

Determinação de metabólitos relacionados a porfirias por eletroforese capilar - espectrometria de massas

Nilson A Assunção (PQ)*, Chrislane O Soares (PG), Douglas G Silva (PG), Etelvino J H Bechara (PQ)

nilson@iq.usp.br

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo

Palavras Chave: Eletroforese capilar (CE),

espectrometria de massas (MS), porfirias

Introdução

Metodologias confiáveis para determinação exata e inequívoca de metabólitos oriundos de processos gênicos ou epigênicos tornou-se um desafio em bioquímica clínica. A determinação e dosagem destes produtos têm sido cada vez mais requeridas. Neste trabalho apresentamos um método utilizando eletroforese capilar - espectrometria de massas como ferramenta analítica para quantificação de espécies envolvidas em quadros clínicos de porfirias. As espécies monitoradas foram: 5-aminolevulinico (ALA), porfobilinogênio (PBG), serotonina, triptofano e creatinina.

Resultados e Discussão

As análises foram realizadas em um sistema de CE modelo P/ACE MDQ (Beckman Coulter), utilizando-se capilar de sílica de 50 μm de d.i. e 70 cm de comprimento. O volume de amostra utilizado por injeção foi 40 nL. A separação ocorreu em 300 V cm^{-1} e pressão de 3 psi. O tampão de corrida do sistema de CE foi formiato de amônio 50 mM, pH 4.0. O sistema MS utilizado foi o LCQ Advantage MAX da Thermo, com ionização "electrospray" no modo positivo, analisador de íons do tipo "ion-trap". Usou-se uma interface "sheath-liquid" para conectar os dois sistemas. Condições de análise do MS-ESI: 4.5 kV, temperatura = 275°C, N_2 = 20 unidades.

Na **Figura 1** representa-se a análise simultânea dos metabólitos envolvidos no modelo de doença em estudo. O tempo de corrida foi inferior a 5 min, comprovando o alto poder de separação de CE, o qual está aliado à capacidade de identificação por MS. Nesta análise foram monitorados os íons moleculares, mas o método pode ser usado em tandem, porque os íons moleculares, embora de baixa massa molecular, produzem precursores estáveis.

Além da determinação simultânea do ALA e PBG, biomarcadores de porfirias hepáticas, é possível a dosagem de Trp e serotonina. A análise destes dois compostos é importante uma vez que podem estar envolvidos nas manifestações neurológicas destas porfirias. A dosagem de creatinina é requerida para normalização das concentrações urinárias de metabólitos excretáveis.

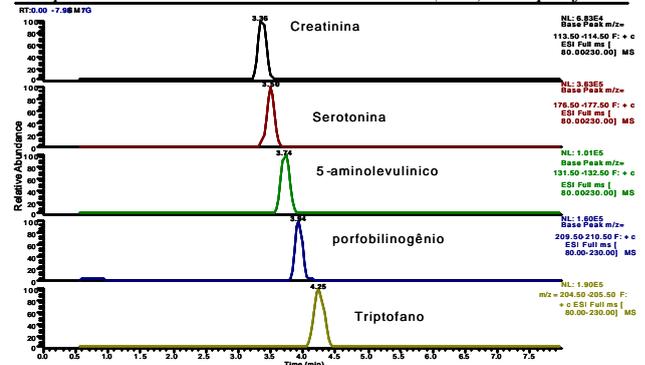


Figura 1. Eletroferograma reconstruído dos metabólitos estudados. Os padrões foram obtidos da Sigma-Aldrich.

Na **tabela 1**, mostram-se os parâmetros analíticos do método.

Tabela 1. Parâmetros analíticos obtidos na determinação de metabólitos para o estudo de porfirias.

Análitos	LOD* $\mu\text{Mol L}^{-1}$	Intervalo de []s	Detectabilidade (pmoles)	R
PBG	1.34	128X	3.02	0.9994
ALA	2.81	128X	7.72	0.9897
Creatinina	4.21	512X	7.32	0.9798
Serotonina	1.76	208X	4.81	0.9609
Triptofano	3.02	128X	3.23	0.9981

* LOD = 3X a linha de base, n = 5.

Conclusões

O método descrito permite determinação simultânea, confiável e direta de metabólitos importantes na investigação dos mecanismos moleculares de desordens porfirínicas, abrindo a possibilidade de seu uso em clínica para diagnóstico. Seu uso em amostras de urina de rato tem confirmado sua utilidade na caracterização de porfiria experimental em ratos tratados com succinilacetona e ALA.

Agradecimentos

Fapesp, CNPQ, Milênio Redoxoma.

I. Stein, J.A.; Tschudy, D. P. Medicine **1970**, 49, 1.

2. Soga, T.; Ueno, Y.; Naraoka, H.; Ohashi, Y.; Tomita, M.; Nishioka, T.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2233.