

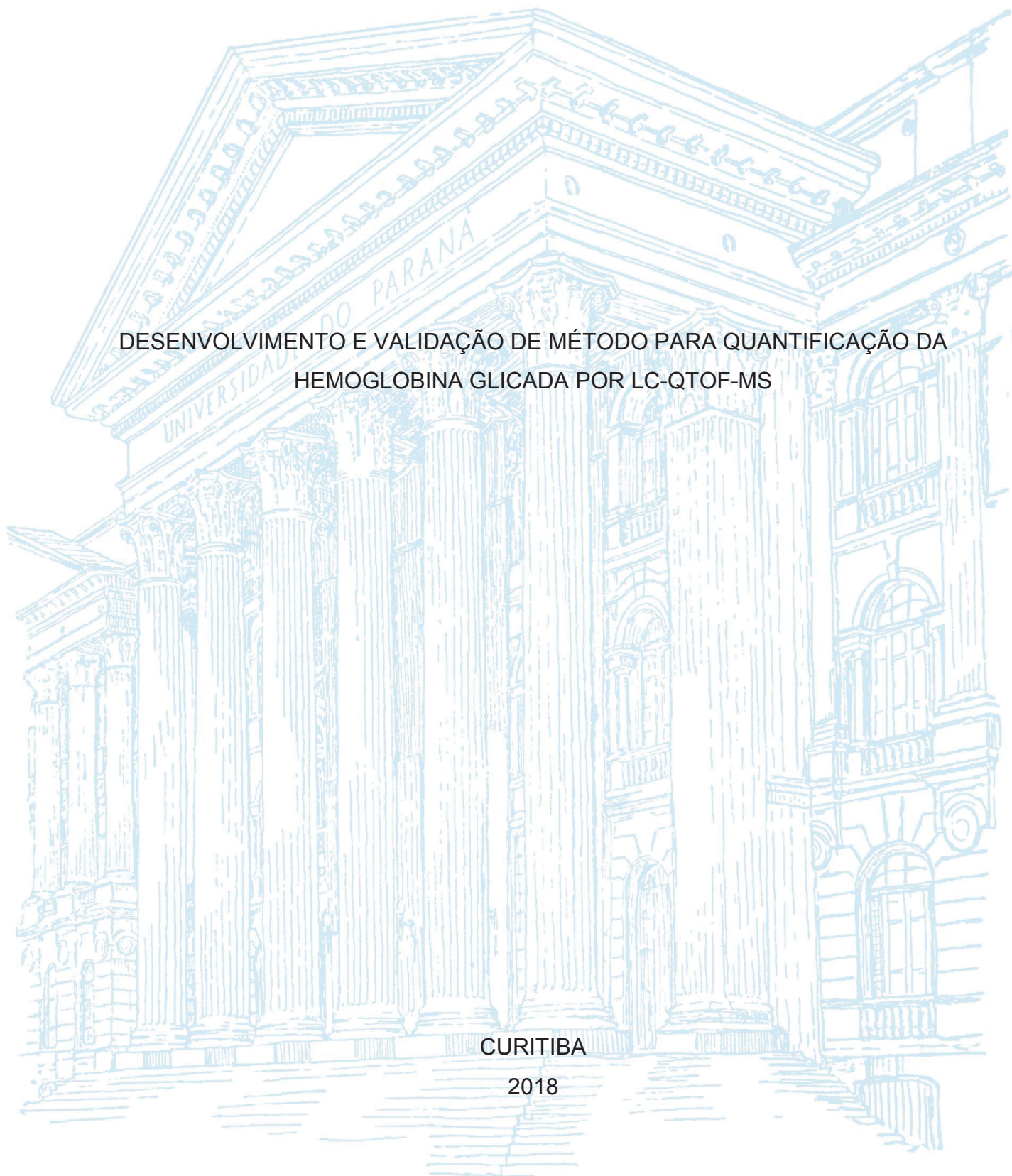
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETICIA BONANCIO CERQUEIRA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DA
HEMOGLOBINA GLICADA POR LC-QTOF-MS

CURITIBA

2018



LETICIA BONANCIO CERQUEIRA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DA
HEMOGLOBINA GLICADA POR LC-QTOF-MS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA

2018

Cerqueira, Leticia Bonancio
Desenvolvimento e validação de método para quantificação da hemoglobina glicada por LC-QTOF-MS / Leticia Bonancio Cerqueira – Curitiba, 2018.
135 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo
Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde.
Universidade Federal do Paraná.

Inclui referência

1. Hemoglobina glicada. 2. Peptídeos. 3. Cromatografia. 4. Espectrometria de massas. I. Pontarolo, Roberto.
II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de LETICIA BONANCIO CERQUEIRA intitulada: **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA POR LC-QTOF-MS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 23 de Abril de 2018.

ROBERTO PONTAROLO
Presidente da Banca Examinadora

MICHEL LEANDRO DE CAMPOS
Avaliador Externo

MARCO ANDRÉ CARDOSO
Avaliador Externo

ALAN GUILHERME GONÇALVES
Avaliador Interno

DAYANE ALBERTON
Avaliador Interno

Aos meus pais, *Jorge Mendes Perqueira e Selma Bonancio Perqueira*, por todo amor e carinho, por serem meus primeiros e mais amados mestres.

Ao *Artur Vitor Dembiski*, pela paciência, pela alegria, pela disposição, pela preocupação, por todo amor, com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho, doaram seu tempo e conhecimento sem nada esperar em troca. Muito obrigada, sem vocês não seria possível.

Aos meus pais, Jorge e Selma, meus irmãos, Fernando e Diego e meu sobrinho Augusto, pela riqueza do dia-a-dia, pela segurança e alegria de ter vocês sempre comigo.

Ao Artur Vitor Dembiski, por toda paciência, carinho e incentivo. Pelo amor e dedicação, imprescindíveis para mim. Com certeza a melhor pessoa que eu conheço e que poderia ter ao meu lado.

À toda família Dembiski, Élio, Selma, Ana e Alberto, por me acolherem como família, por compartilhar momentos maravilhosos e pelo incentivo constante à pesquisa

Aos meus grandes amigos Tracy Reinaldet, Ricardo Almeida, Eduardo Raizer, Renato Agottani e Ana Lis Jurgensen, que com certeza me motivaram muito. Lembrando que a felicidade está em tradicionalmente compartilhar momentos com os bons amigos.

Aos amigos do laboratório Flávia, João Gasparetto, Michel, Raquel, Breno e todos que passaram por lá nesses quatro anos, por estarem sempre dispostos e contribuírem sempre, cada um à sua maneira, seja cientificamente ou não, sempre tornando o trabalho melhor e mais divertido.

Aos amigos do laboratório de Controle de Qualidade e de Atenção Farmacêutica que, apesar de nem sempre estarmos juntos, somos uma equipe, torcendo pelo sucesso uns dos outros e ajudando no que for possível.

Aos novos amigos do laboratório INTECSO, Paula, Carlos, Fernanda, Gabriela, Luíz, Ana Cláudia, Robson, André e Caio pela oportunidade de aprender um pouco mais sobre a rotina de um centro de tecnologia avançada e pela amizade incrível de todos.

Aos amigos Estevan, Tatiana, Jane, Jaqueline, Letícia, meus amigos do laboratório de Física Industrial (labullyn). Por toda ajuda, parceria e cantorias desses anos.

À prof. Dr^a Francinete Ramos Campos, pelos ensinamentos valiosos sobre a pesquisa. Pela paciência, pelo tempo e esforços dedicados à ciência, sem nunca se deixar abater. Pela amizade de sempre, por acreditar em mim e por me apresentar o mundo mágico da espectrometria de massas.

À Mariana Fachi e Wilton Kawaguchi meus grandes amigos nessa jornada árdua que com vocês foi muito mais feliz. Por toda ajuda, apoio e principalmente pela amizade que levarei para vida toda.

Ao Laboratório LANAC, principalmente à farmacêutica Daniele Guimarães Cerqueira por se disponibilizar a colaborar nessa pesquisa na separação de amostras e resultados de hemoglobina glicada.

Ao pessoal do Laboratório Escola de Análises Clínicas da UFPR (LEAC), em especial prof. Railson Henneberg, pela disponibilização dos equipamentos e estrutura que foram essenciais para esse trabalho para realização de ensaios parciais.

Aos professores da banca Michel Leandro de Campos, Dayane Alberton, Marco André Cardoso e Alan Guilherme Gonçalves, exemplos na área acadêmicos e amigos pessoais, pela dedicação nas correções e contribuições enriquecedoras à versão final do trabalho

E ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo por dedicar-se por completo a Universidade que mesmo com todas as responsabilidades e tantos orientados, preocupa-se com cada um deles. Por possibilitar o desenvolvimento científico de muitas pessoas, inclusive o meu. Com muito carinho, muito obrigada.

Às instituições CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro

Enfim, a todos que contribuíram da alguma forma e torceram pelo sucesso desse trabalho,

Muito obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

A hemoglobina glicada (HbA1c) é o atual biomarcador de referência para monitorar o controle e diagnóstico do diabetes, pois é capaz de fornecer informações dos níveis glicêmicos a longo prazo. Valores elevados de HbA1c estão associados à muitas complicações do diabetes. Devido a sua importância clínica, vários métodos foram desenvolvidos para a quantificação de HbA1c, utilizando diferentes princípios. Porém, dependendo do método utilizado, os resultados podem variar, podendo gerar dúvidas quanto ao diagnóstico e controle da doença. Nesse sentido, há necessidade de se investir no desenvolvimento de métodos utilizando técnicas modernas, que sejam mais precisos e exatos. Desta forma, este trabalho visou desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução para quantificação da hemoglobina glicada em sangue humano. Para o desenvolvimento do método, amostras de sangue foram coletadas, centrifugadas e o plasma descartado. As células restantes foram tratadas para análise e hemolisadas com 1 mL de água milli-Q. Alíquota contendo 0,5 mg de hemoglobina foi submetida a digestão enzimática, utilizando Glu-C e tripsina. Para cada alíquota foram adicionados 50 µL de solução da enzima selecionada e tampão, em quantidade necessária para atingir volume final de 500 µL. A mistura foi mantida a 37°C durante 18 horas. Após o período de digestão, as amostras foram congeladas a -40°C por 12 horas e então descongeladas, diluídas e injetadas no UPLC-QTOF-MS. As análises foram realizadas utilizando o cromatógrafo UPLC Acquity H-Class Waters Co. Ultra Performance acoplado ao espectrômetro de massas híbrido Quadrupolo - Tempo de voo (Xevo G2-S), com fonte de ionização por electrospray, operado no modo positivo de ionização. Os peptídeos VHLTPE m/z 695,373 e glu-VHLTPE m/z 857,426, obtidos via digestão por glu-C, foram selecionados para a quantificação de HbA1c (%), representando a porção N-terminal da cadeia beta. A separação cromatográfica foi obtida em coluna Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm), mantida a 40°C. A fase móvel foi composta por água (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,02% de TFA e 0,1% de ácido acético, eluídos em modo gradiente. O fluxo foi de 0,50 ml/min e o volume de injeção foi de 5 µL. O método desenvolvido foi capaz de detectar hemoglobina glicada no sangue humano, via análise de peptídeos, com alta resolução de massa e sem interferência de matriz. O método foi totalmente validado, sendo considerado linear na faixa de 4,4% a 11,9% de HbA1c, sensível, seletivo, preciso, exato e livre de efeitos residuais e de matriz. O método foi aplicado com sucesso em amostras de 15 pacientes com diabetes, alcançando cerca de 90% de concordância com os resultados do método de referência. O método desenvolvido forneceu informações precisas e exatas sobre a massa do peptídeo, sem preparação laboriosa da amostra. Estes resultados sustentam o uso desta técnica para melhorar a qualidade dos resultados da hemoglobina glicada nos serviços de saúde e demonstram uma possível aplicação da investigação de peptídeos para análises clínicas em um futuro próximo.

Palavras chave: hemoglobina glicada, peptídeos, cromatografia, espectrometria de massas

ABSTRACT

Glycated hemoglobin (HbA1c) is the current gold standard biomarker to monitor the diabetes control, representing long-term plasma glycemic levels. It has been associated with many complications of diabetes. Due to its clinical importance, several methods were developed for HbA1c quantification, using different principles. Most of them are based on the charge difference between HbA1c and HbA0, such as affinity chromatography and immunochemical methods. The results obtained with these techniques may differ according to the method adopted; hence, there is a great need and effort to standardize the current methods to quantify glycated hemoglobin. New methods, with the aid of modern techniques, faster and more accurate, should be developed. On this way, this work aims to develop and validate a UPLC-QTOF-MS method for quantification of glycated hemoglobin in human blood. The blood samples were collected, centrifuged and the plasma was discarded. The remaining cells were treated for analysis and hemolyzed with 1 mL of milli-Q water. An aliquot containing 1 mg of total hemoglobin was taken to enzymatic digestion. Glu-C and trypsin were evaluated as digestion enzymes. To each aliquot was add 50 μ L of selected enzyme solution and completed to a final volume of 500 μ L with adequate buffer. The mixture was maintained at 37°C for 18 hours. After the period of digestion, the samples were frozen at -40°C thawed, diluted and injected on UPLC-QTOF-MS. Analyzes were performed using Ultra Performance Liquid Chromatography Acquity H-Class Waters Co. (Milford, USA) coupled to mass spectrometry Quadrupole – Time of Flight (Xevo G2-S, Waters, Milford, USA), provided with electrospray ionization source (ESI) operated in the positive ion mode. VHLTPE m/z 695.373 and glu-VHLTPE m/z 857.426, obtained via glu-C digestion, were the selected peptides to quantification of HbA1c (%), representing the N-terminal of beta chain. Chromatographic separation was obtained in an Acquity UPLC® BEH C18 column (50 x 2.1 mm, 1,7 μ m), maintained at 40°C. The mobile phase was composed of water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.02% TFA and 0.1% acetic acid; eluted in gradient mode. The flow rate was 0.50 mL/min and the injection volume was 5 μ L. The developed method was capable of detect hemoglobin and glycated hemoglobin in human blood, via peptide analyzes, with high mass resolution and no matrix interference. The method was fully validated, being considered linear in the range of 4.4% to 11.9% of HbA1c, sensitive, selective, precise, accurate and free of matrix and carryover effects. The method was successfully applied to real samples from 15 patients with diabetes, reaching about 90% of agreement with reference method results. provided accurate and precise information on peptide mass, without laborious sample preparation. These results support the use of this technique to improve the quality of results of glycated hemoglobin in health services and demonstrate a possible application of peptide investigation for clinical analysis in the near future.

Keywords: Glycated hemoglobin, peptide, chromatography, mass spectrometry

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1. RELAÇÃO ENTRE A MASSA DO ÍON E SUA VELOCIDADE CINÉTICA	43
EQUAÇÃO 2. FÓRMULA PARA CÁLCULO DO FATOR MATRIZ NORMALIZADO	58
EQUAÇÃO 3. FÓRMULA PARA CÁLCULO DO DESVIO PADRÃO RELATIVO	60
EQUAÇÃO 4. FÓRMULA PARA CÁLCULO DO ERRO PADRÃO RELATIVO	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DE AGES.	26
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA HEMOGLOBINA GLICADA...	29
FIGURA 3. RELAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA (HbA1c) E RISCO DE COMPLICAÇÕES MICROVASCULARES.	30
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MIGRAÇÃO DIFERENCIAL EM FUNÇÃO DA CARGA NA HEMOGLOBINA GLICADA	31
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO	32
FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MÉTODOS BASEADOS NA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE PELO ÁCIDO BORÔNICO	33
FIGURA 7. EXEMPLO DE ACOMPANHAMENTO DE PACIENTE APÓS AFERIÇÕES A CADA 3 MESES E ESQUEMA PARA CONVERSÃO DE UNIDADES DA HbA1c	35
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DE ESPECTRO DE MASSAS DA PROTEÍNA INSULINA.....	39
FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ANALISADOR DE MASSAS QUADRUPOLO.....	42
FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ANALISADOR DE MASSAS POR TEMPO DE VOÔ.....	44
FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM MULTIPLICADOR DE ELÉTRONS.....	45
FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO DOS SÍTIOS ESPECÍFICOS PARA DIGESTÃO ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS.....	50
FIGURA 13. ESPECTRO DE MASSAS MS E ESTRUTURA QUÍMICA DE PEPTÍDEO EXEMPLO, MONOPROTONADO.....	51
FIGURA 14. REPRESENTAÇÃO DE ESPECTRO DE MASSAS DE PEPTÍDEO MULTIPROTONADO	52
FIGURA 15. EXEMPLO DE ESPECTRO DE MASSAS DE FRAGMENTAÇÃO (MS/MS) DE PEPTÍDEO	53

FIGURA 16. REPRESENTAÇÃO DA DIGESTÃO ENZIMÁTICA DA MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA (PORÇÃO N-TERMINAL DA CADEIA BETA), GLICADA E NÃO GLICADA, ATRAVÉS DA ENZIMA GLU-C E TRIPSINA.....	65
FIGURA 17. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE PEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS DIGESTÃO POR TRIPSINA	75
FIGURA 18. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE PEPTÍDEOS DA HEMOGLOBINA, OBTIDOS APÓS DIGESTÃO POR GLU-C	77
FIGURA 19. ESPECTRO DE MASSAS DE BAIXA ENERGIA DO PEPTÍDEO TRÍPTICO TP2 β (VHLTPEEK).....	78
FIGURA 20. ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA ENERGIA DO PEPTÍDEO TP2B (VHLTPEEK) E SEUS PRINCIPAIS FRAGMENTOS B E Y.	78
FIGURA 21. ESPECTRO DE MASSAS DO PEPTÍDEO GP2 β (VHLTPE), APÓS DIGESTÃO POR GLU-C.....	79
FIGURA 22. ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA ENERGIA DO PEPTÍDEO TRÍPTICO TP2 β (VHLTPEEK) E SEUS PRINCIPAIS FRAGMENTOS B E Y.	80
FIGURA 23. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DIGESTÃO COM GLU-C E TRIPSINA DA HEMOGLOBINA GLICADA	81
FIGURA 24. CROMATOGRAMAS DOS PEPTÍDEOS GLICADO E NÃO GLICADO OBTIDOS DA DIGESTÃO POR GLU-C E TRIPSINA E RAZÃO DE ÁREA ENTRE OS PICOS	82
FIGURA 25. CROMATOGRAMA TOTAL OBTIDO DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO FORTIFICADA COM HbA1c (11,9%).....	85
FIGURA 26. CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DO PEPTÍDEO GLU-VHLTPE (<i>m/z</i> 857,426) OBTIDO DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO FORTIFICADA COM HbA1C (11,9%).....	86
FIGURA 27. CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DO PEPTÍDEO VHLTPE (<i>m/z</i> 695,373) OBTIDO DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO FORTIFICADA COM HbA1C (11,9%).....	86

FIGURA 28. SOBREPOSIÇÃO DAS RETAS OBTIDAS DE SEIS FONTES DISTINTAS DE MATRIZ E SEUS RESPECTIVOS DADOS ESTATISTICOS	88
FIGURA 29. CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DAS MASSAS RELATIVAS AO PEPTIDEO GLICADO E NÃO GLICADO DAS INJEÇÕES DOS BRANCO, LSQ E BRANCOS.....	89
FIGURA 30. CROMATOGRAMAS TOTAIS DAS INJEÇÕES DOS BRANCOS E LIMITE SUPERIOR DE QUANTIFICAÇÃO E BRANCOS.....	90
FIGURA 31. CURVA DE CALIBRAÇÃO da HbA1c, 1º DIA.	93
FIGURA 32. CURVA DE CALIBRAÇÃO da HbA1c, 2º DIA.	94
FIGURA 33. CURVAS DE CALIBRAÇÃO da HbA1c, 3º DIA.	95
FIGURA 34. DEMONSTRAÇÃO DE CÁLCULOS DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ANALÍTICA.....	111

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PELOS MÉTODOS LC-QTOF-MS, KIT COMERCIAL (TROCA IÔNICA) E NGCP, NA FAIXA 4% A 7,5% DE HbA1c.....	106
GRÁFICO 2. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PELOS MÉTODOS LC-QTOF-MS, KIT COMERCIAL (TROCA IÔNICA) E NGCP, COM TODAS AS AMOSTRAS.	107
GRÁFICO 3. DIVISÃO DOS ERROS NO MÉTODO LC-QTOF-MS.....	108
GRÁFICO 4. DIVISÃO DOS ERROS NO MÉTODO LC-QTOF-MS.....	108
GRÁFICO 5. DISTRIBUIÇÃO DOS ERROS POSITIVOS E NEGATIVOS NA METODOLOGIA POR TROCA IÔNICA	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DE HbA1c NA CURVA DE CALIBRAÇÃO.	67
TABELA 2. PERFIL PEPTÍDICO DE HbA1c OBTIDO APÓS DIGESTÃO TRÍPTICA.	74
TABELA 3. PERFIL PEPTÍDICO DE HbA1c OBTIDO APÓS DIGESTÃO COM GLUC.	76
TABELA 4. PARAMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO DE MASSA.	83
TABELA 5. RESULTADO DAS ANÁLISES DE EFEITO MATRIZ.	91
TABELA 6. COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES CALCULADAS EM MATRIZ E EM SOLUÇÃO.	92
TABELA 7. LINEARIDADE 1º DIA.	93
TABELA 8. LINEARIDADE 2º DIA.	94
TABELA 9. LINEARIDADE 3º DIA.	95
TABELA 10. PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA, 1º DIA.	96
TABELA 11. PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA, 2º DIA.	96
TABELA 12. PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA, 3º DIA.	97
TABELA 13. PRECISÃO E EXATIDÃO INTERCORRIDAS.	97
TABELA 14. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PÓS PROCESSAMENTO.	99
TABELA 15. RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE CURTA DURAÇÃO.	100
TABELA 16. RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PÓS CICLO DE CONGELAMENTO.	101
TABELA 17. RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE LONGA DURAÇÃO.	102
TABELA 18. RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO, PÓS-PREPARATIVA, APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO E DE LONGA DURAÇÃO.	103

TABELA 19. RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO DE HBA1C EM AMOSTRAS REAIS PELO MÉTODO DE REFERENCIA, MÉTODO DESENVOLVIDO LC-QTOF-MS E MÉTODO KIT TROCA IÔNICA.....	105
---	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	OBJETIVO GERAL	20
1.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	DIABETES	22
2.1.1	Definição, classificação e epidemiologia	22
2.1.2	Fisiopatologia	24
2.1.3	Diagnóstico e controle do DM	27
2.2	HEMOGLOBINA E HEMOGLOBINA GLICADA	28
2.2.1	Definições e conceitos	28
2.2.2	Métodos de quantificação de hemoglobina glicada	30
2.2.3	Padronização dos métodos	33
2.3	ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR LC-MS	36
2.3.1	Análise de proteínas por LC-MS	36
2.3.2	Detector e sistema de aquisição de dados	44
2.4	PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE DE PROTEÍNAS	46
2.4.1	Digestão enzimática	47
2.4.2	Seleção da protease	47
2.4.3	Digestão enzimática	48
2.5	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DE ANÁLISE DE PROTEÍNAS	50
2.5.1	Análise cromatográfica	50
2.5.2	Análise espectrométrica	51
2.5.3	Análise de dados de validação	53
2.6	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS	54
2.6.1	Seletividade	55
2.6.2	Controle de Qualidade	56
2.6.3	Efeito residual (<i>Carryover</i>)	57
2.6.4	Efeito Matriz	58

2.6.5	Curva de calibração.....	59
2.6.6	Precisão.....	60
2.6.7	Exatidão.....	61
2.6.8	Estudo de Estabilidade	61
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	63
3.1	OBTENÇÃO DOS PADRÕES ANALÍTICOS E SOLVENTES	63
3.2	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SANGUE	63
3.3	PROCEDIMENTO DE DIGESTÃO ENZIMÁTICA	63
3.3.1	Protocolo de digestão da hemoglobina e seleção da enzima.....	63
3.3.2	Digestão do padrão HbA1c.....	65
3.3.3	Preparo das amostras de validação do método (matriz de validação)	65
3.4	INSTRUMENTAÇÃO	66
3.5	OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	66
3.6	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	67
3.7	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	67
3.7.1	Seletividade	68
3.7.2	Efeito Residual (<i>Carryover</i>)	68
3.7.3	Efeito Matriz.....	69
3.7.4	Curva de calibração e Controles de Qualidade	69
3.7.5	Precisão e Exatidão.....	70
3.7.6	Estudo de Estabilidade	70
3.8	APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PACIENTES DIABÉTICOS.....	72
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1	PROTOCOLO DE DIGESTÃO E SELEÇÃO DA ENZIMA.....	73
4.2	OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	82
4.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	87
4.3.1	Seletividade	87
4.3.2	Efeito Residual (<i>Carryover</i>)	88
4.3.3	Efeito Matriz.....	91

4.3.4	Curva de calibração.....	92
4.3.5	Precisão e Exatidão.....	95
4.3.6	Estudo de Estabilidade.....	97
4.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PACIENTES DIABÉTICOS.....	104
5	CONCLUSÃO.....	113
	REFERÊNCIAS.....	115
	APÊNDICE 1. LISTA DE PEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS DIGESTÕES <i>IN SILICO</i> DA HEMOGLOBINA (α, β) POR GLU-C.....	123
	APÊNDICE 2. LISTA DE PEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS DIGESTÕES <i>IN SILICO</i> DA HEMOGLOBINA (α, β) POR TRIPSINA.....	126
	ANEXO 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO....	129
	ANEXO 2. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - UFPR.....	131
	ANEXO 3. RECOMENDAÇÕES DE USO - KIT GLICOHEMOGLOBINA MONOTESTE INLAB.....	134

1 INTRODUÇÃO

O diabetes é um grupo de doenças crônicas metabólicas caracterizadas por hiperglicemia e associadas a disfunções e insuficiência de vários órgãos (ADA, 2018; SBD, 2015; WHO, 2016). Trata-se da terceira causa de mortalidade prematura no mundo e no Brasil está entre as dez maiores causas de mortalidade (DATASUS, 2018; IDF, 2017; WHO, 2009). O controle da glicemia reduz de forma significativa as complicações do diabetes mellitus (DM). Assim, métodos que avaliem a frequência e a magnitude da hiperglicemia, são essenciais para o acompanhamento do DM, visando ajustes no tratamento e a prevenção das complicações (SBD, 2018).

A medida da hemoglobina glicada (HbA1c) permite avaliar o controle glicêmico a longo prazo, pois representa uma média ponderada da glicemia nos últimos 60 a 90 dias (NETTO et al., 2009; WHO, 2011). Recentemente, valores de HbA1c maior ou igual que 6,5% passaram a ser reconhecidos como um dos critérios para o diagnóstico de DM (SBD, 2018; WHO, 2011). Estudos indicam que as complicações crônicas se intensificam quando os níveis de HbA1c estão situados permanentemente acima de 7% (SBD, 2015). Sendo assim, a manutenção do nível de HbA1c abaixo de 7% é atualmente considerada como uma das principais metas no controle do diabetes (ADA, 2018; SBD, 2018; WHO, 2016).

Diferentes métodos para a quantificação de HbA1c estão disponíveis atualmente (CAMARGO; GROSS, 2004; WEYKAMP, JOHN; MOSCA, 2009). Estes diferem em níveis de sensibilidade e seletividade, o que acaba conduzindo à variação de resultados em função da técnica analítica selecionada (GILLERY, GUILLEMIN; DELPECH, 1994; LEE, SZETO; BENZIE, 2002; MOSCA et al., 2015). Existe no momento uma grande mobilização no sentido de se padronizar os métodos disponíveis. De acordo com o *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC), a técnica indicada para o doseamento da hemoglobina glicada é a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), com analisador quadrupolo (JEPPSSON et al., 2002). Devido à alta massa molecular da hemoglobina, é recomendada a realização da digestão proteica para a obtenção de peptídeos de baixa massa molecular, uma alternativa vantajosa para a análise por LC-MS (MAYNE et al., 2016). A análise peptídica é uma estratégia atual aplicada com

sucesso em muitas abordagens clínicas, como biomarcadores para classificação (RAJAPAKSE, DUAN; YEO, 2005), diagnóstico (ANAND et al., 2017) e monitoramento (WU et al., 2007) de diversas patologias.

Apesar dos métodos baseados na espectrometria de massas já oferecerem maior seletividade, o analisador do tipo quadrupolo apresenta limitações em relação à baixa resolução de massas, o que pode comprometer a identificação do analito. Nesse sentido, a espectrometria de massa de alta resolução (LC-QTOF-MS) oferece vantagens significativas, como ferramenta analítica capaz de fornecer informações sobre a estrutura molecular com a precisão e exatidão necessária aos métodos clínicos. (AEBERSOLD; MANN, 2003; CRAVATT, SIMON; YATES, 2007; PASIN et al., 2017; YORK et al., 2010).

Uma vez que os métodos disponíveis, apresentam baixa seletividade para detecção da hemoglobina glicada, podendo comprometer o diagnóstico e o acompanhamento do diabetes, novas tecnologias capazes de proporcionar resultados precisos e confiáveis são necessárias. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-QTOF-MS), para quantificação de hemoglobina glicada, visando comparar os diferentes métodos disponíveis comercialmente.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método por UPLC-QTOF-MS para quantificação de hemoglobina glicada em amostras de sangue.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar um método de preparo de amostra de sangue para análise de hemoglobina glicada por UPLC-QTOF-MS;

- Desenvolver um método por UPLC-QTOF-MS para análise de hemoglobina glicada e validá-lo de acordo com guias e legislações nacionais e internacionais vigentes;
- Aplicar o novo método desenvolvido na quantificação de hemoglobina glicada em amostras de pacientes diabéticos e controles.
- Comparar o resultado obtido pelo novo método com os resultados de métodos disponíveis comercialmente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DIABETES

2.1.1 Definição, classificação e epidemiologia

O termo “diabetes mellitus” descreve um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia, que é o resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambas. Os efeitos do diabetes incluem danos a longo prazo, relacionados a alterações nos grandes e pequenos vasos sanguíneos (doença arteriosclerótica cardiovascular) e nos nervos, e consequente disfunções e insuficiência de vários órgãos (ADA, 2018; WHO, 2016).

A classificação do DM tem sido realizada de acordo com sua etiologia, porém os fatores causais dos principais tipos de DM – genéticos, biológicos e ambientais – ainda não são completamente conhecidos (SBD, 2018). A classificação atual, segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, inclui quatro subtipos: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), DM gestacional, e outros tipos específicos de DM (ADA, 2018; SBD, 2018).

O DM1, correspondente de 5% a 10% dos casos, estando relacionado a destruição de células beta pancreáticas com consequente deficiência de insulina. Pode ser subdividido em DM-1A e DM-1B. O DM-1A é a forma mais frequente de DM1, no qual o diagnóstico pode ser confirmado pela presença de autoanticorpos (SBD, 2018), enquanto que o DM-1B apresenta deficiência de insulina de natureza idiopática. O DM-1A apresenta forte associação com o antígeno leucocitário humano (HLA) DR3 e DR4, envolvendo fatores genéticos associados a fatores ambientais responsáveis por desencadear uma resposta autoimune contra as células produtoras de insulina (TEDDY, 2008).

O DM2, presente em 90% a 95% dos casos de diabetes, caracteriza-se por defeitos na ação e/ou secreção da insulina. Apresenta etiologia multifatorial, combinando fatores genéticos e ambientais. Trata-se de uma patologia fortemente influenciada por hábitos alimentares e atividade física, devido à associação destes fatores à obesidade, esta é um dos principais fatores de risco para o

desenvolvimento do DM2 (ADA, 2018; SBD, 2018; WHO, 2016). No DM2, a hiperglicemia persistente está vinculada a resistência na ação da insulina e diversas alterações no metabolismo de carboidratos e ácidos graxos. Diferentemente do DM1, não apresenta marcadores específicos e, em aproximadamente 90% dos casos, está associada ao sobrepeso e síndrome metabólica (CHATTERJEE, KHUNTI; DAVIES, 2017).

O diabetes gestacional foi por muito tempo definido como qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação (DIABETES, 2015). Porém, recentemente com o aumento de casos de DM2 não diagnosticado, muitas mulheres passaram a ter o diagnóstico após o exame pré-natal, porém não associada às alterações metabólicas decorrente da gravidez. Por este motivo, mulheres com diagnóstico de diabetes durante o primeiro trimestre de gestação devem ser classificadas como portadoras de diabetes mellitus preexistentes. Após o primeiro trimestre, mulheres grávidas estão sujeitas a novos limites mais rígidos quanto a glicemia. Valores acima de 92 mg/dL são estabelecidos como diagnóstico positivo de diabetes gestacional (ADA, 2018; INTERNATIONAL ASSOCIATION OF DIABETES PREGNANCY STUDY GROUPS CONSENSUS PANEL et al., 2010; SBD, 2018). Assim como o DM2, o DM gestacional está associado tanto à resistência à insulina quanto à diminuição da função das células beta (SBD, 2018).

Pertencem a classificação de “outros tipos específicos de DM” formas menos comuns de DM cujos defeitos ou processos causadores podem ser identificados. Estão incluídos nessa categoria defeitos genéticos na função das células beta (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*, MODY), defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, diabetes induzido por medicamento ou agentes químicos, infecções, formas incomuns de DM autoimune e outras síndromes genéticas associadas ao DM.

A hiperglicemia persistente está associada a complicações crônicas micro e macrovasculares, aumento de morbidade, redução da qualidade de vida e elevação da taxa de mortalidade (WHO, 2016). Atualmente existem em torno de 425 milhões de casos de diabetes no mundo, aproximadamente 8,8% de toda população mundial (IDF, 2017). Somente no ano de 2017, as despesas de saúde relacionadas ao

diabetes ultrapassaram os 727 bilhões de dólares, aproximadamente 12% de todo investimento mundial em saúde (IDF, 2017). A Organização Mundial da Saúde estima que a glicemia elevada é o terceiro fator causa de mortalidade prematura, superada apenas por hipertensão e fumo (WHO, 2009). No Brasil, aproximadamente 13,3 milhões de pessoas são diabéticas, uma prevalência de 8,7% da população, sendo o diabetes a causa de mais de 140 mil mortes em 2017 (IDF, 2017).

2.1.2 Fisiopatologia

Como foi apresentado, o diabetes é uma doença multifatorial caracterizada pelo aumento persistente nos níveis glicêmicos. Suas complicações fisiológicas também são múltiplas. No caso do DM1, a destruição das células beta leva a deficiência de insulina, o que resulta em distúrbios metabólicos associados a hiperglicemia. Além disso, a função de células alfa também é alterada, levando a um excesso de secreção do hormônio glucagon, contribuindo também para a disfunção metabólica gerada (OZOUGWU et al., 2013). A maioria das manifestações patológicas do diabetes pode ser atribuída a três consequências principais da falta de ação da insulina: menor utilização de glicose pelas células corporais e consequente aumento da glicose plasmática; aumento acentuado da mobilização de gorduras, produzindo um metabolismo lipídico anormal e depósito nas paredes vasculares; e alterações no metabolismo e perda de função de proteínas (GUYTON; HALL, 1998).

A insulina, além de promover a captação de glicose pelos tecidos, também está associada a regulação da produção de glicogênio. O aumento de insulina promove a captação de glicose pelo fígado e também seu armazenamento na forma de glicogênio. Desta forma, em condições metabólicas normais, após as refeições ocorre a queda de glicose plasmática e de insulina, o que ativa a gliconeogênese, reestabelecendo as concentrações plasmáticas de glicose. No caso do diabetes, ausência da insulina também levará ao aumento da produção e liberação de glicose hepática, contribuindo ainda mais para o aumento das concentrações séricas do monossacarídeo (GUYTON; HALL, 1998).

O metabolismo lipídico também é alterado visando promover a liberação de uma segunda fonte de energia. Como os carboidratos não estão sendo captados pelas células, o organismo promove a produção energética através da quebra de gordura. Para isso ocorre a hidrólise dos triglicerídeos armazenados e liberação de ácidos graxos livres. Esses ácidos graxos são convertidos no fígado à fosfolipídios e colesterol, podendo atingir altas concentrações e, com isso, elevando o risco de desenvolvimento e progressão acelerada de arteriosclerose, uma das complicações mais graves do diabetes descontrolado (GUYTON; HALL, 1998). Além disso, o aumento da utilização de lipídeos como fonte energética leva a um consequente aumento na produção de ácido acetoacético, gerando quadros de acidose metabólica. Esses quadros, quando não revertidos rapidamente podem levar o paciente ao coma e óbito (BARONE et al., 2007).

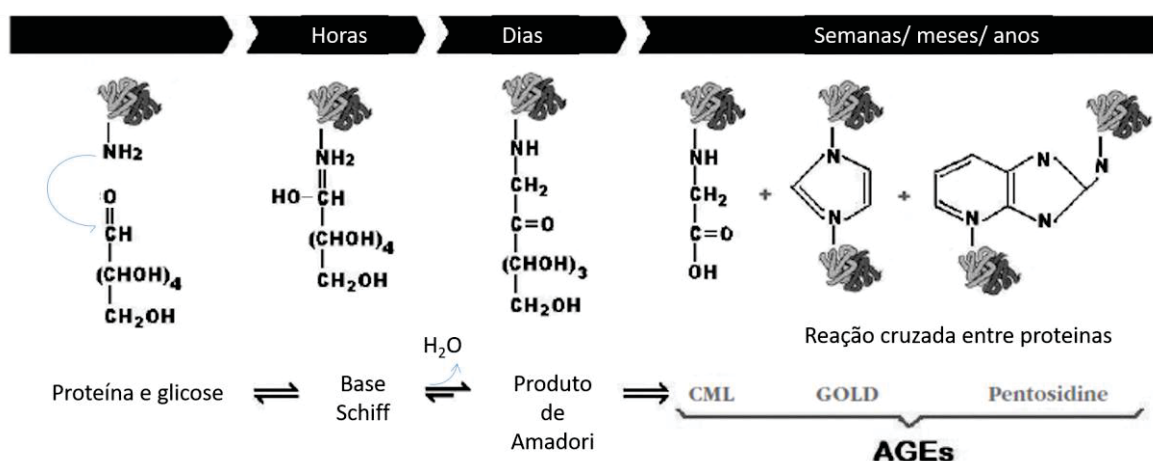
Quanto a alteração no metabolismo de proteínas, a insulina está diretamente associada ao crescimento corporal. Ela exerce efeito direto sobre a captação de aminoácidos pelas células, atuando também sobre os ribossomos aumentando a produção de RNA mensageiro e consequentemente, a sua tradução. Ainda, a insulina também inibe o catabolismo das proteínas, diminuindo a velocidade de liberação de aminoácidos pelas células musculares. Todos esses efeitos fazem com que a insulina seja considerada como hormônio anabólico, promovendo a síntese de proteínas, enquanto que a sua ausência teria efeito catabólico, acelerando a degradação de proteínas (GUYTON; HALL, 1998).

Outra alteração importante envolvendo as proteínas se dá através da ligação à moléculas de glicose, dando origem aos chamados Produtos Finais de Glicação Avançada (*Advanced Glycation End-products* – AGEs). A formação destas moléculas é uma das teorias mais aceitas sobre como a hiperglicemia crônica conduz aos danos celulares e teciduais observados no diabetes (BROWNLEE, 2001). Os AGEs endógenos são compostos formados através da reação não enzimática entre açúcares redutores e proteínas, fosfolipídios ou ácidos nucleicos e uma das principais formas de condensação é conhecida como reação de Maillard (FIGURA 1). Essa reação inicia-se através da condensação de grupamento carbonila de açúcar redutor (ex. glicose) com um grupamento amina (ex. aminoácido lisina). O produto dessa reação é conhecido como base de Schiff e ainda é reversível. Na

sequência, em uma etapa mais lenta, a molécula sofre rearranjos formando uma estrutura mais estável, o produto de Amadori, modernamente conhecido como *early Maillard reaction products (early MRPs)*, ou produtos iniciais da reação de Maillard, que são caracterizados por uma ligação estável e irreversível entre o açúcar e o grupo amina. A hemoglobina glicada é um exemplo de produtos de Amadori. Os produtos de Amadori gerados possuem grupos carbonílicos reativos capazes de reagir com grupamentos eletrofílicos como aminas primárias acessíveis, dando origem aos produtos avançados da reação de Maillard, também conhecidos como AGEs (BARBOSA, OLIVEIRA; SEARA, 2008).

Diversas evidências apontam a contribuição dos AGEs no desenvolvimento de complicações relacionadas ao diabetes. Um dos efeitos patológicos promovidos pelos AGEs está relacionado à capacidade de se ligar a diferentes moléculas e, com isso, alterar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. Outro fator patológico associado aos AGEs é a capacidade de originar radicais livres, intensificando reações derivadas do estresse oxidativo. Além disso, alguns AGEs atuam em receptores celulares e, juntamente com proteínas e lipídios modificados promovem o aumento da expressão de mediadores inflamatórios.

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DE AGEs.



FONTE: Adaptado de (OLIVEIRA et al., 2013)

2.1.3 Diagnóstico e controle do DM

O diagnóstico do diabetes é normalmente realizado por medidas da glicemia (ADA, 2018; SBD, 2018; WHO, 2016). O quadro fisiopatológico da doença inicia-se antes das alterações glicêmicas, por isso foi incluído o quadro de pré-diabetes. Neste caso o paciente ainda não apresenta valores superiores ao diagnóstico, mas já apresenta resultados de glicemia superiores aos valores considerados normais (SBD, 2018). A glicose plasmática pode ser verificada através dos exames de glicemia em jejum ou tolerância oral a glicose. Outro método para diagnosticar o diabetes é através do exame de hemoglobina glicada. Neste caso, é avaliado a glicemia de forma indireta, através da quantificação de fração de hemoglobina que se encontra ligada de forma estável e irreversível a uma molécula de glicose (ADA, 2018; SBD, 2018; WHO, 2016).

O QUADRO 1 resume os valores de corte para o diagnóstico de diabetes, assumindo o critério da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2018).

QUADRO 1. CRITÉRIOS LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO DE NORMOGLICEMIA, PRÉ-DIABETES E DM, ADOTADOS PELA SBD.

	Glicose em jejum (mg/dL)	Glicose 2 horas após sobrecarga com 75 g de glicose (mg/dL)	Glicose ao acaso	HbA1c (%)
Normoglicemia	<100	<140	-	< 5,7
Pré-diabetes ou risco aumentado para DM	100 ≤ e < 126	140 ≤ e < 200	-	5,7 ≤ e < 6,5
Diabetes estabelecido	126 ≤	200 ≤	200 ≤ e sintomas	6,5 ≤

FONTE: Adaptado de (SBD, 2018)

2.2 HEMOGLOBINA E HEMOGLOBINA GLICADA

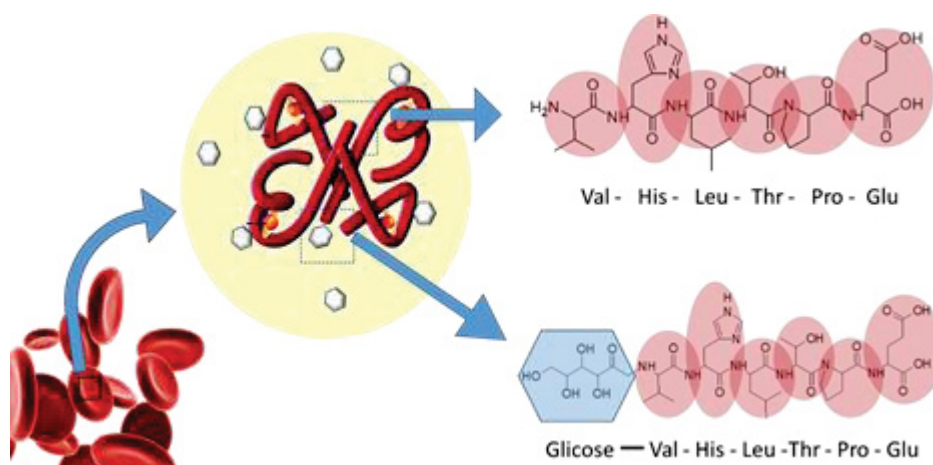
2.2.1 Definições e conceitos

O termo hemoglobina glicada refere-se a substâncias formadas a partir da reação de ligação não enzimática entre a hemoglobina A (HbA) e açúcares. O termo hemoglobina glicosilada muitas vezes é erroneamente considerado um sinônimo, porém este está relacionado a ligação enzimática e instável do açúcar à hemoglobina (ULRICH; CERAMI, 2001).

A hemoglobina é uma proteína composta de 4 subunidades peptídicas ($2\alpha 2\beta$) associadas através de ligações não covalentes a uma ferro-protoporfirina, o grupo heme. De forma geral, em adultos os eritrócitos apresentam 97% das moléculas de hemoglobina na conformação $2\alpha 2\beta$, conhecida como hemoglobina A; 2% na forma $2\alpha 2\delta$, hemoglobina A2; e 1% $2\alpha 2\gamma$, hemoglobina fetal (SCHECHTER, 2008).

A HbA é a principal forma nativa da hemoglobina e sua fração não glicada (neutra) é designada HbA0, enquanto que a fração glicada, carregada negativamente (seja pela ligação de açúcares ou outros carboidratos) é conhecida como HbA1. A HbA1, por sua vez, pode ser diferenciada de acordo com a glicação como HbA1a1, HbA1a2, HbA1b, HbA1c, HbA1d (NETTO et al., 2009; SCHECHTER, 2008). Dentre elas, a HbA1c é caracterizada pela ligação não enzimática de uma glicose ao aminoácido valina da posição N-terminal da cadeia beta (FIGURA 2). A HbA1c é a fração glicada da hemoglobina que apresenta valor clínico para o controle do diabetes (ADA, 2018; NETTO et al., 2009; SBD, 2018).

FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA HEMOGLOBINA GLICADA



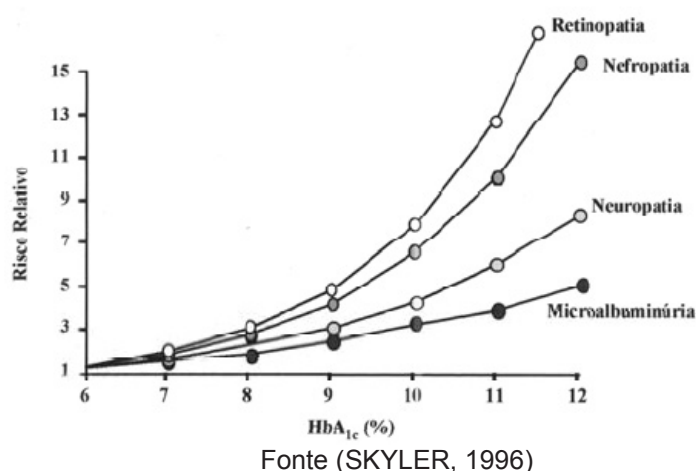
FONTE: O Autor (2018)

Os níveis glicêmicos estão diretamente relacionados as complicações do diabetes (ADA, 2018; SBD, 2018; WHO, 2016). Atualmente a medida da hemoglobina glicada é o parâmetro de referência para avaliação do controle glicêmico em pacientes diabéticos e recentemente foi incluída como critério diagnóstico da doença (SBD, 2018). Os valores são apresentados como uma relação das moléculas que se encontram ligadas covalentemente a glicose em relação ao total de moléculas de hemoglobina. Essa relação pode ser apresentada na forma de porcentagem ou mmol/mol (WEYKAMP, JOHN; MOSCA, 2009). A consolidação da relação da concentração de hemoglobina glicada e o desenvolvimento das complicações crônicas do diabetes ficou definitivamente estabelecido, a partir de dois grandes ensaios clínicos (DIABETES CONTROL COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP et al., 1993; DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP, 1998). No estudo Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) foi determinada a relação dos valores de HbA1c com a glicemia média.

Além disso, foi observado um aumento exponencial no desenvolvimento destas complicações com o aumento dos níveis de HbA1c (FIGURA 3). O segundo estudo (DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP, 1998) também apresentou resultados consonantes, demonstrando que a intensificação do tratamento da hiperglicemia reduz a incidência das complicações. Ainda, de acordo com o estudo, em geral, para cada 1% de decréscimo dos valores de HbA1c, houve diminuição de 35% no risco

de complicações microvasculares, 25% das mortes relacionadas e 7% no número de mortes em geral. Outros estudos também demonstraram a associação entre os valores de HbA1c e complicações do diabetes (GRINDEL et al., 2017; NICHOLAS et al., 2013; SKRIVER et al., 2015; STRATTON et al., 2000; ZOUNGAS et al., 2012).

FIGURA 3. RELAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA (HbA1C) E RISCO DE COMPLICAÇÕES MICROVASCULARES.



Com base nos estudos clínicos, visando evitar as complicações do diabetes, foram recomendados valores de HbA1c abaixo de 7% (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION et al., 2003). Esses valores se mantem como metas das principais diretrizes atuais (ADA, 2018; IDF, 2017; SBD, 2018). Visando este controle, métodos para quantificação de HbA1c tem sido desenvolvido desde então.

2.2.2 Métodos de quantificação de hemoglobina glicada

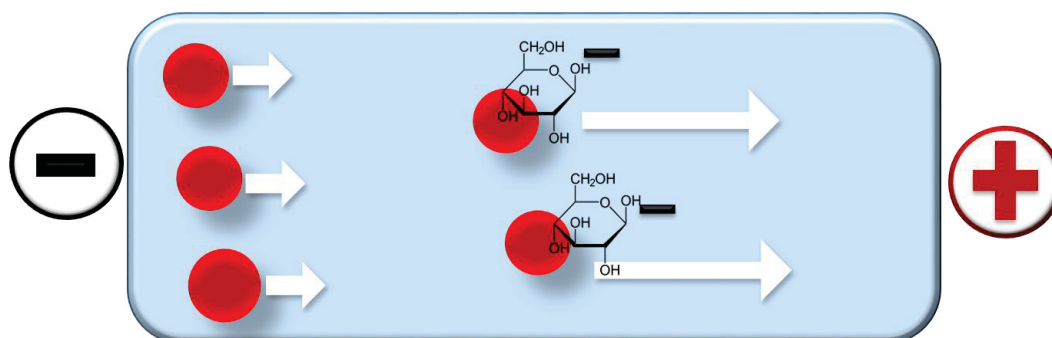
Diversos métodos que foram desenvolvidos para a quantificação de HbA1c, são baseados em diferenças bioquímicas e estruturais entre a hemoglobina glicada e não glicada.

2.2.2.1 Métodos baseados na diferença de carga

A fração glicada da hemoglobina quando comparada a fração não glicada apresenta diferença significativa em seu ponto isoelétrico. Devido a presença da

ligação ao açúcar redutor, em contato com o tampão, a proteína glicada passa a apresentar uma carga residual negativa maior, alterando seu ponto isoelétrico (FIGURA 4) (CAMARGO; GROSS, 2004). Essa diferença bioquímica fundamenta diversos métodos como a cromatografia de troca iônica, a eletroforese e a eletroforese capilar, e a focalização isoelétrica (WEYKAMP et al., 1995). Estes métodos são pH e temperatura dependentes, apresentando limitação com relação a calibração e a baixa reprodutibilidade (CAMARGO et al., 1998; WEYKAMP, JOHN; MOSCA, 2009). Além disso, por não possuírem resolução suficiente para separar as frações glicadas, eles quantificam a fração glicada total (HbA1), não refletindo o real valor da HbA1c, comprometendo a confiabilidade dos resultados (RHEA; MOLINARO, 2014). Nos últimos anos, estes métodos têm sido substituídos por sistemas de eletroforese capilar e HPLC mais robustos e automatizados, alguns inclusive capazes de diferenciar as frações glicadas (CAMARGO et al., 1998; JEPPSSON et al., 2002).

FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MIGRAÇÃO DIFERENCIAL EM FUNÇÃO DA CARGA NA HEMOGLOBINA GLICADA



FONTE: O autor (2018)

2.2.2.2 Métodos baseados em reações enzimáticas e imunoenzimáticas

Como alternativa aos métodos baseados em diferenças relacionadas a carga foram desenvolvidos métodos baseados em diferenças estruturais. Para utilização dos métodos imunoenzimáticos foram desenvolvidos anticorpos capazes de reconhecer a porção N-terminal glicada da cadeia beta (FIGURA 5). O desenho experimental pode variar, podendo ser realizado através de ensaios

imunoturbidimétricos, os quais são baseados no grau de turbidez gerado a partir da ligação dos peptídeos aos anticorpos, ou ainda, através da detecção baseada em reações enzimáticas e colorimétricas. Nos métodos puramente enzimáticos, as células lisadas passam por um processo de digestão proteolítica, liberando o resíduo de valina glicado. Esse resíduo serve de substrato para a enzima *fructosyl valine oxidase*, produzindo peróxido de hidrogênio. Com isso, a detecção é feita através da reação com cromógeno, catalisada pelo peróxido formado, havendo uma relação direta entre a intensidade da cor os níveis glicêmicos. Existem diversos kits comerciais, compatíveis com diversas marcas de analisadores laboratoriais, como Roche, Simens, Vitros.

Como vantagens, esses métodos não são afetados por interferentes relacionados a carga elétrica e podem ser facilmente incluídos em laboratórios de exames de rotina. Porém, apresentam as limitações típicas de ensaios imunoenzimáticos, como curvas não lineares, estabilidade dos reagentes imunológicos limitada e a necessidade de quantificação separada da hemoglobina total, o que pode gerar uma incerteza adicional. O maior desafio para essa classe de métodos está em atingir resultados de precisão desejáveis (RHEA; MOLINARO, 2014; SACKS et al., 2002; WEYKAMP, JOHN; MOSCA, 2009).

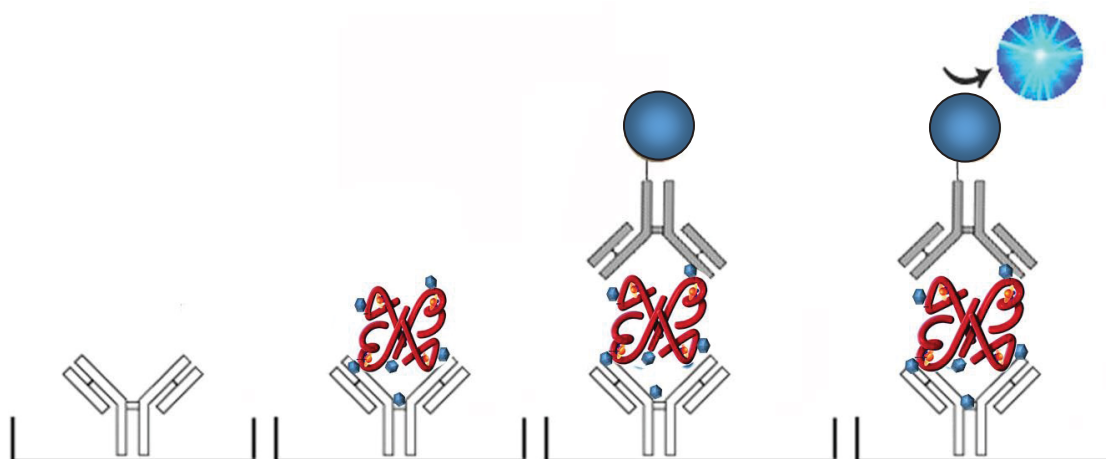
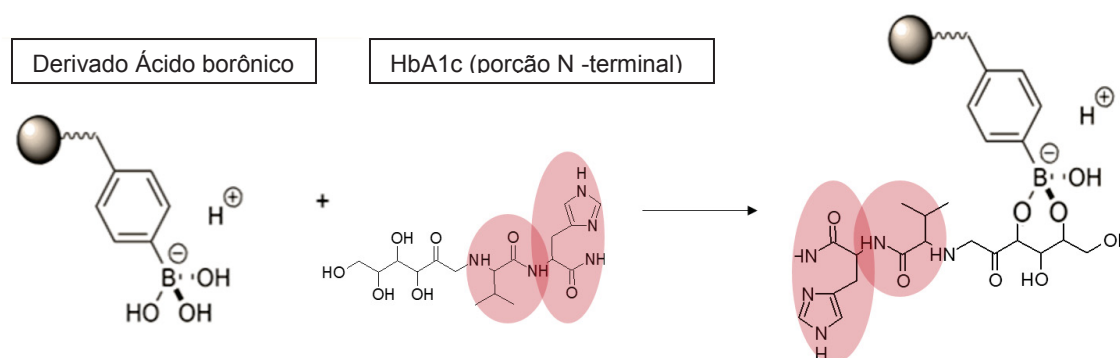


FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO
FONTE: Adaptado de LSBio™

2.2.2.3 Cromatografia de afinidade (ácido borônico)

Outro método baseado na diferença estrutural da HbA1c e a hemoglobina total é através da cromatografia de afinidade. Neste caso, o método fundamenta-se na capacidade de agentes em reagir especificamente com a porção glicada da molécula. Consiste na ligação entre o grupamento cis-diol presente na glicose, e a porção amino do ácido aminofenil borônico, normalmente incluído no gel de agarose ou outra superfície (GASCON; MOLINA, 1989; JOHN, 1984; OREMEK, SEIFFERT; SCHMID, 1987). A hemoglobina glicada se liga a resina de afinidade enquanto que a hemoglobina livre não (FIGURA 6). Vale ressaltar que não apenas a HbA1c mas todas as hemoglobinas glicadas vão se ligar a resina, comprometendo a especificidade do método. As maiores dificuldades destes métodos residem na automação dos métodos, para conferir maior reprodutibilidade, além da robustez do sistema, principalmente no caso de colunas de gel (GASCON; MOLINA, 1989; JOHN, 1984).

FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MÉTODOS BASEADOS NA CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE PELO ÁCIDO BORÔNICO



FONTE: Adaptado de (BIOTECH, 2018)

2.2.3 Padronização dos métodos

Diante da importância dos valores da hemoglobina glicada para o controle da glicemia, rapidamente a solicitação por esse exame tornou-se rotina. Da mesma forma, foi percebido que o resultado variava conforme o laboratório e o período de solicitação (WEYKAMP, JOHN; MOSCA, 2009). Como foi explicado anteriormente,

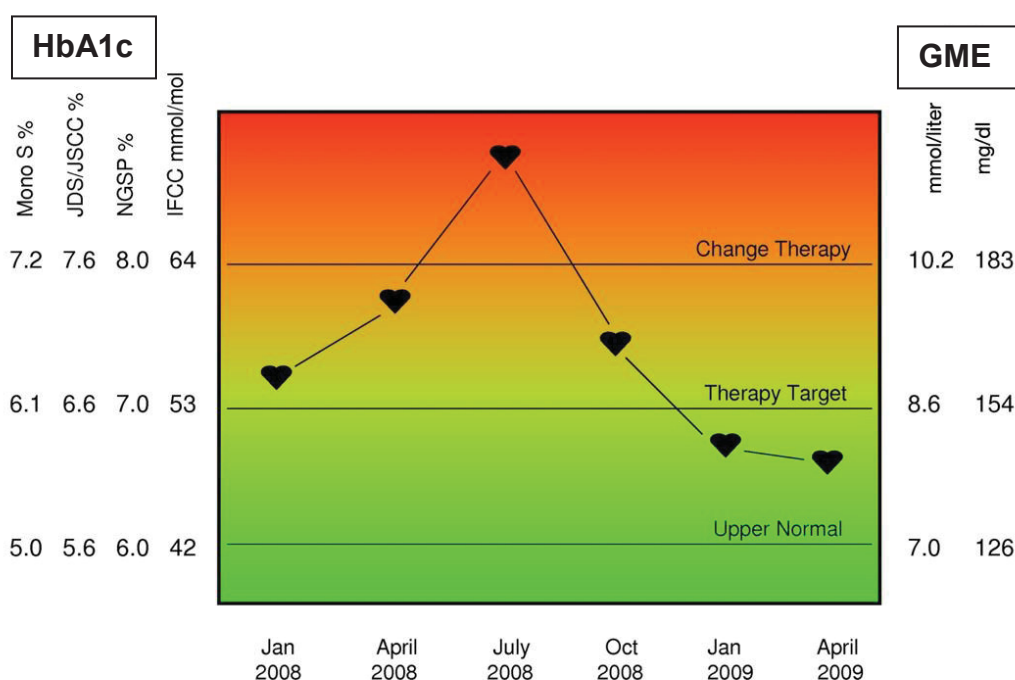
os métodos desenvolvidos são baseados em diferentes princípios, e apresentam vantagens e desvantagens. Cada um dos métodos é capaz de fornecer a informação referente a hemoglobina glicada, porém nem sempre os resultados são compatíveis ou intercambiáveis (NETTO et al., 2009). Além disso, cada um dos métodos define um analito específico, ou seja, alguns trabalham com a HbA1c, outros com a hemoglobina glicada total, e cada um deles apresenta um grau de especificidade, podendo ser verificada através da capacidade de diferenciar variantes da hemoglobina ou capacidade de separar suas diferentes frações glicadas (GARCIA-ALCALA, RUIZ-ARGUELLES; CEDILLO-CARVALLO, 2009).

O primeiro passo para a harmonização dos métodos foi a padronização da nomenclatura. Variações como hemoglobina glicosilada, hemoglobinas rápidas, hemoglobina A1, foram substituídas pelo termo hemoglobina glicada, glicohemoglobina ou HbA1c (SBD, 2018). Em seguida foram iniciados os trabalhos no sentido na padronização dos valores. Nos Estados Unidos, foi criado o *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP). Nesse programa, foi definido um método primário de referência (BioRex 70, HPLC) e um laboratório primário de referência nos Estados Unidos. Os diversos métodos disponíveis foram comparados ao método de referência para que fossem certificados. Desta forma, era confirmado que os resultados obtidos pelos diferentes métodos não apresentavam diferenças estatisticamente significativas em relação ao método de referência (DIABETES CONTROL COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP et al., 1993). Outros países, como o Japão (SHIMA K, 1994) e a Suécia (ECKERBOM, BERGQVIST; JEPPSSON, 1994) também tiveram essa iniciativa. Contudo, na comparação entre os métodos de referência dos diferentes países foram observadas diferenças nos valores. Com isso, todos foram capazes de harmonizar os resultados em seus países porém nenhum deles refletia o real valor de HbA1c (WEYKAMP, JOHN; MOSCA, 2009). Para superar esse problema o *International Federation on Clinical Chemistry* (IFCC) criou um novo programa de padronização mundial. Neste programa foram desenvolvidos padrões a partir da purificação de hemoglobina e hemoglobina glicada para posterior desenvolvimento de método. Esses padrões foram submetidos à digestão enzimática pela endoproteínase glu-C, responsável por clivar a hemoglobina em hexapeptídeos (glicosados ou não) e quantificá-los através

das técnicas de LC-MS ou eletroforese capilar. Através deste método, foi possível comprovar que os métodos considerados de referência apresentavam valores de HbA1c superiores ao real (JEPPSSON et al., 2002).

Após todas as tentativas de padronização dos métodos, foi necessário padronizar também as unidades utilizadas. Para isso o IFCC, juntamente com o American Diabetes Association (ADA) e European Association for Study of Diabetes (EASD) chegaram a um consenso no qual os valores de HbA1c deveriam ser apresentados tanto em mmol/mol (IFCC) quanto em % (NGSP). Para isso, foi disponibilizada uma fórmula para conversão das unidades, de acordo com o gráfico mostrado na FIGURA 7 (ADA, 2018; WEYKAMP, JOHN; MOSCA, 2009):

FIGURA 7. EXEMPLO DE ACOMPANHAMENTO DE PACIENTE APÓS AFERIÇÕES A CADA 3 MESES E ESQUEMA PARA CONVERSÃO DE UNIDADES DA HbA1c



NOTA: Mono S %: método padrão na Suíça; JDS/ JSCC: Japan Diabetes Society/ Japan Society of Clinical Chemistry (método padrão no Japão); NGSP: National Glicohemoglobin Standardization Program; IFCC: International Federation on Clinical Chemistry FONTE: Adaptado de (WEYKAMP, JOHN; MOSCA, 2009)

O método desenvolvido pelo IFCC utiliza espectrometria de massas na detecção dos peptídeos referentes a fração glicada e não glicada da hemoglobina, conferindo maior seletividade ao método (JEPPSSON et al., 2002). Porém, em uma

matriz complexa como o sangue, devemos considerar a presença de possíveis interferentes com a mesma massa molecular dos peptídeos de interesse, o que poderia levar a variação dos resultados, dependendo dos componentes da matriz.

Como foi possível observar, muitas dificuldades foram constatadas durante o desenvolvimento de metodologias capazes de quantificar o real valor da HbA1c. Muitas dessas dificuldades se deram pelo fato de tratar-se de análise de proteínas e proteínas modificadas pois essas moléculas guardam importantes particularidades analíticas.

2.3 ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR LC-MS

Proteínas são macromoléculas biológicas constituídas por uma ou mais cadeias de aminoácidos. Fazem parte de grande parte dos seres vivos, participando de diversos processos celulares, como a replicação de DNA, a resposta a estímulos e o transporte de moléculas. São formadas por sequências de aminoácidos. Os resíduos individuais de aminoácidos são unidos através de ligações peptídicas, formadas pela ligação de um carbono alfa, presente no grupo ácido carboxílico, ao grupo amina de outro aminoácido. Os resíduos de uma proteína são muitas vezes alterados quimicamente através de modificações pós-traducionais, como a glicação (LEHNINGER, 2000).

A extremidade da proteína com um grupo carboxílico livre é denominada C-terminal ou carboxi-terminal, enquanto a extremidade com um grupo livre de amina é denominada N-terminal ou amino-terminal. A partir de tais características, algumas ferramentas analíticas se destacam na elucidação estrutural dessas moléculas, como por exemplo a cromatografia acoplada a espectrometria de massas (ROST, 2001).

2.3.1 Análise de proteínas por LC-MS

A cromatografia é uma técnica analítica muito conhecida e aplicada para os mais diversos fins. A cromatografia líquida consiste na separação de compostos através da interação diferencial dos analitos entre uma fase estacionária e uma fase

móvel (COLLINS, 2006). Existem diferentes tipos de cromatografia líquida, sendo uma das mais utilizadas a cromatografia em fase reversa. A evolução desta técnica deu origem a equipamentos capazes de suportar altas pressões e com isso permitiu o uso de fases estacionárias mais eficientes, com menores tamanhos de partículas (REKHI et al., 2017)

A espectrometria de massas pode ser descrita como o estudo de íons dispersos em uma fase gasosa e tem como objetivo geral a caracterização de diferentes estruturas moleculares (ANAS EL-ANEED, 2009). Um espectrômetro de massas pode ser subdividido em quatro principais componentes: a fonte de íons, o analisador, o detector e o sistema de aquisição de dados (KINTER; SHERMAN, 2000).

2.3.1.1 Fonte de íons

A fonte de íons como o próprio nome diz, tem por objetivo ionizar as moléculas presentes na amostra, de forma que elas fiquem carregadas positivamente (adicionando um próton $[M+H]^+$) ou negativamente (retirando um próton, $[M-H]^-$), de acordo com o modo de ionização selecionado. As fontes de ionização mais utilizadas em análises proteômicas são *Electrospray (ESI)* e *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)*. São formas de ionização conhecidas como “suave” ou “branda”, pois a energia utilizada na transferência de carga é baixa, preservando a estrutura inicial da molécula (KINTER; SHERMAN, 2000).

Para a utilização da fonte MALDI os peptídeos são dissolvidos em uma *matriz*, uma solução de ácidos fracos capazes de absorver luz UV. Após a evaporação do solvente, ocorre a cristalização da matriz, juntamente com os peptídeos da amostra. A amostra é posicionada dentro da fonte, onde recebe pulsos de laser (luz UV) que causam a vaporização de parte da amostra (matriz e peptídeos). A ionização acontece de forma branda, pois boa parte da energia do laser é absorvida pela matriz, produzindo peptídeos íntegros e monocarregados. Os componentes ácidos da matriz e da solução diluente dos peptídeos auxiliam o processo de protonação. O sistema MALDI não é compatível com acoplamento a

cromatografia líquida, porém é capaz de gerar dados diretos a partir do digerido de proteínas, sem praticamente nenhum preparo de amostra (KARAS; KRUGER, 2003).

Na fonte de ionização por *electrospray*, os peptídeos são introduzidos na forma de solução aquosa, normalmente acidificada. A solução é introduzida através de uma agulha de pequeno diâmetro de abertura e altamente carregada (2 - 5 kV), formando um *spray*. Esse *spray* é formado por pequenas gotas carregadas positivamente. Dentro da fonte, as gotas passam por um processo de secagem, com o auxílio de gás de secagem inerte (nitrogênio) e altas temperaturas, levando a redução do tamanho das gotas até a dessorção completa e formação de peptídeos protonados na fase gasosa. Os íons formados são direcionados a entrada do analisador (FENN, 2002; FENN et al., 1989).

Uma característica importante da ESI é que, em meio ácido, esta fonte possui uma tendência de protonar todos os sítios básicos presentes no peptídeo. O sítio básico essencial dos peptídeos é a amina livre presente na posição N-terminal, mas existem aminoácidos que apresentam cadeias laterais básicas, como lisina, arginina e histidina. Nesses casos, ocorre a formação de peptídeos multicarregados (KINTER; SHERMAN, 2000). Essa característica será discutida na sessão de INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DE ANÁLISE DE PROTEÍNAS (item 2.5, p.50).

2.3.1.2 Analisadores de massa

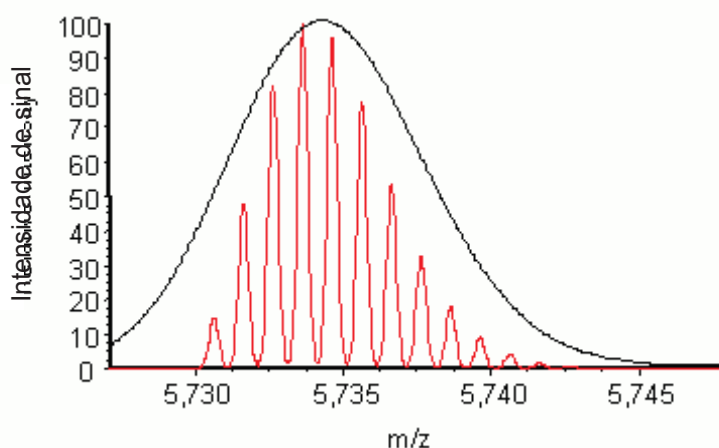
Os analisadores de massa são responsáveis por determinar a relação massa-carga (m/z) dos íons presentes na amostra e que constituem o espectro de massas. Um ponto importante é destacar a diferença entre os termos “massa” e “ m/z ”. Primeiramente, ao trabalhar com m/z estamos referindo aos íons que são espécies carregadas. Quando carregada com um próton, temos a massa correspondente a molécula (M) adicionada a massa de um próton (M+H), e a carga 1. Nesse caso o m/z corresponde a massa molecular mais a massa de um próton (M+H)/1. Porém, quando trabalhamos com espécies multicarregadas, esse valor é diferente, por exemplo, uma molécula com duas cargas terá massa de M+2H e carga 2, portanto

seu m/z será $(M+2H)/2$, aproximadamente metade do valor da massa nominal da molécula (CANTÚ et al., 2008).

Outro ponto importante relacionado ao analisador de massa é o conceito de resolução de massa. A resolução de massa é definida como $R = (m/z) / (\Delta m/z)$, no qual o $\Delta m/z$ pode ser definido de várias formas, como por exemplo, através do valor da largura do pico a meia altura. Na prática, quanto maior a resolução de massas, maior a habilidade do analisador em diferenciar compostos com m/z muito próximos. Alta resolução também está relacionada com maior exatidão de massa, uma vez que o centro do pico é melhor definido (BALOGH, 2004; MURRAY et al., 2013).

No espectro de massas de peptídeos, a resolução desejada pode ser definida como aquela capaz de diferenciar grupamentos de isótopos (*isotope clusters*). Os grupamentos isotópicos de peptídeos consistem em uma série de m/z distintos, produzidos pela contribuição isotópica dos elementos C, H, N, O e S, como pode ser observado na (FIGURA 8), que apresenta o espectro da insulina. A contribuição isotópica é a relação massa carga dos peptídeos formados com isótopos menos abundantes dos elementos químicos presentes na estrutura da molécula. Tipicamente, a resolução necessária para separar grupamentos isotópicos é duas vezes o valor de m/z da molécula alvo (KINTER; SHERMAN, 2000).

FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DE ESPECTRO DE MASSAS DA PROTEÍNA INSULINA



FONTE: (MICHAEL L. GROSS et al., 2018)

Quando analisadores oferecem alta resolução de massas, é necessário calcular a massa molecular dos analitos utilizando o valor de massa monoisotópica,

ou seja a massa do isótopo mais abundante daquele elemento químico, e não o valor da média ponderada. A diferença entre a massa monoisotópica e massa média é importante, principalmente em moléculas maiores, como peptídeos e proteínas, pois podem diferir significativamente. Por exemplo, o peptídeo da hemoglobina VHLTPEEK apresenta fórmula molecular $C_{42}H_{69}N_{11}O_{14}$, calculando a massa molecular utilizando as massas médias dos elementos temos 952,0752 Da, já quando calculamos a massa molecular utilizando a massa monoisotópica o valor passa a 951,5025 Da. Pode parecer pouco, mas trata-se de uma diferença de 588 ppm e para identificação de moléculas o recomendado são erros inferiores a 10 ppm, quando comparamos a massa teórica e experimental (KINTER; SHERMAN, 2000).

Com esses conceitos abordados, podemos discutir dois dos analisadores de massa mais utilizados para a análise de peptídeos: Quadrupolo e Tempo de Voo (*Time of Flight - TOF*).

2.3.1.2.1 Analisadores do tipo Quadrupolo

Analisadores do tipo quadrupolo são um dos mais utilizados analisadores de massas. Esse fato está associado a combinação da facilidade de utilização, alta performance analítica e relativo baixo custo. Por esses motivos os quadrupolos foram incluídos em uma série de aplicações, dentre elas a análise de proteínas (ANAS EL-ANEED, 2009).

Os quadrupolos são compostos de quatro barras magnéticas (polos) dispostas em paralelo e pareadas duas a duas, eletricamente (FIGURA 9). À medida que os íons viajam através do quadrupolo, eles são filtrados de acordo com seu valor m/z para que apenas um único íon de valor m/z possa atingir o detector. O valor m/z transmitido pelo quadrupolo é determinado pelas tensões de radiofrequência (RF) e de corrente contínua (DC) aplicadas aos eletrodos. Essas tensões produzem um campo elétrico oscilante que funciona como um filtro para transmitir o valor m/z selecionado (BRAMER, 1997).

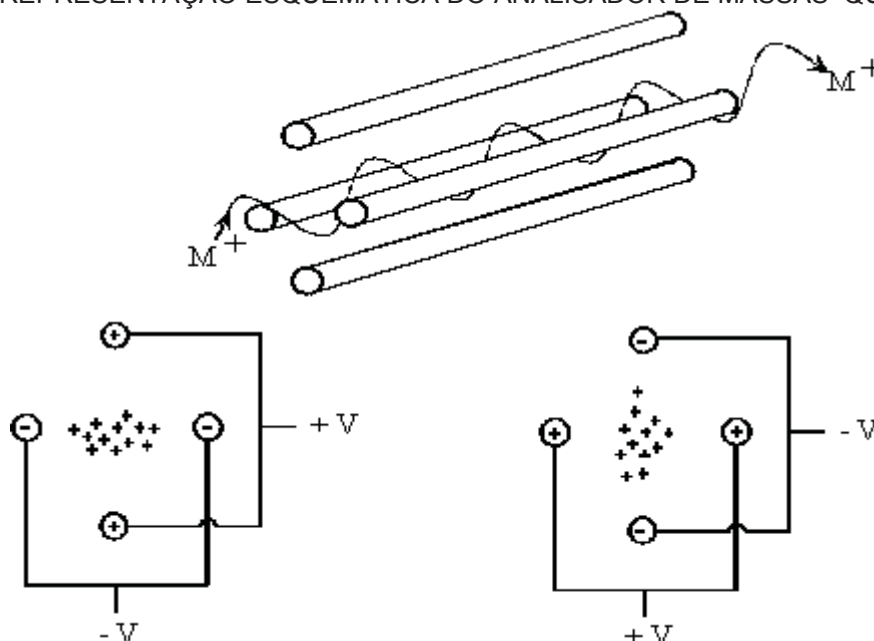
Ao selecionar uma frequência e potencial de RF apropriados, o quadrupolo atua como um “filtro alto”, transmitindo íons m/z maiores e rejeitando íons m/z

menores. Os íons m/z menores têm uma maior velocidade de aceleração, de modo que a onda para esses íons tem maior amplitude. Se essa amplitude for suficientemente grande, os íons colidem com os eletrodos e não alcançam o detector. O baixo valor de corte m/z do quadrupolo é alterado ajustando o potencial de RF ou a frequência de RF. Qualquer íon com m/z maior que este ponto de corte é transmitido pelo quadrupolo (KINTER; SHERMAN, 2000).

Também é aplicada uma tensão DC através das hastes do analisador. Esse potencial combinado com o potencial de RF atua como um filtro de passagem baixo, para rejeitar íons m/z maiores. Como eles respondem rapidamente ao campo RF de mudança, o movimento dos íons m/z menores é dominado pelo potencial de RF. Este movimento estabiliza sua trajetória reorientando cada vez que o potencial de RF muda de polaridade. Como os íons m/z menores são rapidamente reorientados, o potencial DC não afeta esses íons. Já os íons m/z maiores, não se reorientam tão rapidamente durante o ciclo de RF. O potencial DC tem maior influência em sua trajetória e eles lentamente se afastam do centro do quadrupolo. No final do analisador, eles estão muito distantes dos eixos para atingir o detector (HENCHMAN; STEEL, 1998).

A combinação de filtros de passagem alta e baixa produzidos pelos potenciais RF e DC é ajustada para transmitir apenas o valor m/z selecionado. Todos os íons acima ou abaixo do valor ajustado m/z são rejeitados pelo filtro quadrupolo. Os campos RF e DC são digitalizados (por potencial ou frequência) para coletar um espectro de massa completo (HENCHMAN; STEEL, 1998; KINTER; SHERMAN, 2000). A FIGURA 9 traz uma representação no analisador do tipo quadrupolo.

FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ANALISADOR DE MASSAS QUADRUPOLO



NOTA: M^+ : Íon carregado positivamente. -V: Voltagem negativa; + Voltagem positiva. FONTE: (BRAMER, 1997)

É importante ressaltar que nesse sistema o filtro de massas é otimizado para permitir a passagem de um determinado m/z por vez, ou seja, uma varredura de íons entre 0 e 2000, com um tempo de escaneamento (leitura) de 2 segundos significa que apenas 0,001 segundo será utilizado para cada m/z . Outro fator a ser considerado é que, em caso de sistemas de infusão contínua (acoplados a cromatografia líquida ou bomba seringa) associados ao filtro de massas, aproximadamente 0,1% dos íons formados chegam ao detector. O resultado é uma baixa sensibilidade quando comparados aos analisadores QTOF e íon trap (KINTER; SHERMAN, 2000).

2.3.1.3 Tempo de Voo (TOF)

O princípio de funcionamento do analisador por tempo de voo é relativamente simples. Neste caso é fornecida uma determinada quantidade de energia cinética aos íons. Isto ocorre através da aceleração do íon em um campo magnético. Após a aceleração o íon atinge uma região livre do campo magnético e viaja a uma velocidade inversamente proporcional a sua relação massa/carga. Desta forma íon

com menor m/z percorre mais rapidamente o trajeto do que m/z maiores (COTTER, 1992; 1999; KINTER; SHERMAN, 2000). O tempo gasto no percurso é utilizado para calcular a velocidade e por fim a relação massa/carga do íon, conforme a EQUAÇÃO 1.

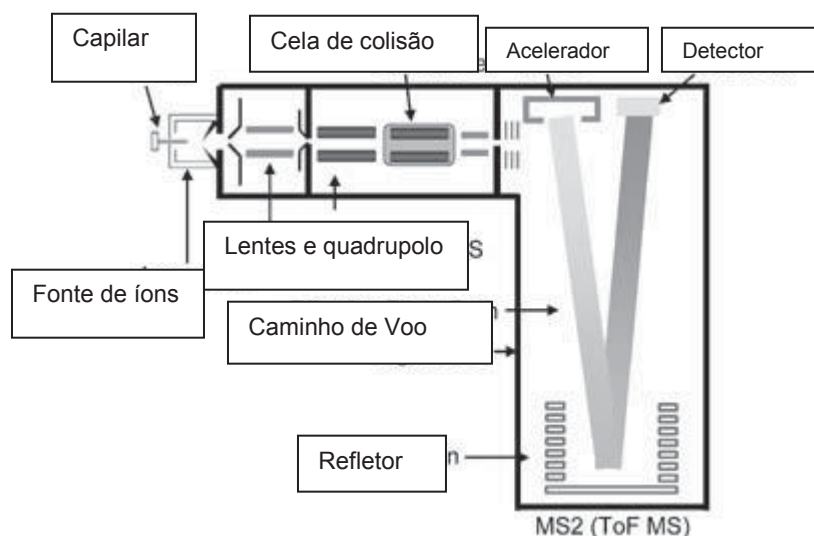
EQUAÇÃO 1. RELAÇÃO ENTRE A MASSA DO ÍON E SUA VELOCIDADE CINÉTICA

$$E_{\text{kinetic}} = \frac{1}{2} m v^2$$

NOTA: E_{kinetic} : Energia cinética; m : massa; v : velocidade. FONTE: (COTTER, 1992)

A diferença de funcionamento do analisador do tipo tempo de voo permite que a resolução de massas neste sistema seja mais susceptível a otimizações do que quadropolos e íon trap. Um dos elementos limitantes de resolução do TOF é proveniente da energia inicial dos íons ao entrarem no analisador. A FIGURA 10 mostra uma representação esquemática do analisador por tempo de voo. Ao serem ionizadas e direcionadas a fonte, algumas moléculas ganham velocidade no processo. Essa energia é somada ao potencial de aceleração e irá apresentar diferente tempo de voo quando comparada a mesma molécula que recebeu apenas a energia de aceleração. Para reduzir esta variação, maiores tubos de voo e velocidades de aceleração mais altas são utilizados, diluindo a diferença causada por energias provenientes da fonte de ionização (ANAS EL-ANEED, 2009; KINTER; SHERMAN, 2000). Outra forma de reduzir a interferência da velocidade inicial é atrasar a saída do campo magnético para o tubo de voo e também através do uso de refletores de íons (aumento do percurso). Essas otimizações fazem com que o analisador TOF apresente alta capacidade de diferenciação de moléculas, ou seja alta resolução de massa. Com o aumento do percurso, seja por aumento do tubo ou uso de refletores, as menores diferenças de velocidade podem ser percebidas, resultando em alta resolução de massas, podendo atingir valores de 10000 a 60000 (KINTER; SHERMAN, 2000; LACORTE; FERNANDEZ-ALBA, 2006).

FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ANALISADOR DE MASSAS POR TEMPO DE VOÔ



FONTE: (LACORTE; FERNANDEZ-ALBA, 2006)

Existem também analisadores conhecidos como híbridos. Nestes casos são combinados diferentes analisadores em um mesmo equipamento. Na FIGURA 10 temos a representação de um híbrido quadrupolo - tempo de voo (Q-TOF). Esses equipamentos foram desenvolvidos para associar a eficiência da fragmentação presente nos quadrupolos com alta resolução de massas do TOF (GLISH; BURINSKY, 2008).

2.3.2 Detector e sistema de aquisição de dados

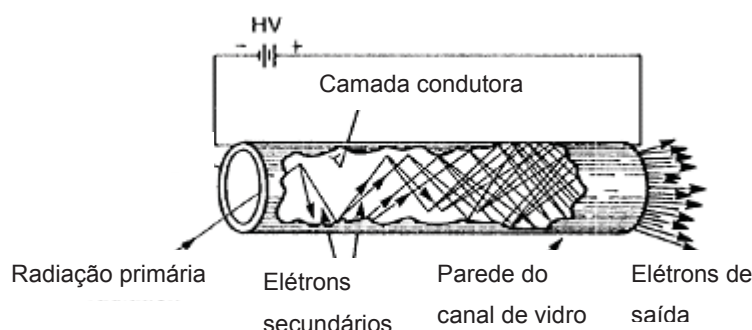
Os fragmentos que superam à jornada através do analisador são direcionados ao detector, os mais comuns são os multiplicadores de elétrons e placas de micro-canal.

2.3.2.1 Multiplicador de elétrons e placa de micro-canal

O multiplicador de elétrons detecta cada íon da massa selecionada que passa pelo analisador de quadrupolo. Os multiplicadores de elétrons usam um processo conhecido como emissão de elétrons secundários (FIGURA 11). Quando os íons atingem uma superfície, isso faz com que os elétrons na área mais externa do átomo sejam liberados, que são conhecidos como elétrons secundários. Cada elétron

secundário gerado, ao atingir a superfície, dará origem a novos elétrons, multiplicando assim o sinal. Esses elétrons são então acelerados através de um campo elétrico, que é gerado pela aplicação da tensão adequada à superfície do tubo. O campo elétrico força os elétrons emitidos a atingir a parede, e esses elétrons, assim como o íon, também fazem com que outros elétrons sejam emitidos. Esse processo continua até que haja elétrons suficientes para emitir uma corrente mensurável.

FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM MULTIPLICADOR DE ELÉTRONS



FONTE: Adaptado de (MAHAFFY, 2008)

A limitação desse sistema consiste no fato de que os elétrons emitidos são esgotados pelo processo e a parede do tubo precisa de tempo para "recuperar" (BRINKMALM, 2008; MAHAFFY, 2008). Esse período de tempo de recuperação é conhecido como tempo morto, e por esse motivo que esse sistema não é compatível com analisadores do tipo TOF. Nesses analisadores, a detecção precisa ser muito rápida pois muitos íons necessitam ser detectados em frações de segundos.

Para esses analisadores, foi desenvolvido o detector do tipo detector de placa de micro canal (*Micro Channel Plate - MCP*). O MCP é uma placa especialmente fabricada que amplifica o sinal de elétrons similar ao do multiplicador de elétrons secundários. O MCP possui milhões de canais independentes e cada canal funciona como um multiplicador de elétron independente. Em outras palavras, pode-se imaginar o MCP como uma montagem de milhões de multiplicadores de elétrons em miniatura. O MCP consiste em uma matriz periódica bidimensional de capilares de

vidro de diâmetro muito pequeno (canais) fundidos e cortados em fatias finas placa. Uma única partícula incidente (íon, elétron, fóton etc.) entra em um canal e emite um elétron da parede do canal. Da mesma forma que os multiplicadores de elétrons, os elétrons secundários são acelerados por um campo elétrico desenvolvido por uma voltagem aplicada em ambas as extremidades o MCP. Eles viajam ao longo de suas trajetórias parabólicas até que, por sua vez, atingem a superfície do canal, produzindo mais elétrons secundários. Este processo é repetido muitas vezes ao longo do canal; como resultado, esse processo em cascata produz uma nuvem de vários milhares de elétrons, que emergem da parte de trás da placa. Se dois ou mais MCPs forem operados em série, um único evento de entrada gerará um pulso de 10^8 ou mais elétrons na saída (BRINKMALM, 2008; OBERHEIDE, WILHELMS; ZIMMER, 1997; VENTURES, 1997).

Esses elétrons emitidos irão originar uma corrente que será então convertida ao sinal analítico correspondente a intensidade e massa do íon detectado. Esse sinal é convertido através de computadores e softwares que da mesma forma necessitam de alta capacidade de armazenamento e processamento de dados (BRINKMALM, 2008).

2.4 PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE DE PROTEÍNAS

A análise de proteínas e peptídeos por espectrometria de massas requer cuidados específicos com o preparo de amostra.

Como descrito anteriormente, alguns espectrômetros são capazes de analisar proteínas intactas, porém muitas razões justificam o uso de peptídeos para análise proteômicas. Dentre elas podemos destacar a instabilidade das proteínas, podendo facilmente ser degradada em condições amenas. Também apresentam limitações quanto a solubilidade, sendo necessário o uso de tensoativos, os quais comprovadamente interferem nas análises por espectrometria de massas, pois ionizam com facilidade, reduzindo o sinal do analito de interesse (CANTÚ et al., 2008). Outro ponto importante é a questão de sensibilidade. Para proteínas intactas, a sensibilidade é consideravelmente menor do que para peptídeos, por se tratarem

de moléculas muito maiores. Por fim, como o objetivo é a identificação e análise estrutural das proteínas, é necessário obter informações quanto a sua sequência de aminoácidos. Nesse sentido os espectrômetros de massas são mais eficientes para obter informação estrutural detalhada de porções menores, separadamente (HAN, ASLANIAN; YATES, 2008; WISNIEWSKI, 2008). Quando a análise proteômica é realizada por meio da análise de peptídeos provenientes da digestão enzimática de proteínas, esse arranjo experimental recebe o nome genérico de análise proteômica *bottom-up* (WESTON, BAUER; HUMMON, 2013).

2.4.1 Digestão enzimática

O primeiro passo para a análise estrutural de proteínas por espectrometria de massas é a obtenção de peptídeos representativos. É indicado o uso de enzimas proteolíticas para essa digestão. Desta forma, os peptídeos gerados irão apresentar características de fragmentação específicas, o que facilita a análise estrutural, além de permitir a reorganização dos peptídeos para formação na sequência primária da proteína. Como auxílio das diferentes enzimas é possível adaptar a digestão visando a obtenção de peptídeos que apresentam sequências de interesse, direcionando melhor o estudo (KINTER; SHERMAN, 2000).

2.4.2 Seleção da protease

A seleção da enzima proteolítica é uma etapa muito importante pois define o perfil dos peptídeos formados. A enzima deve ser selecionada de acordo com as características da proteína e o conjunto de informações a serem obtidas. Quando tratam-se de proteínas conhecidas, podemos utilizar a sequência de aminoácidos para escolha da região de interesse e a partir daí definir qual enzima é mais adequada. Caso a proteína seja desconhecida, recomenda-se o uso da tripsina, que realiza a digestão após o aminoácido lisina e arginina (quando não seguido de prolina). Essa característica é de interesse pois esses aminoácidos compõem aproximadamente 5 e 6% das proteínas de mamíferos, o que significa que existem uma média de 11 sítios trípticos a cada 100 aminoácidos de uma proteína. Desta

forma, o perfil de peptídeos formado pela digestão triptica é amplo, formando vários peptídeos e ao mesmo tempo apresentando sequencias relativamente curtas, adequadas para análise por espectrometria de massas. Além disso, os aminoácidos Lisina e Arginina apresentam cadeias laterais básicas, que atuam como um segundo sítio de protonação além da porção N-terminal (KINTER; SHERMAN, 2000).

Condições para que a enzima apresente seu melhor funcionamento também devem ser mantidas. Aconselha-se o uso de tampões para manutenção do pH adequado e controle de temperatura, conforme o (QUADRO 2) abaixo.

QUADRO 2. CONDIÇÕES TÍPICAS DE REAÇÃO DE ACORDO COM A ENZIMA DE DIGESTÃO

Protease	Ligação amídica clivada	Condições típicas de reação
Tripsina	K-X; R-X. Exceto X=P	50 mM bicarbonato de amônio pH 7,8 ; 37°C; 4-18h
Lys-C	K-X. Exceto X=P	25 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA pH 7,7 ; 37°C; 4-18h
Arg-C	R-X. Exceto X=P	50 mM tampão fosfato pH 7,0 ; 37°C; 4-18h
Asp-N	X-D. X= qualquer aa	50 mM bicarbonato de amônio pH 7,8 ; 37°C; 4-18h
Glu-C	E-X. Exceto X=P	50 mM acetato de amonio pH 4,4 ; 37°C; 4-18h

FONTE: (KINTER; SHERMAN, 2000)

2.4.3 Digestão enzimática

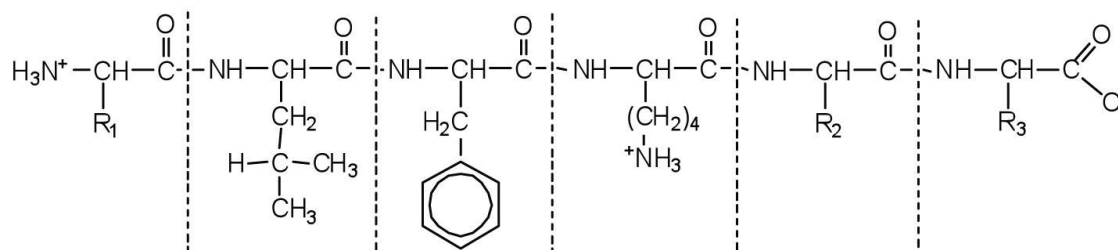
Para digestão da proteína, alguns procedimentos de preparação devem ser realizados, de acordo com as características da amostra. Características como a purificação da proteína e composição dos aminoácidos devem ser analisadas.

O processo de purificação de proteínas é bastante comum. Um dos métodos mais utilizados é através da separação eletroforética. Nesses casos a proteína é purificada utilizando um gel, normalmente composto por poliacrilamida. Existem protocolos específicos para a remoção dos interferentes desta análise para posterior digestão enzimática. A purificação é muito importante principalmente quando o objetivo é a identificação da proteína (KINTER; SHERMAN, 2000).

Outro processo que normalmente antecede a digestão enzimática é a redução e alquilação de regiões onde ocorrem interações intramoleculares, como pontes dissulfeto. Essas regiões são responsáveis por características de conformação da proteína e muitas vezes acabam limitando as regiões de acesso a enzima. A ponte dissulfeto é formada entre dois resíduos de cisteína, por uma reação de oxidação catalisada por enzimas específicas. São raramente encontradas em proteínas intracelulares, sendo mais frequentes em proteínas secretadas para o meio extracelular. Este é o caso da insulina que apresenta três pontes dissulfeto. A redução dessas ligações normalmente é realizada através do uso do reagente ditioneitol (DTT). Em seguida, as ligações reduzidas são alquiladas, comumente utilizando a iodacetamida (IAA). A reação deve ser seguida de etapa cuidadosa de limpeza e remoção dos reagentes para prosseguimento da digestão (KINTER; SHERMAN, 2000).

A etapa de digestão deve respeitar as condições indicadas para cada enzima, principalmente quanto a tampão e temperatura. A proporção enzima: proteína também é variável, dependendo da quantidade de proteína, seu grau de purificação e preparação, condições da reação e qualidade da enzima. A proporção deve ser avaliada, podendo variar entre 1:20 até 1:100 (enzima:proteína) (CANTÚ et al., 2008). A FIGURA 12 apresenta possíveis fontes de digestão na ligação peptídica.

FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO DOS SÍTIOS ESPECÍFICOS PARA DIGESTÃO ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS



FONTE: (DAVID W. BALL, W. HILL; SCOTT, 2011)

2.5 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DE ANÁLISE DE PROTEÍNAS

Após a digestão, a amostra deve ser preparada para análise no espectrômetro de massas. Para análise de peptídeos via cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, existem alguns cuidados necessários, que não devem ser esquecidos. A espectrometria de massas é uma técnica muito sensível e descuidos quanto a pureza e compatibilidade dos reagentes, concentrações e solubilidade adequados devem ser monitorados (KINTER; SHERMAN, 2000).

Quando são analisados peptídeos obtidos a partir de proteínas não purificadas, a amostra torna-se extremamente complexa. O ideal nesses casos é que se trabalhe com proteína conhecida e mais abundante para que informações importantes não sejam perdidas. Outra consideração importante a ser feita é a possibilidade de diluir a amostra antes da injeção. Devido aos seus sítios de protonação básicos, peptídeos ionizam muito bem, produzindo sinais intensos em um espectro de massas. Muitas vezes a diluição contribui para melhora do sinal, evitando supressão iônica e o acúmulo de resíduos no equipamento (KINTER; SHERMAN, 2000).

2.5.1 Análise cromatográfica

A cromatografia de peptídeos segue os mesmos princípios aplicados aos compostos orgânicos, através da separação dos compostos em função da sua

polaridade (COLLINS, 2006). Como tendem a apresentar polaridades médias a altas, em um gradiente que varie entre 20% a 80% de solvente orgânico, praticamente todos os peptídeos são eluídos (KINTER; SHERMAN, 2000).

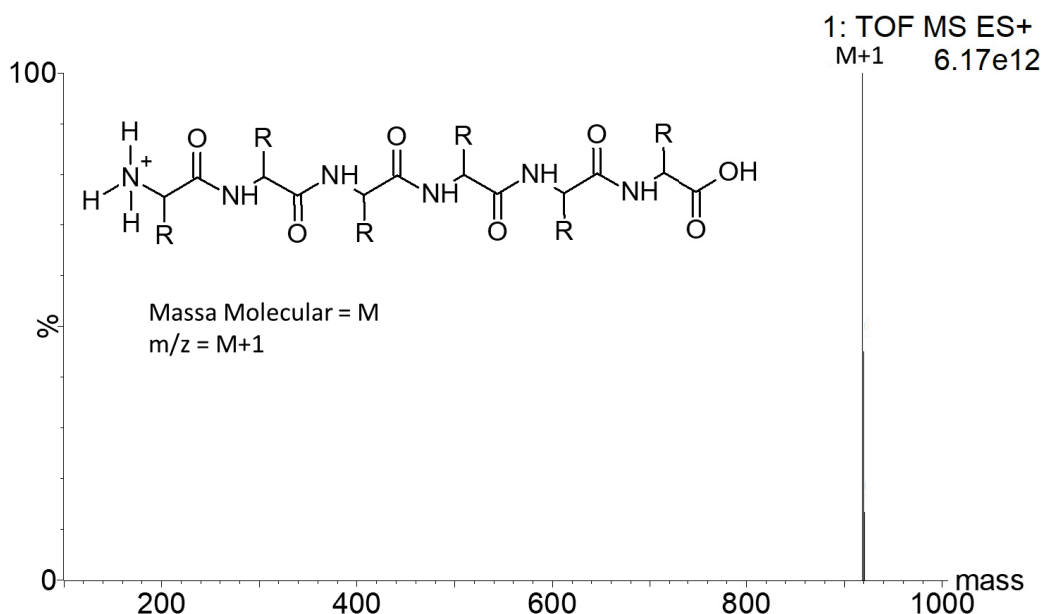
A possibilidade de acoplamento entre as técnicas é muito vantajosa, pois permite a separação dos peptídeos e sua análise individualmente. Além disso, a separação auxilia na ionização, uma vez que a possibilidade de supressão iônica é minimizada (KINTER; SHERMAN, 2000).

2.5.2 Análise espectrométrica

Peptídeos apresentam características particulares quando analisados por espectrometria de massas.

As principais digestões na ligação peptídica liberam sempre uma porção N-terminal, onde está presente o grupo amina, facilmente protonado no modo positivo de ionização. Dessa forma, observam-se os íons dos peptídeos intactos, chamados íons precursoros. A FIGURA 13 apresenta o espectro de massas do peptídeo de massa "M", monoprotonado $[M+H]^+$.

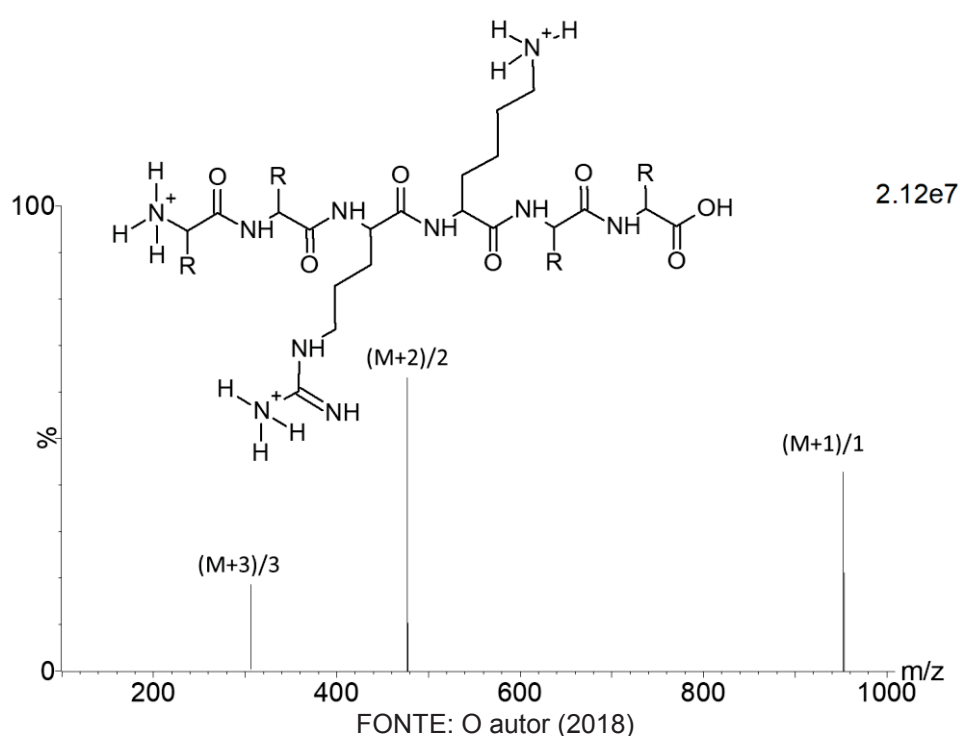
FIGURA 13. ESPECTRO DE MASSAS MS E ESTRUTURA QUIMICA DE PEPTÍDEO EXEMPLO, MONOPROTONADO



FONTE: O autor (2018)

Quando o peptídeo apresenta aminoácidos com cadeias laterais básicas, como Histidina, Lisina e Arginina, existe também alta probabilidade de encontrar as formas multiprotonadas (FIGURA 14). Essas estruturas coexistem na fonte de ionização, por isso as três apresentações da mesma molécula são visualizadas no espectro (KINTER; SHERMAN, 2000).

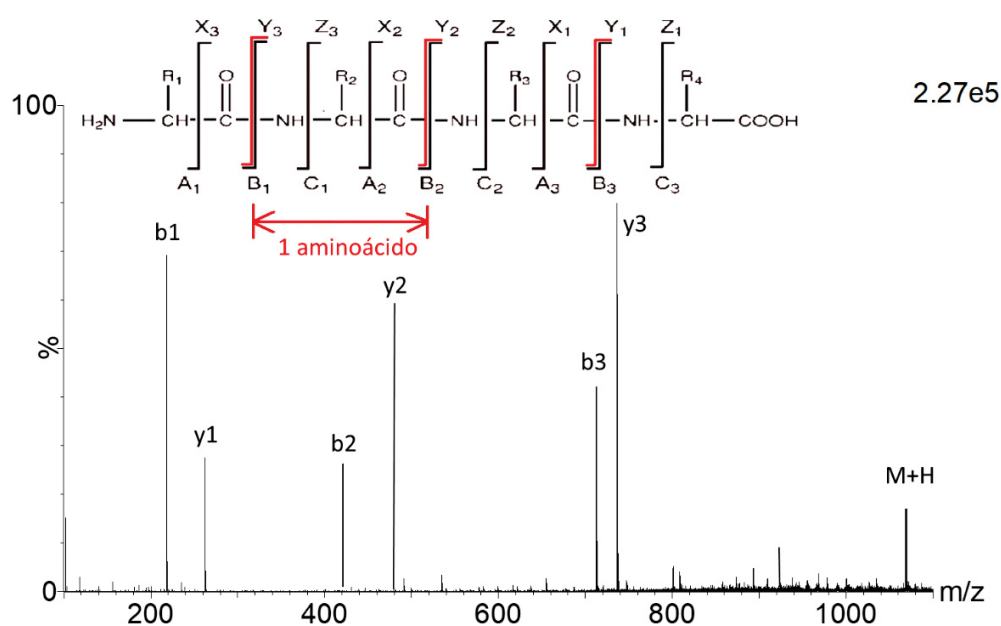
FIGURA14. REPRESENTAÇÃO DE ESPECTRO DE MASSAS DE PEPTÍDEO MULTIPROTONADO



No caso de análises estruturais é necessário fragmentar o íon através de uma energia de colisão. Esses fragmentos serão utilizados para elucidar a sequência de aminoácidos do peptídeo. Os íons resultantes são chamados íons fragmentos e fazem parte da análise do tipo MS/MS ou MS2. A energia interna adquirida induz a transferência intramolecular dos prótons em cada peptídeo, culminando na desestabilização das ligações do esqueleto polipeptídico e, por consequência, induzindo a formação de íon-fragmentos (KINTER; SHERMAN, 2000). Esses íons são classificados como os que retêm a carga residual (próton) no lado N-terminal (gerando fragmentos -a, -b e -c, dependendo da ligação que é fragmentada); íons

que retém a carga residual (próton) na região C-terminal (gerando os fragmentos -x, -y -z, dependendo da ligação que é fragmentada), segundo a nomenclatura proposta por Roepstorff–Fohlmann–Biemann (ROEPSTORFF; FOHLMAN, 1984) (FIGURA 15). É importante enfatizar que os pares de íons a/x, b/y e c/z serão sempre íons correspondentes aos fragmentos opostos e complementares entre si. Considerando que as ligações peptídicas são aquelas menos energéticas, espera-se que a formação do par de fragmentos -b/-y seja mais frequente que os demais pares de fragmentos, facilitando a interpretação dos espectros (CANTÚ et al., 2008).

FIGURA 15. EXEMPLO DE ESPECTRO DE MASSAS DE FRAGMENTAÇÃO (MS/MS) DE PEPTÍDEO



FONTE: O autor (2018)

A partir dessas informações são analisados os espectros de massas dos peptídeos, resultando em sua caracterização a nível molecular.

2.5.3 Análise de dados de validação

Quando um método tem por objetivo a quantificação de determinada substância é necessário que este método seja validado. Diversos ensaios são executados visando garantir a qualidade nas análises de modo que esses métodos

sejam reprodutíveis e confiáveis. Diferentes guias estão disponíveis para orientação da validação de métodos bioanalíticos (BRASIL, 2012; EMA, 2012; FDA, 2001). Porém, quando se trata de quantificação de proteínas e principalmente proteínas já presentes no organismo, algumas modificações são necessárias. Até o presente momento não existe guia oficial para validação de métodos de quantificação de proteínas através de técnicas como espectrometria de massas. Alguns artigos recentes trazem direcionamentos interessantes que podem ser seguidos até a elaboração de um documento oficial (JENKINS et al., 2015; RIFAI, 2006; VAZVAEI; DUGGAN, 2014). O princípio dos testes é o mesmo das técnicas bioanalíticas tradicionais, por isso mantemos os critérios de validação de métodos bioanalíticos de acordo com a RDC nº27, de 17 de maio de 2012.

2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Cada método tem sua particularidade e está sujeito a efeitos da matriz e as variações características de cada analito. Logo, para que a correta interpretação dos seus resultados seja alcançada, é primordial garantir a qualidade nas análises de modo que esses métodos sejam reprodutíveis e confiáveis (SHAH, 2007).

Todavia, otimizações não garantem o desempenho de um método, sendo necessárias ações que demonstrem sua adequabilidade (IUPAC, 1995). Assim, é essencial que os princípios de validação dos métodos bioanalíticos sejam estabelecidos e aplicados de acordo com a orientação de órgãos regulamentadores (SHAH, 2007).

A maioria das técnicas bioanalíticas empregadas inclui, mas não se limita, à métodos cromatográficos (cromatografia a gás com detector por ionização de chama, cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV, cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, entre outros), radioimunoensaio e enzimáticos (ELISA), sendo que os princípios e procedimentos de validação são comuns para todos os métodos. Dessa forma, independente da técnica escolhida, os parâmetros de seletividade, precisão, exatidão, curva de calibração, limite de quantificação e estabilidade das amostras e soluções de trabalho devem ser

avaliados (BRASIL, 2003; SHAH, 2007). Mais recentemente foram incluídos como parâmetros a serem avaliados o efeito matriz e efeito residual (BRASIL, 2012)

A definição destes parâmetros, bem como a faixas de aceitação e os procedimentos a serem adotados encontram-se descritos em diversos guias de validação disponíveis na literatura, sendo o principal deles o *Guidance for Industry* do *Food and Drug Administration*, empregado como documento base de orientação da indústria farmacêutica dos Estados Unidos.

No Brasil, as orientações são fornecidas através da Resolução RDC n°27, de 17 de maio de 2012, a qual dispõe sobre os requisitos mínimos para validação de métodos bioanalíticos no Brasil, regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, que revoga a RE 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2012). De acordo com este órgão, a etapa de validação deve preceder a implementação de um método, e é imprescindível que todos os parâmetros sejam validados. Os parâmetros citados serão detalhados a seguir.

2.6.1 Seletividade

Este parâmetro é definido como a habilidade de um método analítico de medir e diferenciar o analito e seu padrão interno (PI) de outros componentes que possam estar presentes na amostra como metabólitos, impurezas, produtos de degradação ou componentes da matriz (BRASIL, 2003; 2012; ICH, 2005). O padrão interno (PI) é uma substância química que deve ter propriedades físico-químicas similares às dos analitos. O PI deve apresentar concentração fixa, adicionada aos padrões de calibração, às amostras de CQs e às amostras em estudo, com o intuito de minimizar erros aleatórios e sistemáticos causados durante o procedimento analítico. Uma vez que o PI é exposto às mesmas condições experimentais que o analito, pequenas variações ocorridas durante a preparação amostral e a corrida analítica podem ser corrigidas. (BRASIL, 2012)

Os termos seletividade e especificidade têm sido definidos pelo *International Conference on Harmonization* (ICH) com o mesmo significado, porém, apesar de gerar certa confusão, deve-se utilizar apenas o termo seletividade como sugerido pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* - IUPAC e pela *Association*

of Analytical Communities - AOAC International (USP, 2007; VESSMAN, 1996). O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial do Brasil (INMETRO), oferece uma definição mais detalhada sobre este parâmetro, inferindo que um método de separação que causa resposta para uma única substância de interesse pode ser chamado específico e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum pode ser chamado de seletivo (INMETRO, 2003).

Para um método instrumental de separação, a seletividade é o primeiro parâmetro a ser avaliado e deve ser continuamente monitorado durante toda a validação (RIBANI et al., 2004). Em geral, os interferentes observados nas análises biológicas são os componentes da matriz biológica, metabólitos, produtos de degradação e medicamentos utilizados concomitantemente ao estudo.

Para realizar o ensaio de seletividade, amostras de plasma ou soro isentas do analito de interesse devem ser obtidas de seis indivíduos, sendo quatro normais, uma lipêmica e uma hemolisada. As amostras devem ser analisadas sob condições controladas referentes ao tempo, alimentação e outros fatores importantes para o estudo. Quando a matriz biológica isenta do analito não estiver disponível, a seletividade pode ser testada pela comparação das inclinações de, no mínimo, 6 (seis) curvas de adição padrão em 6 (seis) amostras de fontes distintas de matriz biológica. Os resultados devem ser comparados e é considerado seletivo se as inclinações das curvas não forem significativamente diferentes (BRASIL, 2012).

2.6.2 Controle de Qualidade

Os controles de qualidade (CQ) utilizados em uma corrida analítica são amostras da matriz biológica fortificadas com o analito de interesse em diferentes níveis de concentração. Essas amostras têm papel fundamental para monitorar o desempenho de um método bioanalítico, bem como para avaliar a integridade e validade dos resultados das amostras desconhecidas analisadas numa corrida individual (BRASIL, 2003; 2012).

Recomenda-se que as amostras de CQ sejam incorporadas em intervalos adequados, dependendo do número total de amostras da corrida, sempre em igual

número de réplicas para cada concentração. O número de CQ a ser incorporado em cada corrida analítica não deve ser inferior a seis amostras ou 5% (cinco por cento) caso o número de amostras desconhecidas analisadas seja superior a 100 (BRASIL, 2003). Para um ensaio bioanalítico devem ser considerados:

- CQ do Limite inferior de Quantificação (CQ-LIQ): mesma concentração de LIQ, menor nível de concentração da curva analítica;
- CQ de Baixa Concentração (CQB): menor ou igual 3 x LIQ;
- CQ de Média Concentração (CQM): aproximadamente a média entre CQB e CQA;
- CQ de Alta Concentração (CQA): 75 a 90% da maior concentração da curva de calibração.

2.6.3 Efeito residual (*Carryover*)

O teste de efeito residual, também conhecido como *carryover*, foi incluído na lista de testes necessários para validação de métodos analíticos na normativa publicada pela ANVISA (BRASIL, 2012), mas, devido sua importância, já era frequentemente realizado. A resolução RDC 27, de 17 de maio de 2012, define efeito residual como sendo o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou padrão interno (PI) causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. Desta forma, consiste em um ensaio que visa garantir que a amostra anterior não interfira na amostra seguinte, em função de resíduos retidos na coluna cromatográfica ou em qualquer outra parte do equipamento.

Caso sejam encontrados, as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta do analito nas amostras processadas do limite inferior de quantificação (LIQ). As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% (cinco por cento) da resposta do PI (BRASIL, 2012).

A RDC também prevê que se o efeito residual for inevitável, procedimentos específicos devem ser adotados na execução do método com o objetivo de controlar

seu efeito, evitando que a precisão e a exatidão do método sejam afetadas (BRASIL, 2012).

2.6.4 Efeito Matriz

Assim como o teste de efeito residual, o teste de efeito matriz não era obrigatório para validação de métodos bioanalíticos. A nova resolução define efeito matriz como efeito na resposta do analito ou PI causado por componentes da matriz biológica (BRASIL, 2012).

Este ensaio veio a substituir o já conhecido teste de recuperação que apresentava algumas limitações. O objetivo principal atual não é apenas apresentar a melhor eficiência de extração do analito e sim, extrair a menor quantidade de interferentes da matriz. Muitas vezes, o que era apresentado como um excelente sinal analítico estava mascarado por componentes da matriz. Através deste ensaio garante-se que, mesmo não obtendo a melhor recuperação, não há nenhum componente da matriz influenciando a análise. Esse parâmetro apresenta valor significativo nas análises, uma vez que a utilização de matrizes muito complexas na espectrometria de massas pode causar supressão iônica, comprometendo significativamente a qualidade do sinal analítico (ANNESLEY, 2003; DETTMER, ARONOV; HAMMOCK, 2007).

Devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas, posteriormente adicionadas de analito e PI, as quais serão comparadas com soluções, nas mesmas concentrações. Devem ser avaliados CQB e CQA.

Essas amostras serão comparadas com as respectivas soluções, utilizando o Fator Matriz Normalizada por PI (FMN), calculado segundo a seguinte fórmula:

EQUAÇÃO 2. FÓRMULA PARA CÁLCULO DO FATOR MATRIZ NORMALIZADO

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}}$$

FONTE: (BRASIL, 2012)

O Coeficiente de variação entre todos os FMN não pode ser superior a 15% (BRASIL, 2012).

2.6.5 Curva de calibração

A curva de calibração é definida como a relação entre a resposta do instrumento frente a concentrações conhecidas do analito (BRASIL, 2003; 2012; FDA, 2001). Ao utilizar o PI na construção da curva de calibração, as concentrações do composto de interesse são relacionadas com as razões sinal de resposta do analito/sinal de resposta do PI. A validação, quanto a este parâmetro, deve garantir um máximo de precisão, exatidão e confiança nos resultados, permitindo a visualização dos valores de concentração que se encontram em um intervalo linear de resposta (POLESELLO, 1996; USP, 2007).

Uma curva de calibração deve ser gerada para cada analito e corrida analítica, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo. Cada curva deve incluir a análise da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do analito e do padrão interno), da amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e de, no mínimo, seis níveis distintos de concentração, sendo que quaisquer procedimentos alternativos deva ser justificados. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados sendo recomendável o modelo matemático mais simples, geralmente o linear. Caso a variância do erro não seja constante em toda a faixa de quantificação do método analítico, deve ser utilizada a ponderação que apresentar o menor valor para soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração versus seus valores obtidos pela equação da curva. Os critérios de aceitação da curva de calibração são:

- Desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LIQ;
- Desvio menor ou igual a 15 % em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração;
- No mínimo 75% dos padrões da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o CQ-LIQ e a maior concentração da curva de calibração;

- No mínimo seis padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo CQ-LIQ e LSQ, aprovados conforme os critérios anteriores (BRASIL, 2012).

2.6.6 Precisão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogeneia, sob condições idênticas de ensaio (ICH, 2005; USP, 2007). Pode ser definido como proximidade dos resultados obtidos por repetidas determinações de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz (BRASIL, 2012). Este parâmetro é avaliado utilizando-se, pelo menos, cinco níveis de concentrações. Cada curva deve incluir a análise da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do analito e do padrão interno), da amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e de, no mínimo, cinco amostras de cada controle de qualidade (CQs) contendo o padrão interno e o padrão do analito em concentrações pré-estabelecidas (BRASIL, 2012). Esses controles devem contemplar a faixa de variação do procedimento analítico, sendo necessário no mínimo, cinco replicatas para cada nível de concentração. A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída) e em, no mínimo, três corridas em dias diferentes (precisão intercorrídas) (BRASIL, 2012).

A precisão pode ser expressa em termos da característica da dispersão dos resultados, ou seja, através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) (BRASIL, 2003; 2012; INMETRO, 2003; USP, 2007). Como valores de referência não se admitem variações superiores a 15%, exceto para o CQ-LIQ, onde se admite valores menores ou iguais a 20%, calculados conforme a fórmula a seguir:

EQUAÇÃO 3. FÓRMULA PARA CALCULO DO DESVIO PADRÃO RELATIVO

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP (desvio padrão)} \times 100}{\text{CME (concentração média experimental)}}$$

NOTA: DPR: desvio padrão relativo, DP: desvio padrão, CME: concentração média experimental.
 FONTE: (BRASIL, 2012)

2.6.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade entre o valor aceito como verdadeiro ou de referência em relação ao valor encontrado experimentalmente. Este parâmetro é determinado em pelo menos cinco níveis de concentração (CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) em cinco replicatas cada. Deve ser avaliado em uma mesma corrida analítica (exatidão intracorrída), e também em, no mínimo, três corridas analíticas em dias diferentes (exatidão intercorridas)(BRASIL, 2012).

A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal, segundo a fórmula a seguir (BRASIL, 2012):

EQUAÇÃO 4. FÓRMULA PARA CÁLCULO DO ERRO PADRÃO RELATIVO

$$\text{EPR (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal} \times 100}{\text{Valor nominal}}$$

FONTE: (BRASIL, 2012)

2.6.8 Estudo de Estabilidade

Um dos principais problemas relativos às amostras biológicas é a instabilidade das drogas, seus metabólitos ou ainda dos próprios metabólitos da matriz. Por isso, monitorar o comportamento da substância de interesse tanto em solução quanto na matriz é de fundamental importância para evitar a subestimação ou a superestimação da sua concentração (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

Os problemas de estabilidade podem ocorrer em qualquer etapa de um procedimento analítico (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009), mas em geral se relacionam com as condições de armazenamento, presença de enzimas, pH, anticoagulante,

ciclos de descongelamento, luz, e pelas propriedades químicas do fármaco, da matriz e do recipiente de armazenamento (BRASIL, 2003; FDA, 2001; NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Portanto um estudo de estabilidade não pode ser extrapolado se houver qualquer mudança na conduta de um ensaio bioanalítico (BRASIL, 2003; 2012; FDA, 2001).

O teste deve reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras, desta forma, a substância de interesse deve ser avaliada durante armazenagens de curta e longa duração, após ciclos de congelamento e descongelamento, e também nas condições normais de análise (BRASIL, 2003; 2012; NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Os resultados devem expressar um comparativo entre amostras com diferentes períodos de armazenagem, e amostras fortificadas com soluções estoque recém-preparadas, nas mesmas concentrações (BRASIL, 2012).

São consideradas amostras estáveis quando não forem observados concentrações com desvios superiores a 15% quando comparadas a amostras recém preparadas, com exceção do limite inferior de quantificação, para o qual é aceitável desvio de até 20% (BRASIL, 2003; 2012; FDA, 2001).

Além da estabilidade do analito em matriz biológica, deve ser comprovada a estabilidade do analito e do PI em solução. Para isso, no mínimo, três amostras da solução primária de maior concentração e da solução de trabalho de menor concentração devem ser armazenadas por tempo superior ao período de uso ou armazenamento das mesmas. As soluções serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 10% de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém preparadas (BRASIL, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS PADRÕES ANALÍTICOS E SOLVENTES

Os reagentes utilizados foram: metanol (Panreac; Barcelona, Espanha), ácido fórmico (96,0%) e acetonitrila (Tedia; Califórnia, EUA). A água ultrapura foi obtida através do Sistema de Purificação Milli-Q® da Millipore (Millipore; Bedford, EUA). Os sais utilizados foram: Acetato de Amônio (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) e cloreto de sódio (Merck; Darmstadt, Alemanha). A endoproteínase Glu-C e Tripsina, grau MS, foram obtidas junto a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O padrão de hemoglobina glicada (96%) foi obtido da empresa My Biosource (San Diego, EUA).

3.2 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SANGUE

O sangue utilizado para o desenvolvimento e validação do método foram obtidos de voluntários saudáveis, em tubos de coleta a vácuo, com EDTA K3 de 4,0ml, um total de 20 mL. Os voluntários receberam o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE - Anexo 1), com informações da pesquisa e o assinaram. As amostras de pacientes foram obtidas junto ao Laboratório de Análises Clínicas - LANAC (Curitiba-PR). O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos do setor de ciências biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob número CAAE: 30803114.0.0000.0102 (Anexo 2).

3.3 PROCEDIMENTO DE DIGESTÃO ENZIMÁTICA

3.3.1 Protocolo de digestão da hemoglobina e seleção da enzima

O preparo de amostra foi baseado no método preconizado pelo IFCC (JEPPSSON et al., 2002). Primeiramente as amostras de sangue, 0,5 mL, foram centrifugadas a 3000 g para separação do plasma. O plasma foi então descartado em descarte específico para materiais biológicos, e as células remanescentes foram

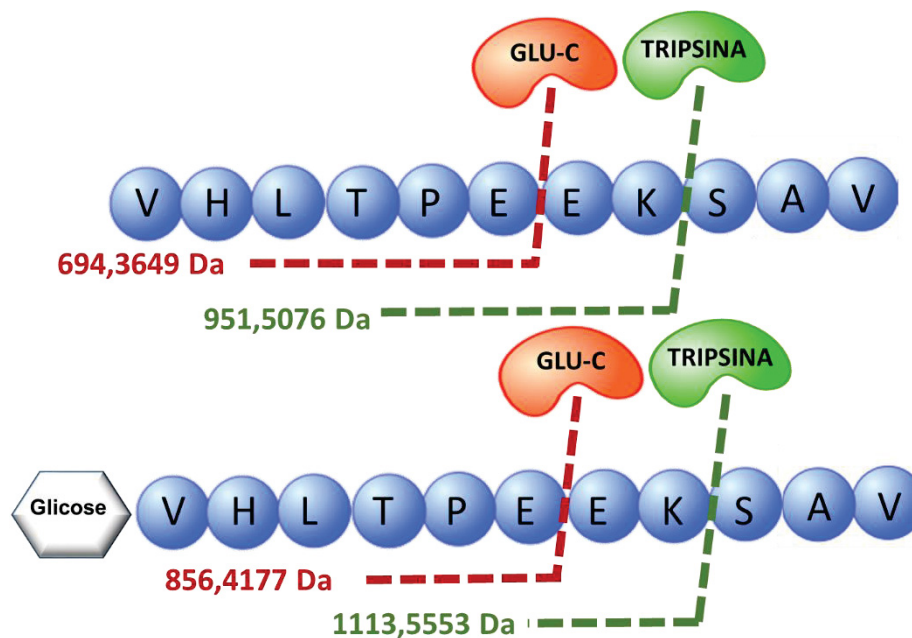
tratadas para a análise. Primeiramente as células passaram por lavagem com 1,5 mL de solução salina 0,15 M, centrifugadas (3000 g, 5 minutos, a temperatura ambiente), seguido do descarte da fração aquosa. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes para retirada de resíduos de plasma. Na sequência, a amostra foi novamente centrifugada seguida do descarte da solução salina. As células lavadas foram então hemolisadas com 1 mL de água milli-Q e centrifugadas. O hemolisado foi então quantificado quanto a hemoglobina total no equipamento Horiba Abx Micros 60 (Quioto, Japão) e diluído para 5 mg/mL com solução salina.

Uma alíquota contendo 0,5 mg de hemoglobina total foi retirada para digestão enzimática, aproximadamente 100 μ L. Para cada alíquota, foi utilizado 50 μ L da solução de Glu-C, 100 μ g/mL, e completado para um volume final de 250 μ L com acetato de amônio 50 mM, pH 4,3. A mistura foi mantida a 37°C, sob agitação, por 18 horas.

Para o teste de comparação das enzimas, o mesmo protocolo foi utilizado, porém, para enzima tripsina, foi utilizado o tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,4. Após o período de digestão, as amostras foram diluídas 20 vezes em tampão acetato de amônio pH 4,3 (10 μ L para um volume final de 200 μ L), contendo 20 μ g de hemoglobina total, atingindo a concentração final de 0,1 μ g/ μ L de hemoglobina.

Os sinais peptídicos foram comparados com a digestão teórica obtida da ferramenta ExPASy™ PeptideMass. A sequência de proteínas utilizada foi a subunidade de hemoglobina beta (p-68871) (betaglobina) e a subunidade de hemoglobina alfa (p-69905) (alfaglobina) de UniProtKB / SwissProt. O acordo entre os peptídeos experimentais e teóricos também foi avaliado. Todos os parâmetros cromatográficos e espectrométricos foram mantidos iguais para a comparação das digestões. A FIGURA 16 apresenta um esquema da digestão enzimática da hemoglobina glicada e não glicada para obtenção dos peptídeos de interesse.

FIGURA 16. REPRESENTAÇÃO DA DIGESTÃO ENZIMÁTICA DA MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA (PORÇÃO N-TERMINAL DA CADEIA BETA), GLICADA E NÃO GLICADA, ATRAVÉS DA ENZIMA GLU-C E TRIPSINA.



FONTE: O autor (2018)

3.3.2 Digestão do padrão HbA1c

Após a seleção do protocolo de digestão, o padrão de hemoglobina glicada foi digerido, conforme descrito no item 3.3.1, p.63, de modo a obter um padrão 15 µg/mL de HbA1c. Esse digerido foi utilizado para fortificar as amostras de validação.

3.3.3 Preparo das amostras de validação do método (matriz de validação)

Para o preparo das amostras para validação foi utilizado sangue total com concentração conhecida de HbA1c como matriz de validação. Esse sangue total foi quantificado quanto HbA1c (4,4%) através do método de eletroforese capilar, certificado pelo NGSP (Laboratório LANAC, Curitiba-PR). Essa amostra de sangue padronizada foi digerida conforme descrita anteriormente (item 3.3.1, p.63) e utilizada como matriz das amostras de validação. As amostras de validação foram compostas de matriz (10 µL contendo 20 µg do padrão interno, hemoglobina total), padrão de hemoglobina glicada digerido (10 µL à 80 µL, dependendo da

concentração desejada: 4,4%; 5,9%; 7,4%; 8,9%; 10,4%; 11,9%; conforme TABELA 1. p.72) e tampão acetato de amônio, 50 mM, pH 4,3 (q.s.p 200 µL).

3.4 INSTRUMENTAÇÃO

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Acquity H-Class da Waters Corporation (Milford, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo- tempo de voo, Q-TOF, (Xevo G2-S, Waters, Milford, EUA) com fonte de ionização por *Electrospray*, operando no modo positivo de ionização.

3.5 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Para a separação dos analitos foram testadas diferentes colunas: C8 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm), Acquity UPLC® HSS Cyano (100 x 2,1 mm, 1,8 µm) e coluna Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm), Waters Corporation, (Irlanda). Para a fase móvel foram avaliadas diferentes proporções de água e acetonitrila, com ácido acético e ácido trifluoroacético como aditivos. Diferentes temperaturas da coluna, volumes de injeção e fluxo também foram testados.

Todos os parâmetros foram testados de forma a obter a melhor qualidade de sinal analítico. Além disso, também foram avaliados diferentes aditivos e em diferentes proporções. A amostra digerida foi analisada para checagem e otimização do sinal dos peptídeos glicosados e não glicosados. Os parâmetros da fonte de ionização avaliados foram: a voltagem do capilar e do cone, *source offset*, temperatura da fonte e de dessolvatação, fluxo do gás do cone e do gás de dessolvatação. Os dados foram adquiridos no modo positivo de ionização e o intervalo de aquisição definido entre 50 a 1200 *m/z*.

3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Após o estabelecimento das condições de digestão enzimática e otimização das condições analíticas, partiu-se para o preparo de amostras para a validação do método analítico. Uma alíquota de 10 µL de matriz de validação, contendo 20 µg do padrão de hemoglobina total, foi fortificada com o padrão HbA1c (15 µg/mL) e completadas ao volume final de 200 µL com tampão acetato de amônio 50 mM, pH 4,3, de modo a obter as concentrações de HbA1c, conforme a TABELA 1. A adição de alíquotas de 20 µL do padrão de HbA1c (contendo 0,30 µg de HbA1c) à matriz de validação (20 µg de hemoglobina total) resultou em um aumento de 1,5% na razão HbA1c/hemoglobina total (Hb).

TABELA 1. NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DE HbA1c NA CURVA DE CALIBRAÇÃO.

Analito	Nível	Volume de fortificação (µL)	Concentração final HbA1c/Hb (µg/µg)	Concentração Final HbA1c/Hb (%)
HbA1c	1 (CQ-LIQ)	-	0,88/ 20	4,4
	2 (CQB)	20,0	1,18/ 20	5,9
	3	40,0	1,48/ 20	7,4
	4 (CQM)	60,0	1,78/ 20	8,9
	5 (CQA)	80,0	2,08/ 20	10,4
	6 (LSQ)	100,0	2,38/ 20	11,9
Hemoglobina total	-	10 µL	20 µg	100%

CQ-LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: Controle de qualidade de baixa concentração; CQM: Controle de qualidade de média concentração; CQA: Controle de qualidade de alta concentração; HbA1c: Hemoglobina glicada; Hb: Hemoglobina total

FONTE: O autor (2018)

3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A validação do método desenvolvido foi baseada nos critérios estabelecidos na RDC n° 27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos (BRASIL, 2012); juntamente com as considerações do *Food*

and Drug Administration (FDA, 2001) e o consenso oficial de companhias e organizações dos Estados Unidos e Canadá (JENKINS et al., 2015). De acordo com esses guias, para que um método bioanalítico seja considerado adequado, deve atender aos requisitos de seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração, precisão (intra e intercorrida), exatidão (intra e intercorrida) e estabilidade (BRASIL, 2012).

3.7.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através do método da comparação de curvas de calibração provenientes de diferentes matrizes (sangue), uma vez que a matriz biológica isenta do analito não é disponível. Foram comparadas as inclinações de seis curvas de adição padrão obtidas a partir de matrizes de fortificação distintas, contendo o mesmo nível de hemoglobina glicada (4,4%). O método é considerado seletivo se as inclinações das curvas não forem significativamente diferentes.

Para a realização deste ensaio, foram utilizadas 6 diferentes amostras, as quais passaram pelo processo de digestão conforme descrito no item 3.3.1, p.63. Para preparo da amostra fortificada foi aliquoteado 10 µL de cada amostra, ao qual foi adicionado volumes suficientes do padrão de HbA1c digerido, de modo a obter as concentrações de 4,4%; 5,9%; 7,4%; 8,9%; 10,4% e 11,9% de HbA1c, conforme a TABELA 1 (p.72).

As curvas obtidas com as diferentes matrizes foram sobrepostas e seus coeficientes de inclinação comparados estatisticamente.

3.7.2 Efeito Residual (*Carryover*)

O teste de *carryover* foi realizado com a finalidade de verificar se há arraste do analito da amostra anterior em amostras posteriores. O ensaio consistiu de injeção de uma amostra branco (diluyente), seguida da injeção de uma amostra de matriz fortificado na concentração do nível mais alto da curva de calibração, o limite superior de quantificação (LSQ). Logo após a injeção da amostra fortificada, a mesma amostra branco analisada anteriormente foi resubmetida. Nenhum pico de

interferência significativa (20% da área do LIQ) deve ser observado nos cromatogramas dos brancos nos mesmos tempos de retenção dos analitos (BRASIL, 2012).

3.7.3 Efeito Matriz

Para realizar o teste de efeito matriz, foram preparadas 12 réplicas em solução e 12 réplicas contendo 10 µL de matriz de validação. As concentrações foram equivalentes ao do CQB, 5,9% de HbA1c (6 replicatas), e ao CQA (10,4% HbA1c), diluídas em tampão acetato de amônio 50 mM.

As amostras de matriz foram obtidas de seis fontes distintas, sendo duas lipêmicas, e foram fortificadas, de modo a obter seis amostras no nível do CQB e seis amostras no nível do CQA.

Para cada amostra, foi calculado o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme descrito no item 2.6.4, p.58. O Coeficiente de Variação (CV%) entre os FMNs relativos às amostras e suas respectivas soluções não deve apresentar valores superiores a 15% (BRASIL, 2012).

3.7.4 Curva de calibração e Controles de Qualidade

A curva de calibração foi estabelecida através do método da padronização interna, utilizando a hemoglobina total como padrão interno, na concentração fixa de 20 µg/200 µL. As curvas de calibração foram preparadas em triplicada, em seis níveis de concentração, durante três dias consecutivos, conforme descrito no item 3.6 (TABELA 1, p.67).

As curvas de calibração foram construídas através do método da padronização interna, ou seja, utilizando a razão entre a área do padrão (glu-VHLTPE) e o padrão interno (VHLTPE) correlacionada com a concentração de hemoglobina glicada, em porcentagem (HbA1c/Hb). Para cada nível de concentração, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV%) foram calculados. A regressão linear utilizada foi 1/x.

Para confirmar a linearidade, foi calculado o erro padrão relativo (EPR%) entre o valor obtido experimentalmente e o valor teórico. Não devem ser observadas variações superiores a 15% em relação a concentração nominal do nível da curva, exceto para o CQ-LIQ onde é aceitável variações até 20%. Além disso, segundo Jenkins, são aceitas variações até 20% e 25% para peptídeos, respectivamente (JENKINS et al., 2015). Para métodos bioanalíticos, é recomendável que o coeficiente de correlação (r) seja igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003).

As amostras de CQ foram preparadas da mesma maneira que na curva de calibração, conforme descrito no item 3.6, p.67, sendo neste caso avaliadas cinco réplicas de cada CQ. O critério de aceitação da curva de calibração exige que 75% dos controles preparados apresentem desvio padrão inferior a 15% quando comparado ao valor nominal, exceto para o CQ-LIQ onde não devem ser observadas variações maiores que 20% (BRASIL, 2012).

3.7.5 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas 3 vezes, em três dias consecutivos (intra e intercorrida). Para tanto, foram preparadas cinco réplicas de cada um dos controles, conforme descrito no item 3.6, p.67, de modo a obter as concentrações descritas na (TABELA 1 p.72).

A precisão foi expressa em termos do coeficiente de variação (CV%) conforme o item 2.6.6, p.60, entre as concentrações de HbA1c obtidas experimentalmente, em um mesmo nível de concentração. A exatidão foi calculada através do valor de EPR%, conforme o item 2.6.7, p.61, em cada nível de concentração. Para ambos, precisão e exatidão, são exigidos erros menores que 15%, exceto para o CQ-LIQ onde os desvios não devem exceder 20% (BRASIL, 2012).

3.7.6 Estudo de Estabilidade

Foram avaliadas as estabilidades em matriz nas condições: Pós-Processamento, de Curta Duração, após Ciclos de Congelamento e

Descongelamento e de Longa Duração. A estabilidade das soluções estoque e de trabalho não foram avaliadas uma vez que as soluções de fortificação (padrão de HbA1c digerido, 20 µg/mL) e as matrizes de fortificação (amostra padronizada 4,4% de HbA1c) utilizadas na validação foram preparadas no momento das análises. A matriz utilizada na curva de calibração foi digerida no mesmo momento em que as amostras a serem quantificadas, para evitar variações relacionadas a digestão.

3.7.6.1 Estabilidade em matriz biológica

Para avaliação da estabilidade em matriz pós-processamento foram utilizadas matrizes de validação fortificadas nas concentrações do CQB (5,9% de HbA1c) e CQA (10,4% de HbA1c). O ensaio pós-preparativo avaliou a estabilidade das amostras após 24 horas de armazenamento no gerenciador de amostras (a temperatura ambiente, em vial transparente).

Para que os testes de estabilidade de curta duração, após ciclos de congelamento e descongelamento e de longa duração representassem o resultado mais próximo possível de uma situação real de análise de rotina, foram utilizadas amostras reais, de concentração conhecida de HbA1c, próximas aos valores de CQB e CQA (5% e 11%, respectivamente).

Para o ensaio de estabilidade de curta duração, as amostras de sangue total foram mantidas sobre a bancada por 6 horas, a temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a digestão enzimática, conforme descrito no item 3.3.1, p.63 Uma alíquota de 10 µL do digerido foi diluído para o volume final de 200 µL e analisada.

O teste de congelamento e descongelamento avaliou a amostra após três ciclos de congelamento e descongelamento do hemolisado (1 ciclo por dia, 3 dias consecutivos). Em seguida foi realizada a digestão enzimática, conforme descrito no item 3.3.3, p.65. Uma alíquota de 10 µL do digerido foi diluído para o volume final de 200 µL e analisada.

Para verificação da estabilidade de longa duração, o hemolisado das amostras (5% e 10,4% de HbA1c) foram mantidos congelados a -40°C durante 15 dias. Depois deste período, o hemolisado foi digerido conforme descrito no item

3.3.1. p.63. Uma alíquota de 10 μL do digerido foi diluído para o volume final de 200 μL e analisada.

A estabilidade em todas as condições foi verificada por meio de um comparativo entre as concentrações obtidas com as amostras armazenadas, e aquelas obtidas com amostras recém preparadas. A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

3.8 APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PACIENTES DIABÉTICOS

O método desenvolvido e validado foi então aplicado a amostras reais. As amostras de sangue de pacientes do laboratório LANAC foram analisadas através do método desenvolvido para comparação dos resultados. As amostras foram primeiramente avaliadas utilizando um método de referência por eletroforese capilar, equipamento modelo Capillarys 2 Flex Piercing, Sebia (Evry, Essone), certificado pelo NGSP.

As mesmas amostras foram submetidas à análise utilizando o método LC-QTOF-MS desenvolvido. Além disso, foi realizada a quantificação das amostras em um terceiro método, utilizando um kit comercial produzido por Alamar Tecno Científica LTDA (Diadema, São Paulo), sendo este kit distribuído por Interlab Distribuidora de Produtos Científicos S.A. (São Paulo, São Paulo). O kit Glicohemoglobina Inlab utiliza uma resina de troca catiônica de ligação rápida para obter a separação da hemoglobina glicada da hemoglobina não glicada. A quantificação é realizada através de leitura em espectrofotômetro (415 nm). O método foi realizado segundo as orientações do fornecedor (ANEXO 3) e a leitura realizada em fotômetro de microplacas, modelo Multiskan FC, Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts). A comparação dos métodos foi realizada através dos valores de sensibilidade, especificidade e EPR% dos resultados provenientes do método teste, em relação aos valores obtidos com o método de referência, certificado pelo NGSP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PROTOCOLO DE DIGESTÃO E SELEÇÃO DA ENZIMA

Para seleção da enzima foram comparados os perfis cromatográficos e espectrométricos obtidos a partir da digestão por tripsina e Glu-C da mesma matriz.

Os resultados da digestão *in silico* foram utilizados para identificação dos peptídeos obtidos experimentalmente (APÊNDICES 1 e 2). A digestão com tripsina produziu seis peptídeos característicos da subunidade alfa e oito da subunidade beta. A TABELA 2 resume a sequência peptídica e a massa de cada peptídeo como $[M + H]^+$. O peptídeo tríptico (TP) 6 α foi encontrado como $[M + 2H]^{2+}$. A FIGURA 17 apresenta o cromatograma sobreposto de massas de peptídeos trípticos da hemoglobina. Os peptídeos m/z 952,5098 (2,74 min, TP2 β); m/z 1149,6738 (3,44 min, TP4 β); m/z 1126,5639 (3,50 min, TP3 β); m/z 1314,6648 (3,55 min, TP6 β); m/z 1378,7001 (3,63 min, TP7 β); m/z 1421,6729 (4,09 min, TP8 β); m/z 932,5200 (4,15 min, TP1 β); e m/z 1274,7255 (5,09 min, TP5 β); da cadeia beta e dos peptídeos m/z 532,2878 (2,29 min, posição TP1 α); m/z 729,4141 (2,37 min, TP2 α); m/z 818,4406 (3,33 min, TP3 α); m/z 1252,7147 (4,64 min, posição TP5 α); e m/z 1071,5543 (4,88, TP4 α) da cadeia alfa foram separados em menos de 6 min e identificados com um erro de massa inferior a 5 ppm. O N-terminal de valina glicado também foi observado como Gly-TP2 β , como m/z 1114,5632.

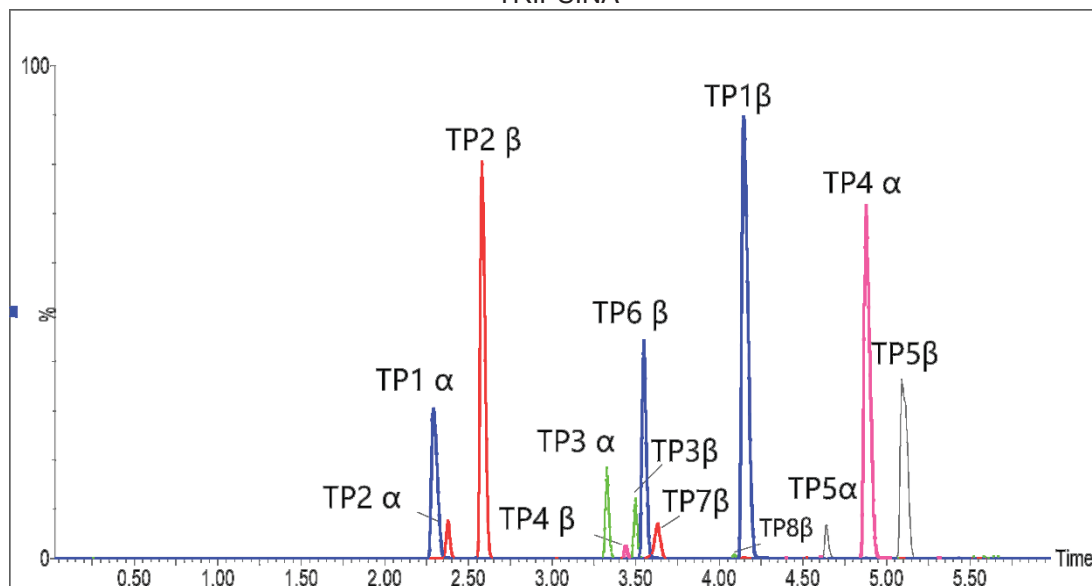
TABELA 2. PERFIL PEPTÍDICO DE HbA1c OBTIDO APÓS DIGESTÃO TRÍPTICA.

	Sequência de aminoácidos	Massa teórica (m/z)	Massa experimental (m/z)	Erro (ppm)
TP1 α	AAWGK	532,2878	532,2896	3,38
TP2 α	VLSPADK	729,4141	729,4158	2,33
TP3 α	VDPVNFK	818,4406	818,4426	2,44
TP4 α	MFLSFPTTK	1071,5543	1071,5574	2,89
TP5 α	FLASVSTVLTSK	1252,7147	1252,7156	0,72
TP6 α	VGAHAGEYGAELER	626,8610	626,8633	3,67
TP1 β	SAVTALWGK	932,5200	932,5219	2,04
TP2 β	VHLTPEEK	952,5098	952,5109	1,15
TP3 β	LHVDPENFR	1126,5639	1126,5669	2,66
TP4 β	VVAGVANALAHK	1149,6738	1149,6726	1,04
TP5 β	LLVVYPWTQR	1274,7255	1274,7284	2,27
TP6 β	VNVDEVGGEALGR	1314,6648	1314,6678	2,28
TP7 β	EFTPPVQAAYQR	1378,7001	1378,7026	1,81
TP8 β	GTFATLSELHCDK	1421,6728	1421,6716	2,04
Glc-TP2 β	Gly-VHLTPEEK	1114,5632	1114,5656	2.15

NOTA: TP α : Peptídeo obtido da digestão trípica da cadeia alfa da hemoglobina; TP β : Peptídeo obtido da digestão trípica da cadeia beta da hemoglobina, Glc-TP: glicose ligada ao peptídeo trípico.

FONTE: O autor (2018)

FIGURA 17. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE PEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS DIGESTÃO POR TRIPSINA



NOTA: Separação obtida em coluna C18, 1,7 μ m, volume de injeção 5 μ L, eluição gradiente acetonitrila e água, contendo ácido trifluoracético 0,02%, fluxo: 0,5 ml/min, temperatura 40 $^{\circ}$ C, Modo de aquisição MSe, modo positivo de ionização e voltagem do capilar 3 kV. TP: Peptídeo tríptico.
FONTE: O autor (2018)

A digestão utilizando Glu-C produziu dois peptídeos característicos da subunidade alfa e seis da subunidade beta. A TABELA 3 resume a sequência peptídica e a massa de cada peptídeo monoprotonado. Sinais de peptídeo de baixa intensidade $[M+H]^+$ foram confirmados pelo padrão de fragmentação ou pela presença de íons multicarregados ($[M + 2H]^{2+}$; $[M + 3H]^{3+}$). A FIGURA 18 apresenta o cromatograma sobreposto da massa dos peptídeos da hemoglobina obtidos após a digestão com Glu-C. Os peptídeos m/z 532,2613 (1,75 min, GP1 β); m/z 837,4465 (1,79 min, GP4 β); m/z 695,3723 (1,90 min, GP2 β); m/z 824,4148 (1,92 min, GP3 β); m/z 1180,6208 (2,28 min, GP5 β); e m/z 1616,8642 (2,37 min, GP6 β) da cadeia beta e os peptídeos m/z 1057,5312 (2,14 min, GP2 α) e m/z 1018,4773 (2,44, GP1 α) da cadeia alfa foram separados com o mesmo método usado para peptídeos trípticos, em menos de 3 min. Além disso, foi realizado a identificação dos compostos através da exatidão de massas (erro de massa ≤ 5 ppm). O terminal N da valina glicada também foi observado como Gly-GP2 β , como m/z 857,4256.

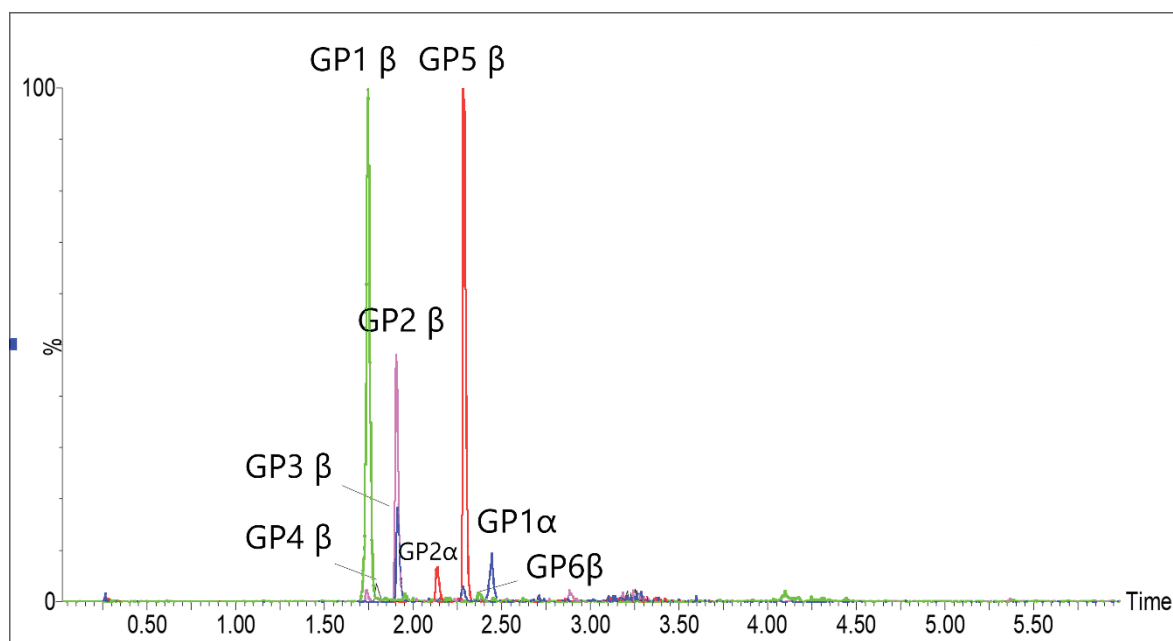
TABELA 3. PERFIL PEPTÍDICO DE HbA1c OBTIDO APÓS DIGESTÃO COM GLU-C.

	Sequência de aminoácidos	Massa Teórica	Massa Experimental	Erro (ppm)
GP1 α	MPNALSALSD	1018,4873	1018,4897	2,36
GP2 α	FTPAVHASLD	1057,5312	1057,5297	1,42
GP1 β	LSTPD	532,2613	532,2609	0,751
GP2 β	VHLTPE	695,3723	695,3713	1,44
GP3 β	VHLTPEE	824,4148	824,4140	0,97
GP4 β	KLHVDPE	837,4465	837,4475	1,19
GP5 β	NLKGTFATLSE	1180,6208	1180,6212	0,34
GP6 β	KSAVTALWGKVVNDE	1616,8643	1616,8570	4,51
Glc-GP2 β	Gly-VHLTPE	857,4256	857,4253	0,350

NOTA: GP α : Peptídeo obtido da digestão GLU-C da cadeia alfa da hemoglobina; GP β : Peptídeo obtido da digestão GLU-C da cadeia beta da hemoglobina, Glc-GP: glicose ligada ao peptídeo GLU-C

FONTE: O autor (2018)

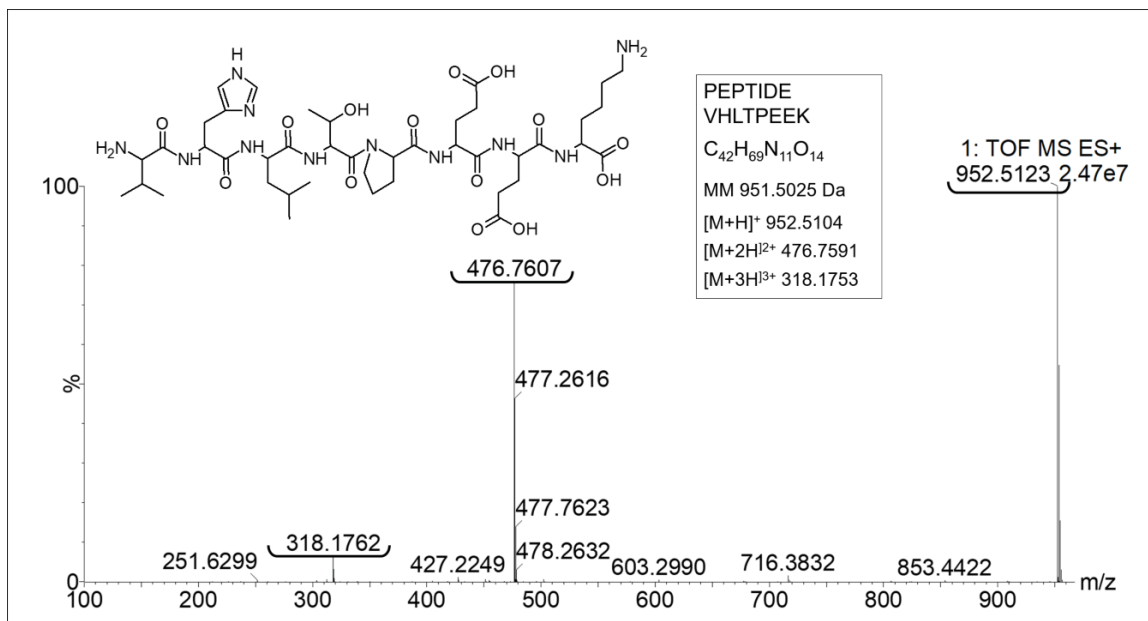
FIGURA 18. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE PEPTÍDEOS DA HEMOGLOBINA, OBTIDOS APÓS DIGESTÃO POR GLU-C



NOTA: Separação obtida em coluna C18, 1,7 μm , volume de injeção 5 μL , eluição gradiente acetonitrila e água, contendo ácido trifluoracético 0,02%, fluxo: 0,5 ml/min, temperatura 40 $^{\circ}\text{C}$, Modo de aquisição MSe, modo positivo de ionização e voltagem do capilar 3 kV. GP: Peptídeo gerado após digestão por GLU-C. FONTE: O autor (2018)

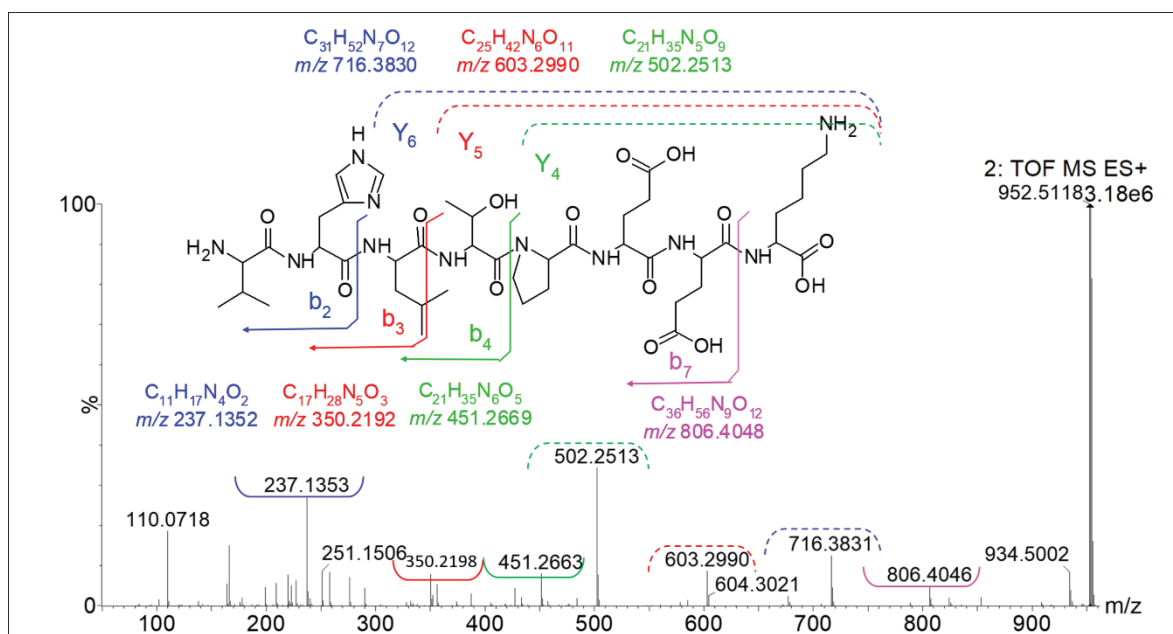
Ambas as digestões originaram um perfil peptídico representativo da hemoglobina que permitiu a visualização do peptídeo referente a HbA1c. A hemoglobina glicada é caracterizada como a hemoglobina cuja valina N-terminal da cadeia beta é glicada. Analisando esta posição na digestão trípica, existe o peptídeo TP2 β (VHLTPEEK). O pico do TP2 β é intenso e pode ser confirmado pelo espectro de massa, que apresenta íons de $[M + H]^+$, $[M + 2H]^{2+}$ e também $[M + 3H]^{3+}$, como mostrado na FIGURA 19. Os espectros de massa de alta energia, apresentaram um perfil de íons consistente, com os fragmentos y e b de VHLTPEEK FIGURA 20, confirmando a identidade do peptídeo, mesmo em uma mistura complexa como o digerido.

FIGURA 19. ESPECTRO DE MASSAS DE BAIXA ENERGIA DO PEPTÍDEO TRÍPTICO TP2 β (VHLTPEEK)



NOTA: Espectro de massas extraído do cromatograma (FIGURA 17), tempo de retenção 2,74 min, baixa energia (20eV). FONTE: O autor (2018)

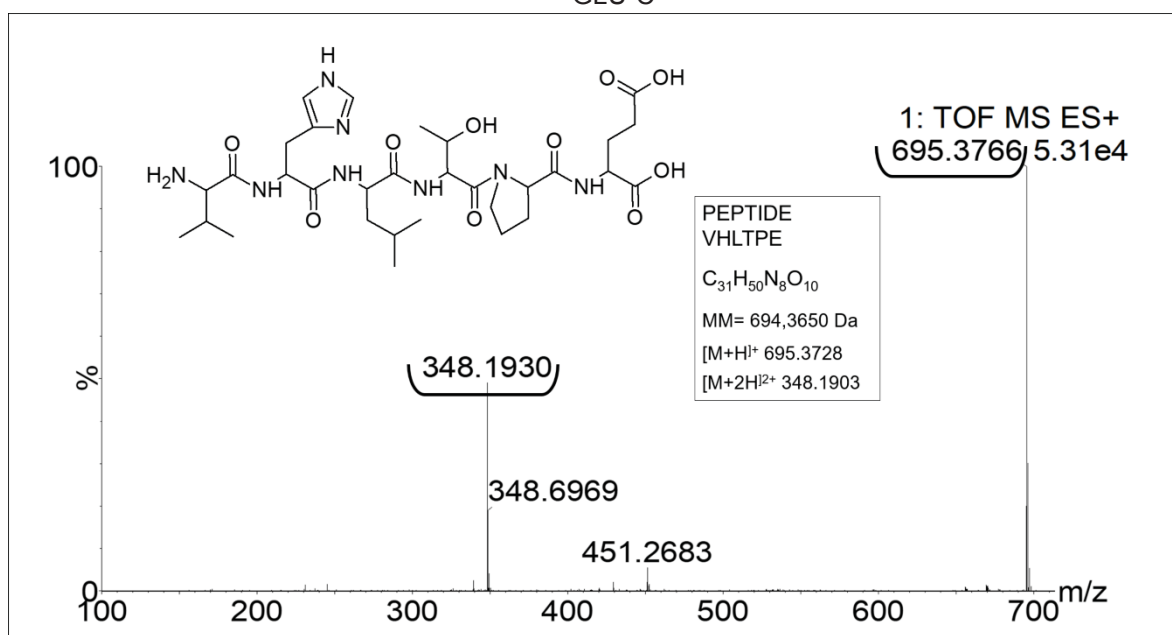
FIGURA 20. ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA ENERGIA DO PEPTÍDEO TP2B (VHLTPEEK) E SEUS PRINCIPAIS FRAGMENTOS B E Y.



NOTA: Espectro de massas extraído do cromatograma (FIGURA 17), tempo de retenção 2,74 min, alta energia (40eV). FONTE: O autor (2018)

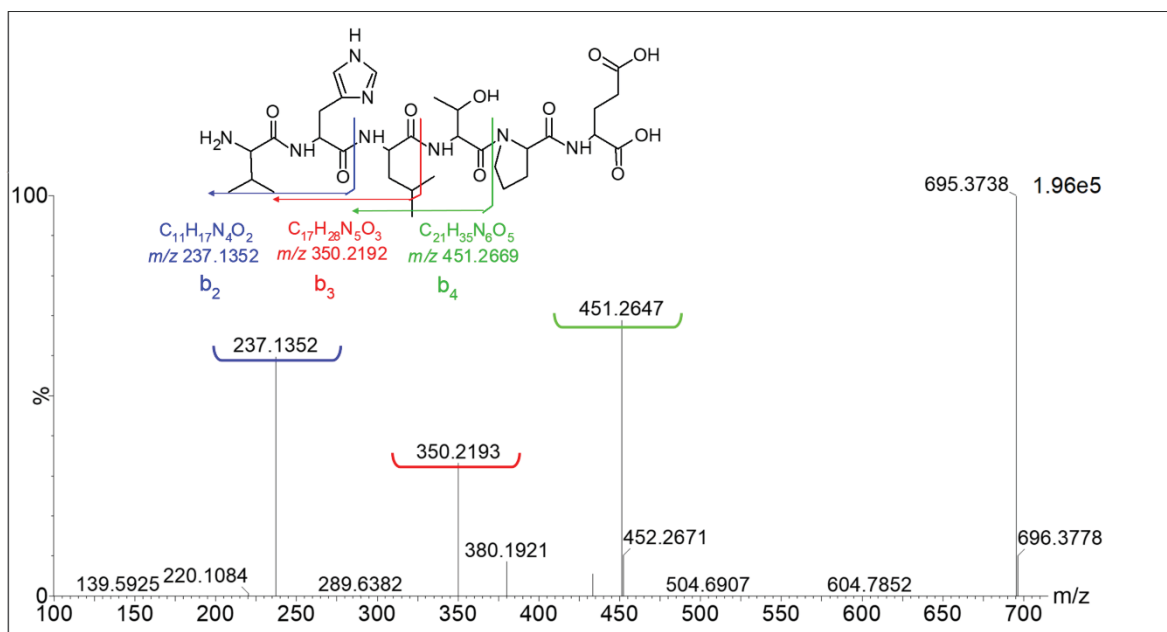
Na digestão com Glu-C, a posição contendo valina N-terminal da cadeia β produz o peptídeo GP2 β (VHLTPE). O pico correspondente a esse peptídeo também foi intenso e apresentou os íons de $[M + H]^+$ e $[M + 2H]^{2+}$ FIGURA 21. A alta energia da GP2 β , confirmou a presença dos íons b e y do fragmento VHLTPE, contribuindo para a identificação do peptídeo, FIGURA 22.

FIGURA 21. ESPECTRO DE MASSAS DO PEPTÍDEO GP2 β (VHLTPE), APÓS DIGESTÃO POR GLU-C



NOTA: Espectro de massas extraído do cromatograma (FIGURA 18), tempo de retenção 1,90 min, baixa energia (20eV). FONTE: O autor (2018)

FIGURA 22. ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA ENERGIA DO PEPTÍDEO TRÍPTICO TP2 β (VHLTPPEEK) E SEUS PRINCIPAIS FRAGMENTOS B E Y.



NOTA: Espectro de massas extraído do cromatograma (FIGURA 18), tempo de retenção 1,90 min, alta energia (40eV). FONTE: O autor (2018)

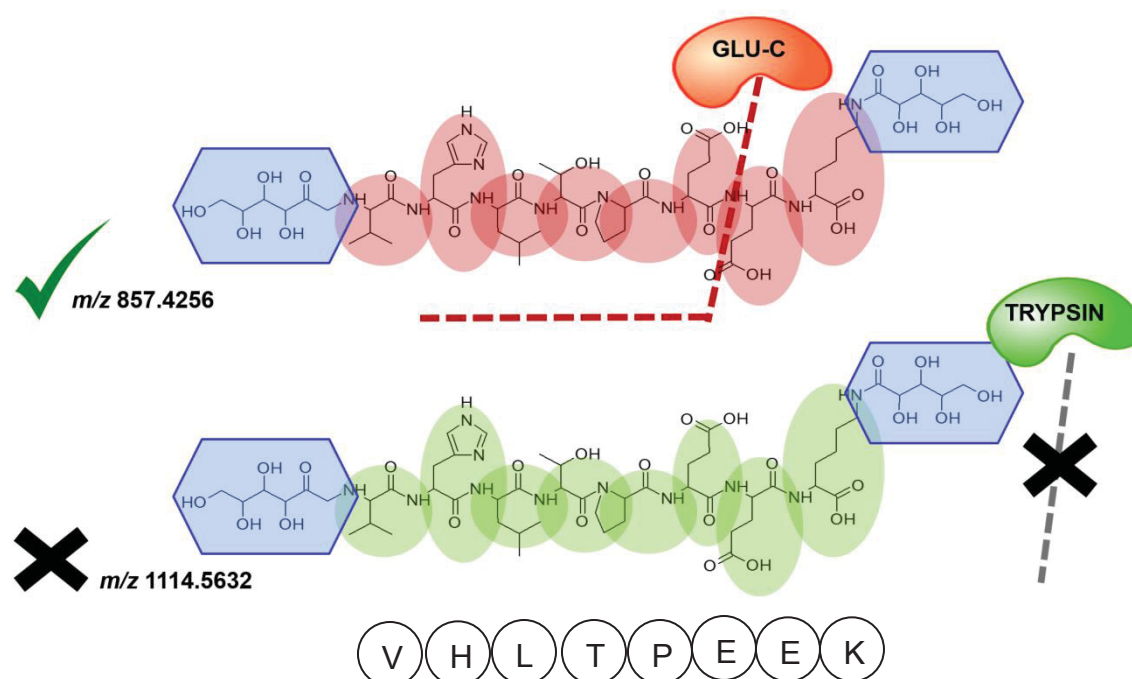
Ambas as digestões forneceram perfis significativos quanto a composição estrutural da hemoglobina. Qualquer mutação presente na hemoglobina que conduza a uma sequência distinta de aminoácidos resultaria em uma massa peptídica diferente e poderia ser facilmente observada nos cromatogramas e nos espectros.

Outras modificações, como a glicação, puderam ser monitoradas, especialmente na porção N-terminal da valina. A hemoglobina glicada clinicamente significativa é glicada no terminal N da valina da cadeia β . De acordo com Ito e colaboradores (ITO, NAKAHARI; YAMAMOTO, 2011), os principais locais de glicação na sequência da hemoglobina são os resíduos N-terminais da valina e os resíduos de lisina -16 α ; -56 α ; -8 β ; 82 β ; e 144 β . Considerando que o local de digestão por tripsina é também Lys (OLSEN, ONG; MANN, 2004); uma vez que este é glicado, a enzima já não reconhece o local e não pode realizar a clivagem. Sendo assim, em digestão utilizando a tripsina, só podemos observar a glicação N-terminal da valina em TP2 β quando a lisina no local de clivagem permanece não-glicada. Os peptídeos TP1 α ; TP2 β ; e TP4 β , que incluem os resíduos de lisina citados por ITO & NAKAHARI, também poderiam teoricamente ser afetados em casos de níveis mais

altos de glicose no plasma. O peptídeo tríptico glicado na valina N-terminal pode ser afetado pois tem uma lisina em sua composição.

A digestão com Glu-C se torna mais interessante, porque produz um peptídeo N-terminal com valina livre de lisina. Neste caso, mesmo que ocorra a glicação da lisina na posição 8 da cadeia β , o peptídeo N-terminal obtido pela digestão com glu-C não será modificado, porque esta enzima clivará o peptídeo antes do resíduo de lisina, como demonstrado na FIGURA 23.

FIGURA 23. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DIGESTÃO COM GLU-C E TRIPSINA DA HEMOGLOBINA GLICADA

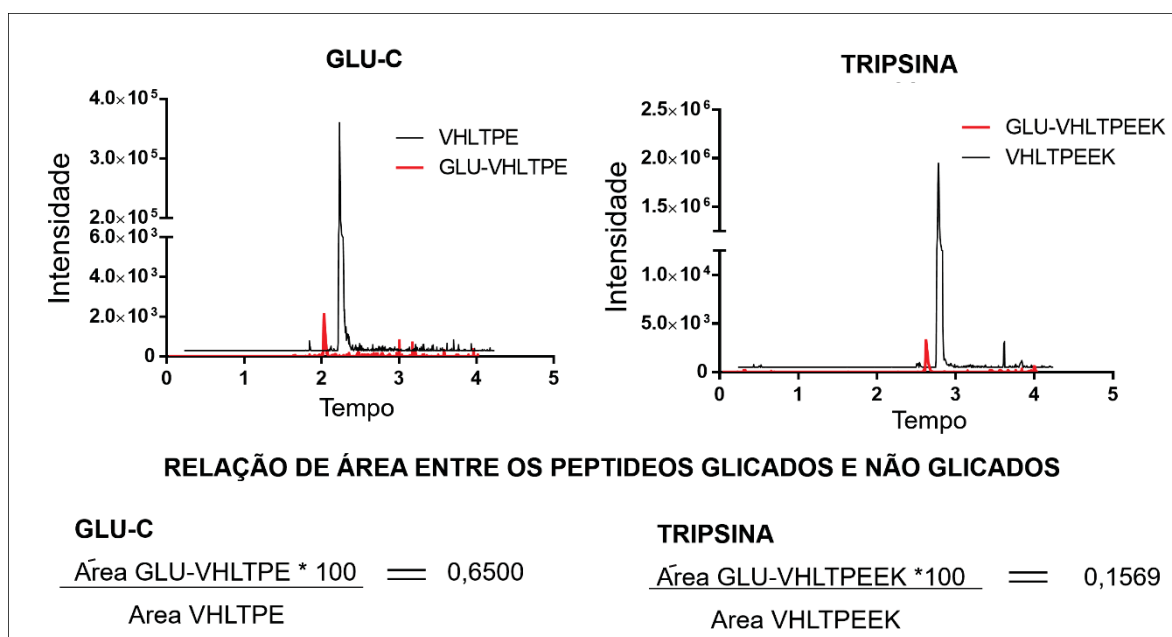


FONTE: O autor (2018)

Em concordância com essa discussão, a razão de áreas dos peptídeos obtidos pela digestão tríptica foi menor que a obtida pela digestão com glu-C. Essa discrepância de resultados entre as enzimas está vinculado às possíveis glicações no resíduo de lisina, levando a uma redução da formação de peptídeos glicosilados na digestão tríptica e resultados falsamente reduzidos da porcentagem de Hb1c. Ou seja, após a digestão com tripsina, formam-se quantidades menores do peptídeo glicado, porque a tripsina não reconhece a lisina glicada como local de digestão.

A FIGURA 24 mostra o cromatograma do peptídeo N-terminal glicado e não glicado da tripsina e da glu-C. Como pode ser observado na figura, a razão de área após a digestão com glu-C (0,65) é maior do que a digestão com tripsina (0,1569), demonstrando o potencial para melhor seletividade e sensibilidade usando o peptídeo glu-C.

FIGURA 24. CROMATOGRAMAS DOS PEPTÍDEOS GLICADO E NÃO GLICADO OBTIDOS DA DIGESTÃO POR GLU-C E TRIPSINA E RAZÃO DE ÁREA ENTRE OS PICOS



FONTE: O autor (2018)

Diante destes resultados foi selecionada a enzima Glu-C para o desenvolvimento e validação do método analítico.

4.2 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A primeira etapa durante o desenvolvimento de um método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é a otimização dos parâmetros espectrométricos. A otimização dos parâmetros espectrométricos ocorreu de maneira acoplada, uma vez que os padrões utilizados são proteínas digeridas, uma matriz muito complexa para infusão direta e a supressão iônica não permitiria a visualização adequada dos íons de interesse. O método cromatográfico foi

reproduzido e mantido durante a otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas.

Os parâmetros espectrométricos foram variados de forma a obter a melhor intensidade de sinal analítico para os peptídeos de interesse VHLTPE e Glu-VLTPE. A fonte de ionização utilizada foi Electrospray, operando no modo positivo de ionização, compatível com a análise de peptídeos. Foram otimizados os parâmetros da fonte de ionização, tendo sido definidas as seguintes condições apresentadas na TABELA 4.

TABELA 4. PARAMETROS DE IONIZAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO DE MASSA

Parâmetros de ionização	Valor otimizado
Voltagem do capilar	2000 V
Voltagem do cone	30 V
Source offset	60 V
Temperatura da fonte	150°C
Temperatura de dessolvatação	300°C
Gás do cone	50 L/h
Gás do dessolvatação	800 L/h
Tempo de aquisição dos dados	6 min
Energia de colisão F1 (baixa energia)	6 V
Energia de colisão F2 (alta energia)	Rampa de 10 - 30 V

FONTE: O autor (2018)

Também foi definido o *lockspray*, padrão de massa conhecida que é utilizado para corrigir desvios de massa durante a corrida. Foi utilizada a leucina encefalina, com m/z 556.2771. Nessas condições foi possível observar os sinais correspondentes ao VHLTPE e Glu-VHLTPE

Após a otimização dos parâmetros da fonte, o método cromatográfico passou a ser avaliado. A coluna Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2.1 mm, 1,7 µm), Waters Corporation, (Irlanda), apresentou os melhores resultados e por ser uma fase estacionária mais comum aos laboratórios foi selecionada para o desenvolvimento do método. Algumas combinações dos solventes água, acetonitrila e ácido acético

foram testados como fase móvel. Condições como velocidade de fluxo, temperatura do forno também foram testadas visando a melhor separação e formato dos picos.

Em seguida, foram avaliadas diferentes composições e tipos de eluição da fase móvel, assim como diferentes vazões de fluxos, volumes de injeção e temperaturas de forno da coluna

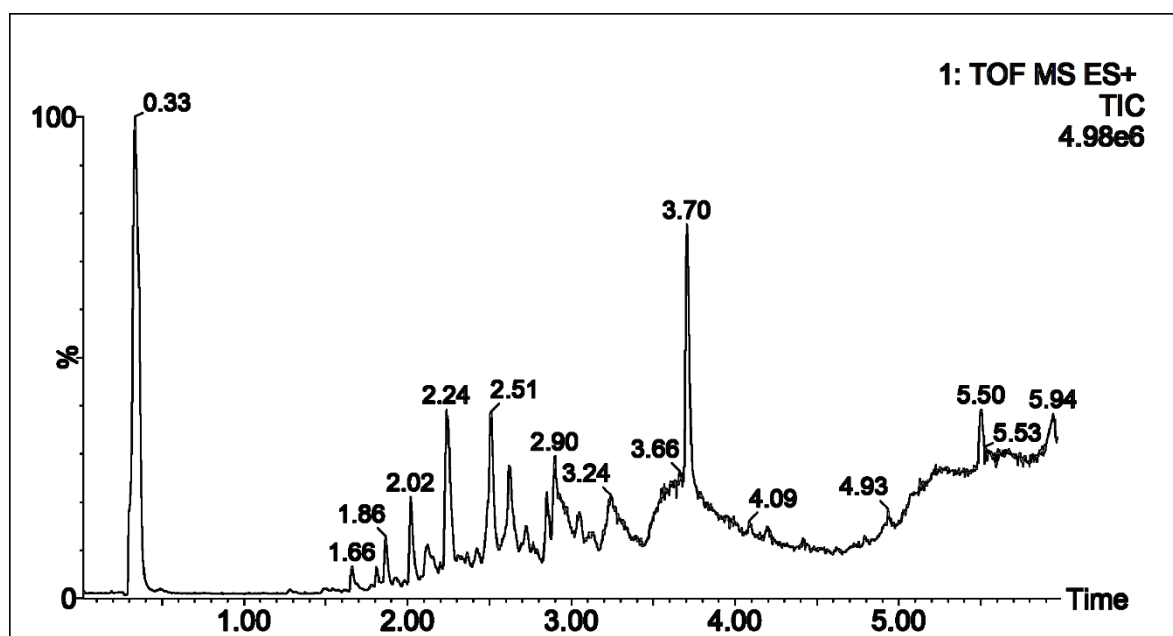
Os primeiros experimentos visando à separação cromatográfica tiveram como base a variação na proporção dos solventes, temperatura e fluxo. Como trata-se de uma análise do espectro como um todo, e não apenas uma transição como no modo de aquisição *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), a separação cromatográfica é muito importante. Uma matriz complexa como digerido de proteínas, deve ser devidamente separada para garantir melhores condições para ionização e sensibilidade do método. Através do gradiente foi possível garantir que os peptídeos, tanto glicado quanto não glicado, não eluam no mesmo tempo que os interferentes, o que poderia causar a supressão iônica. Para os analitos em questão a melhor eficiência e formato dos picos foram obtidos utilizando as seguintes condições: Como solução diluente das amostras foi selecionado tampão acetato de amônio 50 mM, pH 4,3; a fase móvel foi composta por: Solução aquosa de ácido trifluoracético na concentração de 0,02% (A), acetonitrila com 0,02% de ácido trifluoracético (B) e Ácido acético 10% (C); eluída em modo gradiente, conforme segue: T_0 : A=97%; B=2%; C=1%; $T_{0-4 \text{ min}}$: A=29%; B=70%; C=1%; $T_{4,1- 6,5 \text{ min}}$: A=9%; B=90%; C=1%; $T_{6,51- 10 \text{ min}}$: A=97%; B=2%; C=1%. O fluxo da fase móvel foi mantido a 500 $\mu\text{L}/\text{min}$; a coluna selecionada, Acquity UPLC $\text{\textcircled{R}}$ BEH C18 column (50 x 2.1 mm, 1,7 μm), mantida a 40 $^{\circ}\text{C}$; o volume de injeção foi 5 μL . A fonte utilizada foi *electrospray*, operando no modo positivo de ionização. A aquisição dos dados foi realizada através do software Masslynx 4.4.1, experimento MSe em modo resolução e contínuo.

O método desenvolvido foi capaz de analisar os peptídeos da hemoglobina de forma rápida, apresentando uma excelente sensibilidade e formato de pico tanto para o peptídeo glicado quanto para o não glicado. A elevada seletividade da ferramenta analítica associada a um eficiente gradiente de eluição possibilitou uma análise rápida, com um tempo de corrida de seis minutos. Pode ser considerado um método sem produção excessiva de resíduos, uma vez que se trata de um fluxo

baixo e em modo de eluição gradiente no qual são gastos aproximadamente 2 mL de acetonitrila por análise.

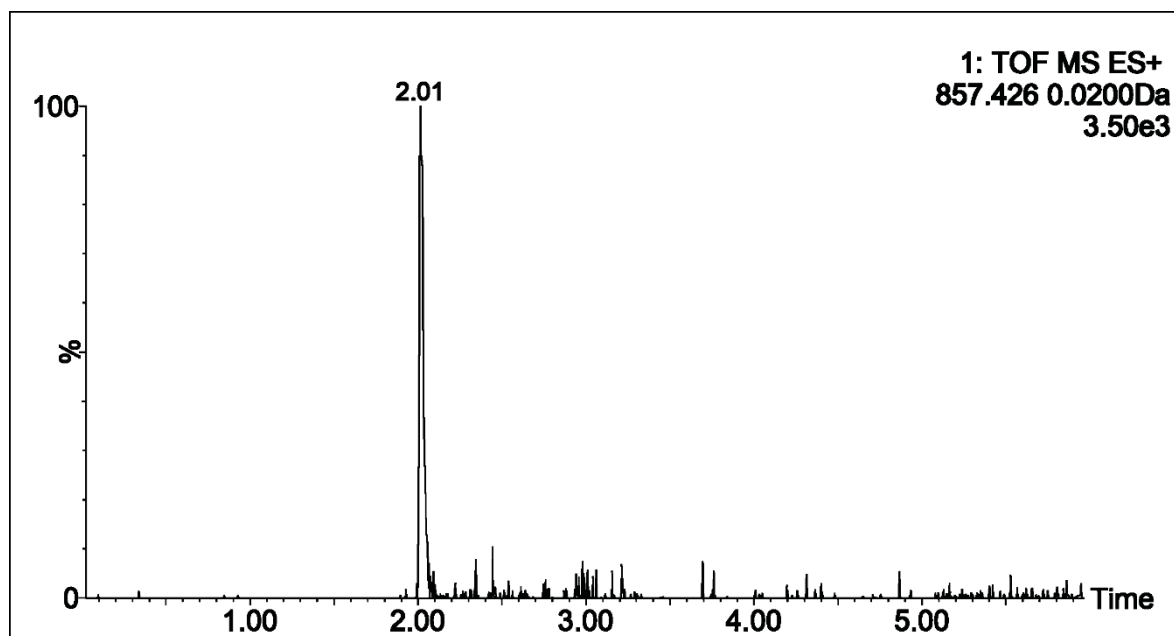
O cromatograma do método desenvolvido pode ser observado na FIGURA 25, evidenciando um bom perfil de separação. As FIGURAS 26 e 27 mostram o perfil cromatográfico dos peptídeos VHLTPE e glu-VLTPE, respectivamente, nos quais pode ser visto picos afilados, simétricos e sem interferentes, adequados para a validação do método.

FIGURA 25. CROMATOGRAMA TOTAL OBTIDO DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO FORTIFICADA COM HbA1c (11,9%).



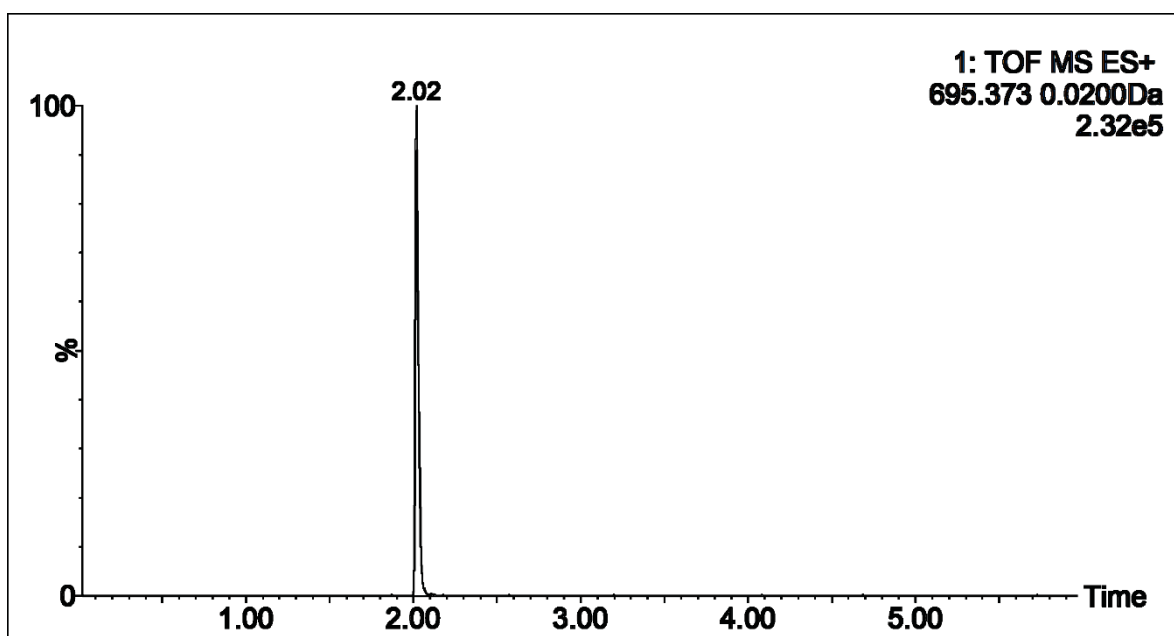
FONTE: O autor (2018)

FIGURA 26. CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DO PEPTÍDEO GLU-VHLTPE (m/z 857,426) OBTIDO DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO FORTIFICADA COM HbA1C (11,9%).



FONTE: O autor (2018)

FIGURA 27. CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DO PEPTÍDEO VHLTPE (m/z 695,373) OBTIDO DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO FORTIFICADA COM HbA1C (11,9%).



FONTE: O autor (2018)

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

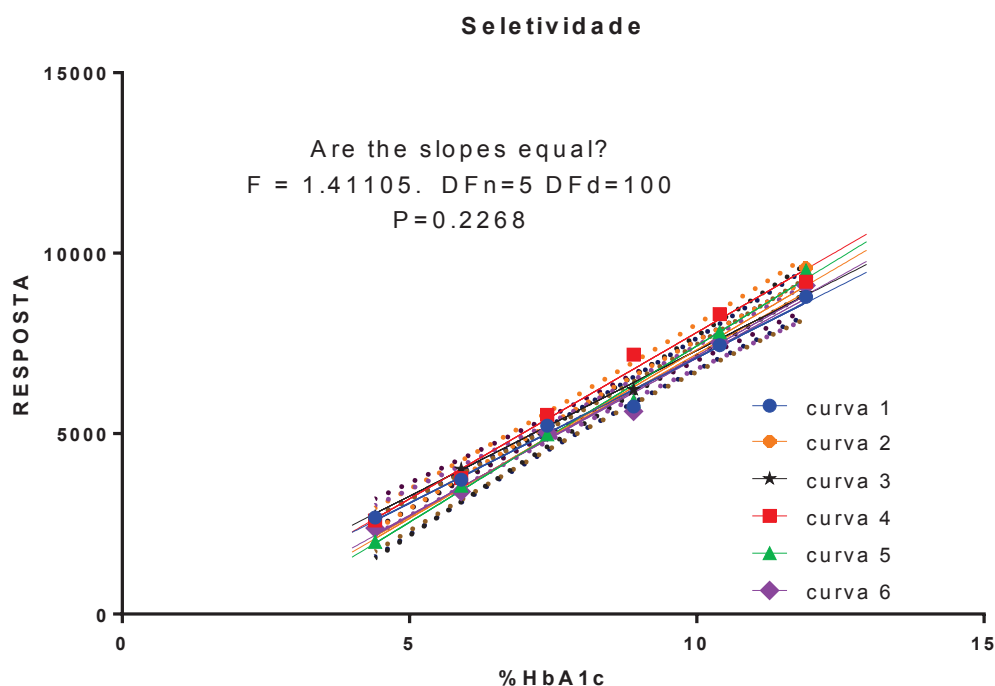
A validação de métodos bioanalíticos foi composta de diversas análises com o objetivo de garantir a confiabilidade dos resultados gerados a partir do método desenvolvido. Para isso, foram realizados ensaios com matriz de validação (digerido de proteínas) fortificada com diferentes concentrações de HbA1c. As amostras de pacientes poderão ser avaliadas somente quando o método em estudo for adequado para análise de matriz fortificada.

4.3.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através da comparação das retas obtidas após fortificação com padrão de hemoglobina glicada em matrizes distintas. Foram obtidas seis equações das retas e o coeficiente angular de cada uma foi comparado através do teste F (ANOVA). O valor de p na comparação das seis curvas foi igual a 0,2268, maior que 0,05, confirmando que não existem diferenças significativas entre as retas FIGURA 28. Os resultados obtidos demonstraram que não há nenhuma interferência significativa da matriz nas determinações das concentrações de HbA1c através do método desenvolvido.

A comparação das curvas não indicou diferença significativa diante das alterações de matriz. Este resultado demonstra uma alta seletividade do método, uma vez que nenhum processo de extração ou purificação prévio foi necessário. Neste ponto vale destacar a vantagem oferecida pela ferramenta analítica da espectrometria de massas de alta resolução. Análises de proteínas e peptídeos normalmente envolvem etapas de extração e purificação das amostras. Essas análises demandam gastos importantes tanto no ponto de vista financeiro quanto em tempo de preparo. Com o auxílio da detecção de massas em alta resolução, mesmo trabalhando com matrizes extremamente complexas e sem etapas de purificação e extração, o método foi capaz de diferenciar os componentes da matriz sem perda do sinal do analito de interesse.

FIGURA 28. SOBREPOSIÇÃO DAS RETAS OBTIDAS DE SEIS FONTES DISTINTAS DE MATRIZ E SEUS RESPECTIVOS DADOS ESTADÍSTICOS



	● curva 1	■ curva 2	★ curva 3	■ curva 4	▲ curva 5	◆ curva 6
	Y = 805.1*X - 957.6	Y = 921.5*X - 1411	Y = 976.6*X - 2332	Y = 887.6*X - 1724	Y = 934.3*X - 2023	Y = 806.8*X - 765.1
Slope	805.1 ± 43.50	921.5 ± 49.04	976.6 ± 43.58	887.6 ± 54.74	934.3 ± 73.33	806.8 ± 28.28
Y-intercept when X=0.0	-957.6 ± 371.6	-1411 ± 419.0	-2332 ± 372.3	-1724 ± 467.6	-2023 ± 626.5	-765.1 ± 241.6
X-intercept when Y=0.0	1.189	1.531	2.388	1.942	2.165	0.9484
1/slope	0.001242	0.001085	0.001024	0.001127	0.001070	0.001240

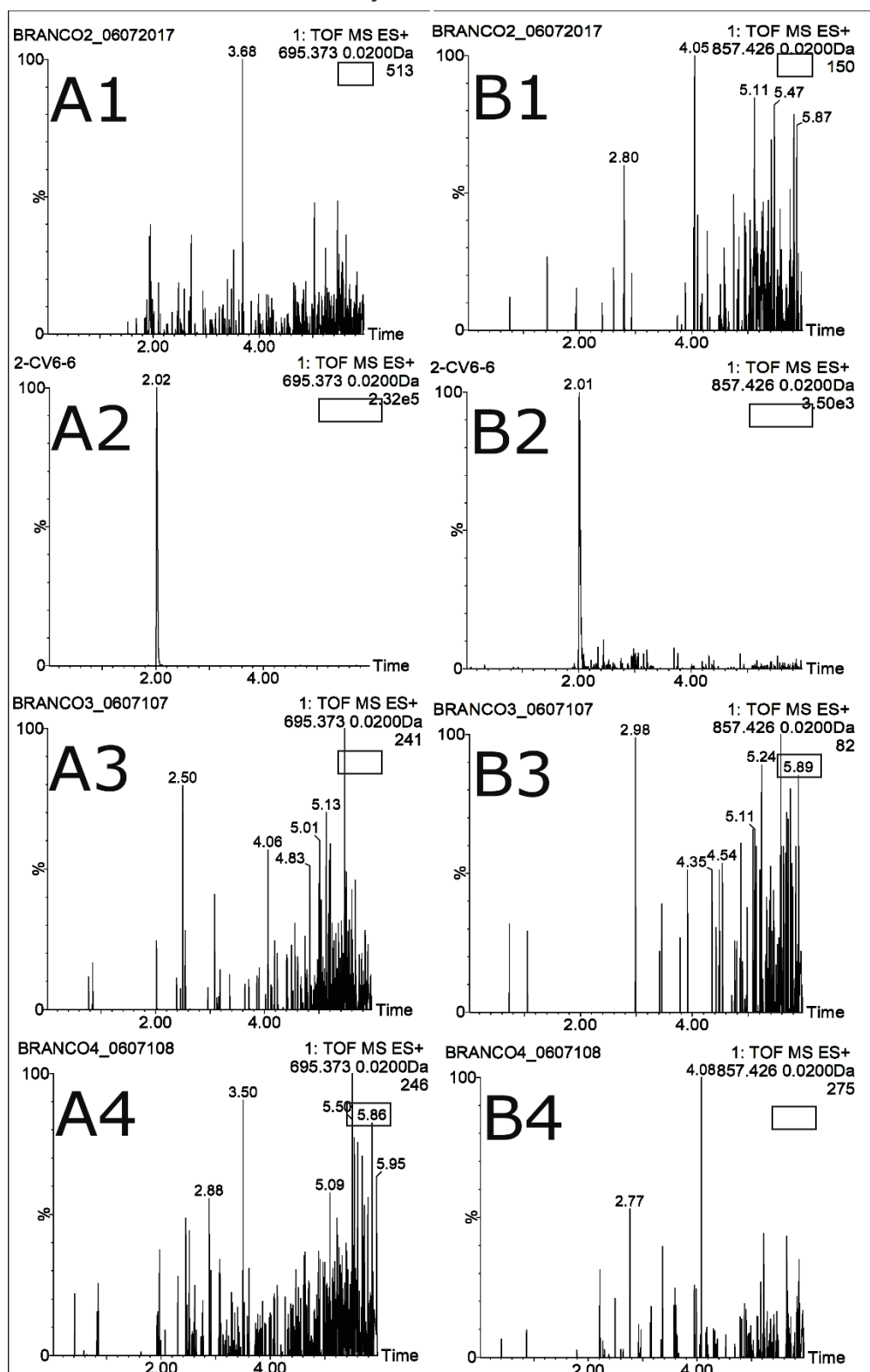
NOTA: F: Valor calculado de teste F; DFn: *Degrees of Freedom nominator* (graus de liberdade no numerador); DFd: *Degrees of Freedom denominator* (graus de liberdade no denominador)

FONTE: O autor (2018), obtido através do software Prisma 6 ®

4.3.2 Efeito Residual (*Carryover*)

O resultado do efeito residual pode ser visualizado através da FIGURA 29 que apresenta os cromatogramas extraído das massas do peptídeo VHLTPE (A1) e glu-VHLTPE (B1) da injeção de uma amostra branco. Em seguida foi injetada uma amostra fortificada com o limite superior de quantificação (LSQ) e (FIGURA 29-A2 e B2). Após a injeção do LSQ, a mesma amostra branco foi injetada novamente, duas vezes, em sequência (FIGURA 29-A3, A4 e B3, B4). Não foi observada nenhuma variação no sinal de nenhum dos brancos. O resultado demonstra a ausência de interferentes relativos às análises anteriores, tanto na massa da Hb quanto da HbA1c.

FIGURA 29. CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DAS MASSAS RELATIVAS AO PEPTÍDEO GLICADO E NÃO GLICADO DAS INJEÇÕES DOS BRANCO, LSQ E BRANCOS

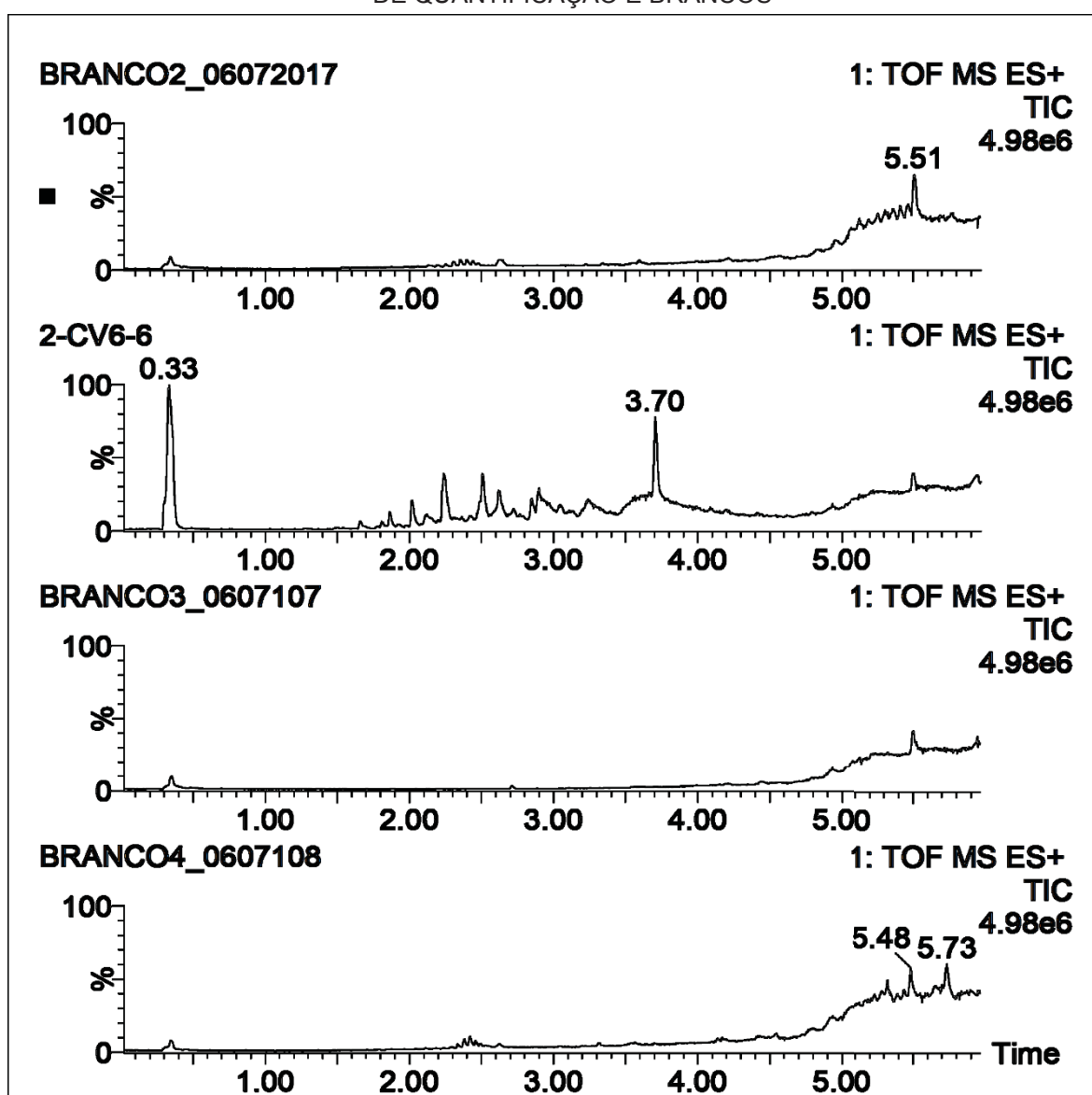


NOTA: **A**: sequência de cromatogramas da massa extraída m/z 695,373 (peptideo não glicado) em diferentes concentrações: A1: branco; A2: limite superior de quantificação; A3: branco; A4: branco. **B**: sequência de cromatogramas da massa extraída m/z 857,426 (peptideo glicado) em diferentes concentrações: B1: Branco; B2: limite superior de quantificação; B3: Branco; B4: Branco. FONTE: O autor (2018)

A FIGURA 30 traz os cromatogramas totais das injeções dos brancos e LSQ. Percebe-se que mesmo no cromatograma total, a amostra branco apresentou a ausência de ruídos mesmo após a injeção da matriz fortificada, demonstrando que, além da seletividade da técnica em diferenciar os componentes da matriz e dos analitos, a limpeza da coluna através da etapa final do gradiente de eluição foi eficiente.

Desta forma, foi verificada a ausência de qualquer risco de contaminação entre as amostras analisadas utilizando o método desenvolvido.

FIGURA 30. CROMATOGRAMAS TOTAIS DAS INJEÇÕES DOS BRANCOS E LIMITE SUPERIOR DE QUANTIFICAÇÃO E BRANCOS



NOTA: 2-CV6-6: amostra fortificada na concentração do Limite Superior de Quantificação.
FONTE: O autor (2018)

4.3.3 Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado através da comparação dos resultados das áreas obtidas com matriz fortificada com padrão de HbA1c com aqueles obtidos em solução, nas mesmas concentrações (TABELA 5).

TABELA 5. RESULTADO DAS ANÁLISES DE EFEITO MATRIZ.

Controles	Matriz		Solução		FMN	
	^a Anal/PI	^b CV (%)	^a Anal/PI	^b CV (%)		^c CV (%)
	103,8450		113,914		0,9651	
CQB	136,7130	11,07	100,140	6,49	1,2705	11,07
	102,4170		109,119		0,9518	
	117,9930		107,7243		1,0966	
	110,3350		110,362		1,0254	
	110,7550		104,457		1,0293	
CQA	199,6940	2,5	230,108	9,60	0,8813	2,50
	210,9700		223,589		0,9311	
	213,4680		201,8260		0,9421	
	205,6680		234,1280		0,9077	
	212,2080		243,2500		0,9365	
	205,7770		226,5802		0,9081	

NOTA: CQB: Controle de Qualidade de Baixa concentração; CQA: Controle de Qualidade de Alta concentração; n=8; ^a Área do analito / Área do Padrão Interno; ^b Variação entre as razões das áreas; ^c Variação entre todos os FMNs.

FONTE: O autor (2018)

Como podemos observar, os valores de CV% dos FMN foram 11,07% e 2,50%, abaixo do limite especificado (BRASIL, 2012), comprovando que o método não apresenta efeito de matriz que comprometa as análises.

Também utilizamos a comparação da concentração calculada. Os mesmos pontos em solução e em matriz foram quantificados pela mesma curva. Os

resultados obtidos na quantificação em matriz e em solução não apresentaram desvios abaixo de 15%, conforme especificado na legislação (TABELA 6).

TABELA 6. COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES CALCULADAS EM MATRIZ E EM SOLUÇÃO

Nível	Conc. Teórica	Conc. Exper. média	CV %
CQB SOL e MTZ	5,9	5,68 ± 0,28	4,88
CQA SOL e MTZ	10,4	10,7 ± 0,25	2,36

NOTA: CQB: Controle de Qualidade de Baixa concentração; SOL: em solução; MTZ: em matriz; CQA: Controle de Qualidade de Alta concentração. FONTE: O autor (2018)

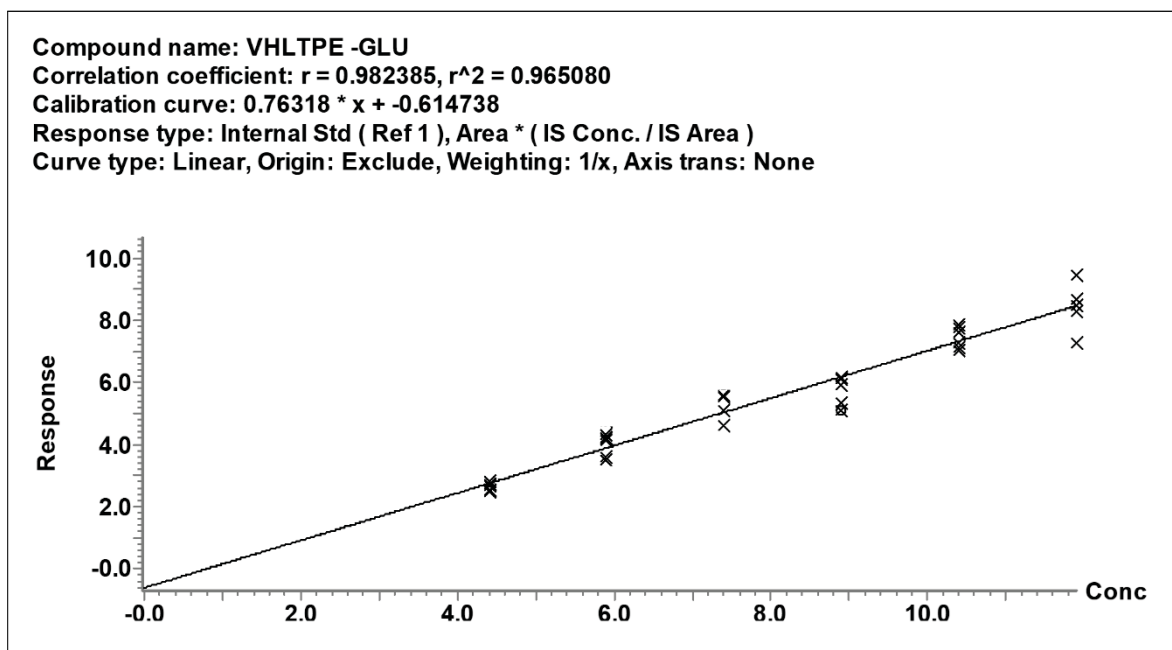
4.3.4 Curva de calibração

A relação linear entre a relação das áreas dos picos do glu-VHLTPE/áreas dos picos do VHLTPE *versus* a relação da concentração do glu-VHLTPE /concentração do VHLTPE foi confirmada através da construção de curvas de calibração (três), três dias consecutivos (nove).

As curvas de calibração da hemoglobina glicada apresentaram linearidade, com coeficientes de correlação (r) superiores a 0,98 (FIGURAS 31, 32 e 33).

Em todos os níveis de concentração os erros padrões relativos foram inferiores a 15%, com valores entre 0,0 e 12,4%. Os erros abaixo de 15% (TABELAS 7, 8, 9) asseguram a confiabilidade da resposta do analito em todos os níveis de concentração avaliados.

FIGURA 31. CURVA DE CALIBRAÇÃO da HbA1c, 1º DIA.



FONTE: O autor (2018)

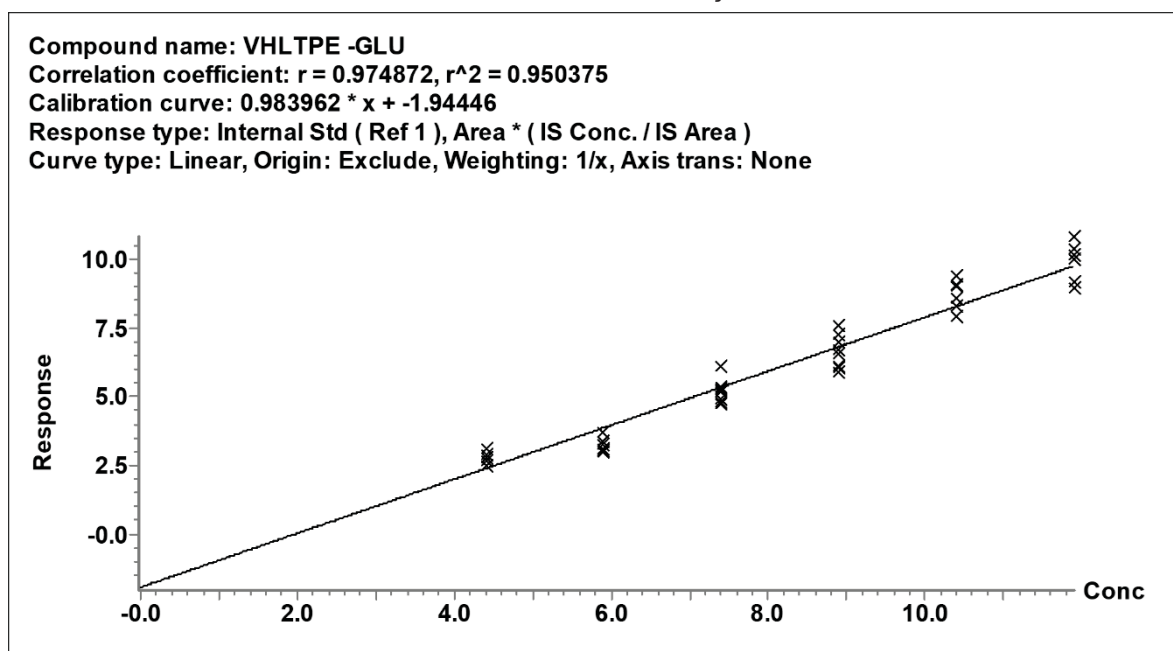
TABELA 7. LINEARIDADE 1º DIA.

	Pontos da curva					
	1	2	3	4	5	6
Conc. Teórica (%)	4,4	5,9	7,4	8,9	10,4	11,9
Conc. Experimental (%)	4,3	6,0	7,5	8,5	10,5	11,8
Média ± DP	±0,19	±0,42	±0,49	±0,37	±0,42	±0,93
Erro	-0,1	0,1	0,1	-0,4	0,2	-0,1
Erro Padrão Relativo (%) ^a	-2,3	1,7	1,3	-4,7	1,5	-0,7

NOTA: Conc.: Concentração; n mínimo = 3; ^a Expressa sobre a concentração teórica

FONTE: O autor (2018)

FIGURA 32. CURVA DE CALIBRAÇÃO da HbA1c, 2º DIA.



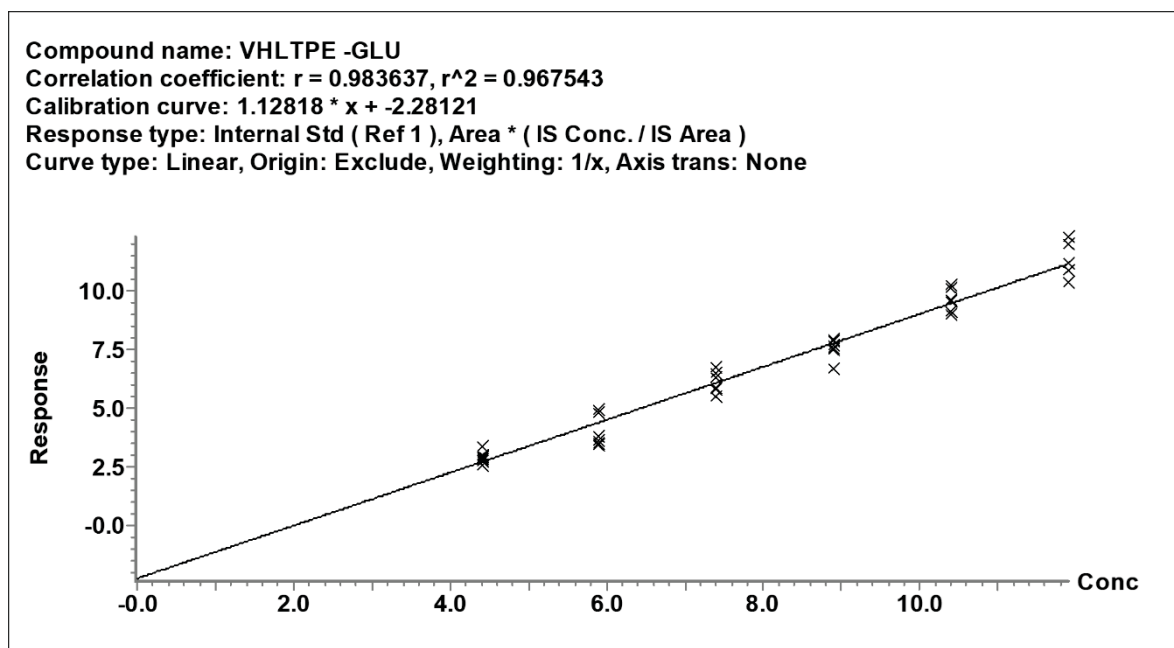
FONTE: O autor (2018)

TABELA 8. LINEARIDADE 2º DIA.

	Pontos da curva					
	1	2	3	4	5	6
Conc. Teórica (%)	4,4	5,9	7,4	8,9	10,4	11,9
Conc. Experimental (%)	4,8	5,3	7,1	8,9	10,8	12,1
Média ± DP	±0,17	±0,25	±0,3	±0,65	±0,52	±0,66
Erro	0,4	-0,7	-0,3	0,0	0,4	0,2
Erro Padrão Relativo (%) ^a	8,0	-12,4	-4,2	0,0	4,0	1,38

NOTA: Conc.: Concentração; DP: Desvio Padrão; n mínimo = 3; ^a Expressa sobre a concentração teórica. FONTE: O autor (2018)

FIGURA 33. CURVAS DE CALIBRAÇÃO da HbA1c, 3º DIA.



FONTE: O autor (2018)

TABELA 9. LINEARIDADE 3º DIA.

	Pontos da curva					
	1	2	3	4	5	6
Conc. Teórica (%)	4,4	5,9	7,4	8,9	10,4	11,9
Conc. Experimental (%)	4,6	5,6	7,4	8,7	10,5	11,7
Média ± DP	±0,20	±0,55	±0,38	±0,37	±0,41	±0,95
Erro	0,2	-0,3	0,0	-0,2	0,1	-0,2
Erro Padrão Relativo (%) ^a	3,7	-5,7	0,0	-2,5	1,3	-1,6

NOTA: Conc: Concentração; DP: Desvio padrão; n mínimo =3; ^a Expressa sobre a concentração teórica. FONTE: O autor (2018)

4.3.5 Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas em quatro níveis de concentração, CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA.

De acordo com os resultados apresentados nas TABELAS 10, 11 e 12, o método pode ser considerado preciso, com valores de coeficiente de variação entre 3,01 e 14,46% para precisão intercorrida e entre 5,13 e 11,44% para precisão intracorrida (TABELA 13).

O método também apresentou resultados satisfatórios para o teste de exatidão, com valores de EPR variando entre 0,37 a 12,4% durante os três dias (TABELAS 10, 11 e 12) e entre 2,3 e 6,63% para exatidão intercorridas (TABELA 13).

TABELA 10. PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA, 1º DIA.

Controle de Qualidade	Conc. Teórica (%)	Conc. Experimental (%)± DP ^a	CV ^a (%)	Exatidão ^b (%)	EPR ^b (%)
CQ-LIQ	4,4	4,3 ± 0,19	4,45	97,73	- 2,33
CQB	5,9	6,0 ± 0,42	7,07	101,69	1,67
CQM	8,9	8,5 ± 0,37	4,34	95,51	- 4,70
CQA	10,4	10,5 ± 0,42	3,96	100,96	1,58

NOTA: CQ-LIQ: Controle de Qualidade na concentração do Limite Inferior de Quantificação; CQB: Controle de Qualidade de Baixa concentração; CQM: Controle de Qualidade de Média concentração, CQA: Controle de Qualidade de Alta concentração; Conc.: Concentração; CV: Coeficiente de Variação; EPR: Erro Padrão Relativo; n=5; ^a Variação entre as áreas experimentais ^b Expressa sobre a concentração teórica.

FONTE: O autor (2018)

TABELA 11. PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA, 2º DIA.

Controle de Qualidade	Conc. Teórica (%)	Conc. Experimental (%)± DP ^a	CV ^a (%)	Exatidão ^b (%)	EPR ^b (%)
CQ-LIQ	4,4	4,8± 0,17	3,61	109,09	8,06
CQB	5,9	5,3 ± 0,25	4,76	89,83	-12,4
CQM	8,9	8,9 ± 0,65	7,39	100,00	0,37
CQA	10,4	10,8 ± 0,51	4,79	103,85	4,0

NOTA: CQ-LIQ: Controle de Qualidade na concentração do Limite Inferior de Quantificação; CQB: Controle de Qualidade de Baixa concentração; CQM: Controle de Qualidade de Média concentração, CQA: Controle de Qualidade de Alta concentração; Conc.: Concentração; CV: Coeficiente de Variação; EPR: Erro Padrão Relativo; n=5; ^a Variação entre as áreas experimentais ^b Expressa sobre a concentração teórica. FONTE: O autor (2018)

TABELA 12. PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA, 3º DIA.

Controle de Qualidade	Conc. Teórica (%)	Conc. Experimental (%)± DP ^a	CV ^a (%)	Exatidão ^b (%)	EPR ^b (%)
CQ-LIQ	4,4	4,6 ± 0,20	4,48	104,55	3,75
CQB	5,9	5,6 ± 0,55	9,89	94,92	-5,67
CQM	8,9	8,7 ± 0,37	4,27	97,75	-2,49
CQA	10,4	10,5 ± 0,41	3,90	100,96	1,26

NOTA: CQ-LIQ: Controle de Qualidade na concentração do Limite Inferior de Quantificação; CQB: Controle de Qualidade de Baixa concentração; CQM: Controle de Qualidade de Média concentração, CQA: Controle de Qualidade de Alta concentração; Conc.: Concentração; CV: Coeficiente de Variação; EPR: Erro Padrão Relativo; n=5; a Variação entre as áreas experimentais b Expressa sobre a concentração teórica.

FONTE: O autor (2018)

TABELA 13. PRECISÃO E EXATIDÃO INTERCORRIDAS.

Controle de Qualidade	Conc. Teórica (%)	Conc. Experimental (%)± DP ^a	CV ^a (%)	Exatidão ^b (%)	EPR ^b (%)
CQ-LIQ	4,4	4,5 ± 0,28	6,12	102,27	3,61
CQB	5,9	5,5 ± 0,52	9,53	93,22	-6,63
CQM	8,9	8,6 ± 1,10	12,68	96,63	-2,80
CQA	10,4	10,6 ± 0,48	4,56	101,92	2,30

NOTA: CQ-LIQ: Controle de Qualidade na concentração do Limite Inferior de Quantificação; CQB: Controle de Qualidade de Baixa concentração; CQM: Controle de Qualidade de Média concentração, CQA: Controle de Qualidade de Alta concentração; Conc.: Concentração; CV: Coeficiente de Variação; EPR: Erro Padrão Relativo; n=15; a Variação entre as áreas experimentais b Expressa sobre a concentração teórica.

FONTE: O autor (2018)

4.3.6 Estudo de Estabilidade

4.3.6.1 Estabilidade em matriz biológica

As diferenças entre as áreas de picos obtidos de amostras recém preparadas e amostras armazenadas sob as condições de avaliadas foi inferior a 15%

(TABELAS 14,15,16 E 17). Portanto, não há diferenças significativas para a HbA1c e seu padrão interno (Hb) frente às diferentes formas de armazenamento e preparo avaliadas.

TABELA 14. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PÓS PROCESSAMENTO

Nível	Conc. Teórica	Conc. Exper.	EPR%	CV%
CQB	5.9	5.4	-1,8	7,6
		5.4		
		6.1		
		5.7		
		5.8		
		5.9		
CQB PP	5.9	5.2		
		5.9		
		6.2		
		6.7		
		5.4		
CQA	10.4	10.0	0,64	5,0
		10.5		
		10.7		
		10.3		
		10.6		
		10.3		
CQA PP	10.4	9.8		
		9.6		
		10.9		
		10.5		
		11.5		
		10.9		
		9.8		

NOTA: Pós processamento, reinjeção da amostra após 3 horas em gerenciador de amostras. CQB: Controle de Qualidade de Baixa concentração; CQA: Controle de Qualidade de Alta concentração; PP: Pós Processado; CV: Coeficiente de Variação; EPR: Erro Padrão Relativo.

FONTE: O autor (2018)

TABELA 15. RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE CURTA DURAÇÃO

Nível	Conc. Teórica	Conc. Exper.	EPR%	DPR%
		4.9		
AM-B	5,0	5.1		
		5.0		
		5.4	5,0	5,5
AM-B		5.5		
CD	5,0	5.6		
		11.6		
AM-A	11.1	11.0		
		11.2		
		11.6	5,0	3,4
AM-A		12.0		
CD	11.1	11.9		

NOTA: Curta duração amostra re-preparada após 6 horas a temperatura ambiente. AM-B: Amostra de concentração conhecida baixa; AM-A Amostra de concentração conhecida alta; CD: Após armazenamento de Curta Duração; CV: Coeficiente de Variação; EPR: Erro Padrão Relativo.

FONTE: O autor (2018)

TABELA 16. RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PÓS CICLO DE CONGELAMENTO

Nível	Conc. Teórica	Conc. Exper.	EPR%	DPR%
		4.9		
AM-B	5,0	5.1		
		5.0	1,7	4,4
AM-B		5.1		
CC	5,0	4.9		
		5.5		
		11.6		
AM-A	11.1	11.0		
		11.2		
		12.0	7,1	5,6
AM-A	11.1	12.8		
CC		12.1		

NOTA: Ciclo de congelamento: Amostra preparada após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, com intervalo de 12 horas. AM-B: Amostra de concentração conhecida baixa; AM-A Amostra de concentração conhecida alta; CC: após Ciclo de Congelamento; CV: Coeficiente de Variação; EPR: Erro Padrão Relativo. FONTE: O autor (2018)

TABELA 17. RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE LONGA DURAÇÃO

Nível	Conc. Teórica	Conc. Exper.	EPR%	DPR%
AM-B	5,0	4.9 5.1	0,7	2,4
AM-B	5,0	5.0 5.1		
LD		4.9 5.2		
AM-A	11.1	11.6 11.0		
AM-A	11.1	11.2 11.6	6,5	5,8
LD		12.0 12.9		

NOTA: Longa Duração: Amostras re-processadas após 15 dias de congelamento -40 °C. AM-B: Amostra de concentração conhecida baixa; AM-A Amostra de concentração conhecida alta; LD: Após armazenamento de Longa Duração; CV: Coeficiente de Variação; EPR: Erro Padrão Relativo.

FONTE: O autor (2018)

A TABELA 18 resume os resultados das condições avaliadas em amostras reais (curta duração, ciclo de congelamento e descongelamento e longa duração). Esse resultado garante que há tempo suficiente para preparo das amostras, sua análise e, se necessário, re-análise sem que ocorram perdas relacionadas à degradação, proporcionando uma quantificação segura e confiável.

TABELA 18. RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO, APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO E DE LONGA DURAÇÃO.

Concentração (%)	Recém preparado		Curta duração (6 horas)		Ciclo de Congelamento e Descongelamento		Longa Duração	
	^a Concentração % ± DP	^b EPR %	^a Área P/ área PI % ± DP	^b EPR %	^a Área P/ área PI % ± DP	^b EPR %	^a Área P/ área PI % ± DP	^b EPR %
5,0	5,0 ± 0,1	0,0	5,5 ± 0,3	9,1	5,2 ± 0,3	3,2	5,1 ± 0,1	1,3
11,0	11,3 ± 0,3	2,4	11,8 ± 0,2	7,0	12,0 ± 0,4	8,3	11,6 ± 0,4	5,2

NOTA: EPR: Erro Padrão Relativo; n=6; P=Padrão de glu-VHLTPE; PI=VHLTPE; ^a Porcentagem expressa em relação a concentração média obtida das amostras; ^b Variação entre média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

FONTE: O autor (2018)

4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PACIENTES DIABÉTICOS

O método desenvolvido e validado foi então aplicado a amostras aleatórias de 15 pacientes que realizaram o exame de quantificação de hemoglobina glicada, cedidas pelo laboratório LANAC, com o objetivo de verificar a adequação do método desenvolvido a análises de amostras reais.

Foi realizada a comparação dos resultados obtidos pelo método LC-QTOF-MS desenvolvido e validado, com o método de eletroforese capilar (certificado pelo NGSP) e o kit comercial glicohemoglobina Inlab-monoteste (troca-iônica) (TABELA 19).

TABELA 19. RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO DE HbA1c EM AMOSTRAS REAIS PELO MÉTODO DE REFERENCIA, MÉTODO DESENVOLVIDO LC-QTOF-MS E MÉTODO KIT TROCA IÔNICA

	NGSP ¹	LC-QTOF-MS ²	ERRO*	EPR %	KIT TI ³	ERRO*	EPR %
1	8,0	7,9	-0,1	-1,3	8,1	0,1	1,1
2	5,0	4,9	-0,1	-2,0	7,2	2,2	43,2
3	7,3	7,6	0,3	4,1	7,7	0,4	5,5
4	9,7	10,8	1,1	11,3	9,1	-0,6	-6,4
5	13,5	16,3	2,8	20,7	11,5	-2,0	-15,0
6	4,9	5	0,1	2,0	6,1	1,2	25,5
7	11,0	11	0,5	4,3	9,5	-1,5	-13,7
8	6,2	6,3	0,1	1,6	7,3	1,1	18,0
9	6,3	6,1	-0,2	-3,2	7,6	1,3	20,3
10	7,2	7,6	0,4	5,6	7,4	0,2	2,8
11	8,7	8,6	-0,1	-1,1	8,0	-0,7	-8,6
12	9,5	9	-0,5	-5,3	8,2	-1,3	-13,2
13	12,4	13,6	1,2	9,7	10,0	-2,4	-19,1
14	11,1	12	1,0	9,0	9,9	-1,2	-10,8
15	5,7	5,2	0,5	-8,8	6,7	1,0	16,9

NOTA: ^a Método Referência, certificado pelo NGSP; ^b Método teste desenvolvido neste trabalho;

^c Método Kit comercial por troca iônica * Erros calculados em relação ao método referência.

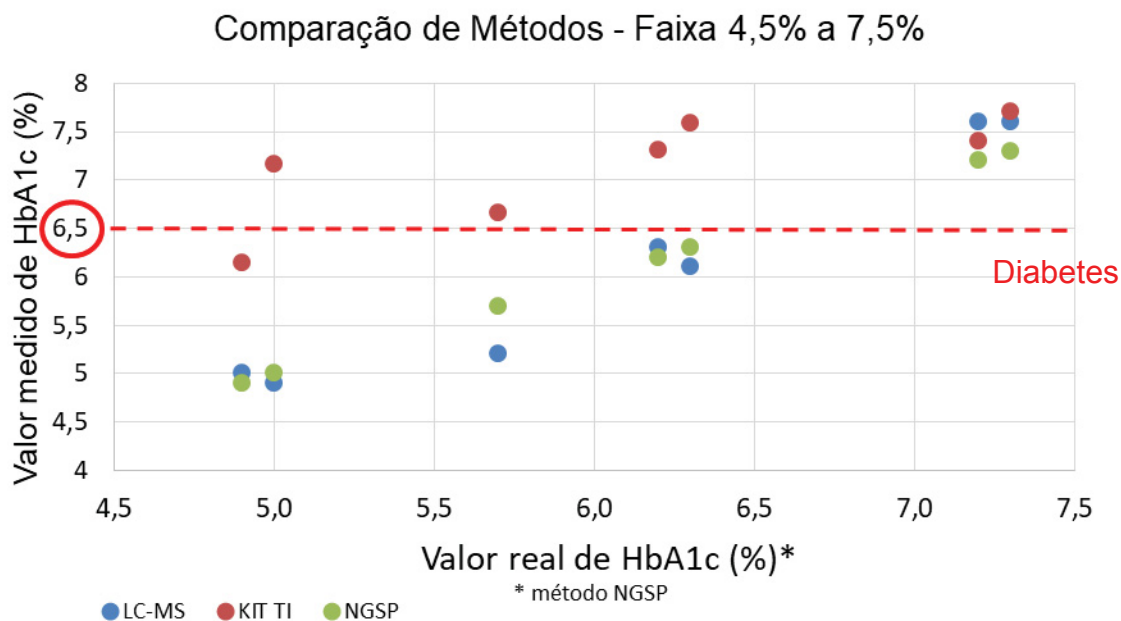
FONTE: O autor (2018)

De acordo com os resultados obtidos fica evidente a baixa concordância entre os resultados obtidos através do método considerado referência e o método utilizando o kit comercial. Dois terços dos resultados apresentaram erros superiores a 10% em relação ao valor considerado real. Considerando que a análise de hemoglobina glicada apresenta uma janela de interesse consideravelmente restrita, uma vez que os valores tipicamente encontrados variam entre 4% e 20%, erros acima de 10% resultam em medições muito diferentes clinicamente.

O impacto dessas variações pode ser observado principalmente quando analisamos os valores de HbA1c utilizados para o diagnóstico de diabetes. De acordo com as recentes diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2018), valores de HbA1c acima de 6,5% confirmam o diagnóstico de diabetes. Quando consideramos os valores obtidos através do método por troca iônica pode-se observar que cinco amostras seriam erroneamente classificadas como diagnóstico

positivo de diabetes (falso positivo) ou pré-diabetes. Na faixa entre 4% e 7%, os erros no método por troca iônica são consideravelmente maiores, podendo levar a falhas no diagnóstico do diabetes (GRÁFICO 1).

GRÁFICO 1. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PELOS MÉTODOS LC-QTOF-MS, KIT COMERCIAL (TROCA IÔNICA) E NGCP, NA FAIXA 4% A 7,5% DE HbA1c

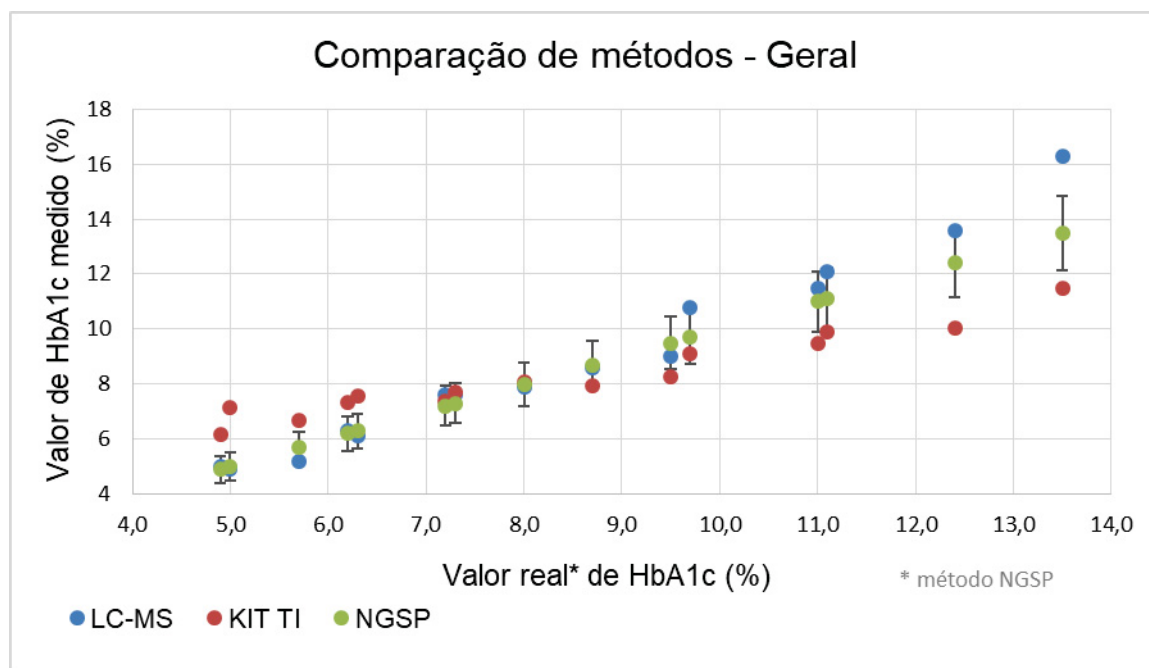


FONTE: O autor (2018)

Ao considerar as amostras próximas a faixa diagnóstica (HbA1c entre 5% a 7%), todas as amostras pertencentes a essa faixa foram erroneamente classificadas pelo método do kit comercial. Este resultado é bastante alarmante visto que o método de quantificação por mini colunas de troca iônica é um dos mais utilizados em regiões metropolitanas (PANAROTTO, TOSS; TELES, 2005).

De forma geral, os resultados obtidos através do método desenvolvido por LC-QTOF-MS se mostrou bastante eficiente na determinação da concentração de HbA1c em amostras reais (GRÁFICO 2).

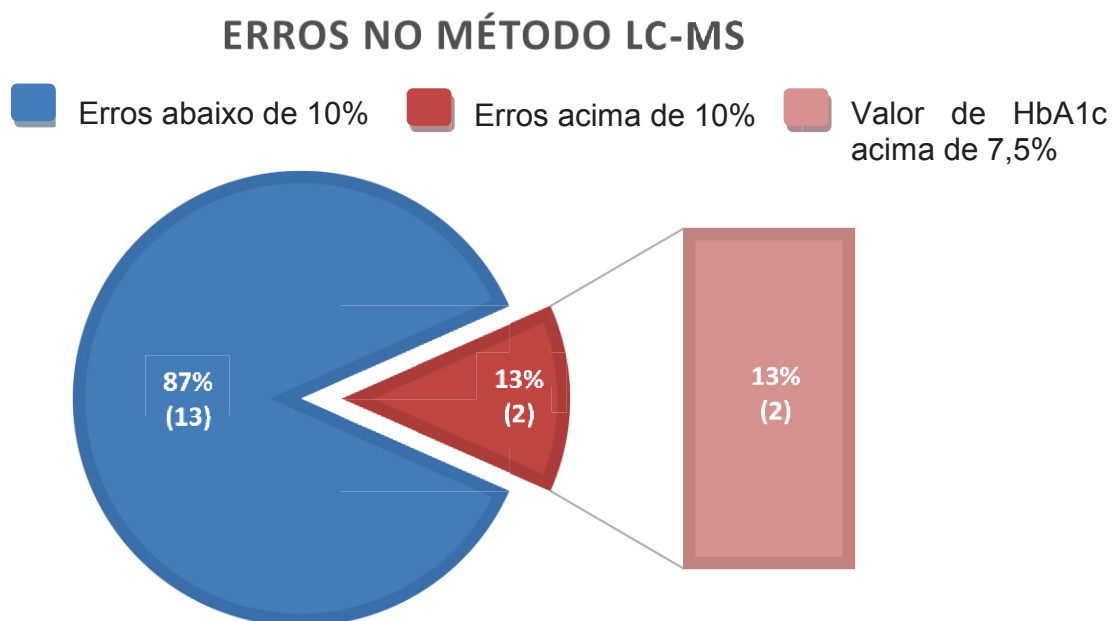
GRÁFICO 2. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PELOS MÉTODOS LC-QTOF-MS, KIT COMERCIAL (TROCA IÔNICA) E NGCP, COM TODAS AS AMOSTRAS.



FONTE: O autor (2018)

O método desenvolvido apresentou resultados próximos ao método de referência, com valores de erros abaixo de 10%, em 13 das 15 amostras analisadas. Das amostras que apresentaram erros acima, uma estava fora do limite de quantificação do método e por isso já era esperado um erro maior (GRÁFICO 3). Também vale ressaltar que ambas amostras encontram-se fora da faixa de 6% a 8%, não comprometendo o diagnóstico. As informações quanto ao (não) controle da glicemia também poderiam ser utilizadas para o acompanhamento da resposta e adesão do paciente ao tratamento. Os resultados obtidos demonstraram uma boa relação na faixa de concentração utilizada para o diagnóstico de diabetes.

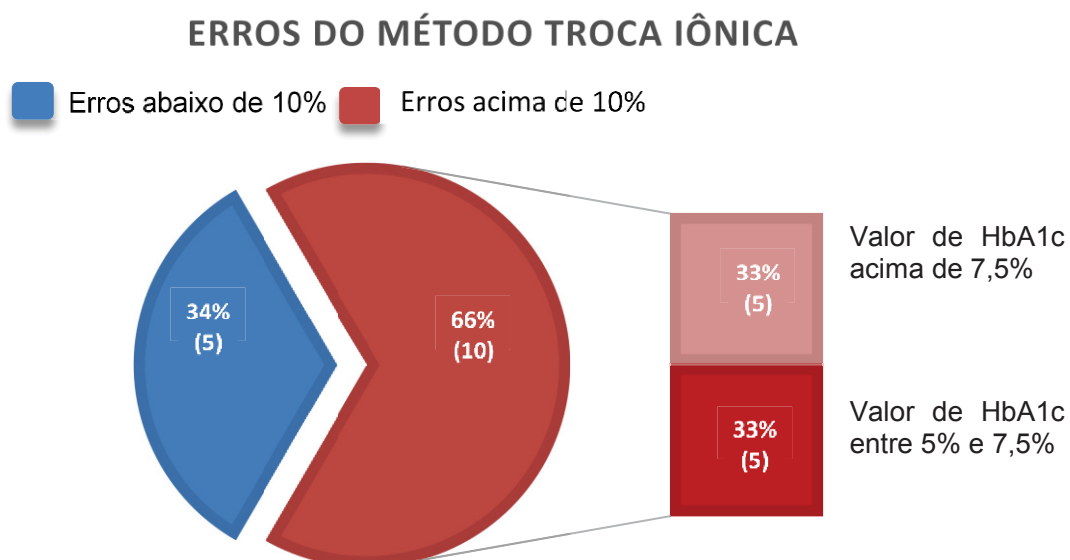
GRÁFICO 3. DIVISÃO DOS ERROS NO MÉTODO LC-QTOF-MS



FONTE: O autor (2018)

Já o método baseado na separação por troca iônica apresentou desvios superiores a 10% em 10 das 15 amostras avaliadas, sendo que dentre essas 10 amostras, 5 encontram-se na faixa crítica para o diagnóstico (GRÁFICO 4).

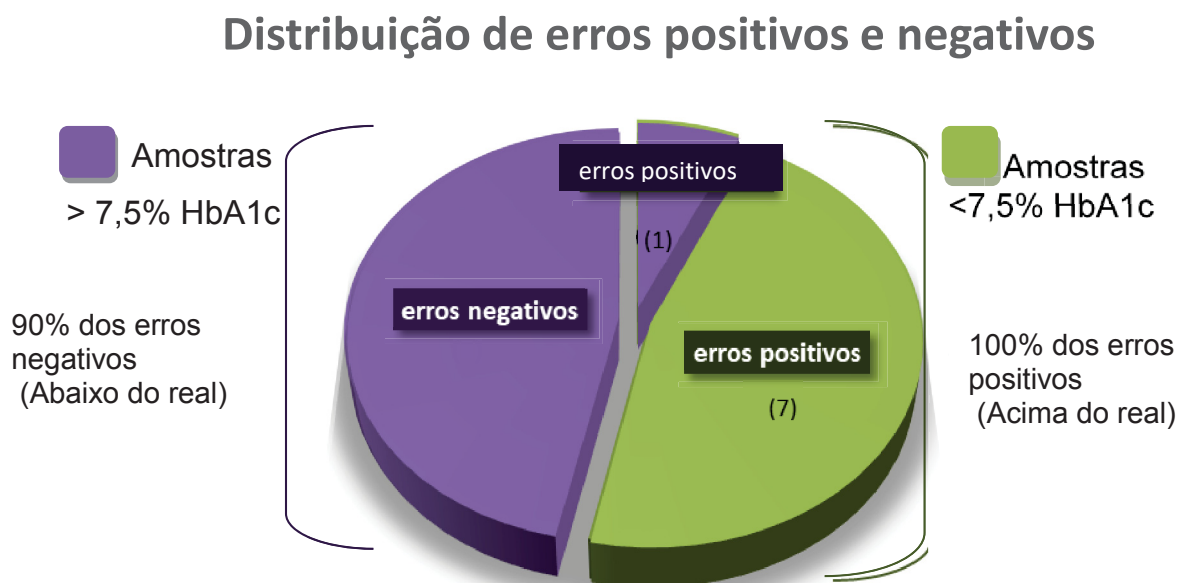
GRÁFICO 4. DIVISÃO DOS ERROS NO MÉTODO LC-QTOF-MS



Fonte: O autor (2018)

Essa elevada proporção de erros provavelmente se deve a própria limitação da técnica. Os métodos baseados na separação de cargas não apresentam seletividade suficiente para diferenciar a fração HbA1c dentre as outras frações de hemoglobina glicada. Essas outras frações contribuem com uma porção menor da hemoglobina glicada total, porém, em concentrações menores de HbA1c a soma dessa quantidade de hemoglobina glicada não específica passa a ser considerável, principalmente na faixa utilizada para o diagnóstico. Como pode-se observar GRÁFICO 5, as amostras que apresentam concentrações de HbA1c abaixo de 7,5%, apresentaram erros positivos, provavelmente em razão da soma das outras frações de hemoglobina glicada, não HbA1c. Já em concentrações acima de 7,5%, nos quais a proporção de hemoglobina glicada não HbA1c já não tem tanto impacto na concentração final, os erros foram negativos.

GRÁFICO 5. DISTRIBUIÇÃO DOS ERROS POSITIVOS E NEGATIVOS NA METODOLOGIA POR TROCA IÔNICA



FONTE: O autor (2018)

Os cálculos de sensibilidade e especificidade analítica colaboram com essa hipótese. A sensibilidade analítica para ambos os métodos foi alta (100%) uma vez que não houveram resultados falso negativos (FIGURA 34). Porém, quando calculamos a especificidade analítica, o método por troca iônica apresentou resultados consideravelmente baixos (20%), o que pode ser resultante da quantificação das outras frações de hemoglobina glicada não HbA1c. O método LC-

QTOF-MS desenvolvido neste trabalho apresentou resultados promissores, apesar do pequeno número de amostras. Como o método não apresentou resultados falso negativos e falso positivos, a sensibilidade e especificidade analíticas ficaram em 100%, demonstrando aplicabilidade do método para análise de amostras reais e monitorização da qualidade dos métodos comercialmente disponíveis.

FIGURA 34. DEMONSTRAÇÃO DE CÁLCULOS DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

NSGP	KIT	
	POS	NEG
POS	10 (VP)	0 (FN)
NEG	4 (FP)	1 (VN)

SENSIBILIDADE ANALÍTICA $S = (VP \times 100) / (VP + FN)$
 KIT TROCA IONICA $(10 \times 100) / (10 + 0) = \mathbf{100\%}$

ESPECIFICIDADE ANALÍTICA $E = (VN \times 100) / (VN + FP)$
 KIT TROCA IONICA $(1 \times 100) / (1 + 4) = \mathbf{20\%}$

NSGP	LC-MS	
	POS	NEG
POS	10	0
NEG	0	5

SENSIBILIDADE ANALÍTICA $S = (VP \times 100) / (VP + FN)$
 Método LC-MS $(10 \times 100) / (10 + 0) = \mathbf{100\%}$

ESPECIFICIDADE ANALÍTICA $E = (VN \times 100) / (VN + FP)$
 Método LC-MS $(5 \times 100) / (5 + 0) = \mathbf{100\%}$

NOTA: NSGP: Método de referencia; KIT: Método teste kit troca iônica; LC-QTOF-MS: Método teste por cromatografia acoplada a espectrometria de massas; POS: Amostras positivas para diabetes; NEG: Amostras negativas para diabetes; VP: Verdadeiro Positivo; FN: Falso Negativo; FP: Falso Positivo; VN: Verdadeiro Negativo FONTE: O autor (2018)

Deve-se ressaltar novamente que o número de amostras utilizadas nessa aplicação é baixo. Um tamanho amostral maior ofereceria maiores evidências quanto aos assuntos discutidos, porém as tendências observadas nesse trabalho estão de acordo com a literatura científica a esse respeito (ADA, 2018; CAMARGO; GROSS, 2004; RHEA; MOLINARO, 2014; SBD, 2018; SCHECHTER, 2008; WEYKAMP,

JOHN; MOSCA, 2009) e podem ser utilizadas em conjunto para embasar as hipóteses levantadas e a promissora aplicabilidade do método desenvolvido tanto no diagnóstico e controle do diabetes quanto na monitorização dos métodos disponíveis.

5 CONCLUSÃO

O método por LC-QTOF-MS desenvolvido e validado nesse estudo apresentou-se adequado para quantificação de hemoglobina glicada em amostras de sangue, sendo o primeiro método utilizando a espectrometria de massas de alta resolução a ser validado para quantificação deste analito.

A técnica de preparo das amostras através da digestão enzimática utilizando a endoproteinase glu-C mostrou-se adequada e seletiva, garantindo que o peptídeo gerado representasse exclusivamente a fração HbA1c, sem a possibilidade de interferentes causados por glicações inespecíficas.

Os parâmetros de validação indicaram que o método é seletivo para os peptídeos glu-VHLTPE e VHLTPE em matriz; linear na faixa entre 4,4% e 11,9% com valores de r próximos a 0,98; sensível, capaz de detectar variações inferiores a 1% de HbA1c; preciso, com variações máximas de 9,89%; exato, com erros máximos de 8,06% e livre de efeitos residuais e de matriz.

Os estudos de estabilidade demonstraram que há tempo suficiente para preparo das amostras, sua análise e, se necessário, reanálise sem que ocorram perdas relacionadas à degradação, proporcionando uma quantificação segura e confiável.

O ensaio com amostras de pacientes diabéticos confirmou a aplicabilidade do método às reais condições de análise. Foi observado que é perfeitamente possível que essas amostras sejam avaliadas através do método desenvolvido, o qual apresentou resultados muito coerentes quando comparado a técnica de referência, certificada. Os resultados sugerem que o novo método seja mais seletivo que o método comercial por troca iônica, apresentando menores erros em relação a técnica de referência.

O presente trabalho confirmou que é possível quantificar a HbA1c através da técnica de LC-QTOF-MS e novos estudos para aplicação do método como diagnóstico são muito promissores. A proposta não é substituir os métodos atuais e sim colaborar para que, em conjunto, sejam eliminadas as limitações de cada ferramenta. A fiscalização dos métodos comerciais deve ser feita por um método mais seletivo, de forma a garantir que os resultados obtidos a partir das diferentes técnicas sejam concordantes.

Novos ensaios com um número maior e em maior quantidade de amostras devem ser realizados, possibilitando assim garantir maior confiabilidade dos dados. O método desenvolvido será capaz de contribuir significativamente para a padronização dos métodos utilizados para quantificação de hemoglobina glicada, possibilitando que o controle e o diagnóstico do diabetes através do exame de HbA1c seja feito com maior segurança e confiabilidade.

REFERÊNCIAS

- ADA. American Diabetes Association - Standards in Medical Care in Diabetes - 2018. **Diabetes Care**, v. 41, n. 1, 2018.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, T. et al. Tests of glycemia in diabetes. **Diabetes Care**, v. 26 Suppl 1, p. S106-8, 2003.
- ANAND, S. et al. Discovery and Confirmation of Diagnostic Serum Lipid Biomarkers for Alzheimer's Disease Using Direct Infusion Mass Spectrometry. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 59, n. 1, p. 277-290, 2017.
- ANAS EL-ANEED, A. C., JOSEPH BANOUB. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 3, p. 210, 2009.
- ANNESLEY, T. M. Ion suppression in mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 1041-4, 2003.
- BALOGH, M. P. Debating Resolution and Mass Accuracy in Mass Spectrometry. **Spectroscopy**, v. 19, n. 10, 2004.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. E. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008.
- BARONE, B. et al. Cetoacidose Diabética em Adultos – Atualização de uma Complicação Antiga. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, v. 51, n. 9, p. 1434-1447, 2007.
- BIOTECH, T. Boronate Affinity Chromatography. 2018. Disponível em: < <https://www.trinitybiotech.com/haemoglobins/boronate-affinity-chromatography/> >. Acesso em: 02/02/2018.
- BRAMER, S. V. An Introduction to Mass Spectrometry. Department of Chemistry, 1997. Disponível em: < http://science.widener.edu/svb/massspec/intro_to_ms/ >. Acesso em: 02/02/2018.
- BRASIL. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Brasília, DF, 2003.
- BRASIL. RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro de medicamentos. **ANVISA**. Brasília, DF, 2012.

BRINKMALM, A. W.-B. A. G. **Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications**. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008. ISBN 978-0-471-71395-1.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-20, 2001.

CAMARGO, J. L.; GROSS, J. L. Glico-Hemoglobina (HbA1c): Aspectos Clínicos e Analíticos. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 48, n. 4, p. 451-463, 2004.

CAMARGO, J. L. et al. Accuracy of conversion formulae for estimation of glycohaemoglobin. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 58, n. 6, p. 521-8, 1998.

CANTÚ, M. D. et al. SEQÜENCIAMENTO DE PEPTÍDEOS USANDO ESPECTROMETRIA DE MASSAS: UM GUIA PRÁTICO. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669, 2008.

CHATTERJEE, S.; KHUNTI, K.; DAVIES, M. J. Type 2 diabetes. **Lancet**, v. 389, n. 10085, p. 2239-2251, 2017.

COLLINS, C. H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora UNICAMP, 2006.

COTTER, R. J. Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. **Analytical Chemistry**, v. 64, n. 21, p. 1027A-1039A, 1992.

COTTER, R. J. Peer Reviewed: The New Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 13, p. 445A-51A, 1999.

CRAVATT, B. F.; SIMON, G. M.; YATES, J. R., 3RD. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 991-1000, 2007.

DATASUS. Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). **MINISTERIO DA SAÚDE**, 2018.

DAVID W. BALL; W. HILL; SCOTT, R. J. **The Basics of General, Organic, and Biological Chemistry**. Irvington, NY: Flat World Knowledge, 2011. ISBN 978-1-4533-1110-3

DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, n. 1, p. 51-78, 2007.

DIABETES CONTROL COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, T. et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 329, n. 14, p. 977-86, 1993.

DIABETES, S. B. D. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo: AC Farmacêutica 2015.

DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP, T. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. **Lancet**, v. 352, n. 9131, p. 837-53, 1998.

ECKERBOM, S.; BERGQVIST, Y.; JEPPSSON, J. O. Improved method for analysis of glycated haemoglobin by ion exchange chromatography. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 31 (Pt 4), p. 355-60, 1994.

EMA. **Guideline on bioanalytical method validation**. Committee for Medicinal Products for Human Use: EMA European Medicine Agency. 44: 1-23 p. 2012.

FDA. SERVICES, U. S. D. O. H. A. H. Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation. **Food and Drug Administration**. 2001.

FENN, J. B. Electrospray ionization mass spectrometry: How it all began. **J Biomol Tech**, v. 13, n. 3, p. 101-18, 2002.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

GARCIA-ALCALA, H.; RUIZ-ARGUELLES, A.; CEDILLO-CARVALLO, B. Effect of the method to measure levels of glycated hemoglobin on individual clinical decisions: comparison of an immunoassay with high-performance liquid chromatography. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 132, n. 3, p. 332-5, 2009.

GASCON, F.; MOLINA, E. Precision of measurement of glycated hemoglobin by affinity chromatography on regenerated columns. **Clinical Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 191, 1989.

GILLERY, P.; GUILLEMIN, C.; DELPECH, M. [Glycated hemoglobin: assay methods and problems of standardization]. **Annales de biologie clinique**, v. 52, n. 3, p. 157-63, 1994.

GLISH, G. L.; BURINSKY, D. J. Hybrid mass spectrometers for tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 19, n. 2, p. 161-72, 2008.

GRINDEL, A. et al. Association of Genomic Instability with HbA1c levels and Medication in Diabetic Patients. **Scientific Reports**, v. 7, p. 41985, 2017.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia Humana e Mecanismo das Doenças**. 6. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

HAN, X.; ASLANIAN, A.; YATES, J. R., 3RD. Mass spectrometry for proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 5, p. 483-90, 2008.

HENCHMAN, M.; STEEL, C. Understanding the Quadrupole Mass Filter through Computer Simulation. **Journal of chemical education**, v. 75, n. 8, 1998.

ICH. VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: text and methodology. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE 2005. p.13.

IDF. **International Diabetes Federation - Diabetes Atlas**. 8. 2017. ISBN 978-2-930229-87-4. Disponível em: < www.diabetesatlas.org >.

INMETRO. **Orientações sobre Validação de Métodos e Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008**: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial: março, 2003 p. 2003.

INTERNATIONAL ASSOCIATION OF DIABETES PREGNANCY STUDY GROUPS CONSENSUS PANEL et al. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. **Diabetes Care**, v. 33, n. 3, p. 676-82, 2010.

ITO, S.; NAKAHARI, T.; YAMAMOTO, D. The structural feature surrounding glycosylated lysine residues in human hemoglobin. **Biomedical Research**, v. 32, n. 3, p. 217-23, 2011.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized guidelines for international quality control in analytical chemistry laboratories. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 649-666, 1995.

JENKINS, R. et al. Recommendations for validation of LC-MS/MS bioanalytical methods for protein biotherapeutics. **AAPS Journal**, v. 17, n. 1, p. 1-16, 2015.

JEPPSSON, J. O. et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC**, v. 40, n. 1, p. 78-89, 2002.

JOHN, W. G. Effect of Schiff base (labile fraction) on the measurement of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography. **Clinical Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 1111-2, 1984.

KARAS, M.; KRUGER, R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 2, p. 427-40, 2003.

KINTER, M.; SHERMAN, N. E. **Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry**. New York: John Wiley & Sons Inc., 2000. ISBN 0-471-32249-0.

LACORTE, S.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, n. 6, p. 866-80, 2006.

LEE, K. F.; SZETO, Y. T.; BENZIE, I. F. Glycohemoglobin measurement: methodological differences in relation to interference by urea. **Acta Diabetologica**, v. 39, n. 1, p. 35-9, 2002.

LEHNINGER, A. L. N., D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 4. São Paulo: Sarvier, 2000.

MAHAFFY, P. Huygens' Gas Chromatograph Mass Spectrometer (GCMS) page. 2008. Disponível em: < https://attic.gsfc.nasa.gov/huygensgcms/MS_Detector_1.htm >.

MAYNE, J. et al. Bottom-Up Proteomics (2013-2015): Keeping up in the Era of Systems Biology. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 95-121, 2016.

MICHAEL L. GROSS et al. TOF MS Resolution and Mass Measurement Accuracy. 2018. Disponível em: < <https://msr.dom.wustl.edu/tof-ms-resolution-mass-measurement-accuracy/> >. Acesso em: 02/02/2018.

MOSCA, A. et al. Performance of glycated hemoglobin (HbA(1c)) methods evaluated with EQAS studies using fresh blood samples: Still space for improvements. **Clinica Chimica Acta: international journal of clinical chemistry**, v. 451, n. Pt B, p. 305-9, 2015.

MURRAY, K. K. et al. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013)*. **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 7, 2013.

NETTO, A. P. et al. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 45, n. 1, p. 31-48, 2009.

NICHOLAS, J. et al. Recent HbA1c values and mortality risk in type 2 diabetes. population-based case-control study. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68008, 2013.

NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1, p. 8-35, 2009.

OBERHEIDE, J.; WILHELMS, P.; ZIMMER, M. New results on the absolute ion detection efficiencies of a microchannel plate. **Measurement Science and Technology**, v. 8, n. 4, 1997.

OLIVEIRA, M. I. A. et al. RAGE receptor and its soluble isoforms in diabetes mellitus complications. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 2, p. 12, 2013.

OLSEN, J. V.; ONG, S. E.; MANN, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. **Molecular & Cellular Proteomics : MCP**, v. 3, n. 6, p. 608-14, 2004.

OREMEK, G.; SEIFFERT, U. B.; SCHMID, G. Determination of glycated hemoglobin by affinity chromatography. **Clinica Chimica Acta: international journal of clinical chemistry**, v. 168, n. 1, p. 81-6, 1987.

OZOUGWU, J. C. et al. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Journal of Physiology and Pathophysiology**, v. 4, n. 4, p. 46-57, 2013.

PANAROTTO, D.; TOSS, A. M. M.; TELES, A. R. Levantamento dos métodos de análise de hemoglobina glicada utilizados em laboratórios da Serra Gaúcha. **Scientia Medica**, v. 15, n. 3, 2005.

PASIN, D. et al. Current applications of high-resolution mass spectrometry for the analysis of new psychoactive substances: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2017.

POLESELLO, S. How to present an analytical method. **Food Chemistry**, v. 58, p. 145-147, 1996.

RAJAPAKSE, J. C.; DUAN, K. B.; YEO, W. K. Proteomic cancer classification with mass spectrometry data. **American Journal of Pharmacogenomics : genomics-related research in drug development and clinical practice**, v. 5, n. 5, p. 281-92, 2005.

REKHI, H. et al. A Review on Recent Applications of High-Performance Liquid Chromatography in Metal Determination and Speciation Analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 47, n. 6, p. 524-537, 2017.

RHEA, J. M.; MOLINARO, R. Pathology consultation on HbA(1c) methods and interferences. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 141, n. 1, p. 5-16, 2014.

RIBANI, M. et al. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIFAI, N. G., M. A.; CARR, S. A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 971-83, 2006.

ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. **Biomedical Mass Spectrometry**, v. 11, n. 11, p. 601, 1984.

ROST, B. Review: protein secondary structure prediction continues to rise. **J Struct Biol**, v. 134, n. 2-3, p. 204-18, 2001.

SACKS, D. B. et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 436-72, 2002.

SBD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**, v. 1, n. 1, p. 1-15; 361-365 2015.

SBD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. São Paulo: Clannad, 2018. ISBN 978-85-93746-02-4.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3927-38, 2008.

SHAH, V. P. The history of bioanalytical method validation and regulation: Evolution of a guidance document on bioanalytical methods validation. **The APPS Journal**, v. 9, n. 1, p. 43-47, 2007.

SHIMA K, E. J., OIMOMI M, OSHIMA I, OMORI Y, KATAYAMA Y, KANAZAWA Y,., Interlaboratory differences in GHb measurement in Japan, an interim report of the committee on an interlaboratory standardization of HbA1c determination. The Japanese Diabetes Society. **Journal of Japan Diabetical Society**, v. 37, p. 233, 1994.

SKRIVER, M. V. et al. Relationship of HbA1c variability, absolute changes in HbA1c, and all-cause mortality in type 2 diabetes: a Danish population-based prospective observational study. **BMJ Open Diabetes Res Care**, v. 3, n. 1, p. e000060, 2015.

SKYLER, J. S. Diabetic complications. The importance of glucose control. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 25, n. 2, p. 243-54, 1996.

STRATTON, I. M. et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. **BMJ Open Diabetes Research & Care**, v. 321, n. 7258, p. 405-12, 2000.

TEDDY. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) Study. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1150, p. 1-13, 2008.

ULRICH, P.; CERAMI, A. Protein glycation, diabetes, and aging. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 56, p. 1-21, 2001.

USP. **The United States Pharmacopeia**. 30 - NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

VAZVAEI, F.; DUGGAN, J. X. Validation of LC-MS/MS bioanalytical methods for protein therapeutics. **Bioanalysis**, v. 6, n. 13, p. 1739-42, 2014.

VENTURES, D. M. **Microchannel Plates and Microchannel Plate Detectors**. Products for research built by scientists for scientists. San Diego CA. 1997

VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, n. 8-10, p. 867-869, 1996.

WESTON, L. A.; BAUER, K. M.; HUMMON, A. B. Comparison of bottom-up proteomic approaches for LC-MS analysis of complex proteomes. **Analytical methods : advancing methods and applications**, v. 5, n. 18, 2013.

WEYKAMP, C.; JOHN, W. G.; MOSCA, A. A review of the challenge in measuring hemoglobin A1c. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 3, n. 3, p. 439-45, 2009.

WEYKAMP, C. W. et al. Standardization of glycohemoglobin results and reference values in whole blood studied in 103 laboratories using 20 methods. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 1, p. 82-6, 1995.

WHO. **World Health Organization - Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2009.

WHO. **Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus**. Geneva: WHO Press 2011.

WHO. **Global reports on diabetes**. . França: WHO Press 2016.

WISNIEWSKI, J. R. Mass spectrometry-based proteomics: principles, perspectives, and challenges. **Arch Pathol Lab Med**, v. 132, n. 10, p. 1566-9, 2008.

WU, B. et al. Ovarian cancer classification based on mass spectrometry analysis of sera. **Cancer informatics**, v. 2, p. 123-32, 2007.

YORK, T. P. et al. High-resolution mass spectrometry proteomics for the identification of candidate plasma protein biomarkers for chronic obstructive pulmonary disease. **Biomarkers**, v. 15, n. 4, p. 367-77, 2010.

ZOUNGAS, S. et al. Association of HbA1c levels with vascular complications and death in patients with type 2 diabetes: evidence of glycaemic thresholds. **Diabetologia**, v. 55, n. 3, p. 636-43, 2012.

APÊNDICE 1. LISTA DE PEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS DIGESTÕES *IN SILICO* DA HEMOGLOBINA (α , β) POR GLU-C

25/07/2018

ExPASy - PeptideMass

PeptideMass

[Home](#) | [Contact](#)

PeptideMass

The entered protein is: P69905

The selected enzyme is: Glu C (phosphate)

Maximum number of missed cleavages (MC): 0

All cysteines in reduced form.

Methionines have not been oxidized.

Displaying peptides with a mass bigger than 500 Dalton.

Using monoisotopic masses of the occurring amino acid residues and giving peptide masses as $[M+H]^+$.

You have selected HBA_HUMAN (P69905) from UniProtKB/Swiss-Prot:

Hemoglobin subunit alpha (Alpha-globin) (Hemoglobin alpha chain)

- Chain Hemoglobin subunit alpha at positions 2 - 142 [Theoretical pI: 8.73 / Mw (average mass): 15126.36 / Mw (monoisotopic mass): 15116.88]

mass	position	#MC	peptide sequence
3455.9459	87-117	0	LHAHKLRVDPVNFKLLSHCL LVTLAAHLPAE
2135.0419	32-48	0	RMFLSFPTTKTYFPHFD
1723.9238	8-24	0	KTNVKAAWGKVG AHAGE
1718.9296	49-65	0	LSHGSAQVKGHGK KQVAD
1699.9741	128-142	0	KFLASVSTVLT SKYR
1057.5312	118-127	0	FTPAVHASLD
1018.4873	77-86	0	MPNALSALSD
1010.5265	66-75	0	ALTNAVAHVD
601.3191	2-7	0	VLSPAD

94.3% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 500 Da or > 100000000000 Da):

```

100      200      300      400      500      600
VLSPADKTN VKAAWGKVG A HAGEygaeal eRMFLSFPTT KTYFPHFDLS HGSQAQVKGHG
700      800      900      1000     1100     1200
KKVADALTN VAHVDdMPNA LSALSDLHAH KLRVDPVNFK LLSHCLLVTL AAHLPAEFTP
1300     1400
AVHASLDKFL ASVSTVLT SK YR

```

Display the list of masses in raw text format to be exported into an external application

PeptideMass

PeptideMass

The entered protein is: P68871

The selected enzyme is: Glu C (phosphate)

Maximum number of missed cleavages (MC): 0

All cysteines in reduced form.

Methionines have not been oxidized.

Displaying peptides with a mass bigger than 500 Dalton.

Using monoisotopic masses of the occurring amino acid residues and giving peptide masses as $[M+H]^+$.

You have selected **HBB_HUMAN (P68871)** from UniProtKB/Swiss-Prot:

Hemoglobin subunit beta (Beta-globin) (Hemoglobin beta chain) [Contains: LVV-hemorphin-7; Spinorphin]

- Chain Hemoglobin subunit beta at positions **2 - 147** [Theoretical pI: 6.81 / Mw (average mass): 15867.22 / Mw (monoisotopic mass): 15857.25]

mass	position	#MC	peptide sequence
2680.4357	123-147	0	FTPPVQAAYQKVVAGVANAL AHKYH
2266.2277	103-122	0	NFRLLGNVLCVLAHHFGKE
2154.1851	54-74	0	AVMGNPKVKAHGKKVLGAFS D
2095.1487	28-44	0	ALGRLLVVYPWTQRFFE
1616.8642	9-23	0	KSAVTALWGKVNVDDE
1180.6208	81-91	0	NLKGTFATLSE
837.4465	96-102	0	KLHVDPE
824.4148	2-8	0	VHLTPEE
625.3304	75-80	0	GLAHL D
532.2613	49-53	0	LSTPD

91.8% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 500 Da or > 100000000000 Da):

```

100      200      300      400      500      600
VHLTPEEKS AVTALWGKVN VDEvggeALG RLLVVYPWTQ RFFESfgdLS TPDVAVMGNPK
700      800      900      1000     1100     1200
VKAHGKKVLG AFSDDLALHD NLKGTFATLS E1hcdKLHVD PENFRLLGNV LVCVLAHHFG
1300     1400
KEFTPPVQAA YQKVVAGVAN ALAHKYH

```

Display the list of masses in raw text format to be exported into an external application

- Peptide LVV-hemorphin-7 at positions **33 - 42** [Theoretical pI: 8.75 / Mw (average mass): 1308.55 / Mw (monoisotopic mass): 1307.70]

mass	position	#MC	peptide sequence
1308.7099	33-42	0	LVVYPWTQRF

100.0% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 500 Da or > 100000000000 Da):

25/07/2018

ExPASy - PeptideMass

10 20 30 40
 LVVYPWTQ RF

in raw text format to be exported into an external application

- Peptide Spinorphin at positions 33 - 39 [Theoretical pI: 5.52 / Mw (average mass): 877.05 / Mw (monoisotopic mass): 876.47]

mass	position	#MC	peptide sequence
877.4818	33-39	0	LVVYPWT

100.0% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 500 Da or > 100000000000 Da):

10 20 30
 LVVYPWT

in raw text format to be exported into an external application

APÊNDICE 2. LISTA DE PEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS DIGESTÕES *IN SILICO* DA HEMOGLOBINA (α , β) POR TRIPSINA

25/07/2018

ExpASy - PeptideMass

PeptideMass

[Home](#) | [Contact](#)

PeptideMass

The entered protein is: P69905

The selected enzyme is: Trypsin

Maximum number of missed cleavages (MC): 0

All cysteines in reduced form.

Methionines have not been oxidized.

Displaying peptides with a mass bigger than 500 Dalton.

Using monoisotopic masses of the occurring amino acid residues and giving peptide masses as $[M+H]^+$.

You have selected HBA_HUMAN (P69905) from UniProtKB/Swiss-Prot:

Hemoglobin subunit alpha (Alpha-globin) (Hemoglobin alpha chain)

- Chain Hemoglobin subunit alpha at positions 2 - 142 [Theoretical pI: 8.73 / Mw (average mass): 15126.36 / Mw (monoisotopic mass): 15116.88]

mass	position	#MC	peptide sequence
2996.4894	63-91	0	VADALTNVAHVDDMPNALS ALSDLHAHK
2967.6124	101-128	0	LLSHCLLVTLAAHLPAEFTP AVHASLDK
1833.8918	42-57	0	TYFPFDLSHGSAQVK
1529.7342	18-32	0	VGAHAGEYGAEALER
1252.7147	129-140	0	FLASVSTVLTSK
1071.5543	33-41	0	MFLSFPTTK
818.4406	94-100	0	VDPVNFK
729.4141	2-8	0	VLSPADK
532.2878	13-17	0	AAWGK

90.8% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 500 Da or > 100000000000 Da):

```

10      20      30      40      50      60
VLSPADKtn vkAAWGKVG A HAGEYGAEAL ERMFLSFPTT KTYFPFDLS HGSAQVKghg

70      80      90      100     110     120
kkVADALTNA VAHVDDMPNA LSALSDLHAH K1rVDPVNFK LLSHCLLVTL AAHLPAEFTP

130     140
AVHASLDKFL ASVSTVLTSK yr

```

in raw text format to be exported into an external application

PeptideMass

PeptideMass

The entered protein is: P68871

The selected enzyme is: Trypsin

Maximum number of missed cleavages (MC): 0

All cysteines in reduced form.

Methionines have not been oxidized.

Displaying peptides with a mass bigger than 500 Dalton.

Using monoisotopic masses of the occurring amino acid residues and giving peptide masses as $[M+H]^+$.

You have selected **HBB_HUMAN (P68871)** from UniProtKB/Swiss-Prot:

Hemoglobin subunit beta (Beta-globin) (Hemoglobin beta chain) [Contains: LVV-hemorphin-7; Spinorphin]

- Chain Hemoglobin subunit beta at positions **2 - 147** [Theoretical pl: 6.81 / Mw (average mass): 15867.22 / Mw (monoisotopic mass): 15857.25]

mass	position	#MC	peptide sequence
2058.9477	42-60	0	FFESFGDLSTPDAVMGNPK
1719.9726	106-121	0	LLGNVLCVLAHHFGK
1669.8907	68-83	0	VLGAFSDGLAHLNLIK
1421.6729	84-96	0	GTFATLSELHCDK
1378.7001	122-133	0	EFTPPVQAAYQK
1314.6648	19-31	0	VNVDEVGGEALGR
1274.7255	32-41	0	LLVYPWTQR
1149.6738	134-145	0	VVAGVANALAHK
1126.5639	97-105	0	LHVDPENFR
952.5098	2-9	0	VHLTPEEK
932.5200	10-18	0	SAVTALWGK

93.8% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 500 Da or > 100000000000 Da):

```

10      20      30      40      50      60
VHLTPEEK AVTALWGKVN VDEVGGEALG RLLVYPWTQ RFFESFGDLS TPDVAVMGNPK

70      80      90      100     110     120
vkahgkVVG AFSGLAHLN NLKGTATLS ELHCDKLHVD PENFRLLGNV LVCVLAHHFG

130     140
KEFTPPVQAA YQKWAGVAN ALAHKyh

```

Display the list of masses in raw text format to be exported into an external application

- Peptide LVV-hemorphin-7 at positions **33 - 42** [Theoretical pl: 8.75 / Mw (average mass): 1308.55 / Mw (monoisotopic mass): 1307.70]

mass	position	#MC	peptide sequence
1161.6415	33-41	0	LVVYPWTQR

90.0% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 500 Da or > 100000000000 Da):

25/07/2018

ExpASy - PeptideMass

10 20 30 40
 LVVYPWTQ Rf

in raw text format to be exported into an external application

- Peptide Spinorphin at positions 33 - 39 [Theoretical pI: 5.52 / Mw (average mass): 877.05 / Mw (monoisotopic mass): 876.47]

mass	position	#MC	peptide sequence
877.4818	33-39	0	LVVYPWT

100.0% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 500 Da or > 100000000000 Da):

10 20 30
 LVVYPWT

in raw text format to be exported into an external application

ANEXO 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Nós, do Centro de Estudos em Biofarmácia da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o/a Senhor(a) a participar de um estudo intitulado **“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE HEMOGLOBINA GLICADA POR LC-MS/MS”** que tem como objetivo verificar o controle do diabetes de forma mais segura.

- a) O objetivo desta pesquisa é desenvolver um método para dosar a hemoglobina glicada, uma forma de verificar se a diabetes esta controlada pelos últimos 3 meses.
- b) Caso você participe da pesquisa, será necessário doar uma amostra de aproximadamente 2 mL de sangue, para que possamos utilizar no método desenvolvido.
- c) **Não será necessária nova coleta de sangue, o que sobrar do exame de hemoglobina glicada realizado no Hospital de Clínicas será a parte destinada à pesquisa.**
- d) Para tanto não será necessário que você se desloque. As coletas serão realizadas no Hospital de Clínicas, por seus funcionários especializados.
- e) É possível que o(a) Senhor(a) experimente algum desconforto relacionado à coleta de sangue, mesmo que não participe da pesquisa, que envolve utilização de agulha, comum a toda coleta.
- f) Não envolve qualquer riscos ao seu tratamento nem atraso na entrega do resultado do seu exame.
- g) Os benefícios esperados desta pesquisa são: desenvolver um novo método, mais rápido e sensível para o monitoramento do controle do diabetes.
- h) Para esclarecer eventuais dúvidas que o(a) senhor(a) possa ter e fornecer-lhe todas informações que queira a respeito do estudo, antes, durante ou depois de encerrado, Os pesquisadores responsáveis pelo projeto encontram-se listados e poderão ser contatados de segunda a sexta no horário comercial, na Universidade Federal do Paraná (Av. Lothário Meissner, 632 - Jardim Botânico). São os responsáveis pela pesquisa e poderão esclarecer eventuais dúvidas a respeito da sua participação.

Rubricas:

Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável _____

Orientador  Orientado 

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
 Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240
 Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

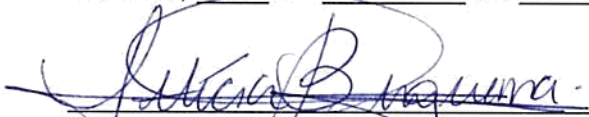
Equipe responsável pelo projeto e email	Formação	Função	Contato
Letícia Bonancio Cerqueira leticia_bc@yahoo.com.br	Doutoranda em Ciências Farmacêuticas - UFPR	Pesquisadora	3360-4075 8516-0102 3267-2746
Prof. Roberto Pontarolo pontarolo@ufpr.br	Doutor em Ciências	Coordenador	3360-4094
Francinete Ramos Campos francampos@ufpr.br	Doutora em Ciências	Colaborador	3360-4162

- i) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.
- j) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas somente pelo grupo de pesquisa. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.
- k) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos etc.) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- l) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.




Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão. Também fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema relacionado a esta pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Assinatura do participante de pesquisa
Curitiba, _____ de _____ de _____


Assinatura do Pesquisador

Rubricas:

Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável  _____
Orientador  Orientado  _____

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240
Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

**ANEXO 2. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE - UFPR**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE HEMOGLOBINA GLICADA POR LC-
MS/MS

Pesquisador: LETICIA BONANCIO CERQUEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30803114.0.0000.0102

Instituição Proponente: Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da
Saúde/ SCS

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 667.137

Data da Relatoria: 04/06/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da aluna Letícia Bonancio Cerqueira, sob orientação do Prof. Roberto Pontarolo.

O projeto será desenvolvido nas dependências do Centro de Estudos em Biofarmácia, localizado junto ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná e no Hospital de Clínicas da UFPR.

Objetivo da Pesquisa:

Os mesmos do primeiro parecer.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os mesmos do primeiro parecer.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os mesmos do primeiro parecer.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos solicitados no primeiro parecer foram devidamente anexados a este protocolo.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo:

NOTIFICAÇÃO.

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

UF: PR

Telefone: (41)3360-7259

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 667.137

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências e inadequações listadas no primeiro parecer foram adequadamente atendidas, permitindo a aprovação do projeto neste CEP/SD.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Quando o projeto de pesquisa for realizado num todo ou em parte no Hospital de Clínicas da UFPR: O pesquisador deverá aguardar o Parecer Consubstanciado de Coparticipação do CEP/HC APROVANDO o projeto, para então dar início a pesquisa. Se houver necessidade de alteração do Cronograma em virtude desse trâmite, solicitar prorrogação de prazo através de emenda, alterando o Cronograma no sistema PB.

CURITIBA, 29 de Maio de 2014

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

UF: PR

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 3. RECOMENDAÇÕES DE USO - KIT GLICOHEMOGLOBINA MONOTESTE INLAB

GLICOHEMOGLOBINA INLAB-MONOTESTE

Reagente em tubos para a determinação quantitativa de hemoglobina glicosilada no sangue total a 415 nm

INTRODUÇÃO

Do início ao fim da vida da célula vermelha, a hemoglobina glicosilada é formada continuamente pela adição da glicose ao N-terminal da cadeia beta da hemoglobina. Este processo, o qual não é enzimático, reflete a média de exposição da hemoglobina à glicose em período prolongado. Em um trabalho científico clássico, Trivelli e colaboradores¹ mostraram níveis de hemoglobina glicosilada de 2-3 vezes mais elevados em diabéticos em relação aos encontrados em indivíduos normais. Vários pesquisadores têm recomendado que a hemoglobina glicosilada serve como um indicador do controle da diabetes uma vez que os seus níveis aproximam-se dos valores normais para diabéticos respondendo ao tratamento⁽²⁻⁴⁾.

A hemoglobina glicosilada tem sido definida operacionalmente como a hemoglobina "fração rápida" (Hb1a, A1b, A1c) cujas frações separam-se primeiro durante a cromatografia em coluna com resina de troca catiônica. A hemoglobina não glicosilada, que é a maioria da hemoglobina, tem sido designada como Hb AO. O kit GLICOHEMOGLOBINA INLAB utiliza uma resina de troca catiônica de ligação rápida para obter a separação acelerada da hemoglobina glicosilada (fração rápida) da hemoglobina não glicosilada (Hb AO).

PRINCÍPIO DO TESTE

Um hemolisado preparado a partir do sangue total é misturado continuamente durante 5 minutos com uma resina de troca catiônica de ligação rápida. Durante este tempo, a Hb AO liga-se à resina. Após o período de homogeneização, um filtro é usado para separar a resina do líquido sobrenadante, onde ficou a hemoglobina glicosilada. A porcentagem de hemoglobina glicosilada da amostra é determinada, calculando-se a proporção das absorvâncias das duas hemoglobinas (glicosilada e total) da amostra, dividida pela proporção obtida das hemoglobinas (glicosilada e total) do Padrão e o resultado multiplicado pela concentração do Padrão (%). A leitura das absorvâncias é obtida a 415 nm.

MATERIAIS FORNECIDOS (para 50 testes)

- 50 x 3,0 ml - Resina de Troca Iônica
 - 8 mg/ml de resina de troca catiônica, tamponada em pH 6,9. HOMOGENEIZAR BEM ANTES DE USAR.
 - 1 x 25,0 ml - Reagente Lisante
 - 10 mM de cianeto de potássio, adicionado de surfactante.
 - 1 x 1,0 ml - Padrão liofilizado
- Preparado de hemoglobina glicosilada a partir de eritrócitos humanos. A concentração do

Padrão vem indicada no rótulo do frasco.
- 1 x 50 un - Filtros separadores

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Micropipetas de 0,02 ml e 0,1 ml.
- Pipetas de 0,5 ml e 5,0 ml.
- Homogeneizador de hemograma, shaker ou vortex.
- Controle liofilizado INLAB.
- Tubos 13 x 100 mm.
- Cronômetro e estante para tubos.
- Espectrofotômetro ou colorímetro (415 nm).

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

1. Resina

Armazenar de 15-30°C. A resina é estável até a data de validade indicada no rótulo do frasco, desde que mantida nas condições indicadas.

DETERIORAÇÃO: O líquido sobrenadante acima da resina deve ser claro e incolor. A turbidez indica deterioração e o reagente não deve ser utilizado.

2. Reagente Lisante

Armazenar de 15-30°C. O reagente é estável até a data de validade indicada no rótulo, desde que mantido nas condições indicadas.

DETERIORAÇÃO: O Reagente Lisante deve ser claro e incolor. A turbidez indica deterioração e o reagente não deve ser utilizado.

3. Padrão de Glicohemoglobina

Armazenar de 2-8°C. O Padrão é estável até a data de validade indicada no rótulo, desde que mantido nas condições indicadas. **PROTEJA DA LUZ E CALOR.**

Reconstituição: Adicionar 1,0 ml de água deionizada. Homogeneizar suavemente durante 10 minutos. Depois de reconstituído, o Padrão é estável por 14 dias, se mantido de 2-8°C ou pode ser dispensado em alíquotas de 0,1 ml congelado por 90 dias.

PRECAUÇÕES

- Somente para uso diagnóstico in vitro.
- A resina causa irritação. Evite o contato com os olhos, a pele e o vestuário. Caso ocorra, lave a área afetada com bastante água.
- O Reagente Lisante contém cianeto. Não misturar com ácidos. Lave as mãos após o manuseio; descarte com grande quantidade de água.
- O Padrão de glicohemoglobina é um padrão secundário com valor estabelecido por um método de referência¹. Manuseie com o mesmo cuidado tomado para as amostras de sangue humano.
- Os eritrócitos humanos usados neste produto deram resultados negativos para o antígeno da Hepatite B, Hepatite C e anticorpo HIV.

COLETA DA AMOSTRA

Coletar o sangue com EDTA como anticoagulante.

Precauções:

Manuseie as amostras com o mínimo de potencialmente infectantes.

Conservação da amostra:

A glicohemoglobina no sangue total coletado com EDTA é estável durante uma semana a 2-8°C.

Substâncias interferentes:

Soros lipêmicos podem causar resultados falsamente elevados. A hemoglobina fetal (HbF) tem ligação com a resina similar à hemoglobina glicosilada e, se presente em quantidade elevada, contribui nos valores. As hemoglobinas glicosiladas HbS e HbC ligam-se mais intensamente e produzem falsamente baixos valores. Outras hemoglobinopatias (por exemplo, betatalassemia) e anemia hemolítica também produzem baixos resultados.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

Todos os reagentes devem estar em temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento do teste.

A - Preparo do Hemolisado

1. Identifique um tubo para cada Padrão, Controle e um para cada amostra. Dispense 0,5 ml do Reagente Lisante em cada um deles.
2. Coloque 0,1 ml do sangue, bem homogeneizado, dentro dos tubos apropriadamente identificados. Homogeneize suavemente até a completa lise.
3. Deixe em repouso durante 5 minutos.

B - Separação da Hemoglobina Glicosilada

1. Identifique os tubos que contêm a resina para o Padrão, Controle, Amostra 1, etc..
2. Coloque 0,1 ml do hemolisado, preparado no Item A, dentro dos respectivos tubos com resina.
3. Introduza neles o Filtro Separador, deixando a borracha da extremidade do filtro aproximadamente 1 cm acima do nível do líquido.
4. Homogeneize todos os tubos continuamente, durante 5 minutos. Poderá ser feito em um homogeneizador de hemograma, num vortex, num shaker ou manualmente, por inversão. No caso do shaker, colocar os tubos deitados, fixando-os na plataforma.
5. Empurre o Filtro Separador para dentro do tubo até que a resina esteja firmemente compactada no fundo do tubo.
6. O sobrenadante agora contido no Filtro Separador poderá ser transferido para um acubeta ou ser aspirado de dentro do próprio Filtro Separador, dependendo do equipamento utilizado para leitura.
7. Para proceder às leituras, ajuste o equipamento

para absorvância zero, a 415 nm, utilizando água deionizada ou destilada como Branco. 8. Leia e anote as absorvâncias do Padrão, Controle, Amostra 1, etc.. Estas leituras são para hemoglobina glicosilada.

C. Hemoglobina Total

1. Identifique tubos para Padrão, Controle, Amostra 1, etc.. Dispense 5,0 ml de água deionizada ou destilada neles.
2. Coloque 0,02 ml do hemolisado, preparado no Item A, dentro dos respectivos tubos. Homogeneize.
3. Ajuste o equipamento em absorvância zero a 415 nm, usando água deionizada ou destilada como Branco.
4. Leia e anote os valores de absorvância para o Padrão, Controle, Amostra 1, etc.. Estas leituras são para Hemoglobina Total.

ESTABILIDADE DE AMBAS HEMOGLOBINAS APÓS PROCEDIMENTO

Os produtos finais de reação para hemoglobina glicosilada para a hemoglobina total apresentam-se completamente estáveis, porém, as leituras das reações devem ser efetuadas dentro de uma hora, evitando que a evaporação tome-se significativa.

CALIBRAÇÃO

Recomenda-se o uso do Padrão fornecido com o kit. O Padrão está na forma liofilizada, é estável e tem um valor estabelecido por um aceitável método de referência.

CONTROLE DE QUALIDADE

A confiança nos resultados dos testes deve ser monitorada rotineiramente usando um Controle apropriado, analisado do mesmo modo que o desconhecido. Sugere-se o uso de Controle para Hemoglobina Glicosilada - INLAB.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

Os resultados desconhecidos (amostras) devem ser determinados do seguinte modo: Para cada amostra, calcular a proporção (P) da absorvância da hemoglobina glicosilada pela absorvância da hemoglobina total. Usar a seguinte equação para determinar a concentração:

Amostra % =

$$\frac{\text{Proporção da Amostra} \times \text{Concentração do Padrão}}{\text{Proporção do Padrão}}$$

onde, Proporção da Amostra =

$$\frac{\text{Hemoglobina Glicosilada da Amostra}}{\text{Hemoglobina Total da Amostra}}$$

$$\text{Proporção do Padrão} = \frac{\text{Hemoglobina Glicosilada do Padrão}}{\text{Hemoglobina Total do Padrão}}$$

EXEMPLO

Um padrão contendo 8,0% de hemoglobina glicosilada e com as absorvâncias: 0,480 para a hemoglobina glicosilada e 0,575 para a hemoglobina total.

Uma amostra desconhecida e com as absorvâncias:

0,962 para a hemoglobina glicosilada e 0,746 para a hemoglobina total.

$$P (\text{Padrão}) = \frac{0,480}{0,575} = 0,835$$

$$P (\text{Amostra}) = \frac{0,962}{1,29} = 0,746$$

$$\% \text{ Amostra} = \frac{1,29}{12,4} \times 8,0\% = 0,835$$

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Amostras de pacientes com hemoglobinopatias ou com diminuição do tempo de sobrevivência das células vermelhas podem mostrar resultados incorretos (V. Item COLETA DA AMOSTRA). Amostras de sangue com hemoglobina total maior do que 18g/dl deverão ser diluídas a 1:2 com água destilada ou deionizada antes do teste.

VALORES ESPERADO

Normal = 6,0 - 8,3%

Este intervalo representa 95% do intervalo de confiança para 200 pacientes supostamente com valores de glicose normal e sem histórico de diabetes. Um estudo com 31 indivíduos diabéticos mostrou valores de hemoglobina glicosilada de 8,4% a 16%. Para a população diabética, uma comparação com glicose plasmática em jejum com níveis de hemoglobina glicosilada, forneceu um coeficiente de correlação igual a 0,84.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Linearidade

O procedimento para a determinação da

hemoglobina glicosilada mostra linearidade para os níveis de hemoglobina glicosilada no intervalo de 4,0% - 20,0%.

Precisão

PRECISÃO ENTRE-ENSAIOS

Foi estabelecida a partir de sangues analisados com níveis normais e elevados de hemoglobina glicosilada, vinte vezes cada.

Nível	Média %	Desvio Padrão	% C. V.
Normal	7,8	0,21	2,7
Elevado	13,4	0,23	1,7

PRECISÃO INTRA-ENSAIOS

Foi estabelecida a partir de sangues analisados com níveis de hemoglobina para dez corridas cada um, num período de cinco dias.

Nível	Média %	Desvio Padrão	% C. V.
Normal	7,6	0,31	4,1
Elevado	13,0	0,60	4,6

Especificidade

Um estudo comparativo da GLICOHEMOGLOBINA INLAB e outro método comercial amplamente utilizado mostrou uma correlação de 0,96.

Sensibilidade

O teste de GLICOHEMOGLOBINA INLAB tem uma sensibilidade de 0,02% de hemoglobina glicosilada por 0,001 unidade de absorção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Trivelli, L.A., Ranney, H.M. and Lai, H.T., New Eng. J. Med. 284, 353 (1971).
2. Goen, B., Rubenstein, A.H., Diabetologia 15, 1 (1978).
3. Gabby, K.H., Hasty, K., Breslow, J.L., Ellison, R.C., Bunn, H.F. and Gallop, P.M., J. Clin. Endocrinol. Metab. 44, 859 (1977).
4. Bates, H.M., Lab. Manag. Vol. 16 (Jan. 1978).
5. Nathan, D.M., et al., The Clinical Information Value of Glycosylated Hemoglobin Assay. The New England Journal of Medicine, 310, 341-346 (1984).

