



Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Determinação de Hidroxipireno em Líquido Amniótico

Priscila Graffetti¹, Paula Boeira¹, Bianca Leonardi², Aline Rigon Zimmer², Pedro Froelich², Flavia Valladão Thiesen¹ (orientador).

¹Faculdade de Farmácia, PUCRS, ² Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Resumo

Objetivo: Desenvolver e validar uma metodologia para determinação de hidroxipireno em líquido amniótico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de fluorescência (CLAE-DF).

Descrição: Validação do método para detecção de hidroxipireno em líquido amniótico, a fim de verificar a exposição de recém-nascidos a compostos carcinogênicos oriundos da combustão de cigarros durante o período fetal.

Metodologia: Foram preparados calibradores de hidroxipireno em líquido amniótico em concentrações de 0,25 a 15,0 ng/mL (n=8). Uma alíquota de 2,0 mL de líquido amniótico foi pipetada em tubos de 9 mL, foram adicionados 2,0 mL de tampão acetato pH 5,0 e 20 uL de enzima β -glicuronidase. Os tubos foram agitados por 30 segundos e incubados a 37°C por 2 horas. A seguir, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e foram adicionados 4,0 mL de éter etílico. As soluções foram homogeneizadas por inversão, agitadas por 1 minuto e centrifugadas. Após, a fase orgânica foi transferida para frasco evaporador. Repetiram-se os passos da extração e a fase orgânica foi transferida para o mesmo frasco evaporador. Evaporaram-se as amostras sob corrente de ar comprimido a 37°C, o extrato seco foi reconstituído com 250 uL de metanol HPLC e 50 uL deste extrato foi injetado no CLAE-DF. Foram testados dois solventes de extração (acetato de etila e éter etílico), dois tempos de incubação com a enzima β -glicuronidase (2 e 4 horas) e dois volumes de solvente para extração (2x2 mL e 2x4 mL de éter). Foram avaliadas a linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, recuperação, robustez e sensibilidade do método.

Resultados: Foi possível a separação dos analitos em corrida cromatográfica de 30 minutos, com tempo de retenção de 4,0 minutos para o hidroxipireno. A curva de calibração apresentou linearidade adequada com $r = 0,997$. Os valores de precisão intermediária CV(%) foram de 8,7 a 10,4, recuperação de 96 a 99,6%, limite de quantificação de 0,19 ng/mL e de detecção de 0,06 ng/mL. Os testes com solventes mostraram que a extração com éter 2x4 mL foi mais eficiente e os de tempo de incubação não apresentaram diferença. Para análise da robustez foram testadas quatro marcas diferentes de éter etílico na extração, sendo que duas marcas apresentaram eficiência de extração inferior.

Considerações finais: Está sendo desenvolvido um método simples, rápido e de baixo custo, que poderá ser utilizado para a quantificação hidroxipireno em líquido amniótico.

APOIO: FAPERGS e CNPq