

UTILIZAÇÃO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

João Gabriel Roque de Jesus¹

Claudia Katarine Andrade de Carvalho de Souza²

Veronica de Lourdes Sierpe Jeraldo³

Biomedicina



cadernos de
graduação

ciências biológicas e da saúde

ISSN IMPRESSO 1980-1769

ISSN ELETRÔNICO 2316-3151

RESUMO

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) se apresenta como mais uma técnica utilizada no diagnóstico laboratorial, realizando a separação dos vários componentes de uma mistura de substâncias, visando a identificação, quantificação e/ou purificação. No âmbito das análises clínicas, é uma técnica que utiliza principalmente detectores de Ultravioleta-Visível (UV-VIS) e Arranjo de diodos (DAD). Possui alta sensibilidade e especificidade, sendo recomendada pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) para investigação de hemoglobinopatias em recém-nascidos, além de ser utilizado na fragmentação e determinação de substâncias consideradas tóxicas à saúde. Este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre a utilização da cromatografia líquida nas análises clínicas com foco na pesquisa de hemoglobinopatias e avaliação de micropoluentes. Para a sua realização, foram realizadas pesquisas bibliográficas, utilizando as palavras-chave “diagnostico” e “cromatografia líquida” em bases de dados como Pubmed e Scielo. O uso da HPLC-DAD e UV-VIS na triagem das variantes de hemoglobinas é mais benéfico quando comparado ao método eletroforético por apresentar menor custo de análise e maior especificidade. Bem como a separação cromatográfica de micropoluentes como por exemplo o surfactante nonilfeonol e os fármacos em geral, em ambos foram obtidos resultados rápidos e eficazes. Dessa forma, a HPLC pode ser considerada uma técnica ideal para determinação de hemoglobinopatias e micropoluentes.

PALAVRAS-CHAVE

Cromatografia Líquida. Análise. Hemoglobinopatias. Micropoluentes.

ABSTRACT

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is presented as another technique used in laboratory diagnosis, performing the separation of the various components of a mixture of substances aiming at the identification, quantification and/or purification. In the scope of clinical analysis, it is a technique that mainly uses Ultraviolet-Visible (UV-VIS) and Diode Array (DAD) detectors. It has high sensitivity and specificity, being recommended by the National Neonatal Screening Program (PNTN) for the investigation of hemoglobinopathies in newborns, in addition to being used in the fragmentation and determination of substances considered toxic to health. This work aimed to carry out a bibliographic survey on the use of liquid chromatography in clinical analyzes with a focus on the research of hemoglobinopathies and evaluation of micropollutants. For its accomplishment, bibliographic searches were carried out using the keywords "diagnostic" and "liquid chromatography" in databases such as Pubmed and Scielo. The use of HPLC-DAD and UV-VIS in the screening of hemoglobin variants is more beneficial when compared to the electrophoretic method because of its lower cost of analysis and greater specificity. As well as the chromatographic separation of micropollutants such as nonylphenoxy surfactant and pharmaceuticals in general, fast and effective results were obtained in both. Thus, HPLC can be considered an ideal technique for the determination of hemoglobinopathies and micropollutants.

KEYWORDS

Liquid Chromatography. Analysis. Hemoglobinopathies. Micropollutants.

1 INTRODUÇÃO

Existem diversas variantes dentro da HPLC, possibilitando uma alta multifuncionalidade no momento da análise, o que possibilita a pesquisa de diversos compostos (PEREZ, 2002). Por esse motivo a técnica do HPLC vem se tornando uma opção importante para realizar separação e avaliação de diversas substâncias (VOGUEL; AFONSO, 2015).

O método de diagnóstico realizado pelo equipamento de HPLC proporciona a detecção de baixas concentrações de elementos ou substâncias, sendo considerada, então, uma técnica de alta especificidade e sensibilidade (CATTANEO *et al.*, 2016). É um procedimento vantajoso, pois pode ser utilizado em análises de compostos não voláteis ou instáveis termicamente no qual a cromatografia a gás não poderia ser a técnica mais adequada (FERREIRA, 2014). Nas análises clínicas, a HPLC pode ser aplicada na dosagem de 25-Hidróxi-vitamina D, hemoglobina glicada e de hormônios esteroides, por exemplo, além da detecção de metabólitos, proteínas, aminoácidos, dentre outros (MORALES *et al.*, 2015).

O emprego de separação cromatográfica, utilizando HPLC é aplicado em diferentes tipos de laboratórios para esclarecer os complexos problemas da química, bioquímica, toxicologia, dentre outros, tanto na pesquisa como nas análises clínicas e em diversas práticas industriais. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi realizar um levantamento bibliográfico sobre a utilização do método de análise conhecido como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) na prática laboratorial tanto nas análises clínicas como ambientais.

2 METODOLOGIA

Este trabalho foi desenvolvido com base na pesquisa bibliográfica do uso da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, tanto em amostras biológicas como em amostras não biológicas, com ênfase na área hematológica e de análises ambientais.

Para a sua realização, foram feitas pesquisas bibliográficas, utilizando os descritores em Ciências da Saúde (DECS): cromatografia líquida, análise e diagnóstico em bases de dados como *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO), Literatura Latino-Americana em Ciências de Saúde (LILACS) e Pubmed; após a avaliação, foi realizado uma triagem com os trabalhos mais relevantes, onde critérios como o desenvolvimento e aplicabilidade da técnica, ano de publicação e abordagem objetiva das temáticas a serem discutidas foram priorizados.

3 DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINOPATIAS

Hemoglobinas são proteínas presentes nos glóbulos vermelhos responsáveis pelo transporte de oxigênio e por produzir a coloração vermelha do sangue. São formadas por 4 subunidades proteicas, constituídas por duas cadeias polipeptídicas e duas do tipo β , possuindo como principais tipos a Hb A1, Hb A2 e Hb fetal (BATISTA *et al.*, 2020). Já as hemoglobinopatias são um grupo de doenças genéticas que afetam os genes responsáveis pela síntese da hemoglobina, ocasionando alterações na funcionalidade ou vida útil das hemácias (HE *et al.*, 2019). Por possuírem uma diversidade clínica e laboratorial extensa, são classificadas como problemas de saúde pública em diversos países, incluindo o Brasil (MELO *et al.*, 2008).

A prevalência de casos de hemoglobinopatias se aproxima a 5% na população mundial; dentre elas, se destaca a anemia falciforme, patologia que ocasiona falcização dos eritrócitos (LOBO *et al.*, 2003) caracterizada pela hemólise e vaso-oclusão do sistema sanguíneo, que pode levar a um quadro de isquemia tecidual e possível perda funcional de tecidos e órgãos (TELES *et al.*, 2017).

Atualmente, a técnica de HPLC com detector de arranjo de diodo (DAD), vem sendo utilizada no diagnóstico de hemoglobinopatias devido a sua maior especificidade quando comparado ao método de eletroforese. Permite determinar as substâncias presentes na amostra com diferentes comprimentos de onda durante a análise cromatográfica. Apresentando sistema automatizado e maior velocidade na liberação dos resultados (SO-

ARES *et al.*, 2017). Além disso, a HPLC – DAD é um método sensível que possui limiares de determinação aceitáveis, o que permite o seu uso na rotina de análise com controle de qualidade, sendo apto, então, de reconhecer e distinguir várias hemoglobinas variantes.

Dentre as vantagens da utilização da HPLC em programas de prevenção das hemoglobinopatias, pode-se citar a rapidez nas análises, utilizando pouca quantidade de amostra, a análise de uma grande quantidade de amostras em um curto período de tempo, a detecção de uma gama de variantes de hemoglobinas em um único ensaio de triagem e o fornecimento de resultados semiquantitativos, com custo por teste comparável a outros métodos laboratoriais que trabalham com grandes volumes de amostras (MELO *et al.*, 2008; AL-SAADI *et al.*, 2020).

Tal característica é evidente no estudo de Soares e colaboradores (2017), onde foi pesquisada a presença de hemoglobinas variantes em 15 comunidades quilombolas do estado do Piauí, Brasil, no qual foi constatado que o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência possui maior acurácia que os procedimentos eletroforéticos, devido principalmente à facilidade de manuseio do equipamento e pela rapidez em obter resultados. Por outro lado, Al-Saadi e outros autores (2020) ratificaram que a HPLC consegue identificar vários distúrbios estruturais das hemoglobinas, além de hemoglobinopatias raras que não podem ser reconhecidas e diagnosticadas por eletroforese de Hb, o que pode caracterizar a HPLC como padrão ouro no diagnóstico destas patologias.

Estabelecida pelo sistema automatizado Variant (Bio-Rad), a HPLC possibilita a quantificação de hemoglobina A2, hemoglobina F, hemoglobina A, hemoglobina S, hemoglobina C e triagem para demais variantes, sendo um sistema altamente reprodutível, tornando-se uma excelente tecnologia de pesquisa e diagnóstico (LOBO *et al.*, 2003). Nesse tipo de sistema de troca catiônica, a separação e elucidação das porcentagens relativas de variantes de hemoglobina são feitas a partir de amostras de sangue (MISHRA *et al.*, 2018).

No sistema automatizado é utilizado um mini cartucho preenchido com material de polímero de troca catiônica – no caso de amostras neonatais colhidas em papel filtro, deve-se perfurar manchas de sangue de 3mm do papel de filtro e as eliminar com 0,5mL de água destilada por 20min. Introduce-se, então, a amostra na corrente de fluxo a uma taxa controlada de 2mL/min. Cada amostra é inserida na corrente de fluxo por meio de uma sonda automática; à medida que a concentração do composto aumenta, as hemoglobinas mais fortemente retidas eluem do cartucho.

Deve-se levar em consideração que cada tipo de hemoglobina tem um tempo de retenção característico e que as mudanças na absorbância podem ser medidas usando um fotômetro de filtro de comprimento de onda duplo (CAMPBELL *et al.*, 1999). É válido ressaltar que o processo de retenção de frações normais de hemoglobina auxilia na padronização da eluição de formas variantes, tornando-se um modo complementar de identificação. Contudo, a presença de pequenas alterações na duração da eluição pode retirar a hemoglobina variante da sua classificação exata (FERNANDES; DOMINGOS, 2006, AL-SAADI *et al.*, 2020).

A clareza do sistema automatizado com elaboração da amostra internamente, alta resolução, tempo de teste rápido e mensuração exata das frações de hemoglo-

binas torna esta metodologia ideal para a rotina de laboratório clínico (ZANATTA; MANFREDINI, 2009).

4 AVALIAÇÃO DE MICROPOLUENTES

Micropoluentes são compostos químicos ou biológicos presentes em uma variedade de produtos comerciais, como medicamentos e embalagens alimentícias, que apresentam potencial risco a saúde humana e ambiental. Também podem ser, por exemplo, microrganismos encontrados no ambiente, que não passam periodicamente por monitoramento ou que ainda não possuem legislação regulatória específica, mas que têm a capacidade de prejudicar a saúde humana, também o ecossistema (FARRÉ *et al.*, 2008). Dentre os possíveis malefícios consequentes dos poluentes orgânicos emergentes, podem-se citar disfunções no sistema endócrino e reprodutivo dos seres humanos, abortos espontâneos, distúrbios metabólicos e neoplasias malignas, além da indução à resistência de algumas bactérias (FONTENELE *et al.*, 2010).

Dos analitos existentes, os que mais se destacam são os princípios ativos de fármacos, elementos que podem ser classificados como interferentes endócrinos e elementos presentes em produtos de uso individual (VIEIRA *et al.*, 2007). Estes ainda despertam um estado de alerta entre os cientistas, visto que nem mesmo as estações mais modernas de tratamento de efluentes são capazes de eliminá-los completamente, em especial quando apresentam alta solubilidade em água ou são pouco degradáveis, como os fármacos polares (BITTENCOURT *et al.*, 2016). Outro poluente relevante é o nonilfenol, que está presente em diversas fontes comumente utilizadas e descartadas de forma inadequada no ambiente como pesticidas, tintas, lubrificantes, cremes dérmicos, detergentes domésticos, dentre outros, são alguns dos exemplos (SANTOS *et al.*, 2007).

Devido a variação que essas substâncias apresentam em relação a volatilidade e instabilidade térmica, as metodologias baseadas em HPLC com detector de Ultravioleta-Visível e arranjo diodos (UV-VIS / DAD) são consideradas as mais adequadas para a análise dos poluentes orgânicos emergentes (GIGER, 2009). Dentre as vantagens para a separação e estudo desses poluentes pelo método de HPLC UV-VIS/DAD, pode-se citar o alto poder de determinação dos analitos sem a necessidade do uso de solventes, além da determinação de antibióticos em amostras de leite e anti-inflamatórios esteroidais em urina (SILVA, 2011).

A fase estacionária do tipo reversa (RP, *reversed phase*) é a mais utilizada, tratando-se da separação realizada pelo método, sendo composta com base de sílica com grupos C_{18} (octadesilsilano quimicamente ligado); para β -bloqueadores e antibióticos como tetraciclinas, penicilinas, sulfonamidas e macrolídeos, fases estacionárias com grupos C_8 podem ser utilizadas devido a menor polaridade deste grupo. Já na fase móvel, são utilizadas misturas de metanol: água (MeOH:H₂O) ou acetonitrila: água (ACN:H₂O) com ajuste da força cromatográfica e seletividade da fase móvel até que se obtenha resolução suficiente para a separação de todos os picos cromatográficos no mínimo tempo de análise (SILVA; COLLINS 2011).

Em estudo sobre a utilização da HPLC na bioanálise de fármacos, envolvendo a separação de lidocaína e monoetil glicinexilidida, seu metabólito, em amostras de plasma obtidas a partir de mulheres grávidas com diabetes mellitus gestacional, foi observado por Manousi (2020) que o tempo de separação cromatográfica da lidocaína e mais dezessete outras drogas potencialmente coadministradas foi de 15 minutos, o que caracteriza a rapidez como uma das principais vantagens do método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em análises laboratoriais.

Ademais, Silva (2011) concluiu que a HPLC é uma das técnicas de separação de grande destaque dentro da química analítica e da ciência ambiental, podendo ser utilizada como um excelente instrumento para os mais variados tipos de estudos.

5 CONCLUSÃO

Diante do que foi exposto, pode-se concluir que a Cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de diagnóstico laboratorial eficiente e recomendada para alguns tipos de análise; tal fato ratifica-se devido à alta especificidade/sensibilidade e do grande número de amostras que podem ser processadas pelo equipamento, com resultados de alta fidedignidade diagnóstica.

No cenário atual, não existem muitos trabalhos voltados a metodologia em uso no âmbito laboratorial, todavia, este método encontra-se fortemente presente nas práticas de pesquisas acadêmicas. Visto isso, é preciso explicar mais sobre a HPLC a fim de que esta seja melhor disseminada e seus benefícios possam ser utilizados e explorados com mais eficiência.

REFERÊNCIAS

AL-SAAD, E. A. K. *et al.* Patterns of Haemoglobinopathies Diagnosed by High Performance Liquid Chromatography in Karbala Population and Correlations between Different Hematological Parameters. **Médico Legal Update**, v. 20, n. 1, p. 759-765, 2020.

BATISTA, G. S. *et al.* Hemoglobinopatias: investigação em sangue periférico de acadêmicos de uma universidade de Alfenas – MG. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 99, n. 3, p. 246-50, 2020.

BITTENCOURT, S. *et al.* Sorção de poluentes orgânicos emergentes em lodo de esgoto. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 43-53, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação-Geral de Atenção Especializada. **Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

CAMPBELL, M. *et al.* Evaluation of cation-exchange HPLC compared with isoelectric focusing for neonatal hemoglobinopathy screening. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 969-975, 1999.

CATTANEO, R. *et al.* Validação do método para determinação de cotinina em urina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 19, n. 1, p. 25-31, 2006.

DEGANI, A. L. G. *et al.* Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.

FARRE, M. L. *et al.* Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 991-1007, 2008.

FERNANDES, A. R. C.; DOMINGOS, C. R. B. Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinas variantes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 1, p. 65-67, 2006.

FERREIRA, R. C. G. **Análise de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas recorrendo à microextração por difusão gasosa (GDME) e à cromatografia líquida de alta eficiência.** 2014. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Universidade de Porto, Portugal, 2014.

FONTENELE, E. G. P. *et al.* Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.

GIGER, W. Poluentes hidrofílicos e anfílicos da água: usando métodos analíticos avançados para contaminantes clássicos e emergentes. **Revista Química Analítica e Bioanalítica**, v. 393, n. 1, p. 37-44, 2009.

GOULART, D. S. **Aplicações das técnicas de cromatografia no diagnóstico toxicológico.** 2012. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

HE, L. *et al.* Diagnosis of Hemoglobinopathy and -Thalassemia by 21 Tesla Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry of Hemoglobin from Blood. **Clinical Chemistry**, v. 65, n. 8, p. 986-994, 2019.

LANÇAS, F. M. Efeitos de temperatura em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 13-19, 2012.

LOBO, C. L. C. *et al.* Triagem neonatal para hemoglobinopatias no Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 13, p. 154-159, 2003.

MANOUSHI, N. *et al.* "Bioanalytical HPLC Applications of In-Tube Solid Phase Microextraction: A Two-Decade Overview." **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2096, 2020.

MELO, L. *et al.* Rastreamento de hemoglobinas variantes e talassemias com associação de métodos de diagnóstico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 1, p. 12-17, 2008.

MISHRA, D.P. *et al.* HPLC: An Ideal Methodology and Screening Tool for Diagnosis of Haemoglobinopathies in Paediatric Age Group in Southern Odisha. **Scholars Journal of Applied Medical Sciences**, v. 6, n. 6, p. 2316-2332, 2018.

MORALES, P. *et al.* Optimization and application of FL-HPLC for folates analysis in 20 species of mediterranean wild vegetables. **Food analytical methods**, v. 8, n. 2, p. 302-311, 2015.

PERES, T.B. Noções básicas de cromatografia. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Revista Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004

ROSENFELD, L. G. *et al.* Prevalência de hemoglobinopatias na população adulta brasileira: Pesquisa Nacional de Saúde 2014-2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, supl. 2, p. E190007, 2019.

SANTOS, J. H. Z. *et al.* Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de fármacos em meio aquático por extração em fase sólida e hplc. **Revista de ciências ambientais**, v. 1, n. 2, p. 19-34, 2007.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SILVA, W. S. *et al.* Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, n. 12, p. 2561-2566, 2006.

SOARES, F. L. *et al.* Prevalência de hemoglobinas variantes em comunidades quilombolas no estado do Piauí, Brasil. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3773-3780, 2017.

SUCHARA, E.A. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de fármacos em fluidos biológicos e amostras ambientais por cromatografia líquida e gasosa**. 2007. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

TELES, A. F. *et al.* Hemoglobinas de origem africana em comunidades quilombolas do estado do Tocantins, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 1, p. 39-46, 2017.

VIEIRA, E. M. *et al.* Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 3, p. 283-288, 2007.

VOGEL, A. I.; AFONSO, J. C. Análise química quantitativa. **Grupo Editorial Nacional Participações S/A**. Rio de Janeiro, 6 ed., 2015. p.144-158.

ZANATTA, T.; MANFREDINI, V. Comparação entre métodos laboratoriais de diagnóstico de Doenças Falciformes. **Revista News lab.**, v. 94, n.1, p. 180-192, 2009.

Data do recebimento: 7 de Novembro de 2021

Data da avaliação: 11 de Dezembro 2021

Data de aceite: 11 de Dezembro de 2021

1 Acadêmico em biomedicina, Universidade Tiradentes – UNIT/SE. E-mail: gabrielwk1@gmail.com

2 Acadêmica em biomedicina, Universidade Tiradentes – UNIT/SE. E-mail: Katarine_ks16@hotmail.com

3 Doutora; Mestre; Bióloga; Professora Universitária, Universidade Tiradentes – UNIT/SE.

E-mail: veronica_sierpe@hotmail.com