregando método descrito no item 3.2.1 – protocolo 6 e rampa de temperatura descrita no item 3.2.4 tabela 10.

4.4.4 Recuperação

O experimento de recuperação avalia a eficiência dos processos de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Idealmente, a recuperação do analito deve ser próxima a 100%, no entanto valores menores são aceitáveis desde que reprodutíveis. Os valores de reprodução obtidos para três concentrações ao longo da faixa de linearidade do método foram satisfatórios (Tabela 15 e Tabela 16), pois são aceitos analitos recuperados entre 80 e 120% (Mendes, 2010).

Tabela 15: Recuperação da PREG em três concentrações distintas (Concentrações em ng/dL).

Valor Teórico	Valor Obtido	Recuperação em %
239,2	262,3	109,7
833,9	882,9	105,9
378	343,6	90,9

Tabela 16: Recuperação da 17OHPREG em três concentrações distintas (Concentrações em ng/dL).

Valor Teórico	Valor Obtido	Recuperação em %
200	201,0	100,5
800	744,9	93,1
2000	1894,2	94,7

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nessa dissertação demonstram que o objetivo do trabalho de desenvolver um método para quantificar os esteroides PREG e 17OHPREG, foi alcançado. Apesar de terem sido apresentados apenas dados preliminares da validação analítica, estes dados indicam que o desempenho do método é aceitável para a determinação de ambos esteroides e poderá ser utilizado para o diagnóstico diferencial de hiperplasia adrenal congênita por deficiência de 21 – hidroxilase e de 3 β – hidroxidesidrogenase.

Não há trabalhos publicados que utilizem cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em tandem utilizando ionização química negativa para a quantificação de PREG e 17OHPREG, o que torna esse trabalho pioneiro e com alto potencial para quantificação de analitos similares e presentes em baixa concentração no organismo. O novo método que permite a extração e derivatização simultâneas é inovador, poderá ser adaptado à outras determinações incluindo aquelas baseadas em LC-MS/MS e poderá ser automatizado com robôs pipetadores.

O método desenvolvido permitirá ainda o diagnóstico precoce da deficiência de 3 β -HSD no Brasil. A redução no tempo de obtenção dos resultados contribuirá para tratamentos mais rápidos e por consequência resultarão na diminuição da sintomatologia. O tempo de resposta aliado ao pequeno volume de amostra será benéfico principalmente para recém-nascidos. Para adultos, além de diagnosticar a forma tardia da doença, poderá auxiliar em outros diagnósticos decorrentes da esteroidogênese, já que a PREG é um hormônio precursor de todos os hormônios esteroidais.

REFERÊNCIAS

6 REFERENCIAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2016. “Consulta Pública N° 129, de 12 de Fevereiro de 2016.”.
- Agilent Technologies. 2002. *Pharmacologically GC / MSD – EI / PCI / NCI*. 2013. *Agilent 5977 Series MSD System - Concepts Guide*. Santa Clara, CA.
- Apen, Harles. 2001. “Adrenal Gland : Structure , Function , and Mechanisms of Toxicity.”.
- Bao, M.L.; et al. 1998. “Determination of Carbonyl Compounds in Water by Derivatization-Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatographic Analysis.” *Journal of Chromatography A* 809: 75–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9677712>.
- Biziuk, M. 2006. “Solid Phase Extraction Technique – Trends , Opportunities and Applications.” *Polish Journal of Environmental Studies* 15(5): 677–90.
- Bongiovanni, Alfred M; and George Kellenbenz. 1962. “3,8-Hydroxysteroid.” 41(11): 2086–92.
- Cardoso, Rui, e Palma, Isabel. 2009. “Cortex Supra-Renal: Anatomia, Embriologia E Fisiologia.” *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo* 01: 71–76.
- Carvalho, Valdemir Melechco; Nakamura, Odete Hirata e Vieira, José Gilberto Henriques. 2008. “Simultaneous Quantitation of Seven Endogenous C-21 Adrenal Steroids by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry in Human Serum.” 872: 154–61.
- Chiaradia, Mariza C.; Carol H. Collins e Jardim, C. S. F. 2008. “O Estado Da Arte Da Cromatografia Associada À Espectrometria de Massas Acoplada À Espectrometria de Massas Na Análise de Compostos Tóxicos Em Alimentos.” *Quimica Nova* 31(3): 623–36.
- Costa-Barbosa, Flávia; et al. 2010. “Superior Discriminating Value of ACTH-Stimulated Serum 21-Deoxycortisol in Identifying Heterozygote Carriers for 21-Hydroxylase Deficiency.” *Clinical Endocrinology* 73: 700–706.
- Dougherty, Ralph C. 1981. “Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry.” *Analytical Chemistry* 53(4): 625A – 636A. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00227a813>.
- Douglas, Carlos Roberto. 2002. *Tratado de Fisiologia Aplicada Às Ciências Da Saúde*. 5ª edição.
- Rhoads, David. 1983. “Lab Statistics Fun and Easy.”

- Eiceman, Gary; et al. 1994. "Gas Chromatography." *Analytical chemistry* 78(12): 3985–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18493677>.
- Elias, Lucila; Leico K.; Castro, Margaret de. 2003. "Diagnóstico Da Forma Não Clássica Da Deficiência de 21-Hidroxilase. Redefinição de Critérios Após Estudos Moleculares?" 47(Mc): 511–13.
- Glish, Gary L, e Vachet, Richard. 2003. "The Basics of Mass Spectrometry in the Twenty-First Century." *Nature reviews. Drug discovery* 2(2): 140–50.
- Gross, Jürgen H. 2004. "Mass Spectrometry: A Textbook."
- Brito De Araújo, Vitor Guilherme; et al. 2014. "3 B -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type II Deficiency on Newborn Screening Test." 58(6): 650–55.
- GUYTON, Arthur C. ; HALL, John E. 2011. *Tratado de Fisiologia Médica*. 12ª edição. Elsevier.
- Hägström, Mikael. 2016. "Diagram of the Pathways of Human Steroidogenesis." 1(1): 1–7.
- Hsu, F. F.; et al. 1999. "Mass Spectrometric Analysis of Pentafluorobenzyl Oxime Derivatives of Reactive Biological Aldehydes." *International Journal of Mass Spectrometry* 185: 795–812.
- Huber, Ludwig. 2007. "Validation of Analytical Methods."
- Iglesias, Jacobo; Gallardo, José Manuel e Medina, Isabel. 2010. "Determination of Carbonyl Compounds in Fish Species Samples with Solid-Phase Microextraction with on-Fibre Derivatization." *Food Chemistry* 123(3): 771–78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.025>.
- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). 2010. *ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS*.
- Juruena, Mario F.; et al. 2004. "REVISÃO O Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal , a Função Dos Receptores de Glicocorticóides E Sua Importância Na Depressão The Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis , Glucocorticoid Receptor Function and Relevance to Depression." 26(3): 189–201.
- Kamrath, Clemens; et al. 2014. "Steroid Biochemistry." 27: 41–52. <http://www.karger.com?doi=10.1159/000363612>.
- Knighton, W. B.; et al. 1995. "High-Pressure Electron Capture Mass Spectrometry." *Mass Spectrometry Reviews* 14 (4-5): 327–43. <http://dx.doi.org/10.1002/mas.1280140406>.

Krone, Nils; et al. 2010. "Gas Chromatography/mass Spectrometry (GC/MS) Remains a Pre-Eminent Discovery Tool in Clinical Steroid Investigations Even in the Era of Fast Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS)." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 121(3-5): 496–504. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.04.010>.

Kushnir, Mark M.; et al. 2006. "Development and Performance Evaluation of a Tandem Mass Spectrometry Assay for 4 Adrenal Steroids." 1567: 1559–67.
———. 2011. "Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Analysis of Steroids in Clinical Laboratories." *Clinical Biochemistry* 44(1): 77–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.07.008>.

Junqueira, L. C. e Carneiro, José. 2013. *Histologia Básica*. 9ª edição. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN.

Lima, Marco Fábio Prata et al. 2000. "Atividade Enzimática Da 21-Hidroxilase E Da 3beta-Hidroxiesteróide Desidrogenase Em Mulheres Hirsutas Com E Sem Anovulação Crônica." *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 22(9): 585–91.

Lutfallah, Chantal; et al. 2002. "Newly Proposed Hormonal Criteria via Genotypic Proof for Type II 3b-Hydroxysteroid Dehydrogenase Deficiency." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87(6): 2611–22.

Macherone A. e Churley, M. White R. 2010. "Ultralow Detection of Estrogenic Compounds by GC-NCI-MSMS." *Current Trends In Mass Spectrometry* May(9): 10–15.

Macherone, A. 2012. "Derivatization Procedure and Negative Chemical Ionization GC / MS / MS Conditions for the Analysis of Steroidal Analogs." : 6.
Makin, Hugh L J, John W Honour, Cedric H L Shackleton, and William J Griffiths. 2010. "General Methods for the Extraction , Purification , and Measurement of Steroids by Chromatography and Mass Spectrometry."

Mello, Maricilda Pallandi De; et al. 2002. "Bases Moleculares Da Hiperplasia Adrenal Congênita." *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 46: 457–77.

Mendes, Carla Albuquerque de Oliveira. 2010. *Gestão Da Fase Analítica Do Laboratório Como Assegurar a Qualidade Na Prática*.

Moraes, Rafael Barberena. 2009. "Comparação Dos Testes de Estímulo Com Baixa E Alta Dose de Cortosina Para O Diagnostico de Insuficiencia Adrenal Em Pacientes Com Choque Séptico." : 1–89.

Munson, M, S, B. e Field, F.H. 1966. "Chemical Ionization Mass Spectrometry." *Journal of The American Chemical Society* 88(12): 2621–30.

Ong, Voon S.; Hites, Ronald A. 1986. "ELECTRON CAPTURE MASS SPECTROMETRY OF ORGANIC ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS." (5): 1920–22.

- Pang, S. 1998. "The Molecular and Clinical Spectrum of 3beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Deficiency Disorder." *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 9(2): 82–86.
- Robbins, Leonard e Cotran, Ramzi. 2010. *Patologia: Bases Patológicas Das Doenças*. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Rose, B.A. 1959. "Gas Chromatography and Its Analytical Applications." 84(574).
- Ruggiero, Carmen e Enzo Lalli. 2016. "Impact of ACTH Signaling on Transcriptional Regulation of Steroidogenic Genes." 7 (March): 1–14.
- Saison, Daan, David P. De Schutter, Filip Delvaux, and Freddy R. Delvaux. 2009. "Determination of Carbonyl Compounds in Beer by Derivatisation and Headspace Solid-Phase Microextraction in Combination with Gas Chromatography and Mass Spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1216(26): 5061–68.
- Sanderson, J Thomas. 2006. "The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals." 94(1): 3–21.
- Dos Santos Pereira, Alberto e Aquino, Francisco Radler De. 2000. "Estado Da Arte Da Cromatografia Gasosa de Alta Resolução E Alta Temperatura." *Quimica Nova* 23(3): 370–79.
- Saúde, Ministério da. 2009. *CONSULTA PÚBLICA Nº 13, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2009*.
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2009/cop0013_07_12_2009.html.
- Tai, Susan e Welch, Michael. 2004. "Development and Evaluation of a Candidate Reference Method for the Determination of Total Cortisol in Human Serum Using Isotope Dilution Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry." *Analytical Chemistry* 76(4): 1008–14. <http://dx.doi.org/10.1021/ac034966f>.
- Tai, Susan,; Xu, Bei; Welch, Michael e Phinney, Karen W. 2007. "Development and Evaluation of a Candidate Reference Measurement Procedure for the Determination of Testosterone in Human Serum Using Isotope Dilution Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388(5-6): 1087–94. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1355-3>.
- Thompson, Michael, Ellison, Stephen L. R. e Wood, Roger. 2002. "Harmonized Guidelines for Single - Laboratory Validation of Methods of Analysis." *INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY* 74(5): 835–55.
- Turcu, Adina F.; e Auchus, Richard. 2015. "Adrenal Steroidogenesis and Congenital Adrenal Hyperplasia." *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 44(2): 275–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26038201>.
- Vieira, Alexandra et al. 2011. "Hiperplasia Congénita Da Suprarenal de Expressão Tardia Por Deficiência de 21-Hidroxilase Revisão Da Literatura E Estudo Genético Preconcepção de Cinco Casais." *Acta Medica Portuguesa* 24(1): 99–110.

Westgard, James O. "The Replication Experiment."

White A., Brice. 2009. "Introdução Ao Sistema Endócrino." In *Fisiologia - Beine E Levy*,.