



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Curso de Graduação em Farmácia

Danillo Macêdo Gomes

**Poliaminas em amostras biológicas humanas:
Importância e métodos de detecção**

João Pessoa
2013

**Poliaminas em amostras biológicas humanas:
Importância e métodos de detecção**

Danillo Macêdo Gomes

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do curso de Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Farmacêutico**.

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

João Pessoa

Abril / 2013

**Poliaminas em amostras biológicas humanas:
Importância e métodos de detecção**

Danillo Macêdo Gomes

Aprovado em: 15 de abril de 2013.

Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

Orientador – Universidade Federal da Paraíba – Departamento de Biotecnologia

Prof. Dr. Fabio Santos de Souza

Examinador 1 – Universidade Federal da Paraíba – Departamento de Ciências Farmacêuticas

Prof.^a Dr.^a Bárbara Viviana de Oliveira Santos

Examinador 2 – Universidade Federal da Paraíba – Departamento de Ciências Farmacêuticas

João Pessoa

Abril / 2013

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal da Paraíba pela oportunidade de me tornar um profissional farmacêutico habilitado.

Ao Laboratório de Análises Farmacêuticas e Moleculares e a Biblioteca Central/UFPB por me fornecerem os subsídios necessários para a elaboração deste trabalho.

Ao meu orientador, o professor Eduardo, que é mais do que um professor, pela sua confiança depositada em mim enquanto estudante, pela oportunidade concedida de desenvolver um projeto de iniciação científica em seu laboratório e pela sua orientação, tanto acadêmica quanto profissional.

A Eugênia Abrantes de Figueiredo, hoje aluna de doutorado do Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, da qual eu acompanhei e com quem pude aprender sobre a rotina de um cromatógrafo líquido e que me ajudou ao longo da iniciação científica. Acredito que fui mais ajudado do que ajudante.

A todos os meus especiais colegas de curso e professores de graduação, em especial a: Elizete Ventura do Monte, José Rodrigues de Carvalho Filho, Jória Viana Guerreiro, Bagnólia Araújo da Silva, Rossana Maria Souto Maior Serrano, Bárbara Viviana de Oliveira Santos, Zélia Braz Vieira da Silva Pontes e Fabio Santos de Souza por serem exemplos de professores.

A todos os meus familiares, pelo apoio incondicional na minha trajetória de vida pessoal e profissional, especialmente a meus pais: José de Arimatéa Meira Gomes e Eliane Ferreira de Macêdo Gomes; meus tios: Edison Ferreira de Macêdo, Hubert Arvet-thouvet, Maria das Neves Ferreira de Macêdo e Maria Bernardete Ferreira de Macêdo e a minha avó: Lindalva Ferreira de Macêdo.

“A paciência é amarga, mas seu fruto é doce.”

Rousseau

RESUMO

Poliaminas são bases orgânicas alifáticas pertencentes ao elenco das aminas bioativas e que desempenham importantes funções metabólicas e fisiológicas em animais, vegetais e microorganismos. São um alvo importante para o desenvolvimento de quimioterápicos, uma vez que estão intimamente envolvidas nos processos de crescimento e replicação celular e seu monitoramento em fluidos biológicos tem sido usado para estimar a extensão da morte de células tumorais induzida por quimioterapia ou radioterapia. Na prática da investigação clínica, os métodos mais amplamente utilizados para a análise de poliaminas são os métodos cromatográficos, notadamente a cromatografia líquida de alta eficiência por detecção fluorimétrica, sendo requerido processo de derivatização. A literatura científica estabelece diferentes metodologias pré-analíticas em função da natureza das amostras clínicas, sendo o sangue e urina as mais utilizadas. Além disso, métodos otimizados tem sido desenvolvidos, sobretudo aqueles que interferem no pH e temperatura da reação de derivatização, uma vez que estes dois parâmetros podem favorecer a formação de outros produtos detectáveis pelo sistema cromatográfico ou levar a decomposição das poliaminas, respectivamente, comprometendo assim a confiabilidade dos resultados clínicos.

Palavras-chave: Poliaminas; Cromatografia líquida; Análises clínicas.

ABSTRACT

Polyamines are basic aliphatic compounds belonging to the list of bioactive amines and have important metabolic and physiological functions in animals, plants and microorganisms. They are an important target for the development of chemotherapy, since they are intimately involved in the processes of growth and cell replication and its monitoring in biological fluids has been used to estimate the extent of tumor cell death induced by chemotherapy or radiotherapy. In the practice of clinical research, the most widely used methods for the polyamine analysis are chromatographic methods, particularly high performance liquid chromatography with fluorimetric detection where derivatization is required. The scientific literature provides various pre-analytical methods according to the nature of the clinical samples, blood and urine are being the most used. Furthermore, optimized methods have been developed, particularly those that affect the pH and temperature of the derivatizing reaction, since these two parameters might favor the formation of other detectable products by chromatographic system or lead to decomposition of polyamines respectively, thus compromising the reliability of clinical results.

Keywords: Polyamines; Liquid chromatography; Clinical analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADC	Arginina descarboxilase
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
C18	Octadecil silano
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dns-Cl	Cloreto de dansila
Dns-OH	Ácido sulfônico dansilado
EC	Eletroforese Capilar
EPD	Espermidina
EPM	Espermina
Fmoc	9-fluorenilmetil cloroformato
ODC	Ornitina descarboxilase
OPA	o-ftalaldeído
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Cologarítmo da constante de acidez
PUT	Putrescina
RNA	Ácido ribonucléico
SAM	S-adenosil metionina
SAMDC	S-adenosil metionina descarboxilase
TLC	Cromatografia em Camada Fina

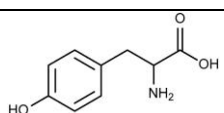
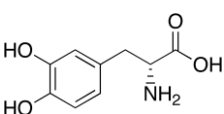
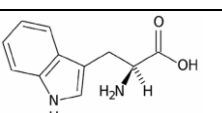
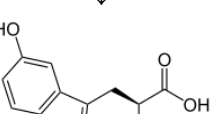
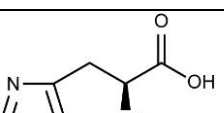
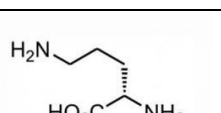
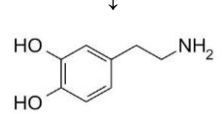
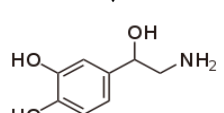
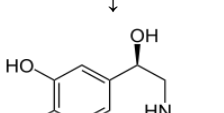
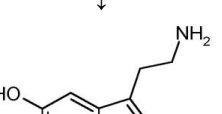
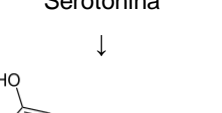
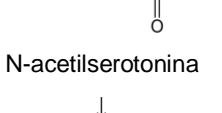

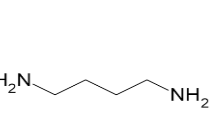
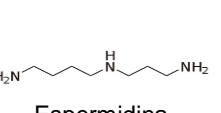
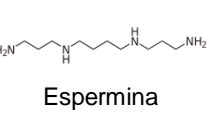
SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	11
2 – METODOLOGIA	15
3 – POLIAMINAS: POR QUE E COMO SE DETECTAR?	15
4 – MÉTODOS OTIMIZADOS E PROBLEMAS DE DETECÇÃO	22
5 – CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS	26

1 – INTRODUÇÃO

Aminas biogênicas incluem as catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas (serotonina e melatonina), imidazolaminas (histamina) e poliaminas (putrescina, espermidina e espermina), conforme quadro 1 (NAGATZU, 1991).

Quadro 1 – Vias biossintéticas das aminas biogênicas a partir de seus aminoácidos precursores.

	Catecolamina	Indolamina	Imidazolamina	Poliamina
Aminoácido precursor	 ↓  Dopa	 ↓  5-hidroxitriptofano	 ↓	 ↓
Amina biogênica	 ↓  ↓  Adrenalina	 ↓  ↓  Melatonina	 Histamina	 ↓  ↓  Espermina

Fonte: NAGATZU (1991, p.288)

As poliaminas são bases orgânicas alifáticas pertencentes às aminas bioativas ou biologicamente ativas que desempenham importantes funções metabólicas e fisiológicas em animais, vegetais e microrganismos. Dessa forma, estão naturalmente presentes em baixas concentrações em todos os organismos vivos (GLÓRIA, 2005).

São quimicamente classificadas por possuírem dois ou mais grupamentos amino. São também as principais poliaminas encontradas em seres procarióticos e eucarióticos, porém outras aminas têm sido identificadas em microrganismos que vivem sob condições ambientais extremas, por exemplo, em termófilos. (GERNER e MEYSKENS, 2004).

Estudos envolvendo a conformação e estruturas iônicas das poliaminas indicam que as mesmas no meio fisiológico encontram-se na forma protonada (MINARI et al., 2010). Em meio lipofílico provavelmente existem como compostos neutros e, em meio aquoso, estão altamente solubilizadas em conformação estendida (LØVAAS, 1997). É a solubilidade em meio orgânico e em meio aquoso que permite sua utilização em uma grande variedade de produtos.

Como policátions flexíveis as poliaminas exibem 2, 3 ou 4 cargas positivas em condições fisiológicas conforme figura 1. Dessa forma, podem interagir eletrostaticamente com moléculas aniônicas como o DNA, RNA, fosfolipídios ácidos e proteínas (LIU et al., 2011).

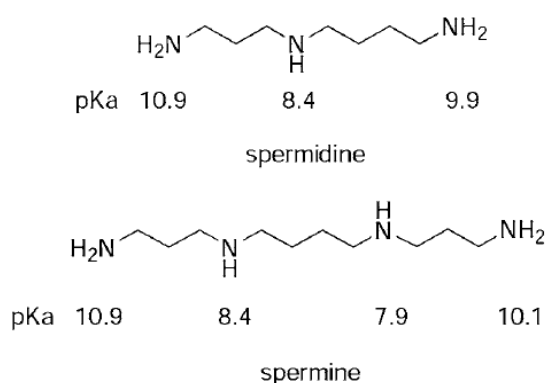


Figura 1 - Estruturas moleculares da espermina e espermidina e valores de pKa dos grupos amino primários e secundários.

Fonte: WOSTER. In: WANG e CASERO, 2006, p.4

Estão também envolvidas em vários processos celulares, como modulação da estrutura da cromatina, transcrição e translação gênica, estabilização do DNA, transdução de sinal, crescimento celular e proliferação, migração, estabilidade de membrana, funcionalidade de canais iônicos e interações receptor-ligante (KAHANA, sd.).

Uma vez que as poliaminas estão intimamente envolvidas no crescimento e replicação de diversos tipos de células, e em especial encontram-se em altas concentrações em células exibindo crescimento rápido, são um alvo importante para o desenvolvimento de drogas anti-câncer (CUNHA et al, 2006).

Níveis insuficientes de poliaminas resultam em um déficit de crescimento e, em alguns casos, a morte celular, incluindo a apoptose. A elevação descontrolada das poliaminas pode levar a transformação celular e ao surgimento de tumores (PEGG, 1988 apud SAMPAIO et al., 2010).

A biossíntese das poliaminas se dá a partir da descarboxilação da ornitina e da arginina pelas respectivas enzimas ornitina descarboxilase (ODC) e arginina descarboxilase (ADC) (MEDINA, et al, 2003). Segundo Hillary & Pegg (2003), a principal via de formação de putrescina em animais é pela enzima ODC, promovendo a descarboxilação da ornitina e, conseqüentemente, formação da putrescina (PUT). A ODC também é a primeira enzima-chave regulatória, possuindo um pequeno tempo de meia-vida, em torno de 10 minutos (MOINARD et al., 2005).

Para que ocorra a conversão de PUT em espermidina (EPD) e esta em espermina (EPM), uma série de reações envolvendo transferases, descarboxilases e sintetases acontecem paralelamente. A metionina é convertida em S-adenosil metionina (SAM) e, pela S-adenosil metionina descarboxilase (SAMDC), forma a S-adenosil metionina descarboxilada, fornecendo um grupo propilamina à PUT formando a EPD, pela espermidina sintase, e, o mesmo grupamento à EPD formando a EPM, pela espermina sintase (GLÓRIA, 2005).

Há, entretanto, diferenças nos detalhes entre as vias biossintéticas em diferentes tipos de células (MORGAN, 1998). Um esquema generalizado da síntese, degradação e transporte transmembrana de poliaminas é mostrado na

figura 2 abaixo:

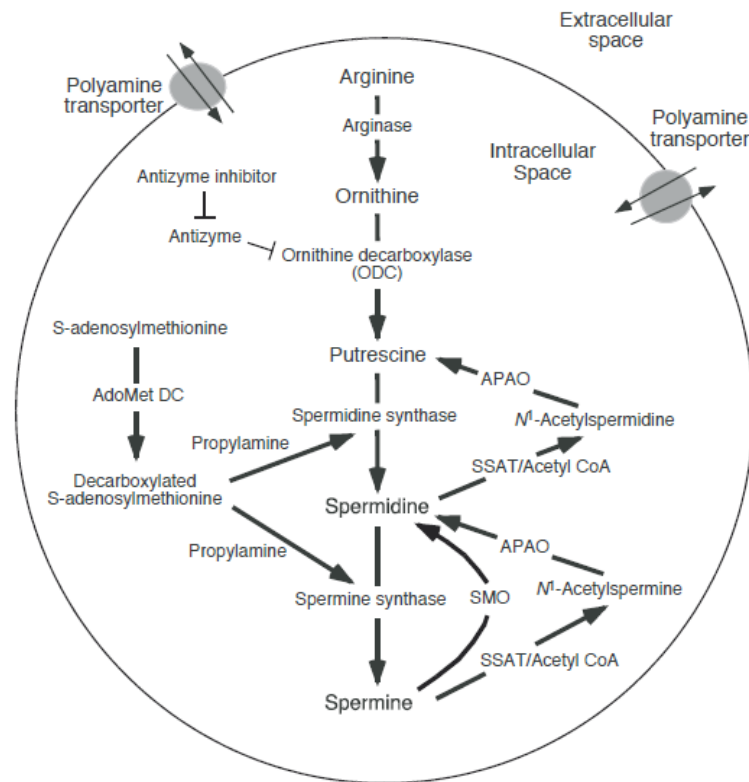


Figura 2 – Metabolismo e transporte de poliaminas.

Fonte: SODA, 2011, p.2

Os estudos mais recentes sugeriram que as poliaminas provenientes de fontes extracelulares são também de fundamental importância para os processos metabólicos (MEDINA et al., 2003). Os pré-requisitos para a formação das poliaminas em alimentos são a disponibilidade de aminoácidos livres, a presença de microrganismos descarboxilase positiva e condições que permitam o crescimento bacteriano e a atividade descarboxilase (BRINK et al., 1990).

Acreditava-se que as poliaminas eram produzidas *in situ*, uma vez que todas as células são capazes de sintetizá-las (SMITH e DAVIES, 1985). Porém, Halász et al. (1994) observaram que, em alguns casos, a capacidade de as células e órgãos sintetizarem poliaminas é insuficiente para satisfazer os requerimentos totais. Os estudos mais recentes sugeriram que as poliaminas provenientes de fontes extracelulares são também de fundamental importância para os processos metabólicos (MEDINA et al., 2003).

Assim, as três fontes formadoras de poliaminas estabelecidas são:

biossíntese *in situ* a partir de aminoácidos, síntese e liberação por bactérias residentes no trato gastrointestinal, como as do gênero *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Morganella* e *Proteus*, além da ingestão direta por meio da dieta (MINOIS et al, 2011; TETI et al, 2002) . Em trabalho realizado por Lima et al. (2006), sobre os teores de poliaminas da dieta do povo brasileiro, os maiores teores encontrados foram provenientes da batata, do tomate e da banana.

O objetivo deste trabalho consiste em estabelecer uma revisão de literatura sobre os métodos aplicáveis de detecção e separação de poliaminas em amostras biológicas por cromatografia líquida de alta eficiência e sua relevância e aplicabilidade no contexto das análises clínicas.

2 – METODOLOGIA

O levantamento dos dados da literatura disponível foi realizado no período de setembro de 2012 a fevereiro de 2013 por meio de consulta nas bases de dados do Portal de Periódicos CAPES, Scielo, Pubmed e Medline.

Foram selecionados artigos, livros e protocolos relacionados à poliaminas, métodos de detecção por cromatografia líquida de alta eficiência e métodos otimizados. A seleção se deu com base na relevância ao tema proposto para esta revisão, não sendo estabelecido prioridade por ordem cronológica de publicação dos artigos.

Os termos de buscas utilizados foram “poliaminas”, “poliaminas derivatização”, “poliaminas HPLC”, “espermina/espermidina derivatização”, “poliaminas método” e “poliaminas câncer”.

3 – POLIAMINAS: POR QUE E COMO SE DETECTAR?

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, o câncer é a terceira doença que mais mata no mundo, depois das doenças infecciosas e das cardiovasculares. Um dos fatores que auxiliam o diagnóstico precoce é buscar novas maneiras de detectar a presença de tumores por meio de substâncias denominadas de marcadores (RANGEL, 2009).

Os marcadores tumorais são usados para ajudar a detectar, diagnosticar e gerenciar alguns tipos de câncer. Embora um elevado nível de um certo marcador tumoral possa sugerir a presença de câncer, isso por si só não é suficiente para diagnosticá-lo. Portanto, os ensaios com marcadores tumorais são normalmente combinados com outros, tais como biópsias, possibilitando assim o diagnóstico (NCI, 2011).

Por um longo tempo, o monitoramento das poliaminas e seus conjugados e metabólitos em fluidos biológicos tem sido usado para estimar a extensão da morte das células tumorais induzida por quimioterapia e radioterapia em paciente com câncer (RUSSEL, 1983 apud TETI et al., 2002).

Um grande número de estudos tem indicado altas concentrações de PUT, EPD e EPM e poliaminas totais (livres e acetiladas) em pacientes com câncer, em comparação aos padrões saudáveis (KHUHAWAR e QURESHI, 2001) e que as poliaminas estão muito mais presentes em células tumorais do que em células normais; o seu teor em urina, soro e fluido cerebrospinal de pacientes com câncer é geralmente superior ao valor normal (YUN e ZHANG, 1987).

Na Química Clínica, o fluido mais frequentemente empregado para a análise de poliaminas é, evidentemente, o sangue (GUGLIUCCI, 2004). Células tumorais, que são geralmente bastante proliferativas, sintetizam altos níveis de poliaminas e elevadas concentrações de espermina e espermidina tem sido observadas nas células vermelhas do sangue obtidas de pacientes com câncer (MOULINOUX et al., 1988, 1991 apud DUCROS et al., 2009).

Russell (1971) também evidenciou que pacientes com vários tipos de tumores sólidos e leucemias tem consideráveis níveis aumentados de poliaminas em urina. Porém, segundo Teti et al. (2002), níveis elevados de poliaminas também têm sido encontrados em células proliferativas ativas em condições patológicas além do câncer, como infecções, psoríase, policitemia, lúpus eritematoso sistêmico, uremia, nefrite crônica, cirrose hepática, nefrite crônica, fibrose cística, *diabetes mellitus* insulino-dependente, distrofia muscular e Mal de Alzheimer, desmistificando assim a utilidade da mensuração dos níveis de poliaminas como marcador específico para diagnóstico do câncer.

Correlações mais promissoras foram encontradas entre os níveis de mensuração de poliaminas urinárias e a resposta dos pacientes a terapia (RUSSELL et al, 1978 apud WALLACE e CASLAKE, 2001), porém resta ser estabelecido o papel dessas poliaminas como marcador preditivo (GERNER e MEYSKENS, 2004).

As técnicas de separação, tais como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC), vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos (RIBAMI et al., 2004).

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido extremamente usada por anos como um método analítico para a separação de amostras no controle de qualidade farmacêutico e nas pesquisas das ciências da vida. Devido ao poder e flexibilidade dessa técnica, numerosas aplicações tem sido adotadas para o uso de rotina em laboratório clínico (CLI, 2006).

O método cromatográfico se caracteriza por ser um modelo físico-químico de separação baseado na distribuição dos componentes de uma mistura entre um fluido (fase móvel ou eluente) e um adsorvente (fase estacionária). A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido depositado num sólido inerte, empacotado numa coluna ou espalhado por uma superfície formando uma camada fina. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS et al., 2006).

Para a análise de poliaminas e acetopoliaminas, métodos de cromatografia líquida de alta eficiência são os mais amplamente usados para finalidades de pesquisa e investigação clínica (MATSUMOTO et al., 1990).

Entretanto, o método de CLAE encontra uma limitação, uma vez que muitos dos compostos de interesse não possuem grupos cromóforos ou fluoróforos o que dificulta a sua detecção, fazendo-se necessário um passo experimental adicional, como por exemplo, a derivatização, que é uma técnica capaz de aumentar a sensibilidade e/ou seletividade. Compostos contendo

grupos funcionais tais como aminas são um tipo de analito que requererem derivatização para sua determinação por CLAE (SILVA, 2005).

A detecção direta das poliaminas é difícil porque elas não possuem absorvância na região do ultravioleta e, conseqüentemente, elas não tem fluorescência nativa, requerida na maioria dos procedimentos de derivatização (MOLINS-LEGUA, 2009), que são geralmente direcionados para aminas alifáticas, ácidos carboxílicos ou álcoois, difíceis para serem detectados em baixas concentrações por absorvância, luminescência ou métodos eletroquímicos (DANIELSON et al., 2000).

Conseqüentemente, para a determinação dos picos de poliaminas, os métodos de derivatização com detecção fluorimétrica são os mais populares, tanto os de troca iônica, quanto os de fase reversa por cromatografia líquida (MATSUMOTO et al, 1990).

A derivatização pós-coluna é geralmente realizada com o-ftalaldeído (OPA) para detecção fluorimétrica. No entanto, derivatização pré-coluna com cloreto de dansila é também reportada em muitos trabalhos (MATSUMOTO et al, 1990). Outros reagentes de derivatização também são usados, a exemplos do cloreto de benzoíla e 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC).

Vantagens e desvantagens são evidenciadas nas duas principais estratégias de derivatização. No primeiro caso, através da derivatização pós-coluna, com a utilização do OPA, o método é caracterizado por ser mais sensível em virtude do reagente de derivatização reagir apenas com os grupos amino primários das poliaminas, porém os adutos formados caracterizam-se pela sua instabilidade química a temperatura ambiente.

No que tange os métodos de derivatização pré-coluna por dansilação, os mesmos são menos sensíveis em virtude da reação inespecífica do reagente de dansilação com outros constituintes da amostra, sendo necessário seu uso em excesso para garantir que todas as poliaminas sejam dansiladas. Outros interferentes poderão ser formados em virtude de reações de decomposição e hidrólise dependentes do pH em soluções aquosas. Entretanto, este método proporciona uma forte detecção fluorescente em virtude de ambos os grupos amino primário e secundário serem dansilados, além de poder ser usado em uma grande variedade de matrizes biológicas (HUNTER, 1998).

O cloreto de dansila é o reagente mais amplamente usado para a derivatização de poliaminas em separações por TLC ou CLAE (SMITH e DAVIES, 1987 apud PEDROL e TIBURCIO, 2001).

Smith e Davies (1985) descreveram em detalhes a metodologia da reação de dansilação, que consiste em misturar uma alíquota de 100µL do sobrenadante extraído da amostra com 200µL de solução saturada de carbonato de sódio e 400µL de solução de cloreto de dansila em acetona (7,5mg/mL) em vials de reação de 5mL. A mistura em seguida é incubada num bloco de reação térmica a 60°C por 1 hora no escuro. 100µL de prolina são adicionados para remover o excesso de cloreto de dansila. Após 0,5 hora, as poliaminas são extraídas com 500µL de tolueno com agitação vigorosa por 30 segundos. A mistura é então separada em duas fases, a aquosa e orgânica. A fase aquosa, a mais densa, é removida com seringa de 1mL e descartada. A fase orgânica, contendo as poliaminas, é completamente secada em nitrogênio. Os resíduos são dissolvidos em 1mL de metanol e filtrados em membrana de nylon (0,2µm de poro); as soluções são testadas imediatamente ou estocadas não mais que uma semana a -20°C e alíquotas são diluídas para a injeção no cromatógrafo.

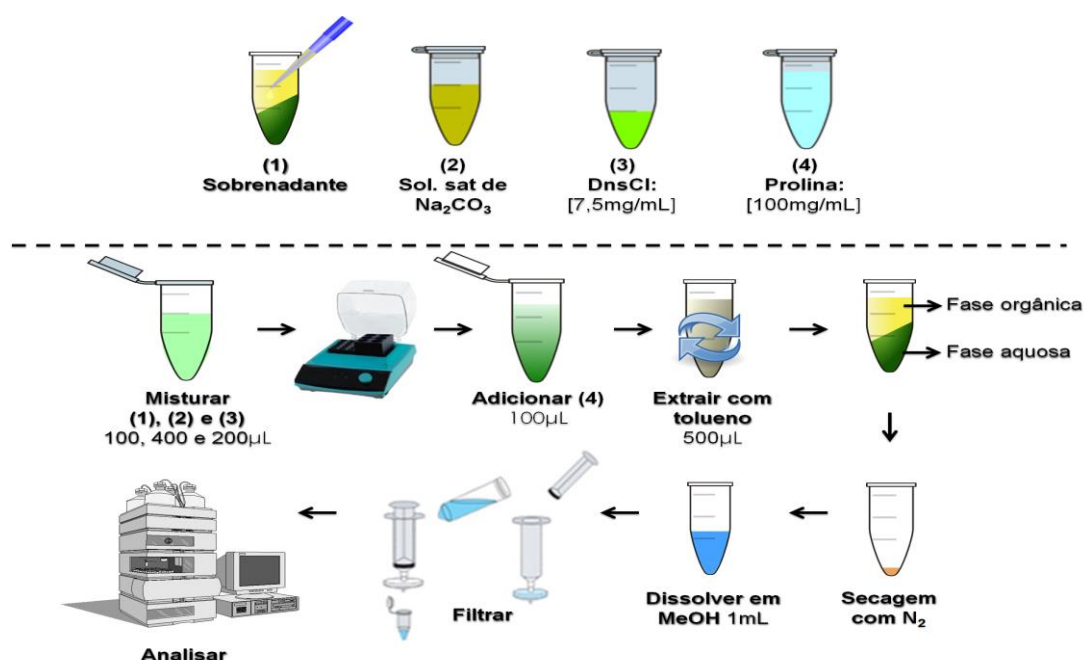


Figura 3 - Procedimento padrão da reação de derivatização por dansilação.

Os autores também propuseram as condições cromatográficas para a

separação, que consiste em utilizar um volume de injeção de amostra de 20µL, coluna C18 (5 x 250mm; 5µm de diâmetro de partícula) e sistema de eluição em gradiente de água:metanol, com proporções variando de 60 a 95% dos respectivos solventes num tempo de 23 minutos, com fluxo de 1mL/min, tempo de eluição de 27 minutos e detecção de fluorescência com comprimentos de onda de 365 e 510nm de excitação e emissão, respectivamente. A EPD apresenta um menor tempo de eluição que a EPM e o perfil cromatográfico obtido da análise de amostras contendo poliaminas é representado na figura 5.

O Dns-Cl é composto por uma porção aromática altamente fluorescente (5-dimetilaminonaftaleno) e um grupo reativo (cloreto de sulfonila). O grupo reativo atribui aos analitos uma coloração azul ou azul esverdeado, por meio de uma reação de substituição nucleofílica representada na figura 4, produzindo sulfonamidas fluorescentes (amidas de dansila), sendo estes derivados dansilados, formados sob condições alcalinas fracas, bastante estáveis (SILVA, 2005).

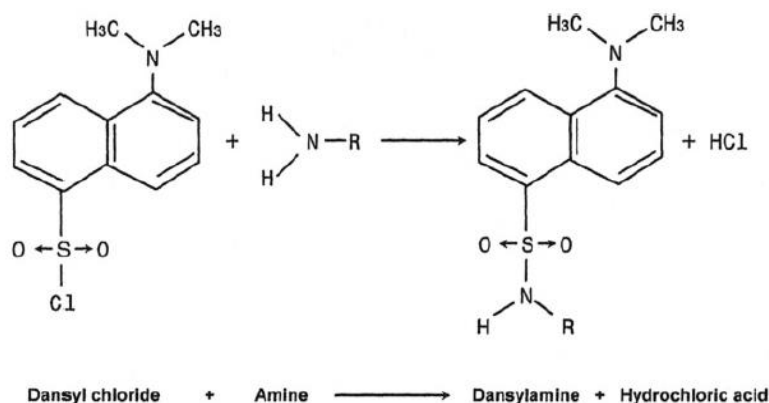


Figura 4 - Mecanismo molecular da reação de derivatização.

Fonte: PEDROL e TIBURCIO. In: ROGER, 2003, p.352

De acordo com Vandemark et al. (1978) a etapa pré-analítica para a preparação de amostras de urina para a derivatização consiste em, inicialmente, realizar uma reação de hidrólise, onde cerca de 200µL de urina e 200µL de HCl concentrado são transferidos para um tubo. A amostra é misturada e aquecida a 110°C por 14 a 16 horas. Após hidrólise, os tubos são resfriados e a amostra é submetida a evaporação para secagem com vácuo a 80°C. Em seguida, são adicionados 20µL de carbonato de sódio saturado que

deverá ser misturado a amostra e evaporado para secagem. Em seguida a amostra é derivatizada.

Gerbaut (1991) descreve o procedimento para a determinação de poliaminas eritrocitárias. De acordo com o método, 5mL de amostras de sangue são coletadas em tubos heparinizados e processadas durante 3 horas. Após centrifugação (2500 x g por 10min a 4°C), o plasma é removido, os leucócitos são cuidadosamente descartados e os eritrócitos são ressuspendidos em 4 volumes de solução salina isotônica (0,15mol/L NaCl). As amostras são suavemente misturadas por inversão e os eritrócitos suspensos são re-centrifugados. Em seguida, é adicionado 1mL de água destilada em 0,5mL de eritrócitos empacotados. As células são então hemolizadas por mistura em vortex durante 30 segundos. As proteínas são removidas por adição de 1mL de ácido perclórico (100g/L). Com a adição do ácido, a amostra é misturada e submetida a uma nova centrifugação (3000 x g por 10min). O sobrenadante é removido e resfriado a -30°C. 0,5mL do sobrenadante é utilizado para a reação de derivatização.

Para a determinação de poliaminas em tecidos, o material coletado por biopsia (2-7mg) é homogeneizado em água (1mg de tecido fresco para 200µL) a 0°C. Ácido sulfosalicílico é adicionado até a concentração final de 40mg/mL para que haja a precipitação proteica. A amostra é mantida a 0°C por 30 minutos. Após centrifugação (2000 x g por 15min), alíquotas de 200uL do sobrenadante, cerca de 14-50% da amostra original, são submetidos ao procedimento de derivatização. O soro humano também pode ser desproteínizado por ácido sulfosalicílico e tratado conforme a metodologia descrita para tecidos (BONTEMPS et al., 1984).

Poliaminas também têm sido detectadas em amostras biológicas, tais como sêmen humano (OEFNER et al., 1992), cabelo (SUGIURA et al, 2008), retina (NICOLETTI et al., 2003), próstata (FU el al., 1998) e saliva (VENZA et al., 2001), sob diferentes condições cromatográficas, objetivando o estabelecimento de uma correlação entre os seus níveis detectados com o câncer e outras desordens clínicas ou a descoberta de novas metodologias analíticas otimizadas para a investigação em outras matrizes biológicas.

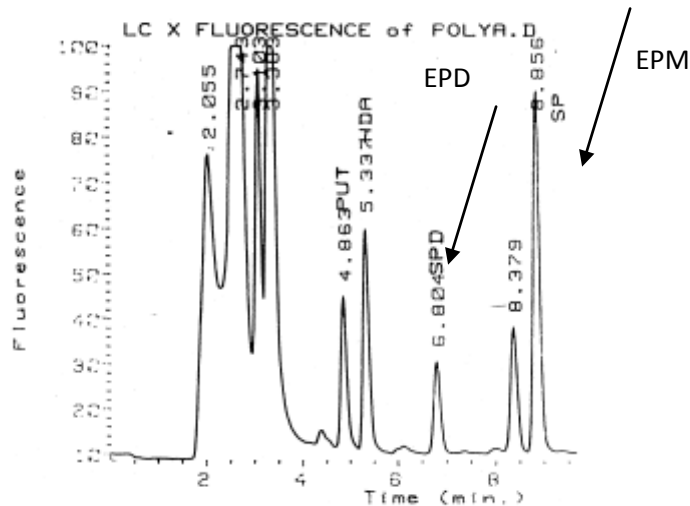


Figura 5 – Perfil cromatográfico da espermina e espermidina derivatizadas obtido de amostra de próstata hiperplásica benigna.

Fonte: FU et al.1998, p.299

4 – MÉTODOS OTIMIZADOS E PROBLEMAS DE DETECÇÃO

Vários métodos tem sido propostos para a detecção de poliaminas, apresentando condições otimizadas para minimizar os interferentes formados no processo de derivatização.

Kang et al (2006) observaram que os produtos de hidrólise produzidos pela reação do cloreto de dansila com água foram observados como picos intensos nos cromatogramas, que se sobrepunham com os picos de interesse das poliaminas em estudo.

A formação destes produtos apresenta dependência direta com o pH do meio na qual a reação de dansilação ocorre. Segundo Fu et al. (1998), isso pode ser explicado em termos de três reações competitivas:

- (1) $R-NH_2 + Dns-Cl \rightarrow R-NH-Dns + HCl$
- (2) $H_2O + Dns-Cl \rightarrow Dns-OH + HCl$
- (3) $R-NH-Dns + Dns-Cl \rightarrow Dns-NH + \text{outros produtos}$

A reação desejada, a reação 1, é acelerada por valores altos de pH, o que também favorece a reação 2. Já a reação 3 leva à decomposição de R-NH-Dns (poliaminas dansiladas). Neste trabalho, foi investigado o valor ideal de pH para a reação de dansilação, sendo o mesmo igual a 9.

O ácido sulfônico dansilado (Dns-OH) é altamente fluorescente e pode interferir com a subsequente separação cromatográfica das aminas porque ele pode ser co-eluído com derivados dansilados das poliaminas com um maior carácter hidrofílico (SILVA, 2005).

A temperatura também é outro parâmetro importante, uma vez que altas temperaturas promovem a reação de derivatização, porém, valores muito elevados podem causar decomposição das poliaminas (FU et al., 1998), conforme reação 3. Os autores encontraram a temperatura de 50°C como a ideal e o tempo de 30 minutos como sendo o necessário para a reação de derivatização.

Em uma outra abordagem, Kang et al. (2006) ajustaram o pH da fase móvel para 2,5 e adicionaram modificadores, como a trietanolamina e o hidróxido de tetrabutilamônia, favorecendo assim a separação dos analitos e possibilitando a obtenção de cromatogramas mais limpos.

O excesso de cloreto de dansila pode levar a sua decomposição e formação de adutos (YU et al., 1999 apud KANG et al., 2006). Para remover o excesso não derivatizado, aminoácidos como a prolina podem ser utilizados se necessário, porém isso não garante uma melhora dos cromatogramas e a reação de remoção é lenta (MORGAN, 1998). Este procedimento remove o excesso de Dns-Cl, formando o derivado ionizado de prolina, que permanece na fase aquosa, em conjunto com Dns-OH (SILVA, 2005).

A utilização de fornos de microondas são uma boa forma para o fornecimento de altas temperaturas em um curto espaço de tempo; uma abordagem assistida por microondas tem sido relatado como uma alternativa útil para acelerar a dansilação de aminas (LINARES et al., 1998; CARDENES et al, 2002 apud SILVA, 2005)

Linares et al (1998) desenvolveram uma metodologia em que a espermidina, espermina e outras aminas foram quantitativamente dansiladas em 5 min utilizando uma energia de radiação de 252W e uma pressão máxima de 3,4bar no interior de um reator através desta abordagem.

O quadro 2 estabelece uma comparação entre o método padrão de Smith e Davies (1985) e alguns métodos otimizados para a determinação de poliaminas, onde foram estudados as influências dos parâmetros de tempo,

temperatura e pH da reação de derivatização com a finalidade de se obter melhores análises cromatográficas.

Quadro 2 – Comparação de alguns métodos publicados para a determinação de aminas biogênicas por CLAE.

Referência	Smith e Davies, 1985	FU et al, 1998	Kang et al, 2006	Linares et al, 1998
Coluna (tamanho)	250 x 5mm / 5µm e 250 x 4,6mm	250 x 4,6mm / 10µm	150 x 4,6mm	300 x 4,6mm
Eluição	Fase reversa / gradiente	Fase reversa / gradiente	Fase reversa / gradiente	Fase reversa/ gradiente
Fase móvel	Metanol:água 60-95%	Metanol:água 80-100%	Metanol: água 35-65%; 1,5% de trietanolamina e 5mmol/L de hidróxido de tetrabutilamônio	Acetonitrila: água 60:40%; 90-10%
Tempo de corrida	27min	9min	35min	30min
Fluxo	1mL/min	1mL/min	1,5mL/min	1,2mL/min
Sensibilidade	0,8pmol	0,06-0,08nmol	23-454ng	0,6-3ng
Amostra	Plantas	Próstata	Tecido cerebral e plasma de rato	Plantas
Compostos	Poliaminas	Poliaminas	Aminoácidos	Poliaminas
pH da reação de derivatização	-	9	9,8	-
Temperatura da reação de derivatização	60°C	50°C	80°C	-
Tempo da reação de derivatização	60min	30min	30min	5min

5 – CONCLUSÕES

As dificuldades sentidas na tentativa de identificar e medir as quantidades de poliaminas em materiais biológicos seguem a partir de três características: a sua dimensão, as baixas concentrações onde estão presentes e os seus únicos centros reativos são os grupos amino (MORGAN, 1999).

Para tanto, técnicas analíticas mais rebuscadas tem sido usadas para a detecção desses compostos. Dentre as técnicas utilizadas para estudo de poliaminas, destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência, técnica esta capaz de detectá-las simultaneamente com precisão, rapidez e alta especificidade.

REFERÊNCIAS

BRINK, B. et al. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **Int J Food Microbiol**, v. 11, p. 73-84, 1990.

BONTEMPS, J. et al. Analysis of dansyl derivatives of di- and polyamines in mouse brain, human serum and duodenal biopsy specimens by high-performance liquid chromatography on a standard reversed-phase column. **J Chromatogr**, v.311, p.59-67, 1984.

CLINICAL Laboratory International – CLI. **Applications of HPLC in clinical diagnostics**. Bruxelas, 2006. Disponível em: < http://www.cli-online.com/fileadmin/pdf/pdf_general/applications-of-hplc-in-clinical-diagnostics.pdf>
Acessado em: 20 de dezembro de 2012.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. & BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 452p. 2006.

CUNHA, A.S. et al. Synthesis of novel naphthoquinone-spermidine conjugates and their effects on dna-topoisomerases I and II. **J Braz Chem Soc**, São Paulo, v.17, p.439-442, 2006.

DANIELSON, N.D.; GALLAGHER, P.A. & BAO, J.J. Chemical reagents and derivatization procedures in drug analysis. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, Chichester, p. 7042-7076, 2000.

DUCROS, V. et al. Determination of dansylated polyamines in red blood cells by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Anal Biochem**, v. 390, p. 46-51, 2009.

FU, S. et al. Determination of polyamines in human prostate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 709, p. 297-300, 1998.

GERBAUT, L. Determination of erythrocytic polyamines by reversed-phase liquid chromatography. **Clin Chem**, v. 37/12, p. 2117-2120, 1991.

GERNER, E.W. & MEYSKENS JR, F.L. Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding. **Nat Rev Cancer**, v.1, p.781-792, 2004.

GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines: In: HUI, H. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. Marcel Dekker, v.4, p.13.1-13.38, 2005.

GUGLIUCCI, A. Polyamines as clinical laboratory tools. **Clin Chim Acta**, v. 344, p. 23–35, 2004.

HALÁSZ, A. et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, p. 42-49, 1994.

HILLARY, R.A. & PEGG, A.E. Descarboxylases involved in polyamine biosynthesis and their inactivation by nitric oxide. **Biochim Biophys Acta**, v. 1647, p. 161-166, 2003.

HUNTER, K.J. A dansyl chloride-HPLC method for the determination of polyamines. In: MORGAN, D.M.L. **Polyamine protocols**. Humana Press, Totowa, cap. 14, pg. 119-123, 1998.

KANG, X. et al. Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples. **Clin Chim Acta**, China, v. 366, p. 352 – 356, 2006.

KHUHAWAR, M.Y. & QURESHI, G.A. Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. **J Chromatogr B**, v.764, p. 385-407, 2001.

KAHANA, C. **Polyamines: Regulation and molecular functions**. Weizmann Institute of Science. Disponível em: <<http://www.weizmann.ac.il/molgen/Kahana/polyamines>>. Acessado em: 20 de agosto de 2012.

LIMA, G.P.P. et al. Teores de poliaminas em alguns alimentos da dieta básica do povo brasileiro. **Cienc. Rural**, v.36, n.4, p. 1294-1298, 2006.

LINARES, R.M. et al. Rapid microwave-assisted dansylation of biogenic amines analysis by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr A**, v. 808, p. 87-93, 1998.

LIU, R. et al. Determination of polyamines in human urine by precolumn derivatization with benzoyl chloride and high-performance liquid chromatography coupled with Q-time-of-flight mass spectrometry. **Talanta**, China, v. 83, p. 751-756, 2011.

LØVAAS, E. Antioxidative and metal chelating effects of polyamines. **Adv Pharmacol**, v.38, p. 119-149, 1997.

MATSUMOTO, T.; TSUDA, T. & SUZUKI, O. Polyamine determination in clinical laboratories by high-performance liquid chromatography. **TrAC**, Nagoya, v. 9, n. 9, p. 292-297, 1990.

MEDINA, M.A. et al. Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biochemical applications. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 38, p. 23-59, 2003.

MINARI, A. et al. Synthetic polyamines: an overview of their multiple biological activities, **Amino Acids**, v. 38, p. 383-392, 2010.

MINOIS, N.; CARMONA-GUTIERREZ, D. & MADEO, F. Polyamines in aging and disease. **Aging**, v .3, p. 1-17, 2011.

MOINARD, C.; CYNOBER, L. & DE BRANDT, J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clin Nutr**, v. 24, p. 184-197, 2005.

MOLINS-LEGUA, C. et al. Urine polyamines determination using dansyl chloride derivatization in solid-phase extraction cartridges and HPLC. **Analyst**, v. 124, p. 477-482, 1999.

MORGAN, D.M.L. Polyamines. In: **Polyamine protocols**. Humana Press, Totowa, cap. 1, p. 3-30, 1998.

MORGAN, D.M.L. Polyamines: An overview. **Mol Biotechnol**. v. 11, p. 229-250, 1999.

NAGATZU, T. Application of high-performance liquid chromatography to the study of biogenic amine related enzymes. **J Chromatogr**, Amsterdam, v. 566, p. 287-307, 1991.

NICOLETTI, R. et al. Vitreous polyamines spermidine, putrescine, and spermine in human proliferative disorders of the retina. **Br J Ophthalmol**, v. 87, p. 1038-1042, 2003.

NATIONAL Cancer Institute. **Tumor Markers**. 2011. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/tumor-markers>> Acessado em: 02 de novembro de 2012.

OEFNER, P.J.; WONGYAI, S. & BONN, G. High-performance liquid chromatographic determination of free polyamines in human seminal plasma. **Clin Chim Acta**, v. 205, p.11-18, 1992.

PEDROL, N.E. & TIBURCIO, A.F. Polyamines determination by HPLC and TLC. In: ROGER, M.J.R. **Handbook of plant ecophysiology techniques**. Kluwer Academic Publishers, 2001. cap. 21, p. 335-353.

RANGEL, R. Avançam pesquisas para o diagnóstico precoce do câncer . **Inovação em Pauta**, n. 5, p. 26-31, 2009.

RIBAMI, M. et al. Validação de Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Quim Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RUSSELL, DH. Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients. **Nature New Biology**, v. 233, p. 144-145, 1971.

SAMPAIO, V.F. et al. Rat brain polyamines: An analytical method validation. **J Bras Patol Med Lab**, São Paulo, v. 46, n. 6, p. 455-461, 2010.

SILVA, M. Quantitation by HPLC of Amines as Dansyl Derivatives. In: MOLNÁR-PERL, I. Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography. **Journal of Chromatography Library**, v. 70, p. 445-470, 2005.

SMITH, M.A. & DAVIES, P.J. Separation and Quantitation of Polyamines in Plant Tissue by High Performance Liquid Chromatography of Their Dansyl Derivatives. **Plant Physiol**, New York, v. 78, p. 89-91, 1985.

SODA, K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 30:95, p. 1-9, 2011.

SUGIURA, K. et al. Rapid, sensitive and simultaneous determination of fluorescence-labeled polyamines in human hair by high-pressure liquid chromatography coupled with electrospray-ionization time-of-flight mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1205, p. 94-102, 2008.

TETI, D.; VISALLI, M. & McNAIR, H. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. **J Chromatogr B**, v. 781, p. 107-149, 2002.

VANDEMARK, F.L.; SCHMIDT, G.J. & SLAVIN, W. Determination of polyamines by liquid chromatography and precolumn labeling for fluorescence detection. **J Chromatogr Sci**, v. 16, p. 465-469, 1978.

VENZA, M. et al. Determination of polyamines in human saliva by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J Chromatogr B**, v. 757, p. 111-117, 2001.

WALLACE, HM. & CASLAKE, N. Polyamines and colon cancer. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 13, p. 1033-1039, 2001.

WOSTER, PM. Polyamine structure and synthetic analogs. In:_____.WANG, J.Y. & CASERO JR, R.A. **Polyamine Cell Signalling**. Humana Press, Totowa, 2006. cap. 1, p. 3-24.

YUN, Z. & ZHANG, R. HPLC determination of polyamines in the femtomole range. **Biomed Chromatogr**, v. 2, p. 173-176, 1987.

G633p *Gomes, Danilo Macêdo.*

Poliaminas em amostras biológicas humanas: importância e métodos de detecção / Danilo Macêdo Gomes. - - João Pessoa: [s.n.], 2013.

30f.: il. -

Orientador: Eduardo de Jesus Oliveira.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.