

## Biomarcadores Tumorais: Desenvolvimento e Comparação de Dois Métodos de Separação para Análise de Nucleosídeos Modificados

Adriana Zardini Buzatto<sup>1</sup> (IC), Rafael Henrique Medeiros<sup>1</sup> (IC), Ana Valéria Colnaghi Simionato<sup>1</sup> (PQ)

\*dri\_buzatto@hotmail.com

<sup>1</sup>Departamento de Química Analítica - Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6154, CEP: 13083-970

Palavras Chave: Eletroforese Capilar, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Biomarcadores Tumorais

### Introdução

Nucleosídeos modificados são metabólitos encontrados livremente em fluidos biológicos, comumente estudados como biomarcadores tumorais. São fragmentos originados de tRNA constituídos por uma base nitrogenada e uma pentose, podendo conter modificações pós-transcricionais como metilação, hidroxilação e isomerização, entre outras<sup>1</sup>.

A eletroforese capilar (CE) é um método de separação bastante aplicado na análise de amostras biológicas, devido à versatilidade, consumo de pouca quantidade de eletrólito (BGE) e de amostra, alta velocidade de análise e alta eficiência. Já a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) apresenta-se como um método bastante consolidado e com sensibilidade e aplicabilidade adequadas para análise destes metabólitos em fluidos biológicos. Neste trabalho, desenvolveu-se métodos de análise destes metabólitos por ambas as técnicas através da otimização de diversos parâmetros experimentais. Ambos os métodos são comparados através de dados como eficiência, tempo de análise, volume de injeção e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), observando-se as características de cada técnica.

### Resultados e Discussão

Utilizou-se padrões de nucleosídeos em soluções aquosas a  $5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> para CE e  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> para HPLC, sendo: timidina (T), 2'-deoxiadenosina (2dA), adenosina (A), citidina (C), N4-acetilcitidina (N4-aC), 1-metiladenosina (1mA), 5-metiluridina (5mU), guanosina (G), inosina (I) e 8-bromoguanosina (8BrG). Um detector UV com arranjo de diodos foi utilizado em ambas as técnicas.

As melhores condições para análise por CE (equipamento HP3DCE da Agilent) foram: BGE: borato 20 mmol L<sup>-1</sup> dodecil sulfato de sódio 300 mmol L<sup>-1</sup> metanol 25% pH 9,2; V: 25 kV; t<sub>inj</sub>: 15s (50 mBar); L<sub>total</sub>: 60 cm; L<sub>efetivo</sub>: 52 cm; i.d.: 50 µm, λ = 260 nm (modalidade de cromatografia micelar eletrocinética capilar). Por HPLC (modelo Shimadzu Prominence UV-DAD SPD-M20A), por sua vez, as melhores condições encontradas foram: Fase A: tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  $1 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> pH 5, Fase B:

metanol/água 70:30 (v:v), vazão: 1 mL min<sup>-1</sup>; λ: 260 nm. A composição da fase móvel foi variada de acordo com gradiente otimizado (dado não apresentado).

Atingiu-se a separação dos padrões injetados por ambos os instrumentos após a otimização de parâmetros analíticos. A Tabela 1 traz dados comparativos obtidos pelos dois métodos. Observa-se que o método desenvolvido por CE resulta em eficiências mais altas, além de menor tempo de análise e volume de amostra injetada. Os valores de LOD e LOQ, por sua vez, são mais baixos utilizando-se HPLC, conforme esperado devido à maior sensibilidade da técnica.

**Tabela 1.** Comparação entre os métodos desenvolvidos por CE e HPLC

Técnica de análise	Eficiência	Tempo total de análise (min)	Volume de amostra (nL)	LOD (10 <sup>-7</sup> mol L <sup>-1</sup> )	LOQ
CE	$9,69 \times 10^4$	17	21,6	31,9 a 229	95,8 a 688
	(C) à				
	$5,71 \times 10^5$				
HPLC	$3,82 \times 10^3$	55	$2,0 \times 10^4$	2 a 3	6 a 9
	(C) a				
	$1,20 \times 10^5$				
	(8-BrG)				

### Conclusões

Ambos os métodos permitem a separação de nucleosídeos modificados e podem ser empregadas na busca por metodologias de detecção precoce de neoplasias malignas. Curvas analíticas para determinação da linearidade estão sendo construídas e a validação de ambos os métodos será feita futuramente em soro sanguíneo de voluntários saudáveis (matriz da amostra real).

### Agradecimentos

À FAPESP, CNPq, Prof. Dr. Jayme Amaya Farfan, Prof. Dra. Susanne Rath e Ricardo Pereira (Laboratório de Cromatografia Líquida IQ-UNICAMP).

<sup>1</sup> Ma, Y.; Liu, G.; Du, M.; Stayton, I. *Electrophoresis* **2004**, 25, 1473.