



ADRIANA ZARDINI BUZATTO

**ANÁLISE DE NUCLEOSÍDEOS, POTENCIAIS BIOMARCADORES TUMORAIS
DE CÂNCER DE PRÓSTATA, POR ELETROFORESE CAPILAR**

**CAMPINAS
2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

ADRIANA ZARDINI BUZATTO

**ANÁLISE DE NUCLEOSÍDEOS, POTENCIAIS BIOMARCADORES TUMORAIS
DE CÂNCER DE PRÓSTATA, POR ELETROFORESE CAPILAR**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANA VALÉRIA COLNAGHI SIMIONATO
CANTÚ**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM QUÍMICA NA
ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
POR ADRIANA ZARDINI BUZATTO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ANA VALÉRIA
COLNAGHI SIMIONATO CANTÚ**

Assinatura da Orientadora

**CAMPINAS
2014**

Ficha catalográfica

Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Danielle Dantas de Sousa - CRB 8/6490

Buzatto, Adriana Zardini, 1987-

B988a Análise de nucleosídeos, potenciais biomarcadores tumorais de câncer de próstata, por eletroforese capilar / Adriana Zardini Buzatto. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Câncer. 2. Nucleosídeos. 3. Biomarcadores tumorais. 4. Eletroforese capilar. 5. Próstata - Câncer. I. Simionato, Ana Valéria Colnaghi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of nucleosides, putative tumor biomarkers for prostate cancer, by capillary electrophoresis

Palavras-chave em inglês:

Cancer

Nucleosides

Tumor biomarkers

Capillary electrophoresis

Prostate – Cancer

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú [Orientadora]

Emanuel Carrilho

Dosil Pereira de Jesus

Data de defesa: 17-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Química

Dedico este trabalho aos meus pais, Celso e Sonia, e ao meu marido e melhor amigo, Hugo.

*“A educação é a arma mais
poderosa que você pode usar para
mudar o mundo.”*

Nelson Mandela

*“Nada na vida deve ser temido,
somente compreendido. Agora é a
hora de compreender mais para
temer menos.”*

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram do desenvolvimento deste trabalho e que me auxiliaram na conclusão de mais uma etapa em minha vida, direta ou indiretamente.

Aos meus pais, Celso e Sonia, pelos valores e educação que me deram e, principalmente, por todo o apoio, incentivo e carinho que recebi em toda a minha vida. Obrigada pela compreensão e por toda a ajuda que sempre me forneceram. Agradeço, ainda, ao meu pai pelo auxílio que sempre me deu com a manutenção do equipamento de eletroforese capilar – este trabalho não poderia ser completado sem essa ajuda.

Ao meu irmão, César, pela amizade e companheirismo.

Ao meu marido, Hugo, por toda a paciência. Agradeço o imenso amor, a amizade, o carinho e todos os momentos de felicidade que compartilhamos.

Aos queridos amigos que estiveram presentes nos momentos de descontração.

As colegas do laboratório pelo auxílio e amizade.

Ao Prof. Dr. Ronei J. Poppi e Paulo R. Filgueiras, pela colaboração nas análises quimiométricas, e ao Prof. Dr. Marcelo Lancellotti, por ceder seu laboratório para o trabalho com as amostras biológicas.

A Laurione Cândido de Oliveira, pela coleta das amostras de soro sanguíneo dos portadores de câncer de próstata, e ao Hemocentro da UNICAMP, pelas amostras dos doadores saudáveis.

A CAPES, a FAPESP e ao CNPq, pelo financiamento deste projeto, e aos professores e funcionários do IQ-UNICAMP, pela excelente formação que recebi desde a graduação.

Por fim, agradeço imensamente à minha orientadora e amiga, Prof^a. Dr^a. Ana Valéria C. Simionato, presente na minha vida acadêmica desde a iniciação científica. Obrigada por ter aceitado me orientar mais uma vez e por ter contribuído tanto para a minha formação. Agradeço, acima de tudo, o carinho e a paciência que sempre teve comigo.

Curriculum Vitae

Adriana Zardini Buzatto

Formação Acadêmica

- 2012 – atual Mestrado em Química Analítica
 Instituto de Química – UNICAMP (Campinas, SP)
- 2007 – 2011 Graduação em Química (modalidade Tecnológica)
 Instituto de Química – UNICAMP (Campinas, SP)
- 2003 – 2005 Ensino médio profissionalizante (Técnico em Informática)
 Colégio Divino Salvador (Jundiaí, SP)

Atuação Profissional

- 2011 – 2012 T&E Analítica Comércio e Análises Químicas (Campinas, SP)
 Vínculo: Colaborador (Analista de Laboratório 2)
- 2010 – 2011 T&E Analítica Comércio e Análises Químicas (Campinas, SP)
 Vínculo: Estágio em Análises de Laboratório

Projetos de Pesquisa

- 2012 – atual Mestrado em Química Analítica
 Título: “Análise de nucleosídeos, potenciais biomarcadores tumorais em câncer de próstata, por eletroforese capilar”.
 Financiamento: CAPES
 Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Valéria C. Simionato
 Instituto de Química – UNICAMP (Campinas, SP)
- 2008 – 2010 Iniciação Científica em Química Analítica
 Título: “Desenvolvimento de metodologia para análise de nucleosídeos modificados, biomarcadores tumorais, por eletroforese capilar”.
 Financiamento: FAPESP

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Valéria C. Simionato
Instituto de Química – UNICAMP (Campinas, SP)

Prêmios

2010 Menção Honrosa pelo trabalho apresentado no XVIII Congresso PIBIC (UNICAMP, Campinas, SP): “Biomarcadores tumorais: desenvolvimento e comparação de dois métodos de separação para análise de nucleosídeos modificados”.

Publicações

Buzatto, A. Z., Guedes, S. F., Vidotto, L. T., Oliveira, L. C., Simionato, A. V. C., Development and validation of a micellar electrokinetic capillary chromatographic method for the assessment of nucleosides, potential biomarkers, in blood serum, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 24, p. 904-913, 2013.

Buzatto, A. Z., Sousa, A.C., Guedes, S. F., Ciesralová, Z., Simionato, A. V. C., Metabolomic investigation of human diseases biomarkers by CE and LC coupled to MS, *Electrophoresis*, 2013 (no prelo).

Buzatto, A. Z., Guedes, S. F., Simionato, A. V. C., A novel method for the analysis of nucleosides, potential tumor biomarkers, in blood serum samples by CE-UV with reversed electrosmotic flow, *Journal of Chromatography*, 2014 (submetido).

Principais participações em eventos

2013 V BrMass – Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas (Campinas, SP)
Pôster: “A fast bioanalytical method for the quantification of modified nucleosides – putative tumor biomarkers – in serum samples by LC-MS/MS”

- 2013 17° ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica (Belo Horizonte, MG)
Pôster: “Novo método para análise de potenciais biomarcadores tumorais por CE-UV com inversão de fluxo eletrosmótico e maior detectabilidade”
- 2013 ESPCA – São Paulo Advanced School on Bioorganic Chemistry (Araraquara, SP)
Pôster: “Novel approach for the analysis of nucleosides as potential tumor biomarkers in blood serum by micellar electrokinetic chromatography (MECK) and UV detection”
- 2012 LACE – Latin American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology (Buenos Aires, Argentina)
Pôster: “Novel approach for the analysis of nucleosides as potential tumor biomarkers by CE-UV”

RESUMO

O câncer está entre as maiores causas de óbitos no mundo, porém, se a enfermidade for detectada no início, grande parte dos casos pode atingir a cura. Os nucleosídeos são moléculas originadas da degradação do RNA e suas concentrações em fluidos biológicos são alteradas na presença de tumores devido à maior taxa de replicação celular, portanto são potenciais biomarcadores tumorais. A investigação do perfil de tais metabólitos pode auxiliar no diagnóstico e no tratamento do câncer. Neste trabalho, um novo método para a análise de nucleosídeos em soro sanguíneo por eletroforese capilar (CE-UV) no modo cromatografia micelar eletrocínética capilar (MECK) foi desenvolvido e validado. O tensoativo catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi empregado, com consequente inversão do fluxo eletrosmótico (EOF). Os analitos foram extraídos da matriz de soro sanguíneo através de extração em fase sólida (SPE) e um amplo estudo sobre estratégias de pré-concentração foi realizado para obtenção de limites de quantificação mais adequados. Sete padrões de nucleosídeos foram separados em *c.a.* 25 min sob as condições de análise otimizadas, *i.e.* eletrólito de corrida composto por ácido bórico 30 mmol/L, CTAB 50 mmol/L e metanol 10% (v/v) em pH 9,90; tensão de -10 kV; temperatura de 20°C; injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 120 s seguida por aplicação 25 kV entre *vials* de eletrólito por 15 s; detecção em 260 nm; e capilar de sílica fundida com 50 µm de diâmetro interno e 56 cm de comprimento efetivo. Foram atingidas eficiências entre $4,3 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^5$ e resolução mínima de 1,5. A metodologia foi validada em um *pool* de soro sanguíneo de indivíduos sadios e foram obtidos limites de quantificação entre 1,0 e 4,0 µmol/L, coeficientes de correlação linear (R) entre 0,9801 e 0,9969 e precisões e exatidões com desvios menores que 20%. O método foi aplicado a amostras de 60 indivíduos sadios e 66 portadores de câncer de próstata e um estudo quimiométrico foi realizado para avaliação da potencialidade dos nucleosídeos como biomarcadores tumorais, com obtenção de sensibilidade acima de 90%. Tal metodologia, portanto, pode ser empregada em conjunto com as já bem estabelecidas para o diagnóstico do câncer de próstata.

ABSTRACT

Cancer is amongst the major causes of death worldwide, but, if the disease is detected early, most cases can be cured. Nucleosides are molecules originated from RNA degradation and their concentrations in biological fluids are altered during tumor development due to a higher rate of cell replication; therefore, they are putative tumor biomarkers. The investigation of the profile of such metabolites may aid in the diagnosis and treatment of cancer. In this work, a novel method for the analysis of nucleosides in blood serum by capillary electrophoresis (CE-UV) under micellar electrokinetic capillary chromatography (MECK) mode was developed and validated. The cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was employed, with consequent reversal of the electrosmotic flow (EOF). The analytes were extracted from blood serum samples by solid phase extraction (SPE) and a wide study on pre-concentration strategies was accomplished in order to obtain more adequate limits of quantification. Seven nucleoside standards were separated within *c.a.* 25 min under the optimized conditions, *i.e.* electrolyte composed by 30 mmol/L boric acid, 50 mmol/L CTAB and 10% methanol (v/v) with pH 9.90; voltage of -10 kV; temperature of 20°C; hydrodynamic injection under 50 mbar for 120 s followed by 25 kV for 15 s between electrolyte vials; detection in 260 nm; and fused silica capillary with 50 μm internal diameter and 56 cm of effective length. Efficiencies between 4.3×10^4 and 1.0×10^5 and a minimum resolution of 1.5 were achieved. The methodology was validated in a pool of blood serum samples from healthy individuals and limits of quantification between 1.0 and 4.0 $\mu\text{mol/L}$ were obtained, as well as linear correlation coefficients between 0.9801 and 0.9969 and precision and accuracy with deviations lower than 20%. The method was applied to samples from 60 healthy individuals and 66 prostate cancer patients and a chemometric study was employed in order to evaluate the potentiality of the nucleosides as tumor biomarkers, with sensibility higher than 90%. Therefore, this methodology may be applied in conjunction with those already established for prostate cancer diagnosis.

ÍNDICE

Lista de abreviações e siglas	xxv
Lista de tabelas	xxix
Lista de figuras	xxxii
Capítulo 1 - Introdução	1
1. Câncer	3
2. Biomarcadores	8
3. Câncer de próstata e PSA	12
4. Nucleosídeos como potenciais biomarcadores tumorais	16
5. Análise de nucleosídeos por técnicas instrumentais	19
Capítulo 2 - Objetivos	23
1. Objetivos gerais	25
2. Objetivos específicos	25
Capítulo 3 – Desenvolvimento da metodologia de análise por CE	27
1. Materiais e equipamentos	29
2. Metodologia inicial	30
3. Composição do BGE	34
3.1. Ácido bórico e CTAB	34
3.2. Fosfato e CTAB	38
3.3. Eletrólito misto	41
3.4. Definição da melhor composição do BGE	43
4. pH do BGE	43
5. Temperatura	47
6. Tensão	48
7. Condicionamento do capilar	50
8. Modificador orgânico	51
9. Identificação dos analitos	55
10. Curva de Ohm	58
11. Tensão (ajuste fino)	59

12. Tempo de injeção	61
13. Conclusões.....	64
Capítulo 4 – Desenvolvimento da metodologia de extração	65
1. Materiais e equipamentos	67
2. Metodologia inicial	67
3. Evaporação em fluxo de nitrogênio	69
4. Adição de metanol (MeOH) à solução de eluição.....	70
5. Concentração e pH da solução de acetato de amônio	72
6. Composição da solução de eluição	75
7. Método de extração proposto por Jiang <i>et al.</i> ⁸¹	76
8. Volume de ressuspensão	78
9. Concentração da solução de acetato de amônio.....	80
10. Conclusões.....	81
Capítulo 5 – Estudo de estratégias de pré-concentração.....	83
1. Materiais e equipamentos	85
2. Modos de injeção	85
3. Injeção eletrocinética.....	87
4. Injeção hidrodinâmica.....	98
5. Comparação entre o método otimizado e o empregado anteriormente.....	116
6. Conclusões.....	119
Capítulo 6 - Validação	121
1. Metodologia	123
2. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	124
3. Curvas analíticas	126
4. Precisão, exatidão e recuperação	132
Capítulo 7 – Análise de amostras de soro sanguíneo	135
1. Materiais e equipamentos	137
2. Análise de amostras de voluntários sadios e doentes.....	137
3. Quimiometria	142
3.1. Introdução à Floresta Randômica (RF).....	143
3.2. Construção do modelo.....	146

3.3. Resultados	147
4. Conclusões.....	151
Capítulo 8 - Conclusões	153
Referências	157

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

1mA.....	1-metiladenosina
2dA.....	2'-deoxiadenosina
5mU.....	5-metiluridina
8BrG.....	8-bromoguanosina
β -HCG.....	gonadotrofina coriônica humana (<i>human chorionic gonadotropin</i>)
A.....	adenosina
ACN.....	acetonitrila
ACS.....	Sociedade Americana de Câncer (<i>American Cancer Society</i>)
AFP.....	alfafetoproteína
AIDS.....	síndrome da imunodeficiência adquirida (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
ANVISA.....	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGE.....	eletrólito de corrida (<i>background electrolyte</i>)
BPH.....	hiperplasia benigna da próstata (<i>benign prostatic hyperplasia</i>)
C.....	citidina
CA.....	antígeno do câncer (<i>câncer antigen</i>)
CEA.....	antígeno carcinoembrionário(<i>carcinoembryonic antigen</i>)
CEC.....	eletrocromatografia capilar (<i>capillary electrokinetic chromatography</i>)
CTAB.....	brometo de cetiltrimetilamônio (<i>cetyltrimethylammonium bromide</i>)
CV.....	coeficiente de variação
CZE.....	eletroforese capilar de zona (<i>capillary zone electrophoresis</i>)
DRE.....	toque retal digitalizado (<i>digital rectal exam</i>)
ESI.....	<i>electrospray</i>
EMA.....	Agência Européia de Medicamentos (<i>European Medicines Agency</i>)
FDA.....	Administração de Alimentos e Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
G.....	guanosina
HIV.....	vírus da imunodeficiência humana (<i>human immunodeficiency vírus</i>)
HPV.....	vírus do papiloma humano (<i>human papiloma vírus</i>)

V.....tensão
X.....xantosina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de pKa de alguns dos nucleosídeos estudados. ^{35,99}	44
Tabela 2 – Concentrações de nucleosídeos em soro sanguíneo de indivíduos saudáveis, conforme dados publicados na literatura.	62
Tabela 3 – Recuperações obtidas para matriz de soro sanguíneo fortificada com solução de padrões 100 µmol/L extraída com o método otimizado.	82
Tabela 4 – Condições avaliadas na otimização da injeção eletrocínética (continua na página seguinte).	88
Tabela 5 – Condições avaliadas para a otimização da injeção no modo hidrodinâmico (continua na página seguinte). Em todos os casos que envolvem a aplicação de tensão, foram empregados <i>vials</i> de BGE, porém a amostra foi injetada no modo hidrodinâmico.	98
Tabela 6 – Condições avaliadas na otimização da injeção hidrodinâmica (50 mbar) seguida por aplicação de tensão entre <i>vials</i> de BGE.....	110
Tabela 7 – LQs e LDs obtidos para o método desenvolvido e comparação com LDs reportados na literatura para trabalhos que empregam CE-UV.	125
Tabela 8 – Concentrações teóricas empregadas para a construção das curvas analíticas.....	126
Tabela 9 - Parâmetros das curvas analíticas obtidas com padronização interna.	127
Tabela 10 - Parâmetros das curvas analíticas obtidas com padronização externa sem eliminação de <i>outliers</i>	127
Tabela 11 – Parâmetros das curvas analíticas obtidas com padronização externa e eliminação de <i>outliers</i>	132
Tabela 12 – Valores de precisão, exatidão e recuperação obtidos para a validação da metodologia desenvolvida.	133
Tabela 13 – Médias das concentrações obtidas para as análises de amostras de soro sanguíneo de indivíduos sadios e portadores de câncer de próstata.	141
Tabela 14 - Divisão dos resultados amostrais dos pacientes em conjuntos de treinamento e teste para avaliação estatística.	147

Tabela 15 - Resultados do modelo floresta randômica (RF) aplicado ao conjunto de amostras de teste.149

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Dados de incidência e mortalidade mundial por tipo de câncer em 2008. Em destaque está o câncer de próstata, enfermidade alvo deste trabalho.
26
- Figura 2 – Ilustração dos conceitos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (PPV) e valor preditivo negativo (NPV)..... 12
- Figura 3 – Localização da próstata no organismo humano. ³⁰ 13
- Figura 4 – Comparação das taxas de incidência e mortalidade de câncer de próstata por 100 mil habitantes dos Estados Unidos. ³ 14
- Figura 5 – Estruturas químicas dos nucleosídeos e do padrão interno (8BrG) investigados.....29
- Figura 6 – Inversão do EOF causada pela formação de uma camada de recobrimento dinâmico positivo sobre a superfície do capilar de sílica fundida através da atração coulômbica entre os grupos silanóis negativos e o tensoativo catiônico.31
- Figura 7 – Interação entre ânions borato e analitos contendo grupos 1,2-cis-diol em soluções aquosas. A eliminação de água durante a formação do complexo foi suprimida para facilitar a visualização. ^{93,94}33
- Figura 8 – Eletroferogramas obtidos com condições baseadas na metodologia proposta por Jiang *et al.* ⁸¹, *i.e.* BGE tetraborato de sódio (bórax) 25 mmol/L, fosfato de sódio 25 mmol/L e CTAB 25 mmol/L em pH 9,50; V = -15 kV; T = 25°C; injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 15 s; padrões de nucleosídeos C, A, 1mA, 2dA, T, U, 5mU, G, X, I e 8BrG; detecção em 260 nm.....34
- Figura 9 – Eletroferogramas obtidos para a otimização da concentração de borato e CTAB no BGE. A melhor condição está destacada pela seta (ácido bórico 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L). Condições: BGE ácido bórico e CTAB em concentrações variadas e pH 9,50; V = -15 kV; T = 25°C; injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 15 s; padrões de nucleosídeos C, A, 2dA, T, U, 5mU, G, X, I e 8BrG; detecção em 260 nm.36

Figura 10 – Resoluções obtidas para a otimização da concentração de ácido bórico e CTAB no BGE. Condições: análogas às da Figura 9.....	37
Figura 11 – Eletroferogramas obtidos para a otimização da concentração de fosfato e CTAB no BGE. A melhor condição está destacada pela seta (fosfato 70 mmol/L e CTAB 70 mmol/L). Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE composto por fosfato e CTAB.	39
Figura 12 – Resoluções obtidas para a otimização da concentração de fosfato e CTAB no BGE. Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE composto por fosfato e CTAB.....	40
Figura 13 – Eletroferogramas obtidos para a otimização da concentração do eletrólito misto. A melhor condição está destacada pela seta (ácido bórico 30 mmol/L, CTAB 50 mmol/L e fosfato 30 mmol/L). A: ácido bórico 30 mmol/L, CTAB 50 mmol/L; B: ácido bórico 30 mmol/L, CTAB 30 mmol/L. Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE composto por ácido bórico, fosfato e CTAB.....	42
Figura 14 – Resoluções obtidas para a otimização da concentração de sais no eletrólito misto. A: ácido bórico 30 mmol/L, CTAB 50 mmol/L; B: ácido bórico 30 mmol/L, CTAB 30 mmol/L. Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE composto por ácido bórico, fosfato e CTAB.	42
Figura 15 – Eletroferogramas obtidos para a otimização do pH do BGE entre 7,50 e 11,00. As condições com pH entre 7,50 e 8,50 não apresentam a identificação dos picos devido à co-migração. A melhor condição é destacada pela seta (pH 10,00). Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE borato 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L em pHs variáveis.	44
Figura 16 – Resoluções obtidas para a otimização do pH do BGE entre 7,50 e 11,00. Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE borato 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L em pHs variáveis.	45
Figura 17 – Eletroferogramas obtidos para o ajuste fino do pH do BGE entre 9,70 e 10,40. A melhor condição é destacada pela seta (pH 9,90). Condições:	

	análogas às da Figura 9, porém com BGE borato 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L em pHs variáveis.....	46
Figura 18	– Resoluções obtidas para o ajuste fino do pH do BGE entre 9,70 e 10,40. Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE borato 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L em pHs variáveis.	46
Figura 19	– Eletroferogramas obtidos para a otimização de temperatura do cassete no qual o capilar é acondicionado durante as análises entre 20 e 25°C. A melhor condição é destacada pela seta (20°C). Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE borato 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L em pH 9,90 e temperatura variável.	47
Figura 20	– Resoluções obtidas para otimização da temperatura do cassete no qual o capilar é acondicionado durante as análises entre 20 e 25°C. Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE borato 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L em pH 9,90 e temperatura variável.....	48
Figura 21	– Eletroferogramas obtidos para otimização da tensão aplicada durante a separação entre -10 e -30 kV. A melhor condição é destacada pela seta (-10 kV). Condições: BGE borato 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L em pH 9,90; V variável; T = 20°C; injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 15 s; padrões de nucleosídeos C, A, 2dA, T, U, 5mU, G, X, I e 8BrG; detecção em 260 nm.....	49
Figura 22	– Resoluções obtidas para otimização da tensão aplicada durante a separação entre -10 e -30 kV. Condições: análogas às da Figura 21.	49
Figura 23	– Eletroferogramas obtidos para otimização do condicionamento do capilar. Condições: análogas as da Figura 21, porém com V = -10 kV. ..	50
Figura 24	– Eletroferogramas obtidos para a otimização da concentração de MeOH no BGE entre 0 e 20%. A melhor condição é destacada pela seta (4%). Condições: análogas as da Figura 21, porém com BGE contendo MeOH em concentrações variadas e V = -10 kV.....	52
Figura 25	– Resoluções obtidas para a otimização da concentração de MeOH no BGE entre 0 e 20%. Condições: análogas as da Figura 21, porém com BGE contendo MeOH em concentrações variadas e V = -10 kV.....	53

Figura 26 - Eletroferogramas obtidos para a otimização da concentração de ACN no BGE entre 0 e 10%. Condições: análogas as da Figura 21, porém com BGE contendo ACN em concentrações variadas e $V = -10$ kV.....	54
Figura 27 – Gráfico de resoluções obtido para a otimização da concentração de ACN no BGE entre 0 e 10%. Condições: análogas as da Figura 21, porém com BGE contendo ACN em concentrações variadas e $V = -10$ kV.....	54
Figura 28 - Eletroferogramas obtidos para a identificação dos picos dos analitos. Condições: BGE borato 30 mmol/L, CTAB 50 mmol/L e MeOH 4% em pH 9,90; $V = -10$ kV; $T = 20^{\circ}\text{C}$; injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 15 s; padrões de nucleosídeos C, A, 2dA, T, U, 5mU, G, X, I e 8BrG; detecção em 260 nm.....	55
Figura 29 – Espectros de absorção UV dos analitos estudados entre 200 e 400 nm, obtidos com o detector de arranjo de diodos do equipamento de CE-UV.....	57
Figura 30 – Ilustração do gradiente de temperatura e perfil de mobilidades eletroforéticas (μ_{ep}) obtidos como consequência do efeito Joule.....	58
Figura 31 – Curva de Ohm obtida para o BGE composto por borato 30 mmol/L, CTAB 50 mmol/L e MeOH 10% em pH 9,90 ($T = 20^{\circ}\text{C}$).....	59
Figura 32 – Eletroferogramas obtidos para o ajuste fino da tensão aplicada durante as análises entre -10 e -15 kV. A melhor condição é destacada pela seta (-10 kV). Condições: análogas às da Figura 28, porém com BGE contendo 10% de MeOH e V variável.....	60
Figura 33 – Resoluções obtidas para o ajuste fino da tensão aplicada durante as análises entre -10 e -15 kV. Condições: análogas às da Figura 28, porém com BGE contendo 10% de MeOH e V variável.....	60
Figura 34 – Eletroferogramas obtidos para a avaliação da repetibilidade dos tempos de migração. As identificações dos picos de todos os eletroferogramas seguem as descritas para a injeção 10. Condições: análogas às da Figura 28, porém com BGE contendo 10% de MeOH....	61
Figura 35 – Eletroferogramas obtidos para avaliação do tempo de injeção de soluções 100 $\mu\text{mol/L}$ dos padrões de nucleosídeos, sob pressão de 50	

- mbar. As identificações dos picos seguem às de 60 s. A melhor condição é indicada pela seta (30 s). Condições: análogas às da Figura 28, porém com BGE contendo 10% de MeOH e tempo de injeção variável.62
- Figura 36 – Resoluções obtidas para a otimização do tempo de injeção de soluções 100 µmol/L dos padrões de nucleosídeos. Condições: análogas às da Figura 28, porém com BGE contendo 10% de MeOH e tempo de injeção variável.63
- Figura 37 – Eletroferograma obtido nas condições de análise otimizadas para a metodologia de separação dos nucleosídeos. Condições: BGE borato 30 mmol/L, CTAB 50 mmol/L e MeOH 10% em pH 9,90; V = -10 kV; T = 20°C; injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 30 s; solução 100 µmol/L dos padrões de nucleosídeos C, A, T, U, 5mU, G, X, I e 8BrG; detecção em 260 nm.....63
- Figura 38 – Eletroferogramas obtidos para a avaliação da evaporação em fluxo de nitrogênio como alternativa à liofilização. A: solução de padrões 1,0 mmol/L misturada com água e evaporada em fluxo de nitrogênio; B: solução de padrões 1,0 mmol/L sem evaporar. Condições: análogas às da Figura 37, porém com soluções de padrões 1,0 mmol/L.69
- Figura 39 – Eletroferogramas obtidos para a avaliação da adição de MeOH na solução de eluição dos analitos durante a evaporação. A: sem evaporação; B: evaporação em água; C: evaporação em ácido fórmico 0,1 mol/L; D: evaporação em ácido fórmico 0,1 mol/L em MeOH:água 50% (v/v). Condições: análogas às da Figura 37, porém com soluções de padrões 1,0 mmol/L.71
- Figura 40 – Eletroferogramas obtidos para três extrações sucessivas com condicionamento e *clean-up* da resina com solução de acetato de amônio 0,25 mol/L pH 8,8. Condições: análogas às da Figura 37.72
- Figura 41 – Recuperações obtidas para a otimização de concentração e pH da solução de acetato de amônio, empregada para condicionamento e *clean-up* da resina durante a extração dos analitos, por planejamento multivariado. Condições: análogas às da Figura 37.73

- Figura 42 – Eletroferogramas obtidos para a otimização de concentração e pH da solução de acetato de amônio, empregada para condicionamento e *clean-up* da resina durante a extração dos analitos, por planejamento multivariado. A melhor condição é destacada pela seta (20 mmol/L pH 8,8). Condições: análogas às da Figura 37.74
- Figura 43 – Aumentos de área obtidos para a otimização da composição da solução de eluição por planejamento multivariado em relação à solução composta por MeOH 50% e ácido fórmico 0,5% (v/v). 1: MeOH 50%; 2: MeOH 75%; 3: MeOH 100%; A: ácido fórmico 0,5%; B: ácido fórmico 1,0%; C: ácido fórmico 2,0%; D: ácido fórmico 3,0%; E: ácido fórmico 4,0% (v/v). Condições: análogas às da Figura 37.75
- Figura 44 – Eletroferogramas obtidos para a otimização da composição da solução de eluição dos analitos da resina de PBA, *i.e.* ácido fórmico e MeOH. A melhor condição é destacada pela seta (ácido fórmico 1% em MeOH 50% v/v). Condições: análogas às da Figura 37, porém sem 8BrG.....76
- Figura 45 – Comparação entre a metodologia de extração proposta por Jiang *et al.* e a condição otimizada até o momento. Condições: análogas às da Figura 37.....78
- Figura 46 – Eletroferogramas obtidos para otimização do volume de ressuspensão a partir da extração de 500 μ L de matriz de soro sanguíneo fortificada com solução de padrões na concentração final de 100 μ mol/L. Condições: análogas às da Figura 37, porém com matriz de soro sanguíneo fortificada com solução mista de padrões na concentração de 100 μ mol/L, sem T. 79
- Figura 47 – Aumentos de área obtidos para a ressuspensão em volumes variados de água, a partir da extração de 500 μ L de amostra, em relação à ressuspensão em 500 μ L de água. Condições: análogas às da Figura 37, porém com matriz de soro sanguíneo fortificada com solução de padrões na concentração de 100 μ mol/L, sem T.....79
- Figura 48 – Eletroferogramas obtidos para a otimização da concentração de acetato de amônio na solução de condicionamento e *clean-up*. Condições: análogas às da Figura 37, porém com matriz de soro

sanguíneo fortificada com solução de padrões na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$, sem T.....	81
Figura 49 – Ilustração do capilar com cela de detecção estendida.....	86
Figura 50 – Variações de altura obtidas para a avaliação das condições de injeção no modo eletrocínético (de 2 a 30) em relação à condição 1. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução da amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 4).....	89
Figura 51 – Resoluções obtidas para a avaliação das condições de injeção no modo eletrocínético (de 1 a 30). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução da amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 4).	90
Figura 52 – Eletroferogramas obtidos para a avaliação das condições de injeção no modo eletrocínético (de 1 a 30). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução da amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 4).	91
Figura 53 – Variações de altura obtidas para a avaliação das condições de injeção no modo eletrocínético (de 31 a 43) em relação à condição 1. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução de amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 4).....	92
Figura 54 – Resoluções obtidas para a avaliação das condições de injeção no modo eletrocínético (de 31 a 43). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução de amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 4).	93
Figura 55 – Eletroferogramas obtidos para a avaliação das condições de injeção no modo eletrocínético (de 31 a 43). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução de amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 4).	94
Figura 56 – Variações de altura obtidas para a otimização da tensão e do tempo de injeção eletrocínética para a condição 35 (injeção de solução de padrões em tampão borato 3 mmol/L pH 8,00 a -10 kV por 30 s).	

Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis.	95
Figura 57 – Resoluções obtidas para a otimização da tensão e do tempo de injeção eletrocinética para a condição 35 (injeção de solução de padrões em tampão borato 3 mmol/L pH 8,00 a -10 kV por 30 s). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis.	96
Figura 58 – Eletroferogramas obtidos para a otimização da tensão e do tempo de injeção eletrocinética para a condição 35 (injeção de solução de padrões em tampão borato 3 mmol/L pH 8,00 a -10 kV por 30 s). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis.	97
Figura 59 – Variações de altura dos picos para as condições de injeção hidrodinâmica avaliadas em relação à injeção por 30 s a 50 mbar de padrões dissolvidos em água (“normal”). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 5).	100
Figura 60 – Resoluções dos picos obtidas para as condições de injeção hidrodinâmica avaliadas. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 5).	101
Figura 61 – Eletroferogramas obtidos para as condições de injeção hidrodinâmica avaliadas. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 5).	103
Figura 62 – Variações de altura observadas para a otimização da injeção hidrodinâmica seguida por aplicação de tensão entre <i>vials</i> de BGE em relação à condição “normal” (50 mbar por 30 s). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 6).	111
Figura 63 – Resoluções observadas para a otimização da injeção hidrodinâmica seguida por aplicação de tensão entre <i>vials</i> de BGE. Condições de	

análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 6).....	112
Figura 64 – Eletroferogramas obtidos para a otimização da injeção hidrodinâmica seguida por aplicação de tensão entre <i>vials</i> de BGE. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 6).....	114
Figura 65 – Variações de altura obtidas para o otimização do meio de dissolução da amostra em relação aos padrões dissolvidos em água. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução de amostra variável e injeção a 50 mbar por 120 s seguida por tensão de 25 kV por 15 s entre <i>vials</i> de BGE.	115
Figura 66 – Resoluções obtidas para a otimização do meio de dissolução da amostra. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução de amostra variável e injeção a 50 mbar por 120 s seguida por tensão de 25 kV por 15 s entre <i>vials</i> de BGE.	115
Figura 67 – Eletroferogramas obtidos para a otimização do meio de dissolução da amostra. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução de amostra variável e injeção a 50 mbar por 120 s seguida por tensão de 25 kV por 15 s entre <i>vials</i> de BGE.	116
Figura 68 – Comparação entre eletroferogramas obtidos para: A – modo de injeção empregado anteriormente (50 mbar por 30 s para amostra em água); e B – modo de injeção otimizado (50 mbar por 120 s para amostra em tampão borato 3 mmol/L pH 9,90, seguida por 25 kV por 15 s entre <i>vials</i> de BGE). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com injeção hidrodinâmica em condições variáveis e amostra em meios variáveis.....	117
Figura 69 – Comparação entre eletroferogramas obtidos para: A – injeção de solução de padrões 100 µmol/L em tampão borato 3 mmol/L pH 9,90; e B – injeção de matriz de soro sanguíneo fortificada com solução de padrões 100 µmol/L, extraída e ressuspendida em tampão borato 3 mmol/L pH 9,90. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com injeção	

hidrodinâmica a 50 mbar por 120 s seguida por aplicação de 25 kV por 15 s entre <i>vials</i> de BGE e amostras variáveis em tampão borato 3 mmol/L pH 9,90.....	118
Figura 70 – Eletroferogramas obtido para a análise de: A - <i>pool</i> de soro sanguíneo de 60 indivíduos sadios (branco); e B: <i>pool</i> de soro sanguíneo fortificado com solução mista de nucleosídeos na concentração de 10 μ mol/L. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 120 s seguida por aplicação de 25 kV por 15 s entre <i>vials</i> de BGE e matriz de soro sanguíneo pura (em A) ou fortificada com solução 10 μ mol/L dos padrões em tampão borato 3 mmol/L pH 9,90 (em B).....	119
Figura 71 – Eletroferogramas obtidos para a determinação de LQ e LD. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 120 s seguida por aplicação de 25 kV por 15 s entre <i>vials</i> de BGE e <i>pool</i> de soro sanguíneo fortificado com solução dos padrões C, A, U, 5mU, G, X e I em concentrações variadas.....	125
Figura 72 – Curvas analíticas e gráficos de resíduos obtidos por padronização externa sem eliminação de <i>outliers</i>	129
Figura 73 – Curvas analíticas e gráficos de resíduos obtidos por padronização externa após a eliminação de <i>outliers</i>	131
Figura 74 – Exemplos de eletroferogramas obtidos para as análises de amostras de soro sanguíneo de indivíduos sadios. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 60 s seguida por aplicação de 25 kV por 15 s entre <i>vials</i> de BGE.	138
Figura 75 – Exemplos de eletroferogramas obtidos para as análises de amostras de soro sanguíneo de indivíduos portadores de câncer de próstata. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 60 s seguida por aplicação de 25 kV por 15 s entre <i>vials</i> de BGE.	139
Figura 76 – Comparação entre eletroferogramas obtidos para um indivíduo saudável (amostra 5) e um doente (amostra 19). Condições de análise:	

análogas às da Figura 37, porém com injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 60 s seguida por aplicação de 25 kV por 15 s entre <i>vials</i> de BGE. .	140
Figura 77 - Médias das concentrações obtidas para as análises de amostras de soro sanguíneo de indivíduos sadios e portadores de câncer de próstata.	141
Figura 78 – Ilustração do modelo de classificação de floresta randômica (RF). Cada círculo representa um nó, no qual o conjunto de variáveis selecionado randomicamente leva à decisão do caminho a ser seguido. A categoria com a maior quantidade de votos é o resultado final da classificação.	144
Figura 79 - Exemplo de partição de nó pai (D) em dois nós filhos D_1 e D_2	145
Figura 80 – Concentrações ($\mu\text{mol/L}$) obtidas para as 7 variáveis medidas.	148
Figura 81 – Média dos resultados obtidos para os dois grupos de pacientes (sadios e doentes).	148
Figura 82 - Probabilidade do diagnóstico de câncer pelo modelo floresta randômica (RF). Como existem apenas duas classes, uma probabilidade maior que 0,5 indica que o paciente tem diagnóstico de câncer, enquanto uma probabilidade menor que 0,5 indica ser um paciente saudável.	150
Figura 83 - Importância (peso) de cada variável no modelo floresta randômica (RF).....	151

Capítulo 1

Introdução

1. Câncer

O câncer é definido como um crescimento anormal e descontrolado de células no organismo. Constitui um grupo complexo de mais de 100 doenças que variam em termos de taxa de crescimento, diferenciação celular, detectabilidade, potencial metastático, resposta ao tratamento e prognóstico. As células cancerígenas reproduzem-se rapidamente, dando origem a aglomerados denominados tumores malignos, que causam danos ao organismo do hospedeiro, podendo levá-lo à morte. Tumores malignos apresentam como principais características a habilidade de invadir tecidos próximos e de se espalhar para órgãos distantes através de metástase, um processo que ocorre quando células cancerígenas atingem outros órgãos por meio da corrente sanguínea ou de vasos linfáticos. Tumores benignos, por outro lado, não são cancerosos, *i.e.* não apresentam crescimento rápido e não representam ameaça à vida. Os tumores, tanto malignos quanto benignos, podem ser denominados como neoplasias, enquanto que o termo câncer é usado apenas para tumores malignos. ¹⁻³

O câncer pode ser visto como uma consequência indesejável de mutações gênicas essenciais para a evolução das espécies, estando sempre presente entre os humanos. Seus padrões de incidência foram afetados por outras doenças e por aspectos culturais e sociais, porém a doença está presente em todas as regiões do mundo, independentemente do nível socioeconômico da população. Apesar de ser frequentemente considerado como consequência do padrão de vida da sociedade moderna, o câncer é mais antigo do que a espécie humana. Existem evidências da presença de tumores em fósseis de dinossauros do período Jurássico e, em *Homo sapiens*, indícios de tumores em ossos (osteosarcomas) foram observados em restos mortais que datam dos períodos neolítico e pré-colombiano. Papiros egípcios de 3000 a 1500 a.C. fazem referências à tumores de mama e sarcomas. Credita-se aos gregos a primeira distinção do câncer como uma doença e a criação dos termos “carcinomas” e “carcinoma”, referentes à forma mais usual dos tumores, similar a um caranguejo. ⁴⁻⁷

Através da história, diversas teorias de causas da carcinogênese foram desenvolvidas, porém, após a descoberta da estrutura helicoidal do DNA e de investigações sobre a atuação de genes no controle de replicação celular, mutações genéticas foram diretamente relacionadas ao desenvolvimento de tumores. Atualmente, sabe-se que a doença é causada por alterações na expressão gênica que levam a desregulação no balanço de proliferação e apoptose de células com mutações em seu código genético, possibilitando o crescimento de tumores. Grande parte dos danos que ocorrem no DNA é reparada naturalmente pelo organismo; entretanto, durante a carcinogênese, os processos de controle de proliferação celular do organismo não operam corretamente e células com mutações continuam a crescer e se dividir. Em nível molecular, todos os tipos de câncer apresentam características comuns, o que indica que as lesões bioquímicas causadoras do desbalanço no sistema de regulação celular podem ser produzidas por um mesmo padrão de alterações genéticas. ^{1,4,8,9}

Mutações hereditárias são responsáveis por uma pequena porcentagem dos casos da doença (c.a. 5%), porém grande parte é causada por danos adquiridos durante a vida, sejam internos (causados por hormônios ou pelo metabolismo de nutrientes nas células) ou externos (causados por exposição a fatores carcinogênicos – 75 a 80% dos casos). Atualmente são conhecidos mais de 100 fatores carcinogênicos, e.g. radiação, asbestos, fumaça de tabaco, poluição do ar e da água, aflatoxinas, bezeno e metais pesados (arsênio, chumbo, cádmio, mercúrio, crômio e manganês), além de diversos vírus e bactérias relacionados com o desenvolvimento tumoral, como hepatite B e C, herpes (vírus Epstein-Barr), vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*), vírus do papiloma humano (HPV, do inglês *human papiloma virus*) e *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). O envelhecimento também é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de tumores malignos devido ao acúmulo da exposição a fatores carcinogênicos ao longo da vida, sendo que c.a. 77% dos casos são diagnosticados em pessoas com 55 anos ou mais. ²⁻

4,10

Grande parte dos tumores malignos poderia ser prevenida com mudanças no estilo de vida da população. Cerca de 30% dos falecimentos por câncer são atribuídos a cinco principais fatores: alto índice de massa corporal, baixo consumo de frutas e vegetais, falta de atividade física, uso de tabaco e consumo de álcool. A *American Cancer Society* (ACS – Sociedade Americana de Câncer, em tradução livre) estima que 174 mil mortes por câncer tenham sido causadas por uso de cigarros no ano de 2013 só nos Estados Unidos. Cerca de um terço dos novos casos de câncer diagnosticados no mesmo país estão relacionados com obesidade, falta de atividade física e má nutrição. Grande parte dos 2 milhões de casos de tumores de pele diagnosticados anualmente também poderiam ser prevenidos através do uso de protetores solares e redução da exposição ao sol. Infecções virais, por outro lado, são responsáveis por cerca de 20% dos óbitos por câncer em países pobres, que poderiam ser reduzidos através de mudanças comportamentais e uso de vacinas e antibióticos. ^{2-4,10}

Atualmente, o câncer é a causa de um em cada oito falecimentos no mundo. A enfermidade foi responsável por *c.a.* 14% dos casos de óbito em 2011 (7,9 milhões de mortes) e um crescimento de 45% é previsto até 2030, atingindo 13,1 milhões de mortes e 21,3 milhões de novos casos diagnosticados. Só nos Estados Unidos, cerca de 1600 pessoas morrem diariamente devido à doença. Estima-se que a probabilidade de ter câncer durante a vida é de 40,76%, *i.e.* 1 em cada 2 seres humanos desenvolverão algum tipo de tumor. O risco de falecimento por câncer, por outro lado, é de 20,93% (1 em cada 5 seres humanos). A maior parte dos falecimentos é causada por câncer de pulmão (19,4%), fígado (9,1%), estômago (8,8%), colorretal (cólon, reto e intestino grosso - 8,5%) e mama (6,4%), enquanto que as maiores incidências são atribuídas aos tumores de pulmão (13,0%), mama (11,9%), colorretal (9,7%), próstata (7,9%) e estômago (5,6%) (Figura 1). Entre os homens, tumores de pulmão e próstata apresentam as maiores incidências (16,5 e 13,6%, respectivamente). Já para mulheres, tumores de mama atingem a maior parte das pacientes (22,9%). Mais de 60% dos falecimentos por câncer ocorrem em países de baixa e média renda, incluindo o

Brasil, principalmente devido à falta de recursos médicos e sistemas de saúde pública adequados. ^{2,3,10-12}

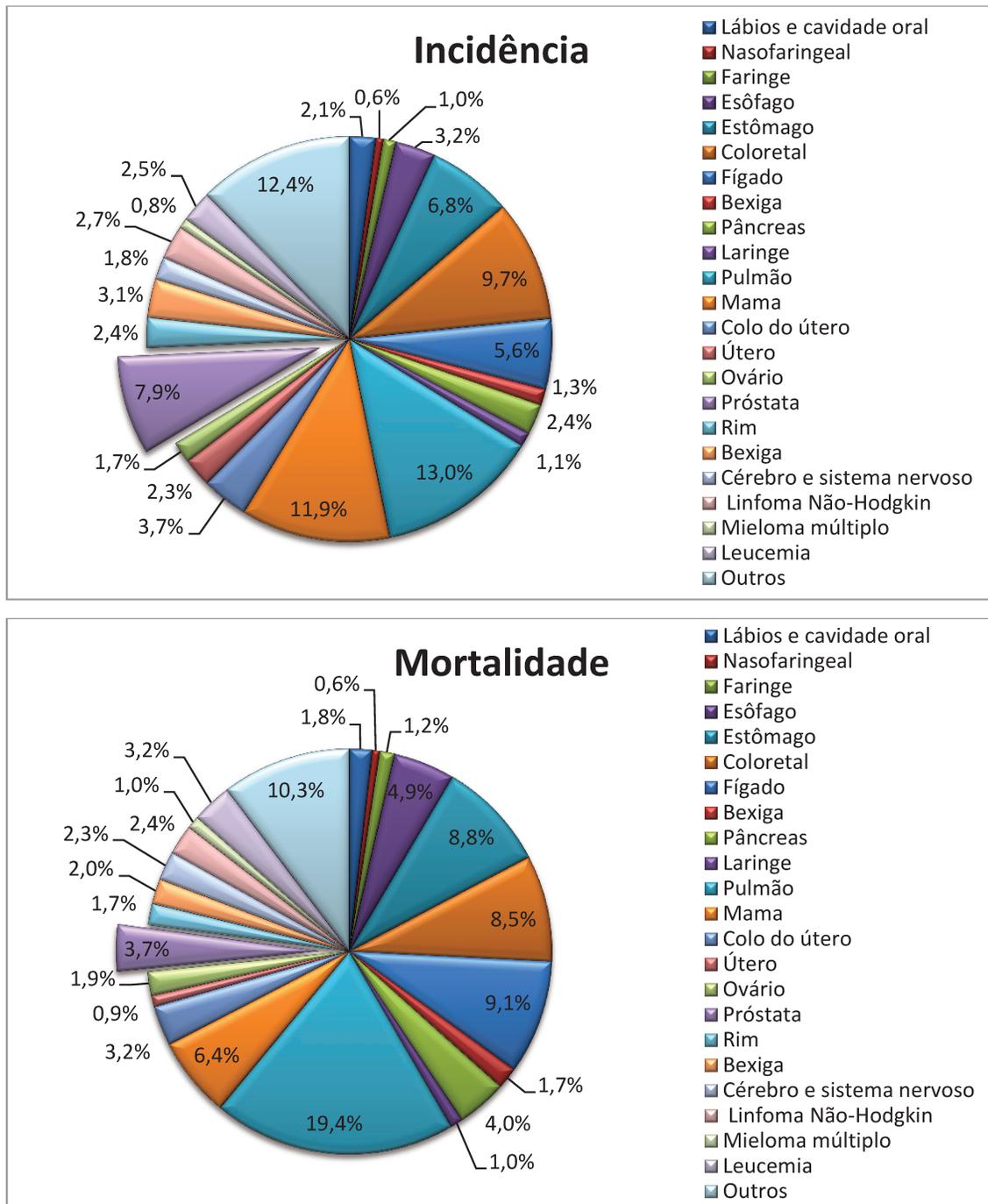


Figura 1 – Dados de incidência e mortalidade mundial por tipo de câncer em 2008. Em destaque está o câncer de próstata, enfermidade alvo deste trabalho. ²

No Brasil, mais de 177 mil óbitos foram atribuídos ao câncer em 2011. O risco de ser diagnosticado com a doença até os 75 anos é de 17,6% (1 em cada 6 pessoas) e o risco de morte, 10,5% (1 em cada 10). Os cinco tipos mais comuns de câncer são: mama, próstata, pulmão, colo de útero e colorretal. ^{2,13}

Casos de câncer detectados em estágios avançados apresentam maior taxa de mortalidade do que aqueles detectados no início, quando a doença ainda está localizada em apenas um tecido ou órgão e é, geralmente, assintomática. Exames que possam ser aplicados na população regularmente para o diagnóstico precoce permitem a remoção de aglomerados de células pré-cancerígenas e a detecção de tumores localizados em apenas um tecido, fase na qual o tratamento é mais simples e efetivo. Os exames de detecção precoce já levaram a uma melhoria na porcentagem de pacientes que sobrevivem após 5 anos do diagnóstico (de 49% para casos diagnosticados entre 1975 e 1977 para 68% entre 2002 e 2008), porém ainda não foi desenvolvido um teste único que diagnostique a doença e diversos procedimentos são realizados para determinar se os sintomas apresentados por um paciente são causados por um tumor maligno ou por outra condição. Métodos de diagnóstico incluem exames por imagens, busca por biomarcadores tumorais, biópsias de tecido tumoral, endoscopia, cirurgias e exames genéticos. ^{3,14,15}

Como muitos tumores são assintomáticos no início de seu desenvolvimento, busca-se, idealmente, um teste que identifique a doença no princípio e seja não invasivo, simples, de fácil aplicação e com baixo custo, para que possa ser realizado periodicamente pela população, mesmo quando ainda não há indícios da presença do tumor. O desafio no controle da doença é sua detecção tão cedo quanto possível, permitindo intervenções e terapias para redução da mortalidade e da morbidade. Testes de *screening*, *i.e.* exames aplicados rotineiramente visando o diagnóstico precoce, são vitais para a detecção do câncer ainda em estágio inicial, porém devem satisfazer quatro requerimentos básicos: distinguir entre indivíduos sadios e doentes com alta exatidão; diagnosticar a doença antes de atingir um estágio mais avançado que reduza a eficácia do tratamento; permitir a diferenciação entre lesões agressivas e

benignas; e apresentar baixo custo e alta aceitação pela população. Atualmente, são aplicados testes de *screening* para alguns tipos de câncer, *e.g.* colonoscopia para tumores colorretais, mamografia para câncer de mama e teste de Papanicolau para tumores de colo do útero, porém a grande maioria não atinge os quatro pré-requisitos citados. Existem comprovações que testes de *screening* reduzem as mortalidades de câncer de mama, colorretal e cervical, porém os biomarcadores atualmente em uso apresentam altas taxas de resultados falsos. A investigação do perfil metabólico de pacientes pode mostrar alterações consistentes e é crucial na determinação da patologia e de seu estágio logo no início. Assim, a busca por novos biomarcadores tumorais, com maior exatidão no diagnóstico, é de fundamental importância.^{2,3,15}

2. Biomarcadores

Um biomarcador pode ser definido como uma característica que pode ser objetivamente medida e avaliada como um indicador de um processo fisiológico ou patológico, ou de uma resposta farmacológica a intervenções terapêuticas. Tal definição inclui desde medidas de pressão sanguínea e níveis de glicose em pacientes diabéticos até a análise de moléculas simples, *e.g.* metabólitos (como carboidratos, esteroides e lipídios), e compostos mais complexos (como proteínas, enzimas, genes, células e anticorpos). Qualquer alteração específica no DNA, no RNA ou em níveis de metabólitos e proteínas pode ser considerada como um biomarcador. Tais indicadores podem ser empregados para avaliar e prever a progressão de doenças (prognóstico), detectar o efeito de fármacos e diagnosticar a presença de patologias no organismo (*screening*). Um biomarcador é considerado válido se puder ser medido por um teste com características e desempenho bem estabelecidos e se existirem evidências científicas de sua significância clínica. A agência americana *Food and Drug Administration* (FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos, em tradução livre) indica que um biomarcador ideal deve estar especificamente associado a uma doença em particular e ser capaz de diferenciar entre condições fisiológicas similares. As

moléculas consideradas em estudos de potenciais biomarcadores não precisam estar diretamente envolvidas no processo patológico, mas devem apresentar alterações consistentes com o desenvolvimento da doença.¹⁶⁻¹⁸

O primeiro biomarcador de que se tem relato na história é uma proteína encontrada na urina indicativa da presença de câncer (proteína Bence Jones), que data de 1847. O termo “biomarcador”, porém, só aparece na literatura a partir dos anos 60. Atualmente, milhares de biomarcadores já foram descobertos e centenas são reportados todos os meses, porém apenas um pequeno número é validado e empregado clinicamente. Uma busca pelo termo “biomarcador” no portal PubMed, referência para literatura biomédica, resulta em mais de 28 mil trabalhos publicados apenas em 2013, porém poucos atingem a população, já que deficiências no processo de validação de metodologias e dos compostos como biomarcadores, além da dificuldade para se estabelecer o intervalo de referência considerado normal, impedem que sejam empregados em testes clínicos. A maior parte dos estudos foca na descoberta de novos biomarcadores, porém sua validação e aplicação em uma população estatisticamente significativa são raramente realizadas, o que pode resultar no abandono de compostos com alto potencial para diagnóstico de doenças.^{16,19-22}

O desenvolvimento tumoral é um processo complexo que requer a interação de diversas proteínas, vias de sinalização e células. Alterações morfológicas e histológicas levam à expressão de genes específicos do processo oncogênico, portanto tais mudanças causam a produção de compostos que podem ser empregados como biomarcadores tumorais para a detecção precoce do câncer, bem como para o acompanhamento da doença. Mais de 10 mil trabalhos foram publicados apenas em 2013 tratando sobre biomarcadores tumorais. Atualmente, os biomarcadores tumorais empregados para diagnóstico e prognóstico da doença incluem: alfafetoproteína (AFP), uma proteína de soro fetal usada principalmente para avaliação de tumores de testículo; antígeno mucoide associado ao carcinoma (MCA, do inglês *mucin-like carcinoma-associated antigen*), uma glicoproteína utilizada para monitorar tumores de mama, mas também associada a tumores de ovário, colo uterino, endométrio e próstata;

cromogranina A, um grupo de proteínas usadas como biomarcadores de neoplasias endócrinas (tireóide, adenoma hipofisário, carcinoma de células ilhotas do pâncreas e neoplasia endócrina múltipla); antígeno carcinoembrionário (CEA, do inglês *carcinoembryonic antigen*), usado principalmente para monitoramento de tumores de cólon; gonadotrofina coriônica humana (β -HCG, do inglês *human chorionic gonadotropin*), uma glicoproteína relacionada a tumores de células germinativas (testículo e ovário); e os antígenos do câncer (CA, do inglês *cancer antigen*) 72.4 (trato gastrointestinal), 125 (ovários), 15.3 (mama); e 19.9 (pâncreas, trato biliar, cólon e reto). A FDA, porém, só aprova para testes de *screening* o antígeno específico da próstata (PSA, do inglês *prostate specific antigen*), empregado para diagnóstico e acompanhamento de câncer de próstata; os cromossomos 3, 7, 9 e 17 (bexiga); e a proteína NMP22 (bexiga).^{20,23-26}

A descoberta de novos biomarcadores é baseada na comparação de estados fisiológicos, fenótipos ou alterações entre indivíduos saudáveis e doentes. Os metabólitos são moléculas pequenas (massa molar de até 1500 Da) contidas em células, tecidos, órgãos ou fluidos biológicos e envolvidas no metabolismo primário e intermediário, cuja síntese é altamente sensível à alimentação, estilo de vida, ambiente externo e até humor do indivíduo. A análise de metabólitos provê um painel do estado do organismo do indivíduo, mas exclui enzimas, proteínas, material genético e moléculas poliméricas. Atualmente, menos de 1% dos metabólitos conhecidos são usados em exames clínicos, apesar do grande potencial apresentado, fator que indica a necessidade de mais avanços científicos na área da metabolômica. Portanto, a quantificação de metabólitos em fluidos biológicos e tecidos é essencial; entretanto, é dificultada pela complexidade das matrizes biológicas, que incluem grandes quantidades de possíveis interferentes, e pela baixa faixa de concentração característica da maior parte de tais analitos. Os fluidos biológicos, como sangue e urina, são matrizes comumente empregadas em análise de metabólitos que podem ser obtidas através de procedimentos simples e pouco danosos ao paciente, o que aumenta a aceitabilidade de exames de *screening*. Entretanto, o desenvolvimento de metodologias de análise não é simples, já que tais fluidos são altamente complexos por apresentarem moléculas

geradas em inúmeros processos fisiológicos. A urina é facilmente obtida em grandes quantidades sem a necessidade de pessoal com treinamento médico, porém apresenta compostos que foram previamente modificados no trato urinário e reflete principalmente a saúde dos rins e da bexiga. O sangue, por outro lado, apresenta menor quantidade de possíveis interferentes e reflete fielmente o estado fisiológico e patológico do organismo através da presença de moléculas excretadas em processos diversos, porém tem obtenção mais complexa e está disponível em quantidades reduzidas.^{16,21,27,28}

A validação de um biomarcador difere do conceito de validação de metodologia. Envolve a avaliação do analito em uma população suficientemente grande através da diferenciação entre estados patológicos e normais. A especificidade e a sensibilidade são os principais conceitos empregados em tal processo, bem como valor preditivo positivo (PPV, do inglês *positive predictive value*) e negativo (NPV, do inglês *negative predictive value*) (Figura 2). A sensibilidade de um biomarcador pode ser definida como a proporção de testes positivos em relação à quantidade real de indivíduos positivos. A especificidade, por outro lado, é a proporção de resultados negativos em relação ao número total de indivíduos sadios. O PPV é a porcentagem de indivíduos nos quais a doença está presente quando o teste é positivo, enquanto que o NPV é a porcentagem de indivíduos nos quais a doença não está presente quando o teste é negativo. Para fins de *screening*, especificidades reduzidas são aceitas se o custo da análise é suficientemente baixo para que um resultado positivo possa ser submetido a testes mais rigorosos. Baixa sensibilidade, porém, não é desejável, já que o tratamento do paciente seria retardado devido ao resultado falso-negativo. Os conceitos, geralmente, estão inversamente relacionados, ou seja, biomarcadores com alta especificidade apresentam baixa sensibilidade e vice-versa. Um biomarcador ideal apresentaria 100% de sensibilidade e especificidade a partir de amostras obtidas por procedimentos pouco invasivos (como exames de urina, sangue, saliva ou lágrimas) e metodologias de análise sensíveis, exatas, rápidas, reprodutíveis e de baixo custo. Tanto a sensibilidade quanto a especificidade dos testes de *screening* podem ser aumentadas usando uma combinação de diversos

biomarcadores, ao invés de apenas um composto-alvo. A pesquisa por biomarcadores está sendo cada vez mais focada em um painel de analitos, *i.e.* investigação simultânea do perfil de diversas moléculas, que permite a diferenciação estatística mais adequada entre pessoas saudáveis e doentes.^{21,27,28}

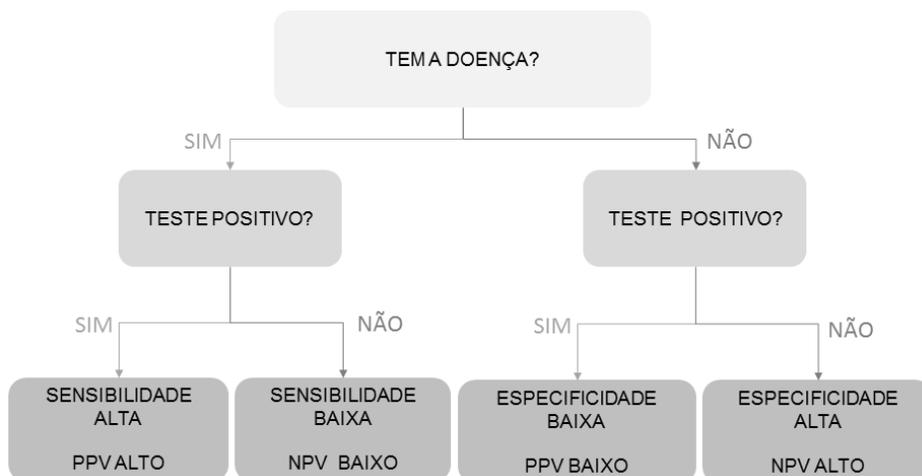


Figura 2 – Ilustração dos conceitos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (PPV) e valor preditivo negativo (NPV).

3. Câncer de próstata e PSA

A próstata é uma glândula que atua na produção de sêmen, líquido que protege e nutre o esperma durante o trajeto pelo trato genital masculino no processo reprodutivo. Apresenta formato e tamanho similar a uma noz, porém com textura esponjosa e interior preenchido por fluido seminal. Está localizada na pélvis, abaixo da bexiga e em torno da uretra, diretamente atrás do osso púbico e na frente do reto (Figura 3). Durante a ejaculação, a estrutura muscular da glândula se contrai, liberando o fluido seminal simultaneamente à liberação de esperma pelos testículos. O PSA é um componente essencial do fluido seminal que só é produzido pelas células epiteliais da próstata.²⁹

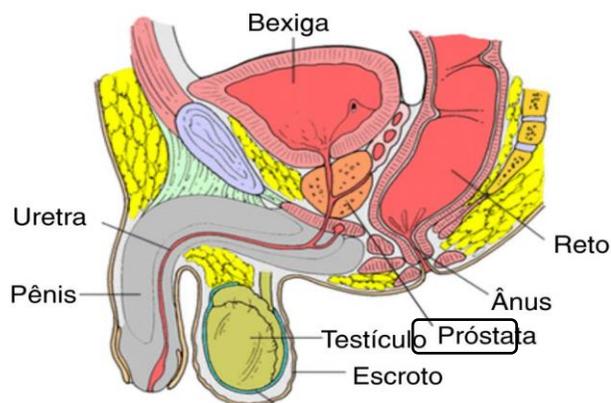


Figura 3 – Localização da próstata no organismo humano. ³⁰

A partir da puberdade, a próstata está sujeita a diversas formas de infecções ou inflamações agudas e crônicas denominadas prostatites, tratadas comumente com antibióticos. A hiperplasia benigna da próstata (BPH, do inglês *benign prostate hyperplasia*), um crescimento benigno da glândula que causa dor e dificuldade para urinar, é uma condição recorrente em homens cuja incidência aumenta com o avanço da idade. Inflamações e BPH causam dores no reto, períneo e abdômen, além de necessidade de urinar frequentemente. O desenvolvimento de tumores malignos, porém, é a condição mais danosa à saúde, sendo que a maior parte dos casos de câncer de próstata não apresenta sintomas claros. Não há cura para o câncer de próstata em estágio avançado (metástase), mas pode ser curado se detectado quando ainda está restrito apenas a próstata. No entanto, o tratamento não é simples e quanto menos desenvolvido o tumor no diagnóstico, maior é a probabilidade de cura. A localização da próstata, no centro de estruturas responsável por funções sexuais, urinárias e intestinais, dificulta o tratamento de tumores. A remoção por cirurgia é complexa devido à presença do osso da pélvis, que fica na frente da glândula, e pode afetar nervos relacionados à função sexual. Procedimentos com radiação, por outro lado, podem atingir a bexiga, a uretra e os testículos, resultando em inflamações, sangramentos e cistites, além de atingir estruturas responsáveis pela ereção. ^{29,31}

O câncer de próstata é a segunda maior causa de mortes por tumores malignos em homens no mundo. A ACS estima que 1 em cada 6 homens

caucasianos (17,6%) e 1 em cada 5 afro-americanos (20,6%) desenvolverá tumor de próstata durante a vida. Homens de pele negra apresentam incidência maior e a idade é um fator impactante nas taxas, sendo que cerca de 80% das autópsias em homens entre 71 e 80 anos apresentam indícios de câncer de próstata, enquanto que entre 30 e 39 anos, o valor é de aproximadamente 30%. A incidência deste tipo de tumor vem aumentando ao longo dos anos, porém um acréscimo abrupto ocorreu no início da década de 90, período no qual os testes de *screening* com PSA foram introduzidos. Como consequência, as taxas de mortalidade apresentaram um declínio constante, o que comprova a importância deste tipo de procedimento para o diagnóstico precoce (Figura 4). Ainda assim, de 10 a 20% dos casos diagnosticados atualmente já estão em metástase e grande parte só é notada após o falecimento do paciente, durante a autópsia. No Brasil, o câncer de próstata é o tipo mais frequente entre os homens em todas as regiões do país, com incidência crescente ao longo dos anos, acompanhando a tendência mundial. ^{2,3,13,32,33}

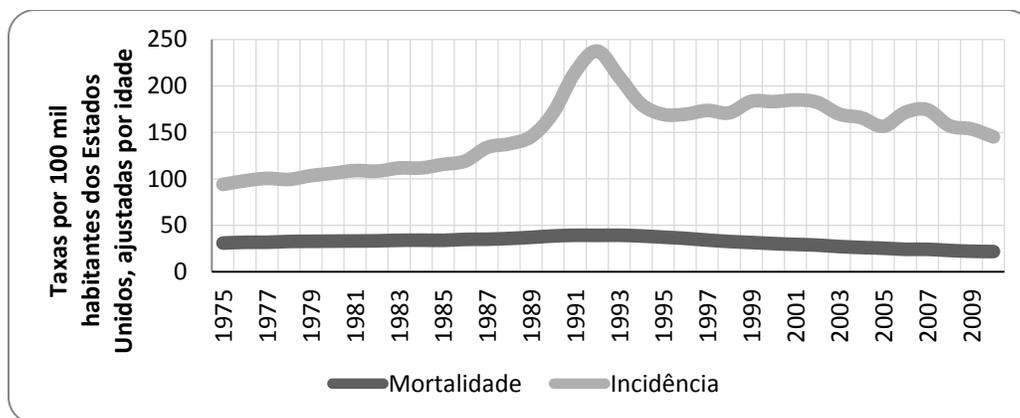


Figura 4 – Comparação das taxas de incidência e mortalidade de câncer de próstata por 100 mil habitantes dos Estados Unidos. ³

O câncer de próstata possui como principal biomarcador tumoral o PSA, normalmente presente no sangue de todos os homens, porém níveis elevados estão relacionados à presença de tumores. O PSA é uma serina-protease que possui como principal função a liquefação de sêmen coagulado através da

clivagem de proteínas de alta massa molecular, garantindo que o esperma tenha liberdade de movimentação para atingir o óvulo durante o processo reprodutivo. É excretado tanto pelo tecido benigno quanto pelo maligno, porém o segundo produz cerca de 20 vezes mais PSA. O *screening* através de testes de PSA, todavia, ainda é um alvo de discussão na comunidade médica e científica. Apesar do aumento da taxa de diagnósticos e redução da mortalidade observados após sua introdução, o biomarcador tem sensibilidade reduzida, característica que pode resultar em adiamento do diagnóstico. A concentração de PSA em soro sanguíneo é considerada normal entre 0 e 4 ng/mL, para a qual o biomarcador apresenta sensibilidade de cerca de 20-25%, *i.e.* 75-80% dos casos de câncer não são diagnosticados, enquanto que a especificidade é *c.a.* 90%, ou seja, cerca de 10% dos homens que não possuem câncer passarão por uma biópsia desnecessária. O limite de 4 ng/mL em soro sanguíneo, portanto, minimiza o risco de um indivíduo que não tem a doença passar por uma biópsia desnecessária, porém falha no objetivo principal de um biomarcador tumoral, que é o diagnóstico, já que gera porcentagem expressiva de resultados falso-negativos. O envelhecimento é um fator que leva ao crescimento benigno do tecido da próstata, portanto as concentrações de PSA consideradas normais variam com a idade do paciente, sendo que, de 40 a 49 anos, níveis de até 2,5 ng/mL são considerados saudáveis; de 50 a 59, até 3,5 ng/mL; de 60 a 69, 4,5 ng/mL; e de 70 a 79, 6,5 ng/mL. Abaixo de 50 anos, testes de *screening* por PSA não são indicados pela comunidade médica devido à baixa incidência da doença e ao elevado custo para os sistemas de saúde. Os níveis de corte ajustados por idade resultam em menor quantidade de biópsias desnecessárias em indivíduos idosos, mas estão aliados a uma maior probabilidade de resultados falso-negativos, enquanto que níveis de corte menores para homens mais jovens podem levar a falso-positivos. Além da idade, prostatites, biópsias, exames retais e ejaculações podem causar alterações transientes nos níveis de PSA. Assim, seu uso como único biomarcador de diagnóstico não é adequado. A detecção precoce do câncer de próstata também inclui exames de toque retal digitalizado (DRE, do inglês *digital rectal exam*), que estão entre os testes de *screening* mais antigos e são realizados através da

inserção do dedo indicador do médico no reto do paciente. Tal tipo de exame, porém, é negligenciado por grande parte da população masculina devido ao preconceito e ao desconforto associados ao procedimento, além de ser altamente dependente da experiência e passível de erros médicos.³¹⁻³⁴

Os testes de detecção do câncer de próstata, portanto, permanecem incertos e controversos. Os testes de PSA e DRE podem produzir resultados falsos, sendo necessária a biópsia para confirmação - um procedimento altamente invasivo, doloroso e potencialmente perigoso para o paciente. O envelhecimento da população e os falsos resultados obtidos com os métodos de diagnóstico atuais indicam a necessidade de avanços nos testes de *screening* através de novos biomarcadores tumorais, que corroborem com os já existentes, para garantir melhor qualidade de vida, já que o diagnóstico precoce pode ser a diferença entre a vida e a morte.³²⁻³⁴

4. Nucleosídeos como potenciais biomarcadores tumorais

As macromoléculas de alta massa molecular de RNA e DNA são ácidos nucleicos que atuam na síntese de proteínas e regulação do metabolismo. São constituídas por unidades de açúcar (ribose para RNA e desoxirribose para DNA), bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina e timina para DNA; e uracila, substituindo a timina, para RNA) e ligações de fosfato. Os nucleosídeos são formados por uma base nitrogenada e uma unidade de açúcar. Os nucleotídeos, por outro lado, apresentam também o grupo fosfato. As bases apresentam átomos de oxigênio e nitrogênio, que agem como doadores ou aceptores de hidrogênio, e possuem caráter moderadamente polar.^{35,36}

O RNA possui grupos 2'-OH ligados à ribose que estão envolvidos em reconhecimento, processamento e propriedades catalíticas, com pKa variando entre 12 e 14. Apresenta uma ampla gama de funções dentro das células e pode ser classificado como: mensageiro (mRNA), produto da transcrição do DNA que contém trincas de bases nitrogenadas que codificam aminoácidos específicos; transportador (tRNA), molécula que promove a adaptação entre os aminoácidos e

as trincas de genes no mRNA dentro dos ribossomos; e ribossomal (rRNA), complexo com proteínas ribossomais para formar as organelas nas quais a síntese de proteínas ocorre. As moléculas de tRNA e rRNA são produzidas a partir de uma molécula de mRNA precursora pela ação da enzima RNA-polimerase.

35,36

Após a síntese do tRNA, enzimas específicas podem causar modificações pós-transcricionais simples ou complexas em locais específicos da cadeia do RNA, importantes para a especificidade, fidelidade e eficiência de suas funções, além de possivelmente atuarem na estabilidade da estrutura tridimensional ou conformação da macromolécula. Após o cumprimento de suas funções, as cadeias de tRNA são degradadas ao nível de nucleosídeos, sendo que os não-modificados podem ser reutilizados pelo organismo na construção de novas moléculas de RNA ou fluem pela corrente sanguínea e são excretados na urina, podendo ser degradados em ácido urinário (adenosina e guanosina), β -alanina (citidina e uridina) e β -aminoisobutirato. Os nucleosídeos modificados, por sua vez, não são substratos de enzimas do organismo, portanto são totalmente excretados. Nucleosídeos modificados ocorrem na maioria dos ácidos nucleicos, porém grande parte dos nucleosídeos presentes nos fluidos biológicos provém do tRNA. Há mais de cem nucleosídeos naturalmente modificados conhecidos e as modificações consistem principalmente em metilações da base nitrogenada ou do açúcar, porém outras ligações também podem ocorrer, como tiolação, hidroxilação, modificação por aminoácidos e dihidrolação da uridina.³⁷⁻³⁹

Durante a carcinogênese, a taxa de replicação celular aumenta exponencialmente. Como consequência, a degradação do RNA também cresce, o que leva a maiores concentrações de nucleosídeos nos fluidos biológicos. Em adendo, as enzimas de metilação apresentam hiperatividade em células cancerígenas, causando maior excreção de nucleosídeos modificados. Assim, os níveis de nucleosídeos, modificados ou não, em sangue e urina estão relacionados à presença de tumores e podem atuar como potenciais biomarcadores tumorais. O primeiro estudo que relata diferenças nas concentrações de produtos de degradação de ácidos nucleicos em pacientes com

câncer data de 1960, com ênfase para pseudouridina.^{40,41} A partir de tal ponto, diversos estudos foram publicados reportando maiores concentrações de nucleosídeos na presença de tumores. Espera-se que tais analitos apresentem concentrações diferenciadas em todos os tipos de câncer, ou seja, são potenciais biomarcadores tumorais para todas as patologias de base.^{38,42}

Já foram realizados estudos quanto à variabilidade de concentração dos nucleosídeos na urina de indivíduos com características diferentes, *i.e.* idade, alimentação, gênero, estados patológicos e infecções bacterianas. A idade e a dieta não alteram significativamente os níveis dos nucleosídeos e mulheres apresentam concentrações ligeiramente maiores do que homens. Crianças, por outro lado, apresentam concentrações mais elevadas inerentes ao processo de crescimento humano, bem como gestantes. Doenças como hepatite, cirrose, pancreatite, colecistite, enterite, artrite reumatoide, colite ulcerativa e psoríase afetam ligeiramente os níveis dos nucleosídeos estudados. Infecções bacterianas, porém, aumentam as concentrações de nucleosídeos na urina dos pacientes, principalmente no caso de infecções urinárias. Na presença de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*), ocorre também aumento nos níveis de nucleosídeos. Os níveis de nucleosídeos para adultos (pós puberdade) na ausência de gravidez, infecções e AIDS, portanto, são aproximadamente constantes, o que indica a utilidade de tais compostos como potenciais biomarcadores tumorais.^{38,39,43,44}

Existem diversos trabalhos publicados na literatura reportando a análise de nucleosídeos como potenciais biomarcadores tumorais de diversos tipos de câncer: colorretal⁴⁵⁻⁴⁷, nasofaríngeal⁴⁸, mamário⁴⁹⁻⁵⁷, de bexiga^{58,59}, urológico⁶⁰, linfoma⁶¹, hepático⁶², leucemia⁵¹, esofageal⁶³, de tireoide⁶⁴, cervical⁵⁷, de ovários⁵⁷, de útero⁶⁵, de boca⁶⁶ e de pulmão^{67,68}. A maior parte de tais trabalhos tem foco principal na análise de urina, uma matriz complexa que apresenta altas concentrações de sais e é altamente influenciada pela saúde do sistema renal do indivíduo^{38,43,45-55,57-59,61,62,65,66,68-82}. A concentração de nucleosídeos em soro sanguíneo, matriz com menor quantidade de interferentes e altamente representativa do estado do organismo, é raramente estudada.^{63,67,83,84} O câncer

de próstata, em adendo, ainda não foi avaliado quanto a tais analitos como potenciais biomarcadores e a relação entre nucleosídeos específicos e esta patologia de base também não foi determinada.

5. Análise de nucleosídeos por técnicas instrumentais

Os nucleosídeos são moléculas com caráter relativamente polar, hidrofílicas e neutras em uma ampla faixa de pHs. São ionizados, em sua maioria, em pHs acima de 12, e apresentam baixa massa molecular, além de absorverem radiação eletromagnética tanto na luz visível quanto na ultra-violeta (UV). Tais características permitem sua análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e suas variantes de ultra-eficiência (UPLC) e interação hidrofílica (HILIC), bem como por eletroforese capilar (CE). Análises por cromatografia gasosa já foram descritas, porém a necessidade de derivatização da amostra após a extração para tornar os analitos voláteis representa um impedimento ao uso da técnica devido ao tempo e esforços necessários, bem como à possíveis perdas dos analitos. Métodos enzimáticos e imunoenaios também podem ser empregados, porém apresentam aplicabilidade limitada.⁸⁵

A cromatografia líquida é uma técnica altamente disseminada nos laboratórios de análise e muito bem estabelecida na comunidade científica. Os nucleosídeos são comumente analisados empregando-se coluna com fase estacionária apolar C18 e fase móvel contendo tampão aquoso e um solvente orgânico, como acetonitrila ou metanol, em diferentes proporções. Porém, análises por cromatografia líquida apresentam como maiores desvantagens o alto consumo de solventes e a grande geração de resíduos orgânicos, cujo descarte dentro dos preceitos da química verde é dificultado. Em análises de rotina, como necessário para testes de *screening*, tais fatores aumentam os custos, além de prejudicarem o meio ambiente. UPLC emprega colunas com partículas de diâmetro reduzido, associadas à alta pressão, e proporciona análises de alta eficiência em curto tempo empregando pequenos volumes de solvente. Ainda assim, a técnica tem

como desvantagens principais a menor vida útil das colunas cromatográficas e o alto custo de compra e manutenção de equipamentos.^{85,86}

A CE é uma técnica analítica amplamente empregada em estudos biomédicos, clínicos e forenses.^{87,88} A versatilidade da técnica, aplicável para moléculas com características físico-químicas diversas, associada ao baixo volume de amostra consumido em cada análise (na faixa de nL) e ao consumo mínimo de solventes orgânicos, torna-a ideal para análises clínicas em processos de *screening*. Além disso, CE geralmente possibilita análises rápidas, com altas resoluções e eficiências, aliadas a simplicidade de instrumentação e alta versatilidade. São empregados capilares sem fase estacionária, mais baratos e mais simples do que as colunas cromatográficas, que possibilitam longos períodos de uso sem a necessidade de troca. Na análise de nucleosídeos, o modo de cromatografia micelar eletrocinética capilar (MECK, do inglês *micellar electrokinetic chromatography*) é geralmente empregado, já que o caráter predominantemente neutro dos analitos em uma ampla faixa de pH dificulta sua separação por eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *capillary zone electrophoresis*), porém a eletrocromatografia capilar (CEC, do inglês *capillary electrochromatography*), que combina princípios de separação de CE com HPLC, também já foi descrita para análise de nucleosídeos.⁸⁹ Eletrólitos de corrida (BGE, do inglês *background electrolyte*) compostos por borato e fosfato com pHs entre 6 e 10 são comumente empregados. As micelas são geralmente formadas pela adição do tensoativo aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecylsulfate*) e auxiliam na separação dos analitos de acordo com suas hidrofobicidades. Entretanto, as altas concentrações de SDS (160 a 300 mmol/L) necessárias para atingir separação dos picos em linha de base causam precipitação do sal dentro do capilar e em partes do equipamento que entram em contato com o BGE, como eletrodos e *prepunchers*, o que pode levar a entupimentos e quebras dos capilares, bem como a necessidade de manutenção constante, que demandam tempo e dinheiro. A aplicação de tais metodologias em análises de rotina torna-se, portanto, inviável.^{39,53,60,64,65,69,78,90,91}

A estrutura química dos nucleosídeos permite sua detecção por diversas técnicas, como espectrofotometria de absorção na faixa do UV-Visível (UV-Vis) e espectrometria de massas (MS). A MS leva a uma segunda dimensão de separação e possibilita a identificação inequívoca dos nucleosídeos, porém necessita de instrumentação avançada e com altos custos de aquisição e manutenção, portanto seu uso em *screening* é dificultado por não estar disponível em grande parte dos laboratórios de análises clínicas e hospitais, principalmente em países de baixa renda, como o Brasil. É majoritariamente empregada com ionização por electrospray (ESI) no modo positivo. A detecção UV-Vis pode ser empregada entre 254 e 260 nm, comprimentos de onda de absorção máxima da maior parte dos nucleosídeos estudados. A técnica representa uma alternativa eficiente e de baixo custo para análises de rotina, porém tem como principais desvantagens a baixa sensibilidade e a impossibilidade de confirmação da identidade dos analitos. Quando aliada à CE, a detectabilidade é reduzida em relação à HPLC ou UPLC devido ao menor caminho óptico fornecido pelo sistema, correspondente ao diâmetro do capilar, porém tal fator pode ser minimizado através do uso de estratégias de pré-concentração de amostra e capilares com cela de detecção estendidas.^{39,85}

Os métodos analíticos já publicados, portanto, apresentam deficiências que restringem sua aplicabilidade em análises clínicas de rotina, como necessário em processos de *screening*. Em adendo, um universo amostral amplo, constituído tanto por indivíduos saudáveis quanto por portadores da doença, deve ser estudado e empregado em estratégias estatísticas e quimiométricas para que o diagnóstico de amostras desconhecidas seja corretamente efetuado; entretanto, grande parte dos estudos emprega grupos restritos de indivíduos, que não são estatisticamente representativos, e realizam a validação da metodologia analítica em soluções aquosas, desconsiderando quaisquer efeitos da matriz. Assim, a aplicabilidade de tais analitos como biomarcadores tumorais para *screening* ainda necessita de melhorias.³⁹

Capítulo 2

Objetivos

1. Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivos o desenvolvimento e a validação de um método de análise de nucleosídeos em soro sanguíneo de indivíduos sadios e com câncer de próstata por CE-UV.

2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Otimização de um novo método de análise de nucleosídeos em soro sanguíneo por CE-UV empregando inversão de fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *electrosmotic flow*), com uso de menor quantidade de tensoativo, visando ampla aplicabilidade clínica e auxílio na obtenção de diagnósticos mais exatos para os estágios iniciais do câncer de próstata quando combinado aos testes de *screening* já disponíveis;
- Avaliação do tensoativo catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, do inglês *cetyltrimethylammonium bromide*) como alternativa ao SDS, em busca de redução nos problemas gerados pelas altas concentrações de tal sal;
- Avaliação de estratégias de pré-concentração de amostra para maximizar a detectabilidade dos analitos, tornando-a mais adequada à matriz biológica escolhida;
- Validação do método baseada na legislação brasileira e em normas internacionais (americanas e europeias) executada em um *pool* de amostras de soro sanguíneo de indivíduos sadios para garantir a adequabilidade da metodologia à matriz biológica;
- Análise de amostras de soro sanguíneo de pacientes com câncer de próstata em comparação com indivíduos saudáveis;
- Estudo quimiométrico para verificar a potencial característica dos nucleosídeos como biomarcadores tumorais.

Capítulo 3

Desenvolvimento da metodologia de análise por CE

1. Materiais e equipamentos

Utilizaram-se os reagentes: ácido bórico, fosfato de sódio monobásico monohidratado e hidróxido de sódio em pastilhas da fabricante Merck S.A (Darmstadt, Alemanha); CTAB da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha); e metanol da Carlos Erba (Milão, Itália). O ácido clorídrico foi obtido da empresa LabSynth (São Paulo, Brasil) e a acetona, utilizada como marcador de EOF, da Nuclear (São Paulo, Brasil). Os padrões analíticos de nucleosídeos citidina (C), adenosina (A), 1-metiladenosina (1mA), timidina (T), uridina (U), 5-metiluridina (5mU), guanosina (G), xantosina (X), inosina (I) e 2-deoxiadenosina (2dA), além do padrão interno 8-bromoguanosina (8BrG) (Figura 5) foram adquiridos na empresa Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Todas as soluções empregadas no desenvolvimento da metodologia foram preparadas utilizando-se água purificada por sistema Milli-Q proveniente da Millipore (Billerica, EUA). As soluções foram filtradas em filtros não-estéreis de nylon Millex de 0,20 µm da Millipore (Cork, Irlanda) antes de serem injetadas no equipamento de CE.

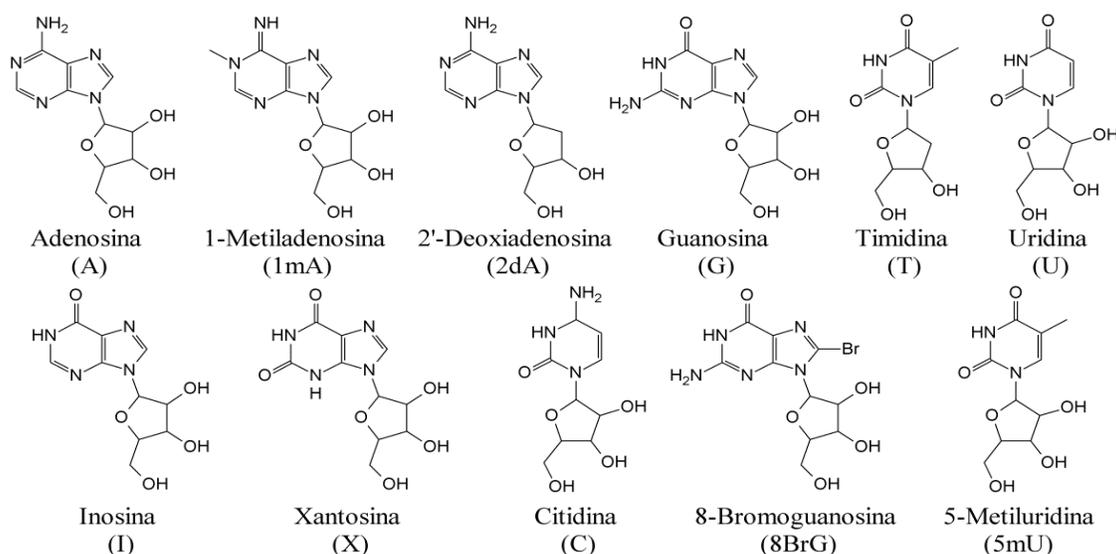


Figura 5 – Estruturas químicas dos nucleosídeos e do padrão interno (8BrG) investigados.

O pH das soluções tampão foi ajustado com soluções de NaOH 1,0 mol/L, NaOH 0,1 mol/L ou HCl 0,1 mol/L com pHmetro de bancada Metrohm modelo 827 (Herisau, Suíça). Os BGEs contendo tensoativo e modificador orgânico foram preparados através da dissolução de tais reagentes na solução tampão com pH previamente ajustado.

O equipamento utilizado foi um CE-UV modelo CE7100 com software 3D-CE ChemStation, ambos da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha). Capilares de sílica fundida com dimensões de 50 µm de diâmetro interno (i.d., do inglês *internal diameter*), 56 cm de comprimento efetivo (L_{eff}) e 62,5 cm de comprimento total (L_T), adquiridos da Polimicro Technologies (Phoenix, Estados Unidos), foram empregados durante o desenvolvimento da metodologia. Tais dimensões foram escolhidas de acordo com a disponibilidade de capilares no modelo *bubble cell* ou *extended light path* (cela de detecção estendida), fornecidos pela Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha), empregados durante a otimização da injeção e validação da metodologia. O melhor comprimento de onda para detecção dos nucleosídeos foi determinado através de espectros UV-Vis obtidos no CE como 260 nm.⁹¹

Foram empregadas soluções na concentração de 1,0 mmol/L dos padrões de nucleosídeos C, A, T, 2dA, U, 5mU, G, X, I e do padrão interno 8BrG durante a maior parte da otimização. Eventuais alterações de tal configuração serão explicitadas ao longo do texto. O padrão de 1mA foi eliminado da otimização após alguns testes iniciais devido à observação de um pico eletroforético que indicava sua degradação e à impossibilidade de adquirir um novo produto, já que sua produção foi descontinuada pelo fabricante.

2. Metodologia inicial

O desenvolvimento da metodologia visou a obtenção de um procedimento rápido, de baixo custo e robusto, com alta aplicabilidade para análises clínicas. As condições iniciais empregadas foram baseadas no método publicado por Jiang *et al.*⁸¹ Tal trabalho apresenta a separação de 12 nucleosídeos em menos de 7

minutos através do uso de BGE contendo borato de sódio 25 mmol/L, fosfato de sódio 25 mmol/L e CTAB 25 mmol/L em pH 9,50 e tensão de -15 kV. O EOF é invertido devido ao uso do tensoativo catiônico e as concentrações de sal são mais baixas do que as comumente usadas para SDS. Jiang *et al.* apresentam, ainda, a validação do método em meio aquoso através da construção de curvas analíticas e avaliação de reprodutibilidade e recuperação, porém não mostram dados de precisão e exatidão, além de desconsiderarem efeitos da matriz escolhida (urina).

O método apresenta como principais diferenciais a aplicação de tensão negativa e uso de tensoativo catiônico em um BGE misto de bórax e fosfato. O tensoativo, além de proporcionar a formação de micelas e a separação dos analitos por hidrofobicidade, interage com os grupos silanóis presentes nas paredes do capilar, tornando sua superfície interna positiva através da formação de uma camada de recobrimento dinâmico. Assim, o EOF resultante tem caráter predominantemente negativo e migra na direção do ânodo (positivo), configuração contrária à normalmente empregada em CE. A aplicação de tensão negativa faz com que o ânodo esteja na posição de *outlet* (saída do capilar), garantindo que o EOF ocorra no sentido da entrada (*inlet*) para a saída do capilar, através da cela de detecção (Figura 6).

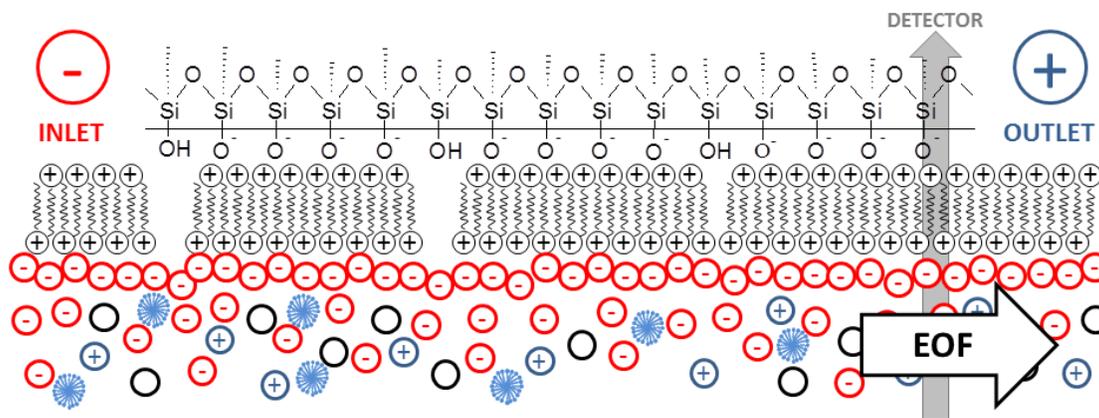


Figura 6 – Inversão do EOF causada pela formação de uma camada de recobrimento dinâmico positivo sobre a superfície do capilar de sílica fundida através da atração coulômbica entre os grupos silanóis negativos e o tensoativo catiônico.

O íon borato desempenha tanto papel de agente tamponante como de agente complexante, pois forma complexos com polióis em soluções alcalinas através de ligações covalentes reversíveis. Essa interação já é conhecida há mais de 100 anos e foi primeiramente empregada para a análise de carboidratos. Atualmente, sabe-se que o borato apresenta afinidade por glicoproteínas, lipoproteínas, proteases, catecóis, hemoglobina, nucleosídeos, nucleotídeos e ácidos nucleicos. A interação é baseada na esterificação entre os grupos hidroxila do diol, idealmente ligados a carbonos adjacentes e em configuração coplanar (1,2-cis-diol), com borato em meio básico. Interações com 1,3-cis-diols também ocorrem, mas resultam em ligações mais fracas devido à geometria menos favorável. O mecanismo de tal ligação não está completamente elucidado, porém é iniciado pela hidroxilação do íon boronato em meio básico, resultando no ânion tetraédrico, que forma ligações covalentes com grupos cis-diols. (Figura 7). O diéster cíclico resultante pode ser hidrolisado em meio ácido, revertendo a reação e liberando o analito. O equilíbrio de complexação depende apenas do pH do meio e da concentração total de boro. A mobilidade eletroforética do substrato será alterada de acordo com a carga do complexo formado, predominantemente negativa, cuja magnitude é determinada pela posição de equilíbrio e, portanto, pela estabilidade do complexo. Em concentração fixa do poliols, a concentração de complexos aumenta com o aumento da concentração de borato e também com o aumento do pH. Como a complexação de polióis é fortemente dependente do pH do tampão e da concentração de borato, ambos os parâmetros podem ser ajustados para uma otimização da separação. Maiores pHs e concentração de boro resultam em maior proporção da espécie complexada e maior mobilidade efetiva.^{92,93}

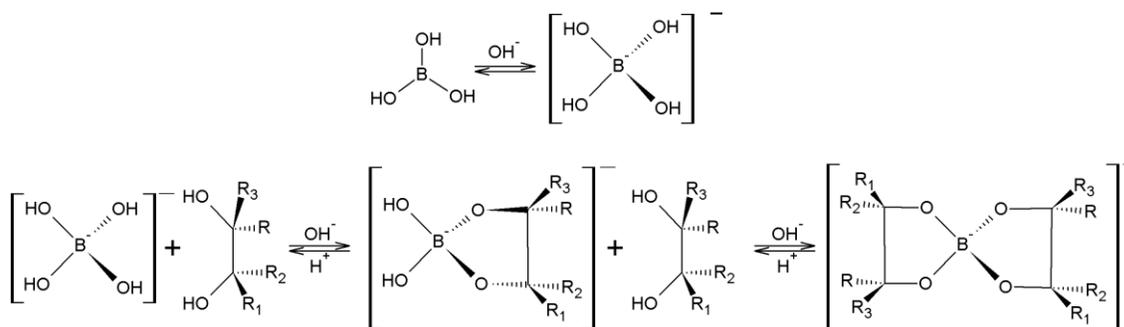


Figura 7 – Interação entre ânions borato e analitos contendo grupos 1,2-cis-diol em soluções aquosas. A eliminação de água durante a formação do complexo foi suprimida para facilitar a visualização.^{93,94}

Foram realizadas análises de mistura dos padrões de nucleosídeos em condições baseadas na metodologia proposta por Jiang *et al.*⁸¹, porém os eletroferogramas resultantes apresentaram picos com baixa resolução e co-migração dos padrões (Figura 8). Decidiu-se, portanto, otimizar os parâmetros de separação em busca de maiores resoluções. Foram avaliados: composição e concentração do BGE por ensaios bivariados, efeito de eletrólito misto, pH do BGE, temperatura (T), tensão (V), condicionamento do capilar, adição de modificador orgânico e tempo de injeção hidrodinâmica (50 mbar).

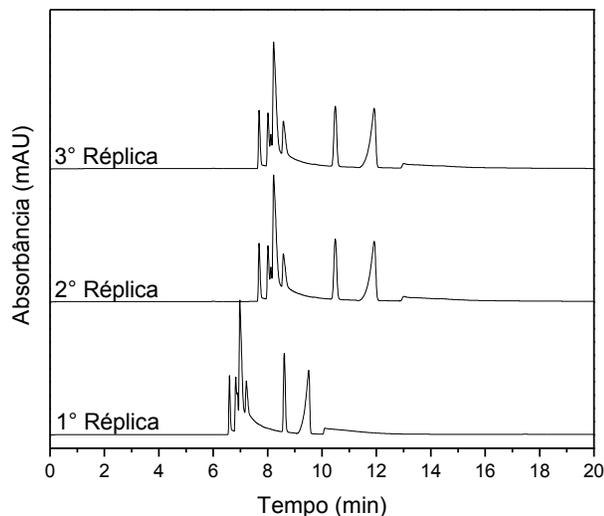


Figura 8 – Eletroferogramas obtidos com condições baseadas na metodologia proposta por Jiang *et al.*⁸¹, *i.e.* BGE tetraborato de sódio (bórax) 25 mmol/L, fosfato de sódio 25 mmol/L e CTAB 25 mmol/L em pH 9,50; V = -15 kV; T = 25°C; injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 15 s; padrões de nucleosídeos C, A, 1mA, 2dA, T, U, 5mU, G, X, I e 8BrG; detecção em 260 nm.

Durante a otimização da metodologia, decidiu-se empregar a resolução como parâmetro principal para avaliação das condições investigadas. A condição com valores mais altos ou com o menor número de pares de picos com resolução menor que 1,5 foi escolhida como ótima, já que tal número corresponde a separação em linha de base. Todos os ensaios apresentados foram realizados em triplicata.

3. Composição do BGE

3.1. Ácido bórico e CTAB

Uma abordagem multivariada, com 2 fatores (concentração de ácido bórico e CTAB) e 4 níveis (10, 30, 50 e 70 mmol/L), foi realizada para otimização simultânea das concentrações de ácido bórico e CTAB no BGE. O aumento da concentração de ácido bórico favorece a formação de complexos com grupos cis-

diol, alterando a mobilidade dos analitos. Maiores concentrações de CTAB, por outro lado, aumentam a concentração de micelas, além de aumentarem a força iônica do BGE, o que reduz a mobilidade do EOF e favorece a ocorrência de efeito Joule. A CMC (concentração micelar crítica, do inglês *critical micelle concentration*) do tensoativo CTAB é de *c.a.* 1 mmol/L em água, portanto a formação de micelas ocorre em todas as concentrações avaliadas. Ambos os sais, assim, interferem na separação entre os analitos.^{95,96}

A melhor condição escolhida corresponde a ácido bórico 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L, conforme os eletroferogramas e gráficos de resolução em função da composição do tampão (Figuras 9 e 10). Dois pares de picos (3-4 e 8-9) ainda apresentaram resolução abaixo do valor mínimo de 1,5, *i.e.* suas separações não atingiram a linha de base.

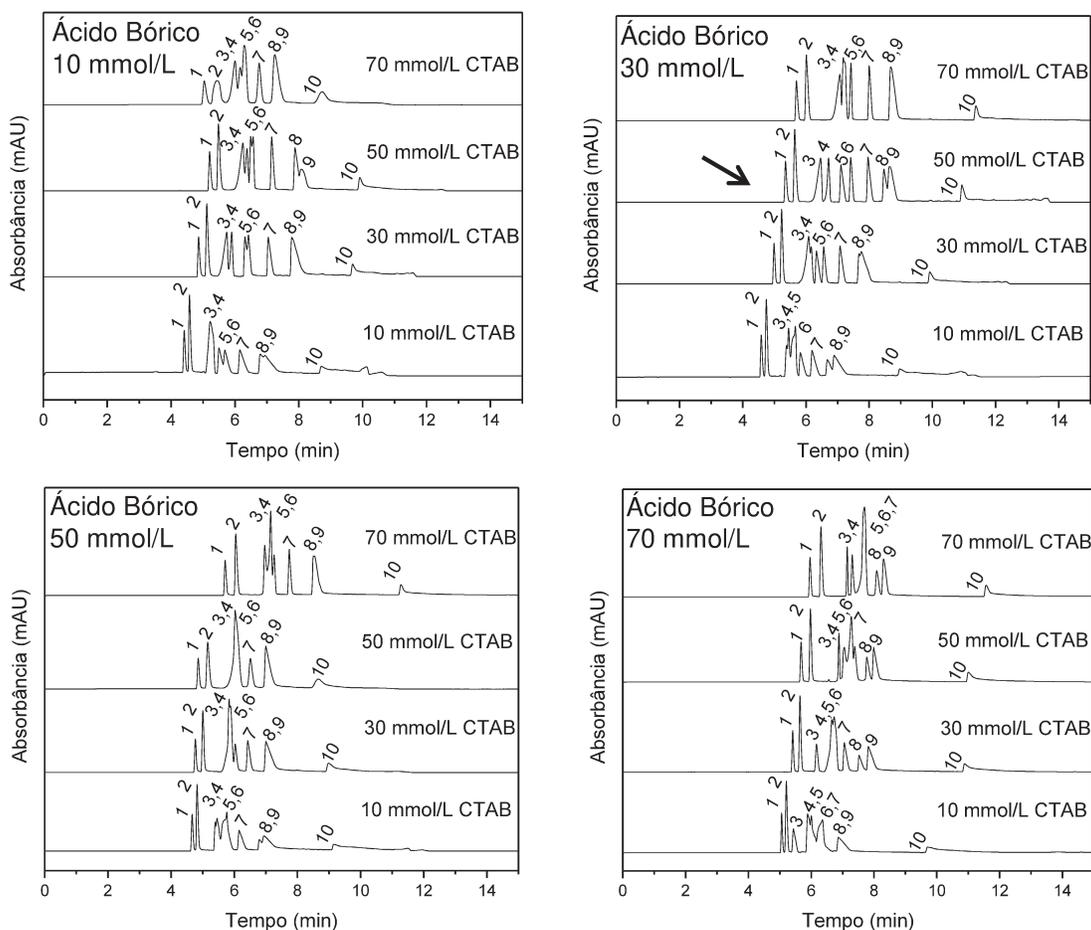


Figura 9 – Eletroferogramas obtidos para a otimização da concentração de borato e CTAB no BGE. A melhor condição está destacada pela seta (ácido bórico 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L). Condições: BGE ácido bórico e CTAB em concentrações variadas e pH 9,50; V = -15 kV; T = 25°C; injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 15 s; padrões de nucleosídeos C, A, 2dA, T, U, 5mU, G, X, I e 8BrG; detecção em 260 nm.

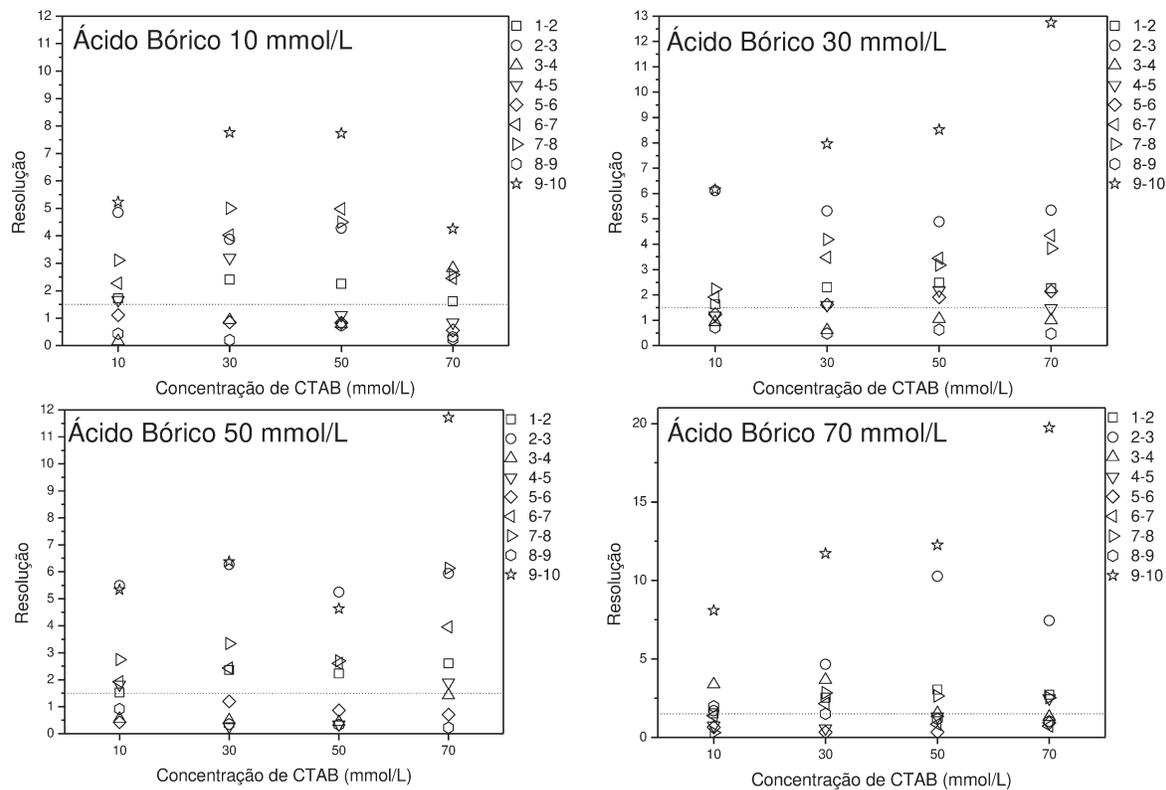


Figura 10 – Resoluções obtidas para a otimização da concentração de ácido bórico e CTAB no BGE. Condições: análogas às da Figura 9.

3.2. Fosfato e CTAB

Um planejamento multivariado com 2 fatores (concentração de fosfato de sódio e CTAB) e 4 níveis (10, 30, 50 e 70 mmol/L) foi realizado para otimização simultânea das concentrações de fosfato de sódio monobásico e CTAB no BGE. O fosfato não possibilita a formação de complexos com os analitos, portanto seu uso leva à perda de uma dimensão de separação. Em adendo, o fosfato, com pKas de 2,1, 7,2 e 12,7, apresenta baixo caráter tamponante no pH 9,50, o que leva à maiores variações de pH durante as análises e baixa repetibilidade dos resultados. Ainda assim, tal sal foi avaliado por estar presente na metodologia proposta por Jiang *et al.*, bem como em outros trabalhos publicados na literatura.^{46,60,64,65,78,81,97}

A melhor condição corresponde a fosfato 70 mmol/L e CTAB 70 mmol/L, as maiores concentrações avaliadas, conforme apresentado nos gráficos de resolução e eletroferogramas (Figuras 11 e 12). Observou-se, porém, resoluções menores em comparação com o BGE contendo apenas ácido bórico. Os mesmos pares de picos (3-4 e 8-9) apresentaram resoluções menores que 1,5, porém houve perda de resolução para os demais pares em relação ao BGE com ácido bórico, com destaque para 1-2 e 5-6. Por fim, as soluções com 70 mmol/L de CTAB, após permanecerem em repouso por alguns minutos sobre a bancada em temperatura ambiente, apresentaram precipitação devido à alta concentração do sal e sua baixa solubilidade em água, não sendo adequadas para uso rotineiro, pois podem causar entupimentos dos capilares e deposição de sal no interior do equipamento. Assim, o uso de fosfato como único sal presente no BGE foi considerado desfavorável para a separação.

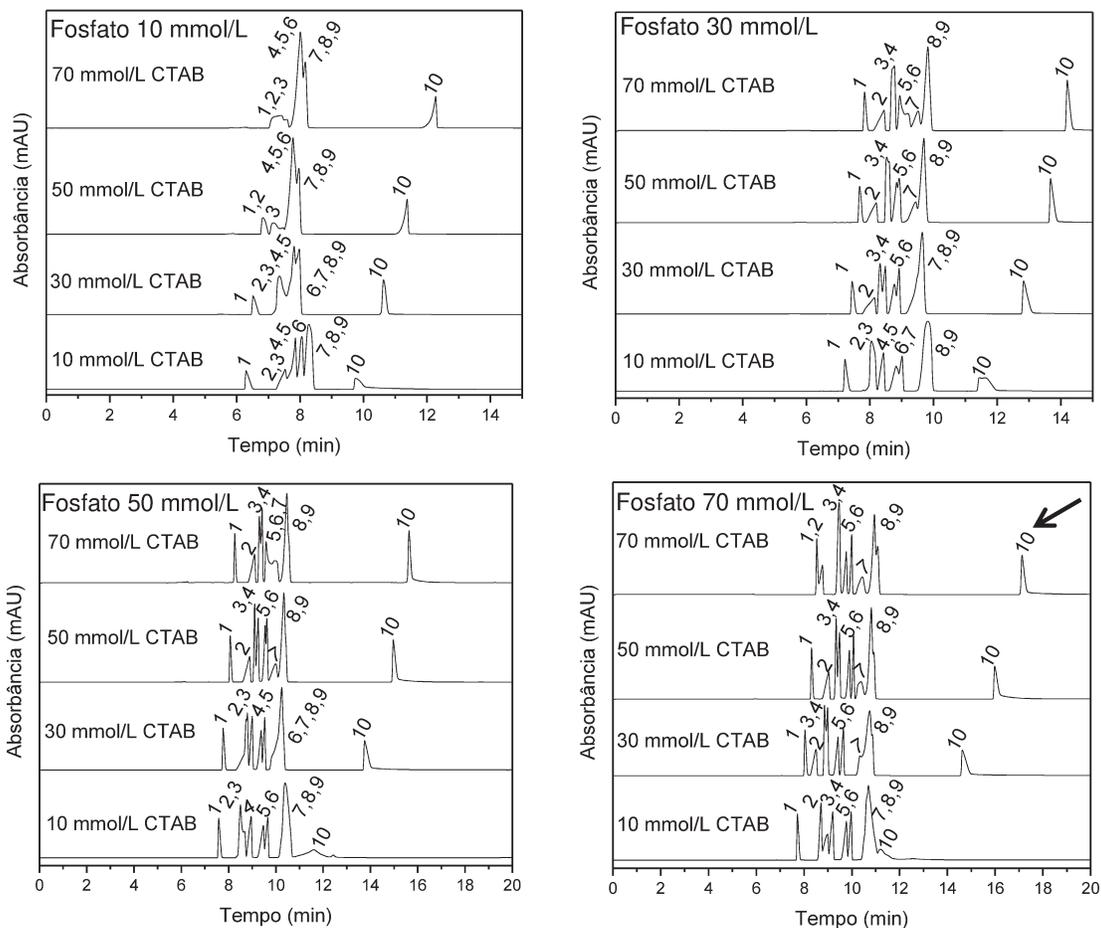


Figura 11 – Eletroferogramas obtidos para a otimização da concentração de fosfato e CTAB no BGE. A melhor condição está destacada pela seta (fosfato 70 mmol/L e CTAB 70 mmol/L). Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE composto por fosfato e CTAB.

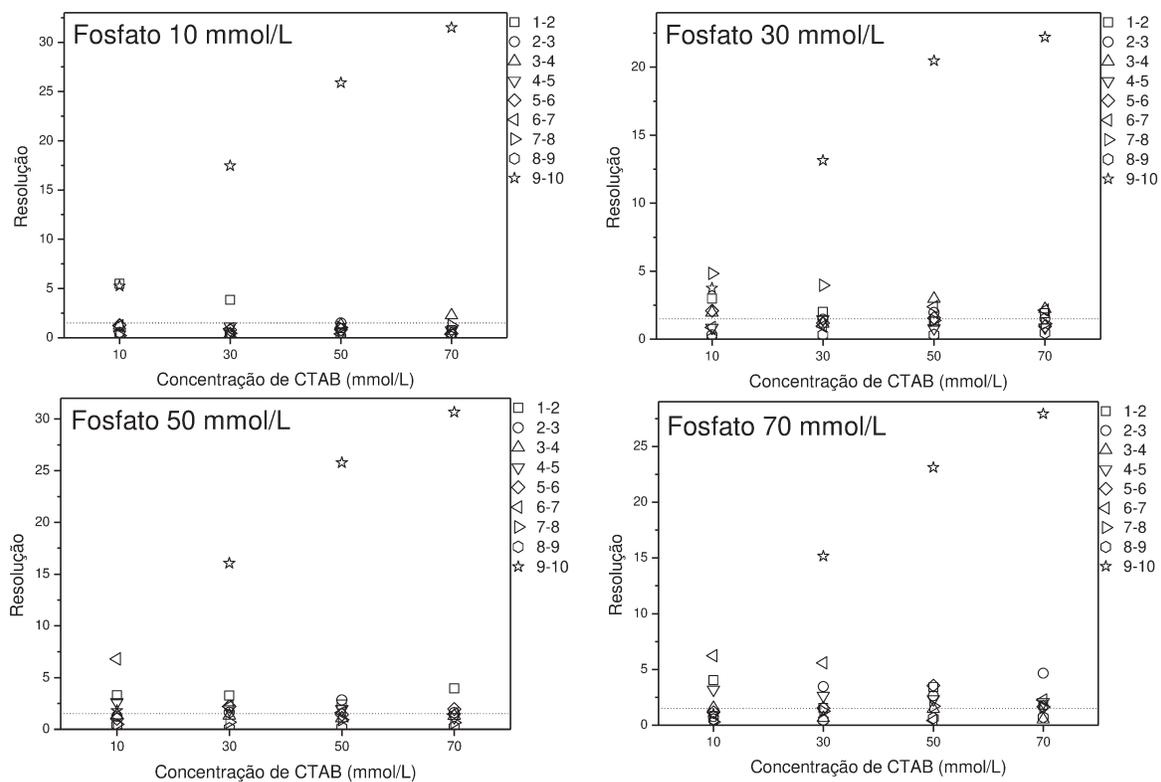


Figura 12 – Resoluções obtidas para a otimização da concentração de fosfato e CTAB no BGE. Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE composto por fosfato e CTAB.

3.3. Eletrólito misto

O uso de eletrólito misto, composto por borato e fosfato, é reportado na maior parte dos trabalhos que descrevem a análise de nucleosídeos por CE-UV.^{46,60,64,65,78,81,97} O pH empregado em grande parte das publicações geralmente está entre 6 e 7, dentro da faixa de tamponamento do fosfato, porém tais valores não favorecem a formação de complexos de borato com os analitos, já que não possibilitam a hidroxilação do íon boronato por não serem básicos. Assim, uma dimensão de separação é perdida e o uso de borato deve ter como principal efeito a alteração da força iônica do meio. Tal condição, portanto, não é ideal para a separação de nucleosídeos. A metodologia proposta por Jiang *et al.*, por outro lado, emprega pH de 9,50, no qual ocorre formação de tampão com o íon borato.⁸¹ Neste caso, o fosfato deve agir apenas na alteração da força iônica do BGE.

As duas melhores condições obtidas para concentração de ácido bórico e CTAB no BGE (ácido bórico 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L; ácido bórico 30 mmol/L e CTAB 30 mmol/L) foram empregadas para verificação do efeito do uso de eletrólito misto com quatro concentrações de fosfato (10, 30, 50 e 70 mmol/L). A melhor condição escolhida corresponde a ácido bórico 30 mmol/L, CTAB 50 mmol/L e fosfato 30 mmol/L, conforme gráficos de resolução e eletroferogramas (Figuras 13 e 14). Observou-se maior quantidade de picos com resolução menor do que 1,5 do que para ácido bórico e CTAB nas mesmas concentrações sem fosfato. Decidiu-se, portanto, que a adição de fosfato não é favorável à separação considerada.

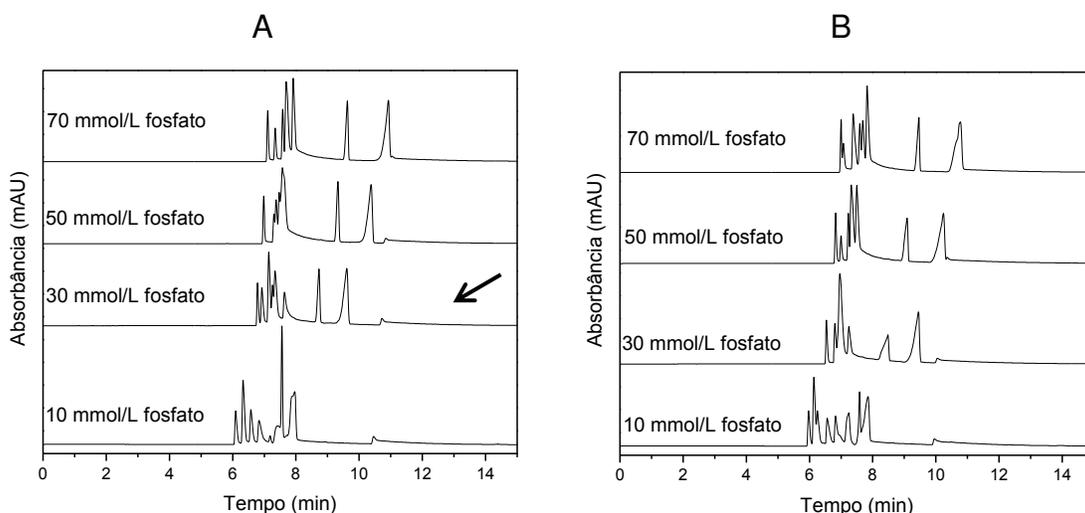


Figura 13 – Eletroferogramas obtidos para a otimização da concentração do eletrólito misto. A melhor condição está destacada pela seta (ácido bórico 30 mmol/L, CTAB 50 mmol/L e fosfato 30 mmol/L). A: ácido bórico 30 mmol/L, CTAB 50 mmol/L; B: ácido bórico 30 mmol/L, CTAB 30 mmol/L. Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE composto por ácido bórico, fosfato e CTAB.

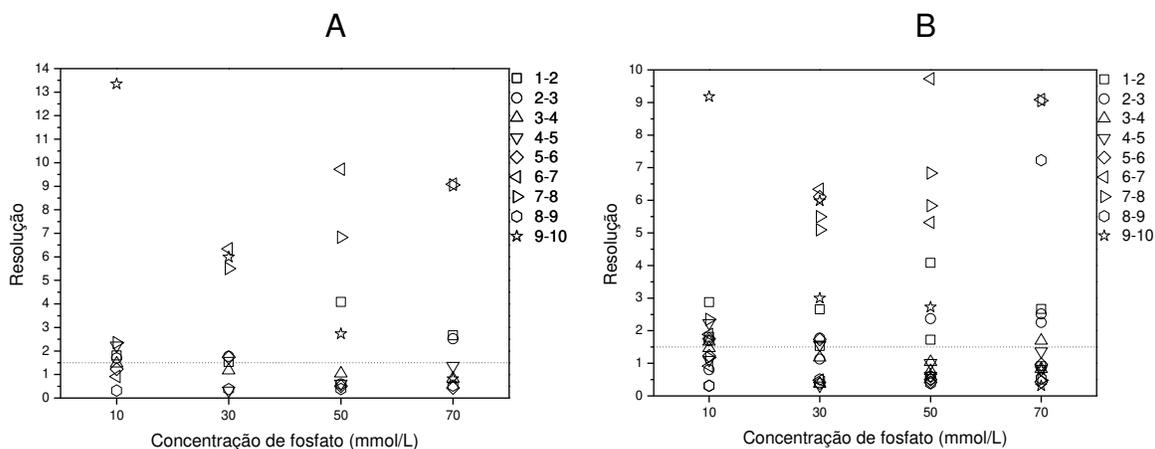


Figura 14 – Resoluções obtidas para a otimização da concentração de sais no eletrólito misto. A: ácido bórico 30 mmol/L, CTAB 50 mmol/L; B: ácido bórico 30 mmol/L, CTAB 30 mmol/L. Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE composto por ácido bórico, fosfato e CTAB.

3.4. Definição da melhor composição do BGE

Comparando-se as melhores condições obtidas para os ensaios realizados, é possível concluir que as resoluções apresentam-se maiores para BGE composto por ácido bórico do que para fosfato e eletrólito misto. A condição ótima escolhida, portanto, é ácido bórico 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L. Ainda assim, dois pares de picos apresentaram resolução menor que 1,5 (3-4 e 8-9).

4. pH do BGE

O efeito da variação de pH no BGE composto por ácido bórico 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L foi avaliado entre 7,50 e 11,00. O borato apresenta pKa de 9,2, portanto seu intervalo de tamponamento está entre 8,2 e 10,2. Os valores foram extrapolados para garantir ampla cobertura de pHs, mas destaca-se que os pHs abaixo de 8,2 e acima de 10,2 não resultam em meio tamponado.

O pH do eletrólito interfere na ionização dos grupos silanóis presentes na parede do capilar. Os grupos silanóis em materiais de sílica fundida se tornam totalmente desprotonados por volta de pH 8,5, sendo que a mobilidade do EOF aumenta com o aumento do pH até esse valor.⁹⁸ O pKa dos nucleosídeos, por sua vez, está entre 12,5 e 13,0 para a maior parte dos padrões estudados (Tabela 1).^{35,36} Assim, os pHs escolhidos não devem interferir significativamente na ionização da maior parte dos analitos, mas principalmente na mobilidade do EOF. Estes, porém, não são os únicos parâmetros que influenciam na ordem de migração dos analitos, já que o tensoativo presente no BGE proporciona um mecanismo de separação adicional regido pelas diferenças de hidrofobicidade. Em adendo, valores mais altos de pH favorecem a complexação de polióis por borato.

Tabela 1 – Valores de pKa de alguns dos nucleosídeos estudados. ^{35,99}

Nucleosídeo	pKa
C	4,1; 12,5
A	3,6; 12,5
T	9,8
U	9,3; 12,5
G	2,2; 9,5
X	5,5; 13,0
I	1,2; 8,9; 12,5

A melhor condição escolhida corresponde ao pH 10,00 (Figuras 15 e 16). Porém os pares de picos 3-4 e 8-9 ainda não atingiram resolução em linha de base.

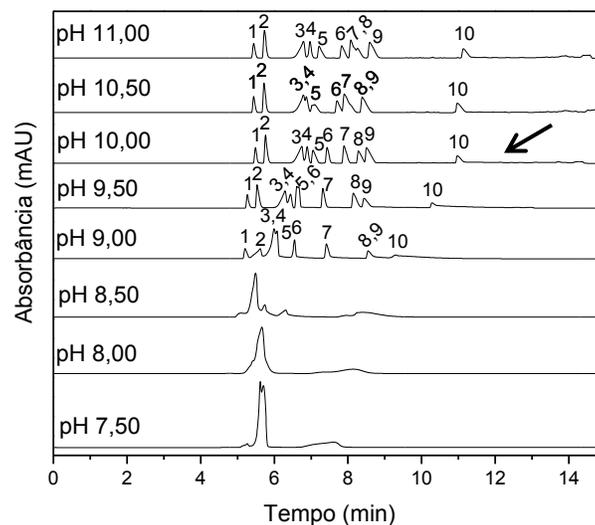


Figura 15 – Eletroferogramas obtidos para a otimização do pH do BGE entre 7,50 e 11,00. As condições com pH entre 7,50 e 8,50 não apresentam a identificação dos picos devido à co-migração. A melhor condição é destacada pela seta (pH 10,00). Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE borato 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L em pHs variáveis.

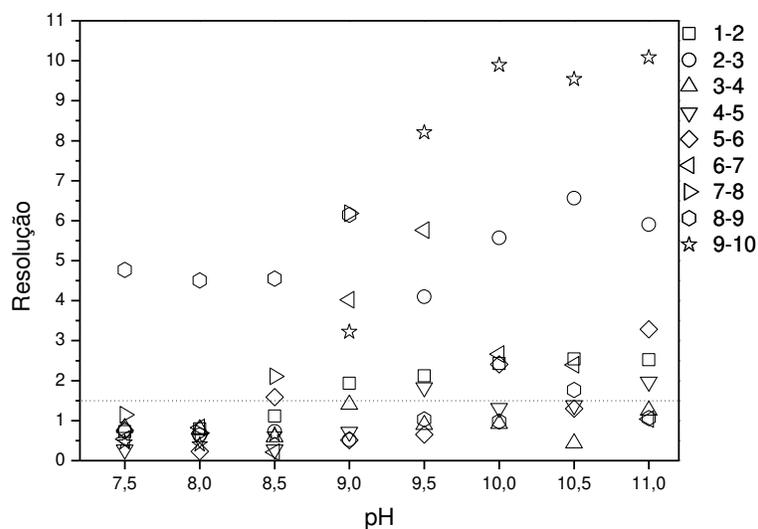


Figura 16 – Resoluções obtidas para a otimização do pH do BGE entre 7,50 e 11,00. Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE borato 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L em pHs variáveis.

Um ajuste fino em torno do pH 10,0 foi realizado em seguida. Notou-se que o pH 9,90 resultou em maiores resoluções, portanto foi escolhido como ótimo (Figuras 17 e 18). Ainda assim, os pares de picos 3-4 e 8-9 apresentaram resoluções abaixo de 1,5.

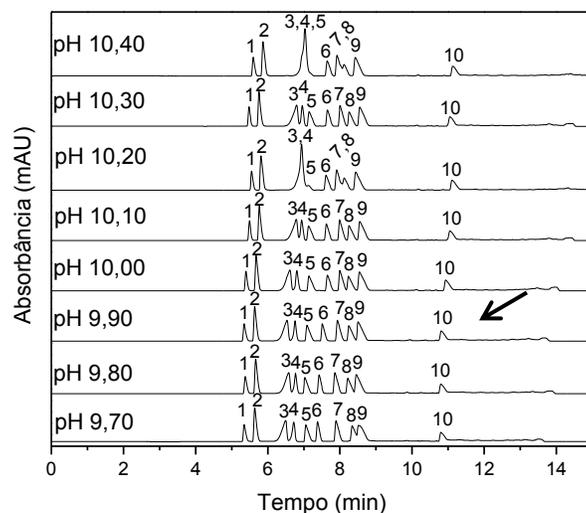


Figura 17 – Eletroferogramas obtidos para o ajuste fino do pH do BGE entre 9,70 e 10,40. A melhor condição é destacada pela seta (pH 9,90). Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE borato 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L em pHs variáveis.

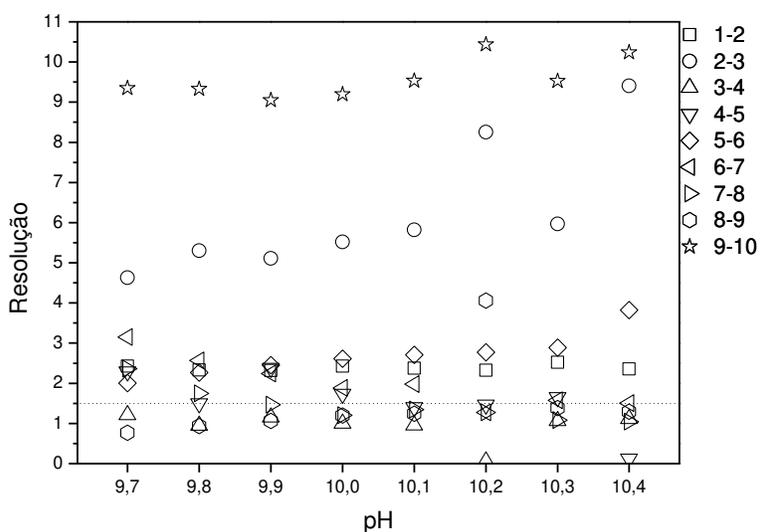


Figura 18 – Resoluções obtidas para o ajuste fino do pH do BGE entre 9,70 e 10,40. Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE borato 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L em pHs variáveis.

5. Temperatura

O efeito da variação da temperatura do cassete onde o capilar é acondicionado foi avaliado entre 20 e 25°C. Temperaturas mais baixas não foram testadas devido à possibilidade de precipitação do CTAB. Temperaturas mais altas, por sua vez, levam à maior velocidade de EOF, o que prejudica a separação.

As menores temperaturas resultaram em melhores resoluções devido à menor velocidade do EOF (Figuras 19 e 20). Um inconveniente desta configuração é o maior tempo total de análise, já que o EOF apresenta menor mobilidade, porém a variação observada foi pequena (de 16,4 min em 25°C a 17,9 min em 20°C para o último pico – Figura 19). Entre 20 e 24°C, dois pares de picos apresentam resolução menor que 1,5 (3-4 e 8-9), porém o aumento da temperatura leva à perda de resolução e, em 25°C, o par 4-5 também deixa de apresentar separação ideal. A temperatura de 20°C resultou em maiores resoluções e foi escolhida como ótima.

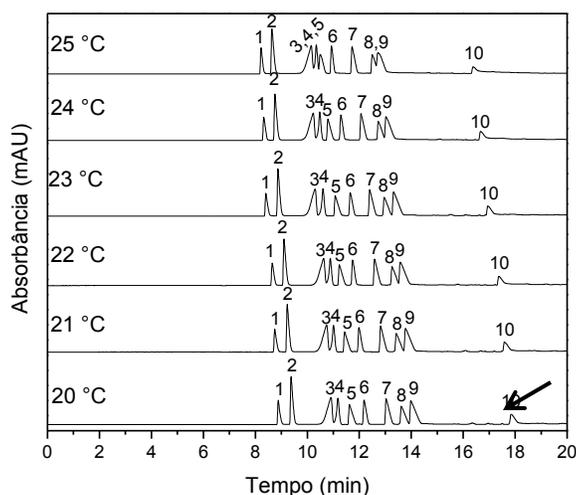


Figura 19 – Eletroferogramas obtidos para a otimização de temperatura do cassete no qual o capilar é acondicionado durante as análises entre 20 e 25°C. A melhor condição é destacada pela seta (20°C). Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE borato 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L em pH 9,90 e temperatura variável.

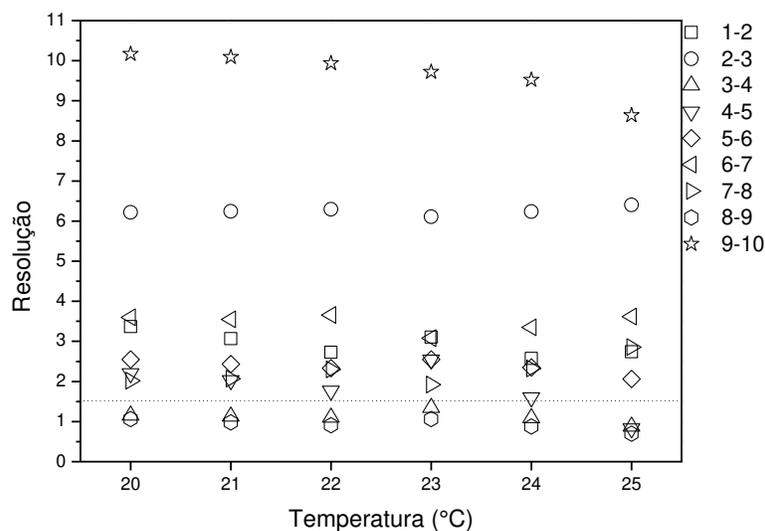


Figura 20 – Resoluções obtidas para otimização da temperatura do cassete no qual o capilar é acondicionado durante as análises entre 20 e 25°C. Condições: análogas às da Figura 9, porém com BGE borato 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L em pH 9,90 e temperatura variável.

6. Tensão

A tensão aplicada durante a separação foi avaliada em -10, -15, -25 e -30 kV, buscando cobrir uma ampla faixa de valores em torno do proposto na metodologia inicial (-15 kV). O aumento da tensão (em módulo) leva à perda de resolução entre todos os picos por aumentar a mobilidade do EOF, além de reduzir o tempo total de análise (Figuras 21 e 22). A perda de resolução é mais problemática para o par de picos 4-5, com valores abaixo do mínimo aceitável de 1,5 em tensões mais elevadas devido à maior velocidade do EOF. Apesar do maior tempo de análise, decidiu-se empregar -10 kV em busca da melhor separação entre os analitos. Ainda assim, os pares de picos 3-4 e 8-9 apresentaram resoluções inferiores a 1,5.

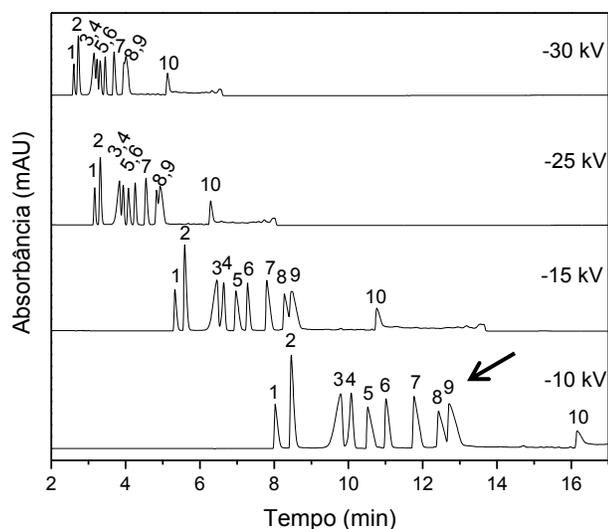


Figura 21 – Eletroferogramas obtidos para otimização da tensão aplicada durante a separação entre -10 e -30 kV. A melhor condição é destacada pela seta (-10 kV). Condições: BGE borato 30 mmol/L e CTAB 50 mmol/L em pH 9,90; V variável; T = 20°C; injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 15 s; padrões de nucleosídeos C, A, 2dA, T, U, 5mU, G, X, I e 8BrG; detecção em 260 nm.

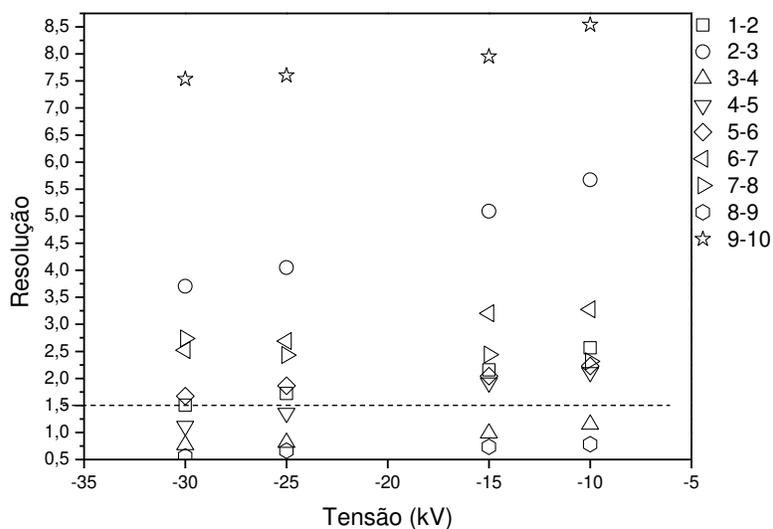


Figura 22 – Resoluções obtidas para otimização da tensão aplicada durante a separação entre -10 e -30 kV. Condições: análogas às da Figura 21.

7. Condicionamento do capilar

O condicionamento do capilar foi otimizado para maximizar a repetibilidade de tempos de migração. Foram avaliadas seis injeções consecutivas com condicionamentos empregando soluções de NaOH 0,1 mol/L e 1,0 mol/L e solução de HCl 0,1 mol/L (Figura 23). Entre as análises empregando as diferentes condições, foi realizada limpeza do capilar com água por 30 min e ar por 200 s. O condicionamento inicial foi realizado com *flush* (lavagem sob pressão) de 500 s de ácido ou base, seguido por 300 s de água e 500 s de BGE. Entre análises, foi feito *flush* de 120 s de ácido ou base, 120 s de água e 300 s de BGE.

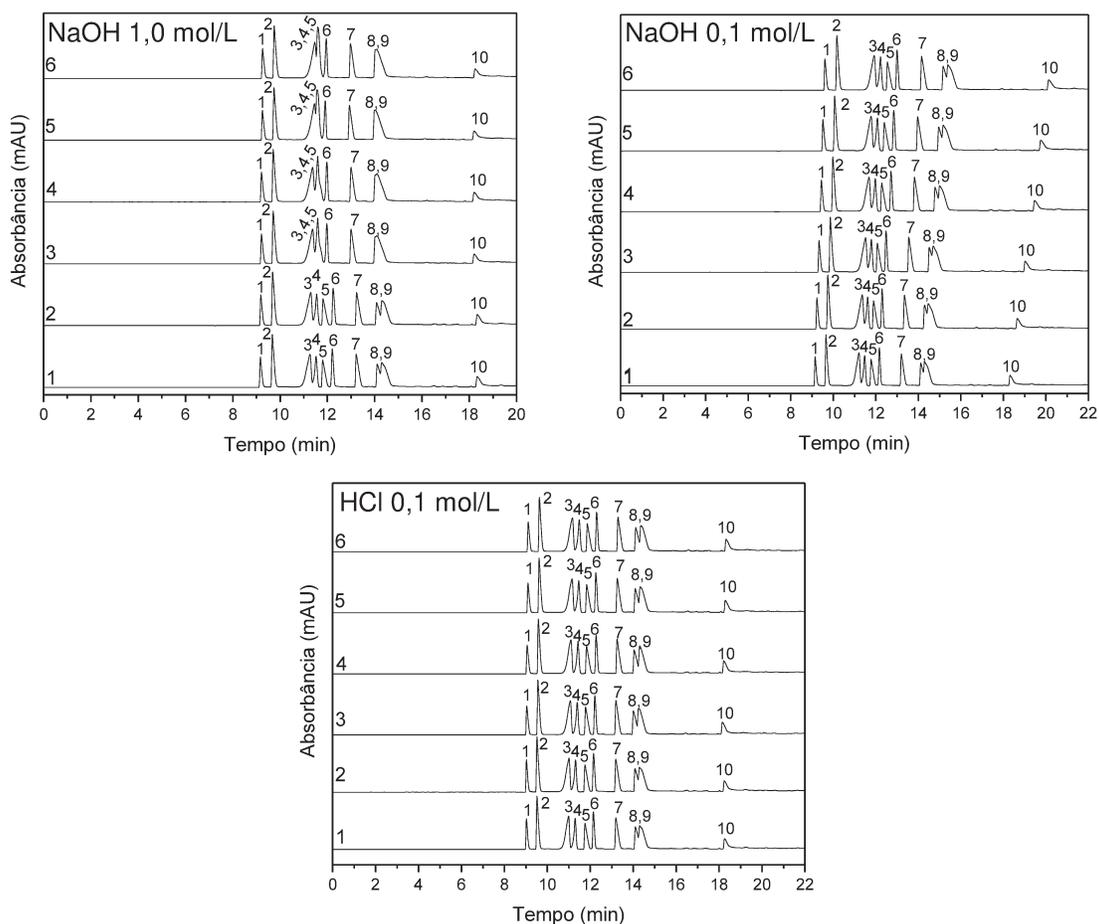


Figura 23 – Eletroferogramas obtidos para otimização do condicionamento do capilar. Condições: análogas as da Figura 21, porém com $V = -10$ kV.

A solução de NaOH é empregada frequentemente para condicionamento de capilares de sílica fundida em CE para a desprotonação dos grupos silanóis da superfície, favorecendo a formação do EOF. O HCl, embora não usual como agente condicionante, pode ter como efeito principal a remoção de substâncias adsorvidas nas paredes do capilar devido à protonação dos grupos silanóis, promovendo maior uniformidade da superfície e, conseqüentemente, do EOF.

Para 6 réplicas, atingiu-se coeficiente de variação para os tempos de migração entre: 1,9 (pico 1) e 3,6% (pico 10) para NaOH 0,1 mol/L; 0,3 (pico 8) e 1,2% (pico 6) para NaOH 1,0 mol/L; 0,3 (pico 8) e 0,7% (pico 4) para HCl 0,1 mol/L. Decidiu-se, portanto, empregar o condicionamento com HCl 0,1 mol/L. Manteve-se, porém, o condicionamento de capilares novos com metanol e NaOH 1,0 mol/L e *flush* com NaOH 1,0 mol/L no início de sequências de análise longas, já que o material da superfície do capilar requer a presença de base para desprotonar os grupos silanóis e gerar o EOF.

8. Modificador orgânico

Os solventes orgânicos, quando adicionados ao BGE, agem diminuindo a interação soluto-capilar e aumentando a solubilidade de solutos orgânicos. Alteram a polaridade e a viscosidade do BGE, causando modificações no EOF, com conseqüente variação do tempo total de análise. Também modificam a seletividade do método por alterarem a distribuição do soluto entre o BGE e as micelas, já que MECK tem como fundamento de separação as diferenças de distribuição de um soluto entre fases hidrofóbicas e hidrofílicas, diretamente afetadas pelo solvente orgânico.

Os solventes orgânicos metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) foram testados em busca de melhor separação. O efeito de solventes orgânicos é difícil de prever, porém é esperado que ambos alterem a mobilidade do EOF por causarem variações na viscosidade do meio. Além disso, os dois modificadores diminuem a polaridade do BGE, alterando a partição dos analitos. O MeOH, porém, é um solvente polar prótico, enquanto que a ACN apresenta caráter

aprótico, não interagindo por ligações de hidrogênio, o que pode reduzir a solubilidade dos analitos em questão.

Primeiramente, avaliou-se o efeito da adição de MeOH no BGE em concentrações entre 0 e 20% (v/v). O aumento na concentração de metanol causou aumento no tempo total de análise e alterações nas resoluções, portanto o melhor compromisso entre resolução e tempo foi buscado (Figuras 24 e 25). Os pares de picos mais afetados são 3-4 e 8-9. Observa-se perda de resolução entre o par de picos 3-4 até 16%, porém ganho significativo para o par 8-9. A maior resolução para o par 3-4 ocorre em 4%. Para 8-9, a melhor resolução ocorre em 16%, porém o ganho não compensa o aumento no tempo total de análise (c.a. 29 min contra c.a. 18 min para 0%) e a perda de resolução entre o par 3-4. Sendo assim, a condição com 4% de metanol foi, a princípio, escolhida como ideal, porém os pares 3-4 e 8-9 ainda apresentaram resolução menor que 1,5.

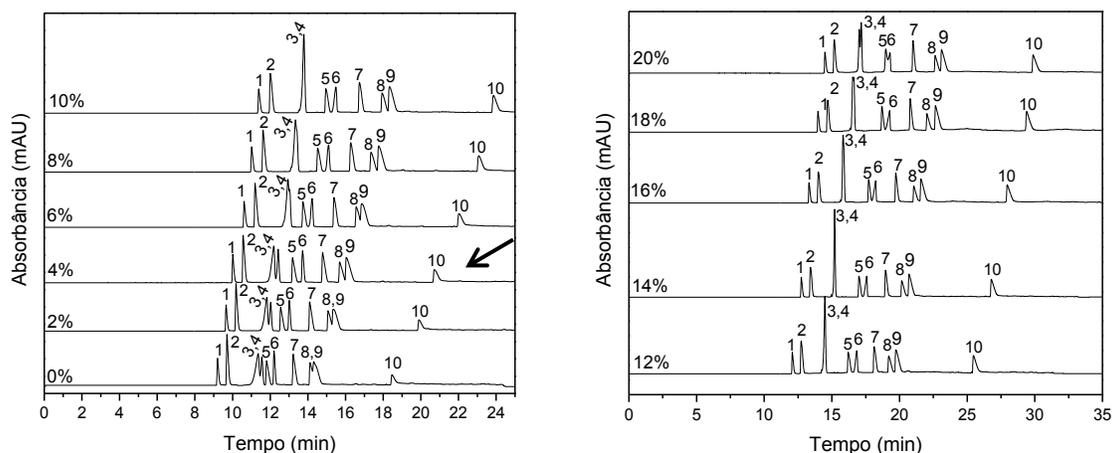


Figura 24 – Eletroferogramas obtidos para a otimização da concentração de MeOH no BGE entre 0 e 20%. A melhor condição é destacada pela seta (4%). Condições: análogas as da Figura 21, porém com BGE contendo MeOH em concentrações variadas e $V = -10$ kV.

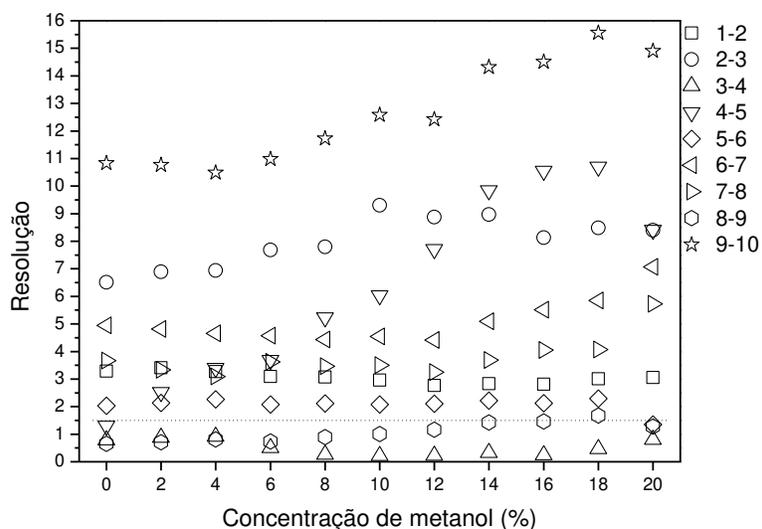


Figura 25 – Resoluções obtidas para a otimização da concentração de MeOH no BGE entre 0 e 20%. Condições: análogas as da Figura 21, porém com BGE contendo MeOH em concentrações variadas e $V = -10$ kV.

Como modificador orgânico alternativo, foi avaliado o efeito da concentração de acetonitrila entre 0 e 10%, porém as resoluções diminuíram após adição do solvente, com destaque para os pares de picos 3-4, 4-5 e 8-9 (Figuras 26 e 27). Assim, tal configuração foi descartada.

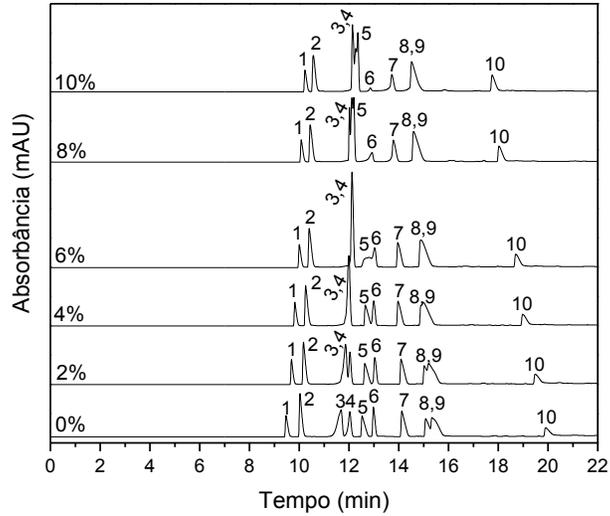


Figura 26 - Eletroferogramas obtidos para a otimização da concentração de ACN no BGE entre 0 e 10%. Condições: análogas as da Figura 21, porém com BGE contendo ACN em concentrações variadas e $V = -10$ kV.

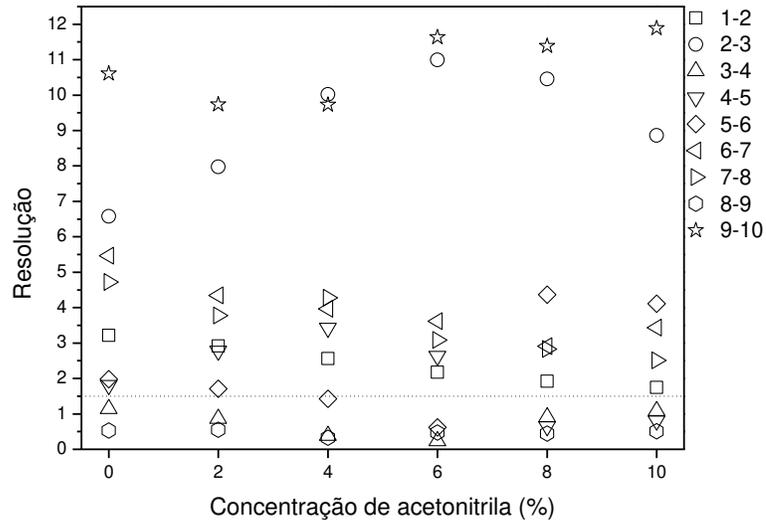


Figura 27 – Gráfico de resoluções obtido para a otimização da concentração de ACN no BGE entre 0 e 10%. Condições: análogas as da Figura 21, porém com BGE contendo ACN em concentrações variadas e $V = -10$ kV.

9. Identificação dos analitos

Foram injetadas soluções individuais dos padrões de nucleosídeos na concentração 1,0 mmol/L para identificação dos picos, bem como uma solução mista (Figura 28). Os picos foram identificados por tempo de migração e espectro de absorção na região do UV (Figura 29). A ordem de migração obtida foi: 1 – C; 2 – A; 3 – 2dA; 4 – T; 5 – U; 6 – 5mU; 7 – G; 8 – X; 9 – I; e 10 – 8BrG.

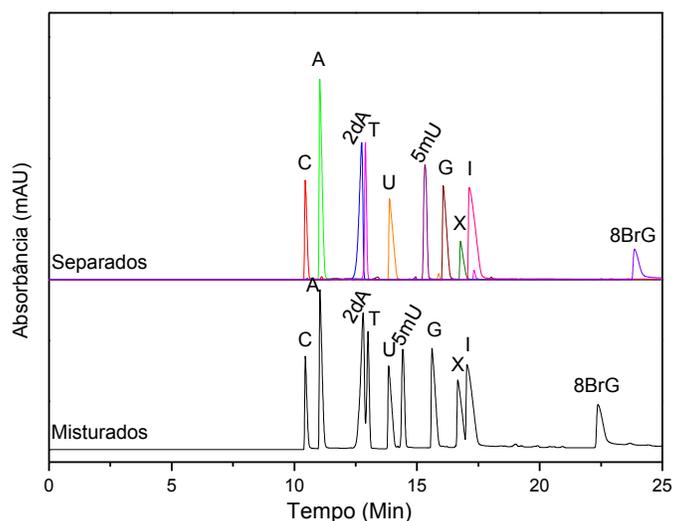


Figura 28 - Eletroferogramas obtidos para a identificação dos picos dos analitos. Condições: BGE borato 30 mmol/L, CTAB 50 mmol/L e MeOH 4% em pH 9,90; V = -10 kV; T = 20°C; injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 15 s; padrões de nucleosídeos C, A, 2dA, T, U, 5mU, G, X, I e 8BrG; detecção em 260 nm.

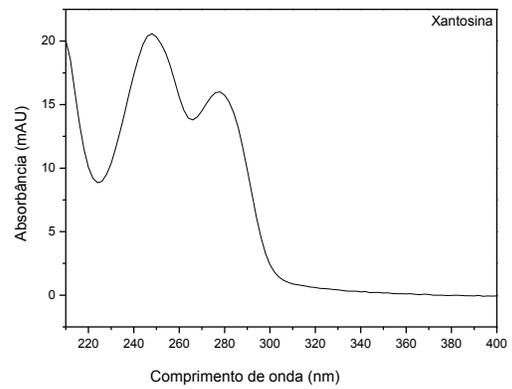
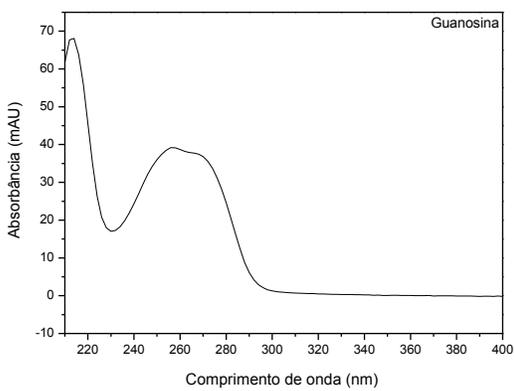
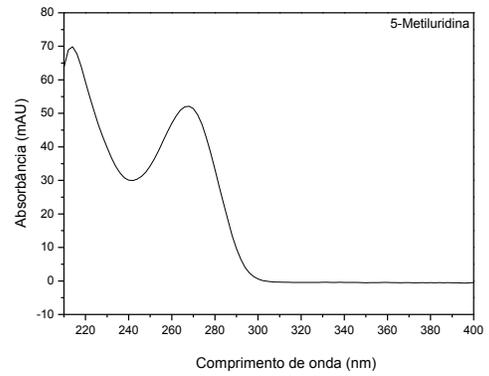
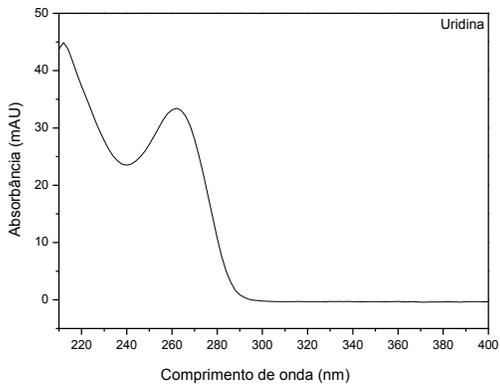
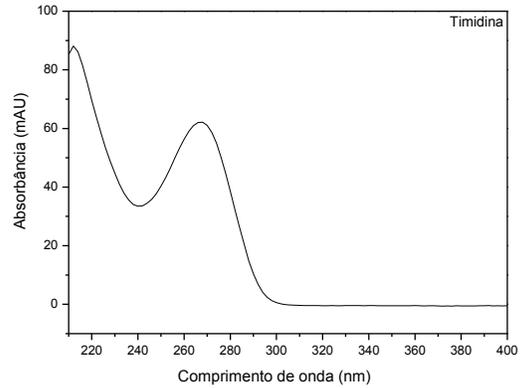
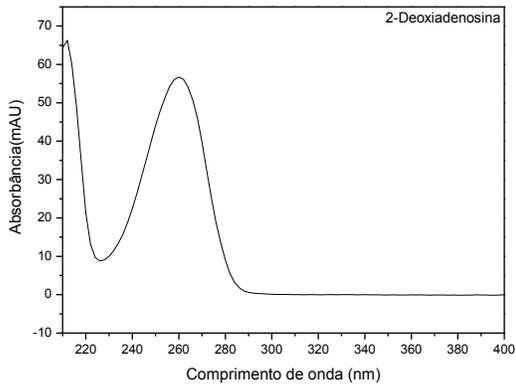
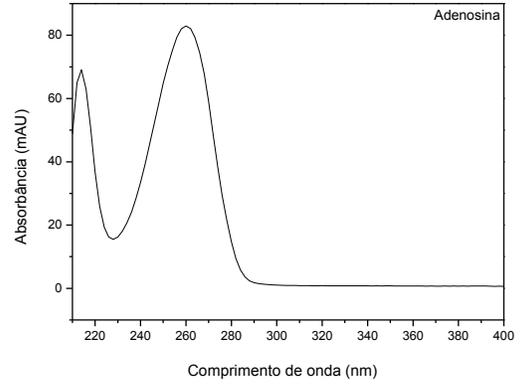
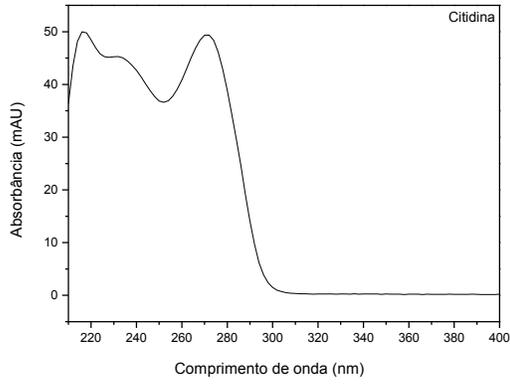


Figura 29 – Legenda na página seguinte

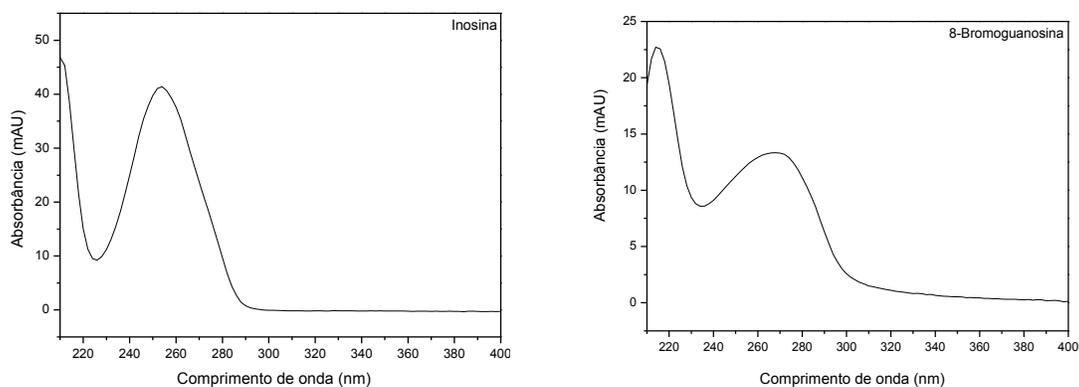


Figura 29 – Espectros de absorção UV dos analitos estudados entre 200 e 400 nm, obtidos com o detector de arranjo de diodos do equipamento de CE-UV.

A ordem de migração é ditada tanto pela carga dos analitos, sendo que os que apresentam maior mobilidade eletroforética migram mais rapidamente, quanto pela polaridade e hidrofobicidade. Quanto à carga, os nucleosídeos G e T apresentam pK_a abaixo de 9,90 e, portanto, estão parcialmente desprotonados. Por outro lado, o caráter positivo do CTAB faz com que as micelas tenham migração eletroforética em direção contrária ao EOF. Os analitos menos polares apresentam maior interação com o interior das micelas e devem deixar o capilar mais tardiamente. Tal fator é evidenciado pelo último analito a deixar o capilar, 8BrG, com forte caráter hidrofóbico devido a presença do bromo. A presença do solvente orgânico, porém, pode alterar a interação soluto-micela. Portanto, a ordem de migração em um sistema tão complexo quanto o estudado é dificilmente prevista.

O par de picos que apresenta a menor resolução é o 3-4, que envolve 2dA e T, nucleosídeos que não são retidos pela resina de ácido fenilborônico (PBA, do inglês *phenylboronic acid*), empregada para a extração dos analitos da matriz de soro sanguíneo, por não possuírem o grupo de afinidade 1,2-cis-diol (Figura 5). Decidiu-se eliminar um deles do desenvolvimento do método, já que não serão eficientemente extraídos nas amostras de soro sanguíneo. A resolução deste par deixou de ser um caráter limitante para a escolha da melhor concentração de metanol e notou-se que concentrações acima de 6% evitam a precipitação do CTAB após repouso prolongado da solução. Assim, decidiu-se empregar

concentração de metanol de 10%, condição na qual se observa bom compromisso entre resolução do par 8-9 (I-X) e tempo total de análise (c.a. 25 min, Figuras 24 e 25).

10. Curva de Ohm

A aplicação de alta tensão através da solução contida no capilar leva à geração de calor devido à resistência elétrica do meio. O calor é dissipado nas paredes do capilar, portanto a solução em seu interior deve apresentar um gradiente de temperatura na direção radial, sendo mais quente no centro (Figura 30). Assim, um gradiente de viscosidade do BGE também é gerado, o que causa convecção térmica e mistura entre bandas já separadas, levando à redução da eficiência dos picos. A mobilidade da maior parte dos íons aumenta em 2% a cada unidade de temperatura absoluta. Tal fenômeno é denominado Efeito Joule e pode ser minimizado por redução do valor de tensão aplicada (em módulo) ou empregando-se capilares de diâmetros menores, que favorecem a dissipação de calor. O resfriamento eficiente dos capilares também auxilia na dissipação de calor e reduz o alargamento das bandas.^{98,100–102}

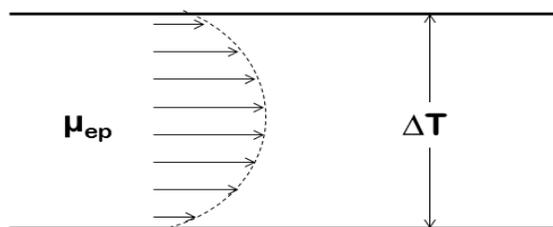


Figura 30 – Ilustração do gradiente de temperatura e perfil de mobilidades eletroforéticas (μ_{ep}) obtidos como consequência do efeito Joule.

A Lei de Ohm afirma que a tensão em um resistor é diretamente proporcional à corrente que passa por ele, porém tal afirmação só é válida para sistemas ôhmicos ou lineares. Curvas de Ohm são gráficos que relacionam tensão com corrente elétrica linearmente, cuja inclinação corresponde à resistência do

sistema e desvios da linearidade apontam que não obedece à Lei de Ohm. Um aumento na temperatura do interior do capilar causado pelo Efeito Joule deve resultar em queda de resistência e, conseqüentemente, aumento da corrente elétrica, destacado por desvio de linearidade. A faixa de valores de tensão na qual os desvios ocorrem deve ser evitada para que a eficiência dos picos seja maximizada.

Foi construída a Curva de Ohm para o BGE estudado com 10% de MeOH (v/v) entre -1 e -30 kV (Figura 31). É possível notar que não ocorrem desvios significativos de linearidade até *c.a.* -17 kV, portanto qualquer valor de tensão dentro de tal faixa pode ser empregado para a separação em questão sem prejudicar a eficiência dos picos. Acima desse valor, um leve desvio pode ser notado, o que demonstra a ocorrência do efeito Joule.

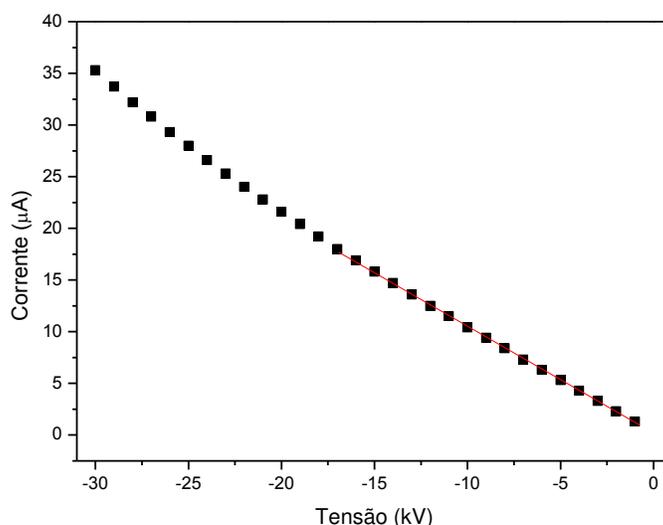


Figura 31 – Curva de Ohm obtida para o BGE composto por borato 30 mmol/L, CTAB 50 mmol/L e MeOH 10% em pH 9,90 (T = 20°C).

11. Tensão (ajuste fino)

Realizou-se novamente a otimização da tensão para o BGE contendo 10% de metanol entre -10 e -15 kV sem 2dA (Figuras 32 e 33). Novamente, a tensão de

-10 kV levou às melhores resoluções e foi mantida, apesar do maior tempo de análise. Tensões maiores levaram a perda de resolução do par X-I.

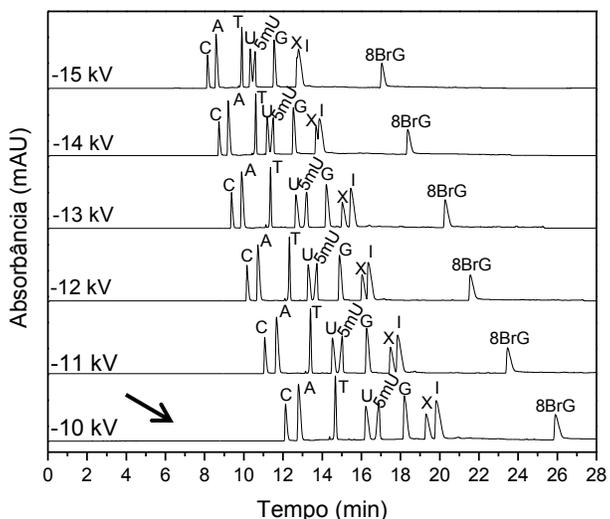


Figura 32 – Eletroferogramas obtidos para o ajuste fino da tensão aplicada durante as análises entre -10 e -15 kV. A melhor condição é destacada pela seta (-10 kV). Condições: análogas às da Figura 28, porém com BGE contendo 10% de MeOH e V variável.

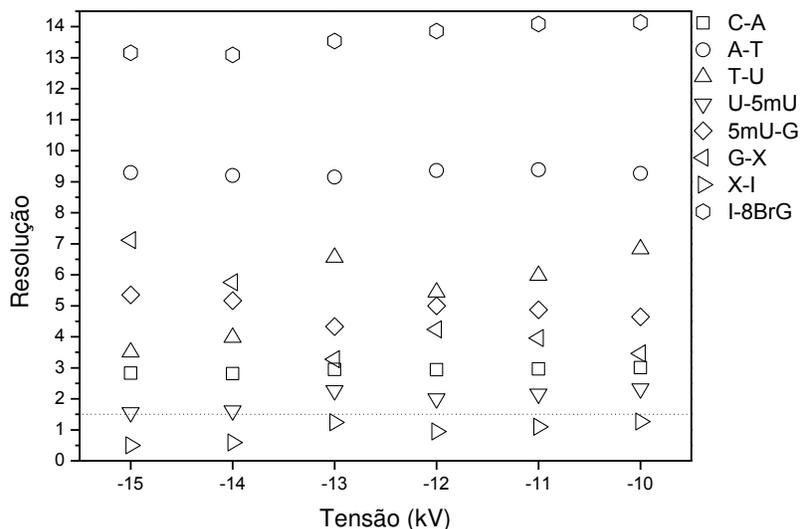


Figura 33 – Resoluções obtidas para o ajuste fino da tensão aplicada durante as análises entre -10 e -15 kV. Condições: análogas às da Figura 28, porém com BGE contendo 10% de MeOH e V variável.

A repetibilidade dos tempos de migração para o BGE com 10% de metanol foi avaliada através de 10 injeções sucessivas sem troca de BGE (Figura 34). Os coeficientes de variação ficaram entre 0,09 (C) e 0,30 % (X).

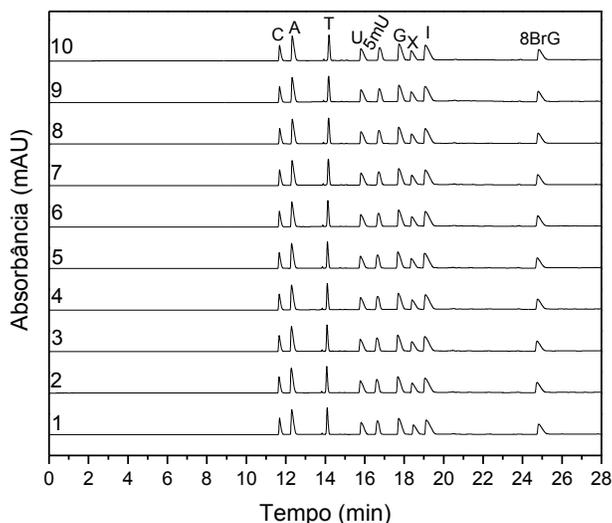


Figura 34 – Eletoferogramas obtidos para a avaliação da repetibilidade dos tempos de migração. As identificações dos picos de todos os eletroferogramas seguem as descritas para a injeção 10. Condições: análogas às da Figura 28, porém com BGE contendo 10% de MeOH.

12. Tempo de injeção

Como as concentrações esperadas de nucleosídeos em soro sanguíneo de humanos situam-se na faixa de $\mu\text{mol/L}$ (Tabela 2), verificou-se o efeito do tempo de injeção entre 15 e 60 s para solução de padrões 100 $\mu\text{mol/L}$, em busca de maior detectabilidade dos analitos, porém mantendo-se resolução adequada (Figuras 35 e 36). Os eletroferogramas demonstram que o aumento do tempo de injeção resulta em perda de resolução entre os pares de picos, porém leva a aumento de altura, elevando a detectabilidade. O valor limite de resolução de 1,5 só é ultrapassado a partir da injeção por 40 s para o par de picos X-I; assim, o tempo de injeção escolhido como ideal foi de 30 s. Foram obtidos aumentos de

altura entre 1,2 (I) e 2,0 (G) vezes em relação à injeção por 15 s. As condições de análise otimizadas são apresentadas na Figura 37.

Tabela 2 – Concentrações de nucleosídeos em soro sanguíneo de indivíduos saudáveis, conforme dados publicados na literatura.

Nucleosídeo	Concentração em soro sanguíneo ($\mu\text{mol/L}$)		
	Djukovic <i>et al.</i> ⁶³	Hartwick <i>et al.</i> ¹⁰³	Xu <i>et al.</i> ⁸³
A	-	-	0,065
C	$0,87 \pm 0,37$	-	0,068
T	-	-	-
U	$12,80 \pm 5,18$	$3,17 \pm 1,11$	4,98
5mU	-	-	-
G	$3,52 \pm 1,68$	$0,881 \pm 0,515$	0,077
X	-	$2,62 \pm 1,04$	0,16
I	$9,99 \pm 8,57$	$5,62 \pm 2,87$	0,36

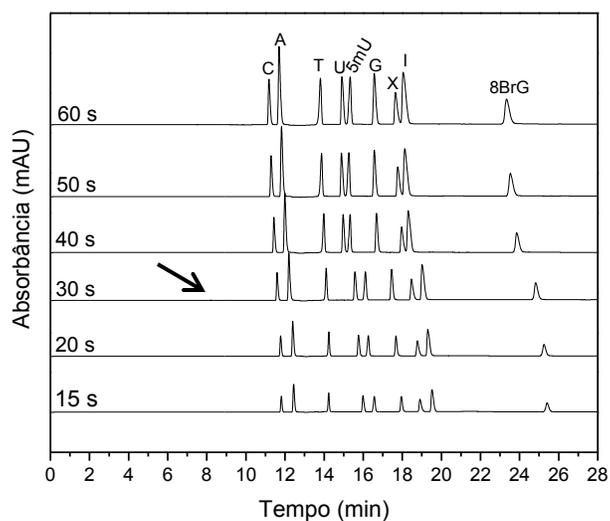


Figura 35 – Eletroferogramas obtidos para avaliação do tempo de injeção de soluções $100 \mu\text{mol/L}$ dos padrões de nucleosídeos, sob pressão de 50 mbar. As identificações dos picos seguem às de 60 s. A melhor condição é indicada pela seta (30 s). Condições: análogas às da Figura 28, porém com BGE contendo 10% de MeOH e tempo de injeção variável.

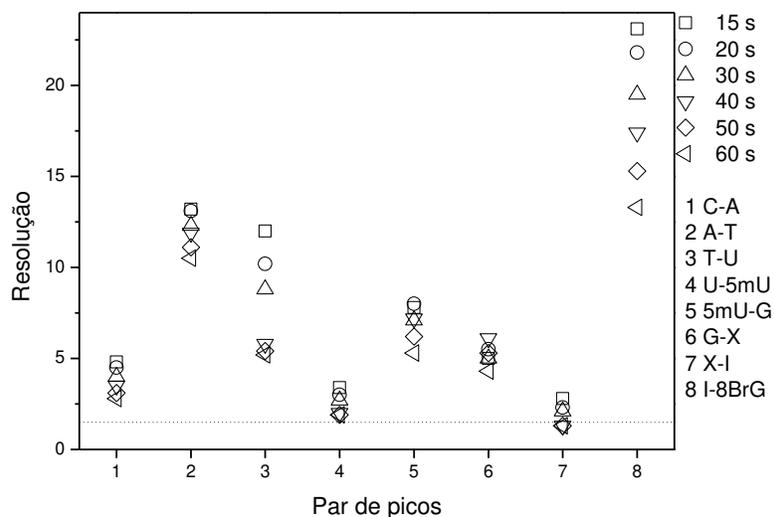


Figura 36 – Resoluções obtidas para a otimização do tempo de injeção de soluções 100 $\mu\text{mol/L}$ dos padrões de nucleosídeos. Condições: análogas às da Figura 28, porém com BGE contendo 10% de MeOH e tempo de injeção variável.

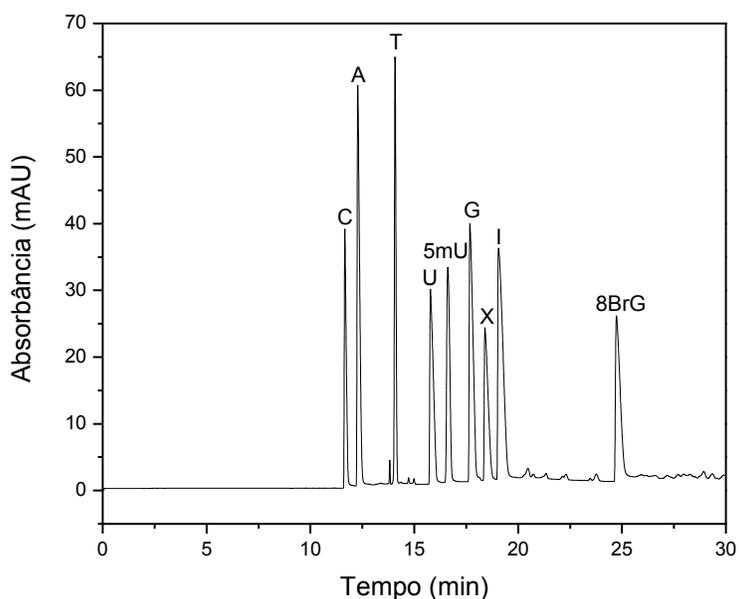


Figura 37 – Eletroferograma obtido nas condições de análise otimizadas para a metodologia de separação dos nucleosídeos. Condições: BGE borato 30 mmol/L, CTAB 50 mmol/L e MeOH 10% em pH 9,90; $V = -10$ kV; $T = 20^\circ\text{C}$; injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 30 s; solução 100 $\mu\text{mol/L}$ dos padrões de nucleosídeos C, A, T, U, 5mU, G, X, I e 8BrG; detecção em 260 nm.

13. Conclusões

Foram atingidas eficiências entre $1,34 \times 10^5$ (I) e $2,58 \times 10^5$ (T) e resolução mínima de 2,1 (X-I) para a solução aquosa de padrões de nucleosídeos na concentração de $100 \mu\text{mol/L}$. A extensa otimização possibilitou o alcance de uma metodologia que emprega concentrações baixas de sal, evitando problemas de precipitação no interior do capilar e do equipamento, aliada a separações em nível de linha de base em tempo de análise adequado (c.a. 26 min).

Capítulo 4

Desenvolvimento da metodologia de extração

1. Materiais e equipamentos

Foram utilizados acetato de amônio e ácido fórmico provenientes da Synth (Diadema, Brasil). A resina de PBA Affi-Gel 601 foi adquirida da Bio-Rad (Hercules, EUA) e as membranas de ultra-filtração Amicon Ultra de 3000 Da, da Millipore (Billerica, EUA). Os demais reagentes e materiais foram descritos previamente no Capítulo 3.

Amostras de sangue de voluntários sadios do sexo masculino foram obtidas junto ao Hemocentro do Hospital de Clínicas da UNICAMP, onde foram previamente analisadas por imunoenaios específicos para os biomarcadores de câncer mais comuns, sendo eles: PSA, β HCG, AFP e CEA. O soro sanguíneo foi separado por centrifugação após a coagulação, sendo posteriormente armazenado a -80°C . Um *pool* com os mesmos volumes de soro sanguíneo de 60 indivíduos sadios foi preparado para as etapas de otimização da metodologia de extração e injeção, bem como para a validação. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (parecer 868/2008).

2. Metodologia inicial

A extração dos nucleosídeos a partir da matriz de soro sanguíneo foi otimizada com base em metodologia previamente desenvolvida visando maximizar a recuperação dos analitos.⁹¹ A extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) foi feita empregando-se resina de PBA, utilizada na maior parte das publicações que reportam a análise de nucleosídeos. A resina apresenta grupos boronato, que possuem afinidade por analitos com grupos cis-diol, ligados a grupos fenila. A interação entre os íons boronato e analitos que possuem grupos 1,2-cis-diol é similar à previamente descrita no Capítulo 3 para BGE contendo ânions borato, *i.e.* retenção através de esterificação por ligações covalentes reversíveis em meio básico. Em meio ácido, porém, ocorre hidrólise das ligações éster e os analitos podem ser eluídos. Além da esterificação, outras interações

secundárias podem ocorrer: interações hidrofóbicas do anel fenila (ou interações aromáticas π - π), que levam à adsorção não específica de analitos como proteínas e são minimizadas em força iônica baixa, já que altas concentrações de sais iônicos favorecem interações entre compostos naturalmente hidrofóbicos; atrações ou repulsões coulômbicas entre a carga negativa do boronato e analitos carregados, minimizadas para força iônica elevada; ligações de hidrogênio entre as hidroxilas do boronato e ligantes específicos, como amônia; e interações de coordenação, nas quais o átomo de boro serve como um acceptor de elétrons devido ao seu orbital vazio, formando ligações coordenadas, principalmente com aminas não-protonadas e ácidos carboxílicos.⁹³

A metodologia previamente desenvolvida é iniciada por filtração da amostra de soro sanguíneo com membrana de 3000 Da através de centrifugação por 1 hora a 6000 rpm e 5°C. Se necessário, ao filtrado é adicionado o menor volume possível de solução estoque de padrões, seguido pela adição da solução de padrão interno. Um volume de 500 μ L é, então, extraído em coluna de SPE contendo 200 mg de resina de PBA pré-condicionada com metanol (1 mL), ácido fórmico 0,1 mol/L (10 mL) e tampão acetato de amônio 0,25 mol/L pH 8,8 (10 mL). A separação de interferentes é efetuada lavando-se com tampão acetato de amônio 0,25 mol/L pH 8,8 (4 mL) e duas alíquotas de 2 mL de solução de ácido fórmico 0,10 mol/L completam o processo, eluindo os analitos. As frações coletadas são evaporadas em liofilizador e ressuspendidas em água.⁹¹

Devido ao longo tempo de liofilização (cerca de 24hs) e ao acesso limitado ao equipamento, o método de evaporação foi alterado para secagem em fluxo de nitrogênio, gás amplamente disponível em laboratórios e de custo relativamente baixo. Foram otimizados os parâmetros: efeito da evaporação em fluxo de nitrogênio, presença de luz durante a evaporação, adição de metanol na solução de ácido fórmico, concentração e pH da solução de acetato de amônio por planejamento multivariado, concentração da solução de ácido fórmico e volume de ressuspensão do eluato após a evaporação. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3. Evaporação em fluxo de nitrogênio

Verificou-se se a evaporação da amostra em fluxo de nitrogênio poderia causar algum tipo de alteração sobre os resultados obtidos. Um volume de 500 μL de solução mista de padrões 1,0 mmol/L foi misturado com 4 mL de água deionizada (mesmos volumes empregados na eluição) e foi evaporado sob fluxo de nitrogênio. Em seguida, o resíduo foi ressuspendido em 500 μL de água deionizada e analisado pelo método de separação otimizado. Os resultados foram comparados com a mesma solução de padrões, porém sem evaporação, em termos de tempos de migração e área do pico corrigida por área do padrão interno (Figura 38).

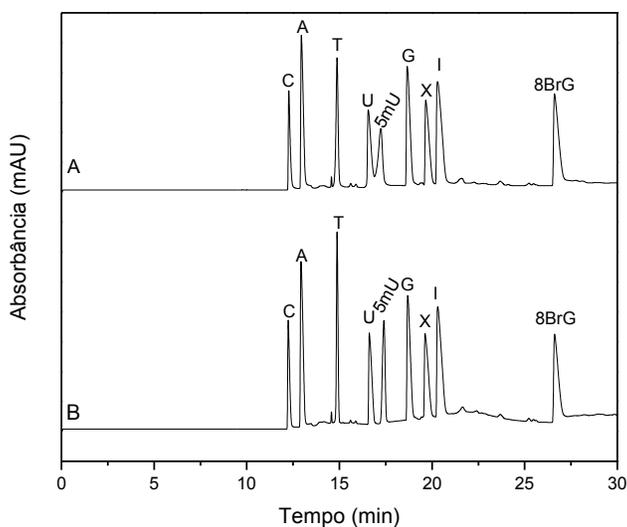


Figura 38 – Eletroferogramas obtidos para a avaliação da evaporação em fluxo de nitrogênio como alternativa à liofilização. A: solução de padrões 1,0 mmol/L misturada com água e evaporada em fluxo de nitrogênio; B: solução de padrões 1,0 mmol/L sem evaporar. Condições: análogas às da Figura 37, porém com soluções de padrões 1,0 mmol/L.

O tempo de secagem foi reduzido de 24hs (com a liofilização) para cerca de 6hs. As variações em termos de tempo de migração em relação à solução de padrões não evaporada foram menores que 1,0% (entre 0,04% – A e 0,65% -

5mU). Para área do pico corrigida por área do pico do padrão interno, porém, foram observadas variações entre -6,9 (A) e 3,8% (I). Um teste estatístico para comparação de médias (teste t de Student) com nível de significância de 0,05 foi realizado e nenhum analito apresentou médias estatisticamente diferentes, portanto decidiu-se empregar a evaporação como forma de secagem.

Avaliou-se, ainda, se a presença de luz durante o período de secagem poderia causar degradação dos analitos estudados. Uma alíquota de 500 µL da solução mista de padrões 1,0 mmol/L foi misturada com 4 mL de água e seca de duas formas: na presença de luz e envolta em papel alumínio para minimizar a passagem da luz. As variações de tempo de migração ficaram entre 0,21 (C) e 1,88% (5mU), enquanto que as áreas corrigidas por área do pico do padrão interno variaram entre -10,10 (T) e 3,36% (X). Apenas o analito T apresentou áreas corrigidas estatisticamente diferentes (teste t com significância de 0,05) na presença e na ausência de luz. Tal nucleosídeo, porém, não possui o grupo 1,2-cis-diol, portanto sua eficiência de extração é reduzida. Assim, considerou-se que não ocorrem degradações significativas durante a evaporação que justifiquem o bloqueio da luz.

4. Adição de metanol (MeOH) à solução de eluição

A presença de MeOH 50% (v/v) na solução de ácido fórmico foi avaliada visando reduzir o tempo de secagem em fluxo de nitrogênio. A solução mista de padrões 1,0 mmol/L (500 µL) foi diluída em 4 mL de água, ácido fórmico 0,1 mol/L ou ácido fórmico 0,1 mol/L em MeOH:água 50% (v/v), evaporada, ressuspensa em 500 µL de água e analisada pelo método de separação otimizado (Figura 39).

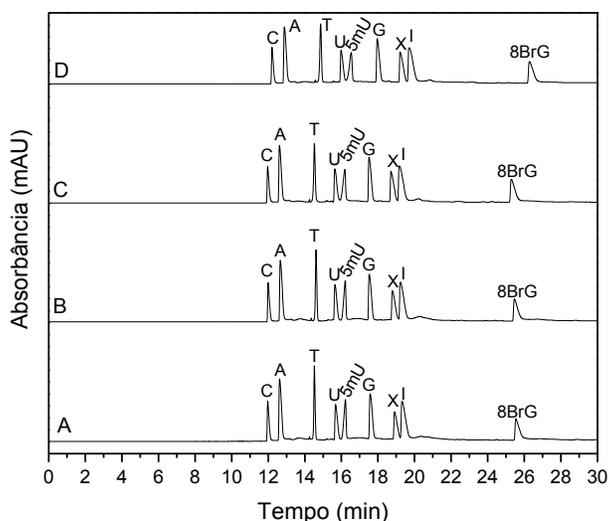


Figura 39 – Eletroferogramas obtidos para a avaliação da adição de MeOH na solução de eluição dos analitos durante a evaporação. A: sem evaporação; B: evaporação em água; C: evaporação em ácido fórmico 0,1 mol/L; D: evaporação em ácido fórmico 0,1 mol/L em MeOH:água 50% (v/v). Condições: análogas às da Figura 37, porém com soluções de padrões 1,0 mmol/L.

As soluções evaporadas em meio ácido foram comparados com a solução evaporada em água por teste t com nível de significância de 0,05. Para a solução evaporada em ácido fórmico 0,1 mol/L em comparação com água, dois picos (C e A) resultaram em médias de área corrigida por padrão interno estatisticamente diferentes. Para ácido fórmico 0,1 mol/L em MeOH:água 50% (v/v), nenhum pico apresentou médias de área corrigida estatisticamente diferentes. Tal fato pode ser atribuído ao menor tempo de secagem, sendo o MeOH mais volátil, o que leva à menor tempo de contato entre os analitos e o ácido, além da redução da exposição da solução ao ar e à luz. O tempo de secagem foi reduzido de cerca de 6 hs, sem MeOH, para aproximadamente 3 hs com MeOH 50%. Decidiu-se, então, utilizar ácido fórmico 0,1 mol/L em MeOH 50%.

5. Concentração e pH da solução de acetato de amônio

A solução de acetato de amônio usada previamente para condicionamento e *clean-up* da resina (0,25 mol/L pH 8,80) resultou em picos distorcidos e separação insuficiente dos analitos (Figura 40).⁹¹ A concentração elevada de acetato de amônio na solução de *clean-up* durante a extração pode interferir nas interações entre os analitos e a resina. O cátion amônio interage com o borato através de forças coulômbicas, blindando os sítios de ligação dos analitos. Além disso, a força iônica elevada favorece interações π - π ou hidrofóbicas entre os anéis fenila e possíveis interferentes da matriz, que podem alterar o perfil de separação dos nucleosídeos estudados.⁹³ A solução foi, então, diluída 10 vezes para melhorar tal aspecto.

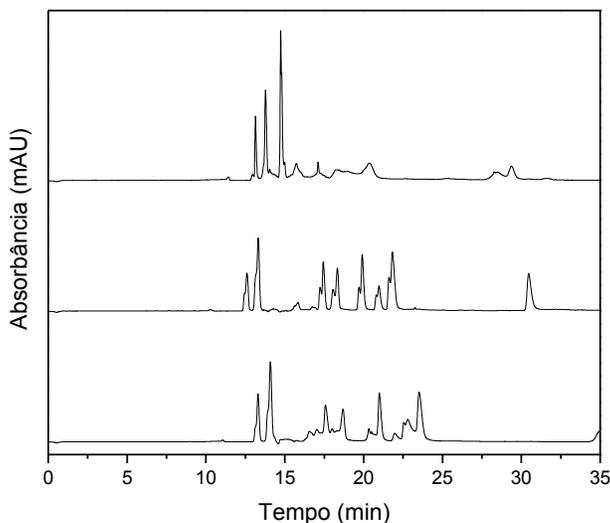


Figura 40 – Eletroferogramas obtidos para três extrações sucessivas com condicionamento e *clean-up* da resina com solução de acetato de amônio 0,25 mol/L pH 8,8. Condições: análogas às da Figura 37.

Em busca de melhores recuperações, decidiu-se otimizar a concentração e o pH da solução de acetato de amônio em uma abordagem multivariada de 3 níveis (pH 7,8, 8,8 e 9,8) e 4 fatores (10, 15, 20 e 25 mmol/L), conforme as Figuras 41 e 42. Os resultados demonstraram que o aumento do pH gera melhores

recuperações, porém o pH 9,8 resultou em alteração do perfil dos picos. O acetato de amônio apresenta pKa de 9,2, portanto, em tal pH o cátion NH_4^+ apresenta-se predominantemente na forma desprotonada (NH_3). Assim, interações por ligação de hidrogênio com as hidroxilas do íon borônio e ligações coordenadas, nas quais o par de elétrons livre da amônia é compartilhado com o átomo de boro (eletrófilo), dificultam a retenção dos nucleosídeos.⁹³ Desta forma, seu uso foi abolido e as recuperações não puderam ser calculadas. Os CVs das recuperações variaram entre 5,3 (8BrG) e 41,8% (T) para pH 7,8; e 3,4 (G) e 52,4% (T) para pH 8,8. As maiores variações entre réplicas foram obtidas para a T, analito que não apresenta o grupo 1,2-cis-diol e interage com a resina apenas através de interações fracas 1,3-diol, portanto sua extração tem baixa eficiência. Decidiu-se empregar o pH 8,8 como valor ideal devido às maiores recuperações obtidas.

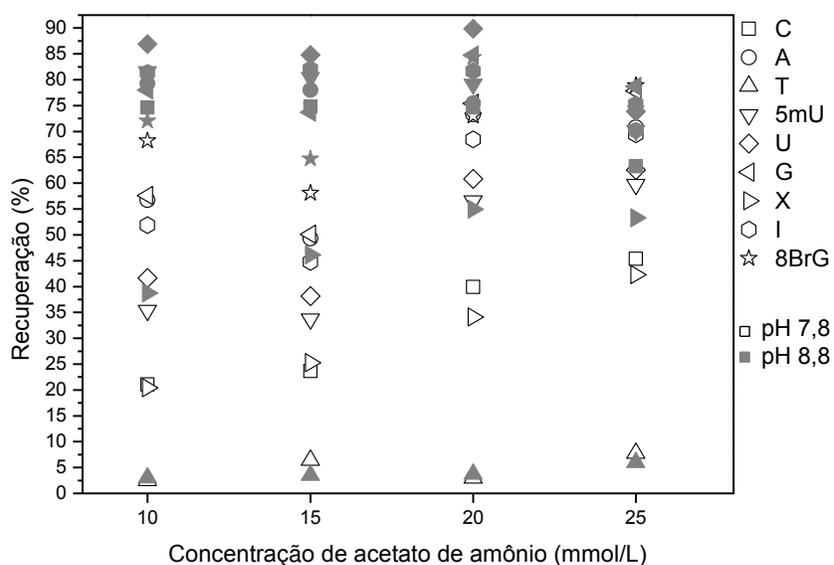


Figura 41 – Recuperações obtidas para a otimização de concentração e pH da solução de acetato de amônio, empregada para condicionamento e *clean-up* da resina durante a extração dos analitos, por planejamento multivariado. Condições: análogas às da Figura 37.

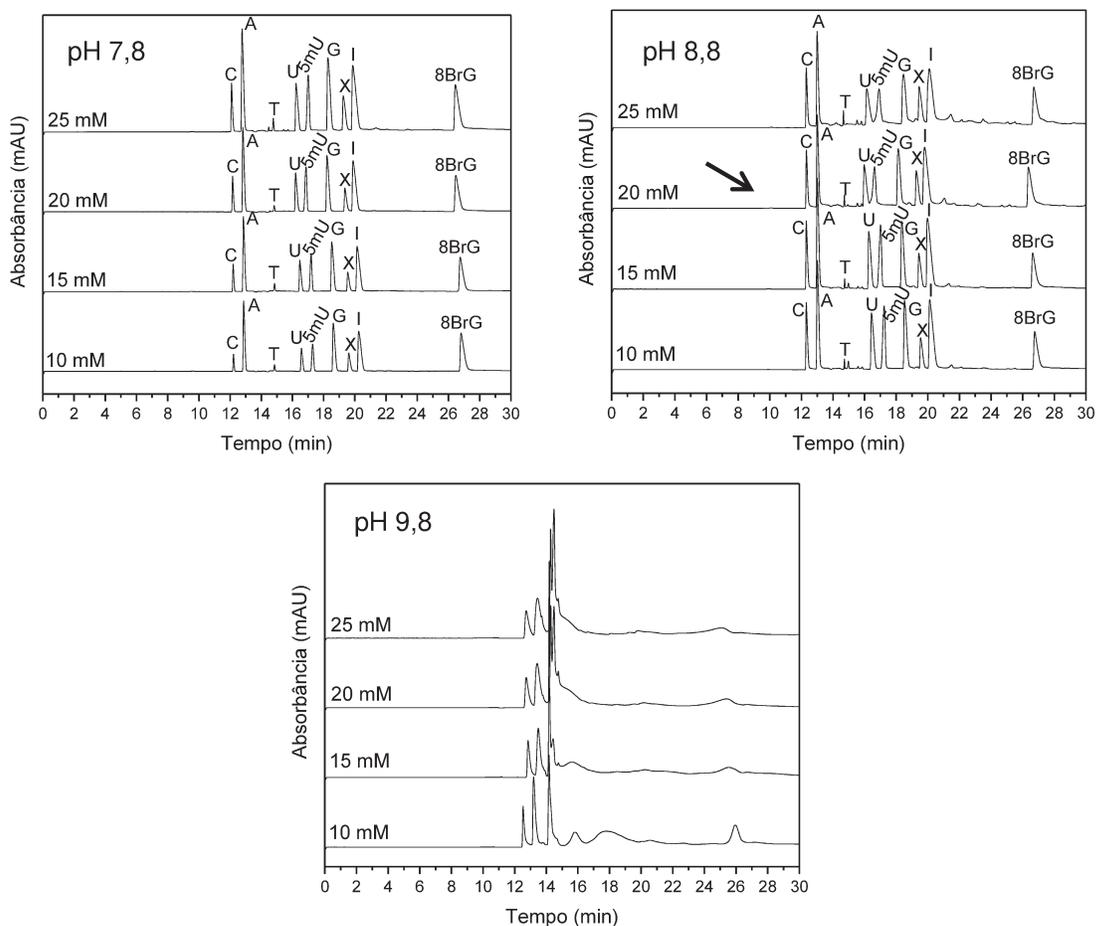


Figura 42 – Eletroferogramas obtidos para a otimização de concentração e pH da solução de acetato de amônio, empregada para condicionamento e *clean-up* da resina durante a extração dos analitos, por planejamento multivariado. A melhor condição é destacada pela seta (20 mmol/L pH 8,8). Condições: análogas às da Figura 37.

Quanto à concentração da solução de acetato de amônio, dois nucleosídeos apresentaram melhor recuperação em 10,0 mmol/L (A e U); dois em 15,0 mmol/L (C e I) e quatro em 20,0 mmol/L de acetato de amônio (5mU, G, X e 8BrG), como mostrado na Figura 41. A recuperação do analito T não foi considerada para a escolha, dado que o nucleosídeo não possui grupo 1,2-cis-diol, portanto apresenta baixíssima afinidade com a resina de PBA. A melhor condição, portanto, foi 20 mmol/L de acetato de amônio em pH 8,8. Em tal condição, os CVs das recuperações variaram entre 5,7 (A) e 33,5% (T).

6. Composição da solução de eluição

A composição da solução de ácido fórmico empregada durante as extrações para eluição dos analitos foi avaliada com 3 níveis (concentração de MeOH em 50, 75 e 100% v/v) e 5 fatores (concentração de ácido fórmico em 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0% v/v). Em geral, o aumento na concentração de MeOH leva à diminuição das áreas dos picos, devido à menor solubilidade dos analitos no solvente orgânico (Figuras 43 e 44). As maiores áreas foram obtidas para ácido fórmico 1,0% em MeOH 50%, com aumentos entre 2,6 (A) e 17,1% (U), porém com perda de 0,5% para C, em relação à solução de ácido fórmico empregada anteriormente (0,1 mol/L em MeOH:água 50%). Os CVs das áreas dos picos ficaram entre 7,4 (8BrG) e 19,5% (X) e as recuperações, entre 24,7 (T) e 98,8% (A).

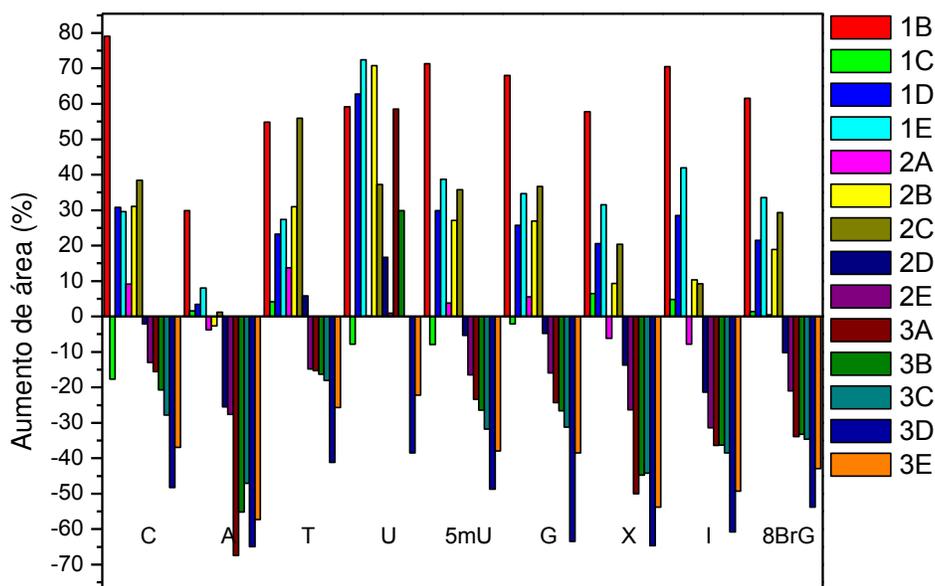


Figura 43 – Aumentos de área obtidos para a otimização da composição da solução de eluição por planejamento multivariado em relação à solução composta por MeOH 50% e ácido fórmico 0,5% (v/v). 1: MeOH 50%; 2: MeOH 75%; 3: MeOH 100%; A: ácido fórmico 0,5%; B: ácido fórmico 1,0%; C: ácido fórmico 2,0%; D: ácido fórmico 3,0%; E: ácido fórmico 4,0% (v/v). Condições: análogas às da Figura 37.

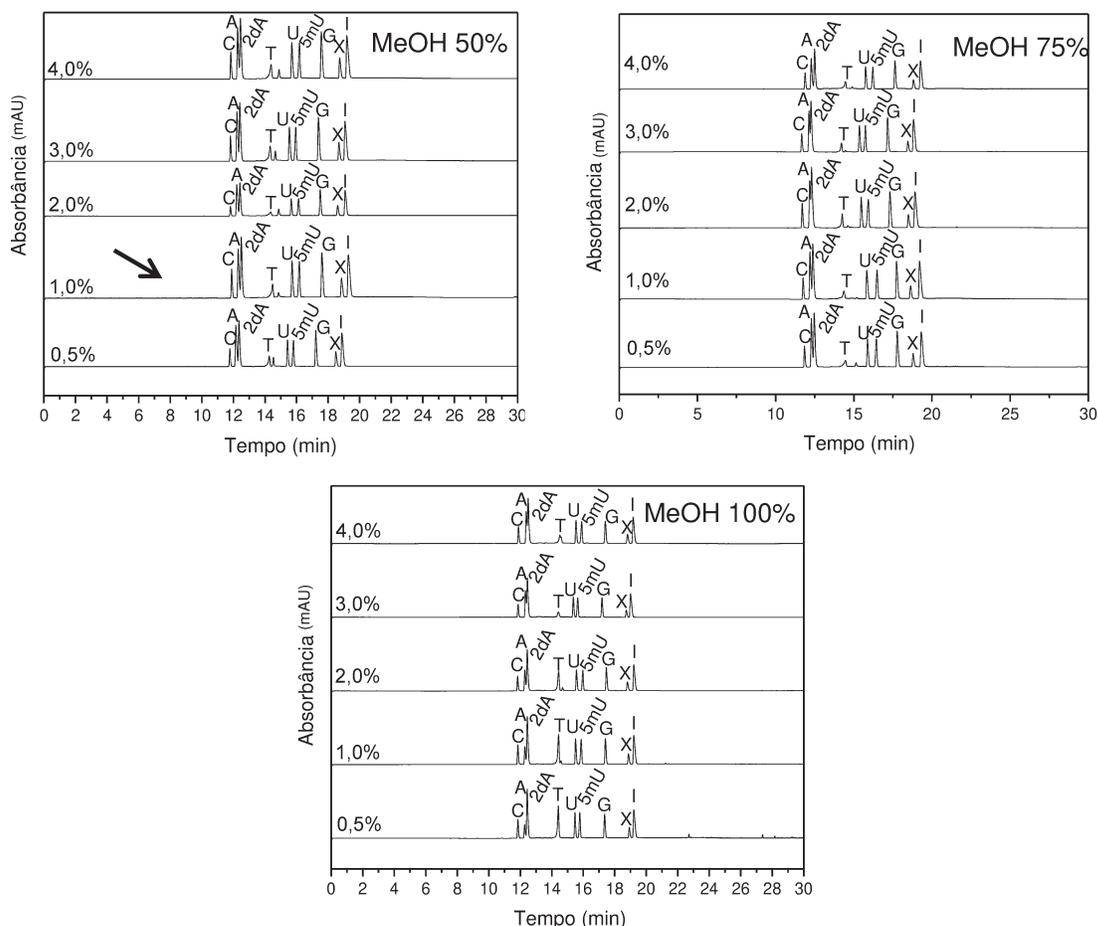


Figura 44 – Eletroferogramas obtidos para a otimização da composição da solução de eluição dos analitos da resina de PBA, *i.e.* ácido fórmico e MeOH. A melhor condição é destacada pela seta (ácido fórmico 1% em MeOH 50% v/v). Condições: análogas às da Figura 37, porém sem 8BrG.

7. Método de extração proposto por Jiang *et al.*⁸¹

Além da metodologia de separação, Jiang *et al.* propuseram uma metodologia para extração de nucleosídeos a partir de amostras de urina empregando resina de PBA.⁸¹ Neste trabalho, a resina é condicionada com 15 mL de ácido fórmico 0,1 mol/L em metanol 50% seguido por 15 mL de acetato de amônio 0,25 mol/L em pH 8,6. O pH da amostra é ajustado entre 8,2 e 8,6 com amônia e 1 mL da mistura é carregado no cartucho de extração, seguido por 0,5 mL de acetato de amônio 0,25 mol/L pH 8,6. Após 5 ou 10 min, os interferentes

são carregados com 4 mL de acetato de amônio 0,25 mol/L pH 8,6; 0,3 mL de metanol 50% por duas vezes; e 0,5 mL de ácido fórmico em metanol 50%. A eluição é feita com 3 mL de ácido fórmico 0,1 mol/L em metanol 50% e o eluato é evaporado à secura e ressuspendido em 200 µL de água. Os autores reportam recuperações entre 81,2 (I) e 113% (C), que estimulam o uso de tal procedimento, portanto as condições empregadas foram testadas. A etapa de lavagem com 0,5 mL de ácido fórmico 0,1 mol/L em metanol 50% foi, porém, eliminada, já que o meio ácido deve eluir os analitos e isso poderia prejudicar as recuperações obtidas. Os principais diferenciais propostos, portanto, são o uso de solução de acetato de amônio mais concentrada e a passagem de MeOH 50% na etapa de *clean-up*.

A Figura 45 apresenta o eletroferograma obtido em comparação com o método empregado até o momento, aqui denominado de “condição normal”. Observa-se claramente que o procedimento proposto por Jiang *et al.*, com a modificação quanto à lavagem ácida, reduziu as áreas dos picos obtidas e levou à deformação do perfil de separação. Houve perda de área entre 40,4 (I) e 76,7% (T), com exceção de I e 8BrG, que apresentaram aumento de 17,7 e 10,2%, respectivamente. A alta concentração de acetato de amônio empregada favorece a blindagem da resina quanto à interação com os analitos de interesse e o uso de MeOH 50% antes da eluição, sem ajuste de pH, pode causar perdas dos nucleosídeos, já que tal solução deve ter caráter levemente ácido. A metodologia foi considerada como inadequada.

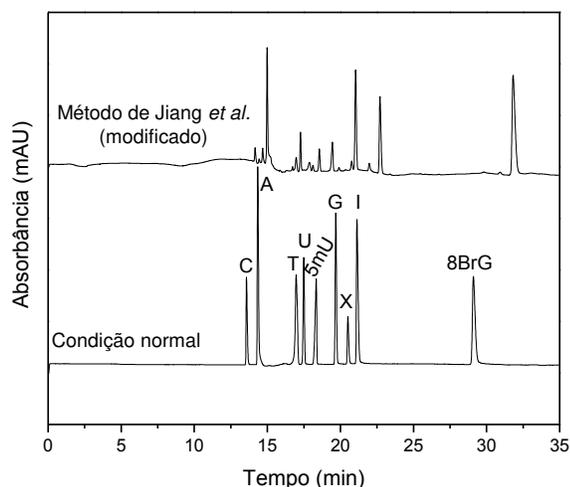


Figura 45 – Comparação entre a metodologia de extração proposta por Jiang *et al.* e a condição otimizada até o momento. Condições: análogas às da Figura 37.

8. Volume de ressuspensão

O volume de água empregado para ressuspensão do eluato após a secagem em fluxo de nitrogênio foi avaliado entre 125 e 500 μL , para a extração de 500 μL de amostra de soro sanguíneo fortificado com solução de padrões na concentração final de 100 $\mu\text{mol/L}$. Os eletroferogramas obtidos são apresentados na Figura 46 e as variações de área em relação à ressuspensão no mesmo volume da alíquota de amostra podem ser observadas na Figura 47. O menor volume de ressuspensão favorece a detectabilidade dos analitos, já que a etapa de preparo de amostra envolve também sua pré-concentração, porém os interferentes presentes na matriz também são concentrados e podem causar aumento do ruído da linha de base e variações no perfil dos picos devido à maior força iônica na banda da amostra.

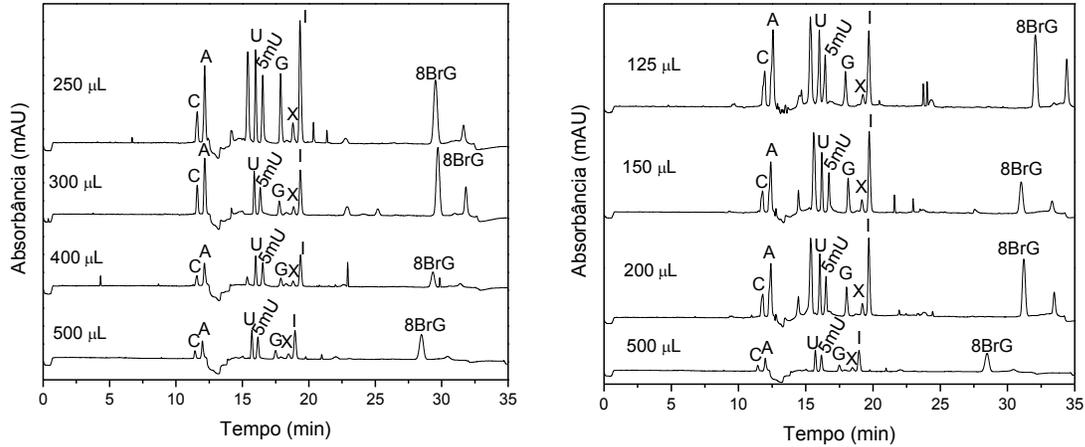


Figura 46 – Eletroferogramas obtidos para otimização do volume de ressuspensão a partir da extração de 500 μL de matriz de soro sanguíneo fortificada com solução de padrões na concentração final de 100 μmol/L. Condições: análogas às da Figura 37, porém com matriz de soro sanguíneo fortificada com solução mista de padrões na concentração de 100 μmol/L, sem T.

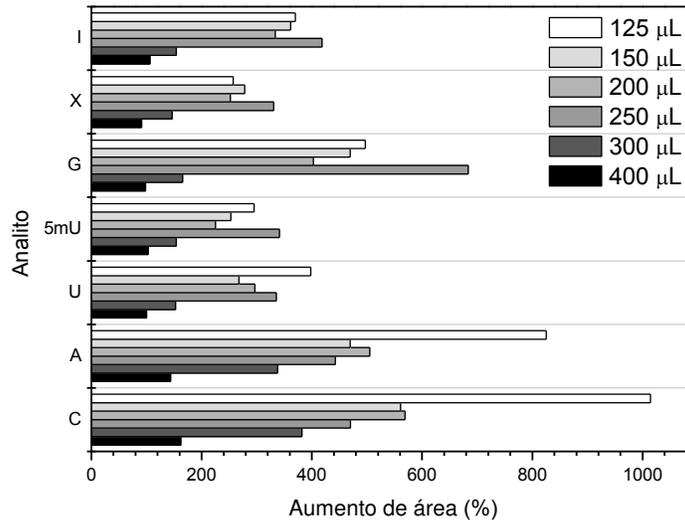


Figura 47 – Aumentos de área obtidos para a ressuspensão em volumes variados de água, a partir da extração de 500 μL de amostra, em relação à ressuspensão em 500 μL de água. Condições: análogas às da Figura 37, porém com matriz de soro sanguíneo fortificada com solução de padrões na concentração de 100 μmol/L, sem T.

Os maiores aumentos de área para 5mU, G, X e I ocorreram para ressuspensão em 250 μ L. Já para C, A e U, os maiores aumentos de área foram para 125 μ L, o menor volume testado. A concentração excessiva, porém, leva a distorções nos picos e maior dificuldade na integração, que pode causar o menor aumento observado para os demais analitos. Em termos de altura, fator mais importante para a detectabilidade, os maiores aumentos ocorreram para 250 μ L, com exceção da C, cujo maior aumento foi em 200 μ L. Assim, a ressuspensão em 250 μ L de água, a partir da extração de 500 μ L de amostra, foi escolhida como condição ótima (concentração de 2 vezes).

9. Concentração da solução de acetato de amônio

Ao fim das otimizações descritas, notou-se que os eletroferogramas obtidos não apresentavam repetibilidade adequada na matriz de soro sanguíneo com ressuspensão na metade do volume da alíquota de amostra extraída, *i.e.* o perfil dos picos apresentava-se distorcido em algumas extrações, com aparência similar à obtida para a extração com solução de acetato de amônio 0,25 mol/L (Figura 39). Considerou-se que tal variação poderia ser causada por concentração de acetato de amônio elevada, que favorece a retenção de interferentes por interação π - π , além de blindar a ligação dos analitos devido a ligações de hidrogênio entre a amônia e os grupos hidroxila da resina. Assim, decidiu-se re-otimizar a concentração da solução de acetato de amônio entre 2 e 20 mmol/L, já que a extração de amostras reais seria prejudicada pela falta de repetibilidade dos resultados (Figura 48).

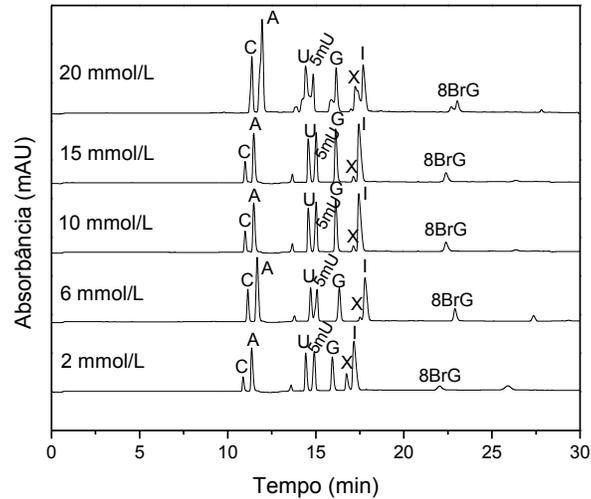


Figura 48 – Eletroferogramas obtidos para a otimização da concentração de acetato de amônio na solução de condicionamento e *clean-up*. Condições: análogas às da Figura 37, porém com matriz de soro sanguíneo fortificada com solução de padrões na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$, sem T.

Observa-se claramente que a redução na concentração de acetato de amônio resulta em melhor perfil dos picos e é ideal para as concentrações de 2 e 6 mmol/L . Porém, a redução na concentração de acetato de amônio leva a menor capacidade tamponante da solução e, portanto, a perda de recuperação dos analitos. As menores recuperações são aceitáveis, desde que sejam reproduzíveis. Entre as concentrações de 2 e 6 mmol/L , as maiores recuperações foram obtidas para 6 mmol/L em todos os analitos (entre 53,0 – I e 155,3% – A), com exceção de X (20,7% para 6 mmol/L e 41,1% para 2 mmol/L). Assim, a concentração de 6 mmol/L foi escolhida como ótima para a metodologia de extração dos analitos a partir da matriz de soro sanguíneo.

10. Conclusões

O método otimizado para extração dos nucleosídeos a partir da matriz de soro sanguíneo emprega 200 mg de resina de PBA empacotados em coluna de SPE com 1,3 cm de diâmetro. A resina é inicialmente lavada com 10 mL de solução de ácido fórmico 1,0% em MeOH:água 50% (v/v), seguida por

condicionamento com 10 mL de solução tampão de acetato de amônio 6 mmol/L em pH 8,80. Uma alíquota de 500 µL de amostra é, então, adicionada, e os interferentes são eliminado com 4 mL da mesma solução tampão. Por fim, os analitos são eluídos com 4 mL de solução de ácido fórmico 1,0% em MeOH:água 50% (v/v). O eluato é evaporado à secura em fluxo de nitrogênio e ressuspendido em 250 µL de água. A resina, por fim, é lavada com 10 mL de solução de ácido fórmico 1,0% em MeOH:água 50% (v/v) e armazenada neste meio em temperatura ambiente até o próximo uso. A Tabela 3 apresenta as recuperações obtidas para matriz de soro sanguíneo fortificada com solução mista de padrões na concentração de 100 µmol/L. As recuperações são mais altas para analitos de maior mobilidade eletroforética. Os valores são reduzidos para X, provavelmente devido à geometria da molécula, que apresenta possibilidade de ligação de hidrogênio entre as hidroxilas do grupo cis-diol e o nitrogênio sem ligações duplas da base nitrogenada, o que poderia dificultar a formação de ligações com a resina. As baixas recuperações obtidas para guanosina também são atribuídas à possível formação de ligações de hidrogênio, enquanto que, para 8BrG, o impedimento estérico causado pelo átomo volumoso de bromo pode prejudicar a retenção. Os valores obtidos, apesar de reduzidos em alguns casos, são satisfatórios, desde que a metodologia seja precisa e exata durante a etapa de validação.

Tabela 3 – Recuperações obtidas para matriz de soro sanguíneo fortificada com solução de padrões 100 µmol/L extraída com o método otimizado.

Analito	Recuperação (%)
C	141.18
A	155.27
U	80.08
5mU	79.57
G	54.46
X	20.68
I	77.59
8BrG	53.01

Capítulo 5

Estudo de estratégias de pré-concentração

1. Materiais e equipamentos

Foram empregados capilares de sílica fundida modelo *bubble cell* ou *extended light path* (cela de detecção estendida), com 50 μm de diâmetro interno, 56 cm de comprimento total e 64,5 cm de comprimento efetivo, provenientes da Agilent Technologies (Waldbroon, Alemanha). Os demais materiais e reagentes empregados foram descritos nos capítulos 3 e 4.

2. Modos de injeção

A injeção de um *plug* de amostra discreto no capilar em CE pode ser feita de duas maneiras: através da aplicação de tensão no *vial* da amostra (eletrocínética), viável somente para analitos iônicos; e através da aplicação de pressão (hidrodinâmica), viável tanto para compostos neutros quanto para iônicos. Os analitos estudados apresentam caráter predominantemente neutro quando dissolvidos em água, porém devem estar complexados com borato se dissolvidos no BGE ou em tampão ácido bórico, formando espécies aniônicas, portanto, em teoria, podem ser injetados tanto pelo modo hidrodinâmico quanto pelo eletrocínético, desde que o meio da amostra seja otimizado. Ainda assim, é esperado que a injeção eletrocínética apresente um maior nível de dificuldade, já que a complexação com borato ocorre em equilíbrio dinâmico e depende da concentração total de boro e do pH do meio.

Na injeção eletrocínética, o *vial* de eletrólito na posição de *inlet* é substituído momentaneamente pelo *vial* da amostra e a tensão é aplicada. Compostos com cargas na solução da amostra são impulsionados seletivamente para dentro do capilar. A quantidade de analito injetada depende da sua carga, da sua mobilidade eletroforética, do tempo de injeção, da tensão aplicada e da razão das condutividades do BGE e do meio da amostra. A injeção hidrodinâmica, por outro lado, requer a aplicação de pressão sobre o *vial* da amostra na posição de *inlet* ou vácuo sobre o *vial* na posição de *outlet*. Ainda, uma diferença de pressão pode ser obtida a partir da elevação do *vial* de amostra, induzindo fluxo de solução para

dentro do capilar através da ação da gravidade. Tal tipo de injeção insere no capilar um volume de solução da amostra tipicamente na faixa de nL, contendo todos os seus componentes, incluindo solventes.¹⁰⁰ O volume injetado depende da diferença de pressão entre os *vials* de *inlet* e *outlet*, das dimensões do capilar, do tempo de injeção e da viscosidade da solução da amostra.^{100,101}

A detectabilidade de analitos em CE-UV é reduzida devido ao caminho óptico, correspondente ao diâmetro interno do capilar, e ao pequeno volume de amostra injetado, tanto pelo modo eletrocinético quanto pelo hidrodinâmico. Os capilares com diâmetro reduzido auxiliam a minimizar o efeito Joule, permitindo a aplicação de tensões mais elevadas e eletrólitos com maior condutividade, porém a detectabilidade é diminuída. Para elevar a sensibilidade do método, capilares com cela de detecção estendida podem ser empregados. Tal modelo apresenta cela de detecção em formato de bolha com diâmetro maior do que o do corpo do capilar, o que possibilita um aumento no caminho óptico e, conseqüentemente, resulta em limites de quantificação menores (Figura 49). O diâmetro interno na cela de detecção pode ser até cinco vezes maior do que no restante do capilar.

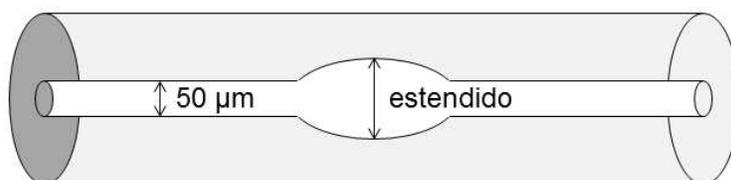


Figura 49 – Ilustração do capilar com cela de detecção estendida.

Além disso, estratégias de pré-concentração *online* podem ser empregadas, com injeção de grandes *plugs* de amostra seguida por contração da banda dos analitos dentro do capilar. O modo mais simples de pré-concentração é conhecido como *sample stacking*, no qual a amostra é preparada em BGE diluído ou solução eletrolítica de baixa condutividade, enquanto que o BGE deve ser uma solução de condutividade maior. A injeção hidrodinâmica insere um *plug* de amostra no capilar, que deve estar preenchido com BGE. Ao aplicar tensão sobre o capilar, os íons do analito migram rapidamente na banda da amostra em direção ao eletrodo de carga oposta, porém suas velocidades são reduzidas ao se aproximarem da

banda do BGE devido à diferença de condutividade. Assim, os íons de interesse são “empilhados” na fronteira entre a banda de amostra e o BGE. A dissolução da amostra em água, neste caso, pode levar a uma resistência muito elevada na banda de amostra em relação ao BGE, que causa mistura por convecção (efeito Joule) e, conseqüentemente, gera perda de eficiência dos picos. A condição considerada ideal para *stacking* geralmente envolve o meio da amostra composto por solução dez vezes mais diluída do que o BGE.^{98,101}

A teoria básica de *stacking* possibilitou o desenvolvimento de novas estratégias de pré-concentração *online* em CE. As próximas seções descrevem diversas estratégias avaliadas para os nucleosídeos, tanto no modo de injeção hidrodinâmico quanto no eletrocínético. O aumento de altura em termos de porcentagem foi considerado como fator primordial na escolha da melhor condição, porém a resolução mínima de 1,5 foi um parâmetro eliminatório. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3. Injeção eletrocínética

Em busca de detectabilidades adequadas à análise de nucleosídeos em soro sanguíneo, avaliou-se a possibilidade de aplicação de injeções eletrocínéticas. Foi empregada solução de padrões 100 µmol/L em todas as condições testadas, em água ou solução tampão com pHs variados, e os resultados foram comparados com a condição 1, composta pela injeção previamente utilizada (injeção hidrodinâmica de padrões em água a 50 mbar por 30 s). A Tabela 4 apresenta um resumo das condições avaliadas. As Figuras 50 e 51 mostram as variações de altura dos picos em relação à condição 1 e as resoluções obtidas para as condições de 2 a 30, porém as condições nas quais os picos não puderam ser integrados não são mostradas.. Os eletroferogramas podem ser observados na Figura 52.

Tabela 4 – Condições avaliadas na otimização da injeção eletrocínética (continua na página seguinte).

Condição	Descrição
1	Amostra em água; injeção a 50 mbar por 30 s (normal)
2	Amostra em água; -10 kV por 30 s
3	Amostra em água; 10 kV por 30 s
4	Amostra em tampão ácido bórico 3 mmol/L pH 9,90; injeção a 50 mbar por 30 s (hidrodinâmica)
5	Amostra em tampão ácido bórico 3 mmol/L pH 9,90; -10 kV por 30 s
6	Amostra em tampão ácido bórico 3 mmol/L pH 9,90; 10 kV por 30 s
7	Amostra em água com pH ajustado para 1 com HCl 1,0 mol/L; 10kV por 30 s
8	Amostra em água com pH ajustado para 13 com NaOH 1,0 mol/L; -10 kV por 30 s
9	Amostra em solução de ácido bórico 3 mmol/L pH 11,0; -10 kV por 30 s
10	Análoga a 9, porém com pH 12,0
11	Análoga a 9, porém com pH 13,0
12	Amostra em água; injeção a -10 kV por 30 s seguida por NaOH 1,0 mol/L a -10 kV por 5 s (<i>pH mediated stacking</i>) ¹⁰⁴
13	Análoga a 12, porém com NaOH por 10 s
14	Análoga a 12, porém com NaOH por 2 s
15	Amostra em tampão ácido bórico 3 mmol/L pH 9,90; injeção a -10 kV por 30s seguida por NaOH 1,0 mol/L a -10 kV por 5 s (<i>pH mediated stacking</i>) ¹⁰⁴
16	Análoga a 15, porém com NaOH por 10 s
17	Análoga a 15, porém com NaOH por 20 s
18	Análoga a 15, porém com NaOH por 2 s
19	Amostra em água; injeção de NaOH 1,0 mol/L a -10 kV por 5 s seguida por amostra a -10 kV por 30 s
20	Análoga a 19, porém com NaOH por 10 s
21	Análoga a 20, porém com NaOH por 20 s
22	Amostra em tampão ácido bórico 3 mmol/L pH 9,90; injeção de NaOH 1,0 mol/L a -10 kV por 5 s seguida por amostra a -10 kV por 30 s
23	Análoga a 22, porém com NaOH por 10 s
24	Análoga a 22, porém com NaOH por 20 s
25	Amostra em tampão ácido bórico 3 mmol/L pH 8,20; injeção a -10 kV por 30 s (<i>dynamic pH junction</i>) ¹⁰⁵
26	Análoga a 25, porém com pH 9,20
27	Análoga a 25, porém com pH 10,20
28	Análoga a 25, porém com tampão ácido bórico 30 mmol/L
29	Análoga a 26, porém com tampão ácido bórico 30 mmol/L
30	Análoga a 27, porém com tampão ácido bórico 30 mmol/L
31	Amostra em tampão fosfato monossódico 3 mmol/L pH 6,20; injeção a -10 kV por 30 s (<i>dynamic pH junction</i>) ¹⁰⁵
32	Análoga a 31, porém com pH 7,20
33	Análoga a 31, porém com tampão fosfato 30 mmol/L
34	Análoga a 31, porém com tampão fosfato 30 mmol/L e pH 7,20
35	Análoga a 25, porém com pH 8,00

Condição	Descrição
36	Análoga a 25, porém com pH 7,50
37	Análoga a 31, porém com tampão fosfato 5 mmol/L em pH 7,20
38	Análoga a 31, porém com tampão fosfato 10 mmol/L em pH 7,20
39	Análoga a 31, porém com tampão fosfato 20 mmol/L em pH 7,20
40	Amostra em tampão ácido bórico 3 mmol/L pH 8,00; injeção a -10 kV por 30 s seguida por NaOH 0,1 mol/L a -10 kV por 5 s (<i>dynamic pH junction e pH mediated stacking</i>) ¹⁰⁶
41	Análoga a 40, porém com NaOH 0,1 mol/L a -10 kV por 2 s
42	Análoga a 40, porém com água a -10 kV por 5 s
43	Análoga a 40, porém com água a -10 kV por 2 s

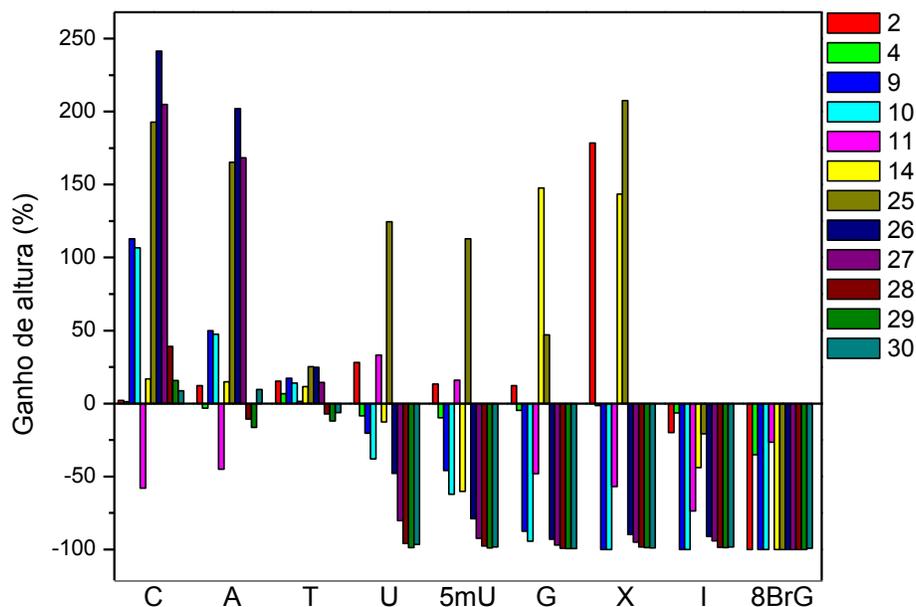


Figura 50 – Variações de altura obtidas para a avaliação das condições de injeção no modo eletrocinético (de 2 a 30) em relação à condição 1. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução da amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 4).

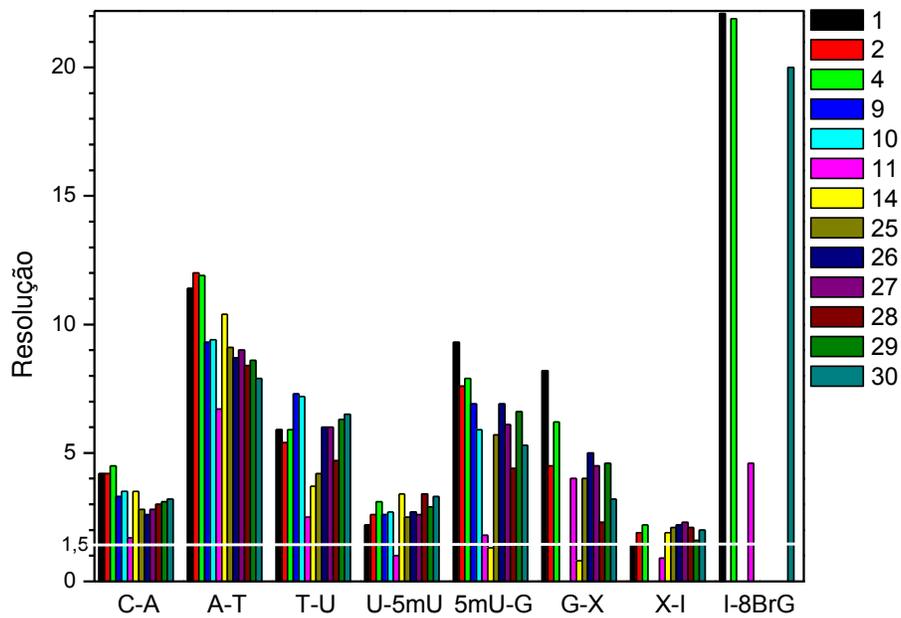


Figura 51 – Resoluções obtidas para a avaliação das condições de injeção no modo eletrocinético (de 1 a 30). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução da amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 4).

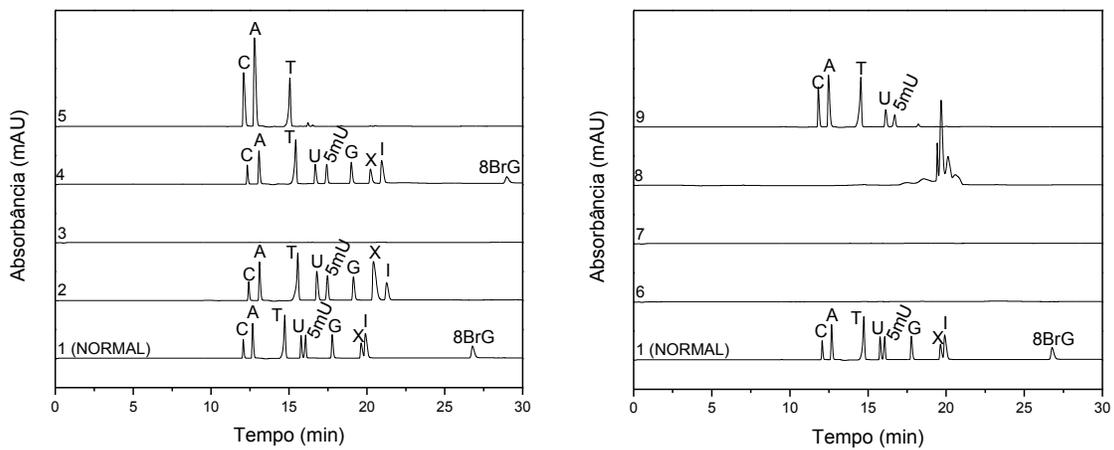


Figura 52 – Legenda na página seguinte

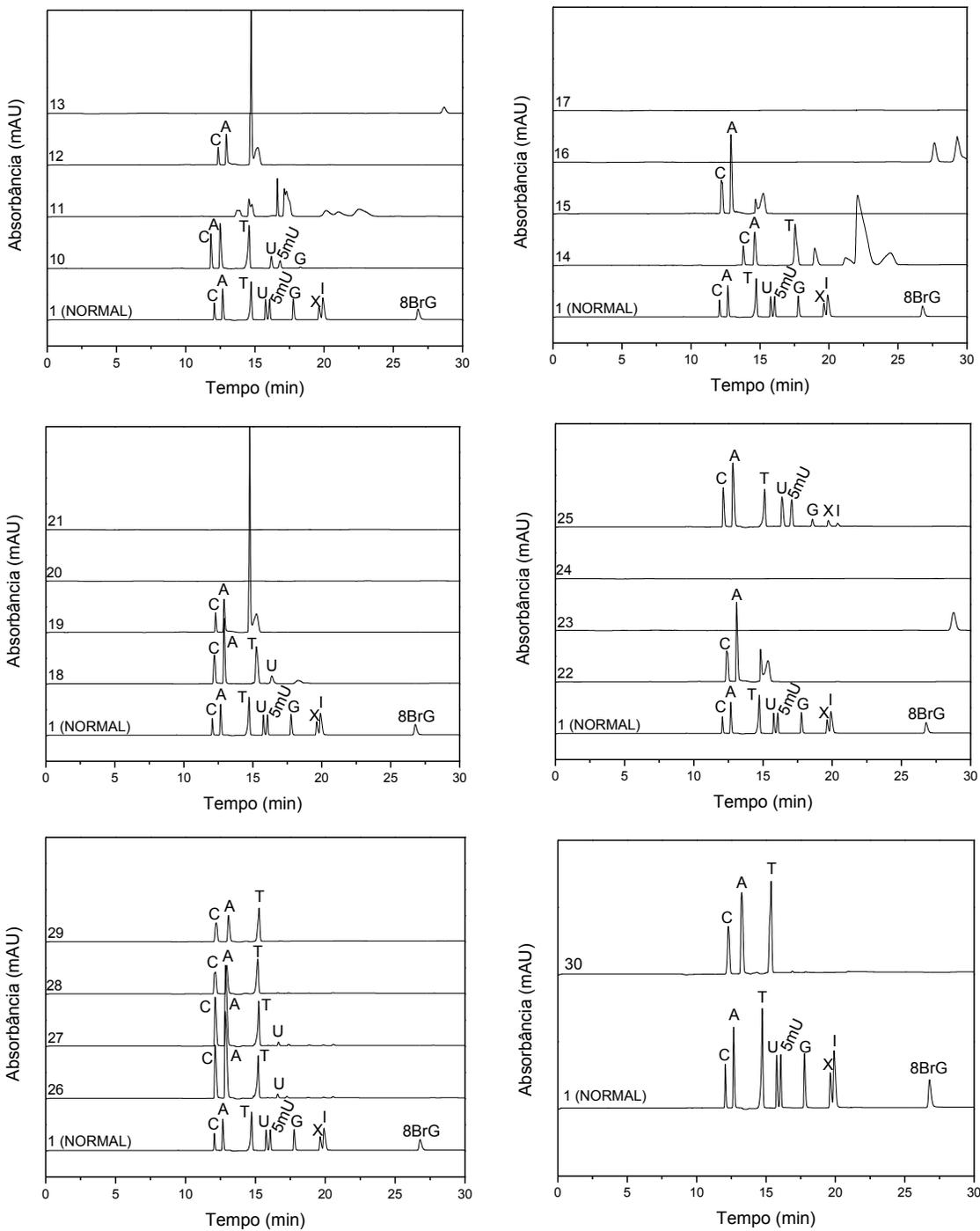


Figura 52 – Eletroferogramas obtidos para a avaliação das condições de injeção no modo electrocinético (de 1 a 30). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução da amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 4).

As Figuras 53 e 54 mostram as variações de altura dos picos em relação à condição 1 e as resoluções obtidas para as condições de 31 a 43, porém as condições nas quais os picos não puderam ser integrados não são mostradas. Os eletroferogramas podem ser observados na Figura 55.

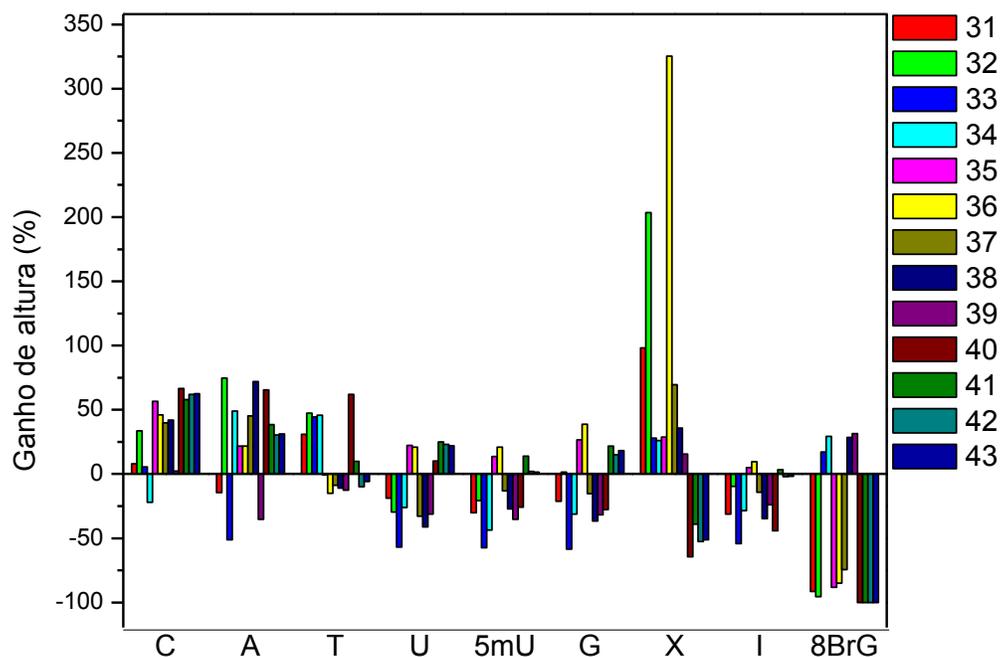


Figura 53 – Variações de altura obtidas para a avaliação das condições de injeção no modo electrocinético (de 31 a 43) em relação à condição 1. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução de amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 4).

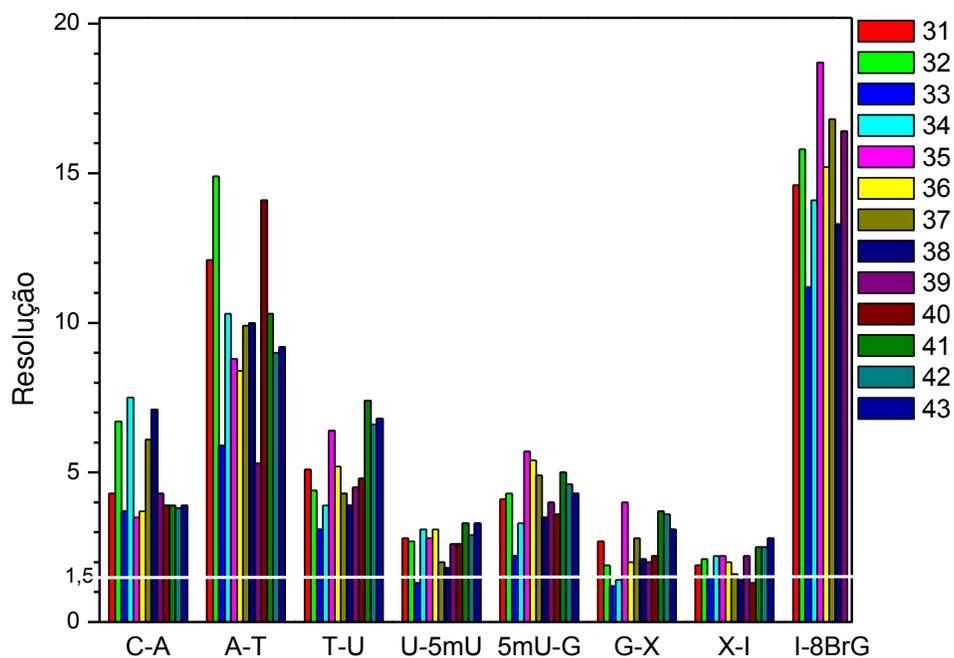


Figura 54 – Resoluções obtidas para a avaliação das condições de injeção no modo eletrocínético (de 31 a 43). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução de amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 4).

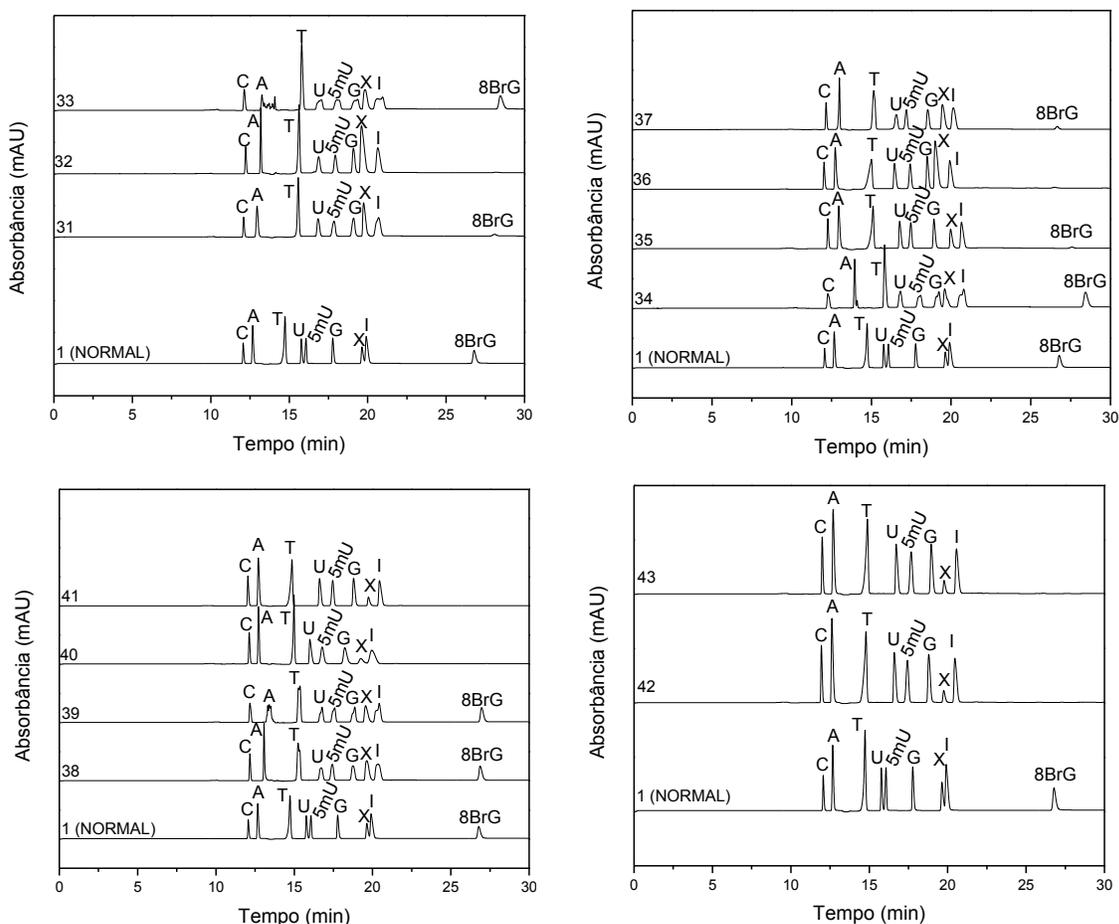


Figura 55 – Eletroferogramas obtidos para a avaliação das condições de injeção no modo eletrocínético (de 31 a 43). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução de amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 4).

Houve perda de altura em todas as condições, com destaque para os analitos de menor mobilidade. Ocorreu redução de área proporcional à altura, o que implica em menor quantidade de analitos injetada no capilar. Para que a ionização dos nucleosídeos seja atingida, são necessários pHs extremos, que alteram o perfil de separação e impossibilitam a análise, ou complexação com borato, altamente dependente do pH e da concentração total de boro. A melhor condição encontrada dentre as testadas foi a 35, *i.e.* injeção de solução de padrões em tampão borato 3 mmol/L pH 8,00 a -10 kV por 30 s. Tal condição apresenta o uso da estratégia de junção dinâmica de pH, que consiste na

dissolução da amostra em tampão com pH diferente do BGE. Assim, quando o analito passa da banda de amostra para a banda de BGE, pode ser ionizado ou complexado, o que altera sua mobilidade eletroforética. O objetivo final é um empilhamento dos analitos na fronteira entre as zonas de diferentes pHs para maximizar a detectabilidade dos analitos.¹⁰⁵ O pH de tal condição não é suficiente para que todos analitos estejam na forma aniônica, porém favorece a complexação com borato, presente no tampão. Ocorreu, porém, perda de altura de 88% para a 8BrG. O pico observado para o padrão interno apresentou altura muito reduzida, o que dificulta a integração e pode levar a maiores desvios nas análises. Decidiu-se, portanto, otimizar a condição 35 (tempo de injeção e tensão) em busca de maior detectabilidade para este analito. Foram testados: -10 kV a 30, 40, 50 e 60 s; -20 kV a 30, 40, 50 e 60 s; e -30 kV a 10, 20 e 30 s (Figuras 56, 57 e 58).

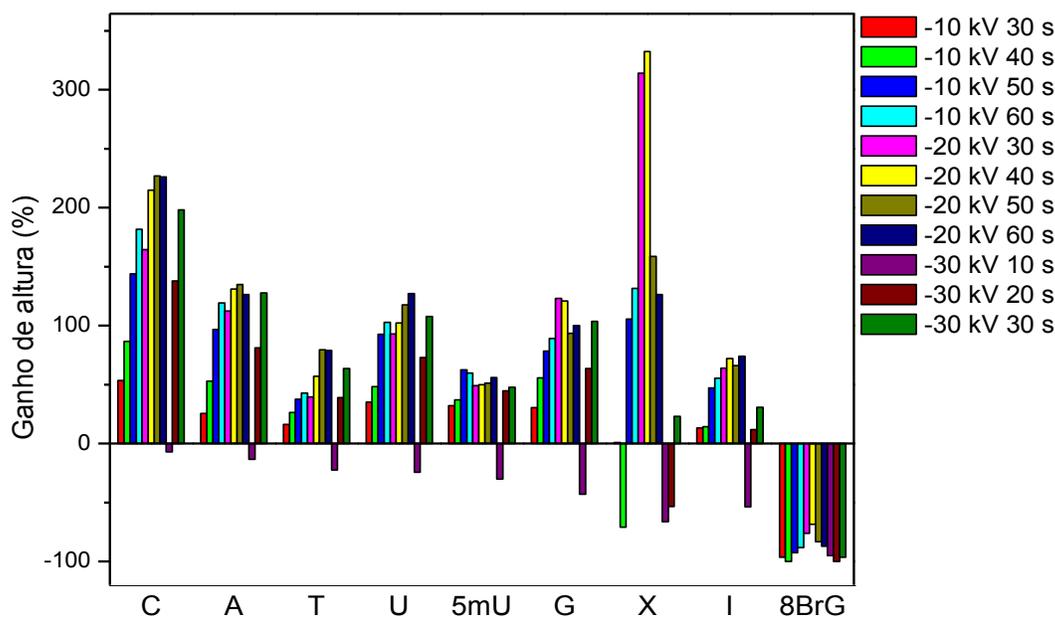


Figura 56 – Variações de altura obtidas para a otimização da tensão e do tempo de injeção eletrocinética para a condição 35 (injeção de solução de padrões em tampão borato 3 mmol/L pH 8,00 a -10 kV por 30 s). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis.

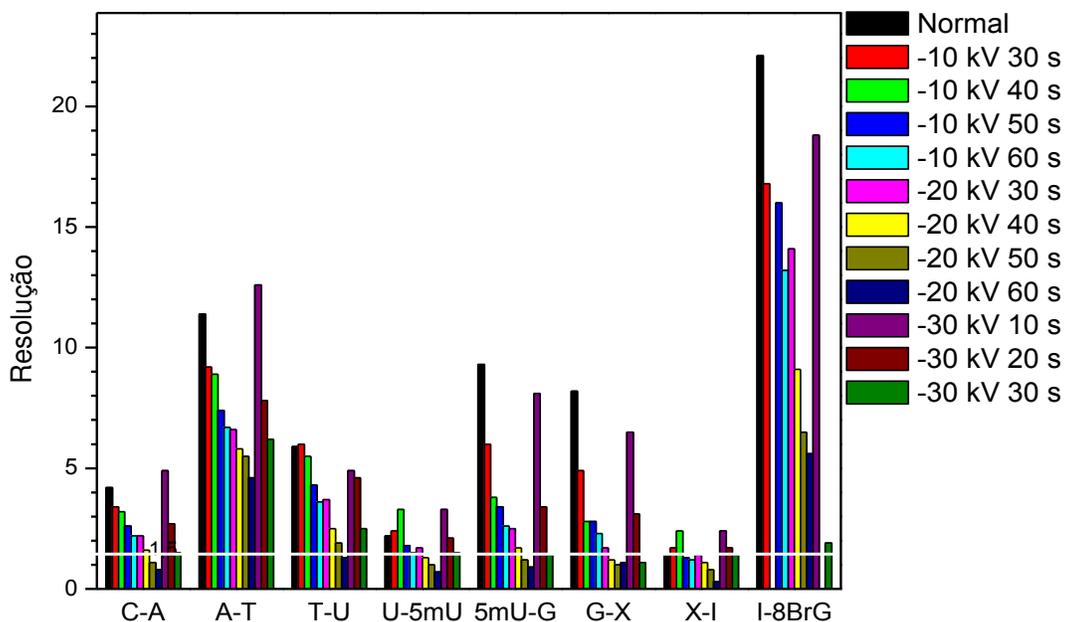


Figura 57 – Resoluções obtidas para a otimização da tensão e do tempo de injeção eletrocinética para a condição 35 (injeção de solução de padrões em tampão borato 3 mmol/L pH 8,00 a -10 kV por 30 s). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis.

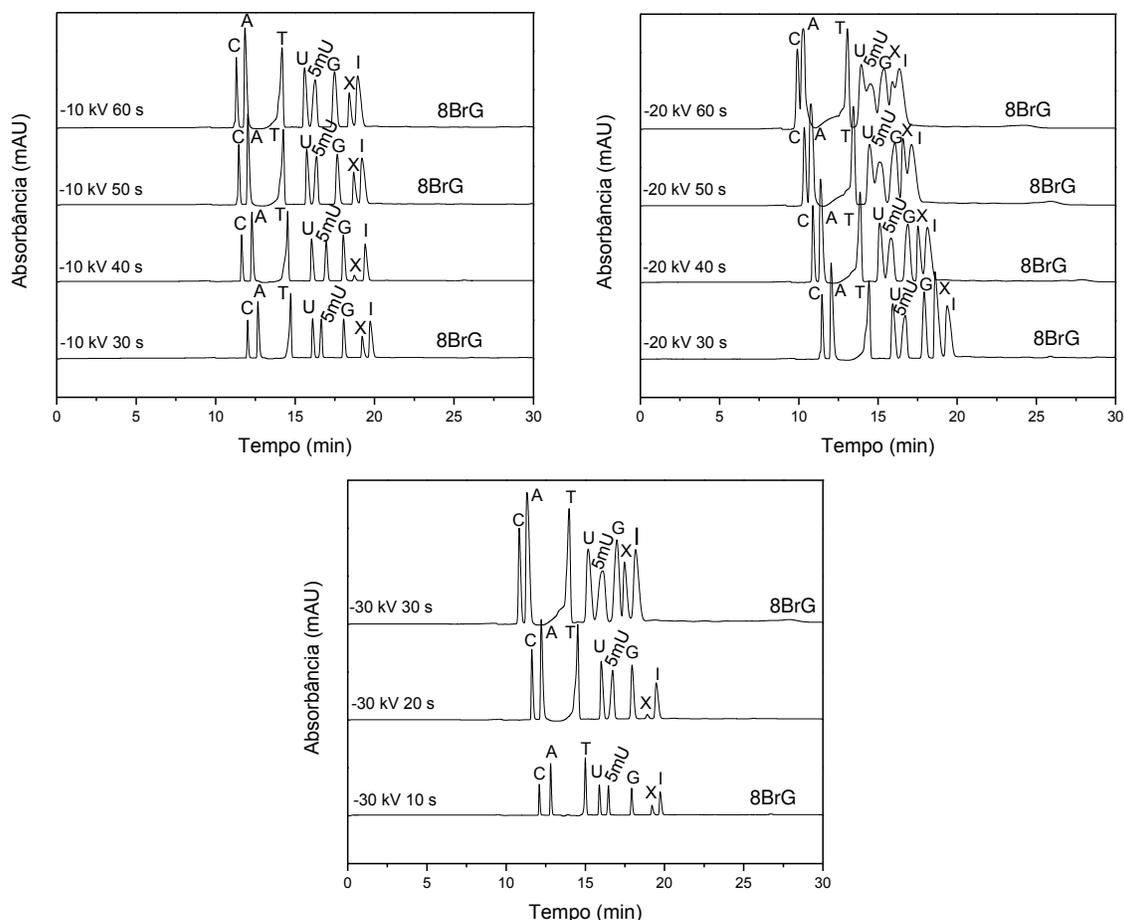


Figura 58 – Eletroferogramas obtidos para a otimização da tensão e do tempo de injeção eletrocinética para a condição 35 (injeção de solução de padrões em tampão borato 3 mmol/L pH 8,00 a -10 kV por 30 s). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis.

Para as condições de -10 kV a 40 s e -30 kV a 20 s, o pico da 8BrG não foi observado. Estas foram, portanto, desconsideradas. Para -10 kV a 50 e 60 s; -20 kV em todos os tempos; e -30 kV a 30 s ocorreram resoluções menores que 1,5, principalmente para o par de picos I-X. Para -30 kV a 10 s, houve perda de altura entre 7 (C) e 95% (8BrG) para todos os analitos. Assim, a condição prévia de -10 kV a 30 s foi escolhida como ótima, com ganho de altura entre 1 (X) e 54% (C) para todos os analitos, com exceção de 8BrG, que apresentou perda de 96%. A altura observada para o padrão interno dificulta a integração do pico, por ser muito

reduzida, como visto nos eletroferogramas apresentados (Figura 58). Conseqüentemente, o modo de injeção eletrocinético não foi adequado para a separação em questão.

4. Injeção hidrodinâmica

Diversas estratégias de injeção no modo hidrodinâmico foram avaliadas. Foi empregada solução de padrões 100 $\mu\text{mol/L}$ em todas as condições testadas, em água ou solução tampão, e os resultados foram comparados com a condição “normal”, composta pela injeção previamente utilizada (injeção hidrodinâmica de padrões em água a 50 mbar por 30 s). A Tabela 5 apresenta um resumo das condições avaliadas. As Figuras 59 e 60 mostram as variações de altura dos picos em relação à condição “normal” e as resoluções obtidas. Os eletroferogramas podem ser observados na Figura 61.

Tabela 5 – Condições avaliadas para a otimização da injeção no modo hidrodinâmico (continua na página seguinte). Em todos os casos que envolvem a aplicação de tensão, foram empregados *vials* de BGE, porém a amostra foi injetada no modo hidrodinâmico.

Condição	Descrição
NORMAL	Injeção a 50mbar por 30s
1	Injeção a 50 mbar por 60 s; -10 kV por 10 s; -50 mbar por 30 s
2	Injeção a 50 mbar por 60 s; -10 kV por 30 s; -50 mbar por 30 s
3	Injeção a 50 mbar por 60 s; -10 kV por 120 s; -50 mbar por 30 s
4	Injeção a 50 mbar por 60 s seguida de BGE por 10 s ¹⁰⁷
5	Injeção a 50 mbar por 60 s; 10 kV durante toda a análise
6	Injeção a 50 mbar por 60 s; 10 kV por 20 s
7	Injeção a 50 mbar por 60 s; 10 kV por 60 s
8	Injeção a 50 mbar por 60 s
9	Injeção a 50 mbar por 60 s seguida por BGE por 10 s; 10 kV por 20 s
10	Injeção a 50 mbar por 90 s seguida por BGE por 10 s
11	Injeção a 50 mbar por 90 s; 10 kV por 20 s
12	Injeção a 50 mbar por 90 s seguida por BGE por 10 s; 10 kV por 20 s
13	Injeção a 50 mbar por 90 s seguida por BGE por 20 s

Condição	Descrição
14	Injeção a 50 mbar por 60 s pelo <i>outlet</i> ; 10 kV por 30 s
15	Injeção a 50 mbar por 60 s pelo <i>outlet</i> ; 10 kV por 60 s
16	Injeção a 50 mbar por 60 s pelo <i>outlet</i>
17	Injeção a 50 mbar por 15 s seguida por -10 kV por 60 s; repetição por 3X (rLVSI-sweeping MECK - <i>repetitive large volume sample injection and sweeping</i>) ¹⁰⁸
18	Injeção a 50 mbar por 15 s seguida por -10 kV por 60 s; repetição por 4X (rLVSI-sweeping MECK) ¹⁰⁸
19	Injeção a 50 mbar por 30 s seguida por -10 kV por 60 s; repetição por 3X (rLVSI-sweeping MECK) ¹⁰⁸
20	Injeção por flush de 120 s (LVSS – <i>large volume sample stacking</i>) ^{109,110}
21	Injeção por flush de 120 s; injeção de BGE a -50 mbar por 10 s; -10 kV por 600 s (LVSS) ^{109,110}
22	Injeção por flush de 120 s; injeção de BGE a -50 mbar por 10 s; -30 kV por 300 s (LVSS) ^{109,110}
23	Injeção por flush de 120 s; 10 kV por 900 s (LVSS) ^{109,110}
24	Injeção por flush de 120 s; 10 kV por 1200 s (LVSS) ^{109,110}
25	Injeção por flush de 120 s; 30 kV por 300 s (LVSS) ^{109,110}
26	Injeção por flush de 120 s; 10 kV por 600 s (LVSS) ^{109,110}
27	Injeção por flush de 120 s; 10 kV por 300 s (LVSS) ^{109,110}
28	Injeção a 50 mbar por 60 s; 30 kV 30 s
29	Injeção a 50 mbar por 90 s; 30 kV por 30 s
30	Injeção a 50 mbar por 60 s; 30 kV por 15 s
31	Injeção a 50 mbar por 90 s; 30 kV por 15 s
32	Injeção a 50 mbar por 60 s; 30 kV por 7 s
33	Injeção a 50 mbar por 90 s; 30 kV por 7 s
34	Injeção por flush de 120 s de padrões em tampão ácido bórico 3 mmol/L pH 9,90 (LVSS) ^{109,110}
35	Injeção por flush de 120 s de padrões em tampão ácido bórico 3 mmol/L pH 9,90; 10 kV por 900 s (LVSS) ^{109,110}
36	Injeção por flush de 120 s (LVSS) ^{109,110}
37	Injeção por flush de 120 s; 10 kV por 900 s (LVSS) ^{109,110}
38	Injeção por flush de 120 s de padrões em NaOH 0,09 mol/L (LVSS) ^{109,110}

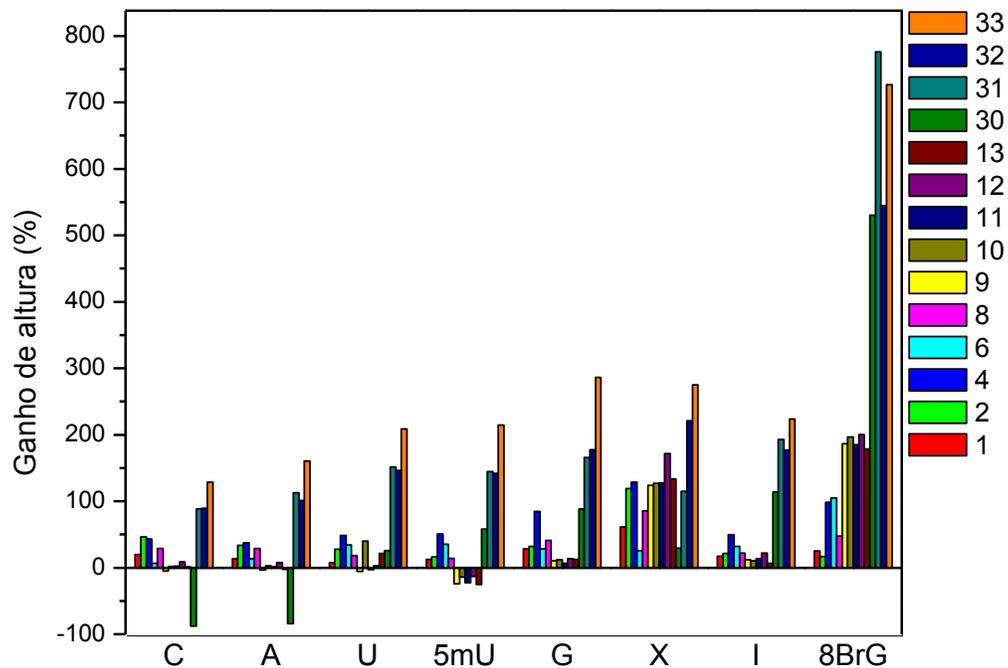


Figura 59 – Variações de altura dos picos para as condições de injeção hidrodinâmica avaliadas em relação à injeção por 30 s a 50 mbar de padrões dissolvidos em água (“normal”). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 5).

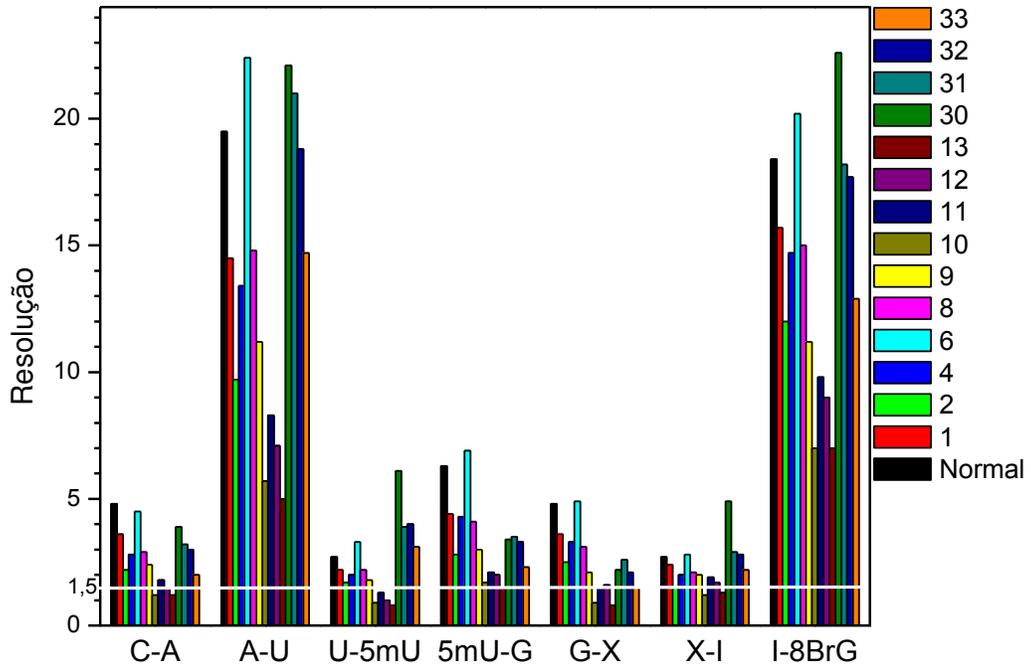


Figura 60 – Resoluções dos picos obtidas para as condições de injeção hidrodinâmica avaliadas. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 5).

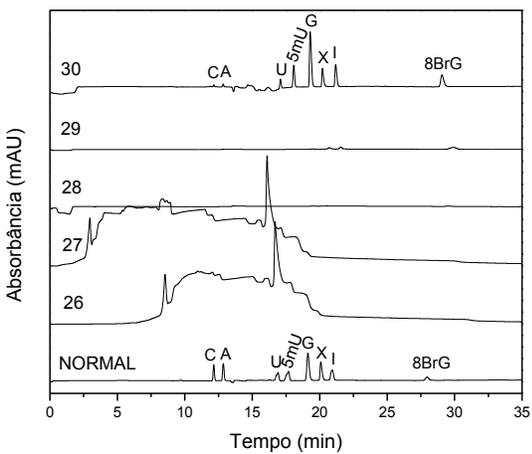
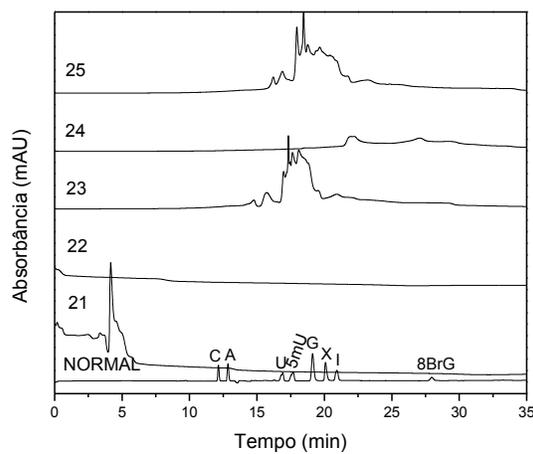
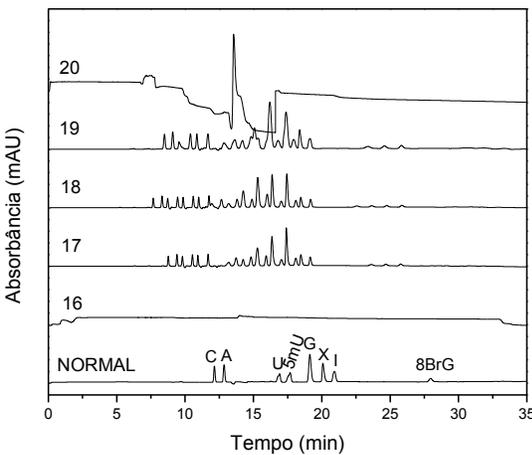
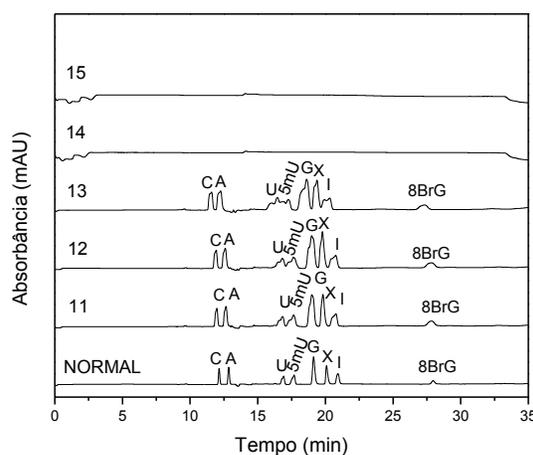
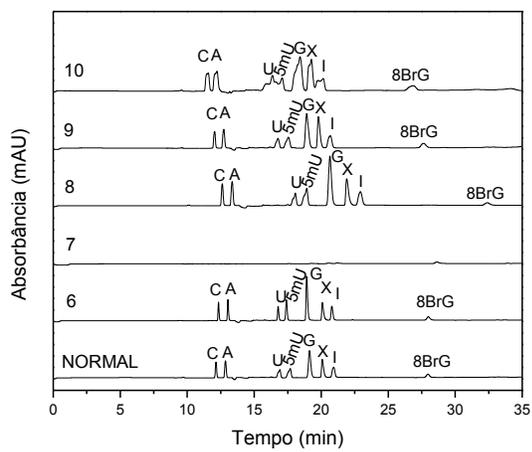
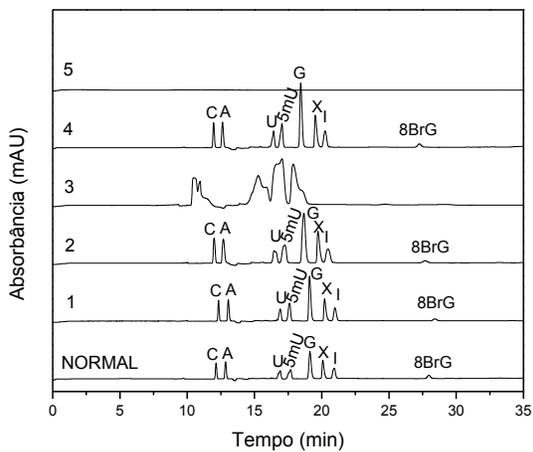


Figura 61 – Legenda na página seguinte

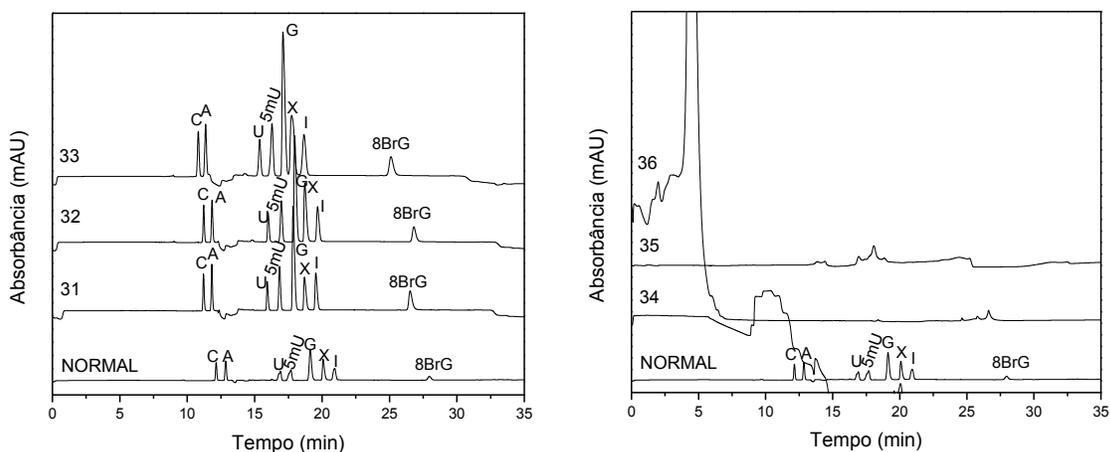


Figura 61 – Eletroferogramas obtidos para as condições de injeção hidrodinâmica avaliadas. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 5).

Primeiramente, tentou-se realizar *stacking* da amostra injetada através da aplicação de tensão negativa por um curto tempo após a injeção hidrodinâmica, seguida de aplicação de pressão para eliminar o excesso de solvente da banda da amostra na direção da posição de *inlet*. O *stacking* deve ocorrer mais próximo à posição de *outlet* para analitos com caráter aniônico, como os nucleosídeos estudados. Nesta etapa, a amostra foi injetada a 50 mbar por 60 s, seguida da aplicação de -10 kV por 10, 30 e 120 s (condições 1, 2 e 3, respectivamente). Finalizou-se com aplicação de -50 mbar por 30 s. Para tensão aplicada por 10 e 30 s, houve aumento de altura entre 8% (U) e 119% (X), porém ocorreu perda de resolução. Para tensão aplicada por 120 s, os picos não se separaram. A perda de resolução pode ser atribuída ao fato de que a maior parte dos analitos injetados não possui carga em meio neutro e sem borato. Assim, o *stacking* não ocorre corretamente e o aumento do tempo de injeção leva a picos mal resolvidos devido à maior área e menor eficiência. As resoluções para as condições 1 e 2, porém, não ficaram abaixo do limite de 1,5.

Avaliou-se então a injeção hidrodinâmica por 60 s (50 mbar) seguida por introdução de BGE por 10 s (condição 4), conforme descrito por Breadmore *et al.*¹⁰⁷ Observou-se aumento significativo de altura dos picos, entre 37% (A) e 128% (X), porém também houve perda de resoluções. Estas, entretanto, não ficaram

abaixo de 1,5. A injeção do *plug* de BGE após a banda de amostra deve auxiliar na sua compactação devido à diferença de força iônica, favorecendo o *stacking*.

A injeção por 60 s a 50 mbar seguida por separação com tensão positiva de 10 kV também foi realizada (condição 5), porém os picos não foram detectados, já que os analitos com caráter aniônico (devido ao pH e à complexação com borato) devem migrar na direção do *vial* de *inlet*. Assim, tal condição foi eliminada da otimização.

Tentou-se, em seguida, realizar *stacking* da amostra através da aplicação de tensão positiva por um curto tempo entre *vials* de BGE após injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 60 s. A tensão de 10 kV foi aplicada por 20 e 60 s (condições 6 e 7). Para o primeiro caso, houve aumento de altura para todos os picos, porém menos significativo do que para a condição 4, ficando entre 7% (C) e 105% (8BrG). As resoluções e eficiências foram maximizadas, com exceção do par C-A, sendo que os pares de picos A-U, 5mU-G e G-X atingiram as maiores resoluções dentre todas as condições testadas. No segundo caso, os analitos não foram detectados, pois podem ter migrado para o *vial* de *inlet* devido à aplicação de tensão por um tempo demasiadamente longo no momento da introdução da amostra.

A injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 60 s, sem estratégias adicionais de pré-concentração, também foi testada (condição 8). Neste caso, houve ganho de altura entre 14% (5mU) e 86% (X). Por outro lado, ocorreu perda de resolução e eficiência, já que uma banda eletroforética maior leva ao alargamento dos picos. As resoluções, entretanto, não ficaram abaixo de 1,5, diferentemente do observado durante a otimização do tempo de injeção realizada anteriormente.

As condições 4 e 6 apresentaram as melhores alturas e resoluções, respectivamente, até esta etapa. Decidiu-se, então, conciliar ambas na condição 9. Assim, realizou-se injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 60 s seguida de injeção de BGE por 10 s e aplicação de 10 kV por 20 s. Ocorreu perda de altura para os picos de C, A, U e 5mU entre 4% (A) e 24% (5mU). Em adendo, todos os analitos apresentaram perda de resolução e eficiência em relação à condição 6.

O aumento do tempo de injeção para 90 s foi testado em injeção seguida por: 10 s de BGE (condição 10); 10 kV por 20 s (condição 11); BGE por 10 s e 10 kV por 20s (condição 12); e BGE por 20 s (condição 13). Em todos os casos, os picos ficaram mal resolvidos, dificultando a integração. Houve perda de altura para 5mU em todos os casos (entre 13 e 25%) e ocorreu perda de resolução, com valores menores que o limite de 1,5. O aumento do tempo de injeção leva a alargamento dos picos, que se sobrepõem, apesar das estratégias de *stacking*.

Nas condições 14, 15 e 16, a injeção através da posição de *outlet* foi testada a 50 mbar por 60 s. O *stacking* foi realizado pela aplicação de 10 kV por 30 e 60 s entre *vials* de BGE (condições 14 e 15), buscando o empilhamento dos analitos na interface mais próxima ao *inlet*, porém os picos não foram detectados. A injeção sem aplicação de tensão (condição 16) apresentou o mesmo resultado. Concluiu-se que os analitos estudados devem estar neutros no pH da água pura, portanto migram apenas devido ao EOF. Acredita-se que a injeção por 60 s tenha levado a excesso de solvente dentro do capilar devido à larga banda de amostra injetada, o que impediu a inversão do EOF durante a aplicação da tensão de separação. Neste caso, o EOF teria ocorrido na direção do *inlet*, fazendo com que os picos não fossem observados.

Em seguida, a estratégia de rLVSI-*sweeping* (*repetitive large volume sample injection and sweeping*), conforme proposto por Wang *et al.*, foi analisada.¹⁰⁸ Em tal técnica, a amostra é injetada por um tempo curto, seguida da aplicação de tensão igual à de separação por cerca de 1 min. O procedimento é repetido por até cinco vezes. Espera-se que os analitos sejam injetados e empilhados continuamente, resultando em aumento de altura e eficiência dos picos. Testou-se a injeção a 50 mbar por 15 s seguida por -10 kV por 60 s entre *vials* contendo BGE em 3 repetições (condição 17); em 4 repetições (condição 18); e injeção a 50 mbar por 30 s seguida por -10 kV por 60 s em 3 repetições (condição 19). Em todos os casos, foram observados diversos picos em tempos de migração diferentes para cada analito. Tal estratégia foi considerada inadequada para a separação em questão. O empilhamento que deve ocorrer entre as injeções sucessivas durante a aplicação de tensão necessita que os analitos apresentem

carga, o que não ocorre no meio aquoso utilizado para as amostras em questão. Os nucleosídeos estudados apresentam carga apenas em pHs altos, sendo que um meio tamponado em pH 13 seria necessário para que todos estivessem com carga negativa. Tal condição é difícil de ser atingida, portanto a estratégia foi eliminada da otimização.

Por fim, a técnica de LVSS (*large volume sample stacking*), descrita no trabalho de Chien *et al.*, foi testada com adaptações para o sistema em questão, consistindo em preenchimento total do capilar com a solução de amostra (através de *flush* por 120 s), seguida da aplicação de tensão para empilhamento dos analitos e eliminação do excesso de solvente pelo lado oposto do capilar.¹¹⁰ O uso de modificador de EOF faz com que o tensoativo aja como um propulsor para a eliminação do solvente.¹⁰⁹ O capilar é preenchido completamente com a amostra em água e, em seguida, a tensão de separação negativa é aplicada entre *vials* contendo BGE com modificador de fluxo. Deve ocorrer *stacking* dos analitos aniônicos próximo ao *outlet*, porém o EOF, que corre do *outlet* para o *inlet* na ausência do tensoativo catiônico dentro do capilar, empurra o solvente para fora pelo *inlet*. O solvente é gradualmente substituído pelo BGE contido no *vial* do *outlet* e, quando sua eliminação é quase total, o tensoativo faz com que o EOF seja naturalmente revertido, voltando à condição normal de separação. Um salto no valor da corrente deve ser observado devido à presença do BGE. A técnica permite a injeção de grandes volumes de amostra com compactação da banda injetada, o que leva à alta detectabilidade dos analitos aliada a resoluções ótimas. Foram testadas: injeção por *flush* de 120 s (condição 20); injeção por *flush* de 120 s seguida por BGE a -50 mbar por 10 s e -10 kV por 10 min (21); e injeção por *flush* de 120 s seguida por BGE a -50 mbar por 10 s e -30 kV por 5 min (22). Os picos, porém, não foram detectados, apesar do salto no valor da corrente ter sido notado. Os nucleosídeos, em sua maioria, apresentam caráter neutro em pH fisiológico. A estratégia de *stacking* de analitos aniônicos só funcionaria, portanto, se a amostra estivesse dissolvida em meio básico, com pH acima do pKa dos nucleosídeos, ou complexada. O ajuste de pH ou a adição de borato, porém,

prejudicam a estratégia, já que aumentam a força iônica da banda de amostra. Assim, o *stacking* dos analitos não é efetivo, portanto tal efeito não foi avaliado.

A estratégia de LVSS foi, ainda, testada com o uso de inversão de tensão. O capilar foi preenchido com amostra por flush de 120 s, seguido por aplicação de tensão positiva por tempos variáveis nas condições de 23 a 27 (10 kV por 15 min, 10 kV por 20 min, 30 kV por 5 min, 10 kV por 10 min e 10 kV por 5 min, respectivamente). Por fim, a separação foi realizada sob tensão negativa de -10 kV. A tensão positiva leva ao *stacking* de analitos com carga positiva mais próximos do *outlet* e de analitos com carga negativa mais próximos ao *inlet*. Nestas condições, foram observados picos mal resolvidos nos eletroferogramas. Os analitos permaneceram no capilar após a estratégia de *stacking*, porém não puderam ser separados. Concluiu-se que a banda de amostra foi excessivamente larga, o que impediu a separação. A exceção foi a condição 24, na qual 10kV foram aplicados por 20 min e não foram observados picos dos analitos, o que implica na eliminação dos nucleosídeos juntamente com o solvente durante a estratégia de injeção.

A observação de picos nas condições 23, 25, 26 e 27 indicou que a otimização da injeção poderia ser realizada para melhorar a separação dos analitos. Assim, tempos reduzidos de aplicação de tensão foram testadas. As condições foram: injeção a 50 mbar por 60 s seguido por 30 kV por 30 s; 50 mbar por 90 s seguido por 30 kV por 30 s; 50 mbar por 60 s seguido por 30 kV por 15 s; 50 mbar por 90 s seguido por 30 kV por 15 s; 50 mbar por 60 s seguido por 30 kV por 7 s; e 50 mbar por 90 s seguido por 30 kV por 7 s (condições de 28 a 33, respectivamente). Para as condições 28 e 29, não foram observados picos nos eletroferogramas. A condição 30 resultou em perda dos dois primeiros picos (A e C), porém observou-se aumento crescente de altura para os demais, atingindo 531% para o último pico (8BrG). As resoluções atingidas neste caso foram as maiores dentre todas as condições testadas para os pares de picos U-5mU, X-I e I-8BrG. As condições 31, 32 e 33 apresentaram aumento de altura para todos os picos, acompanhado por resoluções acima de 1,5. As alturas atingidas foram

máximas dentre todas as condições testadas (entre 88% - C e 776% - 8BrG, ambos na condição 31).

Por fim, a estratégia de LVSS foi testada em meio tamponado, já que a baixa condutividade da solução em água pode causar Efeito Joule na banda de amostra, levando à perda de eficiência dos picos. As condições foram: padrões extraídos e ressuspensos em tampão borato 3 mmol/L pH 9,90 injetados por flush de 120 s; padrões extraídos e ressuspensos em tampão borato 3 mmol/L pH 9,90 injetados por flush de 120 s seguido por 10 kV por 15 min; e padrões extraídos e ressuspensos em NaOH 0,09 mol/L (pH entre 12,5 e 13,0) injetados por flush de 120 s (condições 34, 35 e 36, respectivamente). Os picos característicos dos analitos de interesse não foram observados em nenhuma das condições testadas. Concluiu-se que o meio com pH ajustado não contribuiu para a aplicação da estratégia de LVSS, principalmente devido à maior força iônica na banda de amostra, que impede que a diferença de condutividade entre o BGE e a solução da amostra favoreça o empilhamento dos analitos com eficiência.

Desta forma, as melhores condições encontradas para injeção hidrodinâmica foram 31, 32 e 33, compostas por injeção de amostra em água a 50 mbar por 60 ou 90 s, seguida por aplicação de 30 kV por 7 ou 15 s entre *vials* de BGE. Tal estratégia é baseada em LVSS, porém utiliza tensão contrária à aplicada durante a separação para realizar o *stacking* e eliminar o excesso de solvente. Na ausência de CTAB, o EOF deve migrar em direção ao cátodo, localizado no *outlet* durante a aplicação de tensão positiva, portanto o excesso de água é empurrado para a saída do capilar e é gradualmente substituído pelo BGE, contido no *vial* na entrada do capilar. Os analitos com caráter aniônico (básicos ou complexados com borato) são empilhados próximo ao *inlet* (ânodo). A corrente observada é reduzida durante o início da análise devido à menor força iônica do meio da amostra e estabiliza-se próximo ao tempo de migração do EOF em cerca de 7 μ A, após a eliminação do solvente e o preenchimento do capilar com o BGE. Obtiveram-se alturas de picos elevadas aliadas a resoluções maiores que o valor limite de 1,5.

Tais parâmetros foram re-otimizados para obtenção da condição ótima de injeção. O tempo de injeção, a tensão e seu tempo de aplicação foram variados em busca das melhores alturas através de abordagem multivariada envolvendo três tempos de aplicação de pressão a 50 mbar (60, 90 e 120 s), três valores de tensão (20, 25 e 30 kV) e três tempos de aplicação de tensão (10, 15 e 20 s). A Tabela 6 apresenta as condições testadas. De modo geral, o aumento do tempo de injeção eleva as alturas dos picos e causa perda de resolução, porém o aumento do tempo de aplicação da tensão leva a ganho de resolução e perda de altura nos picos relativos a C e A, analitos de maior mobilidade eletroforética, já que têm parte de suas moléculas direcionadas ao *vial* de *inlet* durante a aplicação de tensão positiva (Figuras 62, 63 e 64).

Tabela 6 – Condições avaliadas na otimização da injeção hidrodinâmica (50 mbar) seguida por aplicação de tensão entre *vials* de BGE.

Condição	Tempo de injeção (s)	Tensão (kV)	Tempo de tensão (s)
Normal	30	-	-
1	60	20	10
2	60	20	15
3	60	20	20
4	90	20	10
5	90	20	15
6	90	20	20
7	120	20	10
8	120	20	15
9	120	20	20
10	60	25	10
11	60	25	15
12	60	25	20
13	90	25	10
14	90	25	15
15	90	25	20
16	120	25	10
17	120	25	15
18	120	25	20
19	60	30	10
20	60	30	15
21	60	30	20
22	90	30	10
23	90	30	15
24	90	30	20
25	120	30	10
26	120	30	15
27	120	30	20

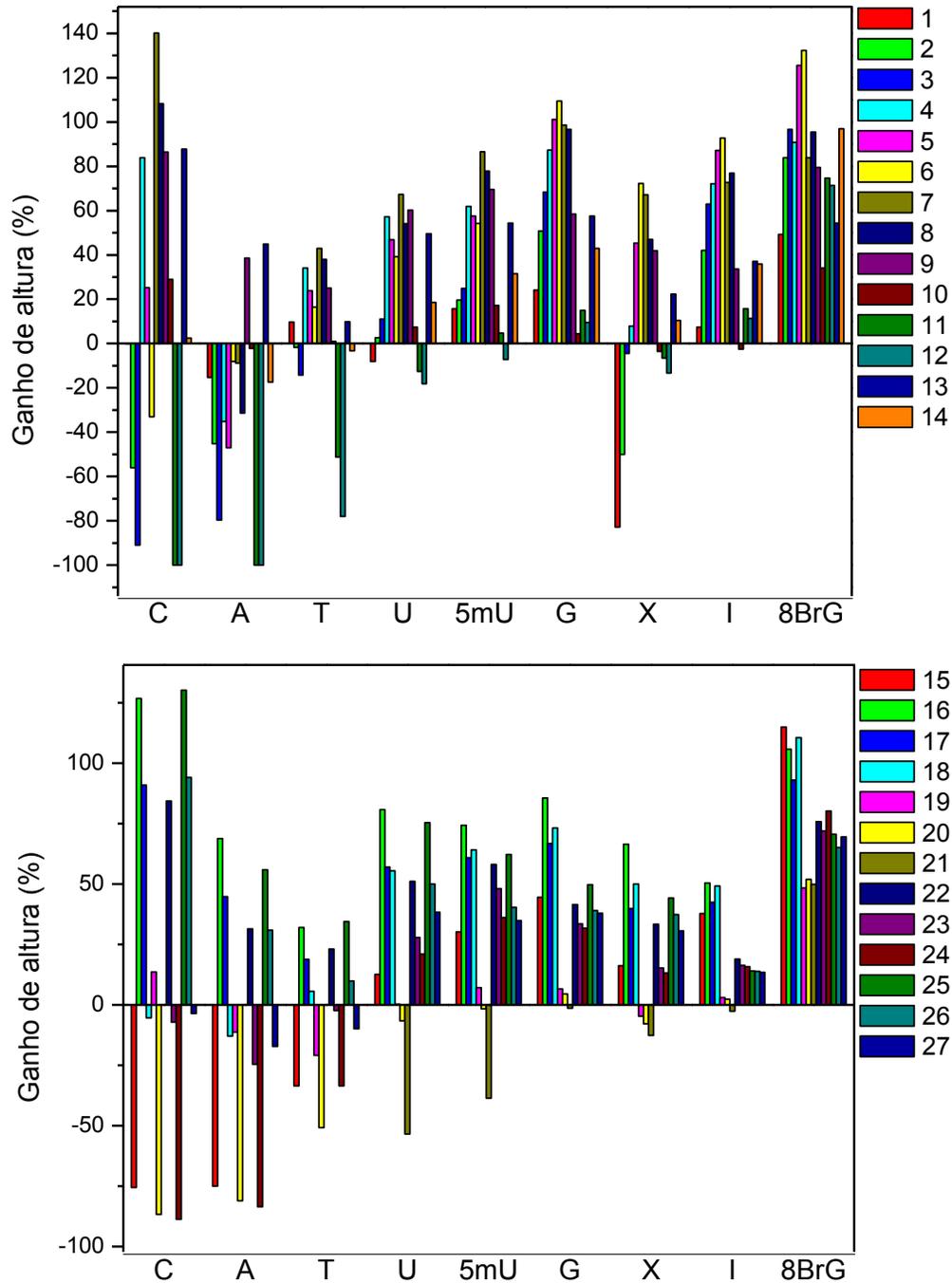


Figura 62 – Variações de altura observadas para a otimização da injeção hidrodinâmica seguida por aplicação de tensão entre *vials* de BGE em relação à condição “normal” (50 mbar por 30 s). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 6).

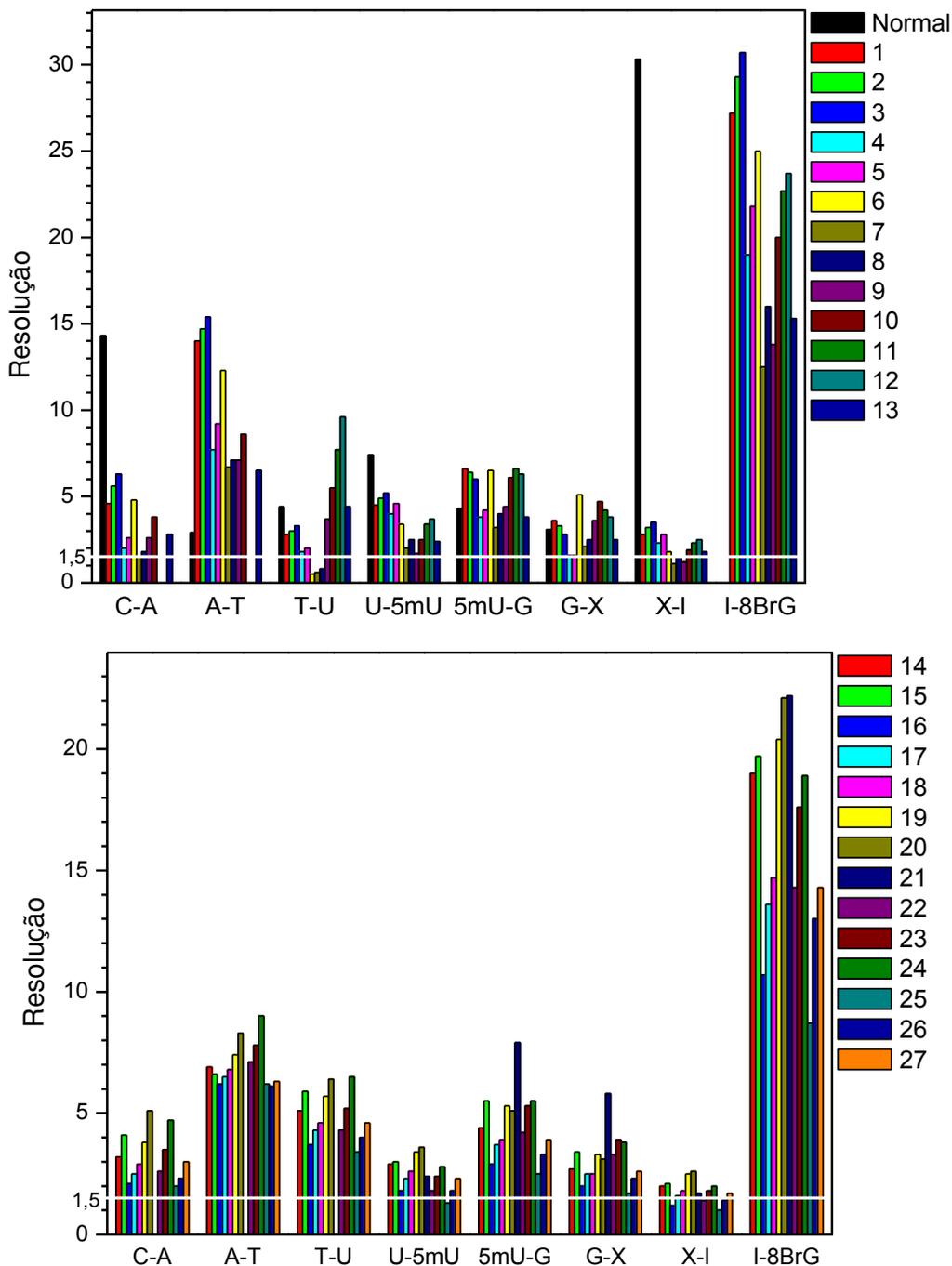


Figura 63 – Resoluções observadas para a otimização da injeção hidrodinâmica seguida por aplicação de tensão entre *vials* de BGE. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 6).

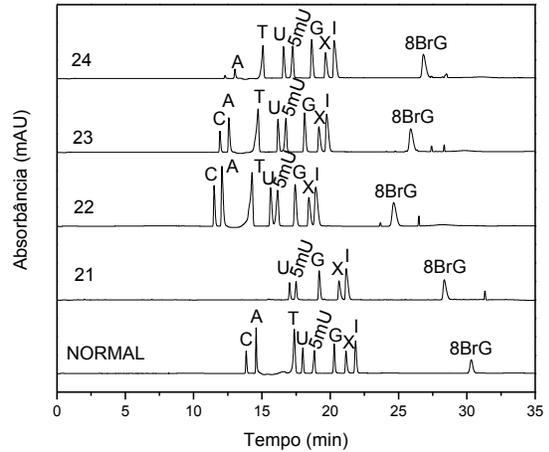
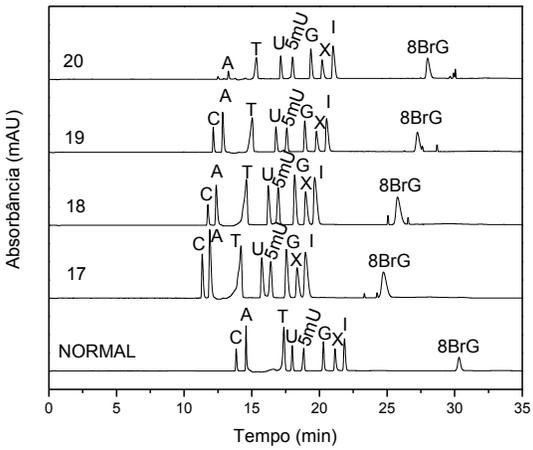
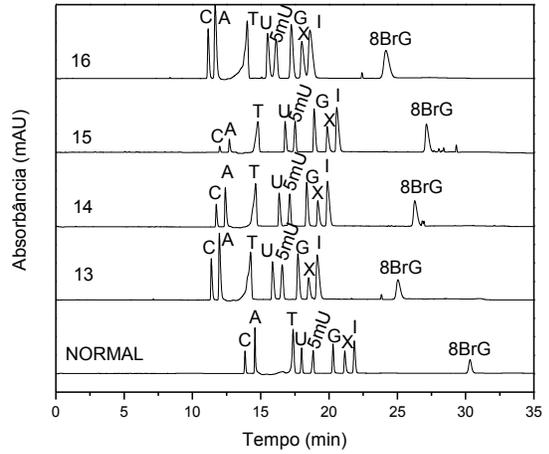
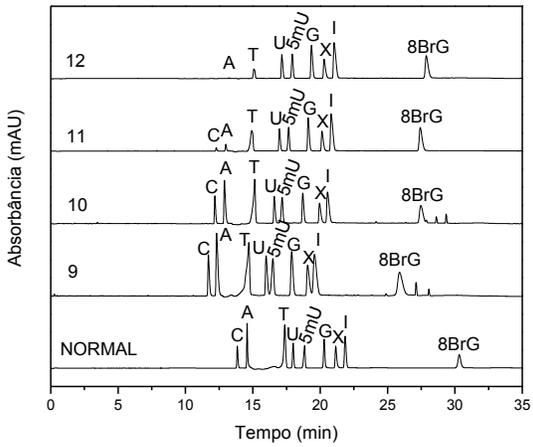
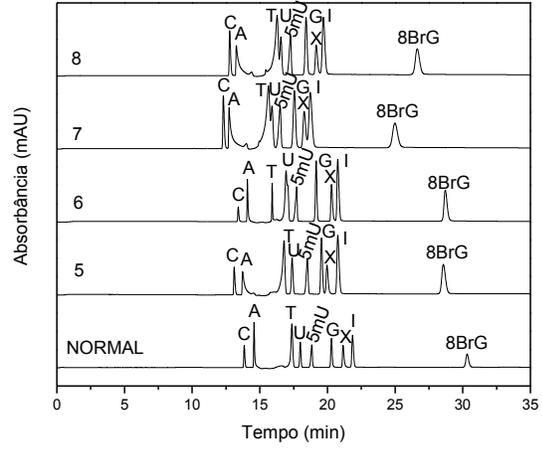
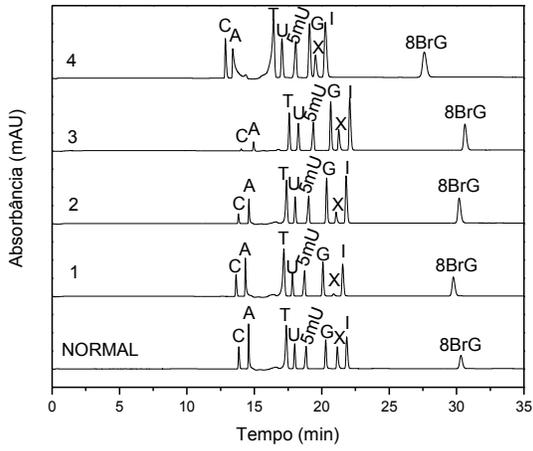


Figura 64 – Legenda na página seguinte

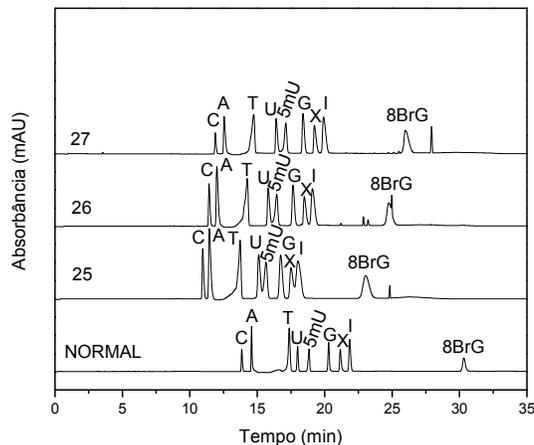


Figura 64 – Eletroferogramas obtidos para a otimização da injeção hidrodinâmica seguida por aplicação de tensão entre *vials* de BGE. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução amostra e estratégias de injeção variáveis (Tabela 6).

O melhor compromisso entre ganho de altura e resolução mínima de 1,5 foi encontrado na condição 17, composta por injeção a 50 mbar por 120 s e tensão de 25 kV por 15 s. Houve ganho de altura entre 18,9% (T) e 93,1% (8BrG) em relação à injeção a 50 mbar por 30 s. Os valores são menores do que os encontrados previamente e não houve repetibilidade dos resultados, fator atribuído ao uso de outro capilar e à troca do equipamento de eletroforese capilar por um novo, porém do mesmo fabricante e com as mesmas configurações, devido a falhas técnicas. Ainda assim, os resultados obtidos são bastante satisfatórios.

O melhor meio de dissolução da amostra foi, por fim, avaliado. A solução de padrões 1,0 mmol/L foi diluída para 100 μ mol/L em: água; tampão borato 3 mmol/L pH 9,90; e tampão borato 3 mmol/L pH 8,15. A Figura 65 traz os ganhos de altura obtidos em relação à água. Observa-se que o analito I só foi observado com altura aceitável nos eletroferogramas para meio de tampão pH 9,90. Em adendo, todos os analitos apresentaram alturas maiores em tal condição, com exceção de C e A. Em termos de resolução, todos os valores foram iguais ou maiores que 1,5 (Figura 66). Os eletroferogramas são apresentados na Figura 67. O meio escolhido para a injeção hidrodinâmica otimizada foi, portanto, tampão borato 3 mmol/L pH 9,90.

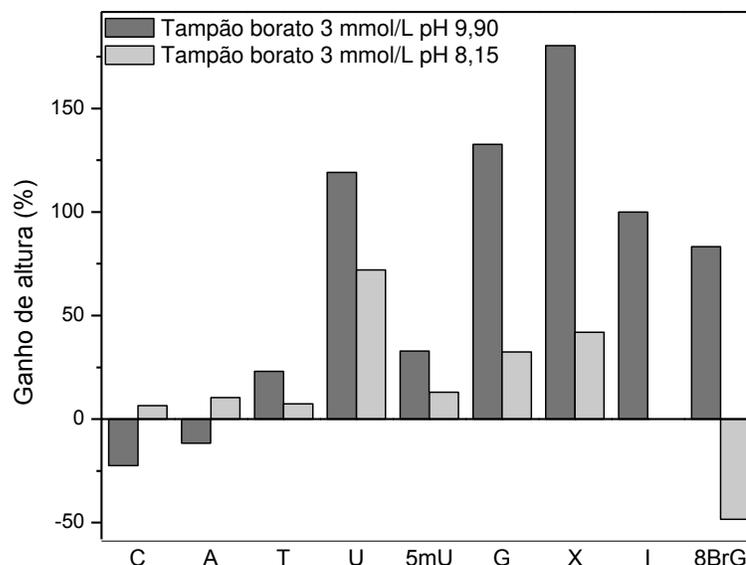


Figura 65 – Variações de altura obtidas para o otimização do meio de dissolução da amostra em relação aos padrões dissolvidos em água. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução de amostra variável e injeção a 50 mbar por 120 s seguida por tensão de 25 kV por 15 s entre *vials* de BGE.

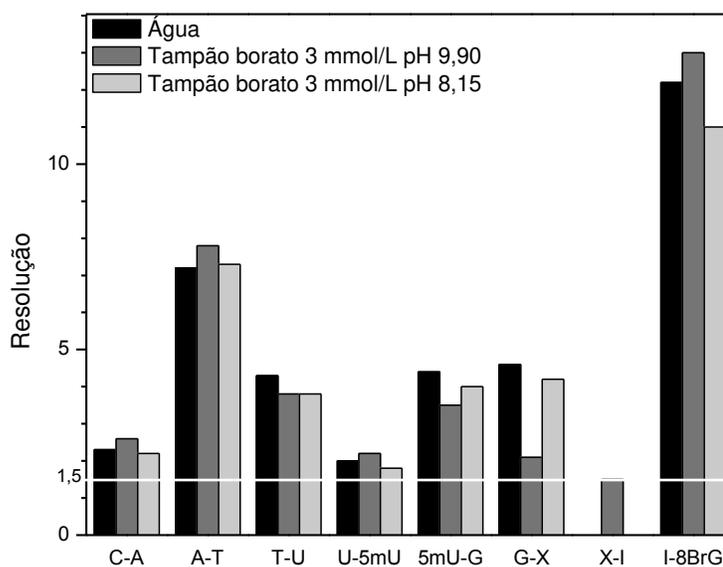


Figura 66 – Resoluções obtidas para a otimização do meio de dissolução da amostra. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução de amostra variável e injeção a 50 mbar por 120 s seguida por tensão de 25 kV por 15 s entre *vials* de BGE.

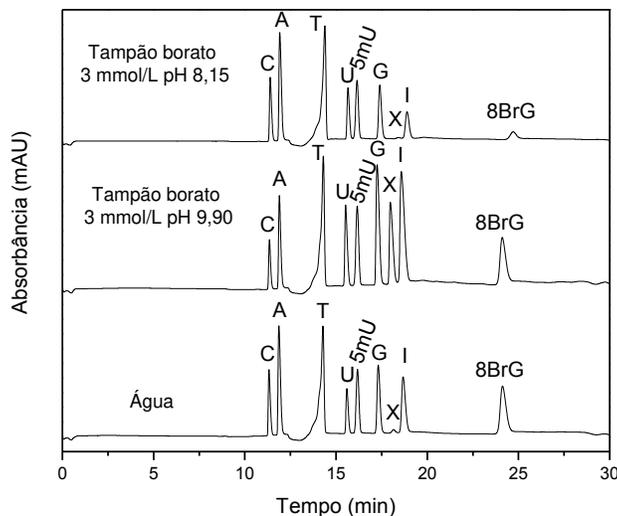


Figura 67 – Eletroferogramas obtidos para a otimização do meio de dissolução da amostra. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com solução de amostra variável e injeção a 50 mbar por 120 s seguida por tensão de 25 kV por 15 s entre *vials* de BGE.

A repetibilidade das áreas dos picos foi testada através da injeção em quintuplicata de três soluções de padrões na mesma concentração, totalizando 15 injeções consecutivas. O BGE foi preparado novamente para as 5 últimas injeções. A repetibilidade de área apresentou coeficientes de variação entre 2,0 (T) e 7,1% (X). Para área do pico corrigida pela área do padrão interno, a repetibilidade variou entre 3,7 (I) e 7,9% (C), com valores, em média, maiores do que os obtidos sem padronização interna.

5. Comparação entre o método otimizado e o empregado anteriormente

A Figura 68 apresenta uma comparação entre o método de injeção otimizado e o empregado anteriormente (50 mbar por 30 s). É possível observar o aumento expressivo de detectabilidade para todos os analitos. Em adendo, é possível observar na Figura 69 que, apesar dos ótimos resultados obtidos nesta estratégia de pré-concentração, a extração é a etapa limitante do método

desenvolvido, já que recuperações reduzidas são obtidas para alguns analitos, com destaque para T, X, G e 8BrG.

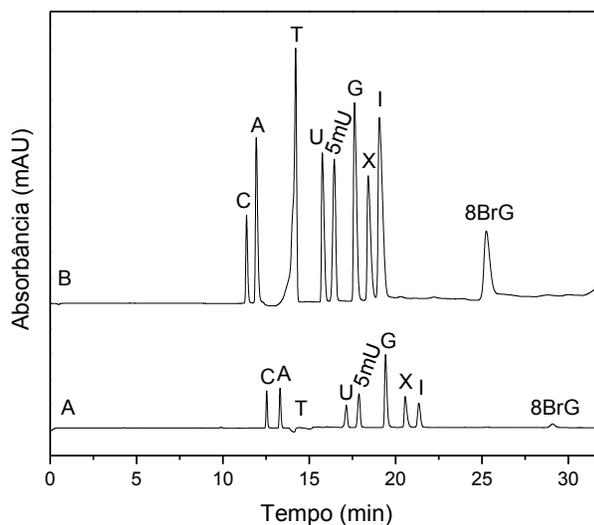


Figura 68 – Comparação entre eletroferogramas obtidos para: A – modo de injeção empregado anteriormente (50 mbar por 30 s para amostra em água); e B – modo de injeção otimizado (50 mbar por 120 s para amostra em tampão borato 3 mmol/L pH 9,90, seguida por 25 kV por 15 s entre *vials* de BGE). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com injeção hidrodinâmica em condições variáveis e amostra em meios variáveis.

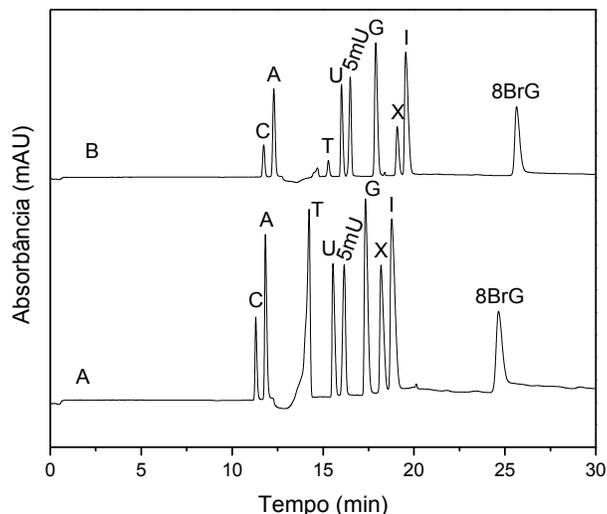


Figura 69 – Comparação entre eletroferogramas obtidos para: A – injeção de solução de padrões 100 $\mu\text{mol/L}$ em tampão borato 3 mmol/L pH 9,90; e B – injeção de matriz de soro sanguíneo fortificada com solução de padrões 100 $\mu\text{mol/L}$, extraída e ressuspensa em tampão borato 3 mmol/L pH 9,90. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 120 s seguida por aplicação de 25 kV por 15 s entre *vials* de BGE e amostras variáveis em tampão borato 3 mmol/L pH 9,90.

A Figura 70 apresenta uma comparação de eletroferogramas obtidos para a análise do *pool* de soro sanguíneo sem fortificação (branco) e fortificado na concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$, empregando-se a metodologia otimizada. É possível observar a presença de picos característicos dos analitos estudados na matriz sem fortificação, principalmente U, 5mU e I, bem como de picos não identificados.

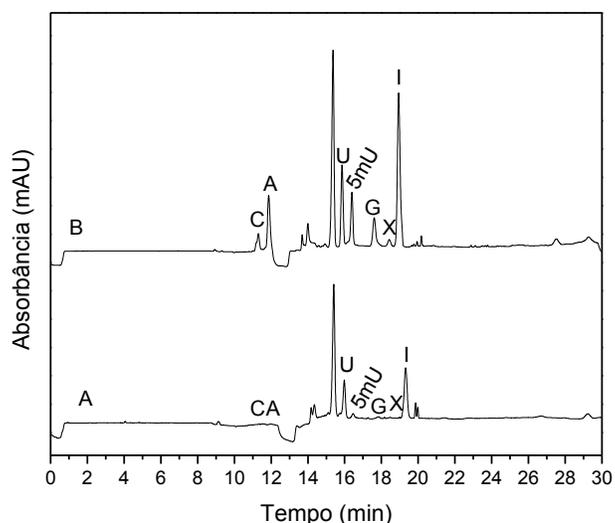


Figura 70 – Eletroferogramas obtido para a análise de: A - *pool* de soro sanguíneo de 60 indivíduos sadios (branco); e B: *pool* de soro sanguíneo fortificado com solução mista de nucleosídeos na concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 120 s seguida por aplicação de 25 kV por 15 s entre *vials* de BGE e matriz de soro sanguíneo pura (em A) ou fortificada com solução 10 $\mu\text{mol/L}$ dos padrões em tampão borato 3 mmol/L pH 9,90 (em B).

6. Conclusões

O modo de injeção otimizado é composto por introdução da amostra dissolvida em tampão borato 3 mmol/L pH 9,90 no modo hidrodinâmico a 50 mbar por 120 s, seguido da aplicação de tensão de 25 kV por 15 s entre *vials* de BGE. Tal procedimento resultou em um aumento de altura entre 137,7 (C) e 292,3% (I) (de 1,4 a 2,9 vezes) em relação ao modo de injeção utilizado anteriormente (50 mbar por 30 s para amostra em água). Em adendo, houve aumento de área entre 178,9 (C) e 394,8% (I). A resolução mínima atingida foi de 1,5 (X-I, na matriz de soro sanguíneo fortificada na concentração 100 $\mu\text{mol/L}$). Os aumentos de área aliados à separação em nível de linha de base tornam o método mais adequado à matriz biológica escolhida devido às maiores detectabilidades atingidas.

Capítulo 6

Validação

1. Metodologia

A validação do método otimizado foi baseada nas normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para métodos bioanalíticos, bem como pelo FDA (EUA) e pela *European Medicines Agency* (EMA, União Européia).¹¹¹⁻¹¹³ Foram avaliados limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), linearidade, faixa linear, exatidão, precisão e recuperação em um *pool* de soro sanguíneo de 60 indivíduos sadios (sem câncer de próstata) fortificado com a menor quantidade possível de solução de padrões (se necessário). Os materiais e equipamentos empregados já foram descritos nos capítulos anteriores.

A ANVISA e o FDA estabelecem que o LQ deve ser a concentração na qual a relação sinal/ruído é de 5:1. A EMA, por outro lado, normatiza que o LQ é a menor concentração na qual a precisão e a exatidão são aceitáveis. Neste trabalho, as concentrações nas quais o sinal é 5 vezes maior que o ruído foram verificadas, porém a precisão e a exatidão não foram adequadas. A integração dos picos foi prejudicada devido ao ruído da linha de base e à baixa intensidade dos picos dos analitos de interesse. Assim, os LQs foram considerados como as concentrações nas quais a relação sinal-ruído é de 10:1 e os LDs, 3:1.

As curvas analíticas, por sua vez, devem ter 6 concentrações, incluindo o LQ, sendo que cada concentração deve ser avaliada, no mínimo, em triplicata. Foram empregados testes de identificação de *outliers* (testes de resíduos e de Jackknife) para a obtenção de regressões lineares mais confiáveis. As normas seguidas não apresentam valores mínimos para o coeficiente de correlação.

A precisão é o coeficiente de variação de concentração entre análises sucessivas ou em dias diferentes. A exatidão, por outro lado, é calculada como a porcentagem de correlação entre a concentração determinada pela análise em relação à concentração nominal da amostra. Por fim, a recuperação é a porcentagem de concordância entre a área obtida para a solução de padrões não extraída e para a matriz fortificada na mesma concentração e extraída. A precisão, a exatidão e a recuperação devem ser avaliadas em análises realizadas no

mesmo dia, pelo mesmo operador e sob as mesmas condições (intra-dia) e em dias diferentes ou por operadores diferentes (inter-dia). Devem ser consideradas 3 concentrações, com 5 determinações para cada uma delas: ponto mínimo (LQ), ponto médio e ponto máximo da faixa linear. Para precisão e exatidão, os CVs devem ser menores que 15%, com exceção da concentração mínima, para a qual o valor máximo aceitável é de 20%. Não há requerimentos para a recuperação, desde que o método seja preciso e exato.

2. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O *pool* de soro sanguíneo foi fortificado com a menor quantidade possível de solução dos padrões em cada concentração, extraído e analisado pela metodologia otimizada (Figura 71). A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos e os compara com valores de LD reportados na literatura para métodos que empregam CE-UV. Os LDs para C, U, G e X são maiores do que os reportados por Szymańska *et al.*⁶⁰, enquanto que para X e I, os valores são maiores do que os reportados por Jiang *et al.*⁸¹ Em ambos os trabalhos, porém, as determinações de LD foram feitas em soluções aquosas e os efeitos da matriz biológica foram totalmente desconsiderados. As soluções aquosas resultam em menor ruído na linha de base, portanto os valores de LD e LQ são menores, porém tal procedimento leva à falta de confiabilidade para a quantificação de analitos com concentrações reduzidas em amostras reais, como é o caso dos nucleosídeos. Em adendo, ambos os trabalhos visam a aplicação em amostras de urina, uma matriz biológica que contém mais interferentes do que soro sanguíneo, o que pode levar à ruído ainda mais intenso.

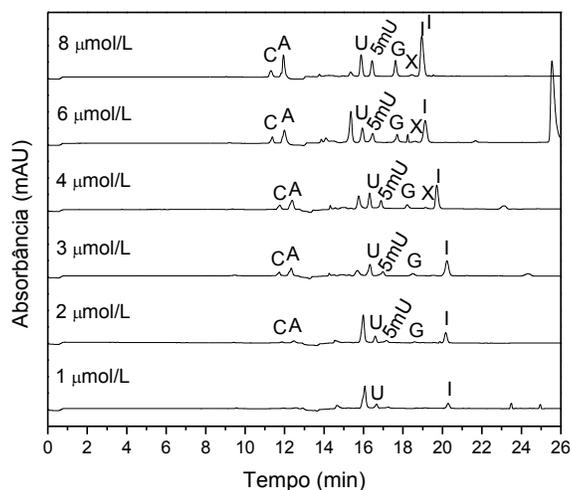


Figura 71 – Eletroferogramas obtidos para a determinação de LQ e LD. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 120 s seguida por aplicação de 25 kV por 15 s entre *vials* de BGE e *pool* de soro sanguíneo fortificado com solução dos padrões C, A, U, 5mU, G, X e I em concentrações variadas.

Tabela 7 – LQs e LDs obtidos para o método desenvolvido e comparação com LDs reportados na literatura para trabalhos que empregam CE-UV.

Fonte	Método desenvolvido	Szymańska <i>et al.</i> ⁶⁰	Jiang <i>et al.</i> ⁸¹	Liebich <i>et al.</i> ⁷⁶	Zheng <i>et al.</i> ⁶⁹	
Matriz	Soro sanguíneo	Água	Água	Não especificada	Água	
	LQ (μmol/L)	LD (μmol/L)				
	LD (μmol/L)					
C	2	0.6	0.5	1.67	3.1	4
A	2	0.6	0.78	1.09	2	6.4
U	1	0.3	0.17	1.06	3.5	5.0
5mU	2	0.6	0.98	-	-	3.5
G	2	0.6	0.55	0.77	2.6	5.6
X	4	1.2	0.41	0.78	9.2	10
I	2	0.6	0.61	0.56	2.5	3.1

3. Curvas analíticas

Foram construídas curvas analíticas usando amostras em 6 diferentes concentrações dos nucleosídeos no *pool* de soro sanguíneo. O menor ponto da curva foi considerado como a concentração do LQ e foram utilizadas concentrações equidistantes para os demais pontos (Tabela 8). Cada concentração foi avaliada em quintuplicata, resultando em um total de 30 análises.

Tabela 8 – Concentrações teóricas empregadas para a construção das curvas analíticas.

	Ponto 1 ($\mu\text{mol/L}$)	Ponto 2 ($\mu\text{mol/L}$)	Ponto 3 ($\mu\text{mol/L}$)	Ponto 4 ($\mu\text{mol/L}$)	Ponto 5 ($\mu\text{mol/L}$)	Ponto 6 ($\mu\text{mol/L}$)
C	2	10	20	30	40	50
A	2	10	20	30	40	50
U	1	5	10	15	20	25
5mU	2	10	20	30	40	50
G	2	10	20	30	40	50
X	4	20	40	60	80	100
I	2	10	20	30	40	50

O uso de padronização interna resultou em maior variabilidade e coeficientes de correlação baixos (Tabela 9). A baixa repetibilidade dos resultados com o uso de padronização interna já havia sido observada em testes anteriores, conforme reportado nos capítulos 4 e 5. A extração do padrão interno 8BrG é prejudicada pelo átomo volumoso de bromo, que dificulta a formação da ligação covalente reversível com o grupo borato da resina, portanto a repetibilidade das áreas obtidas para tal analito é menor do que para os demais nucleosídeos. Assim, as curvas foram construídas por padronização externa. As curvas obtidas inicialmente e os gráficos de resíduos para padronização externa são apresentados na Figura 72, enquanto que os parâmetros da regressão linear são mostrados na Tabela 10.

Tabela 9 - Parâmetros das curvas analíticas obtidas com padronização interna.

	C	A	U	5mU	G	X	I
Faixa linear Mínimo ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2,5	2,4	1,2	2,3	2,4	4,8	2,4
Faixa linear Máximo ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	62,4	59,6	31,0	58,6	59,4	120,8	59,5
R	0,9382	0,9689	0,8991	0,9626	0,9313	0,8082	0,9580
Inclinação ($\text{mAU min } \mu\text{mol L}^{-1}$)	0,04	0,10	0,05	0,06	0,04	0,01	0,09
Intercepto ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,01	-0,30	0,08	-0,44	-0,06	0,05	-0,62

Tabela 10 - Parâmetros das curvas analíticas obtidas com padronização externa sem eliminação de *outliers*.

	C	A	U	5mU	G	X	I
Faixa linear Mínimo ($\mu\text{mol/L}$)	2,5	2,4	1,2	2,3	2,4	4,8	2,4
Faixa linear Máximo ($\mu\text{mol/L}$)	62,4	59,6	31,0	58,6	59,4	120,8	59,5
R	0,9890	0,9929	0,9689	0,9797	0,9857	0,9455	0,9816
Inclinação ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{ mAU}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	5,25	12,28	6,27	6,39	5,03	1,90	11,23
Intercepto ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	-0,99	-16,29	3,87	-15,45	-10,22	1,02	-27,88

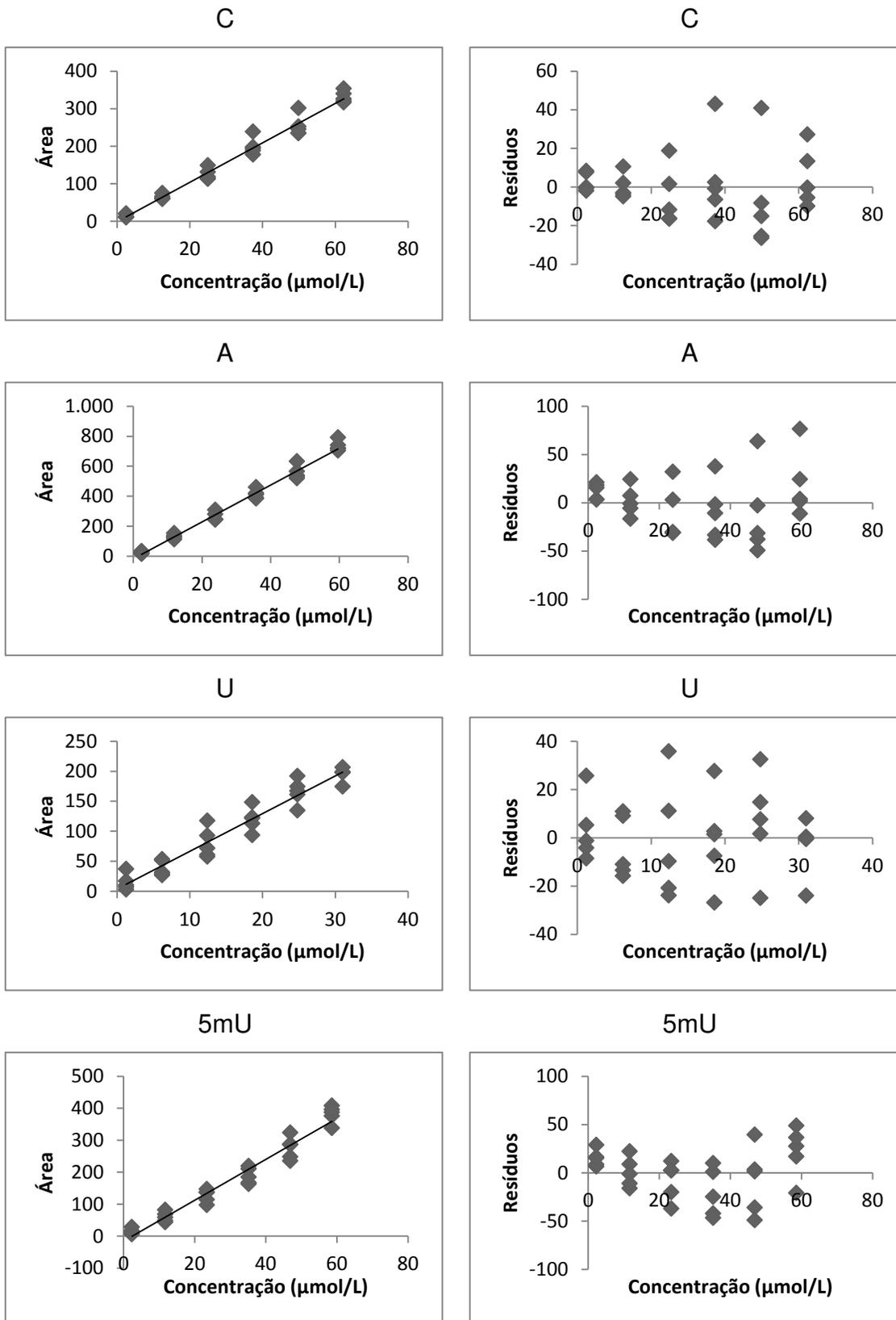


Figura 72 – Legenda na página seguinte.

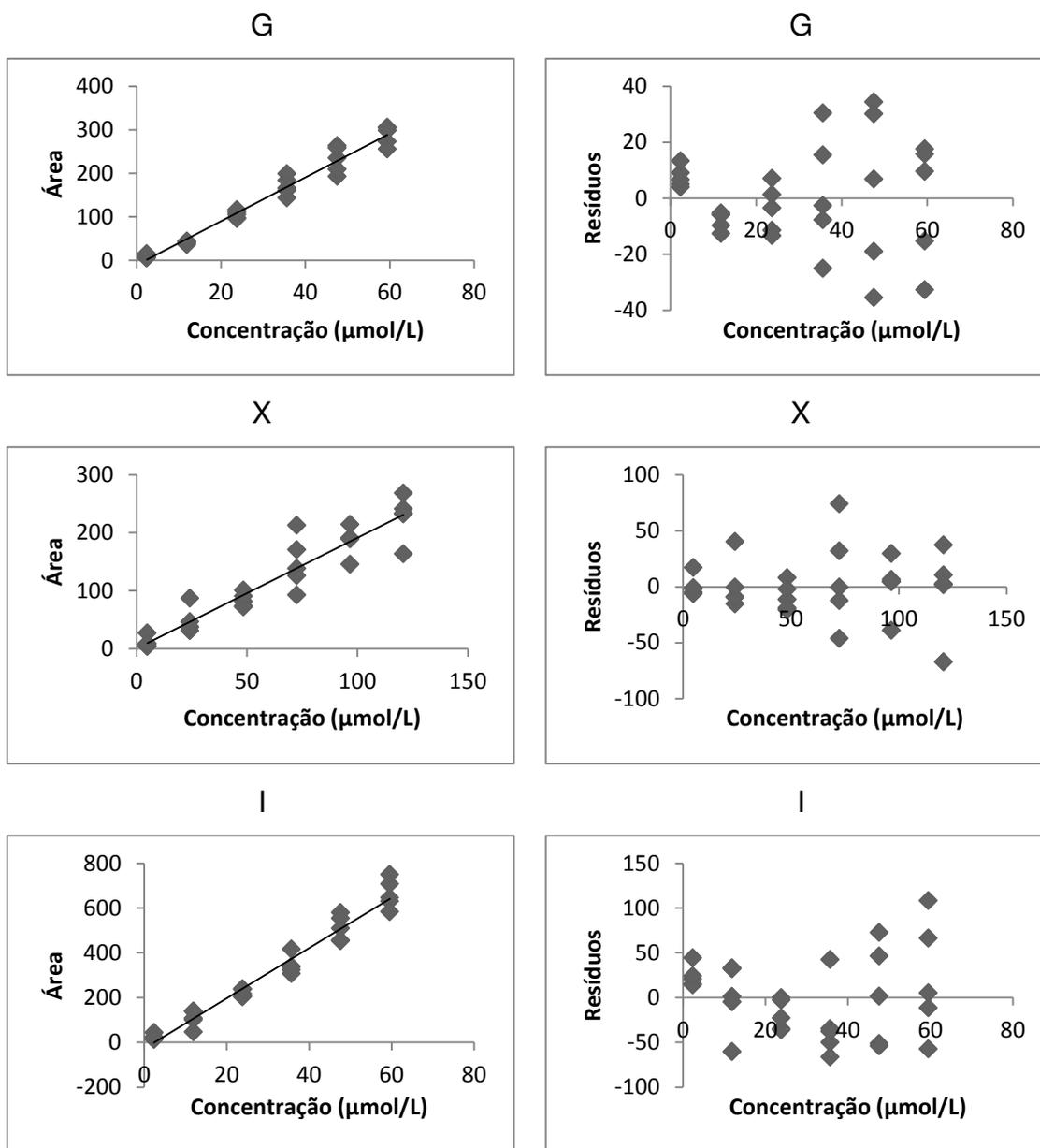


Figura 72 – Curvas analíticas e gráficos de resíduos obtidos por padronização externa sem eliminação de *outliers*.

É possível notar a presença de *outliers* nos gráficos de resíduos, que foram confirmados e eliminados com auxílio do teste de Jackknife, um procedimento analítico para refinar e confirmar os coeficientes de correlação (R) de equações e modelos de regressão, como a regressão linear. Em testes de Jackknife, os *outliers* são selecionados de acordo com os resíduos obtidos na regressão e valores de t de Student, portanto sua eliminação é baseada em princípios

estatísticos.¹¹⁴ A eliminação dos *outliers* foi seguida de nova regressão linear e verificação de resíduos para cada analito. No máximo 25% dos pontos analisados (*i.e.* 7) foram eliminados, conforme determinado nas normas seguidas (5 pontos eliminados para A; 5 para C; 4 para U; 1 para 5mU; 6 para G; 7 para X e 7 para I). As curvas analíticas e os gráficos de resíduos obtidos após a eliminação de *outliers* são apresentados na Figura 73.

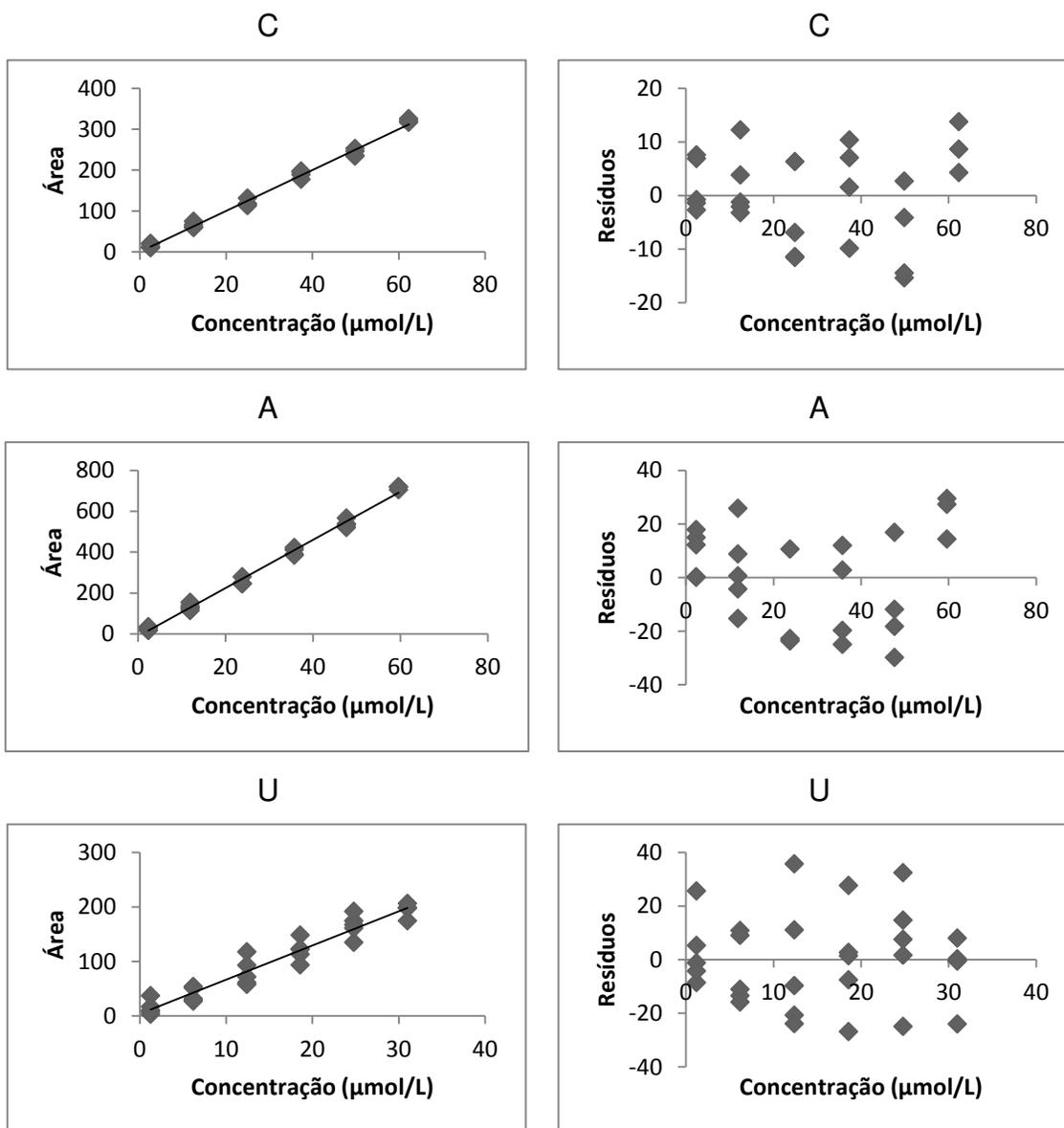


Figura 73 – Legenda na página seguinte

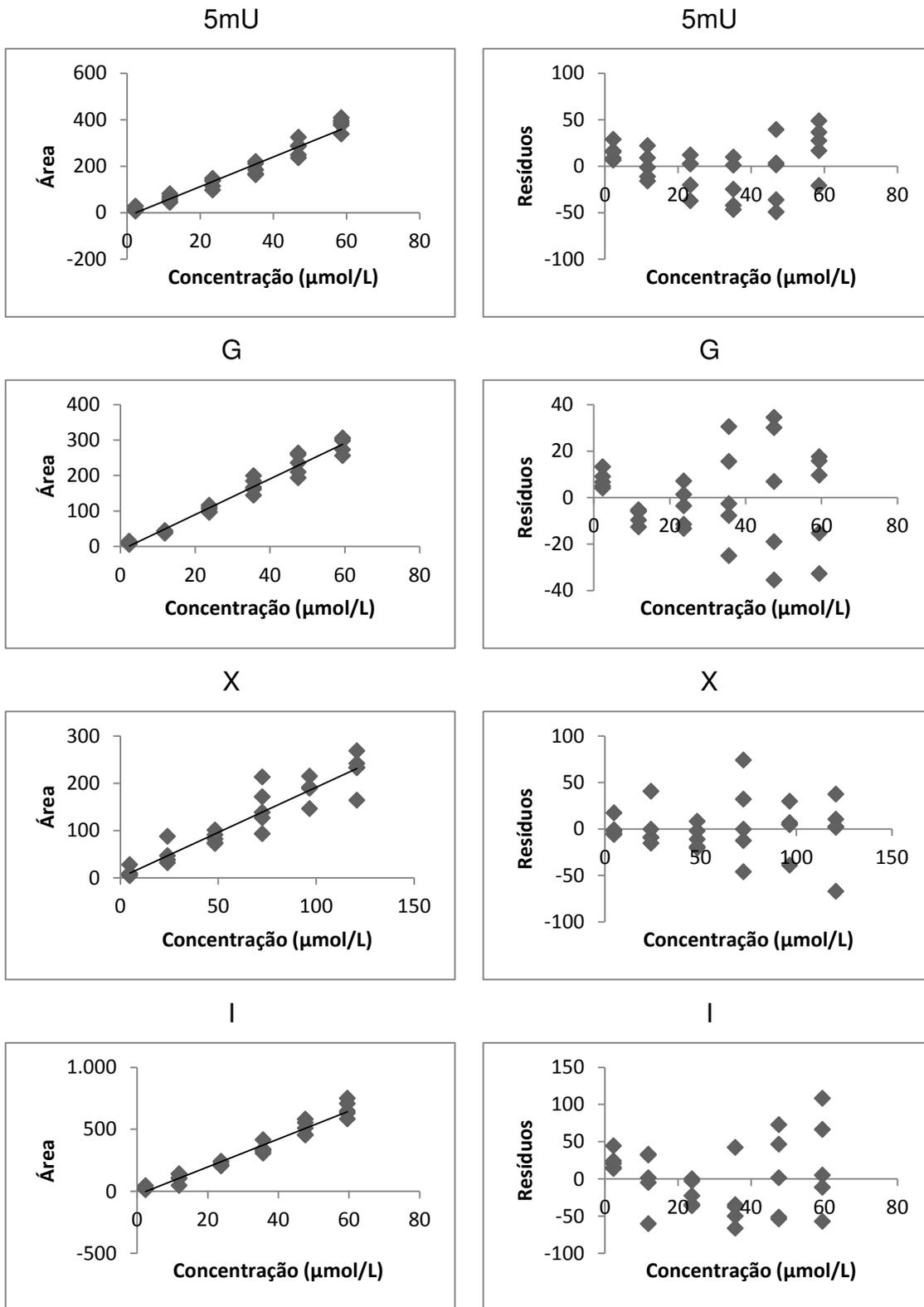


Figura 73 – Curvas analíticas e gráficos de resíduos obtidos por padronização externa após a eliminação de *outliers*.

Após a eliminação de *outliers*, foi possível obter coeficientes de correlação acima de 0,9800 para todos os analitos. Os valores de inclinação e intercepto, bem como os coeficientes de correlação (R), são apresentados na Tabela 11. As curvas analíticas apresentaram caráter homoscedástico para todos os analitos, *i.e.* as variâncias estavam distribuídas de modo homogêneo e aleatório, um requerimento formal da regressão linear. A significância da regressão foi verificada por teste F e foi comprovada como satisfatória para todos os analitos.

Tabela 11 – Parâmetros das curvas analíticas obtidas com padronização externa e eliminação de *outliers*.

	C	A	U	5mU	G	X	I
Faixa linear Mínimo ($\mu\text{mol/L}$)	2,5	2,4	1,2	2,3	2,4	4,8	2,4
Faixa linear Máximo ($\mu\text{mol/L}$)	62,4	59,6	31,0	58,6	59,4	120,8	59,5
R	0,9968	0,9969	0,9836	0,9801	0,9946	0,9915	0,9872
Inclinação ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{ mAU}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	5,00	11,77	6,32	6,26	5,07	2,00	10,48
Intercepto ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,37	-11,85	-1,57	-13,15	-11,78	-5,89	-16,58

4. Precisão, exatidão e recuperação

A precisão foi avaliada em dois dias diferentes (intra-corridas ou repetitividade; e inter-corridas ou precisão intermediária), em três níveis de concentração (mínimos, médios e máximos das faixas lineares, descritas na Tabela 11), com cinco réplicas para cada condição, assim como a exatidão e a recuperação. A Tabela 12 apresenta os valores obtidos. Todos os pontos avaliados foram adequados, com exceção da exatidão inter-corridas para G em concentração máxima. As recuperações obtidas são baixas e altamente dependentes da concentração, porém os valores foram precisos e exatos, portanto são aceitáveis. Assim, a quantificação dos nucleosídeos estudados é satisfatória e confiável.

Tabela 12 – Valores de precisão, exatidão e recuperação obtidos para a validação da metodologia desenvolvida.

Analito	Mínimo (%)		Médio (%)		Máximo (%)	
	Intra*	Inter*	Intra*	Inter*	Intra*	Inter*
Precisão (%)						
C	2,84	6,52	7,39	6,26	13,40	14,62
A	1,69	5,09	6,48	11,37	3,47	8,47
U	19,76	18,90	8,49	10,48	10,04	11,76
5mU	5,96	5,96	13,03	12,48	11,01	13,36
G	6,03	9,08	8,02	8,63	11,60	10,52
X	7,96	11,70	10,74	8,94	6,86	8,53
I	18,11	17,27	13,30	10,24	10,80	12,35
Exatidão						
C	9,25	12,18	10,33	11,44	-0,90	5,18
A	0,92	4,77	-3,64	4,86	9,20	7,59
U	6,57	10,40	-4,82	-8,80	3,42	6,21
5mU	-12,37	-14,53	2,57	-0,37	-5,39	1,43
G	-16,65	-17,87	-6,29	-9,86	-14,16	-20,34
X	-2,05	-10,76	-4,55	-9,00	-9,33	-9,95
I	14,16	13,29	-10,16	-11,23	-7,21	-3,04
Recuperação						
C	109,03	105,61	106,96	105,65	151,11	142,01
A	68,66	64,02	117,41	107,46	134,52	136,93
U	32,25	30,56	49,68	51,60	67,91	65,93
5mU	10,63	11,64	43,08	44,48	61,27	57,16
G	8,51	16,46	27,29	28,28	37,51	39,61
X	10,33	12,51	14,85	15,51	19,89	20,00
I	7,39	7,72	45,79	46,26	50,64	48,62

*Intra = precisão intra-corridas ou repetitividade; Inter = precisão inter-corridas ou intermediária.

Capítulo 7

Análise de amostras de soro sanguíneo

1. Materiais e equipamentos

Amostras de sangue de voluntários do sexo masculino, englobando saudáveis (grupo controle) e portadores de câncer de próstata (grupo doente), foram obtidas junto ao Hospital de Clínicas da UNICAMP, onde foram previamente analisadas por imunoenaios específicos para os biomarcadores de câncer mais comuns, sendo eles: PSA, β HCG, AFP e CEA. As amostras de indivíduos saudáveis foram coletadas no Hemocentro – UNICAMP e o soro sanguíneo foi separado por centrifugação após a coagulação. As amostras provenientes de portadores de câncer foram fornecidas pela Divisão de Patologia Clínica (seção de Fisiologia Clínica) já na forma de soro. Todas as amostras biológicas foram identificadas através de números (de 1 a 70 para sadios e de 1 a 77 para doentes) e foram armazenadas individualmente a -80°C até o momento da análise. Os demais materiais e equipamentos empregados foram descritos nos capítulos anteriores.

2. Análise de amostras de voluntários sadios e doentes

A metodologia validada foi aplicada a amostras de soro sanguíneo de 60 indivíduos sadios e 66 portadores de câncer de próstata (Figuras 74 e 75). As amostras 1, 2, 17, 28, 53, 55, 56, 57, 67 e 70 dos doadores sadios e 1, 2, 4, 8, 11, 13, 14, 18, 20, 21 e 62 dos doentes não foram analisadas porque os voluntários não completaram o processo de doação. A Figura 76 apresenta uma comparação entre eletroferogramas representativos obtidos para um indivíduo saudável e um doente.

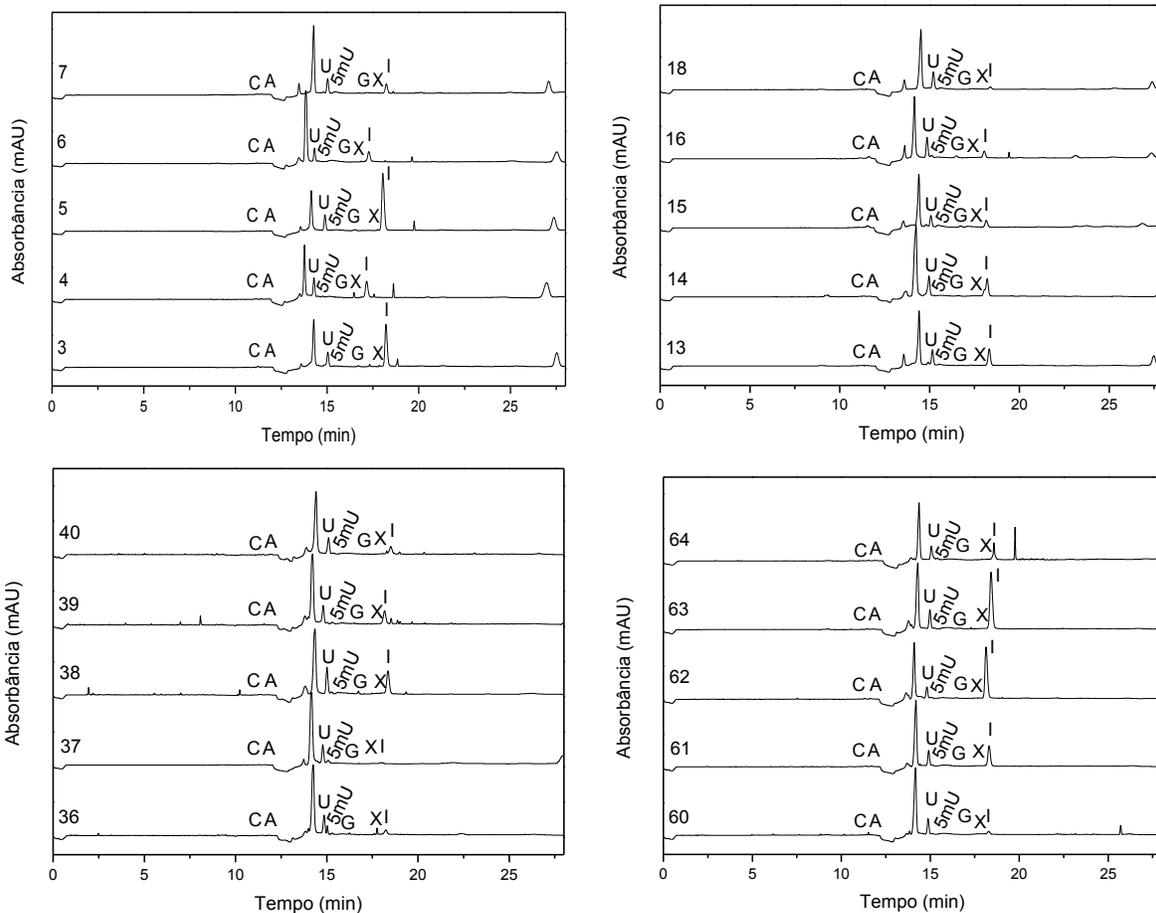


Figura 74 – Exemplos de eletroferogramas obtidos para as análises de amostras de soro sanguíneo de indivíduos saudáveis. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 60 s seguida por aplicação de 25 kV por 15 s entre *vials* de BGE.

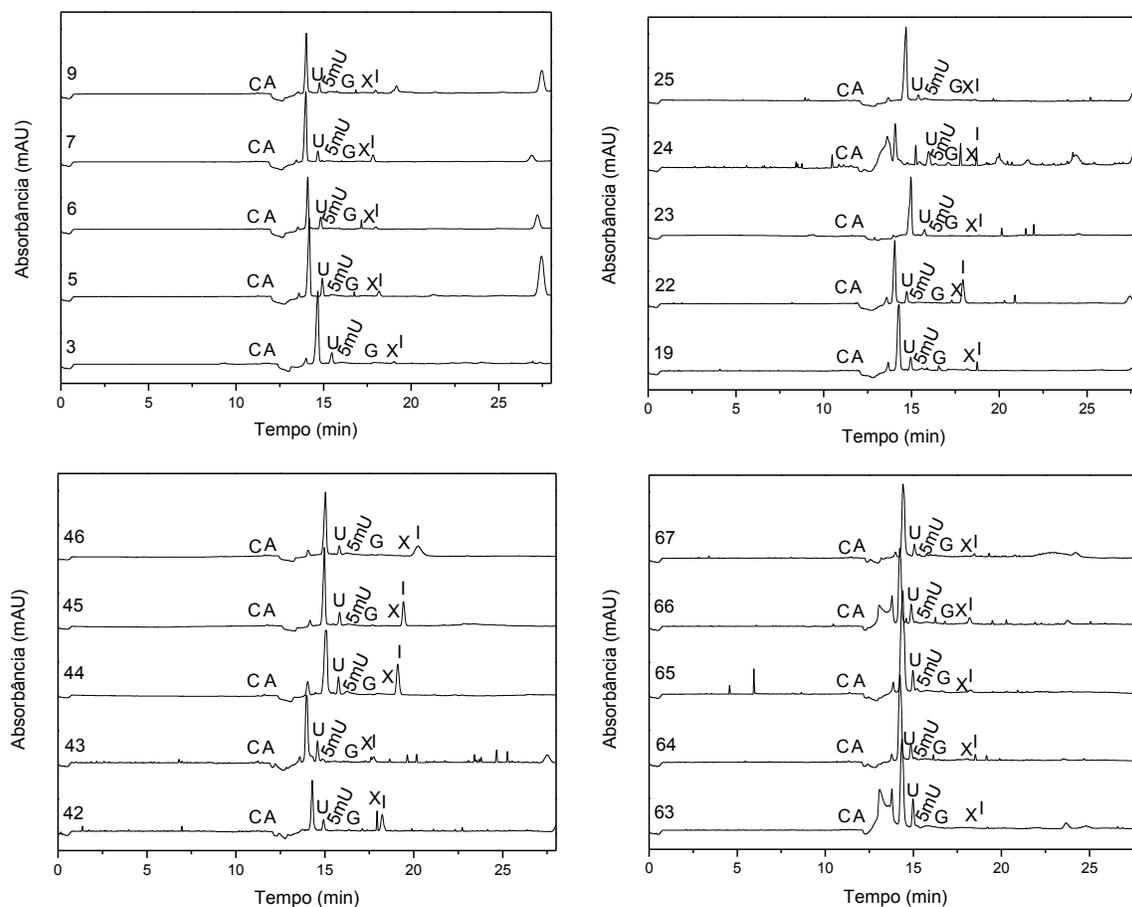


Figura 75 – Exemplos de eletroferogramas obtidos para as análises de amostras de soro sanguíneo de indivíduos portadores de câncer de próstata. Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 60 s seguida por aplicação de 25 kV por 15 s entre *vials* de BGE.

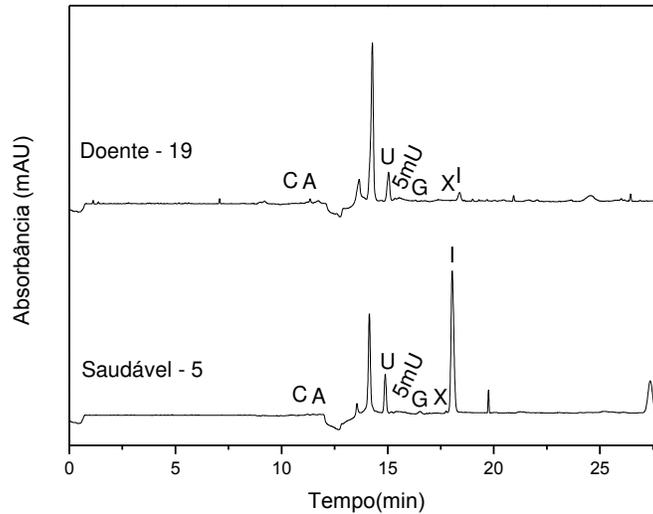


Figura 76 – Comparação entre eletroferogramas obtidos para um indivíduo saudável (amostra 5) e um doente (amostra 19). Condições de análise: análogas às da Figura 37, porém com injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 60 s seguida por aplicação de 25 kV por 15 s entre *vials* de BGE.

As concentrações médias obtidas para os nucleosídeos são apresentadas na Tabela 13 e na Figura 77. Os CV obtidos são altos, o que indica que as concentrações de nucleosídeos variam amplamente entre indivíduos. Um teste t foi realizado para detectar diferenças significativas entre as concentrações de nucleosídeos obtidas para homens saudáveis e doentes. Para C, as concentrações obtidas para pessoas saudáveis são estatisticamente menores do que para doentes; para A, 5mU e U, as concentrações dos indivíduos saudáveis são maiores do que dos doentes; e para os demais nucleosídeos estudados, não houve diferença significativa entre os níveis encontrados. A constatação de que as concentrações de alguns nucleosídeos são estatisticamente menores para doentes do que para indivíduos sadios difere das conclusões normalmente reportadas na literatura científica. Grande parte dos trabalhos já publicados sobre o assunto cita que as concentrações de nucleosídeos são maiores na presença de neoplasias devido à maior taxa de replicação celular, porém as observações demonstram um padrão diferente para o câncer de próstata. Assim, tais alterações poderiam ser relacionadas a esta patologia de base, porém estudos mais amplos

são necessários para verificar a possibilidade. 39,43,46,47,49–56,58,59,61,62,65–67,69,72,74,83,85,89,97,115,116

Tabela 13 – Médias das concentrações obtidas para as análises de amostras de soro sanguíneo de indivíduos sadios e portadores de câncer de próstata.

		C	A	U	5mU	G	X	I
Sadios	Média (μmol/L)	0,25	0,93	5,70	2,82	2,23	2,73	6,03
	Desvio (μmol/L)	0,19	0,48	1,68	0,96	1,47	9,82	6,82
	CV(%)	73,82	51,80	29,48	33,88	66,06	359,41	113,10
Doentes	Média (μmol/L)	0,35	0,73	5,33	2,37	1,97	1,61	2,88
	Desvio (μmol/L)	0,31	0,58	1,77	1,12	1,49	2,64	2,14
	CV(%)	88,59	79,57	33,24	47,04	79,95	164,04	74,34

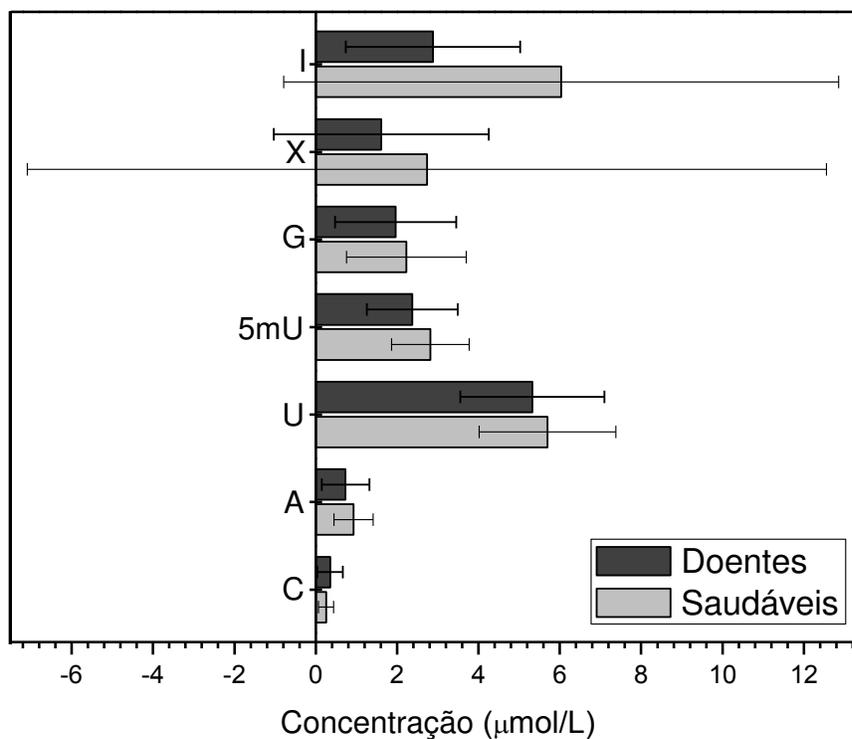


Figura 77 - Médias das concentrações obtidas para as análises de amostras de soro sanguíneo de indivíduos sadios e portadores de câncer de próstata.

3. Quimiometria

Diversos modelos de análise quimiométrica foram avaliados, incluindo PCA (análise de componentes principais, do inglês *principal component analysis*), PCA-DA (análise de componentes principais com análise de discriminantes lineares, do inglês *principal component analysis – discriminant analysis*), árvores de classificação, PLS-DA (análise de discriminantes por mínimos quadrados parciais, do inglês *partial least square discriminant analysis*), k-NN (k vizinhos mais próximos, do inglês *k nearest neighbors*), RF (floresta randômica, do inglês *random forest*) e SVM (máquina de vetores de suporte, do inglês *support vector machine*). As análises quimiométricas foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi e seu aluno de pós-graduação Paulo R. Filgueiras (Laboratório de Quimiometria em Química Analítica - LAQQA, Instituto de Química, UNICAMP).

Modelos não supervisionados de análise multivariada, como PCA, empregam combinações lineares das concentrações de todos os analitos para gerar componentes ortogonais que maximizem a variância total entre os grupos de amostras, independentemente dos rótulos dos grupos (*i.e.* saudável ou doente). O modelo PCA reduz o número de dimensões de separação e mantém as características que contribuem mais para a variância entre as amostras. A combinação linear que gera a maior variância, *i.e.* responsável pela maior variabilidade nos dados, é projetada no primeiro eixo (primeiro componente principal) e os demais componentes tem a máxima variância sob a restrição de serem ortogonais. Cada componente principal é uma combinação linear dos dados originais e é independente dos demais. Por outro lado, modelos supervisionados, como PLS, kNN, RF e SVM, consideram os rótulos dos dados originais (*i.e.* sadio ou doente) para a construção das combinações lineares, o que maximiza a separação entre os grupos de amostras. Em tais métodos, todas as amostras são divididas entre um grupo de treinamento e outro de teste. O primeiro é usado para gerar o modelo, enquanto que o segundo é aplicado nele e a classificação obtida fornece a confiabilidade do resultado. Uma matriz de dados do grupo de

treinamento contendo variáveis das amostras (concentrações, intensidades, áreas, etc.) é relacionada com outra contendo as variáveis de resposta (saudável ou doente). A análise de discriminantes lineares (DA) pode ser combinada com ambos os tipos de modelos e estabelece a posição ótima da superfície de discriminação que melhor separa as classes.¹¹⁷⁻¹²⁰

Para cada modelo, foram avaliados cinco parâmetros: sensibilidade, especificidade, PPV, NPV e exatidão. Os quatro primeiros foram previamente definidos no capítulo 1 (Figura 2); a exatidão corresponde à percentagem total de concordância entre os resultados do modelo e suas referências. É medida pela relação entre todos os resultados corretos do teste e todos os indivíduos examinados. Os melhores resultados foram obtidos com o modelo RF, que emprega a técnica de modelagem de várias árvores de decisão combinadas.

3.1. Introdução à Floresta Randômica (RF)

A RF é um método de classificação que combina resultados de vários classificadores individuais, sendo cada classificador uma árvore construída pelo analista, que representa uma solução do problema.¹²¹ As amostras são divididas em dois conjuntos distintos: conjunto de treinamento, utilizado para construção das árvores de classificação, e conjunto de teste, utilizado para previsão do modelo e cálculos de sensibilidade, especificidade, PPV, NPV e exatidão.¹²²

As árvores são constituídas por nós, com cada um representando uma condição com duas respostas possíveis. Cada resposta leva à outra condição com mais duas respostas possíveis e o processo se repete até atingir a classificação da amostra (Figura 78). Para cada nó da árvore, um número de variáveis (analitos) selecionadas aleatoriamente do grupo de treinamento é considerado. Os nós sofrem divisões binárias selecionadas randomicamente dentre as melhores divisões possíveis. Cada árvore é construída independentemente das demais e o número total de variáveis empregadas em cada nó e a quantidade total de árvores são definidos pelo analista. Após a construção do modelo com base no grupo de amostras de treinamento, o grupo de teste é aplicado e o conjunto de resultados

variáveis de uma amostra (analitos) e o vetor $y \in \{c_1, c_2\}$, a classe n qual as amostras pertencem (sadio ou doente). Cada árvore t (pertencente a T) é construída com $m < M$ variáveis.¹²¹ Na construção da árvore de decisão t , tem-se inicialmente o conjunto com todas as amostras de treinamento D_t . Cada nó da árvore representa um subconjunto D_{ti} de D_t . O nó da raiz representa o próprio conjunto D_t . A árvore t particiona seu conjunto D_t em dois outros subconjuntos disjuntos D_{t1} e D_{t2} , que devem ser tão puros quanto possível em relação às classes c_1 e c_2 (sadio e doente), pertencentes ao vetor y .¹²² Os subconjuntos D_{t1} e D_{t2} correspondem, respectivamente, às sub-árvores esquerda e direita do nó correspondente a D_t (Figura 79).

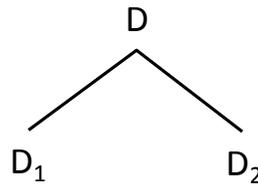


Figura 79 - Exemplo de partição de nó pai (D) em dois nós filhos D_1 e D_2 .

A partição do conjunto D_t é feita mediante um critério de pureza pré-estabelecido (e.g. ganho de informação) e utilizado para decidir qual a variável de x_i dentre as M variáveis é a que melhor divide D_t e qual o valor de v_{ij} de x_{ij} (no caso, concentração) gera a melhor divisão em termos de pureza. A árvore t é construída seguindo o mesmo procedimento utilizado para a primeira repartição, até que todos os subconjuntos sejam puros, ou seja, contenha valores de apenas uma classe (c_1 ou c_2).

Vários critérios podem ser utilizados para determinar a partição do conjunto D_t . O algoritmo utilizado neste trabalho usou o critério entropia com base na maximização do ganho de informação dos subconjuntos filhos. O critério entropia aumenta com o ganho de informação resultante da bisseção do conjunto D_t nos dois conjuntos D_{t1} e D_{t2} , definida por um valor v_j de uma variável x_j . O ganho de informação pelo critério entropia $GI(D, x_j, v_{x_j})$ foi calculado pela Equação 1:

$$GI(D, x_j, v_{xj}) = S(D) - \sum_{k=1}^2 p(D_k)S(D_k) \quad (1)$$

na qual $S(D)$ é a entropia do nó raiz (pais) ou do conjunto D e $p(D_k)$ corresponde à probabilidade de ocorrência de D_k . Quanto maior o ganho de informação na partição, menor a entropia e mais puros são os subconjuntos obtidos. A entropia de um conjunto D em relação às possíveis classes c_1 e c_2 que ocorrem em y foi calculada segundo a Equação 2:

$$S(D) = - \sum_{c=1}^C p(c_i) \cdot \ln[p(c_i)] \quad (2)$$

na qual $p(c_i)$ é a probabilidade de pertencer à classe c_i .

Uma vez que a floresta com T árvores é construída, a classificação pode ser feita com base nos votos de todas as árvores. Cada árvore emite o voto c_1 ou c_2 (sadio ou doente). A classificação dada por uma RF corresponde ao voto da maioria das árvores.

3.2. Construção do modelo

Todos os cálculos foram efetuados no software *Matlab* 7.8. Na construção do classificador, as amostras foram divididas nos conjuntos de treinamento e teste (Tabela 14) pelo algoritmo Kennard-Stone.¹²⁴ Para otimização das árvores de classificação, utilizou-se o procedimento *k-fold*, que consiste em dividir o conjunto de amostras de treinamento em k subconjuntos disjuntos de mesmo tamanho. Um subconjunto é utilizado para teste enquanto os $(k-1)$ restantes são utilizados para construção das árvores. Este processo é realizado k vezes até que todos os subconjuntos sejam testados. Neste trabalho utilizou-se $k = 5$.

A floresta randômica foi construída baseada em resultados de 35 árvores de classificação. Para avaliar a importância de cada variável no modelo, foi realizado um teste de permutação após a construção de cada árvore de classificação. O teste de permutação consiste em permutar cada variável escolhida para crescimento da árvore e comparar a exatidão do modelo da árvore original com os modelos permutados, que serão tantos quanto o número de

variáveis utilizadas para crescimento da árvore.¹²⁵ Uma variável importante para o modelo irá reduzir de forma significativa a exatidão da árvore de classificação, enquanto que uma variável menos importante não terá efeito sobre a árvore.

Tabela 14 - Divisão dos resultados amostrais dos pacientes em conjuntos de treinamento e teste para avaliação estatística.

Paciente	Treinamento	Teste
Saudável	36	24
Câncer	39	29
Total	75	53

Os resultados foram reportados segundo suas capacidades de identificação de um indivíduo com diagnóstico de câncer. Foram avaliados cinco parâmetros previamente definidos: sensibilidade (capacidade do modelo em identificar um indivíduo com câncer quando a doença está efetivamente presente), especificidade (capacidade do modelo em identificar um indivíduo saudável quando este efetivamente não possui a doença), PPV (probabilidade do indivíduo estar doente quando o resultado do modelo é positivo para câncer), NPV (probabilidade do indivíduo não estar doente quando o resultado do modelo é negativo para câncer) e exatidão (porcentagem total de concordância entre os resultados do modelo e suas referências) (Figura 2).

3.3. Resultados

A partir dos resultados amostrais, não é possível obter um modelo confiável utilizando apenas um analito, pois os resultados de um indivíduo sadio e com diagnóstico de câncer são próximos (Figura 80), assim como a média por grupo (Figura 81).

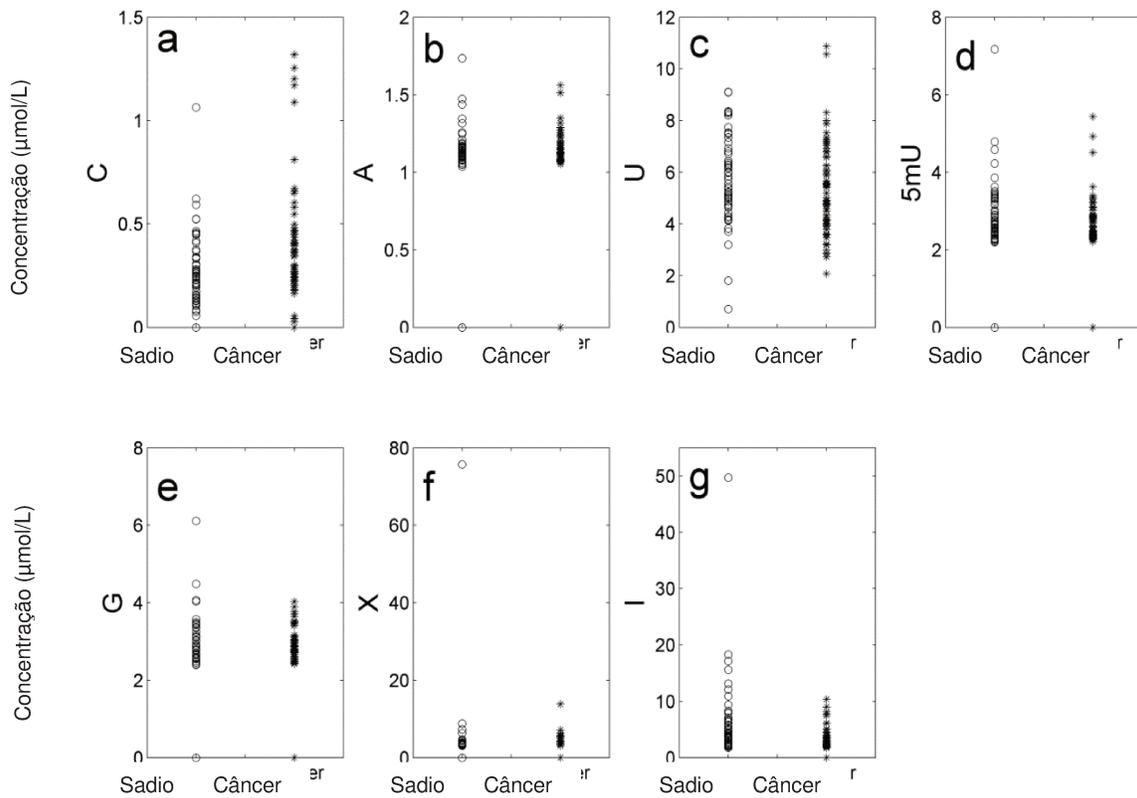


Figura 80 – Concentrações (µmol/L) obtidas para as 7 variáveis medidas.

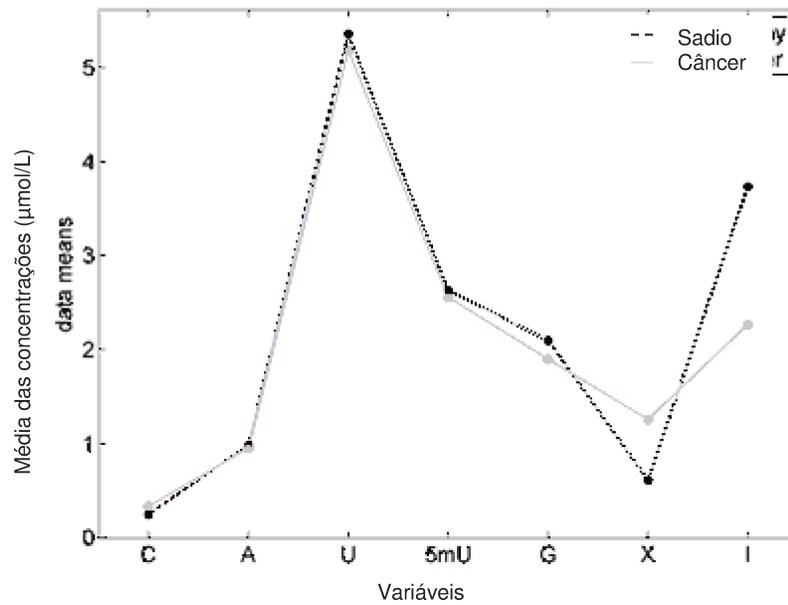


Figura 81 – Média dos resultados obtidos para os dois grupos de pacientes (sadios e doentes).

Na construção do classificador de RF, nenhuma amostra foi excluída do modelo, mesmo as que apresentam resultados fora do esperado para alguma variável (Figura 80). O modelo classificou corretamente 77% das amostras de teste e apresentou alta sensibilidade em detectar um paciente com diagnóstico de câncer (93%, Tabela 15). Entretanto, o NPV de 88%, superior ao PPV de 73%, indica que o modelo é mais adequado em diagnósticos negativos, ou seja, de pessoas que não apresentam a doença. Uma resposta negativa dada pelo modelo provavelmente estará correta, já que foram observadas apenas 2 amostras com resultados falso negativos contra 14 com resultados verdadeiros negativos para diagnóstico de câncer (Figura 82).

Tabela 15 - Resultados do modelo floresta randômica (RF) aplicado ao conjunto de amostras de teste.

Parâmetro	Teste
Sensibilidade	0,93
Especificidade	0,58
PPV	0,73
NPV	0,88
Exatidão	0,77

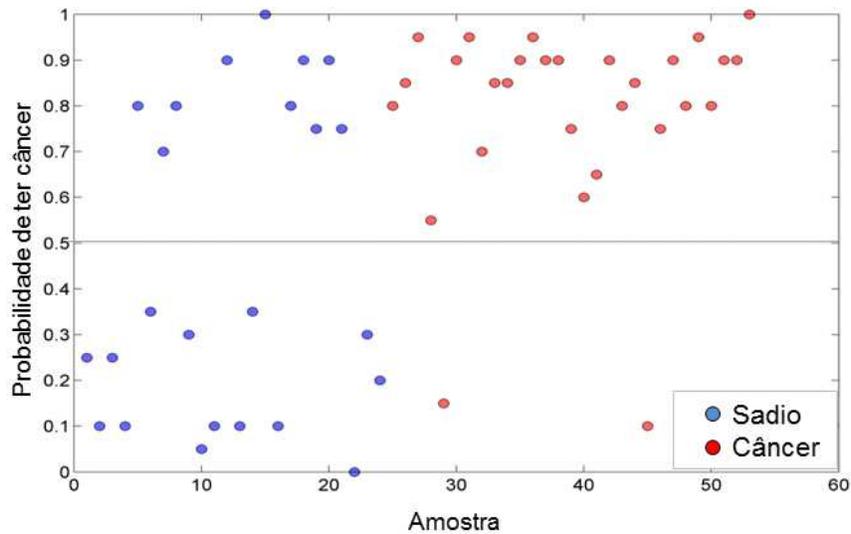


Figura 82 - Probabilidade do diagnóstico de câncer pelo modelo floresta randômica (RF). Como existem apenas duas classes, uma probabilidade maior que 0,5 indica que o paciente tem diagnóstico de câncer, enquanto uma probabilidade menor que 0,5 indica ser um paciente saudável.

As variáveis utilizadas na modelagem foram avaliadas por um teste de permutação. Seus pesos para o classificador estão apresentados na Figura 83, na qual quanto maior o peso de uma variável, maior sua importância em identificar um paciente com diagnóstico de câncer. Apesar das variáveis G e X apresentarem menores pesos, elas não são muito inferiores às demais, sendo desnecessário seu descarte para melhoria da exatidão do classificador. As variáveis I e C apresentaram as maiores importâncias no resultado do modelo.

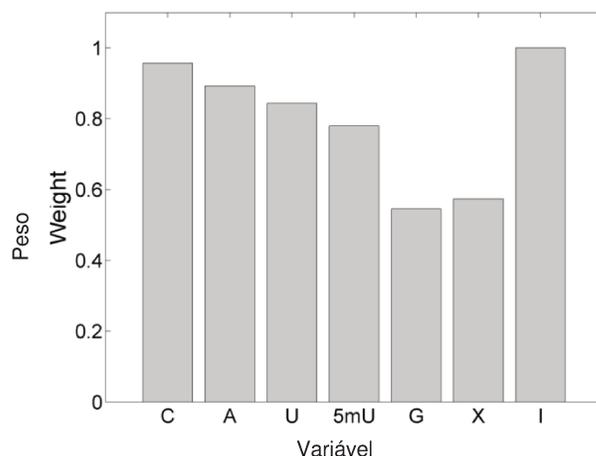


Figura 83 - Importância (peso) de cada variável no modelo floresta randômica (RF).

4. Conclusões

Os resultados de cada uma das 7 variáveis isoladamente (analitos C, A, U, 5mU, G, X e I) não discriminam entre pacientes com diagnóstico positivo ou negativo para câncer. Entretanto, a combinação delas é favorável para um diagnóstico negativo. O modelo RF utilizando as 7 variáveis possui exatidão de 77%. Além disso, apresenta alta sensibilidade em detectar um paciente com câncer (93%) e NPV de 88%. O PSA, biomarcador tumoral empregado atualmente para câncer de próstata, apresenta sensibilidade de cerca de 20 – 25% e especificidade de 90% na faixa de concentração de 0 a 4 ng/mL, considerada como normal. Tal biomarcador minimiza o risco de resultados falso-positivos, porém gera uma alta proporção de falso-negativos. A detecção do câncer de próstata empregando os nucleosídeos pela metodologia desenvolvida, por outro lado, apresenta alta sensibilidade (93%) e especificidade reduzida (58%), *i.e.* minimiza o risco de resultados falso-negativos. Assim, os métodos de diagnóstico por PSA e nucleosídeos são complementares, o que permite concluir que o uso concomitante de tais biomarcadores tumorais pode auxiliar no diagnóstico precoce do câncer de próstata e no acompanhamento da doença.

Capítulo 8

Conclusões

A metodologia para extração, separação e quantificação de nucleosídeos em soro sanguíneo por CE-UV foi totalmente otimizada e validada. Foram obtidas resoluções acima de 1,5 para todos os pares de picos, atingindo separação em linha de base, e eficiências entre $4,3 \times 10^4$ (8BrG) e $1,0 \times 10^5$ pratos (C) pratos. Houve melhora expressiva em termos de resolução quando comparado com a metodologia inicial, publicada por Jiang *et al.*⁸¹ Em adendo, a menor concentração de tensoativo em relação a maior parte das metodologias já publicadas permite a aplicação deste método em análises de rotina com maior confiabilidade e menor necessidade de manutenção de equipamento, o que reduz custos e gasto de tempo. A otimização da injeção, empregando estratégias de pré-concentração de amostra, levou à maior intensidade dos picos, fator que facilita a integração de picos de analitos com baixas concentrações e melhora a detectabilidade do método.

Um total de 126 amostras individuais de soro sanguíneo foram analisadas, sendo 60 de homens sadios e 66 de portadores de câncer de próstata. Observou-se diferença significativa entre as médias das concentrações dos nucleosídeos C, A, 5mU e U. Para A, U e 5mU, foram obtidas concentrações menores, em média, na presença da doença, fator que difere das conclusões normalmente publicadas para outras patologias de base, porém estudos mais amplos são necessários para confirmar se tais diferenças podem ser empregadas no diagnóstico deste tipo de câncer.

Os resultados obtidos foram avaliados através de análise quimiométrica empregando o modelo RF e os valores de sensibilidade e especificidade atingidos (93 e 58%, respectivamente) são complementares aos obtidos em média para o PSA (*c.a.* 20-25 e 90%, respectivamente). O modelo exhibe resultados mais confiáveis para diagnóstico negativo (88% de NPV), com baixa probabilidade de resultado falso-negativo. A exatidão do diagnóstico foi de 77%, valor adequado para testes de *screening* e acompanhamento da doença. Assim, os nucleosídeos podem ser potencialmente empregados como biomarcadores tumorais auxiliares para o diagnóstico e acompanhamento do câncer de próstata, juntamente com o PSA.

Referências

1. Ruddon, R. W. *Cancer Biology*, (Oxford University Press, New York, NY, 2007).
2. World Health Organization (WHO), acessado em 13/12/2013, disponível em <http://www.who.int>.
3. Cancer Facts & Figures, American Cancer Society, acessado em 15/12/2013, (2013). disponível em <http://www.cancer.org/research/cancerfactsfigures/cancerfactsfigures/cancer-facts-figures-2013>.
4. Greave, M. *Cancer: the Evolutionary Legacy*, (Oxford University Press, New York, NY, 2000).
5. Rothschild, B. M., Witzke, B. J. & HersHKovitz, I. Metastatic cancer in the Jurassic, *Lancet* 354, 398 (1999).
6. Hajdu, S. I. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1, *Cancer* 117, 1097–1102 (2011).
7. Hajdu, S. I. A note from history: landmarks in history of cancer, part 2, *Cancer* 117, 2811–2820 (2011).
8. Richards, R. I. Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences, *Trends Genet.* 17, 339–345 (2001).
9. Sudhakar, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods, *J. Cancer Sci. Ther.* 1, 1–4 (2009).
10. Jemal, A. *et al.* Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus (HPV) associated cancers and HPV vaccination coverage levels, *J. Natl. Cancer Inst.* 105, 175–201 (2013).
11. American Cancer Society - The history of cancer, acessado em 15/12/2013, disponível em <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002048-pdf.pdf>.
12. N, H. *et al.* SEER Cancer statistics review 1975-2010, National Cancer Institute, acessado em 15/12/2013, disponível em http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/.

13. Câncer no Brasil - Dados dos Registros de Base Populacional (Volume IV), acessado em 15/12/2013, disponível em <http://www.inca.gov.br/regpop/2003/>.
14. Stanford Medicine Cancer Institute, acessado em 15/12/2013, disponível em <http://cancer.stanford.edu/information/cancerOverview.html>.
15. Etzioni, R. *et al.* The case for early detection, *Nat. Rev.* 3, 243–52 (2003).
16. Jain, K. K. *The Handbook of Biomarkers*, (Humana Press, Totowa, NJ, 2010).
17. *Biomarkers in medicine, drug discovery and environmental health*, (Ed. Vaidya, V. S. & Bonventre, J. V) (John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, 2010).
18. Atkinson, A. J. *et al.* Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework, *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 89–95 (2001).
19. Azuaje, F. *Bioinformatics and Biomarker Discovery: “omic” data analysis for personalized medicine*, (John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, 2010).
20. Portal PubMed, acessado em 16/12/2013, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
21. Lundblad, R. L. *Development and Application of Biomarkers*, (CRC Press, Boca Raton, FL, 2011).
22. Koulman, A., Lane, G. A., Harrison, S. J. & Volmer, D. A. From differentiating metabolites to biomarkers, *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 663–670 (2009).
23. Almeida, J. R. C. *et al.* Marcadores tumorais: revisão de literatura, *Rev. Bras. Cancerol.* 53, 305–316 (2007).
24. Duffy, M. J. & McGing, P. *Guidelines for the use of tumour markers*, 1–15 (Scientific Comitee of the Association of Clinical Biochemists in Ireland (ACBI), 2005).
25. Ludwig, J. A. & Weinstein, J. N. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection, *Nat. Rev. Cancer* 5, 845–856 (2005).
26. Negm, R. S., Verma, M. & Srivastava, S. The promise of biomarkers in cancer screening and detection, *Trends Mol. Med.* 8, 288–293 (2002).

27. *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery*, (Ed. Issaq, H. J. & Veenstra, T. D.) (Elsevier Inc., London, 2013).
28. Bakry, R., Huck, C. W., Najam-ul-Haq, M., Rainer, M. & Bonn, G. K. Recent advances in capillary electrophoresis for biomarker discovery, *J. Sep. Sci.* 30, 192–201 (2007).
29. Scardino, P. T. & Kelman, J. *Dr. Peter Scardino's prostate book: the complete guide to overcoming prostate cancer, prostatitis, and BPH*, (Penguin Group, New York, NY, 2005).
30. FENAESS - Federação Nacional dos Estabelecimentos de Serviços de Saúde, acessado em 18/12/2013, disponível em <http://www.fenaess.org.br/noticias/index.asp?vCod=5954&idioma=pt>.
31. Loughlin, K. R. & Nimmo, J. *100 Questions and answers about prostate disease*, (Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA, 2007).
32. *Management of prostate cancer*, (Ed. Klein, E. A. & Jones, J. S.) (Humana Press, Totowa, NJ, 2013).
33. *Prostate cancer: science and clinical practice*, (Ed. Mydlo, J. H. & Godec, C. J.) (Elsevier, London, 2003).
34. *Health promotion and disease prevention in clinical practice*, (Ed. Woolf, S. H., Jonas, S. & Lawrence, R. S.) (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1996).
35. Bloomfield, V. A. *Nucleic acids: structures, properties and functions*, (University Science Books, Sausalito, CA, 2000).
36. Velikyan, I., Acharya, S., Trifonova, A., Földesi, A. & Chattopadhyaya, J. The pKa's of 2'-hydroxyl group in nucleosides and nucleotides, *J. Am. Chem. Soc.* 123, 2893–2894 (2001).
37. Chang, Y. C. Synthesis and conformational studies of modified nucleosides, (2007).
38. Schram, K. H. Urinary nucleosides, *Mass Spectrom. Rev.* 17, 131–251 (1998).
39. Markuszewski, M. J., Struck, W., Waszczuk-Jankowska, M. & Kaliszan, R. Metabolomic approach for determination of urinary nucleosides as potential tumor markers using electromigration techniques, *Electrophoresis* 31, 2300–2310 (2010).

40. Fedorov, N. A., Bogomazov, M. I. & Kosenko, A. S. Excretion of 5-ribosyluracil (pseudouridine) in healthy persons and cancer patients before and after radiation therapy., *Biull. Eksp. Biol. Med.* 62, 91–4 (1966).
41. Fedorov, N. A. & Bogomazov, M. J. Urinary excretion of purine bases and pseudouridine normal human and in cancer patients before and after radiotherapy, *Radiobiol. Radiother. (Berl)*. 10, 605–608 (1969).
42. Adams, W. S., Davis, F. & Nakatani, M. Purine and pyrimidine excretion in normal and leukemic subjects, *Am. J. Med.* 28, 726 – 734 (1960).
43. Gehrke, C. W., Kuo, K. C., Waalkes, T. P. & Borek, E. Patterns of urinary excretion of modified nucleosides, *Cancer Res.* 39, 1150–1153 (1979).
44. Sharma, O. K. & Fischbeinz, A. em *Chromatogr. Modif. Nucleosides* (Ed. Gehrke, C. W. & Kuo, K. C.) 321 – 340 (Elsevier, Amsterdam, 1990).
45. Feng, B. *et al.* Normal and modified urinary nucleosides represent novel biomarkers for colorectal cancer diagnosis and surgery monitoring, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20, 1913–1919 (2005).
46. Zheng, Y.-F. *et al.* Urinary nucleosides as biological markers for patients with colorectal cancer, *World J. Gastroenterol.* 11, 3871–3876 (2005).
47. Hsu, W. Y. *et al.* Analysis of urinary nucleosides as potential tumor markers in human colorectal cancer by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta.* 402, 31–37 (2009).
48. Trewyn, R. W. *et al.* Elevated nucleoside excretion by patients with nasopharyngeal carcinoma, *Cancer* 49, 2513–2517 (1982).
49. Hennes, C. *et al.* Prediction of breast cancer by profiling of urinary RNA metabolites using Support Vector Machine-based feature selection., *BMC Cancer* 9, 104–114 (2009).
50. Cho, S. H., Choi, M. H., Lee, W. Y. & Chung, B. C. Evaluation of urinary nucleosides in breast cancer patients before and after tumor removal, *Clin. Biochem.* 42, 540–543 (2009).
51. Gehrke, C. W. *et al.* Quantitative high-performance liquid chromatography of nucleosides in biological materials, *J. Chromatogr. A* 150, 455–476 (1978).
52. Sasco, A. J. *et al.* Breast cancer prognostic significance of some modified urinary nucleosides, *Cancer Lett.* 108, 157–162 (1996).

53. Zheng, Y. F., Kong, H. W., Xiong, J. H., Lv, S. & Xu, G. W. Clinical significance and prognostic value of urinary nucleosides in breast cancer patients, *Clin. Biochem.* 38, 24–30 (2005).
54. Liebich, H. M. *et al.* Chromatographic, capillary electrophoretic and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of urinary modified nucleosides as tumor markers, *J. Chromatogr. A* 1071, 271–275 (2005).
55. Cho, S. H. *et al.* Direct determination of nucleosides in the urine of patients with breast cancer using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.* 20, 1229–1236 (2006).
56. Bullinger, D. *et al.* Bioinformatical evaluation of modified nucleosides as biomedical markers in diagnosis of breast cancer, *Anal. Chim. Acta* 618, 29–34 (2008).
57. Woo, H. M. *et al.* Mass spectrometry based metabolomic approaches in urinary biomarker study of women's cancers, *Clin. Chim. Acta* 400, 63–69 (2009).
58. Mao, Y., Zhao, X., Wang, S. & Cheng, Y. Urinary nucleosides based potential biomarker selection by support vector machine for bladder cancer recognition, *Anal. Chim. Acta* 598, 34–40 (2007).
59. Wang, S., Zhao, X., Mao, Y. & Cheng, Y. Novel approach for developing urinary nucleosides profile by capillary electrophoresis-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1147, 254–260 (2007).
60. Szymańska, E., Markuszewski, M. J., Bodzioch, K. & Kaliszan, R. Development and validation of urinary nucleosides and creatinine assay by capillary electrophoresis with solid phase extraction, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, 1118–1126 (2007).
61. Li, H. Y. *et al.* Separation and identification of purine nucleosides in the urine of patients with malignant cancer by reverse phase liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 44, 641–651 (2009).
62. Jeng, L. Bin *et al.* Analysis of urinary nucleosides as helper tumor markers in hepatocellular carcinoma diagnosis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 1543–1549 (2009).
63. Djukovic, D., Baniyadi, H. R., Kc, R., Hammoud, Z. & Raftery, D. Targeted serum metabolite profiling of nucleosides in esophageal adenocarcinoma, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 3057–3062 (2010).

64. La, S., Cho, J. H., Kim, J. H. & Kim, K. R. Capillary electrophoretic profiling and pattern recognition analysis of urinary nucleosides from thyroid cancer patients, *Anal. Chim. Acta* 486, 171–182 (2003).
65. Kim, K. R., La, S., Kim, A., Kim, J. H. & Liebich, H. M. Capillary electrophoretic profiling and pattern recognition analysis of urinary nucleosides from uterine myoma and cervical cancer patients, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 754, 97–106 (2001).
66. Liebich, H. M., Di Stefano, C., Wixforth, A. & Schmid, H. R. Quantitation of urinary nucleosides by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 763, 193–197 (1997).
67. McEntire, J. E. *et al.* Classification of lung cancer patients and controls by chromatography of modified nucleosides in serum, *Cancer Res.* 49, 1057–1062 (1989).
68. Waalkes, T. P. *et al.* Biological markers and small cell carcinoma of the lung: a clinical evaluation of urinary ribonucleosides, *Cancer* 50, 2457–2464 (1982).
69. Zheng, Y. F. *et al.* Study of urinary nucleosides as biological marker in cancer patients analyzed by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Electrophoresis* 23, 4104–9 (2002).
70. Waalkes, T. P. *et al.* The urinary excretion of nucleosides of ribonucleic acid by patients with advanced cancer, *Cancer* 36, 390–398 (1975).
71. Teichert, F. *et al.* Evaluation of urinary ribonucleoside profiling for clinical biomarker discovery using constant neutral loss scanning liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 2071–2082 (2011).
72. Szymańska, E. *et al.* Evaluation of different warping methods for the analysis of CE profiles of urinary nucleosides, *Electrophoresis* 28, 2861–2873 (2007).
73. Studzińska, S. & Buszewski, B. A new way to fast and high resolution determination of modified nucleosides, *J. Chromatogr. B* 887–888, 93–101 (2012).
74. Seidel, A., Brunner, S., Seidel, P., Fritz, G. I. & Herbarth, O. Modified nucleosides: an accurate tumour marker for clinical diagnosis of cancer, early detection and therapy control, *Br. J. Cancer* 94, 1726–1733 (2006).
75. Rodríguez-Gonzalo, E., García-Gómez, D. & Carabias-Martínez, R. Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography-

tandem mass spectrometry method with on-line polar extraction for the analysis of urinary nucleosides. Potential application in clinical diagnosis, *J. Chromatogr. A* 1218, 9055–9063 (2011).

76. Liebich, H. M. *et al.* Analysis of normal and modified nucleosides in urine by capillary electrophoresis, *Chromatographia* 45, 396–401 (1997).
77. Liebich, H. M., Lehmann, R., Xu, G., Wahl, H. G. & Häring, H. U. Application of capillary electrophoresis in clinical chemistry: the clinical value of urinary modified nucleosides., *J. Chromatogr. B* 745, 189–196 (2000).
78. Liebich, H. ., Xu, G., Di Stefano, C. & Lehmann, R. Capillary electrophoresis of urinary normal and modified nucleosides of cancer patients, *J. Chromatogr. A* 793, 341–347 (1998).
79. Liebich, H. M. *et al.* Age-dependence of urinary normal and modified nucleosides in childhood as determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 814, 275–283 (2005).
80. Kammerer, B., Frickenschmidt, A., Gleiter, C. H., Laufer, S. & Liebich, H. MALDI-TOF MS analysis of urinary nucleosides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16, 940–957 (2005).
81. Jiang, Y. & Ma, Y. A fast capillary electrophoresis method for separation and quantification of modified nucleosides in urinary samples, *Anal. Chem.* 81, 6474–6480 (2009).
82. Fischbein, A., Sharma, O. K., Selikoff, I. J. & Borek, E. Urinary excretion of modified nucleosides in patients with malignant mesothelioma, *Cancer Res.* 43, 2971–2974 (1983).
83. Xu, G., Enderle, H., Liebich, H. & Lu, P. Study of normal and modified nucleosides in serum by RP-HPLC, *Chromatographia* 52, 152–158 (2000).
84. Mitchell, E. P. *et al.* Modified nucleosides in human serum, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 581, 31–40 (1992).
85. Struck, W., Waszczuk-Jankowska, M., Kaliszan, R. & Markuszewski, M. J. The state-of-the-art determination of urinary nucleosides using chromatographic techniques “hyphenated” with advanced bioinformatic methods, *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 2039–2050 (2011).
86. Srivastava, B., Sharma, B. K., Baghel, U. S. & Yashwant, N. S. Ultra performance liquid chromatography (UPLC): a chromatography technique, *Internarional J. Pharm. Qual. Assur.* 2, 19–25 (2010).

87. Simionato, A. V. C., Carrilho, E. & Maggi Tavares, M. F. CE-MS and related techniques as a valuable tool in tumor biomarkers research, *Electrophoresis* 31, 1214–1226 (2010).
88. Tavares, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos, *Quim. Nova* 19, 173–181 (1995).
89. Helboe, T. & Hansen, S. H. Separation of nucleosides using capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 836, 315–324 (1999).
90. Ma, Y., Liu, G., Du, M. & Stayton, I. Recent developments in the determination of urinary cancer biomarkers by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 25, 1473–1484 (2004).
91. Buzatto, A. Z., Guedes, S. F., Vidotto, L. T., Oliveira, L. C. & Simionato, A. V. C. Development and validation of a micellar electrokinetic capillary chromatographic method for the assessment of nucleosides, potential biomarkers, in blood serum, *J. Brazilian Chem. Soc.* 24, 904–913 (2013).
92. Kuhn, R. & Hofstetter-Kuhn, S. *Capillary electrophoresis: principles and practice*, (Springer-Verlag, New York, NY, 1993).
93. *Handbook of affinity chromatography*, (Ed. Hage, D. S.) (CRC Press, Boca Raton, FL, 2006).
94. Landers, J. P., Oda, R. P. & Schuchard, M. D. Separation of boron-complexed diol compounds using high-performance capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 64, 2846–2851 (1992).
95. Xu, Y. Tutorial: capillary electrophoresis, *Chem. Educ.* 1, 1–14 (1996).
96. Reijenga, J. C., Verheggen, T. P. E. M., Martens, J. H. P. A. & Everaerts, F. M. Buffer capacity, ionic strength and heat dissipation in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 744, 147–153 (1996).
97. Zhao, R., Xu, G., Yue, B., Liebich, H. M. & Zhang, Y. Artificial neural network classification based on capillary electrophoresis of urinary nucleosides for the clinical diagnosis of tumors, *J. Chromatogr. A* 828, 489–496 (1998).
98. Whatley, H. em *Clin. Forensic Appl. Capill. Electrophor.* (Ed. Petersen, J. R. & Mohammad, A. A.) 21– 58 (Humana Press, New York, NY, 2001).
99. *Nucleic acids in chemistry and biology*, (Ed. Blackburn, G. M., Gait, M. J., Loakes, D. & Williams, D. M.) 16 (The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2006).

100. Copper, C. L. Capillary electrophoresis: part I. Theoretical and experimental background, *J. Chem. Educ.* 75, 343 – 347 (1998).
101. Terabe, S. Capillary separation: micellar electrokinetic chromatography, *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto. Calif.)* 2, 99–120 (2009).
102. Introduction to capillary electrophoresis, Beckman Coulter, *Beckman Coulter*
103. Hartwick, R. A., Krstulovic, A. M. & Brown, P. R. Identification and quantitation of nucleosides, bases and other UV-absorbing compounds in serum, using reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 186, 659–676 (1979).
104. Arnett, S. D. & Lunte, C. E. Investigation of the mechanism of pH-mediated stacking of anions for the analysis of physiological samples by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 24, 1745–1752 (2003).
105. Kazarian, A. A., Hilder, E. F. & Breadmore, M. C. Online sample pre-concentration via dynamic pH junction in capillary and microchip electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 34, 2800–2821 (2011).
106. Arnett, S. D. & Lunte, C. E. Enhanced pH-mediated stacking of anions for CE incorporating a dynamic pH junction, *Electrophoresis* 28, 3786–3793 (2007).
107. Breadmore, M. C., Theurillat, R. & Thormann, W. Determination of ribavirin in human serum and plasma by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 25, 1615–1622 (2004).
108. Wang, C. C., Chen, J. L., Chen, Y. L., Cheng, H. L. & Wu, S. M. A novel stacking method of repetitive large volume sample injection and sweeping MEKC for determination of androgenic steroids in urine, *Anal. Chim. Acta* 744, 99–104 (2012).
109. Burgi, D. S. Large volume stacking of anions in capillary electrophoresis using an electroosmotic flow modifier as a pump, *Anal. Chem.* 65, 3726–3729 (1993).
110. Chien, R. L. & Burgi, D. S. On-Column sample concentration using field amplification in CZE, *Anal. Chem.* 64, 489–496 (1992).
111. ANVISA - Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos, RE nº 899, de 29 de maio de 2003, (2003).
112. Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation, (2001).
113. Draft Guideline Bioanalytical method validation, 1–17 (2009).

114. Kimanani, E. K. Bioanalytical calibration curves: proposal for statistical criteria, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16, 1117–1124 (1998).
115. Lee, S. H., Jung, B. H., Kim, S. Y. & Chung, B. C. A rapid and sensitive method for quantitation of nucleosides in human urine using liquid chromatography/mass spectrometry with direct urine injection, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 973–977 (2004).
116. Yang, J. *et al.* Artificial neural network classification based on high-performance liquid chromatography of urinary and serum nucleosides for the clinical diagnosis of cancer, *J. Chromatogr. B* 780, 27–33 (2002).
117. Issaq, H. J. *et al.* Detection of bladder cancer in human urine by metabolomic profiling using high performance liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Urol.* 179, 2422–2426 (2008).
118. Jain, A. K., Duin, R. P. W., Mao, J. & Member, S. Statistical pattern recognition: a review, *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 22, 4–37 (2000).
119. Derde, M. P. & Massart, D. L. Supervised pattern recognition: the ideal method?, *Anal. Chim. Acta* 191, 1–16 (1986).
120. Wold, S., Esbensen, K. & Geladi, P. Principal component analysis, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2, 37–52 (1987).
121. Breiman, L. Random Forests, *Mach. Learn.* 45, 5–32 (2001).
122. Quinlan, J. R. Induction of Decision Trees, *Mach. Learn.* 1, 81–106 (1986).
123. Breiman, L. Bagging Predictors, *Mach. Learn.* 24, 123–140 (1996).
124. Kennard, R. W. & Stone, L. A. Computer Aided Design of Experiments, *Technometrics* 11, 137–148 (1969).
125. Teh, S. K., Zheng, W., Lau, D. P. & Huang, Z. Spectroscopic diagnosis of laryngeal carcinoma using near-infrared Raman spectroscopy and random recursive partitioning ensemble techniques, *Analyst* 134, 1232–1239 (2009).