



**Instituto Politécnico de Tomar**

**Escola Superior de Tecnologia de Tomar**

**Determinação de Catecolaminas e dos  
Metabolitos por HPLC com Deteção  
Eletroquímica.**

Relatório de Estágio

**Dora Margarida Ferreira Pimenta**

Mestrado em Tecnologia Química

**Tomar/Outubro/2013**





**Instituto Politécnico de Tomar**

**Escola Superior de Tecnologia de Tomar**

**Dora Margarida Ferreira Pimenta**

**Determinação de Catecolaminas e dos  
Metabolitos por HPLC com Detecção  
Eletroquímica.**

Relatório de Estágio

Orientado por:

Professora Paula Portugal, Instituto Politécnico de Tomar

Relatório de Estágio apresentado ao Instituto Politécnico de Tomar  
para cumprimento dos requisitos necessários  
à obtenção do grau de Mestre do Mestrado em Tecnologia Química







## RESUMO

---

O presente trabalho resulta do estágio realizado no Laboratório de Análises Clínicas Fernanda Galo, em Tomar, de 4 de Fevereiro a 31 de Julho de 2013. Este teve como principal objetivo a aplicação de metodologia analítica para a quantificação de catecolaminas e seus metabolitos na urina, utilizando métodos cromatográficos de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) com deteção eletroquímica.

Através da realização de alguns estudos, comprovou-se que os métodos implementados fornecem resultados com boa qualidade. Esses estudos envolveram a avaliação de *performance* cromatográfica para cada um dos compostos a quantificar, a validação dos métodos relativamente à sua seletividade e precisão e, ainda, avaliações de controlo externo - RIQAS.

Deste modo, conclui-se que todos os picos dos compostos analisados apresentam uma boa resolução ( $R_s > 1,5$ ) e um fator de retenção aceitável (entre 1 e 20). Todos os métodos utilizados são seletivos para a deteção dos compostos a quantificar, conclui-se ainda, que todos os métodos são precisos, pois apresentam coeficientes de variação (CV%) inferiores ao valor recomendado, podendo considerar-se confiáveis, uma vez que foram aprovados em vários controlos externos-RIQAS.

Após a implementação e estudo dos métodos, estes foram utilizados para realizar diversas análises no âmbito da prestação de serviços oferecida pelo Laboratório de Análises Clínicas Fernanda Galo.

**Palavras-chave:** HPLC, Catecolaminas, *Performance* Cromatográfica, Validação



## ABSTRACT

---

This paper is the result of a traineeship in the Fernanda Galo Clinical Analyses Laboratory held in Tomar, between february 4th and july 31th of 2013. The main objective of this work was the application of analitical methodology for the quantification of catecholamines and their metabolites in urine, using chromatographic methods of HPLC (High Performance Liquid Chromatography) with electrochemical detection.

Through the accomplishment of some studies, it was proved that the implemented methods supply results of good quality. These studies involved an evaluation of chromatographic performance for each of the composites to quantify, the validation of the methods regarding its selectivity and precision, and the evaluation of external control entities – RIQAS.

In this way, it can be concluded that all peaks of analyzed composites presents a good resolution ( $R_s > 1,5$ ) and an acceptable factor of retention (between 1 and 20). All methods are selective for the detection of the composites to quantify, concluding that they are accurate because they present coefficients of variation (CV%) inferior to recommended values, being considered trustworthy, after validation and approval by external controls-RIQAS.

After the implementation and study of these methods, they were used for diverse analysis in the scope of the services provided by the Fernanda Galo Clinical Analyses Laboratory.

**Keywords:** HPLC, catecholamines, chromatographic performance, validation



## AGRADECIMENTOS

---

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer á Dra. Conceição Faustino por me ter recebido no seu laboratório e por me ter dado a oportunidade de enriquecer a minha experiência profissional.

Ao Dr. Manuel Roque, agradeço a sua dedicação, conhecimento e o tempo dispensado para a realização deste trabalho.

À Professora Paula Portugal, orientadora deste trabalho, agradeço a total disponibilidade, confiança e apoio científico prestado ao longo destes 6 meses.

Agradeço ao meu marido e familiares pelo apoio, encorajamento e a compreensão incondicional que sempre me demonstraram.

E, por fim, gostaria de agradecer a todos aqueles que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.



# Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Caraterização da Empresa.....	1
1.2. Catecolaminas urinárias e seus metabolitos.....	1
1.2.1 Síntese das Catecolaminas.....	3
1.2.2 Metabolismo das Catecolaminas.....	6
2. Metodologia.....	9
2.1 Classificação de Técnicas Cromatográficas.....	9
2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	12
2.2.1 <i>Performance</i> Cromatográfica.....	15
2.2.2 Equipamento do HPLC.....	19
2.3 Validação do método.....	24
3. Materiais e Métodos.....	29
3.1 Equipamentos e Instrumentação.....	29
3.2 Método de extração em fase sólida (SPE).....	31
3.3 Procedimento experimental para a determinação do VMA, HVA e 5-HIAA.....	32
3.4 Procedimento experimental para a determinação das Catecolaminas.....	34
3.5 Procedimento experimental para a determinação das Metanefrinas.....	37
3.6 Controlo Externo - RIQAS.....	40
4. Apresentação e Discussão dos Resultados.....	41
4.1 Análise e determinação de VMA, HVA e 5-HIAA na urina.....	41
4.1.1 Validação de parâmetros analíticos.....	45
4.1.1.1 Estudo da Seletividade.....	45
4.1.1.2 Estudo da Precisão.....	46
4.2 Análise e determinação de Catecolaminas na urina.....	48
4.2.1 Validação de parâmetros analíticos.....	52
4.2.1.1 Estudo da Seletividade.....	52

4.2.1.2 Estudo da Precisão .....	52
4.3 Análise de determinação de metanefrinas na urina .....	54
4.3.1 Validação de parâmetros analíticos.....	57
4.3.1.1 Estudo da Seletividade .....	57
4.3.1.2 Estudo da Precisão .....	58
4.4 Análise do Controlo Externo - RIQAS.....	60
5. Conclusões.....	63
6. Bibliografia.....	65
Webgrafia .....	69
Anexo I – Valores de referência para os compostos analisados .....	71
Anexo 2 – Relatório do controlo externo – RIQAS .....	73

## Índice de Figuras

Figura 1 – Logótipo do Laboratório de Análises Clínicas Fernanda Galo, Lda .....	1
Figura 2 – Esquema elucidativo sobre a localização e morfologia das Glândulas Supra-renais <sup>[32]</sup> .....	2
Figura 3 – Mecanismo de biossíntese das Catecolaminas .....	4
Figura 4 – Sequência reacional relativa ao metabolismo das catecolaminas.....	7
Figura 5 – Fotografia do botânico Mikhail Semenovich Tswett .....	9
Figura 6 – Esquema do aspeto visual do trabalho realizado por Mikhail Semenovich Tswett .....	10
Figura 7 – Classificação das técnicas cromatográficas de acordo com diversos critérios... 10	
Figura 8 - Reação de Oxidação/redução da Noradrenalina que ocorre no detetor .....	15
Figura 9 - Esquema geral de um cromatograma, com indicação dos principais parâmetros .....	16
Figura 10 - Influência do número de pratos teóricos na resposta da coluna cromatográfica .....	19
Figura 11 - Esquema representativo de uma montagem típica para a realização de análises de HPLC. ....	21
Figura 12 – Esquema exemplificativo de um sistema de injeção das amostras em HPLC. a) Válvula na posição “LOAD”. b) Válvula na posição “INJECT” .....	22
Figura 13 - Aspeto exterior das colunas analíticas de HPLC .....	22
Figura 14 - (A) Equipamento de HPLC. (B) Imagem do interior do detetor eletroquímico: (1) Coluna analítica, (2) Célula eletroquímica.....	30
Figura 15 - Etapas do processo de extração em fase sólida.....	31
Figura 16 - Fluxograma da preparação da amostra para a determinação de VMA, HVA e 5-HIAA. ....	33
Figura 17 - Fluxograma da preparação da amostra para a determinação das catecolaminas .....	36

Figura 18 - Fluxograma da preparação da amostra para determinação das metanefrinas...	39
Figura 19 - Curvas de Calibração dos compostos VMA, HVA e 5-HIAA. ....	42
Figura 20 - Cromatograma obtido após a injeção de 20 µL de amostra de urina. Picos: 1 – VMA (ácido vanilmandélico), 2 – Padrão Interno, 3 – HVA, 4 – 5-HIAA .....	43
Figura 21 - Sobreposição do cromatograma do ensaio em branco com o cromatograma do padrão de controlo de qualidade na análise de VMA, HVA e 5-HIAA. ....	46
Figura 22 – Cromatogramas relativos à avaliação da repetibilidade instrumental para o método de análise de VMA, HVA e 5-HIAA. ....	47
Figura 23 - Curvas de calibração dos compostos noradrenalina, adrenalina e dopamina ...	49
Figura 24 - Cromatograma obtido após a injeção de 20 µL de amostra de urina. Picos: 1 – Noradrenalina, 2 – Adrenalina, 3 – Padrão Interno, 4 – Dopamina. ....	50
Figura 25 - Sobreposição do cromatograma do ensaio em branco com o cromatograma do padrão de controlo de qualidade na análise de catecolaminas.....	52
Figura 26 - Avaliação da repetibilidade instrumental para a determinação das catecolaminas.....	53
Figura 27 - Curvas de calibração dos compostos normetanefrina, metanefrina e 3-metoxitiramina.....	55
Figura 28 - Cromatograma obtido após a injeção de 20 µL de amostra de urina. Picos: 1 – Normetanefrina, 2 – Metanefrina, 3 – Padrão Interno, 4 – 3-Metoxitiramina. ....	55
Figura 29 - Sobreposição do cromatograma do ensaio em branco com o cromatograma do padrão de controlo de qualidade na análise de metanefrinas.....	58
Figura 30 - Avaliação da repetibilidade instrumental da Solução Padrão de Controlo de Qualidade para a determinação das metanefrinas.....	58

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais Vantagens e Desvantagens de HPLC .....	13
Tabela 2 - Condições do HLPC para a análise do VMA, HVA e 5-HIAA. ....	34
Tabela 3 - Condições do HLPC para a análise das Catecolaminas. ....	37
Tabela 4 - Condições do HLPC para a análise das Metanefrinas.....	40
Tabela 5 - Composições e resultados da análise da solução padrão para a determinação das curvas de calibração de VMA, HVA e 5-HIAA.....	42
Tabela 6 – Dados e resultados da determinação das concentrações dos compostos VMA, HVA e 5-HIAA na amostra do cromatograma da Figura 20. ....	43
Tabela 7 - Capacidade de resolução da coluna cromatográfica para o método utilizado na determinação da concentração de VMA, HVA e 5-HIAA. ....	44
Tabela 8 – Valores dos parâmetros calculados no estudo de performance cromatográfica para determinar VMA, HVA e 5-HIAA. ....	44
Tabela 9 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) das áreas dos picos de VMA, HVA e 5-HIAA detetados nos cromatogramas do estudo da repetibilidade instrumental. ....	47
Tabela 10 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) das áreas dos picos de VMA, HVA e 5-HIAA detetados nos cromatogramas do estudo da precisão intermédia. .	48
Tabela 11 - Composições e resultados da análise da solução padrão para a determinação das curvas de calibração das catecolaminas (noradrenalina, adrenalina e dopamina).....	49
Tabela 12 - Concentração das catecolaminas na amostra cujo cromatograma é apresentado na Figura 22. ....	50
Tabela 13 - Capacidade de resolução da coluna na separação de catecolaminas. ....	51
Tabela 14 - Valores de parâmetros quantitativos da performance cromatográfica na determinação de catecolaminas.....	51
Tabela 15 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) das áreas dos picos das catecolaminas detetados nos cromatogramas do estudo da repetibilidade instrumental. ....	53

Tabela 16 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) das áreas dos picos das catecolaminas detetados nos cromatogramas do estudo da precisão intermédia.....	54
Tabela 17 - Composições e resultados da análise da solução padrão para a determinação das curvas de calibração das metanefrinas (normetanefrina, metanefrina e 3-metoxitiramina). .....	54
Tabela 18 - Concentração das metanefrinas na amostra cujo cromatograma é apresentado na Figura 26. ....	56
Tabela 19 - Capacidade de resolução da coluna para a separação das metanefrinas. ....	56
Tabela 20 - Valores de parâmetros quantitativos da performance cromatográfica na determinação de metanefrinas. ....	57
Tabela 21 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) das áreas dos picos das metanefrinas detetados nos cromatogramas do estudo da repetibilidade instrumental. ....	59
Tabela 22 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) das áreas dos picos das metanefrinas detetados nos cromatogramas do estudo da precisão intermédia.....	59
Tabela 23 – Resultados do controlo externo relativos ao composto VMA .....	60
Tabela 24 – Resultados do controlo externo relativos ao composto noradrenalina. ....	61
Tabela 25 – Resultados do controlo externo relativos ao composto adrenalina.....	61
Tabela 26 – Resultados do controlo externo relativos ao composto dopamina.....	62
Tabela 27 – Resultados do controlo externo relativos ao composto metanefrina .....	62

## **Lista de Abreviaturas**

- ADR** – Adrenalina
- CCD** – Cromatografia em camada delgada
- CGAR** – Cromatografia gasosa de alta resolução
- CLAE** – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CLC** – Cromatografia líquida clássica
- COMT** – Catecol – O – metiltransferase
- CP** – Cromatografia em papel
- CSC** – Cromatografia supercrítica
- DA** – Dopamina
- DBH** – dopamina- $\beta$ -hidroxilase
- DBH** – Dopamina- $\beta$ -hidroxilase
- ED** – Detecção eletroquímica
- GC** – Cromatografia gasosa
- HVA** – Ácido homovanílico
- HPLC** – *High Performance Liquid Chromatography*
- 5-HIAA** – 5-Hidroxiindolacético
- IPAC** – Instituto Português de Acreditação
- LC** – Cromatografia líquida
- L-DOPA** – 1-3,4- dihidroxifenilalanina
- MAO** – Monoamino oxidase
- NA** – Noradrenalina
- PI** – Padrão Interno
- PNMT** – Feniletanalamina N-metiltransferase
- SNC** – Sistema nervoso central
- SPE** – Extração em fase sólida
- TH** – Tirosina hidroxilase
- VMA** – Ácido vanilmandélico

## **Nomenclatura**

**CV** - Coeficiente de variação (%)

**K** – Fator de retenção

**H** – Altura de um prato teórico

**L** – Comprimento da Coluna (mm)

**N** – Número de pratos teóricos

**R<sub>s</sub>** – Resolução

**S** – Desvio padrão

**t<sub>0</sub>** – Tempo morto (min)

**W** – Largura do pico (cm)

**W<sub>1/2</sub>** – Largura a meia altura do pico (cm)

**α** – Fator de separação

# 1. Introdução

## 1.1 Caracterização da Empresa

O Laboratório de Análises Clínicas Fernanda Galo, Lda, foi fundado em 1958 pela Dr.<sup>a</sup> Fernanda Galo, que lhe deu o nome que permanece até hoje (logótipo na Figura 1). Em 1993 a direção técnica e a gerência do laboratório é assumida pela Dra. Conceição Faustino, que empreendeu um conjunto de investimentos no desenvolvimento técnico-científico na área das análises clínicas e químicas, permitindo um crescimento e alargamento da sua área de atuação. Para além das análises clínicas mais comuns, o laboratório realiza serviços analíticos muito especializados, apenas possíveis pelo forte investimento em equipamentos de ponta. É acreditado pela Norma NP/EC IEC 17025 e foi o primeiro laboratório em Portugal acreditado pela Norma NP/EC IEC 15189. As suas instalações, desde 26 de novembro de 2008, são no edifício TomarLab, na cidade de Tomar <sup>[29, 30]</sup>.



Figura 1 – Logótipo do Laboratório de Análises Clínicas Fernanda Galo, Lda <sup>[29]</sup>

## 1.2. Catecolaminas urinárias e seus metabolitos

As catecolaminas libertadas pelo sistema nervoso simpático e pela medula supra-renal estão envolvidas na regulação de um grande número de funções fisiológicas, que podem ser um indicador na descoberta de algumas doenças, como por exemplo, doenças neurológicas, endócrinas, psiquiátricas e doenças cardiovasculares. <sup>[1]</sup>

Catecolaminas é o nome dado a um grupo de aminas – adrenalina (ADR), noradrenalina (NA) e dopamina (DA), que são produzidas na medula supra-renal, localizada nas glândulas supra-renais. As glândulas supra-renais são dois pequenos

órgãos localizados no polo superior de cada rim (Figura 2). No homem, as glândulas pesam, cada uma, entre 6 e 10g, são achatadas e medem aproximadamente 5cm de altura, 3cm de largura e 3cm de espessura [2, 3]. A glândula supra-renal direita tem uma forma piramidal e a esquerda, a forma oval. As glândulas supra-renais são órgãos encapsulados, compostos por duas partes funcionais completamente distintas, a medula e o córtex (responsável pela produção das hormonas corticosteroides), [2, 3].

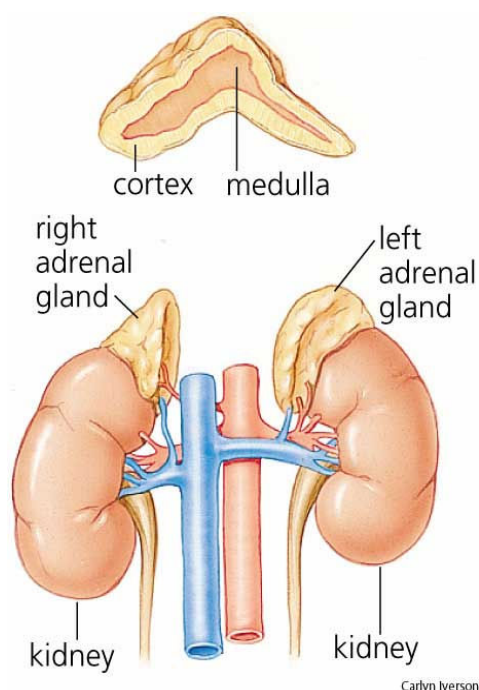


Figura 2 – Esquema elucidativo sobre a localização e morfologia das Glândulas Supra-renais [32]

A NA é o principal neurotransmissor no sistema nervoso simpático periférico, enquanto que a ADR é a principal hormona secretada pela medula supra-renal nos mamíferos e está associada a estados de excitação, alerta, nervosismo, medo ou mesmo pânico. As respostas fisiológicas e metabólicas que se seguem a uma estimulação dos nervos simpáticos em mamíferos são geralmente mediadas pelo neurotransmissor NA, apesar de co-transmissores, como péptidos, poderem potencialmente contribuir para os efeitos simpáticos. Como parte da resposta ao stress, a medula supra-renal é também estimulada, resultando no aumento da concentração de ADR na circulação sanguínea. As ações destas duas catecolaminas são muito semelhantes em alguns locais, mas diferem significativamente noutros. Por exemplo, ambos os compostos estimulam o

miocárdio; contudo, a ADR dilata os vasos sanguíneos no músculo-esquelético, enquanto a NA causa a constrição dos vasos sanguíneos na pele, mucosas e rins <sup>[4,5]</sup>.

A DA é o precursor da NA e, apesar de ser encontrada predominantemente nos gânglios basais do sistema nervoso central (SNC), onde funciona como neurotransmissor em diversas vias importantes, as terminações nervosas dopaminérgicas e os recetores específicos para esta catecolamina foram também encontrados noutros locais do SNC e na periferia (particularmente no rim). Esta catecolamina endógena, inicialmente considerada apenas precursora da NA, veio a revelar-se fundamental como neurotransmissor do SNC <sup>[4, 5]</sup>.

Uma produção anormal de catecolaminas pode ser um indicador de doenças graves como por exemplo o feocromocitoma. O feocromocitoma é uma neoplasia rara, produtora de catecolaminas, cuja origem mais frequente é na medula supra-renal. Tem um amplo espetro de apresentações clínicas, mas a tríade sintomática de cefaleias, palpitações e hipersudorese, acompanhada de hipertensão arterial é muito característica <sup>[6]</sup>.

As crises hipertensivas e os eventos cardiovasculares potencialmente fatais causados por esta neoplasia sucedem do efeito potente da estimulação adrenérgica e justificam a importância de um diagnóstico célere e de uma abordagem terapêutica eficaz no controlo sintomático e na prevenção de complicações. O diagnóstico de feocromocitoma é obtido por testes bioquímicos sanguíneos ou urinários em que se evidencie excesso de catecolaminas ou dos seus metabólitos <sup>[6]</sup>.

### 1.2.1 Síntese das Catecolaminas

O precursor na síntese de todas as catecolaminas é o aminoácido tirosina, (Figura 3). A maior parte da tirosina é obtida da dieta, e uma pequena proporção também pode ser sintetizada no fígado a partir da fenilalanina e encontra-se em todos os neurónios catecolaminérgicos <sup>[4, 6, 7]</sup>. A sua hidroxilação é, normalmente, considerada a etapa limitante na biossíntese das catecolaminas, sendo a enzima responsável – tirosina hidroxilase (TH) – ativada por estimulação dos nervos adrenérgicos ou da medula supra-renal e inibida, por feedback, pelos compostos catecóis <sup>[4, 6, 7]</sup>.

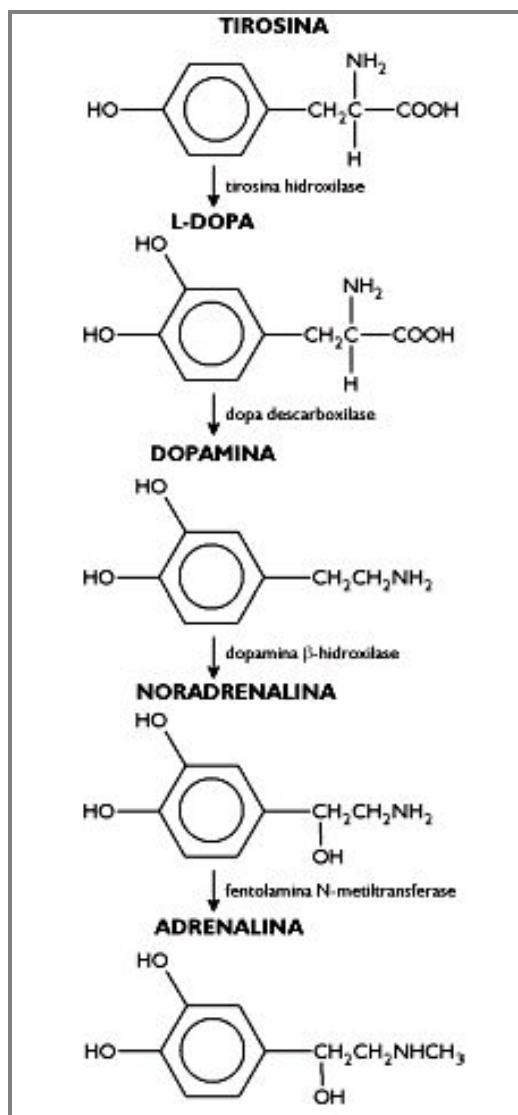


Figura 3 – Mecanismo de biossíntese das Catecolaminas <sup>[8]</sup>

A primeira etapa na biossíntese das catecolaminas, consiste na conversão da tirosina em L-DOPA (1 -3,4- diidroxifenilalanina) por oxidação da posição 3 no anel de benzeno. Esta reação ocorre no citoplasma dos terminais nervosos simpáticos pós-ganglionares. A reação é catalisada pela enzima tirosina hidroxilase (TH). A oxidação da tirosina em L-DOPA é a etapa que limita a velocidade na produção, não apenas da DA, mas também de todos os neurotransmissores da família das catecolaminas. É, também, utilizada com sucesso no tratamento da sintomatologia da doença de Parkinson <sup>[4, 6, 7]</sup>.

A segunda etapa da biossíntese das catecolaminas é mediada pela DOPA descarboxilase, esta enzima é responsável pela remoção do grupo carboxilo da L-DOPA, formando deste modo a DA. Este passo ocorre, tal como o anterior, no citoplasma dos terminais nervosos simpáticos pós-ganglionares. Ao nível dos neurónios contendo DA, esta enzima constitui a etapa final da via biossintética [6, 7, 8, 9].

No caso dos neurónios que sintetizam NA ou ADR, a enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilase (DBH) é a responsável pela fase seguinte do processo de biossíntese das catecolaminas. Aproximadamente metade da DA produzida no citoplasma é transportada ativamente para o interior das vesículas de armazenamento contendo DBH; a restante DA não captada para as vesículas é desaminada a ácido 3,4- dihidroxifenilacético, que é depois metilada a ácido homovanílico (HVA), como será mais à frente abordado no metabolismo das catecolaminas [4]. Deste modo, a DA é ativamente acumulada nas vesículas de armazenamento localizadas nos terminais nervosos simpáticos e, durante este processo de transporte, é  $\beta$ - hidroxilada pela DBH que está associada à vesícula de armazenamento adrenérgica [6, 7, 8, 9].

A DBH é, então, libertada dos nervos e da glândula supra-renal juntamente com as catecolaminas, sendo assim encontrada no plasma. Esta enzima representa a enzima terminal na biossíntese de catecolaminas nos neurónios simpáticos pós-ganglionares. Desta forma, os nervos adrenérgicos libertam apenas NA como neurotransmissor [6, 7, 8, 9].

A biossíntese da ADR é catalisada pela enzima feniletanolamina N-metiltransferase (*phenylethanolamine N-methyltransferase*; PNMT) que está presente ao nível das células medulares supra-renais, para as quais a ADR é a neuro-hormona primária, e ao nível de um pequeno grupo de neurónios no tronco cerebral que utilizam a ADR como neurotransmissor. A PNMT promove a transferência de um grupo metilo da S-adenosilmetionina para o azoto da NA dando, conseqüentemente, origem à formação de uma amina secundária, a ADR. Por conseguinte, esta enzima causa a metilação da NA, que abandona as vesículas (provavelmente por difusão), com conseqüente formação de ADR no citoplasma. A ADR formada é captada novamente para o interior vesículas para ser armazenada e mantida até à sua libertação [6, 7, 8, 9].

## 1.2.2 Metabolismo das Catecolaminas

A metabolização das catecolaminas ocorre pela ação conjunta de duas enzimas, a monoamino oxidase (MAO) e a catecol – O – metiltransferase (COMT), as quais se constituem como as enzimas responsáveis pela inativação das catecolaminas. Estas duas enzimas diferenciam-se no que respeita à sua localização celular, com a MAO associada principalmente à superfície externa do mitocôndrias (incluindo as presentes nos terminais nervosos) e a COMT, localizada predominantemente no citoplasma <sup>[1, 7, 8]</sup>.

A Figura 4 apresenta como ocorre o processo de metabolismo das catecolaminas até chegar aos metabolitos principais o ácido homovanílico (HVA) e o ácido vanilmandélico (VMA).

A dopamina é metabolizada a ácido homovanílico (HVA) através de uma série de reações, esta é oxidada ao ácido diidroxifenilacético pela ação da enzima MAO. A seguir, a COMT oxida o ácido diidroxifenilacético a HVA. Por outro lado, a dopamina é metilada a 3-metoxitiramina pela COMT e, em seguida, oxidada a HVA pela MAO e eliminada na urina <sup>[1, 7]</sup>.

No que diz respeito à Noradrenalina e à Adrenalina, estas sofrem metilação e são convertidas em normetanefrina ou metanefrina, pela ação da COMT, e a seguir oxidadas, dando origem ao VMA, ou podem ser, num primeiro passo, oxidadas pela MAO e dar origem a um composto intermediário o ácido 3,4-diidroximandélico, que a seguir, por ação da COMT, é convertido em VMA que é depois eliminada na urina <sup>[1, 7]</sup>.

Assim, HVA é o metabólito da dopamina e o VMA é um metabólito da adrenalina e noradrenalina.

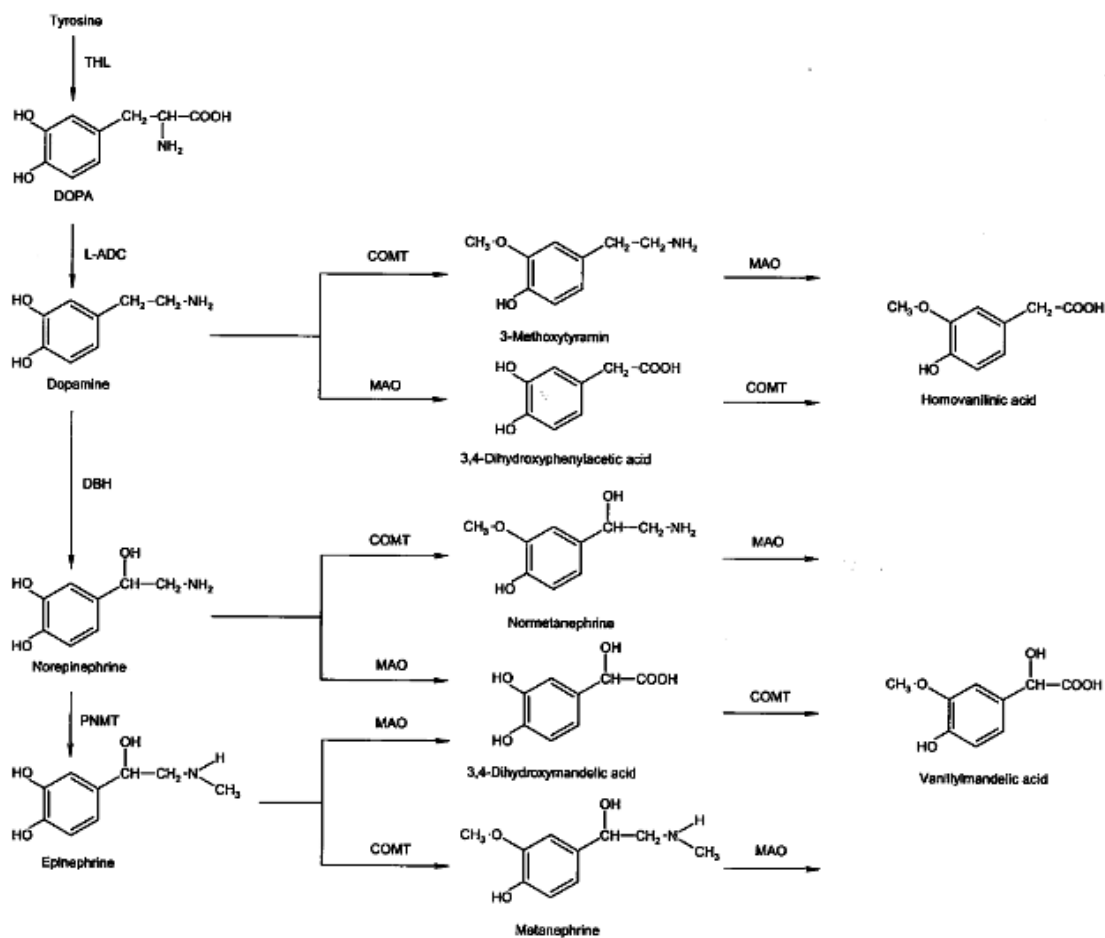


Figura 4 – Sequência reacional relativa ao metabolismo das catecolaminas <sup>[35]</sup>



## 2. Metodologia

### 2.1 Classificação de Técnicas Cromatográficas.

A cromatografia, em todas as suas variantes, é um método de separação de componentes de uma mistura, em que a separação depende da distribuição das diferentes moléculas entre duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel <sup>[10, 11]</sup>.

Este método de separação ganhou importância por volta de 1903, com o botânico Mikhail Semenovich Tswett (Figura 2.1), nascido em Asti (Itália), sendo a sua família de origem russa <sup>[10, 31]</sup>.



Figura 5 – Fotografia do botânico Mikhail Semenovich Tswett <sup>[31]</sup>

Este investigador desenvolveu vários trabalhos experimentais no domínio da separação de extratos de plantas por adsorção diferencial em colunas, usando carbonato de cálcio como fase estacionária e di-sulfureto de carbono como fase móvel (eluente). Nestas experiências, verificou-se a formação de bandas de cores diferentes nas colunas utilizadas, devido à adsorção diferencial dos pigmentos corados, que percolavam com velocidades diferentes e emergiam separadamente da coluna. Este investigador foi mais tarde considerado o pai da cromatografia devido à sua valiosa contribuição no desenvolvimento desta técnica <sup>[10, 31]</sup>.

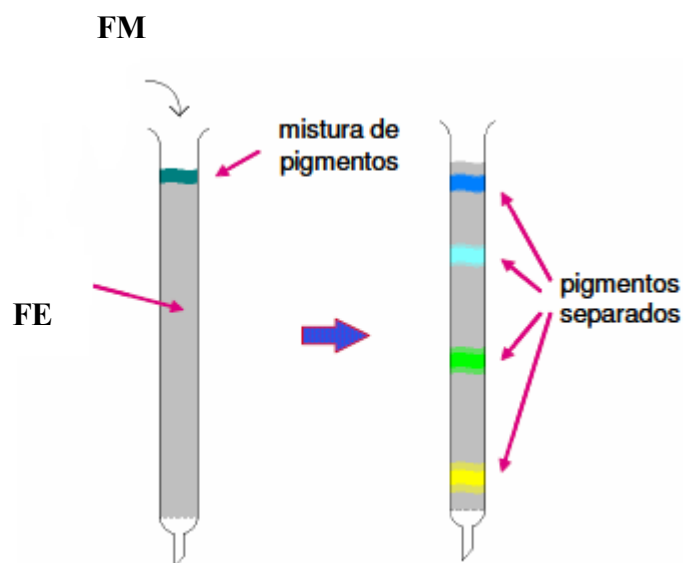


Figura 6 – Esquema do aspeto visual do trabalho realizado por Mikhail Semenovich Tswett <sup>[32]</sup>

A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis, e para a separação dos componentes de uma mistura. As diferentes formas de cromatografia podem ser classificadas considerando-se diversos critérios, nomeadamente quanto ao mecanismo de separação, à técnica empregue, ao tipo de fases a utilizar e ao tipo de superfície na qual ocorre a separação, como se pode verificar na Figura 7 <sup>[10, 31]</sup>.

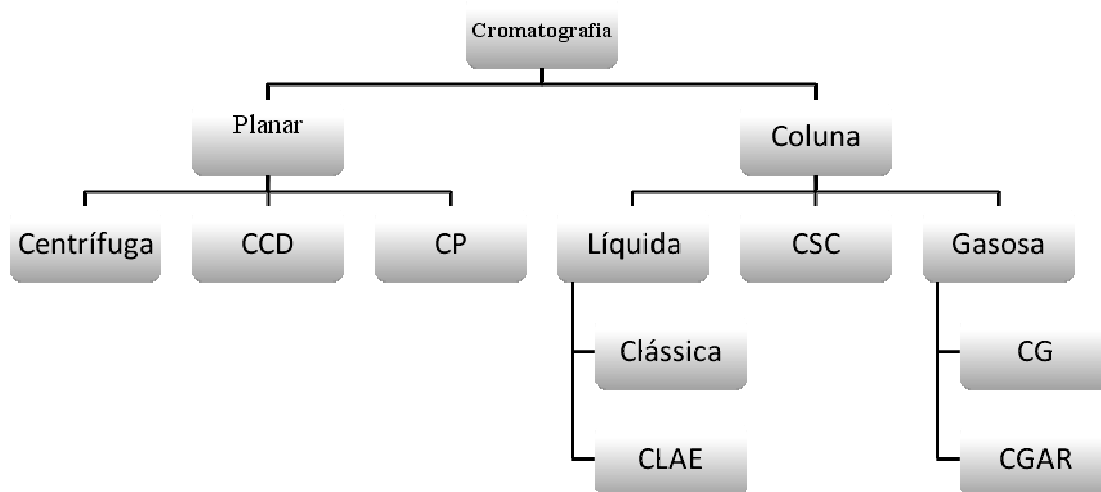


Figura 7 – Classificação das técnicas cromatográficas de acordo com diversos critérios. <sup>[10]</sup>

### 1. Classificação pela forma física do sistema cromatográfico

Em relação à forma física do sistema, a cromatografia pode ser subdividida em *cromatografia em coluna* e *cromatografia planar*. Enquanto a cromatografia planar resume-se à cromatografia em papel (CP), à cromatografia por centrifugação e à cromatografia em camada Fina (CCF), são diversos os tipos de cromatografia em coluna, os quais serão mais bem compreendidos quando classificados por outros critérios <sup>[10, 31]</sup>.

### 2. Classificação pela fase móvel empregada

Em relação à fase móvel, são três os tipos de cromatografia: a cromatografia gasosa (CG), a cromatografia líquida (CL) e a cromatografia supercrítica (CSC), usando-se na última um fluido muito pressurizado, acima de sua temperatura crítica. A cromatografia líquida apresenta uma importante subdivisão: a cromatografia líquida clássica (CLC), na qual a fase móvel é arrastada através da coluna apenas pela força da gravidade, e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na qual se utilizam fases estacionárias de partículas menores, sendo necessário o uso de uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel. A CLAE foi inicialmente denominada cromatografia líquida de alta pressão, mas a sua actual designação mostra-se mais adequada. É conhecida internacionalmente pela sigla HPLC (High Pressure Liquid Chromatography ou High Performance Liquid Chromatography). No caso de fases móveis gasosas, as separações são obtidas pela designada cromatografia gasosa (CG) e pela cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR). A diferença entre estes dois tipos de cromatografia está relacionada com a coluna utilizada. Enquanto em CGAR são utilizadas colunas capilares, nas quais a fase estacionária é um filme depositado na superfície interna da coluna, em CG utilizam-se colunas de maior diâmetro, contendo um empacotamento que funciona como fase estacionária <sup>[10, 31]</sup>.

### 3. Classificação pela fase estacionária utilizada

Quanto à fase estacionária, distingue-se entre fases estacionárias sólidas, líquidas e quimicamente ligadas. No caso da fase estacionária ser constituída por um líquido, este pode estar simplesmente adsorvido sobre um suporte sólido ou imobilizado sobre ele.

Suportes modificados são considerados separadamente, como fases quimicamente ligadas, por normalmente diferirem dos outros dois nos seus mecanismos de separação <sup>[10, 31]</sup>.

#### 4. Classificação pelo modo de separação

Em relação ao modo de separação, este pode ser por adsorção, partição, permuta iónica, exclusão de tamanhos, afinidade ou por uma combinação de alguns destes mecanismos <sup>[10, 31]</sup>.

## **2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

A cromatografia líquida de alta eficiência iniciou-se na década dos anos 60. É uma extensão da cromatografia líquida clássica e caracteriza-se pelo uso de colunas em aço inox muito mais estreitas, com diâmetro interno de 2-5 mm, com empacotamento de partículas de tamanhos muito reduzidos, 3-10 µm, que constituem a fase estacionária. A fase móvel circula sob alta pressão, ao longo da coluna, com um fluxo controlado. A alta pressão permite análises mais rápidas e o uso de fases estacionárias constituídas por micro partículas permite uma elevada eficiência na separação <sup>[10, 12, 13]</sup>.

A técnica de HPLC revelou-se um dos mais eficientes métodos cromatográficos, em virtude do desenvolvimento de instrumentação automatizada. Permitiu a injeção de volumes de amostra cada vez mais pequenos e reprodutíveis e a deteção de quantidades de analitos cada vez menores em sistemas de deteção em fluxo, que indicam quando os componentes sofrem eluição da coluna <sup>[12, 13]</sup>.

Esta técnica veio complementar a cromatografia gasosa (CG) no tipo de compostos que podem ser separados, uma vez que a CG só separa compostos voláteis. Apresentou, também, a vantagem de tempos de retenção mais curtos e maior número de análises por unidade de tempo. A introdução de colunas capilares, como em CG, oferece um maior número de pratos teóricos e uma melhor resolução do que as colunas padrão.

Outra vantagem que esta técnica apresenta é a de utilizar uma menor quantidade de fase móvel, permitindo a utilização de solventes tóxicos, raros, ou caros, bem como o uso de fases estacionárias dispendiosas <sup>[12, 13]</sup>.

A HPLC apresenta, assim, várias vantagens, pois permite automatizar o sistema, reduzir o tempo de análise, efetuar análises qualitativas e quantitativas, bem como ter reprodutibilidade de dados. As desvantagens são o facto do equipamento, e a sua manutenção, serem dispendiosos, de ser um sistema complexo, de apresentar baixa sensibilidade perante alguns compostos e de ser dependente da experiência do operador. As principais vantagens e desvantagens estão resumidas na Tabela 1

Tabela 1 - Principais Vantagens e Desvantagens de HPLC <sup>[17]</sup>.

<b>Vantagens:</b>	<b>Desvantagens:</b>
- Menor tempo de análise	- Alto custo da instrumentação
- Alta Resolução	- Alto custo de operação
- Resultados quantitativos	- Falta de detetor universal sensível
- Boa sensibilidade	- Necessidade de experiência no seu manuseamento
- Versatilidade	
- Automação	

Em cromatografia líquida, a fase móvel é um líquido que escoar ao longo da fase estacionária numa direção definida. Os compostos que são fracamente retidos pela fase estacionária escoam mais rapidamente ao longo do enchimento, enquanto os que estabelecem interações mais fortes com a fase estacionária saem mais lentamente, até à separação completa dos componentes numa mistura <sup>[12, 13]</sup>.

O processo de escoamento dos compostos, que são arrastados pela fase móvel ao longo da coluna até à saída, designa-se por eluição.

A cromatografia líquida de alta eficiência pode ser dividida em dois grupos principais: cromatografia líquida em fase normal e cromatografia líquida em fase reversa.

Quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, a cromatografia líquida é denominada de cromatografia de fase normal. Na situação inversa, ou seja, quando a fase estacionária apresenta menor polaridade que o solvente, a cromatografia recebe a denominação de cromatografia de fase reversa. Os adsorventes mais utilizados na cromatografia de fase normal são a sílica e a alumina, enquanto que para a fase reversa são empregues substâncias polares quimicamente ligadas, tendo como grupos funcionais cadeias com terminações do tipo ciano, diol, fenil, amino ou apolares <sup>[31]</sup>.

A maioria das separações são levadas a cabo por HPLC de fase reversa, devido ao seu maior campo de aplicação, do que por fase normal, pois existem muito poucos compostos que sejam retidos permanentemente na coluna. As colunas também tendem a ser mais robustas. Pode dizer-se que, nas cromatografias em fase reversa, os compostos apolares, ou fracamente polares, são mais fortemente retidos na fase estacionária do que na fase móvel. A retenção de um composto na fase estacionária é tanto maior quanto menor é a sua solubilidade na fase móvel <sup>[12]</sup>.

A eletroquímica oferece um grande grupo de métodos que podem ser usados para a deteção contínua de substâncias. Para a técnica de HPLC, os detetores eletroquímicos mais utilizados são o amperométrico e o coulométrico <sup>[12]</sup>.

O fato de poder combinar o alto poder de resolução da cromatografia líquida de alta eficiência com a alta sensibilidade da deteção eletroquímica através de células de fluxo faz com que seja uma das mais poderosas técnicas bioanalíticas disponíveis <sup>[12]</sup>. A deteção eletroquímica baseia-se na propriedade de um composto para sofrer uma oxidação ou redução num elétrodo a um potencial aplicado. A velocidade da reação eletroquímica é observada como uma corrente, e, por isso, essas técnicas são conhecidas por amperometria, que, literalmente, significa medida de corrente em amperes (A) <sup>[12]</sup>.

Neste tipo de detecção, é possível ter uma configuração onde o eluente flui, num primeiro momento, sobre um eletrodo e, depois, sobre um segundo eletrodo, requerendo, assim, que o analito sofra uma oxidação (ou redução) reversível no primeiro eletrodo. Nesse caso, o segundo eletrodo opera como um cátodo (ou um ânodo) para determinar o produto de oxidação (ou redução). É por este motivo que a seletividade deste sistema é muito elevada <sup>[12]</sup>. Na Figura 8 temos o exemplo da oxidação/redução da Noradrenalina que ocorre no detetor.

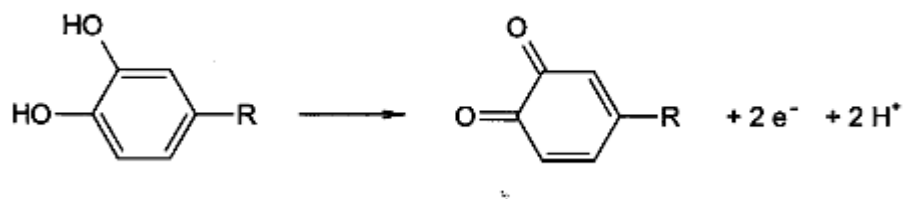


Figura 8 - Reação de Oxidação/redução da Noradrenalina que ocorre no detetor <sup>[16]</sup>

### 2.2.1 Performance Cromatográfica

Para os métodos cromatográficos, os critérios considerados para a definição da *performance* esperada têm como base o referencial normativo ISO 13530 e o guia CITAC/EURACHEM. A *performance* é avaliada a partir dos parâmetros cromatográficos <sup>[13, 14]</sup>.

A *performance* de separação é avaliada a partir da determinação dos seguintes valores: **fator de retenção (k)**, **fator de separação ( $\alpha$ )**, **resolução (Rs)**, **número de pratos (N)**. Estes parâmetros são otimizados a partir de estudos ao nível de:

- 1) fase estacionária, utilizando diferentes colunas;
- 2) fase móvel, experimentando diferentes eluentes, desde que compatíveis com a fase estacionária <sup>[13, 14]</sup>.

Na Figura 9 são indicados os parâmetros utilizados para o cálculo de alguns dos valores de *performance* cromatográfica, acima mencionados <sup>[10, 12]</sup>.

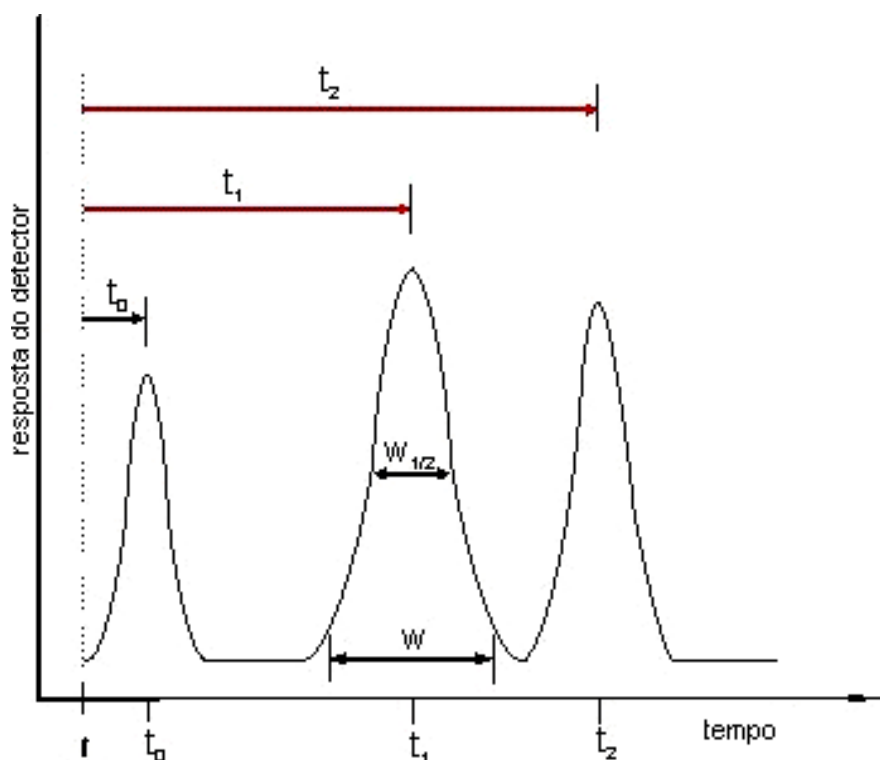


Figura 9 - Esquema geral de um cromatograma, com indicação dos principais parâmetros <sup>[12]</sup>

Onde:

- $t_0$  - Também conhecido como o tempo morto ( $t_M$ ) da coluna. É o tempo gasto pelas moléculas não retidas a percorrer a coluna.
- $t_R$  - Tempo de retenção. É o tempo que demora um soluto a ser totalmente eluído da coluna.
- $W$  - Largura do pico. É a resultante da intersecção das duas tangentes aos pontos de inflexão do pico.
- $W_{1/2}$  - Largura do pico a meia altura

O tempo de retenção corresponde à medida de tempo, normalmente em minutos, que o analito leva a percorrer o sistema cromatográfico. O tempo de permanência efetivo do analito no sistema cromatográfico, nomeadamente na fase estacionária, é determinado a partir da seguinte relação expressa na equação 1.

$$t'_R = t_R - t_M \quad (\text{eq.1})$$

A seguir, descrevem-se os valores de *performance* a avaliar e apresentam-se as respetivas fórmulas de cálculo [12, 15, 16].

### **Fator de retenção (k)**

Também designado por fator de capacidade, é uma medida cromatográfica obtida a partir da razão dos tempos (Fator de retenção) ou dos volumes (Fator de capacidade) do analito que permanece na fase estacionária ( $t'_R$ ) e na fase móvel ( $t_M$ ).

O fator de retenção,  $k$ , representado na equação 2, pode ser determinado por uma das duas metodologias:

- 1) A partir da razão do volume de analito retido na fase estacionária  $V_R$  e o volume morto da coluna  $V_0$  (eq. 2);
- 2) A partir da razão dos tempos.  $t'_R$ , é o tempo gasto desde o momento da injeção até a deteção máxima do pico e  $t_M$ , é o tempo gasto pelas moléculas não retidas a percorrer todo o sistema cromatográfico, sendo esta a forma de cálculo mais usual.

$$K = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (\text{eq.2})$$

Valores de  $k$  compreendidos entre 2 e 10 são considerados ideais, mas aceita-se que esse intervalo possa ser alargado à gama de valores de 1 a 20 [12, 15, 16].

### **Fator de Separação ( $\alpha$ )**

Também designado por fator de retenção relativo, ou fator de seletividade. Corresponde à separação em termos relativos de dois componentes (1 e 2) que eluem da coluna de forma sequencial. É calculado pela razão entre os fatores de retenção dos dois picos adjacentes (eq.3). Depende da fase estacionária, da temperatura e da fase móvel selecionadas, sendo independente do fluxo [12, 15, 16].

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{K_2}{K_1} \quad (\text{eq.3})$$

### **Resolução ( $R_s$ )**

É a medida que determina se dois picos adjacentes estão completamente separados. É calculada a partir da distância que separa os pontos máximos dos picos, estimada a partir das larguras da base, ou a partir da largura da base a meia altura.

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 - w_1} \quad (\text{eq.4})$$

Quando assume o valor unitário, significa que os dois picos estão razoavelmente separados, com apenas 2 % de superposição das áreas, no caso de as quantidades dos dois componentes serem iguais. Valores de resolução superiores a 1 indicam uma melhor separação, sendo considerado ótimo qualquer valor de  $R_s$  superior a 1,5, indicando, neste caso, que a separação é completa. Na prática, considera-se um pico com boa resolução a partir de  $R_s$  igual a 1,25 [12, 15, 16].

### **Número de pratos (N)**

Corresponde a uma medida adimensional da eficiência da coluna cromatográfica. Permite definir, em termos numéricos, a interação da fase estacionária com cada um dos componentes que constituem a alíquota de amostra a analisar. N é determinado para cada analito separado pelo meio cromatográfico (eq.5), a partir do seu tempo de retenção e da largura do pico da linha de base ( $W$ ) ou da largura do pico a meia altura do pico ( $W_{1/2}$ ) [31, 15, 16].

$$N = 16 \times \left( \frac{t'_R}{W} \right)^2 \quad (\text{eq.5})$$

Também se pode relacionar o número de pratos teóricos com a altura de um prato teórico (H) e o comprimento da coluna (L), segundo a equação 6.

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{eq.6})$$

O número de pratos teóricos corresponde ao número de seções transversais imaginárias da coluna onde ocorrem equilíbrios separados por analito, ou seja, baseia-se no fato da separação ocorrer sob a forma de equilíbrios consecutivos e independentes entre o analito e a fase estacionária ao longo da coluna, como se esta estivesse fisicamente dividida por seções<sup>[31]</sup>. Os fatores que podem afetar o valor de N e, conseqüentemente, H são o tamanho das partículas da fase estacionária na coluna, o fluxo da fase móvel, a temperatura a que a coluna se encontra, a viscosidade da fase móvel e o peso molecular do composto em análise. Quanto menor o número de pratos teóricos, mais largo será o pico observado, ou seja, maior será a distribuição dos analitos na coluna e, por essa razão, uma resposta menos eficiente na separação, como mostra a Figura 10<sup>[31, 15, 16]</sup>.

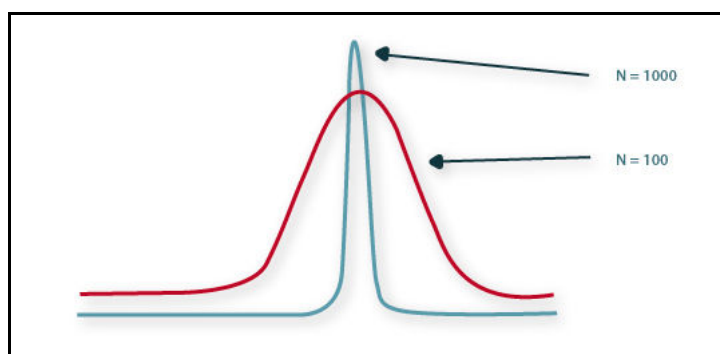


Figura 10 - Influência do número de pratos teóricos na resposta da coluna cromatográfica<sup>[31]</sup>

### 2.2.2 Equipamento do HPLC

As principais características que devem ser tidas em consideração na escolha de um equipamento para HPLC são:

**Versatilidade:** O equipamento deve resolver amostras de diferentes tipos, servir a distintas técnicas cromatográficas e realizar o máximo de operações, tais como, gradiente de fase móvel, coleta das frações, reciclagem de frações, etc., necessárias às análises sofisticadas.

**Rapidez:** Para se conseguirem análises rápidas, devem-se otimizar as condições para HPLC. Nomeadamente, escolher uma fase móvel de baixa viscosidade, uma bomba de alta pressão e colunas com partículas de pequeno diâmetro, o que proporciona uma grande área superficial, que promove o contacto entre fase estacionária e fase móvel, ou seja, facilita a separação.

**Reprodutibilidade e Estabilidade:** O equipamento deve ter controlo adequado sobre os parâmetros de operação, como o caudal, a temperatura, a pressão e a composição da fase móvel.

**Sensibilidade:** Um bom equipamento, mesmo trabalhando com pequenas quantidades de amostra, deve gerar sinais de intensidade apreciável <sup>[17]</sup>.

Na Figura 11 encontra-se representado um sistema típico de HPLC, onde é possível identificar os componentes instrumentais e os componentes químicos. Os componentes instrumentais são a bomba, o injetor, a coluna, o detetor e o sistema de processamento de dados, enquanto os componentes químicos são as fases móveis e fase estacionária.

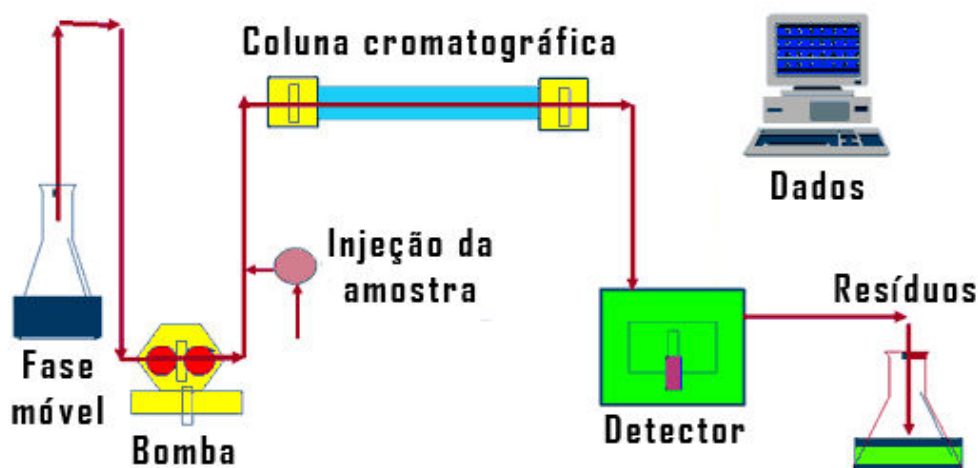


Figura 11 - Esquema representativo de uma montagem típica para a realização de análises de HPLC. [33]

- **Bomba de Alta Pressão**

É um dispositivo relacionado com o tempo de retenção, com a reprodutibilidade e com a sensibilidade do detector. A bomba distribui a fase móvel através do sistema, normalmente a uma velocidade de fluxo de 1 mL/minuto, de forma controlada, exata e precisa. As bombas são construídas com materiais resistentes aos solventes orgânicos e às soluções aquosas utilizadas como eluente. A eluição pode ser feita mantendo sempre o mesmo eluente (*eluição isocrática*), ou variando a composição do eluente com o tempo (*eluição gradiente*) [10, 31, 17, 18].

- **Sistema de Injeção da Amostra**

O injetor permite injetar a amostra na fase móvel, para posteriormente ser introduzida na coluna. A injeção é efetuada com injetores de válvula. A amostra é injetada na válvula, Figura 12-a), quando esta se encontra na posição “LOAD”. Utilizando uma microseringa, introduz-se a amostra num orifício da válvula, que conduz a amostra para um microcanal externo de volume fixo, designado *Loop*, que se encontra à pressão atmosférica. Entretanto o eluente flui diretamente da bomba para a coluna a alta pressão. Quando a válvula é rodada para a posição “INJECT” (Figura 12-b), o *Loop* passa a fazer parte do circuito através do qual flui o eluente e a amostra é arrastada para o interior da coluna [10, 31, 17, 18].

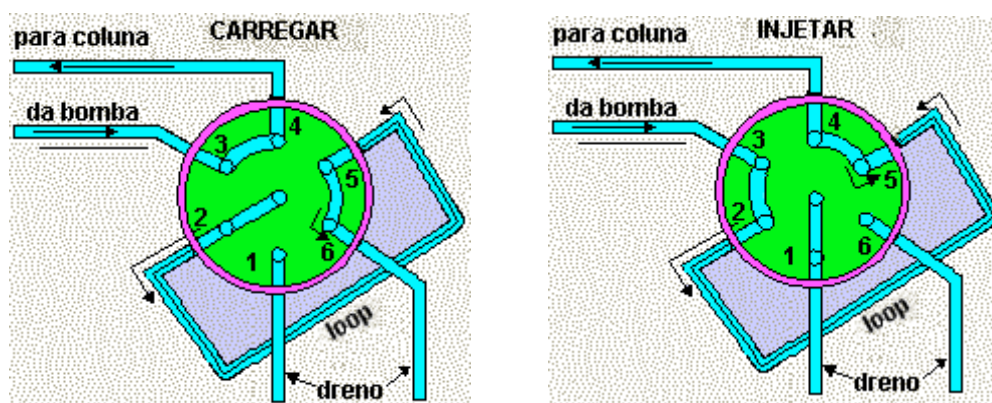


Figura 12 – Esquema exemplificativo de um sistema de injeção das amostras em HPLC. a) Válvula na posição “LOAD”. b) Válvula na posição “INJECT”<sup>[32]</sup>

- **Colunas**

É na coluna que se encontra a fase estacionária, sendo responsável pela separação dos compostos. Em geral, têm 10-25 cm de comprimento e 2,1-4,6 mm de diâmetro interno. As colunas são construídas com aço inoxidável na parede exterior, para que possam suportar as elevadas pressões verificadas em HPLC, e são revestidas internamente com vidro, para evitar possíveis reações que possam ocorrer entre o metal e os solventes [10, 31, 17, 18].



Figura 13 - Aspecto exterior das colunas analíticas de HPLC<sup>[36]</sup>

- **Detetor**

O detetor controla a sensibilidade com que cada composto pode ser detetado e medido, depois de separados na coluna. O detetor deve ser capaz de responder às mudanças de concentração em todos os compostos de interesse, com sensibilidade suficiente para medir o composto de menor concentração. A seleção do detetor mais apropriado para a análise depende do tipo e da concentração do soluto, da sensibilidade, da compatibilidade do detetor com o eluente e, ainda, do modo de eluição a utilizar. Existem seis tipos principais de detetores utilizados em HPLC: Detetores de índice de refração (IR); Detetores de ultravioleta (UV); Detetores de fluorescência (FL), Detetores eletroquímicos (ED), Detetores de condutividade (CD) e Detetores de espectrometria de massa (MS) [10, 31, 17, 18].

- **Fase Móvel**

A fase móvel é um líquido que está a ser continuamente bombeado para a coluna e que atua, não só como transportador da amostra, mas desempenha, igualmente, um papel importante no grau de separação que é possível atingir com uma determinada coluna. É a interação química entre a fase móvel e amostra com o enchimento da coluna que determina o grau de migração e separação dos componentes contidos na amostra. Assim, o tipo e a composição da fase móvel influenciam o grau de separação das espécies químicas numa dada coluna [10, 31, 17, 18].

- **Fase Estacionária**

A fase estacionária é constituída por partículas porosas esféricas. Quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, a cromatografia líquida é denominada de cromatografia de fase normal. Na situação inversa, ou seja, quando a fase estacionária apresenta menor polaridade que o solvente, a cromatografia recebe a denominação de cromatografia de fase reversa. Os adsorventes mais utilizados na cromatografia de fase normal são a sílica e a alumina, enquanto que para a fase reversa são empregues substâncias polares quimicamente ligadas, tendo como grupos funcionais cadeias com terminações do tipo ciano, diol, fenil, amino ou apolares [10, 31, 17, 18].

## 2.3 Validação do método

O processo de validação de um método tem como objetivo comprovar que os resultados obtidos através desse método têm qualidade adequada aos fins a que se destinam. Este processo pretende uniformizar os critérios utilizados de modo a demonstrar que um método de ensaio, nas condições em que é exercido, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida <sup>[19]</sup>.

Segundo a ISO/IEC17025 2005, para a garantia da qualidade analítica dos resultados, todos os equipamentos utilizados na validação devem estar devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados. O método analítico deverá ser reavaliado sempre que houver mudanças no mesmo, devendo-se, porém, considerar a natureza das mesmas <sup>[20]</sup>.

Em Portugal, para efetuar a validação de um método de ensaio, as orientações são indicadas no guia OGC001 do IPAC, o qual indica que pode ser necessário, e conveniente, realizar alguns, ou todos, os estudos abaixo indicados, ou seja pode-se realizar a avaliação indireta, a avaliação direta ou ambas.

A avaliação indireta envolve: O estudo dos princípios (fundamentos) teóricos do método, para evidenciar a base científica do método; Os estudos de otimização das condições operatórias e/ou robustez do método, para permitir uma otimização e harmonização da sua execução; O estudo dos parâmetros característicos do método (por exemplo: campo de aplicação, exatidão, repetibilidade, precisão intermédia, reprodutibilidade, limites de deteção e quantificação, incerteza, etc.), para conhecer a qualidade dos seus resultados <sup>[21]</sup>.

A validação direta é efetuada por determinação da exatidão e da tendência, por comparação com referências aceites, como sejam, a comparação com métodos normalizados ou de referência; a comparação com padrões ou materiais de referência certificados e as comparações interlaboratoriais <sup>[21]</sup>.

### Seletividade

A seletividade avalia a capacidade de um método analítico medir a substância a analisar na presença de componentes como impurezas, produtos de degradação, ou outros compostos que possam estar presentes na matriz da amostra. Uma forma de avaliar a seletividade num método analítico de HPLC é comparar uma amostra isenta da

substância a analisar, como por exemplo uma amostra em branco, com uma amostra onde a substância a analisar foi adicionada. Com este estudo pretende-se verificar se nenhum interferente tem eluição no tempo de retenção da substância de interesse, que deverá estar bem separada dos restantes compostos da amostra [22, 23, 24].

### Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, numa dada gama de concentrações. A gama linear de um método é definida como o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio [15, 22, 23, 24].

A linearidade é expressa através da correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico cromatográfico) e a massa, ou concentração, da substância a ser quantificada. Essa correlação pode ser expressa matematicamente como uma relação linear e é denominada curva analítica. A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica, a partir de um conjunto de medições experimentais, pode ser efetuada através de uma regressão linear. A curva analítica pode, então, ser expressa pela equação 7 [15, 22, 23, 24].

$$y = aX + b \quad (\text{eq.7})$$

Onde,

$y$  - é a resposta medida (altura ou área do pico)

$x$  - é a concentração do analito

***a*** - é o coeficiente angular (inclinação da curva)

***b*** - é o coeficiente linear (intersecção da curva com o eixo y)

É importante analisar o valor do coeficiente de correlação, ***r***, da regressão linear. Este parâmetro permite avaliar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo for do valor 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação superior a 0,999 significa que o conjunto de dados é bem representado pela equação obtida por regressão linear. A sensibilidade, que é um parâmetro que traduz a variação da resposta em função de uma variação na concentração da substância a analisar, pode ser expressa pelo declive da curva analítica, que depende da natureza da substância a analisar e da técnica de detecção utilizada. Do estudo da linearidade define-se o intervalo dinâmico do método, que corresponde ao intervalo de concentrações das soluções padrão de calibração onde o sinal mostra dependência linear, estando, também, dependente dos limites de detecção e quantificação, bem como, dos níveis de concentração da substância a analisar nas amostras. O limite superior do intervalo dinâmico, em geral, é o limite da linearidade, que depende do sistema de resposta do equipamento de medição, mas que pode ser, também, definido em função dos níveis de concentração da substância a analisar nas amostras [15, 22, 23, 24].

As curvas analíticas podem ser construídas utilizando-se os seguintes métodos:

- (A) Padronização Externa: compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas, preparadas a partir de um padrão;
- (B) Padronização Interna: consiste na preparação de soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de um composto designado por padrão interno;

(C) *Adição Padrão*: é realizada adicionando-se quantidades conhecidas da substância de interesse a quantidades conhecidas da amostra, antes da sua preparação [15, 23, 24, 25].

### **Precisão**

A precisão avalia a dispersão de resultados de uma série de medições repetidas a uma mesma amostra, a amostras semelhantes ou a uma solução padrão, em condições definidas. É normalmente avaliada usando o desvio padrão relativo, que não é mais do que o coeficiente de variação (CV%) em circunstâncias específicas de medição, como a repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade [15, 23, 24, 25, 26].

$$CV(\%) = \left( \frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad (\text{eq.8})$$

onde,

s é o desvio padrão absoluto e  $\bar{x}$  é a média aritmética das medições.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{eq.9})$$

Segundo a IPAC o limite de CV% admitido depende da gama de concentração dos analitos, sendo admitidos resultados entre 1 a 30 %. São considerados CV% até 30% para concentrações vestigiais e de 1% para concentrações muito elevadas. Em auditorias de requisitos técnicos do IPAC, e para a metodologia em causa, considera-se aceitável CV% da ordem dos 10 % [15, 23, 24, 25].

A precisão, em validação de métodos, é estudada em três níveis diferentes: repetibilidade; precisão intermédia e reprodutibilidade

*i) Repetibilidade.*

A repetibilidade avalia a dispersão dos resultados de medições sucessivas usando o mesmo método, sob as mesmas condições de medição, ou seja, usando o mesmo procedimento, com o mesmo técnico e equipamento analítico e usando as mesmas condições experimentais do mesmo laboratório. As repetições devem ser realizadas num curto intervalo de tempo, ou seja as injeções devem ser feitas todas no mesmo dia.

*ii) Precisão intermédia.*

A precisão intermédia é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório. Avalia o efeito das variações dentro do laboratório associadas a medições em diferentes dias, ou com diferentes analistas, ou com diferentes equipamentos, ou uma combinação destes fatores. A precisão intermédia é também avaliada através do valor do coeficiente de variação (CV%) dos resultados das análises repetidas nas condições acima referidas [15, 22, 23, 24, 25].

*iii) Reprodutibilidade.*

A reprodutibilidade mede a precisão entre laboratórios, como nos estudos de colaboração entre laboratórios, e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos. Para validar esta característica experimental, estudos semelhantes devem ser efetuados em laboratórios diferentes, usando o mesmo lote da amostra homogénea e o mesmo desenho experimental, para a validação do mesmo método analítico. Este estudo corresponde ao grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob diferentes condições (por exemplo, diferentes técnicos, laboratórios, equipamentos, etc.) [15, 22, 23, 24, 25].

### 3. Materiais e Métodos

Neste capítulo apresenta-se a descrição da preparação das amostras, dos reagentes utilizados, do equipamento, dos procedimentos e das condições experimentais usadas no método aplicado na determinação das catecolaminas e seus metabolitos na urina.

#### 3.1 Equipamentos e Instrumentação

Os equipamentos utilizados para auxiliar os trabalhos foram: agitador vortex (Heidolph, modelo Reax 2000), centrifugadora (Jouan, modelo GR 4.12), um sistema de filtração com bomba de vácuo, que foi utilizado para aspirar as amostras no processo de preparação, um digestor (Lovibond, modelo ET 108). Foram também utilizadas micropipetas de 100 – 500  $\mu\text{L}$ , pipetas de 10 mL, pipetas pasteur, tubos de ensaio e fita de medição de pH.

As amostras foram analisadas num sistema de cromatografia (Figura 14.A) constituído por HPLC “System Gold” da marca Beckman, equipado com um sistema de bombas de modelo 126, ligado a um detetor eletroquímico (Figura 14.B).

Foram utilizadas colunas comerciais da marca Chromsystems e da ClinRep. Nestas colunas a fase estacionária é constituída por sílica-gel. Uma imagem da coluna analítica no sistema pode ser observada na Figura 14.B.

A deteção foi realizada por um detetor eletroquímico - célula eletroquímica VT-03 (Figura 14.B). A célula é formada por um eléctrodo de carbono vítreo, utilizado como eléctrodo de trabalho, e um eléctrodo de referência *in-situ* Ag/AgCl, designado por ISAAC, imerso numa solução de KCl saturada, contendo cristais de KCl e, ainda, um eléctrodo auxiliar de aço inoxidável.

Para a injeção das amostras foi utilizada uma micro seringa de injeção de 50  $\mu\text{L}$ . Os dados foram recolhidos, registados e tratados através do software 32 Karat versão 7.0.

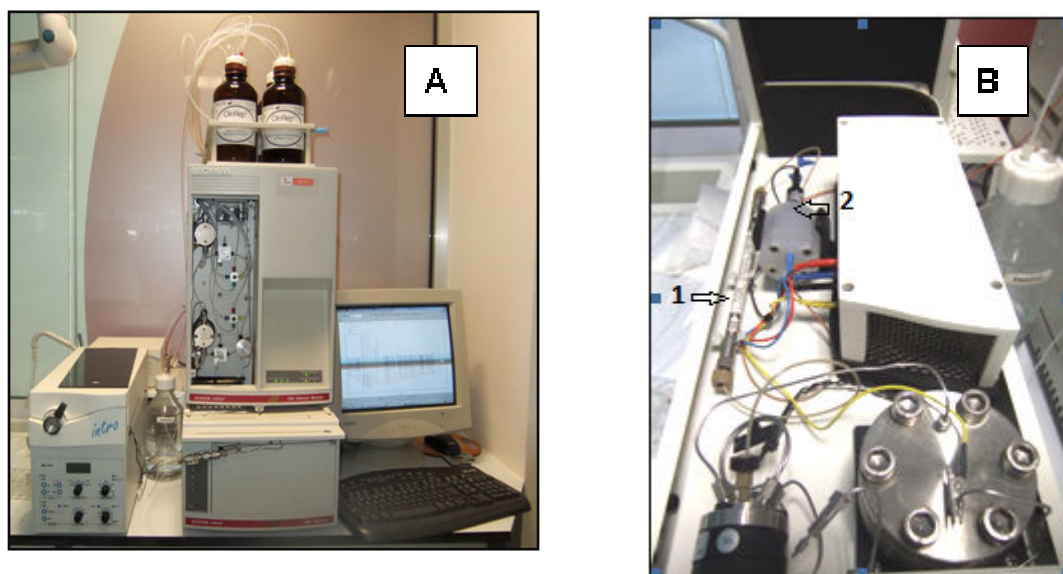


Figura 14 - (A) Equipamento de HPLC. (B) Imagem do interior do detector eletroquímico: (1) Coluna analítica, (2) Célula eletroquímica.

As soluções, reagentes e fases móveis, para HPLC, necessárias para analisar as catecolaminas e seus metabolitos, foram fornecidas pela empresa Recipe.

- Solução Padrão;
- Solução de Calibração;
- Solução de Controlo para fins de qualidade;
- Solução de lavagens W
- Solução A de Amónia,
- Solução B Ácido Bórico;
- Solução D (diluição);
- Fases Moveis;
- Colunas de preparação das amostras;
- Reagente E Eluição;
- Reagente S (estabilização);
- Padrão Interno (PI).

#### Soluções preparadas no laboratório

- Solução de KCl 0,2M
- Solução de NaOH 1N

- Solução de ácido acético 0,2M
- Solução de KCl saturada

### 3.2 Método de extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida consiste num processo de separação através do qual os compostos que se encontram dissolvidos, ou suspensos numa mistura líquida, são separados de acordo com as suas propriedades químicas e físicas.

O procedimento da SPE inicia-se pelo condicionamento da coluna. Segue-se a filtração da amostra líquida sob vácuo, através de uma coluna de extração, onde os analitos são retidos pelo adsorvente. A etapa seguinte é a lavagem da coluna de extração com o mesmo solvente utilizado no seu condicionamento, a fim de remover impurezas. Por fim, efetua-se a eluição dos analitos com um solvente, ou uma mistura de solventes adequados, como ilustra a Figura 15 [27, 28].

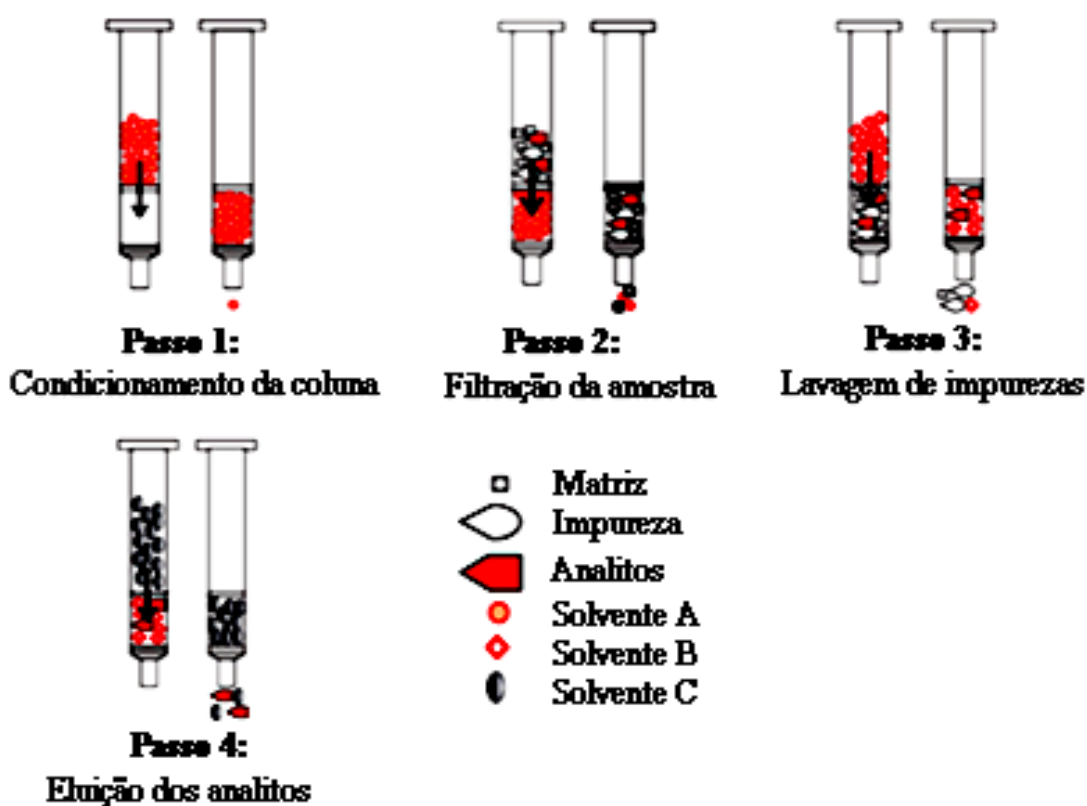


Figura 15 - Etapas do processo de extração em fase sólida [26]

### **3.3 Procedimento experimental para a determinação do VMA, HVA e 5-HIAA**

#### **a) Preparação de Soluções/Amostra**

##### Solução Padrão

A solução padrão para determinar o VMA, o HVA e o ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA) é reconstruída adicionando ao frasco 1.0 mL da solução de HCl a 0,2 M. Agita-se suavemente, até dissolver todo o material. Esta solução tem como objetivo verificar se o equipamento está nas devidas condições, ou seja, se a coluna deteta os componentes e se estes são separados nos tempos certos.

##### Padrão de Calibração

A solução padrão, para fins de calibração, é reconstruída adicionando ao frasco 5.0 mL da solução de HCl a 0,2 M. Agita-se suavemente o frasco, até o material estar todo dissolvido. Depois desta primeira preparação, e antes de ser injetada no HPLC, a solução tem de sofrer o mesmo tratamento a que a amostra é sujeita. Este tratamento é descrito mais à frente neste trabalho.

##### Padrão de Controlo para efeitos de qualidade

A solução do padrão de controlo de qualidade reconstrói-se adicionando ao frasco 8,0 mL da solução de HCl a 0,2 M e agitando durante 15 min, até o material estar todo dissolvido. Esta solução também deve sofrer o mesmo tratamento que a amostra e só depois ser injetada no HPLC.

##### Preparação das amostras (calibrador, controlo e amostra da urina a analisar)

Em 4 tubos de ensaio são colocados 50 µL de urina (previamente centrifugada), 50 µL de padrão de calibrador, e 50 µL de padrão de controlo de qualidade. A cada tubo adiciona-se 1 mL de padrão interno. Depois de agitar suavemente as amostras, estas são colocadas nas colunas específicas para a preparação das amostras. As amostras são, então, filtradas e o filtrado obtido é desprezado. De seguida procede-se à lavagem das amostras, adicionando 1mL de solução A de amónia, em cada coluna. Filtra-se e volta-se a desprezar o filtrado. No segundo passo da lavagem, enche-se as colunas na totalidade com a solução B ácido

bórico, filtra-se e despreza-se o filtrado. Repete-se esta operação. Para finalizar a preparação das amostras, adiciona-se 2 mL de reagente E (reagente de eluição), filtra-se e recolhe-se o filtrado, para ser analisado no HPLC. A Figura 16 apresenta esquematicamente a sequência de operações relativas à preparação das amostras.

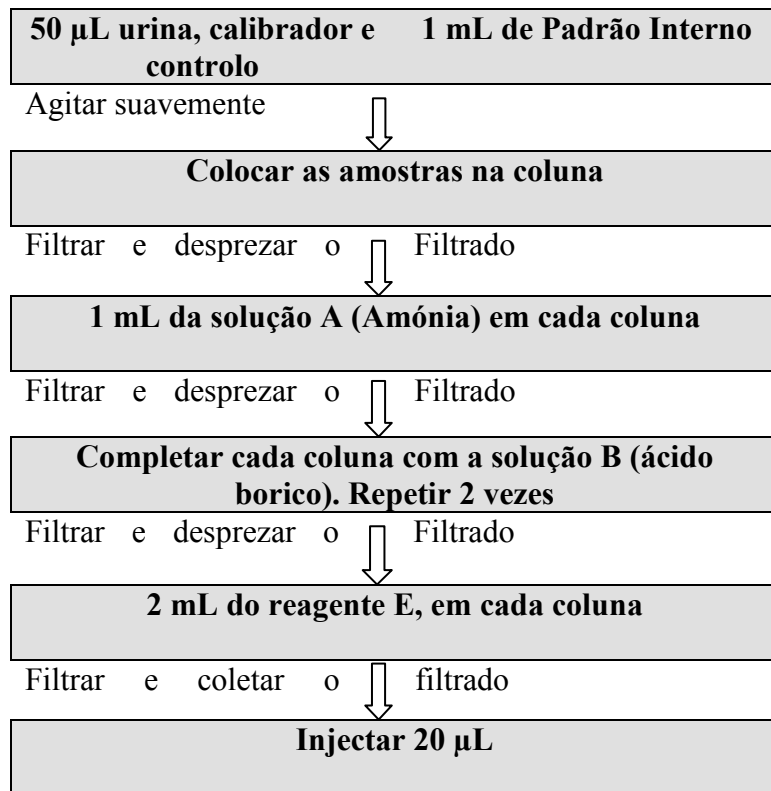


Figura 16 - Fluxograma da preparação da amostra para a determinação de VMA, HVA e 5-HIAA.

### b) Condições Cromatográficas para a determinação de VMA, HVA e 5-HIAA

A eluição é realizada em modo isocrático da fase móvel, a um fluxo de 0,7 mL/min, com um volume de injeção de 20 µL. Na célula do detetor, é fixado um valor de potencial de 800 mV (0,8 V). A temperatura da coluna deverá ser mantida a 30°C. As condições do sistema encontram-se resumidas na Tabela 2.

A primeira amostra a ser injetada é a solução padrão. Este processo deve ser repetido até obter dois cromatogramas iguais, ou muito semelhantes, ao cromatograma que

vem como referência. A segunda amostra a injetar é a solução de calibração. Esta é a solução responsável pela obtenção das curvas de calibração. Deve ser injetada várias vezes, até obter cromatogramas semelhantes, garantindo, assim, um bom resultado final. Por fim, efetua-se a injeção das outras amostras, repetindo sempre os ensaios. Esta sequência é realizada para as análises de todas as espécies químicas (VMA, HVA, 5-HIAA, Catecolaminas e Metanefrinas).

Tabela 2 - Condições do HPLC para a análise do VMA, HVA e 5-HIAA.

<b>Injetor</b>	<b>Volume injeção</b>	20 $\mu$ L
	<b>Fluxo</b>	0,7 mL/min
	<b>Intervalo de injeção</b>	20 min
<b>Coluna</b>	<b>Pressão da coluna</b>	220 bar
	<b>Temperatura da coluna</b>	30 °C
	<b>Pressão das bombas</b>	1560 kpsi
<b>Detetor</b>	<b>Tipo de detetor</b>	Eletroquímico
	<b>Vcell</b>	800 mV
	<b>Vicell</b>	$\pm$ 35 nA
	<b>Filtro</b>	5s
	<b>Range</b>	0,02 *100 nA/V

### 3.4 Procedimento experimental para a determinação das Catecolaminas

#### a) Preparação de Soluções/Amostra,

##### Solução Padrão

Trata-se de uma solução comercial e está pronta a ser injetada.

##### Padrão de Calibração

A solução padrão para fins de calibração prepara-se adicionando ao frasco 8,0 mL da solução de HCl a 0,2 M. Agita-se suavemente o frasco até o material estar todo dissolvido. Depois desta primeira preparação, e antes de ser injetada no HPLC, a solução deve sofrer o mesmo tratamento que a amostra, descrito mais à frente neste trabalho.

Solução de Controlo para efeitos de qualidade

A solução de controlo é preparada adicionando ao frasco 8,0 ml da solução de HCl a 0,2 M e agitando durante 15 minutos. Estas soluções sofrem, o mesmo tratamento que a amostra e só depois são injetadas no HPLC.

Preparação das amostras (calibrador, controlo e amostra da urina a analisar)

Em 3 tubos de ensaio são colocados 3 mL de urina (previamente centrifugada e acidificada com HCL), calibrador e o padrão de controlo. A cada tubo adiciona-se 30 µL de padrão interno. Agita-se suavemente e verifica-se a cor das amostras. Se se verificar que a cor é laranja, deve adicionar-se umas gotas de NaOH até passar a amarela. Coloca-se as amostras nas colunas e filtram-se, sendo o filtrado obtido desprezado. Enchem-se as colunas até ao topo com a solução de água de HPLC, filtra-se e despreza-se o filtrado. Adiciona-se a cada coluna 6 mL de Eluting Reagent E, filtra-se e recolhe-se o filtrado. Por fim, agita-se por breves instantes, num agitador de vórtice, a fim de homogeneizar a amostra. A Figura 17 apresenta a sequência de operações relativa à preparação das amostras, utilizando filtros adequado à realização de extracções em fase sólida.

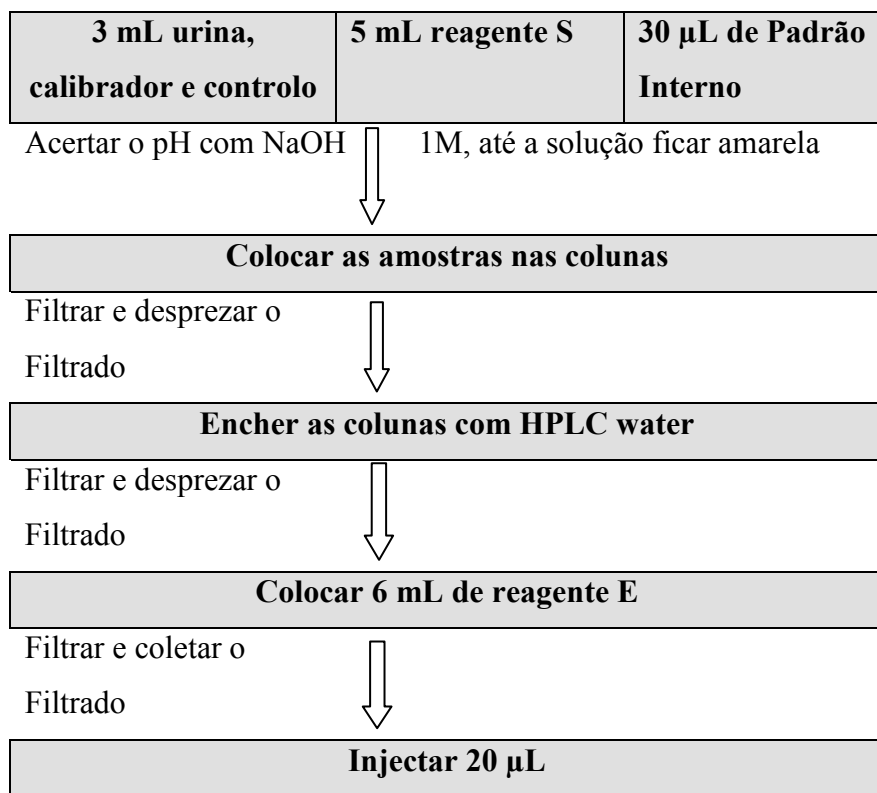


Figura 17 - Fluxograma da preparação da amostra para a determinação das catecolaminas

### b) Condição Cromatográficas para a determinação de Catecolaminas

A eluição é, igualmente, em modo isocrático da fase móvel, a um fluxo de 0,7 mL/min, com um volume de injeção de 20 µL. A célula é fixada com um valor de potencial de 500 mV. e a temperatura da coluna mantida a 30°C. As condições do sistema encontram-se resumidas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições do HPLC para a análise das Catecolaminas.

<b>Injetor</b>	<b>Volume injeção</b>	20 µL
	<b>Fluxo</b>	0,7 mL/min
	<b>Intervalo de injeção</b>	14 min
<b>Coluna</b>	<b>Pressão da Coluna</b>	200 bar
	<b>Temperatura da coluna</b>	30 °C
	<b>Pressão das bombas</b>	1200 Kspi
<b>Detetor</b>	<b>Tipo de detetor</b>	Eletroquímico
	<b>Vcell</b>	500 mV
	<b>Filtro</b>	5 s
	<b>Range</b>	0,5 nA/V

### 3.5 Procedimento experimental para a determinação das Metanefrinas

#### a) Preparação de Soluções/Amostra,

##### Solução Padrão

Trata-se de uma solução comercial e está. A solução vem pronta a ser injetada.

##### Padrão de Calibração

A solução padrão para fins de calibração é reconstituída adicionando ao frasco 8,0 mL da solução de HCl a 0,2 M. Agitar suavemente o frasco até o material estar todo dissolvido. Depois desta primeira preparação, e antes de ser injetada no HPLC, a solução sofre o mesmo tipo de extração que a amostra. Este procedimento encontra-se descrito mais à frente neste trabalho.

##### Solução de Controlo para efeitos de qualidade

A solução de controlo é reconstituída adicionando ao frasco 8,0 ml da solução de HCl a 0,2 M, agitando durante 15 min. Esta solução também tem o mesmo tratamento que a amostra e só depois é injetada no HPLC.

##### Preparação das amostras (calibrador, controlo e amostra da urina a analisar)

Prepara-se 3 tubos de ensaio com 1ml de calibrador, 1ml de padrão de controlo, 1ml de urina (previamente centrifugada e acidificada com HCl) e adiciona-se 20µl de padrão interno em cada tudo. Agita-se e verifica-se o valor de pH. O valor de pH deve

estar na gama de 0,5 a 1. De seguida, incuba-se a amostra a uma temperatura compreendida entre 90 a 100 °C, durante 30 min. Após a hidrólise, deixa-se arrefecer até à temperatura ambiente. Adiciona-se 4 ml da solução Diluting Solution D, que contém um indicador colorométrico, em cada tudo, e verifica-se se ocorre a alteração da cor da amostra para amarela. Caso não se obtenha a cor pretendida, adiciona-se gota a gota uma solução de NaOH 1M até que a amostra fique de cor amarela. O pH terá de ser superior a 6.

Depois de acertar o pH, começa-se o processo de extração. Depositam-se as amostras na coluna de preparação, e, através de um sistema de vácuo, separa-se o filtrado, que é rejeitado. Enchem-se as colunas com água destilada e aplica-se, novamente, vácuo, adiciona-se 4 mL de Solução Washing em cada coluna, aplica-se vácuo e despreza-se o filtrado. Volta-se a colocar água destilada até encher as colunas, a aplicar vácuo e a desprezar-se o filtrado. Por fim, coloca-se um tubo de ensaio com 1 mL de reagente Stabilising (reagente S) na parte inferior de cada coluna, para recolher o filtrado. Pipita-se 5 mL de reagente Eluting (Reagente E) para o interior de cada coluna e aspira-se para os tubos de ensaio. Injeta-se no aparelho de HPLC 20 µL de cada amostra. A Figura 18 apresenta a sequência de operações relativa à preparação das amostras, utilizando filtros adequado à realização de extracções em fase sólida.

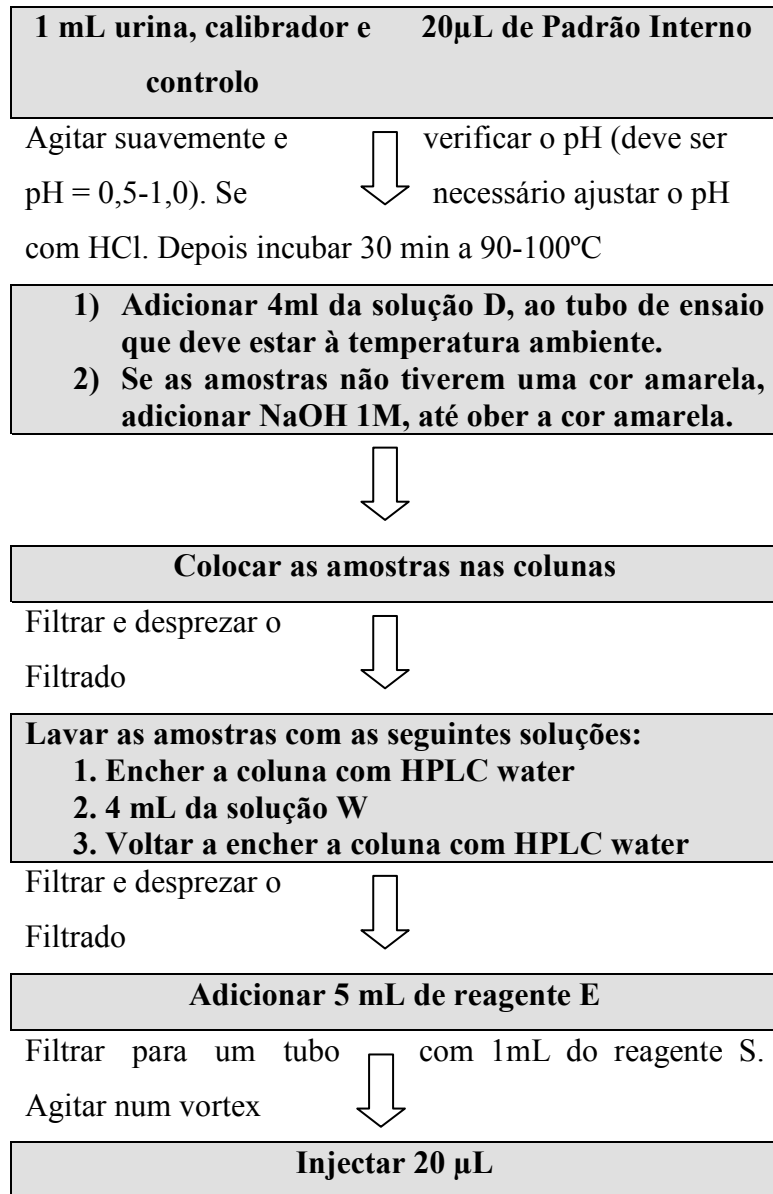


Figura 18 - Fluxograma da preparação da amostra para determinação das metanefrinas.

### b) Condições Cromatográficas para a determinação de Metanefrinas

A eluição é realizada em modo isocrático da fase móvel, a um fluxo de 1,8 mL/min, com um volume de injeção de 20 µL. A célula é fixada com um valor de potencial de 650 mV (0,65 V). A temperatura da coluna é mantida a 30 °C. As condições do sistema encontram-se resumidas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições do HPLC para a análise das Metanefrinas.

<b>Injetor</b>	<b>Volume injeção</b>	20 $\mu$ L
	<b>Fluxo</b>	1,8 mL/min
	<b>Intervalo de injeção</b>	20,5 min
<b>Coluna</b>	<b>Pressão da coluna</b>	200 bar
	<b>Temperatura da coluna</b>	30 °C
	<b>Pressão das bombas</b>	2170 Kspi
<b>Detetor</b>	<b>Tipo de detetor</b>	Eletroquímico
	<b>Vcell</b>	650 mV
	<b>Filtro</b>	5 s
	<b>Range</b>	0,5 nA/V

### 3.6 Controlo Externo - RIQAS

O RIQAS (Sistema de Avaliação da Qualidade Randox Internacional) foi criado em 1990 e, desde então, tornou-se num dos maiores métodos de avaliação externo, em termos de qualidade, e serve a mais de 150 países em todo o mundo. O seu principal objetivo é ajudar os laboratórios a satisfazer as suas exigências no âmbito da qualidade <sup>[37]</sup>.

A preparação do controlo é efetuada hidratando o frasco do controlo externo com 10 mL de água destilada, esperar 30 min, e, por fim, colocar no interior do frasco 3 gotas da solução de ácido clorídrico que é fornecida conjuntamente com o controlo externo. Seguidamente, é preparado de acordo com método analítico e, por fim, injetado no equipamento.

## 4. Apresentação e Discussão dos Resultados

### 4.1 Análise e determinação de VMA, HVA e 5-HIAA na urina.

Para determinar a concentração dos compostos foi necessário construir as curvas de calibração. Estas curvas foram construídas utilizando o método do padrão interno (PI), que consiste na preparação do padrão de calibração da substância a analisar com concentração conhecida (ver Tabela 5), à qual se adiciona um composto, denominado padrão interno, de concentração constante. Após análise do padrão, construíram-se as curvas de calibração, relacionando a razão das áreas (área da substância/ área do padrão interno) em função da razão da concentração da substância (concentração da substância/concentração do PI). O padrão interno deve ser um composto similar à substância a ser quantificada, não devendo reagir com ela, nem fazer parte da amostra e deverá ter um tempo de retenção tal que permita, na aplicação de HPLC, ser separado com boa resolução.

Sendo assim, injetou-se o padrão de calibração no HPLC, de concentração única. Depois de obter o cromatograma, procedeu-se à integração das áreas dos picos e obtiveram-se as 3 curvas de calibração, que estão representadas na Figura 19. Estas curvas de calibração são, obviamente, lineares, com um coeficiente de correlação igual a 1, uma vez que se dispõe apenas de dois pontos para efetuar a sua construção, a origem (0,0) e outro ponto que é função da concentração de cada componente na solução padrão.

Tabela 5 - Composições e resultados da análise da solução padrão para a determinação das curvas de calibração de VMA, HVA e 5-HIAA.

	Concentração (mg/L)	Concentração Relativa	Áreas	Áreas Relativas
VMA	10.9	10.9	46071899	0,767
HVA	10.6	10.6	69123556	1,151
5- HIAA	18.1	18.1	323142899	5,38
PI	1	1	60041193	1

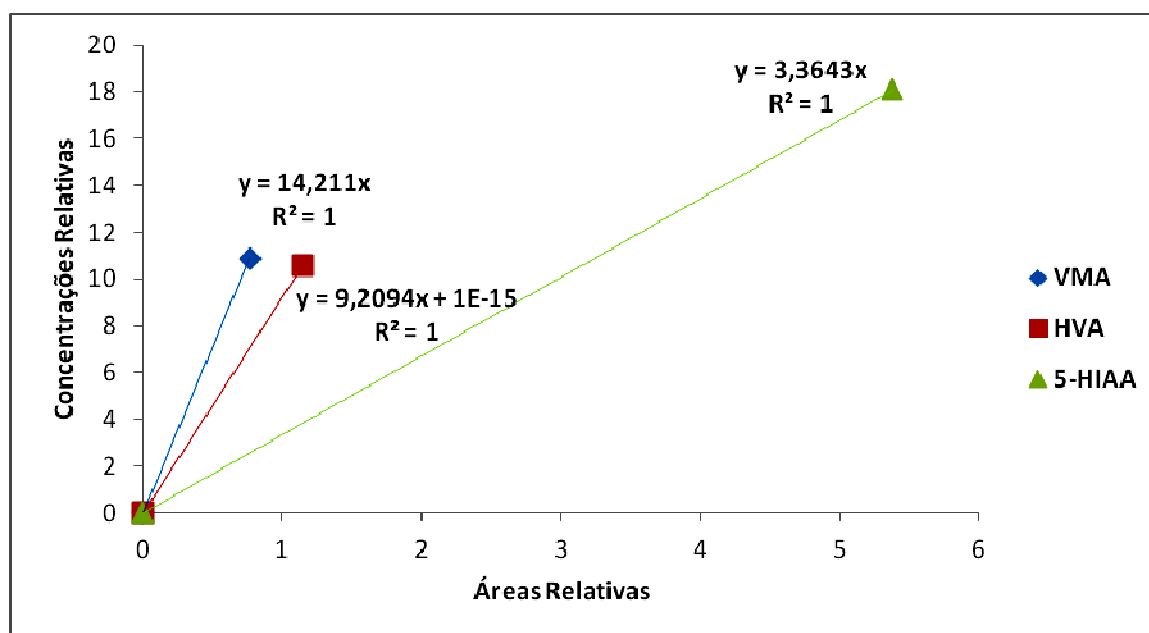


Figura 19 - Curvas de Calibração dos compostos VMA, HVA e 5-HIAA.

Depois de determinar as três curvas de calibração, injetaram-se amostras de urina de concentração desconhecida no HPLC, tendo-se procedido a várias análises segundo o método anteriormente descrito. Na Figura 20 é apresentado um dos cromatogramas obtidos, onde são perfeitamente identificáveis os picos relativos aos três compostos a em análise.

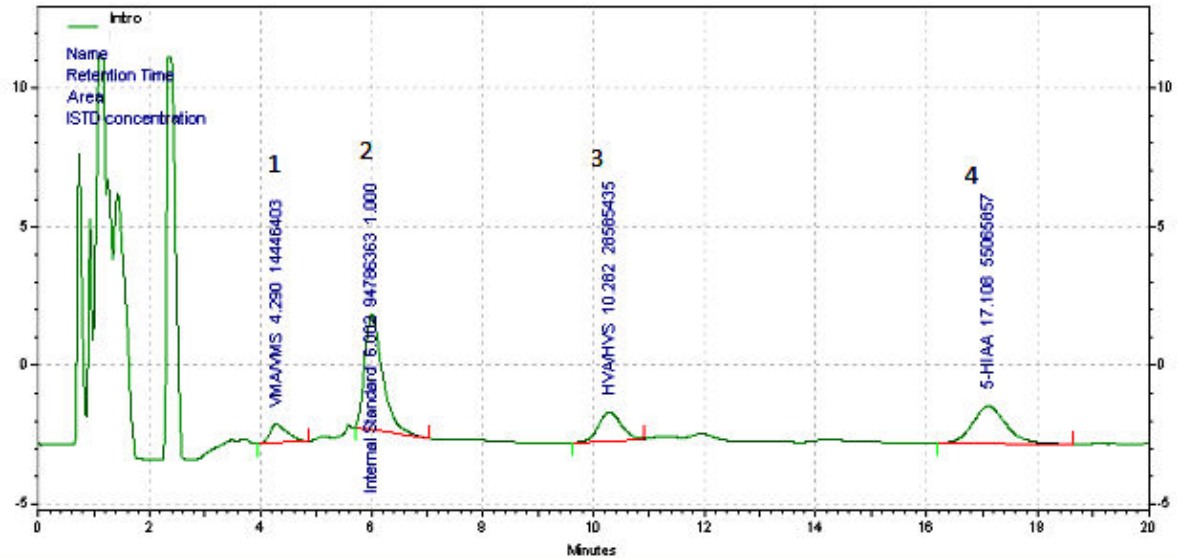


Figura 20 - Cromatograma obtido após a injeção de 20  $\mu\text{L}$  de amostra de urina. Picos: 1 – VMA (ácido vanilmandélico), 2 – Padrão Interno, 3 – HVA, 4 – 5-HIAA.

As razões das áreas obtidas no cromatograma (área amostra/área PI) da Figura 20 são substituídas nas respectivas curvas de calibração, obtendo-se as concentrações dos correspondentes compostos na amostra. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 – Dados e resultados da determinação das concentrações dos compostos VMA, HVA e 5-HIAA na amostra do cromatograma da Figura 20.

	Áreas	Áreas Relativas	Concentração mg/L
<b>VMA</b>	14446403	0.152	2.165
<b>HVA</b>	28585435	0.301	2.777
<b>5- HIAA</b>	55065857	0.581	1.954
<b>PI</b>	94786363	1	1

Para obter a concentração final, estes valores são multiplicados pelo volume de urina recolhida durante as 24 horas e, depois, comparados com valores de referência apresentados no Anexo I.

Ao realizar estas análises constatou-se ser possível estabelecer as condições necessárias a uma fácil construção das curvas de calibração e, ainda, a uma fácil

identificação dos picos e, logo, ao estabelecimento de um método de análise prático e aparentemente eficaz na determinação de VMA, HVA e 5-HIAA. No entanto, é importante quantificar a *performance* cromatográfica do sistema na realização destas análises.

Partindo dos resultados expressos no cromatograma da Figura 20, obtido nas condições cromatográficas estabelecidas, que correspondem a um fluxo de 0,7 mL/min e 20  $\mu$ L de volume de injeção da amostra, e, verifica-se que os picos apresentam uma resolução acima de 1,5 (ver Tabela 7), que é um valor indicativo de uma boa resolução da coluna [12, 15, 16].

Tabela 7 - Capacidade de resolução da coluna cromatográfica para o método utilizado na determinação da concentração de VMA, HVA e 5-HIAA.

	VMA	PI	HVA	5-HIAA
$t_r$	4,26	6,002	10,282	17,106
Largura (W)	0,55	0,6	0,75	1
Resolução	–	<b>2,98</b>	<b>6,34</b>	<b>7,80</b>

Para realizar o estudo de *performance*, é importante, também, determinar o número de pratos teóricos (N) e a altura de pratos teóricos (H). Utilizando os valores do cromatograma da amostra em estudo obtiveram-se os valores apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores dos parâmetros calculados no estudo de performance cromatográfica para determinar VMA, HVA e 5-HIAA.

	$t_r$	K	$\alpha$	W (cm)	N	H (cm)
VMA	4,29	3,29	1,52	0,55	973	0,0144
PI	6,00	5,00	1,86	0,6	1602	0,0087
HVA	10,282	9,28	1,73	0,75	3008	0,0047
5-HIAA	17,106	16,106	–	1	4682	0,0029

Tempo morto = 3,85

Comprimento da Coluna = 14 cm

Como referido anteriormente, o valor de N (número de pratos teóricos), permite retirar conclusões à cerca da eficiência da separação. Sendo assim, e de acordo com os

valores calculados referentes ao VMA, HVA e 5-HIAA, em que se observa uma maior largura de pico para o VMA, constata-se, em concordância, que o VMA apresenta o menor valor de N, o que significa que o sistema apresenta uma menor eficiência na sua separação do que na separação dos outros componentes. É de registrar que ao longo de todas as análises efetuadas, este foi sempre o pico com maior dificuldade de detecção, apesar do valor concreto de N variar de amostra para amostra.

As mesmas conclusões podem ser retiradas no caso de se analisar, não o valor do N, mas o valor da altura de um prato (H). Na verdade, a relação entre estes dois parâmetros é inversamente proporcional (equação 6), sendo a constante de proporcionalidade o comprimento da coluna. Desta forma, é expectável que o maior valor de H ocorra para o VMA. Quanto aos valores de k, estes estão compreendidos entre 3 e 16, que são valores considerados aceitáveis <sup>[12, 15, 16]</sup> e reveladores de uma boa capacidade de retenção dos analitos pela coluna.

#### **4.1.1 Validação de parâmetros analíticos**

##### **4.1.1.1 Estudo da Seletividade**

Para efetuar o estudo sobre a seletividade, compararam-se os cromatogramas de uma amostra em branco (contendo apenas o padrão interno e sem urina), com uma amostra do padrão de controlo de qualidade. Para tal, procede-se à sobreposição dos dois cromatogramas, como apresentado na Figura 21, analisando a perfeição na separação da amostra e a ausência de interferências com compostos que possam existir na amostra em branco.

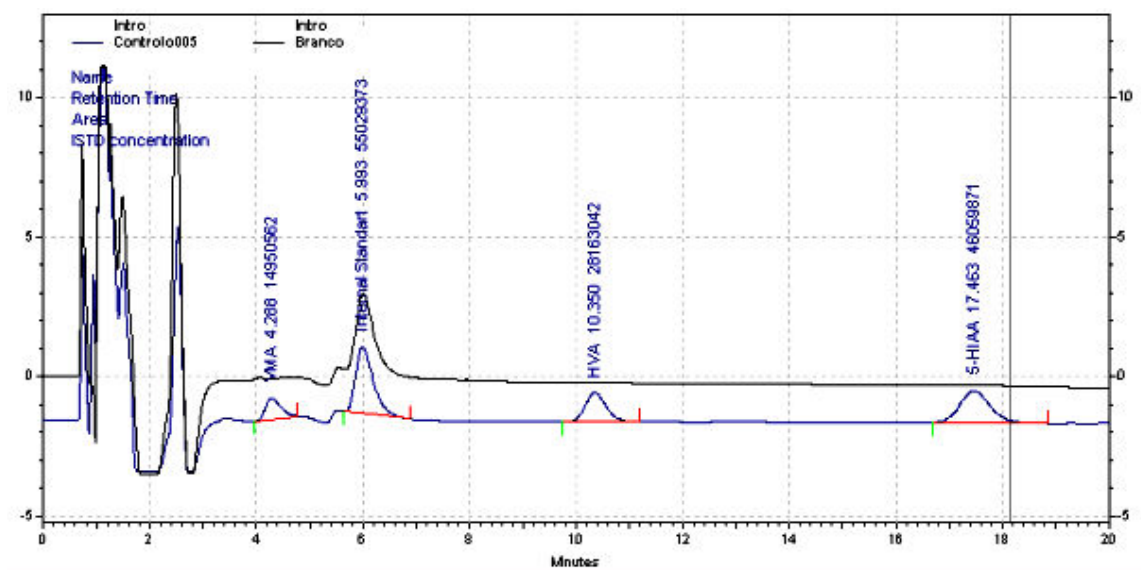


Figura 21 - Sobreposição do cromatograma do ensaio em branco com o cromatograma do padrão de controlo de qualidade na análise de VMA, HVA e 5-HIAA.

Pela análise dos cromatogramas obtidos, verificou-se a ausência dos picos interferentes com tempos de retenção idênticos aos do padrão de controlo. Deste modo, é possível concluir que esta metodologia de HPLC, com detetor eletroquímico, é seletiva para a deteção de VMA, HVA e 5-HIAA na urina.

#### 4.1.1.2 Estudo da Precisão

##### 1) Repetibilidade Instrumental

A precisão do método foi estudada ao nível da repetibilidade instrumental e da precisão intermédia. Relativamente à avaliação da repetibilidade instrumental, procedeu-se à realização de cinco injeções ( $n=5$ ) da solução padrão de controlo de qualidade no HPLC, nas mesmas condições cromatográficas, e ao longo do mesmo dia de estudo. A Figura 21 apresenta os cromatogramas obtidos com as 5 injeções.

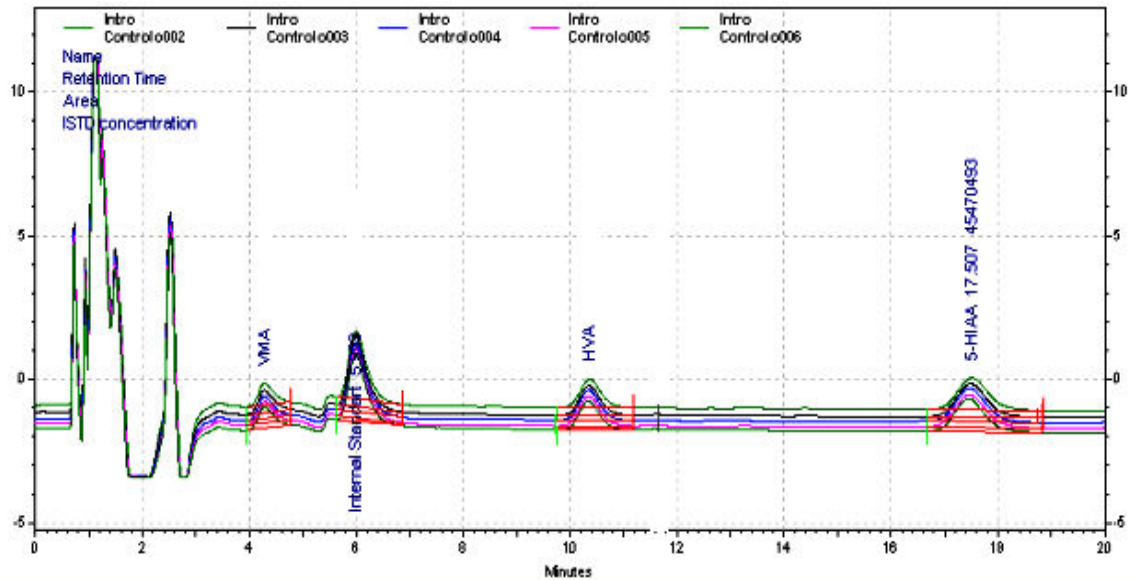


Figura 22 – Cromatogramas relativos à avaliação da repetibilidade instrumental para o método de análise de VMA, HVA e 5-HIAA.

Para cada cromatograma obtido, procedeu-se à integração das áreas dos picos correspondentes a cada composto. Com base no valor médio da área de cada pico, e no correspondente desvio padrão, determinaram-se os coeficientes de variação (CV%) apresentados na Tabela 9. Este parâmetro é uma medida da repetibilidade instrumental, sendo considerado aceitável um valor inferior a 10% <sup>[15]</sup>. Assim, dos valores de CV% obtidos, que são todos muito inferiores a 10%, conclui-se existir uma excelente repetibilidade instrumental.

Tabela 9 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) das áreas dos picos de VMA, HVA e 5-HIAA detetados nos cromatogramas do estudo da repetibilidade instrumental.

	VMA	HVA	5-HIAA
<b>Média (n=5)</b>	15128201	28103301	46388632
<b>Desvio Padrão</b>	342516,46	575842,86	651366,09
<b>CV%</b>	<b>2,26</b>	<b>2,05</b>	<b>1,40</b>

## 2) Precisão Intermédia

Neste estudo, procedeu-se à realização de 11 injeções (n=11) da solução padrão de controlo de qualidade, nas mesmas condições cromatográficas, mas em dias diferentes. Para cada cromatograma obtido, procedeu-se à integração das áreas dos picos correspondentes a cada um dos compostos. Com base no valor médio da área de cada pico, e no correspondente desvio padrão, determinaram-se os CV% apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) das áreas dos picos de VMA, HVA e 5-HIAA detetados nos cromatogramas do estudo da precisão intermédia.

	VMA	HVA	5-HIAA
Média (n=11)	15199867	30068540	43885408
Desvio Padrão	2852926	3763209	10937187
CV%	<b>19%</b>	<b>13%</b>	<b>25%</b>

Admite-se como aceitável para CV%, no estudo da precisão intermédia, um valor até 30%, quando se analisam concentrações tão baixas, como as do caso em estudo <sup>[15]</sup>. Deste modo, pode-se concluir que os valores de CV%, para precisão intermédia, apresentados na Tabela 10, são inequivocamente aceitáveis, uma vez que são bastante inferiores a 30%.

## 4.2 Análise e determinação de Catecolaminas na urina

O método para a determinação da concentração das catecolaminas e das curvas de calibração, é o mesmo já descrito no subcapítulo 4.1, para a determinação de VMA, HVA e 5-HIAA. Sendo assim, a partir dos dados retirados do cromatograma do padrão de calibração (Tabela 11) obtiveram-se as 3 curvas de calibração apresentadas na Figura 21.

Tabela 11 - Composições e resultados da análise da solução padrão para a determinação das curvas de calibração das catecolaminas (noradrenalina, adrenalina e dopamina).

	Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração Relativa	Áreas	Áreas Relativas
<b>noradrenalina</b>	111	111	764493432	0,75
<b>adrenalina</b>	28.4	28.4	18029010	0,18
<b>dopamina</b>	240	240	183854041	1,82
<b>PI</b>	1	1	1012176954	1

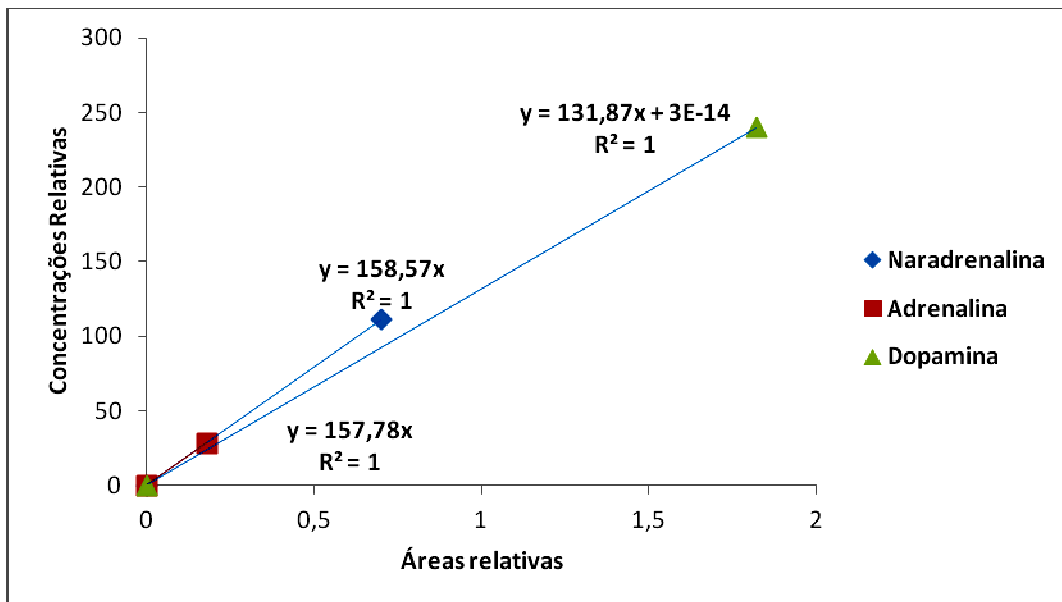


Figura 23 - Curvas de calibração dos compostos noradrenalina, adrenalina e dopamina

Após estabelecidas as curvas de calibração, procedeu-se à injeção de diferentes amostras de urina, devidamente preparadas para a determinação das catecolaminas. Na Figura 22 apresenta-se um dos cromatogramas obtidos e, na Tabela 12, os valores das concentrações das catecolaminas, determinadas a partir dos dados retirados do cromatograma e das curvas de calibração.

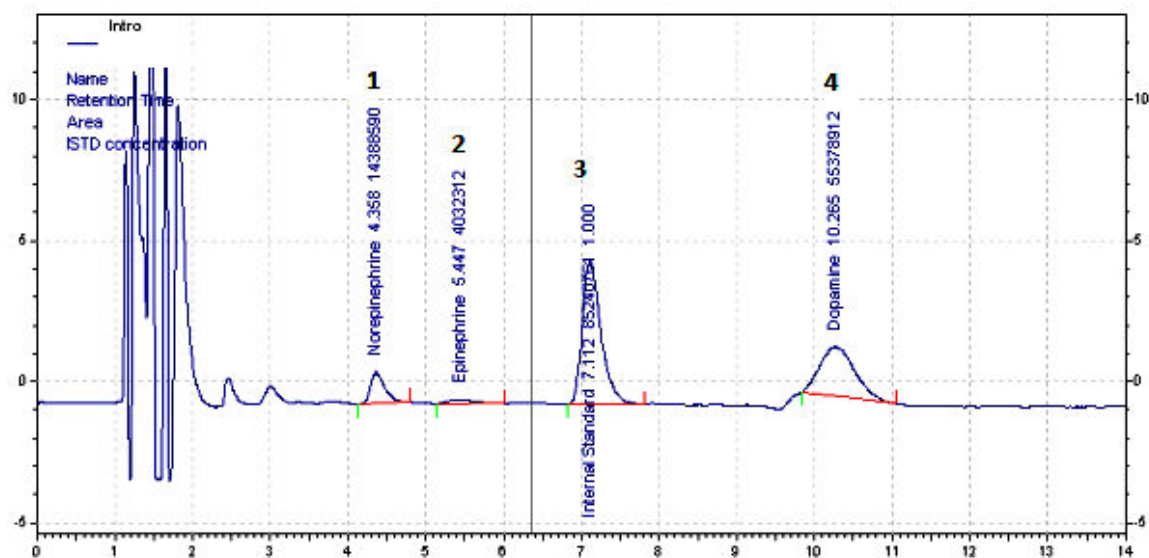


Figura 24 - Cromatograma obtido após a injeção de 20 µL de amostra de urina. Picos: 1 – Noradrenalina, 2 – Adrenalina, 3 – Padrão Interno, 4 – Dopamina.

Tabela 12 - Concentração das catecolaminas na amostra cujo cromatograma é apresentado na Figura 22.

	Áreas	Áreas Relativas	Concentração mg/L
<b>noradrenalina</b>	14388590	0,169	25.094
<b>adrenalina</b>	4032312	0,047	7.195
<b>dopamina</b>	55378912	0,650	86.241
<b>PI</b>	85240764	1	1

Para obter a concentração final, estes valores são multiplicados pelo volume total de urina recolhida durante 24h e, posteriormente, comparados com os valores de referência, apresentados no Anexo I.

Para quantificar a *performance* cromatográfica foi determinado o fator de resolução para a amostra em estudo. Os valores da resolução encontram-se na Tabela 13. Tal como já foi referido anteriormente, uma boa resolução é a que apresenta valores superiores a 1,5. Assim, pode-se concluir que a coluna apresenta uma boa capacidade resolução para todos os compostos analisados.

Tabela 13 - Capacidade de resolução da coluna na separação de catecolaminas.

	<b>noradrenalina</b>	<b>adrenalina</b>	<b>PI</b>	<b>dopamina</b>
<b>t<sub>r</sub></b>	4,358	5,447	7,112	10,265
<b>Largura (W)</b>	0,5	0,7	0,65	1,2
<b>Resolução</b>	–	<b>1,8</b>	<b>2,47</b>	<b>3,41</b>

Na Tabela 14 apresenta-se o valor obtido para o número de pratos teóricos (N) e a altura de cada prato (H) para cada composto.

Tabela 14 - Valores de parâmetros quantitativos da performance cromatográfica na determinação de catecolaminas.

	<b>t<sub>r</sub></b>	<b>W (cm)</b>	<b>K</b>	<b>α</b>	<b>N</b>	<b>H (cm)</b>
<b>Noradrenalina</b>	4,358	0,5	3,36	1,32	1216	0,0123
<b>Adrenalina</b>	5,447	0,7	4,45	1,37	969	0,0155
<b>PI</b>	7,112	0,65	6,11	1,63	1916	0,0078
<b>Dopamina</b>	10,265	1,2	9,97	–	1171	0,0128

t<sub>0</sub> (tempo morto) = 2,997

Comprimento da coluna = 15 cm

Segundo os resultados obtidos, pode-se concluir que a adrenalina, é o composto para o qual a coluna apresenta menor *performance* na separação, uma vez que lhe corresponde o menor valor de N (ou o maior valor de H). Apesar dos valores calculados serem específicos para esta amostra, os valores relativos mantiveram-se constantes em todas as amostras, comprovando que a noradrenalina é o composto separado com maior *performance* e a adrenalina com menor. Quanto aos valores de k, estes estão compreendidos entre 3 e 10, que são valores considerados ideais <sup>[12, 15, 16]</sup> e reveladores de uma boa capacidade de retenção dos analitos pela coluna.

## 4.2.1 Validação de parâmetros analíticos

### 4.2.1.1 Estudo da Seletividade

Para o estudo da seletividade, compararam-se os cromatogramas de um ensaio em branco e do padrão de controlo de qualidade (Figura 23).

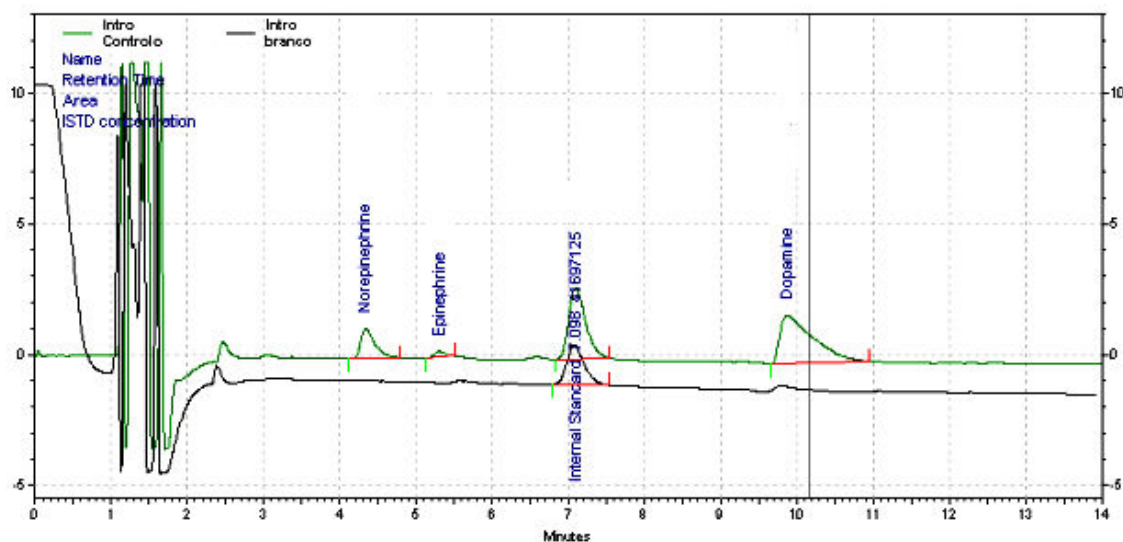


Figura 25 - Sobreposição do cromatograma do ensaio em branco com o cromatograma do padrão de controlo de qualidade na análise de catecolaminas.

Pela análise dos cromatogramas da Figura 23 verifica-se a ausência de picos interferentes, com tempos de retenção idênticos aos do padrão de controlo. Deste modo, é possível concluir que a metodologia, utilizada para a deteção de catecolaminas na urina é seletiva.

### 4.2.1.2 Estudo da Precisão

#### 1) Repetibilidade Instrumental

A precisão do método foi estudada ao nível da repetibilidade instrumental e da precisão intermédia, tal como para o método discutido no subcapítulo em 4.1. Procedeu-se à realização de seis injeções (n=6) da solução padrão de controlo de qualidade nas mesmas

condições cromatográficas e ao longo do mesmo dia de estudo. A Figura 24 apresenta os cromatogramas obtidos.

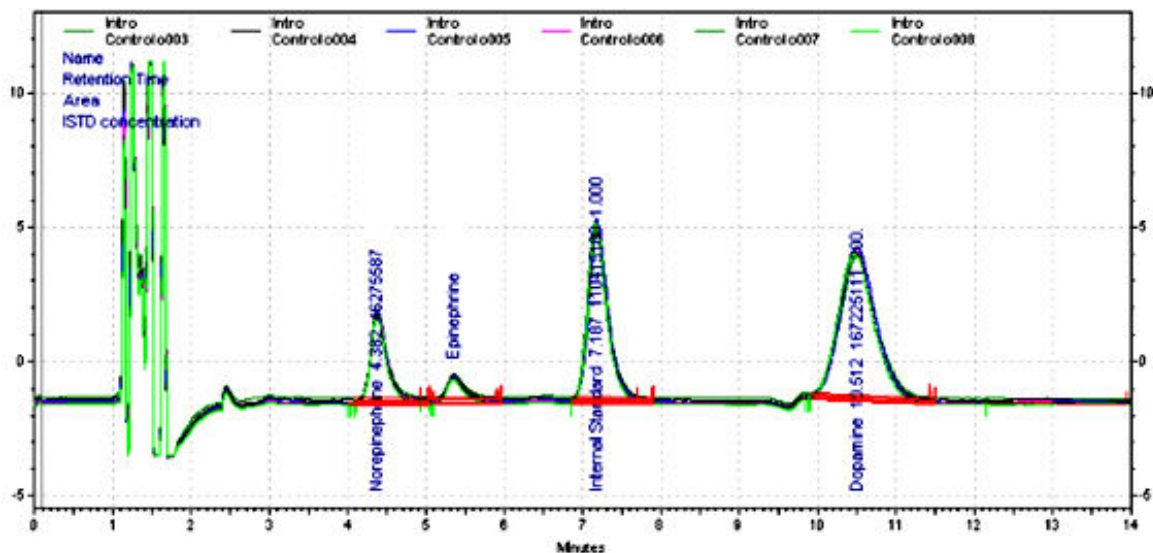


Figura 26 - Avaliação da repetibilidade instrumental para a determinação das catecolaminas.

Para cada cromatograma obtido, procedeu-se à integração das áreas dos picos correspondentes a cada um dos compostos. Com base no valor médio da área de cada pico, e no correspondente desvio padrão, determinaram-se os CV% apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) das áreas dos picos das catecolaminas detetados nos cromatogramas do estudo da repetibilidade instrumental.

	<b>noradrenalina</b>	<b>adrenalina</b>	<b>dopamina</b>
<b>Média (n=6)</b>	47870249,33	14928185,67	175741795
<b>Desvio Padrão</b>	1122784	838883,3	4420597
<b>CV%</b>	<b>2,35</b>	<b>5,62</b>	<b>2,52</b>

Uma vez que todos os valores de CV% são inferiores a 10%, pode concluir-se, também para este método, que a repetibilidade instrumental está dentro de valores aceitáveis.

## 2) Precisão Intermédia

Procedeu-se à realização de 12 injeções (n=12) da solução padrão de controlo de qualidade no HPLC nas mesmas condições cromatográficas, mas em dias diferentes.

Para cada cromatograma obtido, procedeu-se à integração das áreas dos picos correspondentes a cada um dos compostos. Com base no valor médio da área de cada pico, e no correspondente desvio padrão, determinou-se o CV% apresentado na Tabela 16.

Tabela 16 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) das áreas dos picos das catecolaminas detetados nos cromatogramas do estudo da precisão intermédia.

	<b>noradrenalina</b>	<b>adrenalina</b>	<b>dopamina</b>
<b>Média (n=12)</b>	25399628,67	7745833,83	9434981,8
<b>Desvio Padrão</b>	6176459,01	1728193,1	23785734,8
<b>CV (%)</b>	<b>24,3%</b>	<b>22,3%</b>	<b>25,2%</b>

Uma vez que CV% é inferior a 30% <sup>[15]</sup> pode afirmar-se existir uma boa precisão intermédia.

## 4.3 Análise de determinação de metanefrinas na urina

O processo para determinar a concentração de metanefrinas e as curvas de calibração, foi o mesmo utilizado nos métodos abordados em 4.1 e 4.2. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 17 e na Figura 25.

Tabela 17 - Composições e resultados da análise da solução padrão para a determinação das curvas de calibração das metanefrinas (normetanefrina, metanefrina e 3-metoxitiramina).

	<b>Concentração (µg/L)</b>	<b>Concentração Relativa</b>	<b>Áreas</b>	<b>Áreas Relativas</b>
<b>normetanefrina</b>	894	894	90531841	3.424
<b>metanefrina</b>	556	556	43791064	1.656
<b>3-metoxitiramina</b>	225	225	27982654	1.058
<b>PI</b>	1	1	26439204	1

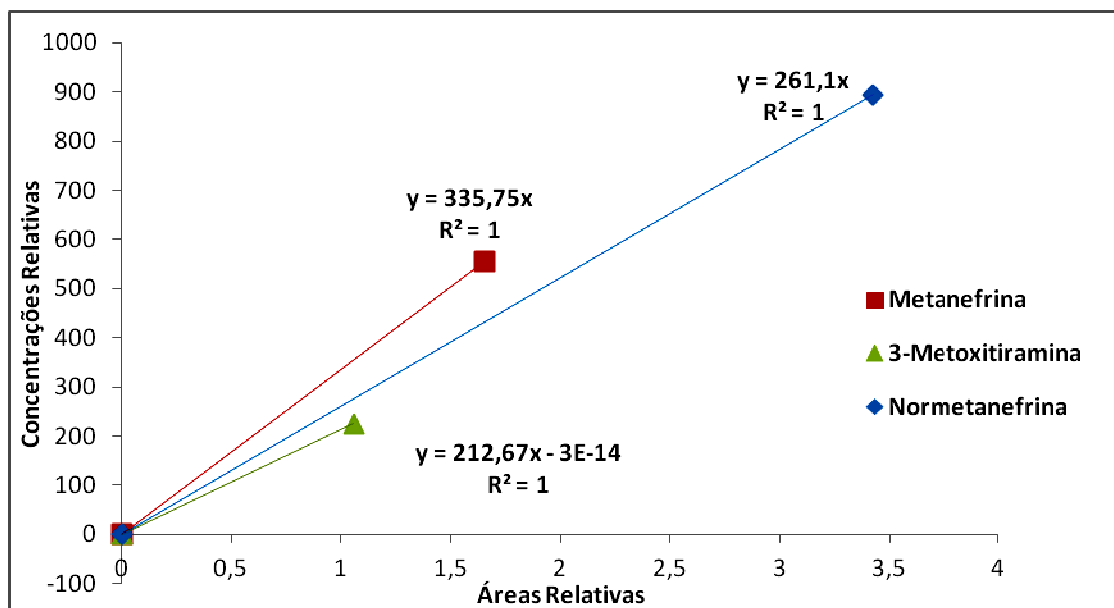


Figura 27 - Curvas de calibração dos compostos normetanefrina, metanefrina e 3-metoxitiramina

Na Figura 26 apresenta-se o cromatograma de uma das várias análises realizadas a amostras de urina para quantificar as metanefrinas, segundo o método anteriormente descrito.

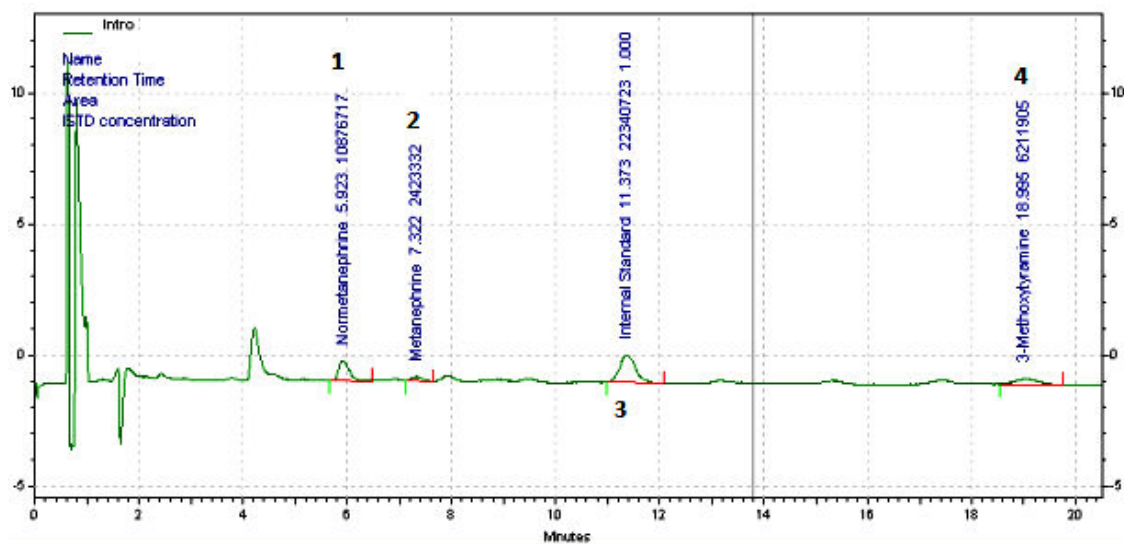


Figura 28 - Cromatograma obtido após a injeção de 20 µL de amostra de urina. Picos: 1 – Normetanefrina, 2 – Metanefrina, 3 – Padrão Interno, 4 – 3-Metoxitiramina.

A partir da integração dos picos do cromatograma da Figura 26, e da leitura das curvas de calibração, determinam-se as concentrações apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18 - Concentração das metanefrinas na amostra cujo cromatograma é apresentado na Figura 26.

	Áreas	Áreas relativas	Concentração mg/L
<b>normetanefrina</b>	10876717	0,48	127.12
<b>metanefrina</b>	2423332	0,108	36.413
<b>3-metoxitiramina</b>	6211905	0,278	59.111
<b>PI</b>	22340723	1	1

Tal como anteriormente referido para os outros compostos analisados, para determinar a concentração final das metanefrinas, os valores apresentados na Tabela 18 têm de ser multiplicados pelo volume de urina recolhido durante 24 horas. Depois devem ser comparados com os valores de referência apresentados no Anexo I, de forma a retirar conclusões sobre o estado clínico do paciente.

Os valores do fator de resolução para a amostra em estudo são apresentados na Tabela 19. Como estes são todos superiores a 1,5, pode-se concluir que a coluna, quando aplicado o método definido, apresenta uma boa capacidade de resolução na separação das metanefrinas.

Tabela 19 - Capacidade de resolução da coluna para a separação das metanefrinas.

	normetanefrina	metanefrina	PI	3-metoxitiramina
<b>t<sub>r</sub></b>	5,923	7,322	11,373	18,995
<b>Largura (W)</b>	0,32	0,4	0,5	0,78
<b>Resolução</b>	–	<b>3,88</b>	<b>9,00</b>	<b>11,91</b>

Para o estudo da eficiência do sistema, foi calculado, como já referido anteriormente, o número de pratos teóricos (N), a altura de cada prato (H) e o valor de K. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Valores de parâmetros quantitativos da performance cromatográfica na determinação de metanefrinas.

	$t_r$	W (cm)	K	$\alpha$	N	H (cm)
<b>normetanefrina</b>	5,923	0,32	4,923	1,28	5482	0,00319
<b>metanefrina</b>	7,322	0,4	6,322	2,11	5362	0,00326
<b>PI</b>	11,373	0,5	10,373	7,62	8279	0,00211
<b>3-metoxitiramina</b>	18,995	0,78	17,995	—	9489	0,00184

$t_0$  (tempo morto) = 4,205

Comprimento da coluna = 175 mm

Verifica-se que o menor valor de N (maior valor de H) corresponde à metanefrina. Pode-se, assim, concluir que a coluna apresenta uma resposta menos eficiente na separação deste componente do que na separação dos outros componentes. Quanto aos valores de k, são todos aceitáveis, pois consideram-se aceitáveis valores entre 1 e 20<sup>[12, 15, 16]</sup>.

### 4.3.1 Validação de parâmetros analíticos

#### 4.3.1.1 Estudo da Seletividade

Para efetuar o estudo sobre a seletividade, fez-se o mesmo procedimento utilizado nos métodos anteriores. Na Figura 27 comparam-se os cromatogramas de um ensaio em branco e do padrão de controlo de qualidade, tendo-se verificado a ausência de picos de interferência nos tempos de retenção do padrão de controlo de qualidade. Deste modo, é possível concluir que esta metodologia de HPLC com detetor eletroquímico é seletiva para a deteção de metanefrinas na urina.

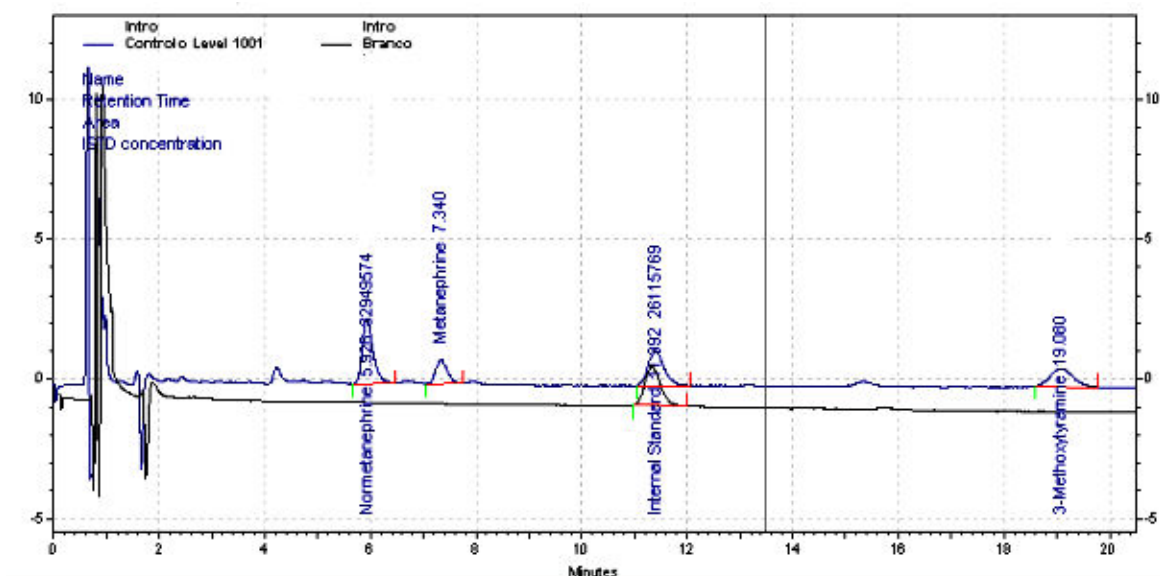


Figura 29 - Sobreposição do cromatograma do ensaio em branco com o cromatograma do padrão de controlo de qualidade na análise de metanefrinas.

#### 4.3.1.2 Estudo da Precisão

##### 1) Repetibilidade Instrumental

Procedeu-se à realização de seis injeções (n=6) da solução padrão de controlo de qualidade, nas mesmas condições cromatográficas, e ao longo do mesmo dia de estudo. A Figura 28 apresenta os cromatogramas obtidos.

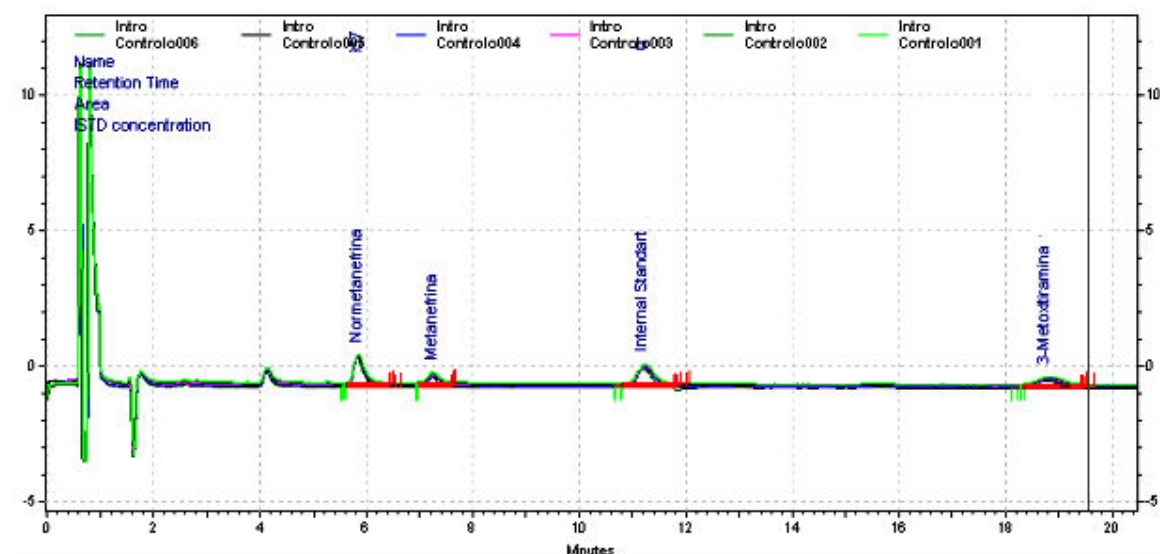


Figura 30 - Avaliação da repetibilidade instrumental da Solução Padrão de Controlo de Qualidade para a determinação das metanefrinas.

Com base no valor médio da área de cada pico, e no correspondente desvio padrão, determinaram-se os valores de CV%, apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) das áreas dos picos das metanefrinas detetados nos cromatogramas do estudo da repetibilidade instrumental.

	<b>normetanefrina</b>	<b>metanefrina</b>	<b>3-metoxitiramina</b>
<b>Média (n=6)</b>	15329386,50	5819415,83	9120520,83
<b>Desvio Padrão</b>	197687,71	195426,66	418904,72
<b>CV (%)</b>	<b>1,29</b>	<b>3,36</b>	<b>4,59</b>

À semelhança do verificado para os outros métodos, pode-se concluir que os valores de CV% para repetibilidade instrumental são valores aceitáveis, uma vez que correspondem a valores inferiores a 10%.

## 2) Precisão Intermédia

Procedeu-se à realização de 8 injeções (n=8) da solução padrão de controlo de qualidade nas mesmas condições cromatográficas, mas em dias diferentes. Com base no valor médio da área de cada pico, e no correspondente desvio padrão, determinaram-se os valores de CV% apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) das áreas dos picos das metanefrinas detetados nos cromatogramas do estudo da precisão intermédia.

	<b>normetanefrina</b>	<b>metanefrina</b>	<b>3-metoxitiramina</b>
<b>Média (n=8)</b>	27800165	11814247	16505680
<b>Desvio Padrão</b>	1567372,46	3138916,12	4735726,43
<b>CV (%)</b>	<b>5,6%</b>	<b>19%</b>	<b>29%</b>

Pode-se concluir que os valores de CV% para precisão intermédia são valores aceitáveis, uma vez que correspondem a valores inferiores a 30%.

#### 4.4 Análise do Controlo Externo - RIQAS

O Controlo Externo é realizado de 15 em 15 dias e tem por objetivo avaliar a qualidade do método analítico utilizado. O método alvo é, neste caso, o da determinação e quantificação de catecolaminas urinárias e dos seus metabolitos utilizando para tal, o HPLC com detetor eletroquímico.

As soluções utilizadas no controlo externo são preparadas de modo igual ao das amostras de urina analisadas. Estas soluções possuem concentrações de catecolaminas, de VMA e de Metanefrina determinadas pelo laboratório que as prepara (laboratório avaliador) e desconhecidas do Laboratório de Análises Clínicas Fernanda Galo, ou seja, é uma prova cega.

Os resultados obtidos são enviados para o laboratório avaliador e comparados com os valores de referência, aqui designados como valores reais. Os resultados da avaliação são apresentados sob a forma de relatório, como o que consta do Anexo II.

A Tabela 23 apresenta os resultados da análise à solução do controlo externo segundo o método analítico utilizado para determinar o VMA. Neste caso, o valor enviado para o laboratório avaliador é o da concentração de VMA, que, como já demonstrado pelo estudo de *performance* cromatográfica, é o composto para o qual a coluna apresenta menor capacidade de separação (menor valor de N e maior valor de H) e, por isso, o que poderá gerar mais erros de leitura.

Tabela 23 – Resultados do controlo externo relativos ao composto VMA

	<b>RIQAS 1</b> mg/l	<b>RIQAS 2</b> mg/l	<b>RIQAS 3</b> mg/l	<b>RIQAS 4</b> mg/l
<b>Valor do Lab Fernanda Galo</b>	25,420	13,721	5,815	98,365
<b>Valor Real</b>	22,277	16,916	5,795	30

Os resultados apresentados, correspondem a 4 controlos feitos num espaçamento de 15 dias. Como se constata, a amostra 4 (RIQAS 4), apresenta um valor muito superior ao valor real. Quando o desvio é significativo, o laboratório avaliador rejeita a análise e procede-se a

um estudo para averiguar as causas desse desvio. No caso do RIQAS 4 da Tabela 23, acabou por se verificar que tinha sido muito difícil identificar os extremos do pico do VMA. Recorde-se, mais uma vez, que o VMA é o composto com o menor valor de N (maior valor de H), precisamente porque o seu pico no cromatograma é muito “largo”, sendo difícil de delimitar.

As Tabelas 24, 25 e 26 apresentam os valores do controlo externo para o método de deteção e quantificação das catecolaminas. Neste controlo são enviados para o laboratório os valores de concentração dos três compostos presentes. Os resultados obtidos para as catecolaminas foram satisfatórios nas três análises de controlo externo.

Tabela 24 – Resultados do controlo externo relativos ao composto noradrenalina.

	<b>noradrenalina</b>		
	<b>RIQAS 1</b>	<b>RIQAS 2</b>	<b>RIQAS 3</b>
	<b>ug/l</b>	<b>ug/l</b>	<b>ug/l</b>
<b>Valor do Lab Fernanda Galo</b>	244,338	175,843	45,350
<b>Valor Real</b>	207,521	149,011	44,255

Tabela 25 – Resultados do controlo externo relativos ao composto adrenalina.

	<b>adrenalina</b>		
	<b>RIQAS 1</b>	<b>RIQAS 2</b>	<b>RIQAS 3</b>
	<b>ug/l</b>	<b>ug/l</b>	<b>ug/l</b>
<b>Valor do Lab Fernanda Galo</b>	15,280	42,126	48,192
<b>Valor Real</b>	12,872	37,847	48,571

Tabela 26 – Resultados do controlo externo relativos ao composto dopamina.

	<b>dopamina</b>		
	<b>RIQAS 1</b> <b>ug/l</b>	<b>RIQAS 2</b> <b>ug/l</b>	<b>RIQAS 3</b> <b>ug/l</b>
<b>Valor do Lab Fernanda Galo</b>	264,731	186,446	54,279
<b>Valor Real</b>	224,459	182,961	66,866

A Tabela 27 apresenta os valores do controlo externo para o método de deteção e quantificação das metanefrinas. Neste controlo só é enviado para o laboratório avaliador o valor do composto metanefrina, que é aquele que a coluna tem mais dificuldade em separar (valor de N baixo, ou valor de H elevado) e, logo, o que poderá suscitar mais erros de quantificação.

Tabela 27 – Resultados do controlo externo relativos ao composto metanefrina

	<b>metanefrina</b>		
	<b>RIQAS 1</b> <b>ug/l</b>	<b>RIQAS 2</b> <b>ug/l</b>	<b>RIQAS 3</b> <b>ug/l</b>
<b>Valor do Lab Fernanda Galo</b>	41,457	301,096	330,681
<b>Valor Real</b>	55,462	307,068	347,659

Mais uma vez, os bons resultados obtidos demonstram que o método de deteção e quantificação de metanefrinas é adequado à sua finalidade.

## 5. Conclusões

O estágio curricular no Laboratório de Análises Clínicas Fernanda Galo decorreu como previsto, ou seja, foram alcançados os objetivos de implementação dos métodos analíticos, utilizando HPLC com deteção eletroquímica, desenvolvidos para a quantificação de catecolaminas e seus metabolitos em urina.

O trabalho envolveu a realização de estudos de *performance* cromatográfica aos três métodos utilizados (método para quantificação de VMA, HVA e 5-HIAA, método para quantificação de catecolaminas e método para quantificação de metanefrinas), a validação de parâmetros analíticos, através da realização de estudos de seletividade e estudos de precisão e, ainda, avaliações de controlo externo - RIQAS. Foram, ainda, realizadas várias análises, envolvendo estes métodos, no âmbito da atividade prestação de serviços do Laboratório de Análises Clínicas Fernanda Galo.

Conclui-se que todos os métodos permitem alcançar uma boa *performance* cromatográfica na deteção e quantificação dos compostos desejados, pois todos apresentam valores de  $R_s$  superior a 1,5 e um valor do fator de retenção aceitável ( $1 < k < 20$ ). Ainda no âmbito do estudo de *performance* cromatográfica, foi determinado o número de pratos teóricos (N) e a altura de cada prato (H) para cada composto, tendo-se verificado que aos picos com “pior qualidade” correspondia, como esperado, um valor de N baixo e, conseqüentemente, um valor de H elevado. Assim, o VMA, no método para quantificação de VMA, HVA e 5-HIAA, a adrenalina, no método para quantificação de catecolaminas e a metanefrina, no método para quantificação das metanefrinas, são os compostos com o menor valor de N (maior valor de H), dentro do conjunto dos compostos quantificados por cada um desses métodos.

Relativamente à validação dos métodos, mais concretamente, no que diz respeito à seletividade, os estudos realizados permitem concluir que a metodologia seguida, envolvendo HPLC com deteção eletroquímica, é seletiva para determinar catecolaminas e seus metabolitos na urina. Os estudos de precisão, que envolveram a determinação do coeficiente de variação (CV%) para a repetibilidade instrumental e para a precisão intermédia, permitem concluir que os métodos são precisos, uma vez que os valores de

CV% são todos inferiores a 10%, para a repetibilidade instrumental, e inferiores a 30%, para a precisão intermédia.

Por fim, pode concluir-se, relativamente à exatidão dos métodos, que estes revelam um excelente desempenho nas avaliações de controlo externo - RIQAS, apresentando apenas um resultado de concentração de VMA muito afastado do valor de referência estabelecido pelo laboratório avaliador, contudo a causa foi perfeitamente identificada.

## 6. Bibliografia

- [1] Eisenhofer, G.; Goldstein, D. S.; Kopin, I. J.; 2004 “**Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implication for Physiology and Medicine**”; ThePharmacological Reviews; Vol 56 nº3; pp 331-49.
- [2] Litwack, G.; Norm, A. W.; 1997 “**Hormones**”; 2ª Ed. Academic Press S. Diego, USA.
- [3] Salgado, J. M. R.; 2007, “**Mecanismos de regulação de catecolaminas nas células cromafins: papel da interleucina 1-β e do neuropeptídeo Y**”; Universidade de Coimbra
- [4] Hoffman, B. B. and Taylor, P. 2001 “**Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems, In Goodman & Gilman`s: the Pharmacological Basis of Therapeutics**”; pp 115-153, McGraw-Hill, New York
- [5] Silva, R. S. A.; 2007 “**O Stress Oxidativo na Toxicidade das Catecolaminas**”; Universidade do Porto.
- [6] Ashwood, E. R.; Bruns, D. E.; Burtis, C. A.; 2005 “**Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**”, capter 12 – Catecholamines.
- [7] Armstrong, A.; Armstrong, E. J.; Golan, D. E.; Tashjian Jr, A. H.; 2009 “**Princípios de Farmacologia – A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**”; capítulo 12 pp 167-69, 2ª ed; Guanabara Koogan S.A;.
- [8] Izquierd, I.; Kapczinski, F.; Quevedo, J.; 2011 **Bases Biológicas dos Transtornos psiquiátricos: uma abordagem transnacional**”; pp. 40, 41, 3ª ed, Porto Alegre, Artmed.

- [9] Fernstrom, J. D.; Fernstrom, M. H.; Tyrosine, 2007 **“Phenylalanine and Catecholamine, Synthesis and Function in the Brain”**; pp 1539 – 1547 The Journal of Nutrition, vol 137 n° 6.
- [10] Neto, F. R. A.; Nunes, D. S. S.; 2003 **“Cromatografia - Princípios básicos e técnicas afins; editora Interciência”**; Rio de Janeiro
- [11] Pires, S. R. R.; 2009 **“Desenvolvimento de novos métodos analíticos para controle da qualidade de alimentos – Análise de micotoxinas”**; Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Lisboa.
- [12] Gomes, S. M. C.; 2010 **“Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Eletroquímica”**; Universidade de Coimbra.
- [13] ISO/TS 13530. 2009; **“Water quality - guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis”**; Switzerland, 1-38.
- [14] EURACHEM/CITAC 2000. Guide CG 4: **“Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement”**.
- [15] Ferreira, K. S. T., 2012 **“Validação de métodos de análises cromatográficos: determinação de HCl”**, Universidade de Coimbra.
- [16] Coulter, B, 2001 **“HPLC User’s Guide”**, For 32 Karat Software Version 5, Beckman Coulter, Printed in USA.
- [17] Castro, M; 2008 **“Análise Instrumental – Cromatografia Líquida de Alta Resolução”**; Universidade de Santa Catarina.
- [18] Sequeira, C. B., 2012 **“Análise de açúcares e ácidos orgânicos em sumos comerciais: aplicação de HPLC-SEC-UV-IR e língua eletrónica”** Instituto Politécnico de Bragança.

- [19] Ferro, S. A., 2010 “**Validação de Métodos Cromatográficos para Análise de Medicamentos**”; Universidade de Aveiro.
- [20] NP EN ISSO/IEC 17025:2005 – “**Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração**”.
- [21] IPAC 2010 *OGC001: Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025*.
- [22] Lança, F.M; 2004 “**Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**”; volume 6.
- [23] Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C., 2004, “**Validação de métodos cromatográficos e electroforéticos**”, pp.771-780 *Química Nova*, 27.
- [24] Silva, R. S. A., 2006, “**Desenvolvimento de uma metodologia de HPLC para a deteção de adutos das catecolaminas com GSH em amostras biológicas**”, Universidade de Aveiro.
- [25] Chiaradia, M. C., 2009, “**Desenvolvimento, validação e aplicação de métodos para análise multirresidual de agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM e CLUE-DAD**”, Universidade de Campinas.
- [26] Freitas, A. A. R.; 2008, “**Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a deteção e quantificação da Amoxicilina em músculo, por LC-MS/MS**”; Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa.
- [27] Ferreira, C., 2011, “**Caraterização por GC-MS de glúcidos derivatização assistida por micro-ondas**”, Universidade de Coimbra.
- [28] Orlando, R. M. ET AL, 2009, “**Pré-Tratamento de Amostras**”, Universidade de Campinas.



## **Webgrafia**

- [29] [www.fernandagalo.com/](http://www.fernandagalo.com/), consultado a 18 de Fevereiro de 2013.
- [30] <http://fernandagalo.pt>, consultado a 18 de Fevereiro de 2013.
- [31] [www.labvirtual.eq.uc.pt](http://www.labvirtual.eq.uc.pt), consultado a 5 de Março de 2013.
- [32] [www.ebah.com.br](http://www.ebah.com.br), consultado a 5 de Março de 2013.
- [33] [www.biomedicinabrasil.com](http://www.biomedicinabrasil.com), consultado a 3 de Abril.
- [34] [www.hitachi-hitec.com](http://www.hitachi-hitec.com), consultado a 11 de Fevereiro
- [35] [www.recipe.de](http://www.recipe.de), consultado a 30 de Abril
- [36] [www.appalab.com.br](http://www.appalab.com.br), consultado a 11 de Fevereiro.
- [37] [www.rigas.com](http://www.rigas.com), consultado a 8 de Abril de 2013.



## Anexo I – Valores de referência para os compostos analisados

**Tabela:** Valores de referência para as **Catecolaminas** na urina de 24h. <sup>[35]</sup>

	Valores de referência [ $\mu\text{g}/24\text{h}$ urina]
<b>Adrenalina</b>	4 – 20
<b>Noradrenalina</b>	23 – 105
<b>Dopamina</b>	190 – 450

**Tabela:** Valores de referência para **Metanefrinas** na urina de 24h. <sup>[35]</sup>

<b>Metanefrina</b>	$\mu\text{mol}/24\text{h}$	$\mu\text{g}/24\text{h}$
Masculino	1.9	374.7
Feminino	1.4	276.1
<b>Normetanefrina</b>		
Masculino		
18 – 40 anos	3.6	659.5
40 – 60 anos	4.25	778.6
>60 anos	4.5	824.4
Feminino		
18 – 40 anos	3.0	549.6
40 – 60 anos	3.45	632.0
>60 anos	3.65	668.7
<b>3 – Metoxitiramina</b>		
Masculino/Feminino		
18 – 40 anos	2.75	459.8
40 – 60 anos	2.55	426.4
>60 anos	2.3	384.6

**Tabela:** Valores de referência de VMA na urina de 24h para criança. <sup>[35]</sup>

Idade (anos)	Valores de Referência [mg/g creatinina]	
	VMA	HVA
0 – 1	18.8	32.6
2 – 4	11.0	22.0
5 – 9	8.3	15.1
10 - 19	8.3	12.8
>19	6.0	7.6

**Tabela:** Valores de referência para a urina de 24h. <sup>[35]</sup>

	Valores de referência [mg/24h]
<b>VMA</b>	1.6 – 7.3
<b>HVA</b>	1.82 – 6.92
<b>5-HIAA</b>	2 – 9

## **Anexo 2 – Relatório do controlo externo – RIQAS**

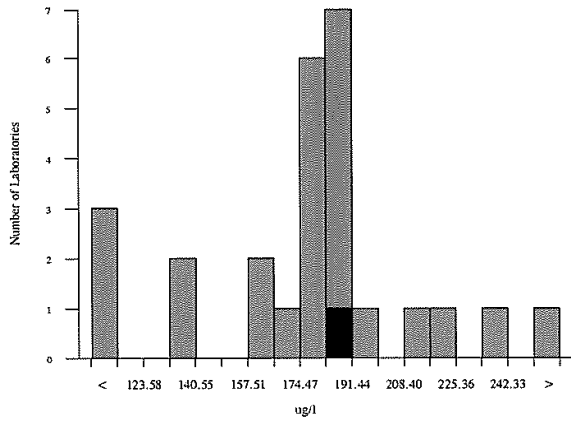


### Dopamine, ug/l

	N	Mean	CV%	U <sub>m</sub>	SDPA	Exc.
All Methods	22	182.961	12.4	6.03	34.15	4
HPLC	22	182.961	12.4	6.03	34.15	4
Beckman Coulter DU Series	1	186.446	0.0	0.00	N/A	0

▲ Your Result	186.446	SDI	0.10
		RMSDI	0.56
■ Mean for Comparison	182.961	TS	120
		RMTS	60
		%DEV	1.9
		RM%DEV	9.3

Acceptable limits derived from Biological Variation	N/A
Acceptable limits of performance for RIQAS	30.70%



Method	N	Mean	CV%	U <sub>m</sub>
HPLC	22	182.961	12.4	6.03

