

# Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação de ALA e PBG em amostras biológicas utilizando cromatografia líquida.

Adriana Rodrigues Silva\* (IC), Etelvino J. H. Bechara (PQ), Nilson A. Assunção (PQ)

\*adriana.silva@unifesp.br

Departamento de Ciências Exatas e da Terra (DCET) – UNIFESP

Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas - Universidade Federal de São Paulo  
R. Prof. Artur Ridell, 275 - Jd Eldorado - Diadema - SP

Palavras Chave: ALA, PBG, cromatografia, porfiria

## Introdução

O chumbo possui grande afinidade a grupos sulfidrílicos presentes em enzimas e proteínas, alterando suas atividades. A presença deste metal pesado pode estar relacionada à inibição da biossíntese do grupo heme, atuando como inibidor da enzima delta-aminolevulinato desidratase, a qual catalisa a condensação de duas moléculas de ácido delta-aminolevulinico (ALA) produzindo uma molécula de porfobilinogênio (PBG).

A deficiência na biossíntese do grupo heme leva o aumento da excreção urinária de ALA e PBG, durante as fases agudas da doença causada pela contaminação. Assim, visando à massiva presença de ambos os metabólitos (ALA e PBG) em casos de contaminação por chumbo (porfiria induzida), foi desenvolvido um método analítico capaz de separá-los e quantificá-los em amostras biológicas. E desta forma futuramente poder realizar um mapeamento da contaminação efetiva de uma população e de seus efeitos sob os aspectos metabólicos.<sup>1</sup> Este método também poderá ser empregado para avaliação de porfiria genética.

## Resultados e Discussão

O método de separação de ALA e PBG foi desenvolvido através da utilização de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Devido os dois metabólitos estudados não possuírem propriedades fluorescente foi utilizado um processo de derivatização dos analitos, onde os mesmos reagem com uma molécula que fluoresce naturalmente, o-ftalaldialdeido (OPA), formando um aduto fluorescente.

A validação do método foi conduzida segundo a ANVISA (RE nº 899, de 29 de maio de 2003). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e precisão intra-corrída. Os parâmetros avaliados estão apresentados nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1:** Resultados referentes a avaliação de linearidade, LD e LQ dos analitos ALA e PBG

	ALA	PBG
Eq. Da reta	$y = 1,16x + 0,00393$	$y = 19,25x + 0,03444$
R <sup>2</sup>	0,99697	0,98846
LD	5,46 µM	18,21 µM
LQ	0,42 µM	1,39 µM

Foram levantadas as curvas de calibração apresentando as seguintes faixa de linearidade para ALA e PBG, 0,032-3,2 mM e 0,0018-0,18 mM, respectivamente. São apresentadas suas respectivas equações da reta, as quais o coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) é maior que 0,98, indicando linearidade significativa do método. Os valores de LD e LQ demonstram que o método é eficiente para a detecção e quantificação dos mesmos para a identificação de desordens relacionadas à deficiência na biossíntese do grupo heme.

**Tabela 2:** Determinação da precisão intra-corrída do método analítico para a quantificação ALA e PBG

ALA		PBG	
[ ] µM	CV	[ ] µM	CV
32,0	5,67%	1,8	3,87%
320,0	4,41%	18,0	3,00%
1.600,0	10,42%	180,0	2,10%

Para um método bioanalítico ser considerado preciso a ANVISA determina que o coeficiente de variação intra-corrídas não ultrapasse 15 %. Os coeficientes de variação possuem valores inferiores ao limite determinado, desta forma a precisão do método para quantificação de ALA e PBG mostra-se satisfatória.

## Conclusões

O método analítico de separação desenvolvido mostrou-se eficiente através dos parâmetros avaliados. No futuro poderá ser utilizado como uma ferramenta para mapear a contaminação de chumbo em uma população, bem como porfirias genéticas.

## Agradecimentos

FAPESP, CNPq e INCT Redoxoma.

<sup>1</sup> Needleman, H. Lead Poisoning. *Annu Rev Med.* 2004; 55: 209-22