



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

---

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fígado humano em tons de rosa e laranja, com uma veia amarela visível, servindo como fundo para o título.

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA  
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SEQÜÊNCIA  
PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE RETINOL E ÁCIDO  
RETINÓICO EM PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA**

EDLAINE RIJO COSTA

Rio de Janeiro

2010



**EDLAINE RIJO COSTA**

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA  
DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SEQUÊNCIA  
PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE RETINOL E ÁCIDO RETINÓICO EM  
PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas da Faculdade  
de Farmácia da Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, como parte dos  
requisitos necessários à obtenção do  
título de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ CARLOS SARAIVA GONÇALVES

Rio de Janeiro

2010

C837d

Costa, Edlaine Rijo.

Desenvolvimento e validação de método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em seqüência para quantificação simultânea de retinol e ácido retinóico em pacientes com doença hepática crônica/ Edlaine Rijo Costa; orientador José Carlos Saraiva Gonçalves. – Rio de Janeiro: UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2010. xix, 149f. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Quantificação. 2. Retinol. 3. Ácido retinóico. 4. EFS-CLAE-EMS. 5. Doença hepática crônica. I. Gonçalves, José Carlos Saraiva. II. Título.

CDD 615.19

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA  
DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SEQUÊNCIA  
PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE RETINOL E ÁCIDO RETINÓICO EM  
PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA

EDLAINE RIJO COSTA

ORIENTADOR:

---

Prof. Dr. José Carlos Saraiva Gonçalves  
Faculdade de Farmácia - UFRJ

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Antônio Jorge Ribeiro da Silva  
Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais – UFRJ

---

Profa. Dra. Elisabete Pereira dos Santos  
Faculdade de Farmácia - UFRJ

---

Profa. Dra. Renata de Mello Perez  
Faculdade de Medicina - UFRJ

---

*Aos meus pais, Rosângela e Egidio,  
responsáveis pelos meus valores,  
meu agradecimento por estarem  
sempre ao meu lado mostrando o  
caminho correto a seguir. Amo  
vocês!*

---

---

*Ao meu orientador, chefe e amigo,  
Prof. Gaúcho, pela dedicação,  
incentivo e confiança, que me  
fizeram crescer não só  
cientificamente, mas também  
contribuindo na minha formação  
pessoal, meu eterno  
agradecimento.*

---

---

*“Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amor à vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que nos fora ensinado pelo tempo afora. Lembraria dos erros que foram cometidos, como sinais para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável: além do pão, o trabalho e a ação. E, quando tudo mais faltasse, para você eu deixaria, se pudesse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta para encontrar a saída”.*

*Mahatma Ghandi*

---

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, luz e caminho durante todo esse trabalho.*

*Aos meus irmãos, Elaine, Eduardo e Elan, meu cunhado Daniel e minha sobrinha Maria Eduarda que são a base da minha vida, meus eternos amores, pelo apoio incondicional e por sempre estarem torcendo e vibrando com minhas conquistas. Amo vocês.*

*Ao meu “amor”, Thiago Luiz, por todos esses anos de apoio, carinho, admiração e compreensão. Com você ao meu lado, essa longa caminhada tornou-se muito mais suave. Te amo demais.*

*A minha avó Lucinda e meus tios Léia e Eliezer, presenças constantes em minha vida, por estarem sempre tão preocupados comigo e contribuindo para meu crescimento.*

*À Profa. Dra. Wilza Arantes Ferreira Peres, por compartilhar o projeto dos retinóides comigo, por todas as dicas e ajuda no desenvolvimento e na estatística deste trabalho. Muito Obrigada!*

*À amiga Gabriela Villaça Chaves, doutoranda da Clínica Médica, pela sua busca incansável por novos pacientes para esse projeto e por toda sua disponibilidade em me ajudar todas as vezes que precisei. Muito obrigada!*

*À Profa. Dra. Rita Estrela, por compartilhar conhecimentos, experiências, dicas e conselhos fundamentais à realização deste trabalho e ao meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por estar sempre disponível para me ajudar e por estar ao meu lado nos momentos de desespero.*

*Às Profas. Dras. Elisabete Pereira dos Santos e Valéria Pereira de Sousa, minha Comissão de Acompanhamento, por toda ajuda e sugestões para o melhor desenvolvimento deste trabalho.*

*Às amigas, Claudia Silvana e Luiza Vargens, minhas fiéis escudeiras, pela amizade, lealdade, ajuda e carinho tão necessários em minha vida. Obrigada por todos os dias de papo “Marisa”. Amo vocês!!*

*À amiga, Maria Angélica, por ter acompanhado meu trabalho desde o início, estando sempre me incentivando e ajudando em todos os momentos que precisei. Adoro você!*

*Aos amigos, Renata e Douglas, por entenderem minhas ausências e mesmo de longe estarem torcendo pelas minhas vitórias.*

*À amiga Luciana Figueiredo do Nascimento, por ter sido pessoa tão fundamental em todos os momentos. Te amo muito, amiga! Você sempre será uma diva! Saudades!*

*Ao amigo Adler Paiva, por estar ao meu lado no momento em que mais precisei, me ensinando que na vida é necessário ter “talento” para vencer.*

*Ao amigo Gustavo Calil, “Padrão Sinc”, por todos os ensinamentos sobre EFS e por sempre me ajudar nas horas de desespero com o equipamento. Muito obrigada!*

*Ao Prof. Dr. François Germain Noël, por entender minhas ausências no laboratório e por permitir que eu utilizasse as instalações do PBF para realização deste trabalho.*

*Aos amigos do PBF, Alessandra, Daylane, Eliana, Joice, Marcelo e Mary Barros, pelo apoio e amizade sem os quais a realização deste trabalho seria impraticável. Obrigada por todos os momentos de descontração!*

*À amiga Deborah Quintanilha, por todos os ensinamentos durante nossos anos de convivência e pelo estímulo ao ingresso na vida acadêmica.*

*Aos pesquisadores e alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por todos os momentos agradáveis que passamos juntos e por todo apoio durante a realização deste trabalho.*

*Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, Thiago Meyer e Marcelo Araujo, pela convivência nesse período de aprendizado e por toda ajuda na parte “burocrática” do mestrado.*

*A todos os professores participantes da banca examinadora por terem aceitado o convite para a melhora deste trabalho.*

*Em especial a todos os pacientes do setor de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF por permitirem que esse trabalho se tornasse uma realidade.*

---

## RESUMO

COSTA, Edlaine Rijo. **Desenvolvimento e Validação de Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas em Seqüência para Quantificação Simultânea de Retinol e Ácido Retinóico em Pacientes com Doença Hepática Crônica.** Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Este trabalho consistiu no desenvolvimento e validação de um método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Seqüência (CLAE-EMS) que foi empregado na quantificação simultânea dos níveis séricos de retinol e ácido retinóico em pacientes com doença hepática crônica. A razão entre as concentrações séricas destes retinóides foi investigada como potencial biomarcador de dano hepático.

A extração em fase sólida em linha foi utilizada para isolar os analitos a partir da matriz biológica, seguida pela injeção direta dos extratos na coluna ACE AQ® C18 15 cm x 4,6 mm x 5 µm com eluição isocrática, utilizando como fase móvel 95% de uma mistura de acetonitrila:metanol (55:45 v/v) e 5% de tampão acetato de amônio 0,01 M pH 6,9, ambas com adição de 0,1% de ácido fórmico. Foi utilizado, como padrão interno, o acetato de retinila. Os retinóides foram quantificados em monitoramento das reações múltiplas (MRM), em modo eletrospray positivo, utilizando as transições  $m/z$  269 → 93, para o retinol e  $m/z$  301 → 205, para o ácido retinóico. A validação seguiu os parâmetros preconizados pela Resolução-RE Nº 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, tendo o método apresentado precisão, exatidão, linearidade e limite de quantificação adequados à aplicabilidade do mesmo.

---

As concentrações séricas de retinol, ácido retinóico e a razão entre as concentrações destes retinóides foram determinadas cinco e sete horas após a administração de uma dose de 1500 UI ou 2500 UI de palmitato de retinila e foram correlacionadas com marcadores de lesão hepática, alanina aminotransferase – ALT e aspartato aminotransferase – AST, e de função hepática, tempo e atividade de protrombina – TAP, bilirrubina total – BT e albumina.

Os níveis séricos de retinol se correlacionaram negativa e significativamente com BT ( $p=0,038$ ), no tempo de cinco horas após a administração da dose de 2500 UI de palmitato de retinila. A razão retinol / ácido retinóico séricos se correlacionou negativa e significativamente com as concentrações de albumina sérica nos tempos de cinco e sete horas ( $p=0,047$  e  $p=0,023$ , respectivamente), após a dose de 2500 UI de palmitato de retinila e, também, positivamente com os níveis séricos de ALT e AST ( $p=0,021$  e  $p=0,041$ , respectivamente), no tempo de cinco horas após a dose de 2500 UI, apresentando-se como um potencial marcador de função e lesão hepatocelular em pacientes com doença hepática crônica.

---

## ABSTRACT

COSTA, Edlaine Rijo. **Development and Validation of method by High Performance Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry for Simultaneous Quantification of Retinol and Retinoic Acid in Patients with Chronic Liver Disease.** Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

This work consisted in the development and validation of a method by High Performance Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS) that was used in the simultaneous quantification of the serum levels of retinol and retinoic acid in patients with chronic liver disease. The ratio between the serum concentrations of these retinoids was investigated as potential biomarker of hepatic damage.

The on-line solid phase extraction was used to isolate the analytes from the biological matrix, followed by the direct injection of extracts into an ACE AQ® C18 15 cm x 4.6 mm x 5µm column with isocratic elution, using as mobile phase 95% of a mixture of acetonitrile: methanol (55:45 v/v) and 5% of 0.01 M ammonium acetate buffer pH 6.9, both with the addition of 0.1% formic acid. It was used, as internal standard, the retinyl acetate. Retinoids were quantified in multiple reaction monitoring (MRM) with positive electrospray, using  $m/z$  269 → 93 transition for retinol and,  $m/z$  301 → 205 transition for retinoic acid. The validation followed the parameters established by Resolution number 899 of May 29<sup>th</sup>, 2003 of the National Agency of Sanitary Surveillance. The method presented precision, accuracy, linearity and limit of quantification appropriate for its applicability.

---

The serum concentrations of retinol, retinoic acid and the ratio between concentrations of these retinoids were determined five and seven hours after administration of a dose of 1500 IU or 2500 IU of retinyl palmitate and were correlated with markers of liver injury, alanine aminotransferase – ALT and aspartate aminotransferase - AST and, markers of liver function, prothrombin time and activity – PTA, total bilirubin – TB and albumin.

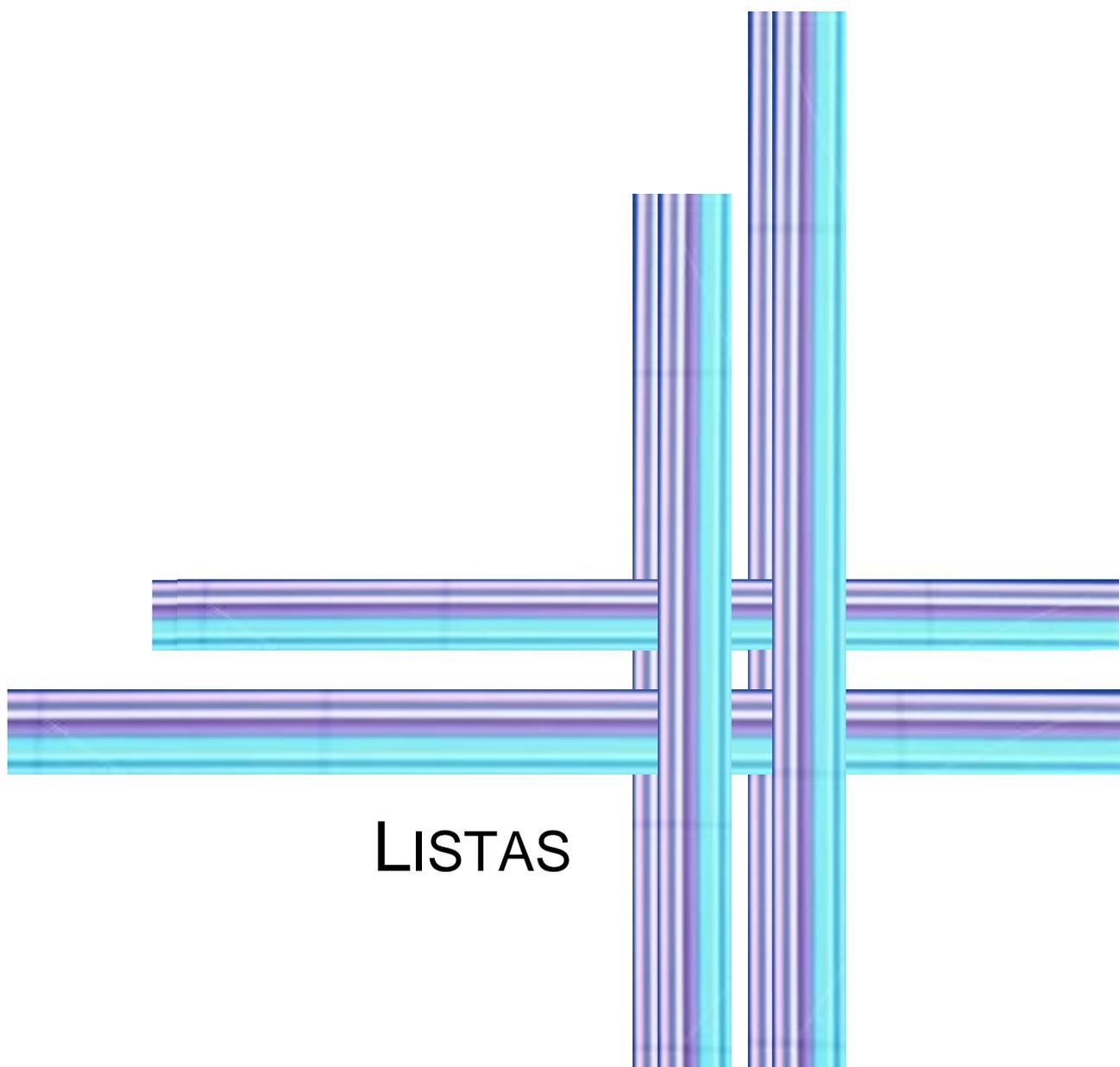
Serum levels of retinol were significantly and negatively correlated with TB ( $p=0.038$ ), in the time of five hours after the administration of a dose of 2500 IU of retinyl palmitate. The ratio retinol / retinoic acid was significantly and negatively correlated with the concentrations of serum albumin in times of five and seven hours ( $p=0.047$  and  $p=0.023$ , respectively), after the dose of 2500 IU of retinyl palmitate and, also, positively correlated with serum levels of ALT and AST ( $p=0.021$  and  $p=0.041$ , respectively), in the time of five hours after the dose of 2500 IU, presenting as a potential marker of hepatocellular injury and function in patients with chronic liver disease.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	iv
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	vii
<b>RESUMO.....</b>	ix
<b>ABSTRACT.....</b>	xi
<b>SUMÁRIO.....</b>	xiii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	xvi
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	xxi
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	xxii
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	xxiii
<b>LISTA DE ANEXOS.....</b>	xxvii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	28
1.1. Doença Hepática Crônica – Hepatite, Cirrose Hepática e CHC.....	29
1.2. Fígado e Retinóides.....	38
1.3. Métodos de Avaliação de Lesão e Função Hepática.....	44
1.4. Retinóides como Biomarcadores de Patologias.....	52
1.5. Métodos Analíticos para Quantificação de Retinóides Séricos.....	53
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	67
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	70
3.1. Objetivo Principal.....	71
3.2. Objetivos Secundários.....	71
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	72
4.1. Desenho do Estudo.....	73
4.2. Aspectos Éticos.....	75
4.3. Recrutamento de Pacientes.....	75
4.4. Instrumento de Coleta de Dados.....	76
4.5. Classificação da Gravidade da Cirrose Hepática.....	76

---

4.6. Exames Bioquímicos.....	77
4.7. Metodologia da Etapa Analítica.....	78
4.8. Preparo de Amostras dos Pacientes para Quantificação.....	87
4.9. Análise Estatística.....	87
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>89</b>
5.1. Resultados da Etapa Analítica.....	90
5.2. Resultados da Etapa Clínica.....	114
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>122</b>
6.1. Discussão da Etapa Analítica.....	123
6.2. Discussão da Etapa Clínica.....	126
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>131</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>133</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>138</b>



LISTAS

---

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AH – ácido hialurônico

ALT – alanina aminotransferase

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

API – do inglês, “atmospheric pressure ionization”, ou ionização à pressão atmosférica

APCI – do inglês “atmospheric pressure chemical ionization”, ou ionização química à pressão atmosférica

APPI – do inglês, “atmospheric pressure photoionization”, ou fotoionização à pressão atmosférica

AST – aspartato aminotransferase

BT – bilirrubina total

CG – cromatografia gasosa

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CHC – carcinoma hepatocelular

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-EM – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

CLAE-EMS – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em seqüência

CLAE-UV – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta

CQ – controle de qualidade

CQ\_CA – controle de qualidade de concentração alta

CQ\_CB – controle de qualidade de concentração baixa

CQ\_CM – controle de qualidade de concentração média

CRBP II – do inglês “cellular retinol binding-protein II”, ou proteína celular ligadora de retinol

CV – coeficiente de variação

CMD – concentração média determinada

DP – desvio padrão

DPR – desvio padrão relativo

EFS – extração em fase sólida

EFS-CLAE-EMS – extração em fase sólida em linha com cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em seqüência

EH – encefalopatia hepática

EHA – esteato-hepatite alcoólica

EHNA – esteato-hepatite não alcoólica

ELL – extração líquido-líquido

EM – espectrometria de massas

EPP – extração por precipitação de proteínas

EROS – espécies reativas de oxigênio

ESI – do inglês “electrospray ionization”, ou ionização por eletrospray

ET – endotelina

FA – fosfatase alcalina

FM – fase móvel

GGT – gamaglutariltransferase

HCl – ácido clorídrico

HUCFF – Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

IGF – do inglês, “insulin-like grown factor”, ou fator de crescimento tipo insulina

IL – interleucina

Inmetro – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

INR – do inglês, “international normalized ratio”, razão normalizada internacional

IUPAC – “International Union of Pure and Applied Chemistry”

ITMP – inibidor tecidual de metaloproteinases

ITMP-1 – inibidor tecidual de metaloproteinases tipo 1

KOH – hidróxido de potássio

LD – limite de detecção

LIQ – limite inferior de quantificação

LRAT – do inglês, “lecithin:retinol acyltransferase”, ou lecitina:retinol aciltransferase

LSQ – limite superior de quantificação

MCP-1 – do inglês, “monocyte chemotactic protein-1”, ou proteína quimiotática para monócitos 1

M-CSF – do inglês, “macrophage colony stimulating factor”, ou fator estimulador de colônia para macrófago

ME – matriz extracelular

Medline – “United States National Library of Medicine”

MPM – metaloproteinases de matriz

MRM – do inglês, “multiple reaction monitoring”, ou monitoramento das reações múltiplas

MTBE – metil-tert-butil-éter

*m/z* – relação massa/carga

OMS – Organização Mundial de Saúde

PI – padrão interno

PIIINP – do inglês, “procollagen type III amino-terminal peptide”, ou peptídeo N-terminal de pré-colágeno tipo III

PDGF – do inglês, “platelet derived growth factor”, ou fator de crescimento derivado de plaqueta

QM – quilomícrons

QMr – quilomícrons remanescentes

RBP – do inglês, “retinol-binding protein”, ou proteína carreadora de retinol

RDR – resposta relativa à dose

REH – do inglês, “retinyl ester hydrolases”, ou hidrolases de ésteres de retinila

RMN – ressonância magnética nuclear

TAP – tempo e atividade de protrombina

TGF- $\alpha$  – do inglês, “transforming growth factor- $\alpha$ ”, ou fator de crescimento transformador alfa

TGF- $\beta$  – do inglês, “transforming growth factor- $\beta$ ”, ou fator de crescimento transformador beta

TNF- $\alpha$  – do inglês, “tumor necrosis factor- $\alpha$ ”, ou fator de necrose tumoral alfa

UI – unidade internacional

UV – ultravioleta

---

VHA – vírus da hepatite A

VHB – vírus da hepatite B

VHC – vírus da hepatite C

VHD – vírus da hepatite D

VHE – vírus da hepatite E

## FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Mapa de prevalência mundial de Hepatite C.....	32
<b>Figura 2</b>	Mapa de prevalência mundial de Hepatite B.....	32
<b>Figura 3</b>	Mapa de prevalência de Hepatite B no Brasil, segundo unidade federada.....	33
<b>Figura 4</b>	Mudanças na arquitetura hepática normal associada com fibrose hepática avançada.....	35
<b>Figura 5</b>	Sequência patogênica de ativação fibrogênica das células estreladas hepáticas a miofibroblastos, levando a fibrose e cirrose.....	37
<b>Figura 6</b>	Estrutura química do retinol – vitamina A, retinaldeído e ácido retinóico.....	39
<b>Figura 7</b>	Absorção, transporte e metabolismo de retinóides.....	41
<b>Figura 8</b>	Esquema do espectrômetro de massas triplo quadrupolo.....	55
<b>Figura 9</b>	Esquema do modo de ionização por ESI.....	56
<b>Figura 10</b>	Etapas da extração em fase sólida.....	59
<b>Figura 11</b>	Organograma do desenho do estudo.....	73
<b>Figura 12</b>	Fragmentograma do retinol.....	91
<b>Figura 13</b>	Esquema de fragmentação proposto para molécula de retinol.....	91
<b>Figura 14</b>	Fragmentograma do ácido retinóico.....	92
<b>Figura 15</b>	Esquema de fragmentação proposto para a molécula do ácido retinóico.....	92
<b>Figura 16</b>	Cromatograma obtido após injeção direta de solução de palmitato de retinila 200 ng/mL.....	95
<b>Figura 17</b>	Cromatograma obtido após EFS de soro enriquecido com palmitato de retinila 200 ng/mL.....	95
<b>Figura 18</b>	Cromatograma, em modo MRM, obtido de amostra de soro de paciente com cirrose Child A, no tempo de colheita de 0h, submetida à EFS e monitorando as transições $m/z$ 269→93 para retinol (Tr=5,24 min) e PI (Tr=6,03 min) e $m/z$ 301→205 para ácido retinóico (Tr=5,08 min).....	96

## QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Mediadores parácrinos envolvidos na ativação da célula estrelada hepática.....	38
<b>Quadro 2</b>	Classificação histológica de fibrose hepática – modelo de Ishak.....	45
<b>Quadro 3</b>	Classificação da gravidade da doença hepática de acordo com o critério de Child & Pugh.....	76
<b>Quadro 4</b>	Estágios de encefalopatia hepática.....	77
<b>Quadro 5</b>	Valores de referência dos parâmetros de normalidade dos exames bioquímicos realizados no HUCFF.....	77
<b>Quadro 6</b>	Monitorização em modo MRM do retinol, ácido retinóico e acetato de retinila.....	90

## TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do retinol – ROH – Dia 1.....	97
<b>Tabela 2</b>	Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do ácido retinóico – RCOOH – Dia 1.....	97
<b>Tabela 3</b>	Precisão e exatidão do retinol – ROH e ácido retinóico – RCOOH – Dia 1: valores nominais e experimentais das seis réplicas das amostras controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CB), média (CM) e alta (CA).....	98
<b>Tabela 4</b>	Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do retinol – ROH – Dia 2.....	98
<b>Tabela 5</b>	Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do ácido retinóico – RCOOH – Dia 2.....	99
<b>Tabela 6</b>	Precisão e exatidão do retinol – ROH e ácido retinóico – RCOOH – Dia 2: valores nominais e experimentais das seis réplicas das amostras controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CB), média (CM) e alta (CA).....	99
<b>Tabela 7</b>	Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do retinol – ROH – Dia 3.....	100
<b>Tabela 8</b>	Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do ácido retinóico – RCOOH – Dia 3.....	100
<b>Tabela 9</b>	Precisão e exatidão do retinol – ROH e ácido retinóico – RCOOH – Dia 3: valores nominais e experimentais das seis réplicas das amostras controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CB), média (CM) e alta (CA).....	101
<b>Tabela 10</b>	Precisão e exatidão interdias para retinol em matriz biológica.....	101
<b>Tabela 11</b>	Precisão e exatidão interdias para ácido retinóico em matriz biológica.....	102
<b>Tabela 12</b>	Precisão e exatidão do retinol – ROH 60 ng/mL e ácido retinóico – RCOOH 1 ng/mL para determinação de limite de quantificação: valores nominais e experimentais de cinco réplicas.....	103

<b>Tabela 13</b>	Área dos sinais cromatográficos correspondentes às amostras controle de retinol obtidas por injeção direta de solução e por extração em fase sólida de soro para cálculo de índice de recuperação.....	104
<b>Tabela 14</b>	Área dos sinais cromatográficos correspondentes às amostras controle de ácido retinóico obtidas por injeção direta de solução e por extração em fase sólida de soro para cálculo de índice de recuperação.....	104
<b>Tabela 15</b>	Área dos sinais cromatográficos correspondentes às amostras de PI obtidas por injeção direta de solução e por extração em fase sólida de soro para cálculo de índice de recuperação.....	105
<b>Tabela 16</b>	Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular estabilidade de soluções-padrão de retinol.....	106
<b>Tabela 17</b>	Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular estabilidade de soluções-padrão de ácido retinóico.....	106
<b>Tabela 18</b>	Estabilidade de soluções de retinol e ácido retinóico: valores nominais e experimentais das três réplicas das amostras controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CB) e alta (CA).....	107
<b>Tabela 19</b>	Valores de concentrações de retinol e ácido retinóico em amostras submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento e recém-preparadas para cálculo de estabilidade.....	108
<b>Tabela 20</b>	Valores de concentrações de retinol e ácido retinóico em amostras deixadas em condições laboratoriais por 8h e recém-preparadas para cálculo de estabilidade de curta duração.....	108
<b>Tabela 21</b>	Valores de concentrações de retinol e ácido retinóico em amostras deixadas no injetor por 22h e recém-preparadas para cálculo de estabilidade pós-processamento.....	109
<b>Tabela 22</b>	Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do retinol (ROH) em solução – Dia 1.....	110
<b>Tabela 23</b>	Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do ácido retinóico (RCOOH) em solução – Dia 1.....	110
<b>Tabela 24</b>	Precisão e exatidão do retinol – ROH e ácido retinóico – RCOOH em solução – Dia 1: valores nominais e experimentais das três réplicas das amostras controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CB), média (CM) e alta (CA).....	111

<b>Tabela 25</b>	Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do retinol (ROH) em solução – Dia 2.....	111
<b>Tabela 26</b>	Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do ácido retinóico (RCOOH) em solução – Dia 2.....	112
<b>Tabela 27</b>	Precisão e exatidão do retinol – ROH e ácido retinóico – RCOOH em solução – Dia 2: valores nominais e experimentais das três réplicas das amostras controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CB), média (CM) e alta (CA).....	112
<b>Tabela 28</b>	Precisão e exatidão interdias para solução de retinol.....	113
<b>Tabela 29</b>	Precisão e exatidão interdias para solução de ácido retinóico.....	113
<b>Tabela 30</b>	Estabilidade de soluções de retinol e ácido retinóico nas condições de análise: valores nominais e experimentais das três réplicas das amostras controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CB) e alta (CA).....	114
<b>Tabela 31</b>	Comparação do retinol sérico basal entre sexo masculino e feminino.....	115
<b>Tabela 32</b>	Comparação do ácido retinóico sérico basal entre sexo masculino e feminino.....	115
<b>Tabela 33</b>	Distribuição da amostra segundo etiologia da doença e sexo.....	115
<b>Tabela 34</b>	Comparação da concentração sérica basal (T0) de retinol entre pacientes que receberam suplementação de 1500 UI e 2500 UI e das concentrações séricas de retinol obtidas após o recebimento da dose de palmitato de retinila nos tempos de cinco (T5) e 7 horas (T7).....	116
<b>Tabela 35</b>	Comparação da concentração sérica basal (T0) de ácido retinóico entre pacientes que receberam suplementação de 1500 UI e 2500 UI e das concentrações séricas de ácido retinóico obtidas após o recebimento da dose de palmitato de retinila nos tempos de cinco (T5) e 7 horas (T7).....	117
<b>Tabela 36</b>	Comparação da concentração sérica basal (T0) da razão retinol/ácido retinóico entre pacientes que receberam suplementação de 1500 UI e 2500 UI e das concentrações séricas da razão retinol/ácido retinóico obtidas após o recebimento da dose de palmitato de retinila nos tempos de cinco (T5) e sete horas (T7).....	117
<b>Tabela 37</b>	Correlação entre marcadores bioquímicos e concentrações séricas de retinol, ácido retinóico e razão retinol/ácido retinóico nos tempos de cinco (T5) e sete (T7) horas após a administração de 1500 UI de palmitato de retinila.....	118

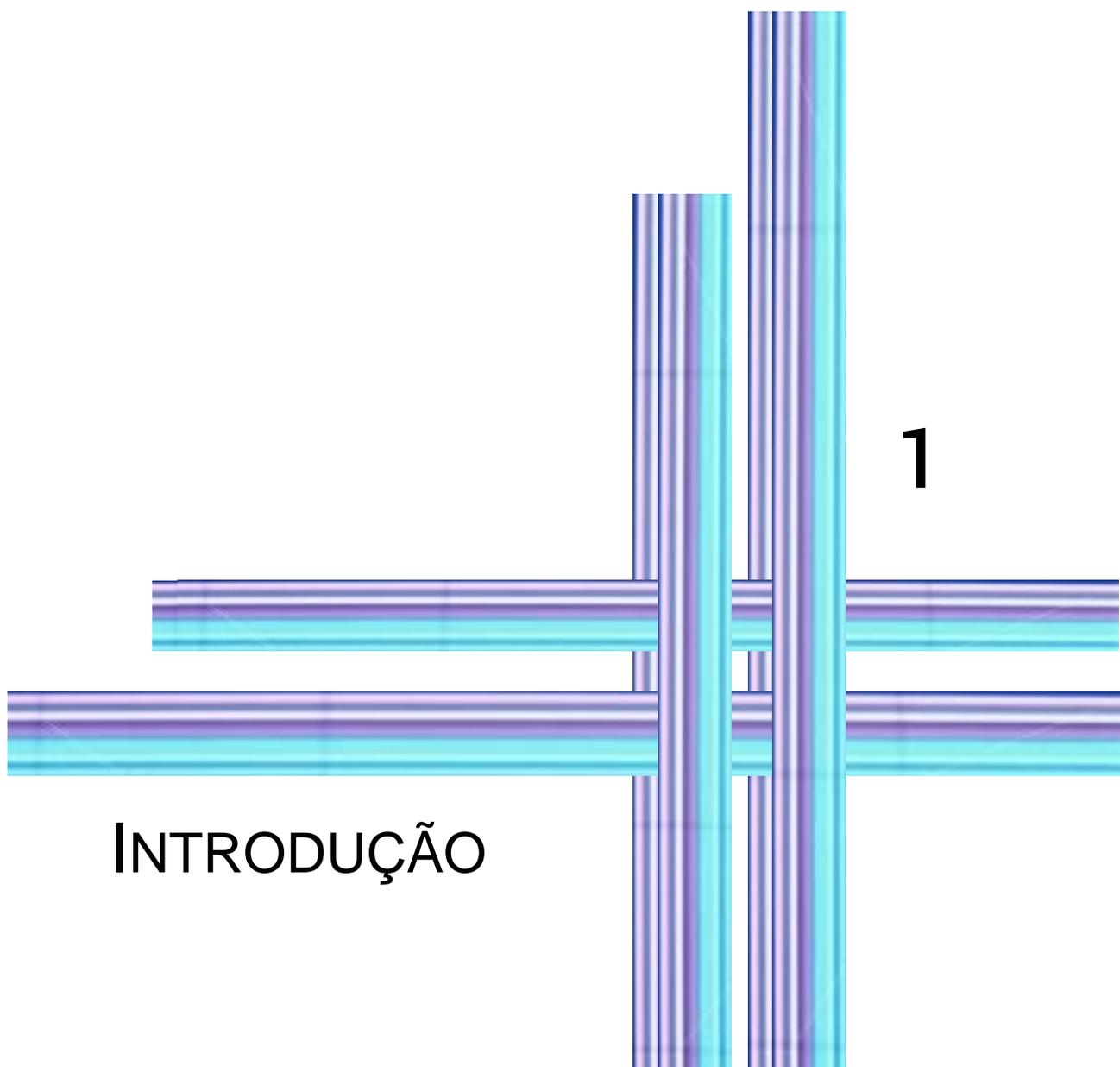
---

<b>Tabela 38</b>	Correlação entre marcadores bioquímicos e concentrações séricas de retinol no tempo de cinco horas (T5) após a administração de 2500 UI de palmitato de retinila.....	119
<b>Tabela 39</b>	Correlação entre marcadores bioquímicos e concentrações séricas de ácido retinóico no tempo de cinco horas (T5) após a administração de 2500 UI de palmitato de retinila.....	119
<b>Tabela 40</b>	Correlação entre marcadores bioquímicos e concentrações séricas da razão retinol/ácido retinóico no tempo de cinco horas (T5) após a administração de 2500 UI de palmitato de retinila.....	120
<b>Tabela 41</b>	Correlação entre marcadores bioquímicos e concentrações séricas de retinol no tempo de sete horas (T7) após a administração de 2500 UI de palmitato de retinila.....	121
<b>Tabela 42</b>	Correlação entre marcadores bioquímicos e concentrações séricas de ácido retinóico no tempo de sete horas (T7) após a administração de 2500 UI de palmitato de retinila.....	121
<b>Tabela 43</b>	Correlação entre marcadores bioquímicos e concentrações séricas da razão retinol/ácido retinóico no tempo de sete horas (T7) após a administração de 2500 UI de palmitato de retinila.....	121

---

**ANEXOS**

<b>Anexo 1</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	134
<b>Anexo 2</b>	Instrumento de Coleta de Dados.....	135
<b>Anexo 3</b>	Comprovante de Submissão de Artigo para Revista Científica.....	137



INTRODUÇÃO

1

## **1.1 Doença Hepática Crônica – Hepatite, Cirrose Hepática e Carcinoma Hepatocelular**

### **1.1.1 Definições**

Hepatite, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é uma inflamação do fígado mais freqüentemente causada por infecção viral.

As hepatites virais são doenças provocadas por diferentes agentes etiológicos, sendo os mais relevantes, o vírus da hepatite A (VHA), o vírus da hepatite B (VHB), o vírus da hepatite C (VHC), o vírus da hepatite D (VHD) e o vírus da hepatite E (VHE). Esses vírus apresentam tropismo primário pelo tecido hepático e características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais distintas (BRASIL, 2005a, 2008a).

Quando a reação inflamatória do fígado, nos casos agudos sintomáticos ou assintomáticos, persiste por mais de seis meses, considera-se que a infecção está evoluindo para a forma crônica (BRASIL, 2005a). Os sintomas, quando presentes, são inespecíficos, predominando fadiga, mal-estar geral e sintomas digestivos. Somente 20 a 40% dos casos têm história prévia de hepatite aguda sintomática. Em uma parcela dos casos crônicos, após anos de evolução, pode aparecer cirrose, com surgimento de icterícia, edema, ascite, varizes de esôfago e alterações hematológicas (BRASIL, 2005c).

Geralmente, o tratamento das hepatites A e E resulta em recuperação completa, não existindo casos de hepatite crônica pelo VHA e VHE. Os vírus B, C e D são aqueles que têm a possibilidade de cronificar.

A freqüência de cronificação é influenciada pela idade em que o paciente se infecta. Aproximadamente 90% dos neonatos e 50% das crianças se tornarão cronicamente infectadas pelo VHB, enquanto que em pessoas adultas infectadas com o mesmo vírus, 5 a 10% evoluem para a forma crônica da doença (BRASIL, 2008a). Já com relação ao VHC, cerca de 80% das pessoas que se infectam, desenvolvem hepatite crônica (BRASIL, 2008b), sendo que, em média, 20 a 25% destas podem evoluir para as formas histológicas graves ou cirrose no período de 20 anos, caso não haja intervenção terapêutica. Dentre os cirróticos cerca de 1-5% desenvolvem câncer primário de fígado (FOCACCIA, 2003).

O alcoolismo é outro fator etiológico bastante comum de hepatopatias crônicas (GONÇALVES *et al.*, 2006; MINCIS & MINCIS, 2006). Existem três formas principais da doença: esteatose hepática, hepatite alcoólica e cirrose, podendo com freqüência as três lesões coexistirem no mesmo paciente, já que representam etapas evolutivas de um mesmo processo patológico. Na primeira etapa, o aspecto histológico característico é a esteatose, depois predominam a necrose e inflamação, com surgimento de fibrose (hepatite alcoólica), que nas fases mais avançadas leva à formação de cirrose (GONÇALVES *et al.*, 2006).

A cirrose hepática é uma doença crônico-degenerativa, considerada o estágio final das diversas hepatopatias crônicas, onde ocorre a conversão da arquitetura hepática normal em nódulos regenerativos no parênquima hepático que são encapsulados por septos fibrosos gerando uma cicatriz (PINZANI & ROMBOUTS, 2004; BRANDÃO *et al.*, 2006; SCHUPPAN & AFDHAL, 2008). Esta cicatriz produz disfunção hepatocelular e bloqueia o fluxo de sangue através do órgão, diminuindo a capacidade que o fígado tem de processar nutrientes, hormônios, fármacos e toxinas, e também reduzindo a capacidade do mesmo em produzir proteínas e outras substâncias, o que resulta em hipertensão portal e insuficiência hepática (BATALLER & BRENNER, 2005; GRESSNER *et al.*, 2007).

O álcool e as hepatites virais B e C permanecem como as principais causas de cirrose em todo o mundo, porém outras etiologias menos freqüentes incluem as causas metabólicas (hemocromatose, Doença de Wilson, deficiência de  $\alpha$ 1-antitripsina, diabetes melito, etc.), os distúrbios auto-imunes (hepatite auto-imune tipo 1 e tipo 2), as colestases crônicas (cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, atresia de vias biliares, etc.), alguns fármacos (amiodarona, metotrexato, oxifenizatina) e a obstrução ao efluxo venoso hepático (doença veno-oclusiva, síndrome de Budd-Chiari, etc.) (FOCACCIA, 2003).

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um dos tumores malignos mais comuns no mundo. Várias causas podem contribuir para seu desenvolvimento, porém um fator comum é sua associação com a doença hepática crônica, mais freqüentemente cirrose, que é observada em cerca de 70-80% dos CHC, sendo esta considerada uma condição pré-neoplásica (OKUDA, 2007).

### **1.1.2 Aspectos Epidemiológicos**

A incidência das hepatites crônicas e cirrose hepática, na população atual, não podem ser exatamente descritas

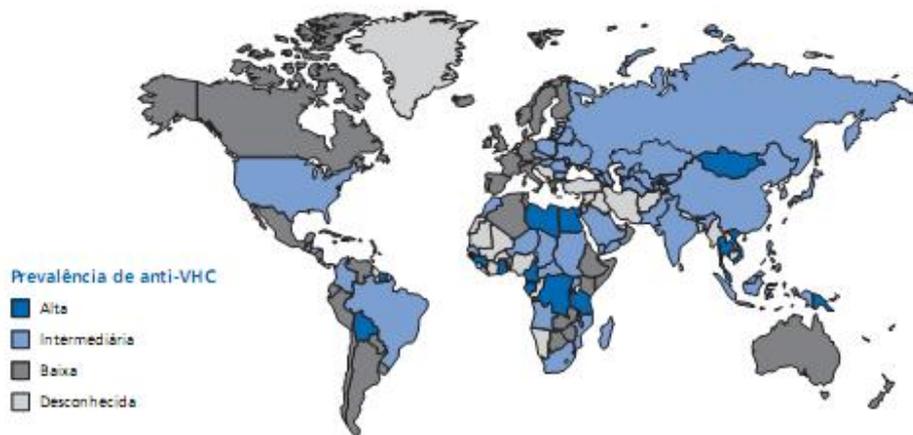
porque essas doenças, muitas vezes, apresentam curso clínico silencioso, podendo permanecer sem apresentar sintomas por um longo período de tempo (VALKOVA, 2002).

Entre as cinco hepatites virais conhecidas, as mais importantes são as causadas pelo VHB e VHC e, isso se deve à combinação de dois fatores, um de natureza epidemiológica e outro de natureza clínica. Epidemiologicamente, a relevância dessas doenças deve-se à larga distribuição geográfica e ao grande número de indivíduos infectados, em praticamente todos os países do mundo. Do ponto de vista clínico, ambas apresentam elevado potencial de cronificação, estando intimamente associadas ao aparecimento de graves afecções hepáticas, destacando-se a cirrose e o carcinoma (PASSOS, 2003).

A distribuição das hepatites virais é universal, sendo que a magnitude dos diferentes tipos varia de região para região, inclusive entre os diferentes estados brasileiros (BRASIL, 2008a).

A OMS estima uma prevalência de cerca de 3% da população mundial ou, aproximadamente, a existência de cerca de 170 milhões de portadores crônicos do VHC (BRASIL, 2005c), fato que tem levado as autoridades de saúde pública a considerar a hepatite C como a grande pandemia do século XXI (PASSOS, 2003).

No Brasil, não se conhece, ao certo, a prevalência da infecção pelo VHC. Com base em dados de hemocentros de pré-doadores de sangue, em 2002, a distribuição variou entre as regiões brasileiras: 0,62% no Norte, 0,55% no Nordeste, 0,28% no Centro-Oeste, 0,43% no Sudeste e 0,46% no Sul. Um dos poucos estudos de base populacional realizado em nosso meio revelou 1,42% de portadores de anti-VHC, na Cidade de São Paulo. O Brasil é considerado um país de endemicidade intermediária para hepatite C (figura 1) (BRASIL, 2008b).

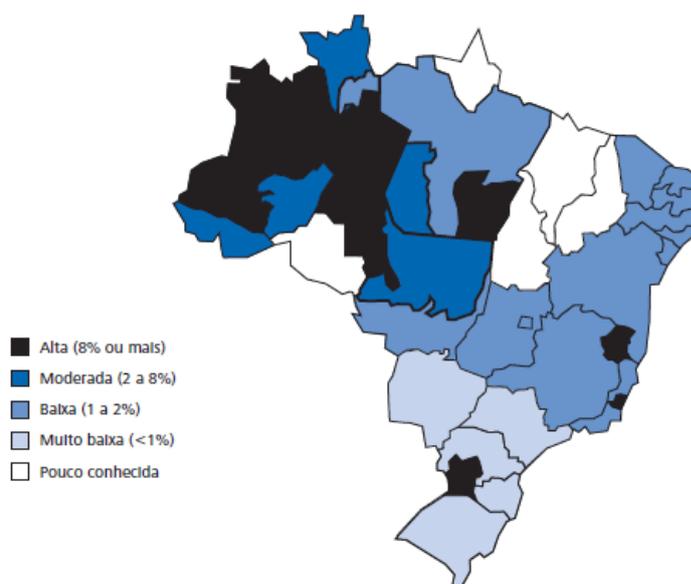


**Figura 1.** Mapa de prevalência mundial de Hepatite C (BRASIL, 2008b).

Estima-se que mais de 2 bilhões de pessoas já foram infectadas pelo VHB em alguma época de suas vidas e que existam cerca de 350 milhões de portadores crônicos da hepatite pelo vírus B em todo o mundo. A prevalência global da infecção crônica pelo VHB varia amplamente, desde regiões de alta prevalência (>8%, na África, Ásia, Pacífico Ocidental e norte do Brasil), média (2-7%, no Leste e Sudeste da Europa, e nordeste do Brasil) até baixa prevalência (<2%, na Europa Ocidental, América do Norte e Austrália, sul e sudeste do Brasil) (Figuras 2 e 3). Em regiões de alta prevalência do VHB, o CHC decorrente desta infecção está entre as três causas mais freqüente de morte por câncer. (FOCACCIA, 2003).



**Figura 2.** Mapa de prevalência mundial de Hepatite B, onde HBsAg é a antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (BRASIL, 2008b).



**Figura 3.** Mapa de prevalência de Hepatite B no Brasil, segundo unidade federada (BRASIL, 2008b).

Com relação à hepatite alcoólica, a maior parte dos casos é assintomática ou oligossintomática, assim a real incidência da mesma é desconhecida. Na literatura, há dados sobre frequência da doença em grupos heterogêneos submetidos à biópsia hepática. Os resultados desses estudos indicam que o álcool pode representar até 50% de todos os casos de cirrose, porém existindo grandes diferenças geográficas. Em estados onde o consumo de álcool é muito grande, a cirrose alcoólica pode representar até 90% de todas as cirroses (VALKOVA, 2002).

O CHC é uma das dez neoplasias malignas mais comuns em todo o mundo, com uma incidência de cerca de quinhentos mil novos casos por ano (CONTE, 2000; DIAS, 2003). Ele também é considerado pela OMS como um importante problema de saúde pública, por ser um dos tumores malignos com maior letalidade e com uma sobrevida extremamente curta.

A incidência do CHC varia muito de acordo com a região do globo terrestre, podendo os países ser divididos em áreas de alta, intermediária e baixa incidência. O Brasil é considerado um país de incidência intermediária (FOCACCIA, 2003).

### 1.1.3 Fibrogênese e Progressão para Cirrose e Carcinoma Hepatocelular

O fígado é formado pelas células parenquimais (hepatócitos) e quatro tipos de células não-parenquimais: as células endoteliais que limitam os sinusóides; as células de Kupffer ou macrófagos hepáticos; células *pit* ou células *natural killer* associadas ao fígado e células estreladas perisinusoidais (BLOMHOFF & WAKE, 1991).

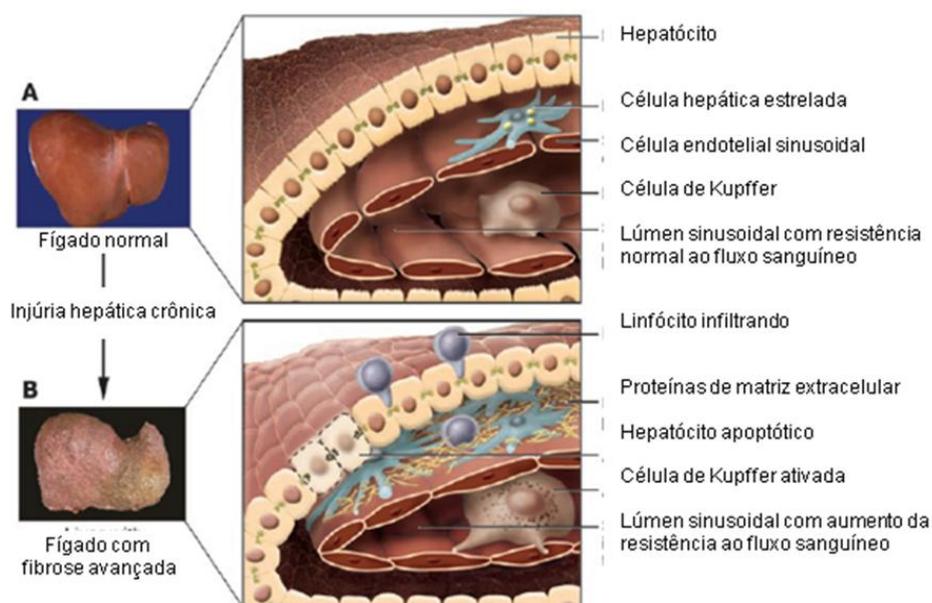
O tecido conectivo do fígado normal consiste de dois componentes básicos: células especializadas e matriz extracelular (ME). O componente celular são os fibroblastos, enquanto que a ME pode ser dividida em estruturas fibrosas e massa interfibrosa amorfa. A ME hepática é formada por três diferentes grupos de macromoléculas:

- colágenos (tipo I, III, IV e VI);
- glicoproteínas não colagenosas (fibronectina, laminina, entactina/nidogênio, tenascina, undulina);
- proteoglicanos (perlecano, sindecano).

Glicosaminoglicanos (ácido hialurônico (AH), sulfato de condroitina e sulfato de dermatano) representam uma parte dos proteoglicanos (VALKOVA, 2002; ROCKEY & FRIEDMAN, 2006).

No fígado, existe ainda o espaço subendotelial de Disse que, é determinado, de um lado, pela superfície não-luminal das células endoteliais dos sinusóides e, do outro lado, sua borda é representada pela membrana dos hepatócitos com microvilosidades (VALKOVA, 2002).

A fibrose hepática é a deposição excessiva de proteínas de ME, que ocorre em muitos tipos de doenças hepáticas. O processo fibrogênico é iniciado através da capilarização dos sinusóides, onde ocorre a redução do número e tamanho dos poros nas células endoteliais; desenvolvimento de membranas basais e acumulação de componentes da ME (colágenos tipos I, III, IV e VI; fibronectina; laminina; AH; tenascina e undulina) no espaço subendotelial de Disse que é conhecida como fibrose perisinusoidal (figura 4) (REEVES & FRIEDMAN, 2002; VALKOVA, 2002; BATALLER & BRENNER, 2005; ROCKEY & FRIEDMAN, 2006; GRESSNER *et al.*, 2007).



**Figura 4.** Mudanças na arquitetura hepática normal (A) associada com fibrose hepática avançada (B) (BATALLER & BRENNER, 2005).

A acumulação de tecido fibrótico no espaço subendotelial de Disse causa deterioração de suprimento de oxigênio e substâncias nutricionais aos hepatócitos, o que pode levar a necrose dos mesmos com intensificação do processo de fibrogênese. A capilarização dos sinusóides limita a troca normal de substâncias entre o plasma e as células hepáticas e, então, representa a principal causa de deterioração dessas células e desenvolvimento de fibrose hepática ou cirrose. Simultaneamente, através de receptores específicos de membrana ocorrem interações entre os componentes da ME e os hepatócitos, o que pode levar a alterações na expressão genética dos mesmos, levando a perda de suas funções. A deposição de colágeno no espaço de Disse leva ao estreitamento do lúmen dos sinusóides e ao aumento da resistência vascular, que contribui para o desenvolvimento da hipertensão portal (GRESSNER *et al.*, 2007).

A fibrogênese hepática culmina com o desenvolvimento da fibrose caracterizado por:

- aumento de 3 a 6 vezes da maioria das moléculas de ME, tanto de natureza colagenosa quanto não-colagenosa;
- elevação desproporcional de alguns componentes da ME, incluindo alguns tipos de colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas estruturais;

- pequenas mudanças na microcomposição de moléculas específicas da ME, por exemplo, o grau de hidroxilação das cadeias alfa do colágeno e o grau de sulfatação dos glicosaminoglicanos e,

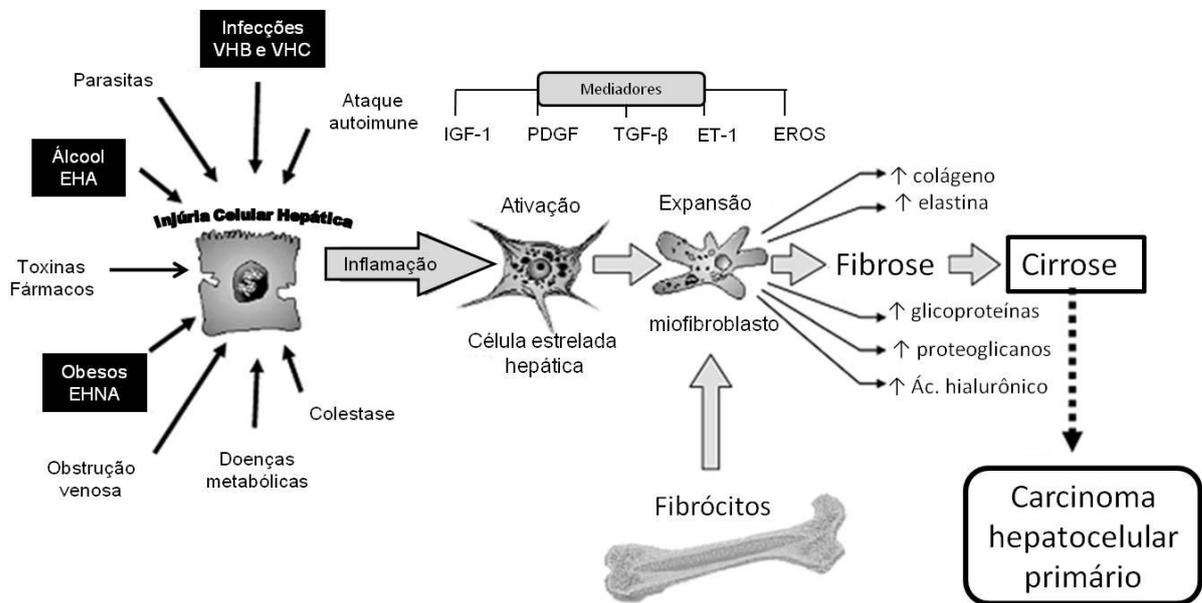
- redistribuição de ME no fígado injuriado levando à deposição subendotelial de tecido conectivo no espaço de Disse (VALKOVA, 2002).

A fibrose hepática é formada não somente como consequência das mudanças de secreção de matriz, mas também por causa das alterações na sua degradação, o que leva à perda do balanço dinâmico funcional entre fibrogênese e fibrólise. As metaloproteinases de matriz (MPM) e seus inibidores teciduais específicos (ITMP – inibidor tecidual de metaloproteinases), bem como as enzimas que ativam algumas metaloproteinases latentes, participam na degradação da ME hepática (VALKOVA, 2002).

O início da fibrose é usualmente insidioso e a maior parte dos casos de morbidade e mortalidade ocorre depois do desenvolvimento da cirrose, que na maior parte dos pacientes, ocorre em um intervalo de 15-20 anos. A fibrose hepática pode progredir rapidamente para cirrose em várias condições clínicas, incluindo episódios repetidos de hepatite alcoólica aguda, hepatite subfulminante e colestase em pacientes com reinfeção de VHC após o transplante de fígado. As principais complicações clínicas da cirrose incluem ascite, falência renal e encefalopatia hepática (EH). Pacientes com cirrose podem permanecer livres de suas principais complicações por vários anos (cirrose compensada). Já a cirrose descompensada é associada com sobrevivência curta e o transplante de fígado é indicado como única terapia efetiva (BATALLER & BRENNER, 2005).

A principal causa da fibrogênese é a injúria celular hepática (necrose e apoptose) com consecutivas reações inflamatórias, que ativam um tipo especial de célula não-parenquimal localizada no espaço subendotelial na vizinhança dos hepatócitos. Essas células, conhecidas como células estreladas hepáticas, células Ito, lipócitos, células perisinusoidais ou células estoque de vitamina A, compreendem cerca de 1,4% do volume total do fígado e representam uma razão de 4-6 células/100 hepatócitos. Elas estão principalmente relacionadas com o estoque de aproximadamente 80-90% dos retinóides no fígado normal, mas em condições de doença, são ativadas a se diferenciarem em células similares aos miofibroblastos, que são capazes de expressar e secretar quase todos os elementos do tecido

conectivo (colágeno, elastina, glicoproteínas estruturais, proteoglicanos e AH) representando a matriz do fígado fibrosado (figura 5) (BATALLER & BRENNER, 2005).



**Figura 5.** Seqüência patogênica da ativação fibrogênica das células estreladas hepáticas a miofibroblastos, levando a fibrose e cirrose (GRESSNER *et al.*, 2007).

A ativação das células estreladas, que é o evento central da fibrogênese, inclui:

- (a) estimulação de sua proliferação celular e transformação fenotípica de célula estrelada para miofibroblastos que produzem componentes de ME;
- (b) aumento da expressão de quase todos os genes que codificam proteínas de ME e,
- (c) desenvolvimento da capacidade de contração nas células estreladas, que contribui para limitar o fluxo sanguíneo e para a hipertensão portal (VALKOVA, 2002).

Além das células estreladas, o influxo de fibrócitos derivados da medula óssea para o tecido hepático inflamado e a produção de matriz por fibroblastos portais e células epiteliais biliares também contribuem em menor parte na formação da cicatriz tecidual. Os miofibroblastos não só produzem um amplo espectro de componentes da ME, mas também citocinas pró-fibrogênicas e enzimas, que regulam o catabolismo de colágeno e de outros componentes de matriz como MPM e seus respectivos inibidores teciduais (ITMP) (GRESSNER *et al.*, 2007).

O processo de ativação das células estreladas e sua diferenciação em miofibroblastos é realizado através de interações das mesmas com células de

Kupffer, hepatócitos, células endoteliais sinusoidais, plaquetas e linfócitos, sendo mediada pela estimulação parácrina com secreção de fatores de crescimento, citocinas e espécies reativas de oxigênio (EROS) (GRESSNER *et al.*, 2007).

Os principais fatores fibrogênicos liberados pelas células hepáticas são o fator de crescimento transformador alfa (TGF- $\alpha$ ) e beta (TGF- $\beta$ ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF). Além desses, são liberados, ainda, endotelinas (ET), fibronectina celular, interleucinas (IL), fator de crescimento tipo insulina (IGF), fator estimulador de colônia para macrófago (M-CSF) e proteína quimiotática para monócito 1 (MCP-1) (Quadro 1) (REEVES & FRIEDMAN, 2002; VALKOVA, 2002; BATALLER & BRENNER, 2005; GRESSNER *et al.*, 2007).

**Quadro 1.** Mediadores parácrinos envolvidos na ativação da célula estrelada hepática

Fonte Celular	Mediador Parácrino
Hepatócitos	Peróxidos lipídicos, TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , IL-6, IGF-1, M-CSF, GM-CSF
Células de Kupffer	Peróxidos lipídicos, TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PDGF, gelatinase-B
Células Endoteliais	TGF- $\beta$ , ET-1, PDGF, fibronectina celular
Plaquetas	PDGF, TGF- $\beta$ , IGF
Linfócitos	TGF- $\alpha$ , interleucinas
Monócitos	TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PDGF

Adaptado de REEVES & FRIEDMAN, 2002.

O TGF- $\beta$  é considerado a principal citocina na fibrogênese do fígado e de outros órgãos. Ele não só estimula a síntese da ME, como inibe a degradação da matriz, pela redução da síntese de MPM; aumenta a concentração de inibidores de proteases; estimula a migração quimiotática e motilidade de fibroblastos e monócitos e aumenta a expressão de outros fatores de crescimento e receptores para componentes da ME (VALKOVA, 2002).

## 1.2 Fígado e Retinóides

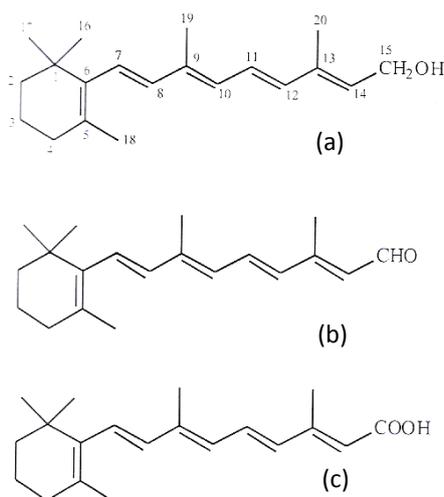
### 1.2.1 Retinóides – Definição e Características

Segundo a Comissão de Nomenclatura Bioquímica da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), retinóides são substâncias formadas por quatro unidades isoprenóides unidas de maneira cabeça-cauda. Outras definições

consideram os retinóides como subsâncias que possuem efeitos biológicos similares ao retinol, mas não necessariamente relação estrutural com este (WYSS, 1995, GUNDERSEN & BLOMHOFF, 2001).

Na estrutura molecular de um retinóide natural é possível identificar três partes fundamentais: um anel de 6 carbonos, uma cadeia poliênica e um grupo funcional terminal polar com carbonos e oxigênio (figura 6). De acordo com a estrutura, três gerações de retinóides podem ser estabelecidas (ROOS *et al*, 1998; SILVA & BARBOSA, 2008):

- retinóides não aromáticos - 1° geração ( $\beta$ - caroteno – pró-vitamina A, retinol, ésteres de retinila, retinaldeído, ácido retinóico, ácido 13-*cis*-retinóico, entre outros);
- monoaromáticos - 2° geração (etretinato, acitretina, motretinida)
- poliaromáticos - 3° geração (adapaleno, tazarodeno)



**Figura 6.** Estrutura química do retinol – vitamina A (a), retinaldeído (b) e ácido retinóico (c).

Os retinóides aparecem como cristais amarelos ou, às vezes, na forma de óleo, como é observado para os ésteres de retinila de cadeia longa. A faixa de polaridade e solubilidade dos vários retinóides varia de solúvel a insolúvel em solventes polares como a água e vice-versa em solventes apolares como hexano. Para os retinóides ionizáveis, como o ácido retinóico, a solubilidade depende do pH do solvente. O ácido retinóico em seu pKa 6-8 é altamente solúvel em água. Retinóides apolares como os ésteres de retinila são pouco solúveis em solventes polares como metanol e acetonitrila

Os retinóides são termolábeis, fotosensíveis e facilmente atacados por oxidantes. Estas características estão ligadas principalmente à sua cadeia poliênica, que contém várias ligações duplas carbono-carbono em conjugação.

Os retinóides naturais e a primeira geração são menos estáveis que os de segunda geração. A terceira geração possui menos problemas de estabilidade, porém mesmo assim precauções devem ser tomadas durante a colheita, estoque e análise das amostras biológicas, para evitar sua oxidação e isomerização (WYSS, 1995).

Os retinóides são reguladores fisiológicos de um grande número de processos biológicos incluindo desenvolvimento embrionário, visão, reprodução, formação dos ossos, metabolismo, hematopoiese, diferenciação, proliferação e apoptose celular (TZIMAS & NAU, 2001; SHIOTA *et al.*, 2006).

Embora, a deficiência de vitamina A esteja associada com a alta incidência e o aumento da susceptibilidade ao câncer e os retinóides estejam sendo usados como fármacos para terapia desta doença, a aplicabilidade dessa classe de substâncias é limitada pela sua atividade teratogênica. Além disso, o uso de doses excessivas de vitamina A pode produzir uma síndrome de toxicidade característica chamada de hipervitaminose A que é observada depois da ingestão de mais de 500 mg de retinol para adultos. Seus sinais incluem dores de cabeça severas, hepatomegalia, vômito e descamação da pele. Toxicidade crônica pode ser observada após a ingestão diária prolongada de mais de 30 mg de retinol ou durante o uso clínico de retinóides sintéticos (TZIMAS & NAU, 2001).

### **1.2.2 Metabolismo dos Retinóides nos Hepatócitos**

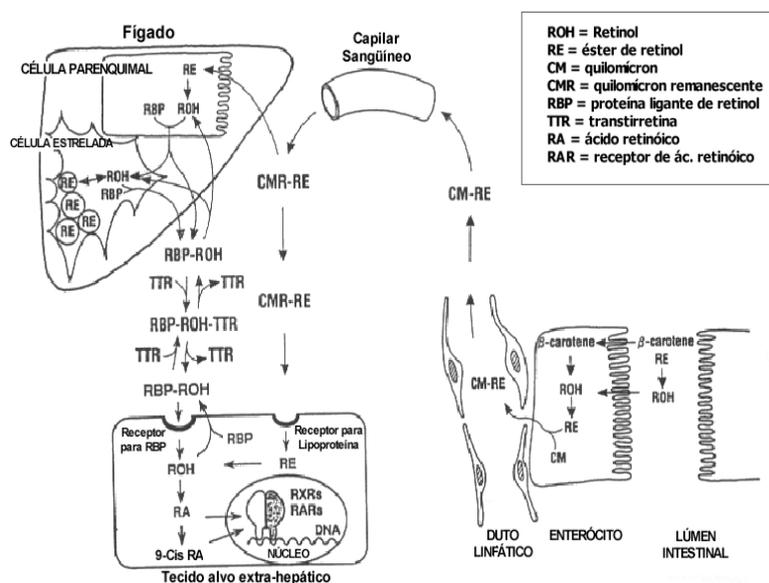
O fígado é o principal órgão responsável pelo armazenamento, metabolismo e distribuição da vitamina A para os tecidos periféricos (HENDRIKS *et al.*, 1993; DAWSON *et al.*, 2000). Dentre os vários tipos de células que compõem este órgão, dois estão diretamente envolvidos no metabolismo do retinol – hepatócitos e células estreladas (BLOMHOFF, 1987; BLOMHOFF, 1994).

O início do metabolismo dos retinóides ocorre no lúmen intestinal, onde os ésteres de retinila provenientes da dieta são emulsificados com sais biliares e hidrolisados a retinol, por várias enzimas pancreáticas e hidrolases de ésteres de retinila (REH), antes da sua absorção (BLOMHOFF, 1994).

No enterócito, o retinol liga-se à proteína celular ligadora de retinol (*cellular retinol binding-protein II* – CRPBII) e este complexo é esterificado pela enzima lecitina:retinol aciltransferase (*lecithin: retinol acyltransferase* – LRAT). Os ésteres de retinila formados são, então, incorporados aos quilomícrons (QM), os quais entram na circulação linfática e migram para circulação sangüínea, onde vários processos bioquímicos como hidrólise de triacilgliceróis e permuta de apoproteínas ocorrem, resultando em quilomícrons remanescentes (QMr) (BLOMHOFF, 1994; CHANG, 1994).

Os QMr são captados pelas células parenquimatosas hepáticas, onde os ésteres de retinila são hidrolisados pelas enzimas REH, localizadas na membrana plasmática ou nos endossomas, resultando na formação do retinol.

O retinol assim formado pode seguir diferentes caminhos: (1) se ligar à proteína carreadora de retinol (RBP) e ser liberado para a circulação sangüínea; (2) ser oxidado até ácido retinóico; (3) ser metabolizado, assim como o ácido retinóico, em formas mais polares, pelo sistema enzimático citocromo P450; (4) ou então ser transportado para as células estreladas, onde será armazenado (ROSS & ZOLFAGHARI, 2004) (figura 7). O estado nutricional de vitamina A do indivíduo determina a via a ser seguida.



**Figura 7.** Absorção, transporte e metabolismo de retinóides (SENNO, 2004).

O ácido retinóico é formado através da oxidação do retinol ao retinaldeído seguido por oxidação do retinaldeído ao ácido retinóico. Controvérsias existem sobre a identidade das enzimas que catalisam essas reações *in vivo*. Alguns autores

sugerem que o retinol é convertido ao retinaldeído por uma álcool desidrogenase microsomal de cadeia curta e o retinaldeído gerado é, então, oxidado ao ácido retinóico por uma via citossólica catalisada por uma aldeído desidrogenase dependente de NAD. Já alguns estudos ligam uma via NADPH-dependente, catalisada por isoformas do citocromo P450 (CYP) à formação do ácido retinóico (Ross, 1993). Dentre os CYPs humanos, os mais eficientes para a oxidação do retinaldeído ao ácido retinóico são CYP 1A1, 1A2, 1B1, 3A4 e 3A5 (CHEN *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 1999; MARRIL *et al.*, 2002).

Muitas vias têm sido propostas para a biossíntese de outros retinóides derivados do ácido retinóico. O ácido retinóico pode se isomerizar *in vitro* e *in vivo* a seus estereoisômeros 9-*cis*- e 13-*cis*-ácido retinóico. Numerosos metabólitos de ácido retinóico e seus isômeros são formados como resultado de reações de oxidação ou conjugação. Isoformas específicas do citocromo P450 são capazes de catalisar a oxidação do ácido retinóico as formas 4-hidroxi, 18-hidroxi e 4-oxo de metabólitos (TZIMAS & NAU, 2001).

Os CYPs humanos 3A4/5, 2B6, 2C8, 2A6 e 2C9 estão envolvidos no metabolismo do ácido retinóico aos seus isômeros 9-*cis*-, 4-hidroxi-9-*cis*- e 4-oxo-9-*cis*-ácido retinóico. Os CYPs 3A4/5, 2B6, e 2C8 cooperam na formação do metabólito 13-*cis*-ácido retinóico, enquanto os CYPs 2A6, 2C8 e 2B6 cooperam para a formação do 4-hidroxi-13-*cis* e 4-oxo-13-*cis*-ácido retinóico. (NADIN & MURRAY, 1999; MARRIL *et al.*, 2000; MCSORLEY & DALI, 2000; MARRIL *et al.*, 2002).

### **2.2.3 Metabolismo dos Retinóides na Fibrose Hepática**

Newsome e colaboradores (2000) mostraram que os níveis séricos de retinol estão baixos em pacientes com doença hepática crônica e este decréscimo está diretamente relacionado com a progressão da doença hepática, refletindo a perda de ésteres de retinila das células estreladas. Além disso, para graus similares de Child-Pugh, os níveis séricos de retinol são significativamente menores em pacientes que possuem CHC associado à cirrose, quando comparados com aqueles que possuem apenas cirrose.

Existem várias possíveis explicações para a diminuição dos níveis séricos de retinol na doença hepática crônica, entre elas estão a síntese defeituosa de proteína ligadora de retinol (RBP) que evita a mobilização de retinol do fígado para tecidos

periféricos (MAIO *et al.*, 2000) e a absorção de retinol da dieta que pode estar prejudicada, explicando porque os níveis estão significativamente mais reduzidos em pacientes com doença hepática colestática, cujo quadro cursa com má-absorção crônica de gordura e vitaminas lipossolúveis (NEWSOME *et al.*, 2000).

Tem sido sugerido que os níveis de retinol possam ser usados para monitorar a progressão da doença hepática crônica e, isto é possível porque as células hepáticas estreladas que são ricas em retinóides e que produzem albumina são ativadas a miofibroblastos enquanto o fígado passa pela transformação fibrótica durante a cirrose. Os miofibroblastos perdem o conteúdo de retinol, bem como a capacidade de produzir albumina e Newsome e colaboradores (2000) encontraram correlação ( $p < 0,0188$ ) entre os valores de retinol e albumina que é um marcador de função hepática.

O principal assunto não resolvido sobre o papel do retinol e seus derivados, na fibrose hepática, tem sido os mecanismos de perda intracelular e como essa perda pode facilitar a ativação celular e a fibrose hepática. Os retinóides modulam a atividade do TGF- $\beta$  que, no fígado, é a citocina fibrogênica mais potente, estimulando a produção de colágeno que, por sua vez, suprime o crescimento dos hepatócitos (OKUNO *et al.*, 1999).

O ácido retinóico exacerba a fibrose hepática, pelo menos em parte, pela ativação e produção de TGF- $\beta$  no fígado pelas células estreladas (OKUNO *et al.*, 1997).

A perda dos ésteres de retinila observados na fibrose pode ser em parte resultante da rápida conversão a ácido retinóico e aos seus subseqüentes metabólitos: 9-*cis*- ácido retinóico, 13-*cis*-ácido retinóico e 9,13-di-*cis*-ácido retinóico. Okuno e colaboradores (1999) observaram um aumento de 58% e 114% na geração de ácido retinóico e 9,13-di-*cis*-ácido retinóico, respectivamente, em fígados fibrosados de ratos.

Como o 9,13-di-*cis*-ácido retinóico é o principal produto que se forma da isomerização *in vivo* do 9-*cis*-ácido retinóico, a elevação de 9,13-di-*cis*-ácido retinóico implica que o metabolismo de retinóides pode estar estimulado e que o ácido retinóico e subseqüentemente o 9-*cis*-ácido retinóico podem ser gerados durante o desenvolvimento da fibrose. Isto sugere que o aumento de ácido retinóico é mais relevante e que a elevação observada em 9,13-di-*cis*-ácido retinóico

meramente reflete o aumento de ácido retinóico e 9-*cis*-ácido retinóico pré-existentes.

### **1.3 Métodos de Avaliação de Lesão e Função Hepática**

Testes sorológicos são importantes por serem não invasivos, porém, freqüentemente, apresentam limitações na avaliação de pacientes com ou sem sintomas de doenças hepáticas. Comumente é utilizado erroneamente o termo **teste de função hepática**, para ensaios que medem lesão hepatocelular. Os verdadeiros testes de função hepática são aqueles que avaliam a síntese de proteínas, como albumina e fatores de coagulação ou a capacidade do fígado em metabolizar substâncias como fármacos (ROCHILING, 2001).

Um marcador de fibrose não invasivo ideal deve:

- (a) ser específico para o fígado;
- (b) apresentar níveis que não devem ser influenciados pelas alterações renais ou reticuloendoteliais;
- (c) avaliar um ou mais dos seguintes processos: estágio de fibrose, atividade de deposição ou remoção de matriz;
- (d) apresentar metodologia de quantificação simples (AFDHAL & NUNES, 2004).

#### **1.3.1 Biópsia Hepática**

A biópsia hepática com consecutiva avaliação histológica é considerada o método padrão-ouro para a avaliação da fibrose hepática. Exames histológicos são úteis na identificação das causas das hepatopatias e na determinação do grau necroinflamatório e do estágio de fibrose através de vários sistemas numéricos (Knodell, Ishak, METAVIR, Scheuer, Desmet, entre outros) (GRESSNER *et al.*, 2007).

O modelo de Ishak é o mais detalhado, classificando a fibrose em estágios de zero a seis, significando, o primeiro, ausência de fibrose, e o último, cirrose estabelecida (Quadro 2).

**Quadro 2.** Classificação histológica de fibrose hepática – modelo de Ishak

Estádio	Descrição
F0	Ausência de fibrose
F1	Alargamento de alguns tratos portais por fibrose
F2	Alargamento da maioria dos tratos portais por fibrose
F3	Alargamento da maioria dos tratos portais com pontes freqüentes ligando tratos
F4	Alargamento da maioria dos tratos portais com pontes freqüentes ligando tratos portais e veias centro-lobulares
F5	Marcante fibrose em ponte e esboço de nódulos
F6	Cirrose

Embora a biópsia seja o procedimento padrão para avaliar a fibrose hepática, ela possui alguns problemas:

(a) o método é invasivo podendo causar dor e complicações severas que podem requerer a hospitalização prolongada. A dor é reportada por cerca de 40% dos pacientes, enquanto as complicações severas em 0,5% dos mesmos. A biópsia requer hospitalização de 6-18 h;

(b) pode ocorrer amostragem errada. A média de tamanho de uma biópsia é de 15 mm, o que representa cerca de 1/50.000 da massa do fígado;

(c) variabilidade intra- e inter-patologista na avaliação histológica da biópsia e

(d) alto custo. O valor de uma biópsia sem complicações é estimado em US\$ 1032, enquanto a biópsia com complicações custa cerca de US\$ 2745 (AFDHAL & NUNES, 2004; BATALLER & BRENNER, 2005; BLANC *et al.*, 2005; GRESSNER *et al.*, 2007; MANNING & AFDHAL, 2008).

Além disso, a dinâmica evolutiva da doença hepática faz com que os pacientes possam necessitar de biópsias repetidas e como este procedimento não é isento de riscos, torna-se necessário o desenvolvimento de marcadores não-invasivos que possam detectar formas avançadas e quantificar fibrose (FOCACCIA, 2003).

### **1.3.2 Marcadores Séricos de Fibrose Hepática**

#### **1.3.2.1 Marcadores de Fibrose de Classe I**

Esses marcadores são componentes da matriz que estão com sua expressão constantemente aumentada pela ativação das células estreladas, ou que tem sua liberação atrasada devido à disfunção metabólica das células de Kupffer ou subendoteliais sinusoidais ou são mediadores que também estão constantemente aumentados durante a fibrogênese. Dentre esses marcadores, podemos citar: AH, peptídeo amino-terminal de pró-colágeno tipo III (PIIINP), colágenos tipo I e IV, laminina, MPM, YKL-40, entre outros (GRESSNER *et al.*, 2007).

##### **- Ácido hialurônico**

O AH é um glicosaminoglicano sintetizado pelas células estreladas e degradado pelas células sinusoidais hepáticas, sendo um importante componente da ME. Altos níveis de AH em pacientes com doenças hepáticas, particularmente cirrose, tem sido relatado para a disfunção das células endoteliais sinusoidais e podem refletir aumento da fibrogênese. Em ensaios que avaliam apenas um marcador que reflete a concentração de ME, o AH aparece como o melhor teste individual (MANNING & AFDHAL, 2008).

##### **- Peptídeo amino-terminal de pró-colágeno tipo III**

O PIIINP é possivelmente o marcador de fibrose mais largamente estudado. Os níveis de PIIINP estão elevados na hepatite aguda e são correlacionados com os níveis de aminotransferases. Os níveis desses marcadores refletem o estágio de fibrose na doença hepática alcoólica, hepatites virais e cirrose (MANNING & AFDHAL, 2008). Embora bastante pesquisado, o PIIINP tem tido sua aplicação clínica limitada já que ele não é um biomarcador específico do fígado, estando também elevado em fibrose de pulmão, acromegalia, doenças reumatóides, pancreatites crônicas e outras enfermidades (GRESSNER *et al.*, 2007).

##### **- Colágenos tipo I e IV**

Os níveis de colágeno tipo I estão aumentados em todos os tipos de fibrose hepática, mas não em estágios necroinflamatórios. O colágeno tipo IV também está

elevado em pacientes com hemocromatose com fibrose avançada comparada com controles normais. Em pacientes com doença hepática alcoólica, existe uma significativa correlação entre os níveis de colágeno tipo IV e o estágio fibrótico, particularmente fibrose periportal (MANNING & AFDHAL, 2008).

#### **- Laminina**

A laminina é uma glicoproteína não colagenosa sintetizada pelas células estreladas e depositada na membrana basal do fígado. Na injúria hepática crônica, os componentes basais, particularmente laminina, são depositados ao redor dos vasos, no espaço perisinusoidal e no trato portal e, por isso, os valores séricos de laminina correlacionam-se com os níveis de pressão portal tanto em cirróticos, como em hipertensão portal causada por outras etiologias (FOCACCIA, 2003). Os níveis séricos de laminina e de seu fragmento P1 são elevados em pacientes com doença hepática crônica devido ao álcool e hepatites virais. A laminina parece ser superior ao PIIINP, mas inferior ao colágeno tipo IV em prever a fibrose na hepatite viral crônica (MANNING & AFDHAL, 2008).

#### **- Metaloproteinases de matriz e Inibidores teciduais de metaloproteinases**

As MPMs e os ITMP são um grupo de proteínas envolvido no controle da degradação de matriz. As MPMs são produzidas intracelularmente e secretadas na forma de pró-enzima, que requerem clivagem por mecanismos da superfície celular para atividade funcional. As ações das MPMs são inibidas pelas ITMPs. A interação entre MPMs e ITMPs é complexa e como essas moléculas agem localmente e tendo múltiplas atividades, incluindo ativação de fatores de crescimento, afetando proliferação celular e inibição da apoptose, a relação permanece não-clara. A MPM-2 (gelatinase A) é secretada pelas células estreladas ativadas e está aumentada na presença do colágeno tipo I. Pouco é conhecido sobre o papel da MPM-3 (estromelisina) na injúria hepática. A MPM-9 (gelatinase B) é principalmente secretada pelas células de Kupffer ativadas. Os níveis plasmáticos dessa proteína estão aumentados em pacientes com CHC, mas não com hepatite crônica ou cirrose (MANNING & AFDHAL, 2008).

**- YKL-40**

YKL-40 é um novo marcador da fibrose hepática. Ele é uma glicoproteína que parece funcionar como um fator de crescimento para fibroblastos, condrócitos e células sinoviais e fator de migração para células endoteliais. As bandas imunohistoquímicas têm demonstrado positividade para YKL-40 em áreas de fibrose hepática e fibrogênese (MANNING & AFDHAL, 2008).

**1.3.2.2 Marcadores de Fibrose de Classe II**

Esses marcadores não estão diretamente relacionados com a patogênese da fibrose, mas estão alterados no soro ou plasma de pacientes com fibrose e cirrose. (GRESSNER *et al.*, 2007). Uma grande variedade de marcadores bioquímicos e combinação de parâmetros podem ser utilizados, porém deve-se fazer a distinção entre os marcadores de lesão e função hepática. Entre os marcadores de fibrose de classe II mais utilizados estão os níveis de aminotransferases, fosfatase alcalina (FA) e gamaglutamiltransferase (GGT), que na verdade, são testes de lesão hepática e, também, BT, albumina, TAP e imunoglobulinas que são testes de função hepática.

**- Bilirrubina total e frações**

A bilirrubina é formada a partir da lise das hemácias, sendo o pigmento resultante do catabolismo da hemoglobina. A bilirrubina indireta (não-conjugada) é transportada para o fígado ligada à albumina. Ela é insolúvel em água e, portanto, não pode ser excretada na urina. A bilirrubina direta (conjugada) é solúvel em água e aparece na urina.

No fígado, a bilirrubina indireta é conjugada ao ácido glicurônico, formando a bilirrubina direta e, subseqüentemente, é secretada na bile e intestino. A flora intestinal quebra a bilirrubina em urobilinogênio, que é, então, reabsorvido e depois excretado pelo rim na urina ou pelo fígado no trato gastrointestinal.

A bilirrubina no soro, normalmente, é encontrada na forma não-conjugada, refletindo o balanço entre a produção e a excreção hepatobiliar (ROCHLING, 2001). A produção de bilirrubina aumenta na hemólise, eritropoiese ineficaz, reabsorção de hematoma e raramente na injúria muscular. Em todos os casos, a bilirrubina está principalmente, na forma não-conjugada. A hiperbilirrubinemia conjugada

caracteristicamente ocorre na doença hepática parenquimal e obstrução biliar (LIMDI & HYDE, 2003).

A icterícia é devida à impregnação dos tecidos com bilirrubina. A dosagem da mesma mostrará, nos casos ictericos, o padrão de icterícia hepatocelular com aumento das bilirrubinas totais, principalmente, à custa, das frações diretas. A presença de urobilinogênio na urina é característica das hepatites virais denotando disfunção celular (FOCACCIA, 2003).

Os níveis de bilirrubinas elevam-se após o aumento das aminotransferases e, nas formas agudas, podem alcançar valores 20 a 25 vezes acima do normal. Na urina, pode ser detectada precocemente, antes mesmo do surgimento da icterícia. Sua normalização costuma ocorrer antes das aminotransferases, exceto nas formas colestáticas (BRASIL, 2005b, 2008b).

#### **- Aminotransferases**

As aminotransferases séricas são enzimas que agem como sensíveis indicadores de dano hepatocelular, sendo as melhores representantes dos fenômenos necróticos a que estão submetidos os hepatócitos durante a agressão por vírus. Dentre as várias transaminases produzidas pelo fígado, duas possuem maior importância clínica: AST e ALT. Elas participam da gliconeogênese catalisando a transferência de grupos amino do ácido aspártico ou da alanina para o ácido cetoglutárico para produzir o ácido oxaloacético e ácido pirúvico, respectivamente (LIMDI & HYDE, 2003).

A menos específica para o fígado é a AST que está presente no citoplasma e em isoenzimas mitocondriais, sendo encontrada no coração, músculo esquelético, rim, cérebro, pâncreas, pulmões, leucócitos e eritrócitos. A ALT é uma enzima citossólica que é encontrada em maior quantidade nos hepatócitos, por isso sendo mais específica para o fígado (ROCHLING, 2001; LIMDI & HYDE, 2003).

Injúria hepatocelular, mas não necessariamente a morte celular, é a causa da liberação dessas enzimas na circulação e, assim os níveis das aminotransferases ficam elevados na hepatite aguda e crônica, cirrose, congestão hepática e doenças infiltrativas como infecção ou câncer (ROCHLING, 2001).

Classicamente se considera que quando a dosagem das aminotransferases ultrapassa 500 UI/L está ocorrendo intensa destruição hepatocítica. Como a ALT é

uma enzima exclusivamente citoplasmática, seu aumento sérico se correlaciona, na maioria das vezes, com a presença de lesão hepatocítica aguda. A queda abrupta dos níveis de AST/ALT no soro pode representar o principal sinal laboratorial de evolução para hepatites fulminantes, representando a falência progressiva do fígado devido à destruição extensa do tecido. A persistência dos níveis elevados de AST/ALT por mais de seis meses, a contar do quadro agudo, é indicativa de provável cronificação (FOCACCIA, 2003).

Nas formas agudas, as aminotransferases chegam a atingir, habitualmente, valores até 25 a 100 vezes acima do normal. Em geral, essas enzimas começam a elevar-se uma semana antes do início da icterícia (sendo que a ALT é a primeira a aumentar no plasma) e normalizam-se em cerca de três a seis semanas de curso clínico da doença. Nas formas crônicas, na maioria das vezes não ultrapassam 5 vezes o valor normal e, por vezes, em indivíduos assintomáticos, é o único exame laboratorial sugestivo de doença hepática (BRASIL, 2005b, 2008b).

O uso dos níveis de ALT ou AST sozinhos para o diagnóstico do estágio de fibrose não tem mostrado ser clinicamente útil. Pode-se usar a razão AST/ALT, sendo que se a mesma for maior que 1, sugere-se diagnóstico de cirrose (MANNING & AFDHAL, 2008).

#### **- Fosfatase alcalina e Gamaglutamiltransferase**

As FAs são originadas principalmente de duas fontes, fígado e ossos, mas podem estar presentes em uma variedade de outros tecidos como intestino e placenta. A sua elevação pode ser fisiológica ou patológica. O papel fisiológico dessas enzimas não é claramente entendido, mas sua produção fica aumentada em tecidos que estejam em estimulação metabólica. Os níveis aumentam, por exemplo, a partir do terceiro mês de gravidez e também na adolescência, que corresponde ao período de crescimento (LIMDI & HYDE, 2003).

Várias causas patológicas podem levar à elevação de FA, sendo hepáticas ou não. Entre elas pode-se citar: doença nos ossos, obstrução do ducto biliar, colestase induzida por fármacos, entre outras (LIMDI & HYDE, 2003).

A GGT é uma enzima encontrada nos hepatócitos e células epiteliais biliares. Embora sensível, a sua utilidade é limitada pela falta de especificidade, já que seus níveis elevados podem ser devido a várias causas, entre elas, doença pancreática,

infarto do miocárdio, falha renal, doença pulmonar obstrutiva crônica, diabetes e alcoolismo (LIMDI & HYDE, 2003).

O aumento dos níveis de GGT pode ser utilizado para confirmar uma fonte hepática de doença para o aumento de FA (ROCHLING, 2001; LIMDI & HYDE, 2003).

#### **- Albumina**

A síntese de albumina é uma importante função do fígado. Aproximadamente 10 g é sintetizada e secretada diariamente. Com a doença hepática progressiva, os níveis sorológicos de albumina caem, refletindo o decréscimo na sua síntese. Os níveis de albumina são dependentes de um número de outros fatores como estado nutricional, catabolismo, fatores hormonais e perdas urinária e gastrointestinal. Mesmo assim, as concentrações de albumina podem ser correlacionadas com o prognóstico na doença hepática crônica (LIMDI & HYDE, 2003). Esta proteína não é um bom indicador de função hepática na doença aguda já que sua meia-vida é de 20 dias (ROCHLING, 2001).

#### **- Tempo e atividade de protrombina**

A síntese dos fatores de coagulação, exceto fator VIII, também é uma importante função do fígado. O TAP avalia a taxa de conversão da protrombina em trombina, o que requer os fatores II, V, VII e X, e assim reflete a função de síntese do fígado. A vitamina K é requerida para a gama carboxilação de todos esses fatores (LIMDI & HYDE, 2003).

Nos casos de hepatite crônica, o alargamento do TAP indica a deterioração da função hepática, porém o TAP também pode estar prolongado na deficiência de vitamina K e terapia com varfarina. A administração de vitamina K pode ajudar a distinguir colestase de doença hepatocelular. Se dentro de 24 horas após a administração, o TAP normalizar, significa que o tempo prolongado é devido a uma má absorção de vitamina K e a função hepática está inalterada (ROCHLING, 2001; LIMDI & HYDE, 2003; BRASIL, 2008b).

#### **- Alfafetoproteína**

Embora não tenha valor clínico na avaliação de hepatites agudas, seus valores elevados ou progressivamente crescentes, em pacientes portadores de

hepatite crônica, em geral, indicam o desenvolvimento de CHC, sendo por isto, utilizada no *screening* deste tumor em pacientes cirróticos (BRASIL, 2005b).

### 1.3.3 Técnicas de Imagem

Finalmente, a fibrose hepática também pode ser diagnosticada por técnicas de imagem. Ultra-sonografia, tomografia computadorizada e imagem por ressonância magnética podem detectar mudanças no parênquima hepático devido à fibrose moderada a grave. Devido ao baixo custo, a ultra-sonografia é a técnica mais aplicada. Ela é capaz de detectar cirrose hepática baseada nas mudanças ecogênicas e nodulares do fígado, bem como através de sinais de hipertensão portal. Todavia, o ultra-som é altamente dependente de um operador treinado e na presença do aumento da ecogenicidade hepática não há como diferenciar entre esteatose hepática e fibrose (BATALLER & BRENNER, 2005).

Os métodos de imagem devem fazer parte do acompanhamento de pacientes portadores de cirrose de etiologia viral, devido à alta frequência de surgimento de CHC. A cada três ou quatro meses, os pacientes devem ser examinados, submetidos ao exame ultra-sonográfico (ou tomográfico) e avaliados laboratorialmente para determinar se está havendo elevação dos níveis séricos da  $\alpha$ -fetoproteína. Confirmada a presença de nódulos intra-hepáticos, a biópsia transcutânea guiada por algum método de imagem pode confirmar a presença da neoplasia (FOCACCIA, 2003).

### 1.4 Retinóides como Biomarcadores de Patologias

Os biomarcadores podem ser definidos como quaisquer variáveis genéticas, imunológicas ou bioquímicas que podem ser detectadas e medidas revelando os processos biológicos normais, patogênicos ou a resposta farmacológica após a intervenção terapêutica. Nas doenças inflamatórias crônicas, nas neoplasias e nos processos infecciosos, estes marcadores se relacionam com a atividade ou remissão do processo patológico, possuindo um importante valor preditivo de evolução clínica e contribuindo para a escolha do tratamento adequado (SCHRIEFER & CARVALHO, 2008).

Vários estudos têm demonstrado que os retinóides podem ser usados como biomarcadores de vários tipos de cânceres, uma vez que as concentrações plasmáticas ou sorológicas do retinol e seus metabólitos ativos estão inversamente associadas com a incidência e/ou risco de desenvolvimento de tumores.

Fontham (1990) mostrou que indivíduos com baixa ingestão de retinóides e carotenóides (pró-vitamina A) possuem alto risco de desenvolver câncer. Hong e colaboradores (1990) demonstraram que os retinóides decrescem a incidência de tumores primários e secundários de pescoço e cabeça. Ching e colaboradores (2002) encontraram que as altas concentrações sorológicas de retinol estavam significativamente associadas com a redução do risco de câncer de mama.

Peres (2006) também demonstrou que o retinol sérico pode ser um sensível biomarcador de doenças hepáticas crônicas, uma vez que, as concentrações basais deste retinóide se correlacionam positivamente com a albumina e negativamente com as variáveis BT, TAP (segundos acima do controle), razão normalizada internacional (INR), AST, AST/ALT, FA e  $\alpha$ -fetoproteína.

Assim, a utilização de retinóides como biomarcadores, através da sua quantificação em matrizes biológicas, pode ser muito útil na prática clínica de forma a avaliar o risco para desenvolvimento de doenças hepáticas crônicas e tumores.

### **1.5 Métodos Analíticos para Quantificação de Retinóides Séricos**

Devido à estrutura poliênica conjugada do retinol, ensaios colorimétricos, como o método de Carr-Price, podem ser utilizados para a análise de vitamina A. Neste ensaio, o sistema poliênico dos retinóides é protonado por um ácido forte, como o ácido trifluoroacético em solvente orgânico levando a formação de uma cor azul de grande intensidade e, assim, fornecendo um ensaio muito sensível e seletivo para a análise de vitamina A e estudo de seu metabolismo. Embora, esse método tenha sido utilizado durante muitos anos, os reagentes requeridos são corrosivos e nocivos e, por isso, hoje, praticamente caiu em desuso (FURR, 2004).

Outra vantagem da estrutura poliênica é a alta absorvidade molar dos retinóides, que são capazes de absorver luz nas regiões do visível e UV do espectro eletromagnético (FURR, 2004). Por esta razão, a espectrofotometria no UV tem sido um método de largo emprego na quantificação de retinóides em matérias-primas (WYSS, 1990).

Para a análise de retinóides em fluidos biológicos, a técnica mais utilizada é a CLAE-UV (WYSS, 1995; GUNDERSEN & BLOMHOFF, 2001), porém outros detectores como de fluorescência (retinol e ésteres de retinila são fluorescentes em solventes orgânicos apolares, enquanto os outros retinóides não são), índice de refração, eletroquímicos e espectrômetro de massas também sejam utilizados (WINGERATH *et al.*, 1999; FURR, 2004).

Embora a CLAE-UV seja a técnica mais utilizada, ela apresenta como inconveniente o fato da separação e identificação dos retinóides serem complicadas pela ocorrência de isômeros *cis/trans* e pela similaridade de espectro de absorção entre essas substâncias (WINGERATH *et al.*, 1999; GUNDERSEN & BLOMHOFF, 2001).

Uma técnica de identificação complementar como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) pode ser utilizada, por ser importante na determinação estrutural e particularmente útil para distinguir os isômeros *cis* de *trans* (FURR, 2004). O inconveniente desta técnica é que apesar de ser empregada em alguns laboratórios de pesquisa, ainda não está acessível à rotina clínica (DOOLEY, 2003).

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) é uma técnica analítica útil para a análise de retinóides porque combina o poder de resolução da CLAE com a especificidade e sensibilidade da espectrometria de massas (EM). Todos os retinóides podem gerar íons sob condições acidificadas. O retinol e seus ésteres são desidratados sob condições ácidas gerando o fragmento com  $m/z$  269  $[M-17]^+$ . Para o ácido retinóico, o espectrômetro de massas pode ser operado também em modo negativo (GUNDERSEN & BLOMHOFF, 2001).

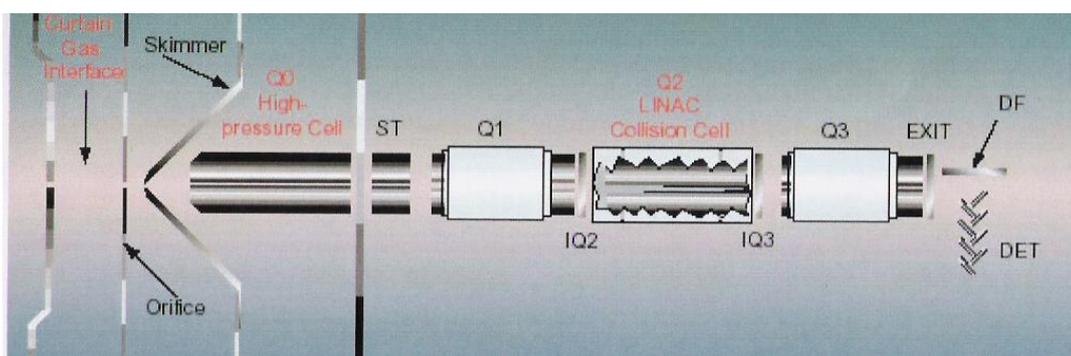
A cromatografia gasosa (CG) tem sido pouco utilizada para a análise de retinóides devido à instabilidade térmica e a volatilidade limitada dessas substâncias (FURR, 2004). A análise quantitativa de retinóides utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) requer hidrólise dos ésteres de retinila e derivatização do retinol e ácido retinóico. A etapa de hidrólise elimina toda informação relativa aos ésteres de retinila e a alta temperatura do CG destrói toda informação a respeito dos isômeros geométricos *cis* e *trans* (VAN BREEMEN *et al.*, 1998, HYÖTYLÄINEN & RIEKKOLA, 2005).

### 1.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas

O acoplamento do detector de EM à técnica de cromatografia líquida permite que os compostos pré-separados pela cromatografia sejam identificados e quantificados com alto grau de seletividade, sensibilidade e confiabilidade. Assim, substâncias presentes em amostras complexas, como os fluidos biológicos, podem ser analisadas livres de interferentes, evitando resultados falsos positivos ou negativos, além de diminuir o tempo de análise, tornando o método de CLAE-EM adequado ao emprego na clínica.

A EM é uma técnica que envolve a ionização e/ou fragmentação de moléculas, seguida pela separação e quantificação de um fragmento caracterizado pela relação massa/carga ( $m/z$ ) (DOOLEY, 2003).

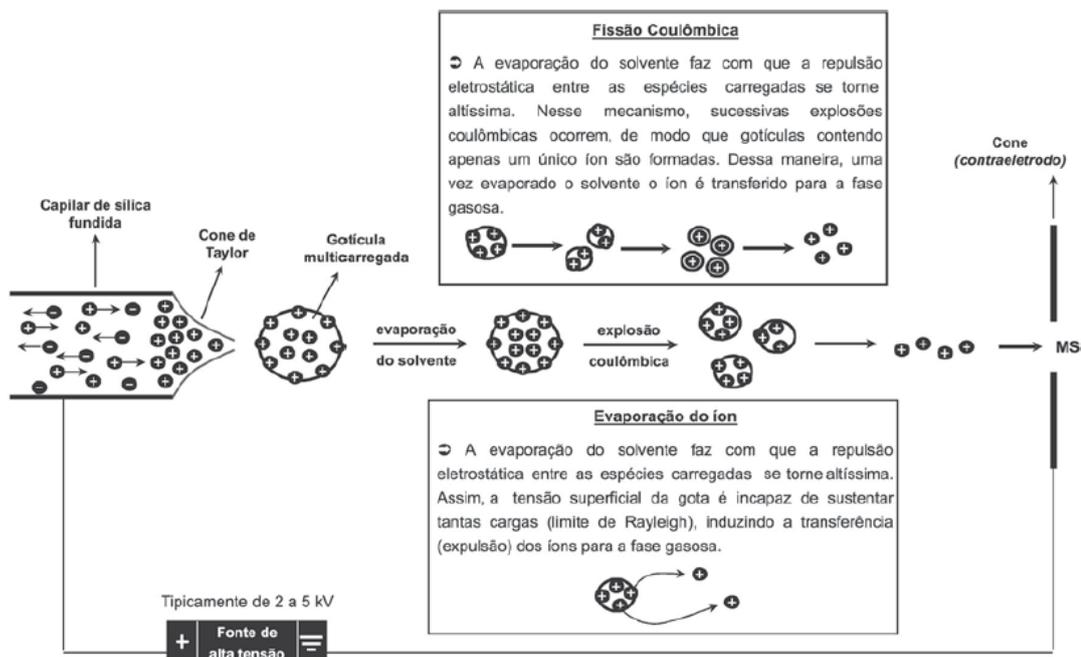
A alta seletividade da técnica de EM está relacionada com sistemas de triploquadrupolo. Nestes equipamentos, ocorre seleção do íon *precursor* ou íon “pai” no primeiro quadrupolo (Q1), a fragmentação deste íon selecionado na célula de colisão (Q2), onde um gás inerte (Hélio ou Argônio) colide em baixa energia, gerando fragmentos iônicos denominados íons *secundários* ou íons “filhos”, que serão selecionados no terceiro quadrupolo (Q3) (Figura 8). Quando a técnica ocorre desta maneira, ou seja, através da seleção de íon precursor e íon secundário, ela é conhecida como espectrometria de massas em seqüência (EMS).



**Figura 8.** Esquema do espectrômetro de massas triplo quadrupolo (APPLIED BIOSYSTEMS, 2003).

A técnica de ionização utilizada nos instrumentos de CLAE-EM e CLAE-EMS é a *Atmospheric Pressure Ionization* (API), podendo esta ser dividida em ESI (*Eletrospray Ionization*), APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e APPI (*Atmospheric Pressure Photoionization*) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2003).

Na ionização por ESI, o líquido no qual o analito de interesse encontra-se dissolvido (fase móvel - FM) passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. O alto campo elétrico na ponta do capilar gera um acúmulo de cargas na superfície do líquido por migração eletroforética e, assim, na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (“spray eletrostático”) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente Nitrogênio) na região do spray. À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido e há um aumento na densidade de cargas até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento ocorre a explosão coulômbica, formando gotas menores. Uma série de explosões passa ocorrer até que são formados íons do analito a partir dessas gotas, os quais são transferidos para o interior de espectrômetro de massas (Figura 9) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2003; CHIARADIA *et al.*, 2008).



**Figura 9.** Esquema do modo de ionização por ESI (CANTÚ *et al.*, 2008).

Como em ESI, a ionização ocorre diretamente em solução, compostos sensíveis à temperatura podem ser ionizados sem sofrer degradação. Este modo de ionização pode ser aplicado aos compostos com massas molares grandes e àqueles altamente polares que podem ser facilmente ionizados.

Na ionização por APCI, o eluente da coluna cromatográfica passa através de um nebulizador pneumático, no qual as gotas são geradas e dessolvatadas. O spray formado passa através de uma região aquecida, na qual o vapor é seco, formando espécies neutras que passam através de uma corona de descarga que possui um campo suficiente para gerar ionização. Como o solvente encontra-se em maior concentração no spray do que o analito, a FM é ionizada preferencialmente e passam a ocorrer reações entre estes íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analito, o que dá origem aos íons do analito.

Uma vez que a ionização ocorre em fase gasosa, a APCI pode ser considerada uma fonte complementar a ESI, pois é aplicável a compostos apolares ou de média polaridade, voláteis e termicamente estáveis (CHIARADIA *et al.*, 2008).

A APPI é semelhante à APCI, porém no lugar da corona de descarga, a APPI possui uma lâmpada de UV cuja função é ocasionar a ionização das moléculas do analito presente nas gotículas de spray. A APPI é aplicada a compostos apolares, como os hidrocarbonetos policíclicos (APPLIED BIOSYSTEMS, 2003).

A importância da técnica de CLAE-EM é evidenciada pelo número de artigos publicados no *United States National Library of Medicine* (MEDLINE), onde em 10 anos (1993-2003), ocorreu um aumento no número de publicações envolvendo essa metodologia de 310% (GELPÍ, 2003).

Particularmente nas análises clínicas, o desenvolvimento desta técnica promoveu importante avanço nos métodos de diagnóstico e rastreamento de algumas doenças, como aminoacidopatias, acidemias orgânicas e distúrbios da beta-oxidação dos ácidos graxos que são detectados no teste do pezinho expandido. Nos últimos dez anos, a otimização da relação custo-benefício superou a resistência ao seu emprego, inicialmente demonstrada por autoridades da área de saúde de alguns países (RASHED, 2001).

### **1.5.2 Métodos de Extração de Retinóides a partir da Amostra Biológica**

Além da escolha do método de detecção, na quantificação de retinóides merece especial atenção o método de extração do analito. Este se encontra no soro ou plasma, normalmente em baixas concentrações e, devido a sua baixa estabilidade, o processo de extração e a própria análise, deve ter um tempo de execução breve e brando (HYÖTYLÄINEN & RIEKKOLA, 2005).

Os procedimentos de extração para os retinóides consistem principalmente de extração por precipitação de proteínas (EPP) e extração líquido-líquido (ELL), embora a extração em fase sólida (EFS) *on-line* e *off-line* também sejam utilizadas (WYSS, 1995).

A EPP é realizada pela diminuição da solubilidade das proteínas em meio aquoso, pela adição de um solvente orgânico miscível em água ou pela diminuição do pH da solução. A adição de solventes imiscíveis em água como hexano, clorofórmio, acetato de etila e metil-tert-butil-éter (MTBE) pode não levar a precipitação de proteínas. Dependendo do solvente, dois a quatro volumes deve ser adicionado para alcançar a remoção quantitativa de proteínas (GUNDERSEN & BLOMHOFF, 2001).

A ELL clássica para a remoção de retinóides é feita através da adição de um solvente imiscível em água após a precipitação de proteínas, agitação vigorosa por 5 a 10 minutos, centrifugação e remoção da fase orgânica numa frequência de 1 a 3 vezes. A fase orgânica é enriquecida e o solvente é removido por vácuo ou pela ação de um gás inerte. O resíduo pode ser dissolvido na fase móvel ou em outro solvente como metanol. Solventes comuns para a extração são hexano, acetona, éter de petróleo, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e mistura desses (GUNDERSEN & BLOMHOFF, 2001).

Após a precipitação de proteínas, o sobrenadante pode também ser submetido à EFS. A fase sólida é freqüentemente sílica modificada com grupos alquil. O cartucho extrator contendo a fase sólida pode ser lavado com volumes de acetonitrila-água ou metanol-água e eluído pela gravidade, vácuo ou pressão positiva. A eluição das substâncias extraídas pode ser feita pela passagem de um solvente com força de eluição forte como metanol. O eluído pode ser injetado diretamente ou evaporado e dissolvido num pequeno volume de fase móvel. A extração em fase sólida pode ser feita manualmente ou por sistemas automáticos

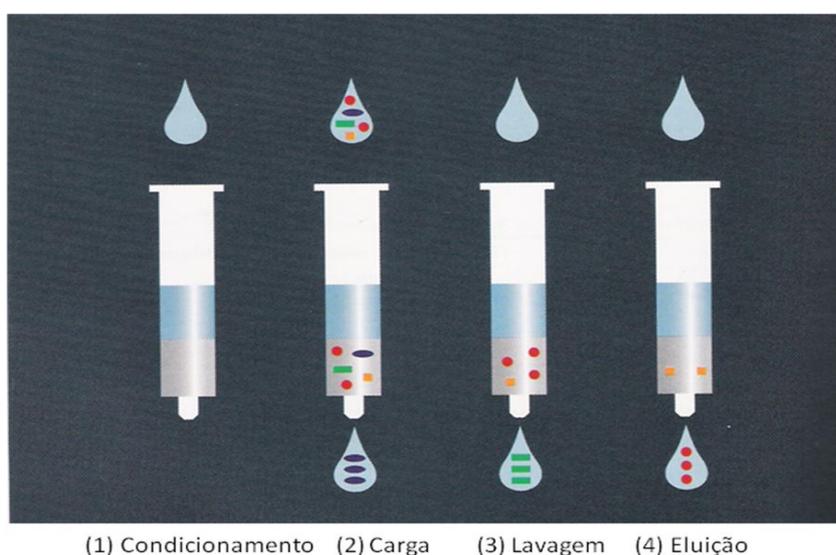
que podem ser *off-line* ou *on-line*. A vantagem dos equipamentos *on-line* é dispensar a manipulação da amostra pelo analista entre a extração e injeção (GUNDERSEN & BLOMHOFF, 2001).

A EPP e a ELL apresentam as vantagens de serem simples e compatível com o uso de grande número de solventes puros e disponíveis comercialmente, porém são trabalhosas, lentas e apresentam o risco de oxidação e isomerização do analito (QUATTROCCHI *et al.*, 1992).

Na EFS, ocorre diminuição na possibilidade de contaminação da amostra e do analista; ausência de perda do analito por evaporação e a análise da totalidade do material da matriz biológica concentrada (HENNION, 1999).

A EFS processa-se em pequenas colunas ou cartuchos de plástico revestidos por material similar aos empregados nas colunas de CLAE (COLLINS & JARDIM, 2001).

Em geral, os procedimentos de EFS contêm quatro etapas: (1) condicionamento da fase sólida pelo emprego de solvente/solução adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; (2) carga da amostra, quando ocorre a retenção do analito e, às vezes, de alguns interferentes; (3) lavagem da fase sólida para retirar os interferentes menos retidos que o analito; (4) eluição do analito (figura 10).



**Figura 10.** Etapas da extração em fase sólida (GILSON *GUIDE TO SPE AUTOMATION*, 1997).

### **1.5.3 Desenvolvimento de Metodologia Analítica**

Os métodos analíticos para a quantificação de fármacos e metabólitos em amostras biológicas desempenham um papel determinante na avaliação e interpretação dos resultados decorrentes de ensaios pré-clínicos, clínicos e biofarmacêuticos. Nesse contexto, a validação de um método analítico assume papel fundamental no reconhecimento e confiabilidade dos dados obtidos a partir do emprego dessa metodologia.

O desenvolvimento de um novo método analítico é a fase mais crítica de todo o processo de quantificação de um fármaco, podendo ser mais simples ou complexo dependendo do analito de interesse, da matriz em que se encontra e da experiência do investigador. O desenvolvimento da metodologia de quantificação poderá envolver apenas a adaptação de um método já existente às novas condições laboratoriais ou implicar em metodologia inovadora, requerendo um trabalho mais completo. Geralmente, um método analítico bem desenvolvido será fácil de validar, ou seja, os critérios de aceitação dos parâmetros de validação que asseguram a aceitabilidade do método serão certamente cumpridos.

### **1.5.4 Validação de Metodologia Analítica**

Antes da implantação de um método analítico é necessário que ele seja validado. A validação da metodologia analítica é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (BARROS, 2002; BRITTO *et al.*, 2003, RIBANI *et al.*, 2004). O objetivo da validação é demonstrar que os resultados obtidos com a metodologia são confiáveis (CAUSON, 1997; HUBERT *et al.*, 1999).

A validação é necessária sempre que se desenvolve um método ou se efetua adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos (BRITTO *et al.*, 2003).

No Brasil, a validação da metodologia analítica deve seguir os parâmetros preconizados por uma das duas agências credenciadoras às quais os laboratórios que executam as análises devem submeter-se: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) ou o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro). Cada um desses órgãos disponibiliza guias para o procedimento

de validação de métodos analíticos, respectivamente a Resolução-RE N° 899, de 29 maio de 2003 e o documento Inmetro DOQ-CGCRE-008, de março de 2003 (RIBANI *et al.*, 2004).

Segundo o guia da Anvisa, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas e para tanto deve apresentar especificidade/seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), estabilidade e recuperação, adequados à análise. A determinação da maioria desses parâmetros de validação requer a construção de curvas de calibração.

- **Curva de calibração e critérios de aceitabilidade**

Uma curva de calibração está associada ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta do instrumento (área do sinal cromatográfico) e a concentração conhecida do analito. Para a construção da curva de calibração é necessário escolher um método de padronização. Normalmente, o método escolhido para a análise fármacos em fluidos biológicos é a padronização interna. Neste método, a curva de calibração inclui uma amostra denominada branco (matriz biológica sem adição de padrão de fármaco e padrão interno - PI), uma amostra denominada zero (matriz biológica sem adição de padrão de fármaco, porém com adição de PI) e seis amostras de concentrações diferentes contendo tanto o padrão de fármaco quanto o PI.

Para que uma curva de calibração seja aceita, deve-se obter:

- desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o limite inferior de quantificação (LIQ);
- desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração;
- no mínimo quatro das seis concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva de calibração;
- o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003).

## **- Métodos de Padronização**

### **(a) Padronização interna**

O método de padronização interna consiste na preparação de padrões de calibração contendo diferentes concentrações do analito e uma concentração constante de PI (CASSIANO *et al.*, 2009). O PI é um composto, geralmente com características estruturais similares ao analito e idealmente deve possuir tempo de retenção próximo ao mesmo, não deve reagir com o analito ou com qualquer outro componente da matriz, além de precisar ser bem cromatografado em relação aos outros componentes da amostra.

Para a quantificação da substância de interesse, inicialmente, analisam-se os padrões de calibração e se constrói a curva de calibração, relacionando as razões de áreas (área do analito / área do PI). Posteriormente, analisam-se as amostras de concentração desconhecida adicionando-se a mesma quantidade de PI que foi adicionada aos padrões de calibração e através da razão de áreas obtidas no cromatograma tem-se a concentração do analito na amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

### **(b) Padronização externa**

No método de padronização externa compara-se a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas a partir de soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão. Assim, uma curva é obtida a partir da preparação de amostras com diversas concentrações, relacionando-se as áreas com as concentrações. Depois, se utiliza a equação desta curva para calcular a concentração de uma amostra desconhecida a partir da área obtida na sua injeção. Este método é mais sensível a erros de preparo de soluções e de amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

### **(c) Adição de Padrão**

Este método consiste na adição de diferentes concentrações do analito à matriz, que já contém uma quantidade desconhecida do mesmo. A adição deve ser feita antes do processo de tratamento da amostra. A concentração do analito na matriz biológica é determinada pela extrapolação da reta definida pelas demais concentrações analisadas até o ponto onde a mesma corta o eixo das ordenadas.

O método de adição padrão é trabalhoso, mas é especialmente importante quando a amostra é muito complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando houver dificuldade de encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância de interesse (CASSIANO *et al.*, 2009).

- **Especificidade/Seletividade**

A especificidade e/ou seletividade é a capacidade do método analítico em avaliar o analito na presença de outros componentes que possam estar presentes na amostra, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou componentes de matriz (BRASIL, 2003). A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI *et al.*, 2004). Se a seletividade não for assegurada, os outros parâmetros da validação estarão comprometidos.

Existe certa confusão na utilização dos termos seletividade e especificidade, de forma que a resposta que um método bioanalítico apresenta para as diversas substâncias presentes em uma amostra é chamada de seletividade, enquanto que a habilidade que um método possui de responder a uma única substância é chamada de especificidade (CASSIANO *et al.*, 2009). Como existem poucos métodos cromatográficos que respondam a apenas uma substância, o termo seletividade é mais apropriado, sendo sugerida sua utilização pela IUPAC (RIBANI *et al.*, 2004).

Existem vários ensaios para avaliar a seletividade e, segundo a Anvisa, deve-se realizar a análise de amostras branco (matriz isenta do analito) de seis indivíduos diferentes e comparar com a matriz enriquecida com o analito, sendo que, nenhum interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção da substância de interesse.

No caso do retinol e ácido retinóico, não é possível obter a matriz biológica isenta desses analitos, uma vez que eles são retinóides endógenos, e por isso, o ensaio de seletividade não foi realizado.

- **Linearidade**

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito (BRASIL, 2003). Ela é

determinada com auxílio de uma curva de calibração construída para determinar as concentrações do analito numa faixa de concentração definida entre o LIQ e o limite superior de quantificação (LSQ).

- **Precisão**

Representa o grau de repetibilidade dos resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio (BRASIL, 2003).

A precisão é avaliada utilizando-se no mínimo três concentrações (baixa – CQ\_CB, média – CQ\_CM e alta – CQ\_CA), que são conhecidas como controles de qualidade (CQ). Deve-se realizar, no mínimo, cinco determinações de cada CQ e a precisão deve ser determinada intra-corrída (em uma mesma corrida) e inter-corrída (em corridas diferentes).

A precisão é expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%, segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Onde: DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

- **Exatidão**

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência (BRASIL, 2003).

É determinada da mesma maneira que a precisão, porém a exatidão é expressa pela fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

- **Limite de Detecção (LD)**

É a menor concentração de uma analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob determinadas condições experimentais (BARROS, 2002; RIBANI *et al.*, 2004).

O LD é determinado por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até que a relação sinal: ruído da linha de base seja de 3:1 ou 2:1.

- **Limite Inferior Quantificação (LIQ)**

Menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis. É determinado por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do analito até que se obtenha uma razão sinal:ruído da linha de base de 5:1, ou ainda, através do sinal de resposta no LIQ que deve ser reprodutível com precisão de 20% e exatidão de 80-120%, através da análise de no mínimo cinco amostras.

- **Estabilidade**

Parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo.

A estabilidade deve ser estabelecida em soluções-estoque, amostras biológicas e amostras processadas (CAUSON, 1997), sendo determinada em curta duração, longa duração, após ciclos de congelamento e descongelamento da amostra e pós-processamento.

As estabilidades devem ser avaliadas com no mínimo três amostras de concentrações baixa e alta. Na estabilidade de curta duração, as amostras devem permanecer em temperatura ambiente de 4 à 24h e analisadas. Os resultados devem ser comparados com amostras recém-preparadas (BRASIL, 2003).

Na estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras devem ser congeladas à temperatura indicada para armazenamento e mantidas por 24h, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente e quando completamente descongeladas, as amostras devem ser novamente congeladas por 12 à 24h, repetindo este ciclo pelo número de vezes que amostras serão descongeladas no estudo (BRASIL, 2003).

Quando são utilizados equipamentos que empregam sistemas automáticos de injeção, o estudo de estabilidade pós-processamento também deve ser realizado. Neste caso, três amostras de concentração baixa e alta devem ser preparadas e

devem aguardar para serem injetadas por um período de tempo maior do que a duração de uma corrida analítica. Os resultados devem ser comparados com CQ recém-preparados (BRASIL, 2003).

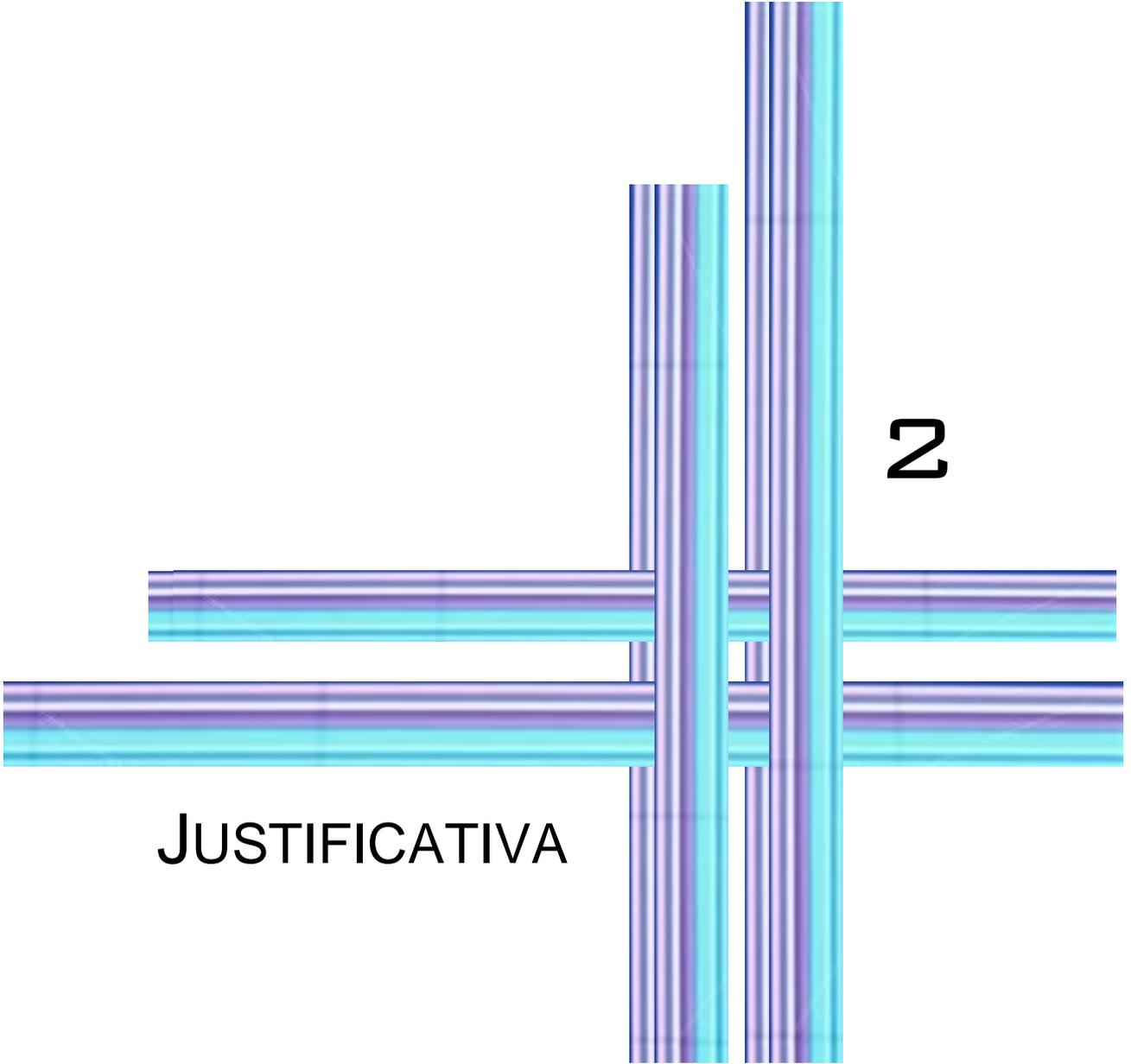
- **Recuperação**

As amostras biológicas não podem ser analisadas diretamente, devendo ser previamente submetidas a processos de preparação mais ou menos complexos, para eliminar possíveis substâncias interferentes.

Todas estas etapas de pré-tratamento das amostras conduzem, inevitavelmente, a perdas nos analitos, sendo importante estimar a capacidade de recuperação destes a partir da matriz biológica. Na metodologia bioanalítica, especialmente em procedimentos cromatográficos, é muito comum a adição de um PI às amostras antes da respectiva preparação. A adição do PI tem por objetivo considerar as perdas que ocorrem durante o processo de extração e análise cromatográfica, ou seja, uma variação na resposta do PI refletirá de forma similar na resposta do analito porque ambos serão processados em conjunto.

A eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, é obtida através da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão, e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas. São desejáveis porcentagens de recuperação próximas de 100%, porém valores menores são admitidos desde que a recuperação seja precisa e exata (BRASIL, 2003).

A recuperação é analisada comparando-se os resultados de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta) com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que correspondem a 100% de recuperação.



JUSTIFICATIVA

2

A doença hepática crônica é caracterizada por alterações na estrutura e na capacidade funcional dos hepatócitos, levando à morte celular e formação de nódulos de regeneração que dificultam a troca de substâncias entre o sangue e as células hepáticas. Devido ao papel central do fígado nas inúmeras vias bioquímicas relacionadas com a produção, modificação e utilização de macro- e micronutrientes, o próprio curso da doença hepática leva a anormalidades metabólicas, propiciando o desenvolvimento ou agravamento da desnutrição que é relativamente comum em pacientes acometidos por essa enfermidade.

Este trabalho surgiu a partir da necessidade de continuidade de um estudo de reserva hepática de vitamina A em pacientes com doença hepática crônica em todos os graus: hepatite, cirrose Child A, cirrose Child B, cirrose Child C e cirrose associada ao CHC.

Inicialmente, este estudo foi realizado pela professora Wilza Arantes Ferreira Peres em sua tese de doutorado **“Relação entre o estado nutricional de vitamina A, estágios da doença e parâmetros bioquímicos de função e lesão hepática em pacientes com hepatite crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular pelo vírus da hepatite C”**. Nessa tese, seu objetivo principal foi avaliar a reserva hepática de retinol em pacientes com doença hepática crônica causada pelo vírus C para planejar uma suplementação adequada deste nutriente. O procedimento de suplementação adequada assume importância na doença hepática grave, pois enquanto a deficiência de vitamina A pode colaborar com o desenvolvimento de cirrose e CHC, o excesso desse nutriente pode ser ainda mais prejudicial, pelo fato do retinol ser hepatotóxico.

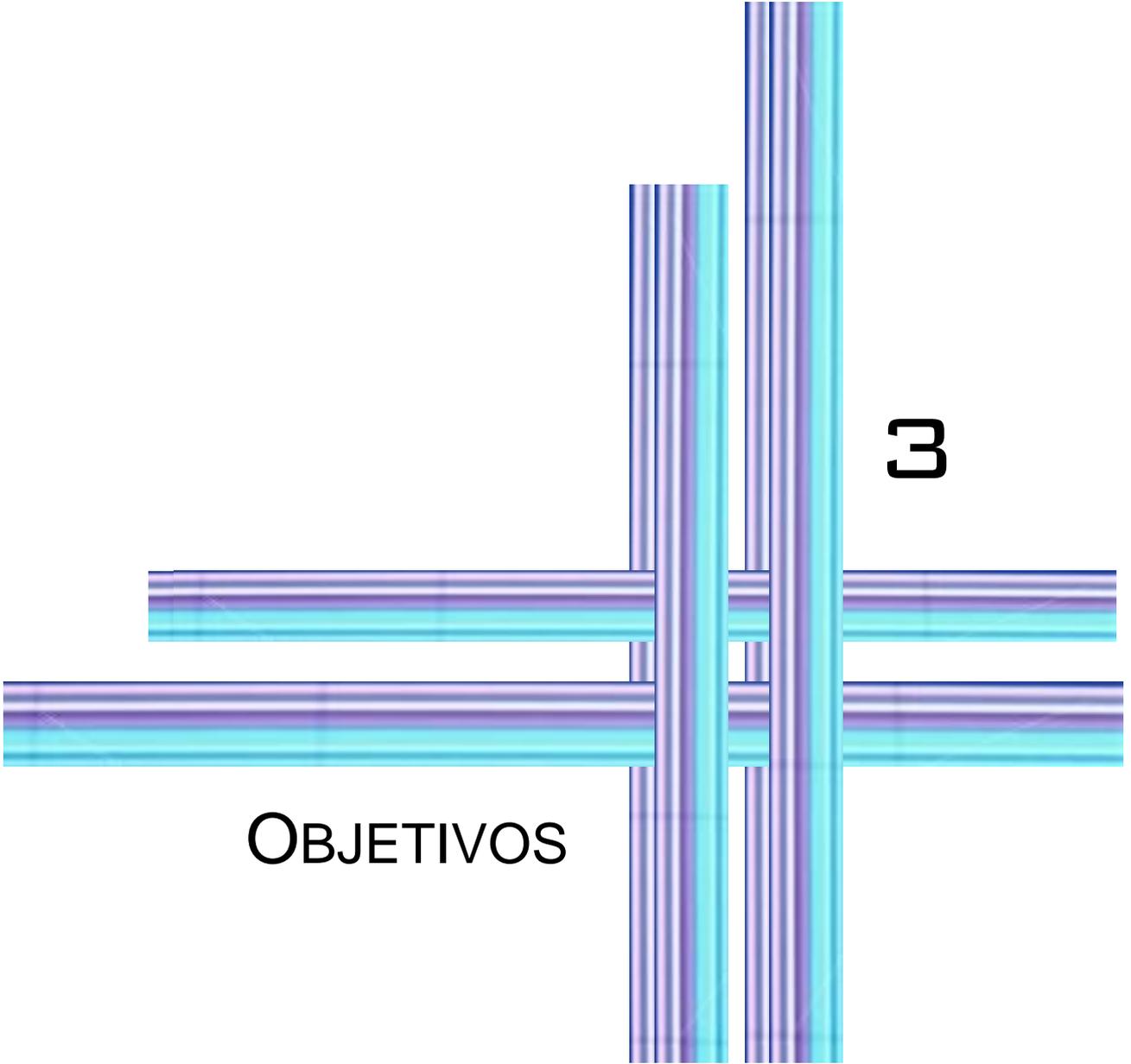
A reserva nutricional de vitamina A foi avaliada pelo teste de resposta relativa à dose (RDR) padrão e como resultados de seu trabalho, Peres descreveu a necessidade de uma adaptação deste teste, utilizando dose de palmitato de retinila e tempo de colheita de amostras no protocolo clínico maiores, devido ao fato da maioria dos pacientes possuírem idade avançada, o que pode acarretar uma redução na velocidade de absorção da vitamina A.

A partir desta necessidade, desenvolveu-se o projeto de tese intitulado **“Adaptação do teste de avaliação indireta da reserva hepática de retinol para diagnóstico do estado nutricional de vitamina A em pacientes com cirrose hepática e carcinoma hepatocelular”**. Esta tese foi submetida ao Programa de

---

Pós Graduação em Clínica Médica – Setor de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF pela doutoranda Gabriela Villaça Chaves, sob orientação das professoras Dra. Rejane Andréa Ramalho Nunes da Silva e Dra. Wilza Arantes Ferreira Peres.

O desenvolvimento deste trabalho sob a orientação do Professor Dr. José Carlos Saraiva Gonçalves, surge da hipótese de que a razão entre as concentrações séricas de retinol e ácido retinóico seja um biomarcador de dano hepático mais fidedigno do que os retinóides (retinol e ácido retinóico) empregados isoladamente. Justifica-se esta hipótese na medida em que a biotransformação do retinol ao ácido retinóico depende de sistemas enzimáticos hepáticos. Tanto o retinol, como o ácido retinóico já foram descritos como parâmetros bioquímicos de evolução de patologias. A razão entre esses produtos, no entanto, ao nosso conhecimento, ainda não foi descrita como eventual biomarcador de hepatopatias.



OBJETIVOS

3

### **3.1 Objetivo Principal**

Desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE-EMS para quantificação simultânea das concentrações séricas de retinol e ácido retinóico aplicável na rotina hospitalar.

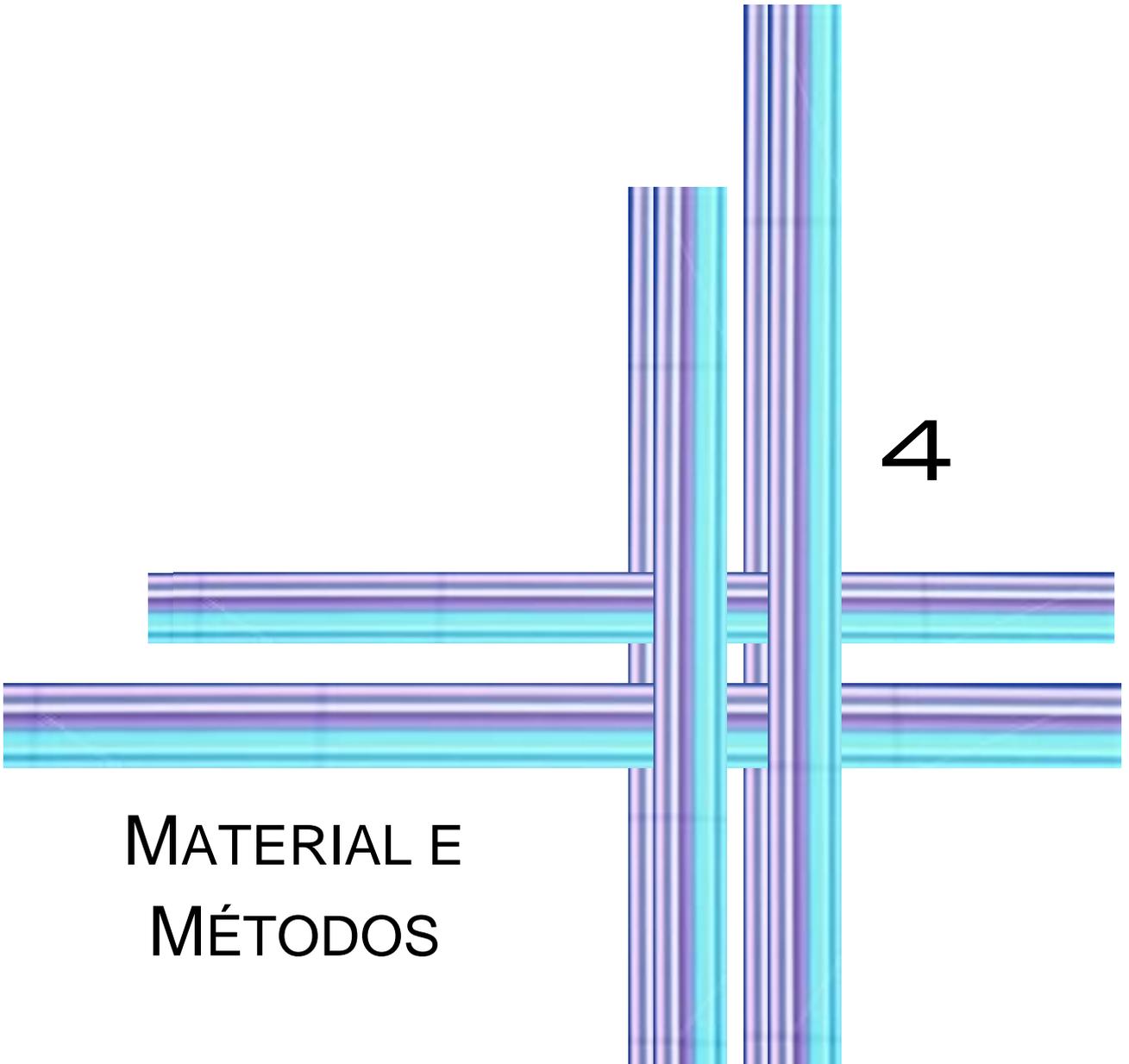
### **3.2 Objetivos Secundários**

1. Determinar as concentrações séricas de retinol e ácido retinóico em pacientes com cirrose hepática divididos em dois grupos de acordo com a dose desafio: 1500 UI e 2500 UI de palmitato de retinila.

2. Investigar a influência da dose desafio (1500 UI e 2500 UI) de palmitato de retinila nas concentrações plasmáticas de retinol, ácido retinóico e na razão entre essas concentrações, quando relacionadas com os marcadores bioquímicos de dano hepático.

3. Investigar a influência do tempo de colheita da amostra sanguínea (5 horas e 7 horas) após a administração da dose de suplementação nas concentrações plasmáticas de retinol, ácido retinóico e na razão entre essas concentrações, quando relacionadas com os marcadores bioquímicos de dano hepático.

4. Investigar a relação entre as concentrações séricas de retinol, ácido retinóico e a razão entre as concentrações destes retinóides, com os marcadores bioquímicos de função hepática (TAP, BT e albumina) e lesão hepática (ALT e AST).



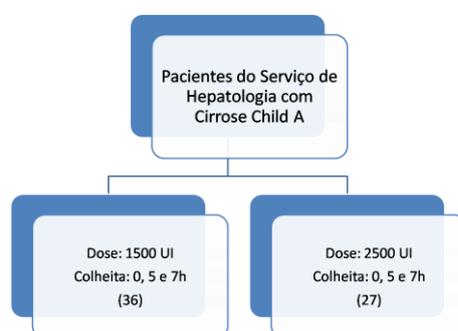
MATERIAL E  
MÉTODOS

#### 4.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo de desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de retinol e ácido retinóico e para a descrição dos perfis das concentrações destes retinóides em pacientes com cirrose Child A, incluindo as etiologias viral, alcoólica e criptogênica.

A população estudada foi constituída de pacientes (de ambos os sexos, independente de etnia e classe social) atendidos no Ambulatório do Serviço de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF/UFRJ no período de outubro de 2007 a março de 2010.

Os pacientes foram divididos em dois grupos: o primeiro seguiu o protocolo RDR padrão (dose de 1500 UI de palmitato de retinila e colheitas de amostras nos tempos de 0 e 5 horas), adicionando a este protocolo o tempo de colheita de 7 horas. O outro grupo recebeu uma dose de 2500 UI de palmitato de retinila (dose desafio) sendo realizadas colheitas nos tempos 0, 5 e 7 horas (figura 11).



**Figura 11.** Organograma do desenho do estudo

A colheita de sangue no tempo zero (basal) foi realizada após 12 horas de jejum noturno. Depois da colheita de sangue, foi administrado por via oral, 1500 UI ou 2500 UI de palmitato de retinila (UNICEF, Batch, 948 R.P Schem PTY.Co, Melbourne, Austrália) diluído em 1 mL de solução oleosa. Em seguida, os pacientes receberam desjejum padrão (teor total estimado de 9,7g de lipídeos e 378 µg de equivalente de atividade de retinol (RAE) de vitamina A) composto de 200 mL de achocolatado, duas fatias de pão de forma, margarina e queijo tipo prato, a fim de garantir a absorção do palmitato. Após o intervalo de 5 horas, foi

realizada a segunda colheita de sangue e, de 7 horas, a terceira colheita. Durante este período, os pacientes foram orientados a não consumir nenhum alimento, sendo permitido somente o consumo de água.

As amostras colhidas foram submetidas à centrifugação a 3000 rpm, por 10 minutos para separação e extração do soro. A seguir, as amostras foram armazenadas em tubos plásticos (*ependorfs*) previamente rotulados, envolvidos em papel alumínio e novamente etiquetados, para armazenamento imediato em freezer à temperatura de -80 °C até o momento das análises.

O protocolo RDR é um método de avaliação indireta da reserva hepática de retinol. Este protocolo baseia-se no princípio de que, na depleção hepática de retinol, a apo-RBP (proteína de transporte dos retinóides no sangue), cuja síntese independe da disponibilidade de retinol, se acumula nos hepatócitos. Diante da administração de uma pequena dose de retinol (normalmente inferior às recomendações diárias desta vitamina), este se liga à RBP, formando a holo-RBP, e é liberado para a corrente sangüínea. Desta forma, o incremento nos níveis séricos é rápido e sustentado por um período médio de 5 horas, de maneira que os valores séricos do retinol antes e 5 horas após a administração da dose devem ser significativamente diferentes (LOERCH *et al.*, 1979).

No teste RDR é administrada uma dose de 1500 UI de palmitato de retinila utilizada para provocar resposta no tempo de 5 horas. Porém, Mobarhan e colaboradores (1981), em estudo com pacientes cirróticos, encontraram falta de RDR positiva em alguns indivíduos e observaram que eles possuíam uma má absorção ou ainda uma absorção lenta da dose. Além disso, Bulux e colaboradores (1992) encontraram baixo clearance pós-prandial de lipídeos e ésteres de retinila na circulação de pacientes idosos e, como a vitamina A absorvida depende do clearance dos QMs para levá-la do intestino ao fígado, onde ela será ligada a apo-RBP, os autores sugerem um tempo de 7 horas para RDR em indivíduos após 60 anos e, por isso, realizamos uma colheita também neste intervalo após a administração do palmitato de retinila. A utilização da dose de 1500 UI no protocolo RDR é baseada nas respostas características obtidas com indivíduos saudáveis e, segundo o estudo de Mobarhan e colaboradores (1981), a dosagem utilizada pode ter sido abaixo da dose necessária para obter resposta em pacientes que possuem doença hepática associada à absorção limitada de

retinóides e, por isso, resolvemos administrar uma dose maior (2500 UI) para avaliar a resposta desses indivíduos.

#### **4.2 Aspectos Éticos**

O presente estudo tem aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Protocolo de Pesquisa nº 068/01 – CEP).

#### **4.3 Recrutamento de Pacientes**

A inclusão de cada paciente no estudo foi realizada mediante autorização formal, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), após explicação sobre os objetivos e procedimentos do projeto por parte de um pesquisador do Núcleo de Pesquisa em Micronutrientes – NPqM do Instituto de Nutrição Josué de Castro – UFRJ, de acordo com a Resolução Nº 196 de 10/10/1996 do Conselho Nacional de Saúde. Em contrapartida à sua participação no estudo, os pacientes receberam diagnóstico do estado nutricional de vitamina A e orientação dietética.

##### **- Critério de Inclusão**

Cirrose hepática diagnosticada pela presença de nódulos de regeneração ao exame histopatológico do fígado ou, na ausência de biópsia, pela presença de achados clínicos de insuficiência hepática (edema, ascite, icterícia, encefalopatia hepática – EH) e hipertensão porta (varizes do esôfago, hiperesplenismo ou achados ultra-sonográficos)

##### **- Critérios de Exclusão**

1. Síndromes Disabsortivas;
2. Infecção de moderada a severa gravidade;
3. Diabetes Mellitus insulino-dependente e/ou descompensada;
4. Insuficiência renal, cardíaca ou respiratória;

5. Amiloidose;
6. Uso de doses terapêuticas de vitamina A, nos últimos 30 dias;
7. Doenças crônicas não estáveis;
8. Gravidez;
9. Alcoolismo crônico;
10. Neoplasias.

#### 4.4 Instrumento de Coleta de Dados

O instrumento que foi empregado na coleta de dados é constituído de formulário preenchido pelo pesquisador do Núcleo de Pesquisa em Micronutrientes – NPqM (Anexo 2), por meio de entrevista e consulta de prontuários.

#### 4.5 Classificação da Gravidade da Cirrose Hepática

Os pacientes com cirrose hepática foram avaliados em relação à presença de insuficiência hepática por meio da classificação de Child & Pugh (1973) que os divide em três grupos (A, B e C) de acordo com a presença e o grau de ascite, EH, alterações nos níveis de albumina, bilirrubina total (BT) e TAP em segundos. Essas variáveis são pontuadas de 1 a 3 e é geralmente aceito, embora não universalmente, que pacientes com somatórios entre 5-6 pontos pertencem ao grupo A, entre 7-9 pontos ao grupo B e entre 10-15 pontos ao grupo C (CHRISTENSEN, 1997) (Quadro 3).

**Quadro 3.** Classificação da gravidade da doença hepática de acordo com o critério de Child & Pugh (PUGH *et al.*, 1973)

Variáveis	1 ponto	2 pontos	3 pontos
<b>Encefalopatia hepática</b>	Ausente	Grau 1-2	Grau 3-4
<b>Ascite</b>	Ausente	Leve - moderada	Grave – refratária
<b>Albumina (g/dL)</b>	> 3,5	2,8 – 3,5	< 2,8
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b>	< 2,0	2,0 – 3,0	> 3,0
<b>Tempo de protombina (segundos acima do controle)</b>	< 4,0	4,0 – 6,0	> 6,0

*Child classe A: 5 a 6 pontos; Child classe B: 7 a 9 pontos; Child classe C: 10-15 pontos*

O grau de EH foi definido pelo julgamento clínico, pela fala e comportamento do paciente na consulta, pelas alterações relatadas por ele e/ou familiares e pelos sinais clínicos característicos, categorizados nos estágios descritos no quadro 4.

**Quadro 4.** Estágios de encefalopatia hepática

<b>Estágio 1</b>	Alteração no padrão sono-vigília, confusão mental leve, pronúncia alterada das palavras, tremor ( <i>flapping</i> ) discreto
<b>Estágio 2</b>	Acentuação do estágio 1, comportamento inapropriado, insônia, <i>flapping</i> presente e facilmente induzido
<b>Estágio 3</b>	Fala incoerente, confusão mental marcante, sonolência, mas facilmente despertável, <i>flapping</i> presente
<b>Estágio 4</b>	Coma

O grau de ascite foi classificado em leve, moderado ou grave e determinado segundo avaliação clínica, resistência à terapêutica diurética e/ou ultra-sonografia abdominal.

#### 4.6 Exames Bioquímicos

Os pacientes que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido foram encaminhados para o laboratório de análises clínicas do HUCFF, sendo coletada amostra de sangue para determinação dos exames bioquímicos constantes no quadro 5.

**Quadro 5:** Valores de referência dos parâmetros de normalidade dos exames bioquímicos realizados no HUCFF

<b>Parâmetros Bioquímicos</b>	<b>Valores de Normalidade adotados no HUCFF</b>
Albumina	3,4 – 5,0 g/dL
Tempo e atividade de protrombina (TAP)	Segundos acima do controle
Bilirrubina Total (BT)	0,0 – 1,0 mg/dL
Aspartato Aminotransferase (AST)	15 – 37 U/L
Alanina Aminotransferase (ALT)	30 – 65 U/L

## 4.7 Metodologia da Etapa Analítica

### 4.7.1 Equipamentos:

- Cromatógrafo Líquido Série 10A – Shimadzu, composto de sistema controlador SCL-10A VP, bomba de micro-pistão LC-10AD VP, misturador de fases FCV 10 AL VP e degaseificador DGU-14A
- Injetor Triathlon – Spark Holland
- Espectrômetro de massas triplo quadrupolo Quattro LC – Micromass acoplado a gerador de nitrogênio Nitrox UHPLC MS 18 – Dornick Hunter; a compressor Jun Air e a bomba de vácuo Boc Edwards 28
- Extrator em Fase Sólida – Spark Holland, composto de HPD (*High Pressure Dispenser*) Mix e ACE (*Automated Cartridge Exchange*)
- Estação de coleta e registro de dados dos cromatogramas com programas MassLynx 4.0 e SparkLink 1.7

### 4.7.2 Material:

#### (a) Solventes

- Acetonitrila grau HPLC – Tédia
- Água ultrapura obtida através de sistema purificante US Filter
- Etanol grau HPLC – Tédia
- Metanol grau HPLC – Tédia
- Tampão acetato de amônio grau analítico – Tédia
- Ácido fórmico 96% – Tédia

#### (b) Padrões

- Acetato de retinila – Sigma
- Ácido retinóico - Sigma
- Palmitato de retinila – Sigma
- Retinol – Sigma

#### (c) Colunas

- Rexchrom® S5-C8 (fase octil) 15 cm X 4,6 mm X 5 µm

- Restek® Ultra PFP (fase pentafluorofenil) 10 cm X 3,2 mm X 3 µm
- ACE AQ® C18 (fase octadecil) 15 cm x 4,6 mm x 5 µm.

#### **(d) Cartuchos para Extração em Fase Sólida**

- BondElut C8 (fase octil), 40-90 µm, Spark Holland®
- BondElut C18 (fase octadecil), 40-90 µm, Spark Holland®
- HySphere C18 (EC) (fase octadecil), 8 µm, Spark Holland®
- HySphere Resin GP (*general phase, fase polidivivil-benzeno*), 10-12 µm, Spark Holland®

#### **4.7.3 Preparo de Soluções-padrão**

Foram pesadas analiticamente, quantidades equivalentes a 0,1000 g das substâncias padrões (acetato de retinila, ácido retinóico, palmitato de retinila e retinol), que foram transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 100,0 mL. As soluções foram preparadas em etanol grau HPLC resultando em uma concentração final de 1 mg/mL (solução estoque). A partir desta solução estoque foram preparadas diluições, de forma a se obter, as demais soluções necessárias para a construção de calibradores e controles de qualidade.

#### **4.7.4 Desenvolvimento da Metodologia Analítica:**

##### **• Parâmetros de Espectrometria de Massas**

Nesta etapa, foi investigada a influência de variáveis espectrométricas e cromatográficas na abundância relativa dos íons monitorados. Os parâmetros espectrométricos avaliados foram: modo de ionização – APCI e ESI positivo e negativo; energia do cone de amostra; energia de colisão; temperatura da fonte de ionização; temperatura de dessolvatação e fluxo do gás de dessolvatação. Os parâmetros cromatográficos avaliados foram principalmente relacionados a natureza dos constituintes da fase móvel: misturas de acetonitrila:água e metanol:água em diversas proporções; acetonitrila:tampão acetato de amônio pHs 6,9 e 4,1 e metanol:tampão acetato de amônio pHs 6,9 e 4,1 em diversas proporções, com ou sem a adição de 0,1% de ácido fórmico.

Para a escolha da energia do cone de amostra, a voltagem foi avaliada entre 10-50 V. A energia de colisão variou entre 10-30 V. A temperatura da fonte de ionização foi fixada em 110 °C e a temperatura de dessolvatação em 330 °C. O fluxo de nitrogênio foi avaliado entre 250-700 L/h.

- **Parâmetros Cromatográficos**

Para escolha dos parâmetros cromatográficos foram testadas diversas proporções das misturas metanol:acetonitrila:água com adição de 0,1% de ácido fórmico e metanol:acetonitrila:tampão acetato de amônio com adição de 0,1% de ácido fórmico. As eluições foram investigadas nos modos isocrático e em gradiente. Além disso, várias colunas com diferentes recheios e tamanhos também foram testadas, entre elas: Rexchrom® S5-C8 15 cm X 4,6 mm X 5 µm, Restek® Ultra PFP 10 cm X 3,2 mm X 3 µm e ACE AQ® C18 15 cm x 4,6 mm x 5 µm.

- **Eliminação dos níveis basais de retinol e ácido retinóico**

Soluções etanólicas de retinol na concentração de 100 ng/mL e de ácido retinóico na concentração de 1 ng/mL foram irradiadas com lâmpada UV 254nm e alíquotas foram retiradas nos tempos de 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min e 180 min. Estas alíquotas foram analisadas por CLAE-EMS para observar o decaimento da área dos analitos.

Amostras de soro branco também foram irradiadas por um tempo de 6,5 h para observar se era possível eliminar o retinol e ácido retinóico basal.

- **Escolha do Método de Extração dos Analitos a partir da Matriz Biológica**

Para extrairmos os analitos a partir da matriz biológica, foram avaliados dois métodos de extração: líquido-líquido e em fase sólida. Na escolha do método a ser empregado foram considerados os parâmetros: índice de recuperação dos analitos, capacidade de eliminar interferentes, condições de detecção e quantificação dos dois analitos (retinol e ácido retinóico) e risco operacional, levando-se em conta as particularidades destas substâncias com relação à oxidação, isomerização e degradação.

### **Extração líquido-líquido**

À 1 mL de soro foram adicionados 3 mL de Hidróxido de potássio (KOH) 0,025 M e esta mistura foi submetida ao vórtex por 20 segundos. Após a homogeneização, foram adicionados 3 mL de hexano e procedeu-se nova homogeneização por 20 segundos em vórtex. Esta mistura foi centrifugada por 5 minutos, a 10000 rpm em temperatura ambiente e a fase orgânica contendo os retinóides apolares (retinol e ésteres de retinila) foi coletada, evaporada, ressuspensa em fase móvel e injetada em cromatógrafo líquido.

À fração aquosa foi adicionado 250 µL de ácido clorídrico (HCl) 4M e esta mistura foi submetida ao vórtex por 20 segundos. Após a homogeneização, foram adicionados 3 mL de hexano e procedeu-se nova homogeneização por 20 segundos em vórtex. Assim como na extração com base, esta mistura foi centrifugada por 5 minutos, a 10.000 rpm em temperatura ambiente e a fase orgânica contendo agora os retinóides polares (ácido retinóico e seus metabólitos) foi coletada, evaporada, ressuspensa em fase móvel e injetada no cromatógrafo líquido.

### **Extração em fase sólida**

O processo de EFS foi desenvolvido em quatro etapas: condicionamento do cartucho, carga com a amostra, lavagem (desproteínização) e eluição em linha (*on line*). Foram avaliados quatro cartuchos de diâmetro interno de 10 X 2 mm, porém com fases sólidas e granulometrias diferentes: BondElut C18 40-90 µm; BondElut C8 40-90 µm; HySphere C18 (EC) 8 µm e HySphere Resin GP 10-12 µm.

Após a escolha do cartucho extrator, foram avaliadas duas extrações:

1<sup>a</sup>: Condicionamento com acetato de amônio 2%, carga com 100 µL de soro, lavagem com metanol, eluição com FM e lavagem do cartucho com acetato de amônio 0,5%: ACN (85:15).

2<sup>a</sup>: Condicionamento com água:acetonitrila (2:1), carga com 100 µL de soro, lavagem com água, eluição com FM e lavagem do cartucho com ACN.

Entre essas duas extrações, a segunda foi escolhida, por fornecer melhores perfis dos picos cromatográficos e separação dos interferentes.

Após a escolha dos solventes que seriam utilizados em cada etapa da extração, foram avaliados diferentes volumes e fluxos para cada um deles. A etapa de carga também foi avaliada de forma que ocorressem uma ou duas cargas de soro no cartucho. Após, decidir que seriam necessárias duas cargas de 100  $\mu\text{L}$  de soro para obtermos limite de quantificação adequado, foi avaliado a necessidade de haver lavagem ou não entre essas cargas.

- **Teste para avaliar a eficiência da EFS em separar os analitos (retinol e ácido retinóico) dos produtos endógenos interferentes (ésteres de retinila)**

A eficiência do processo EFS em reter os ésteres de retinila presentes na matriz biológica (soro) e deixar passar à coluna os analitos (retinol e ácido retinóico) foi avaliada pelo seguinte procedimento:

- Uma solução de palmitato de retinila na concentração de 200 ng/mL foi injetada de maneira direta (controle positivo) para observar se as condições experimentais permitem quantificar este éster, monitorado pela transição  $m/z$  269  $\rightarrow$  93 e determinar o seu tempo de retenção;
- Após esta injeção, uma amostra de soro branco foi enriquecida com 200 ng/mL do palmitato de retinila, submetida à EFS e, posteriormente, à corrida cromatográfica nas mesmas condições que a solução. A eficiência do processo de EFS foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos a partir da amostra de soro enriquecido com palmitato de retinila com o controle positivo.

#### **4.7.5 Validação de Metodologia Analítica na Matriz Biológica**

Os parâmetros analíticos utilizados para validação do método de quantificação do retinol e do ácido retinóico por CLAE-EMS foram: linearidade, precisão e exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, índice de recuperação e estabilidade em solução e na matriz biológica.

- **Linearidade**

A linearidade foi avaliada através da construção das curvas de calibração em soro contendo concentrações adequadas de cada analito:

**1º calibrador:** 1 ng/mL de ácido retinóico e 60ng/mL de retinol

**2º calibrador:** 2,8 ng/mL de ácido retinóico e 140 ng/mL de retinol

**3º calibrador:** 4,6 ng/mL de ácido retinóico e 220 ng/mL de retinol

**4º calibrador:** 6,4 ng/mL de ácido retinóico e 300 ng/mL de retinol

**5º calibrador:** 8,2 ng/mL de ácido retinóico e 380 ng/mL de retinol

**6º calibrador:** 10,0 ng/mL de ácido retinóico e 460 ng/mL de retinol

Para que fossem aceitas, as curvas foram aprovadas em todos os critérios de aceitação preconizados pela Resolução-RE Nº899 da Anvisa.

- **Precisão e Exatidão**

A precisão e a exatidão foram avaliadas através da quantificação de seis réplicas de CQ\_CB (2,0 ng de ácido retinóico e 120 ng de retinol), CQ\_CM (5,5 ng de ácido retinóico e 190 ng de retinol) e CQ\_CA (7,5 ng de ácido retinóico e 345 ng de retinol), em três dias diferentes de forma que fossem determinadas a precisão e exatidão intra- e inter-corridas.

O valor de CQ\_CB foi calculado sendo duas vezes a concentração do LIQ. O CQ\_CA corresponde a 75% do LSQ e o CQ\_CM é, aproximadamente, a média entre CQ\_CB e CQ\_CA.

Os valores experimentais médios das seis réplicas por concentração foram utilizados para determinar a precisão e a exatidão em cada uma das concentrações analisadas, seguindo as fórmulas:

$$Precisão = \frac{DP}{CM} \times 100$$

Onde, DP é o desvio padrão e CM é a concentração média determinada.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Conc. Média Experimental}}{\text{Conc. Teórica}} \times 100$$

A precisão e exatidão inter-corridas foi calculada através da média dos valores encontrados para precisão e exatidão intra-corridas em cada um dos três dias de análise.

- **Limite de Detecção**

O LD foi estabelecido pelo método da relação sinal/ruído da linha de base determinado a partir de quantidades decrescentes dos analitos em solução até que fosse obtida a relação sinal/ruído de 2:1.

- **Limite de Quantificação**

O LQ de quantificação foi determinado através da resposta de precisão e exatidão do LIQ.

- **Índice de Recuperação**

A recuperação foi analisada através da injeção de quatro amostras de soro branco para cálculo do retinol e ácido retinóico basal e quatro amostras de soro enriquecidas com os analitos nas concentrações de CQ\_CB, CQ\_CM e CQ\_CA sem adição PI e extraídas por EFS e soro enriquecido somente com PI e posteriormente extraído por EFS. O objetivo da injeção do soro branco foi subtrair dos CQs, a área correspondente aos níveis basais dos analitos, para que a recuperação pudesse ser comparada com a injeção de soluções-padrão.

O cálculo da recuperação foi feito de acordo com as equações abaixo:

Área amostras extraídas = área CQ – área soro branco

$$R(\%) = \frac{\text{Área amostras extraídas}}{\text{Área de soluções}} \times 100$$

- ***Estabilidade dos analitos em solução***

Para avaliar a estabilidade das soluções-padrão, foram preparadas soluções nas concentrações correspondentes aos CQ\_CB e CQ\_CA. Estas soluções foram deixadas nas condições do laboratório (temperatura 20-25 °C e umidade relativa 35-55%) durante o período de 8 horas e posteriormente injetadas. Os resultados foram comparados com injeções de soluções nas mesmas concentrações, porém recentemente preparadas.

- ***Estabilidade dos analitos após ciclos de congelamento e descongelamento das amostras sorológicas, curta duração (8 horas) e nas condições de análise (pós-processamento)***

Três réplicas de amostras controle (CQ\_CB e CQ\_CA) de retinol e ácido retinóico foram submetidas às seguintes condições experimentais:

(a) Congeladas a -80 °C por um período de 24 horas, sendo submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente e quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas por 12 horas, repetindo este processo de congelamento e descongelamento até serem obtidos três ciclos. Após os ciclos terem sido completados, as amostras foram extraídas e, então, analisadas;

(b) Deixadas nas condições laboratoriais durante 8 horas e depois extraídas e analisadas (estabilidade de curta duração)

(c) Deixadas na bandeja do injetor de amostras, em temperatura ambiente por 22 horas e depois extraídas e analisadas (estabilidade pós-processamento).

Os valores quantificados para essas amostras foram comparados aos obtidos com CQs recém-preparados.

A estabilidade pós-processamento, normalmente, é realizada extraído-se os analitos a partir da matriz biológica e deixando-se essa amostra já preparada no injetor por um período de tempo superior a corrida analítica de um lote. No caso da EFS, as amostras são injetadas e somente depois extraídas e, por isso, as amostras permaneceram pelo tempo de corrida de um lote no injetor sem terem passado por qualquer tipo de tratamento.

#### **4.7.6 Validação da Metodologia Analítica em Solução**

Após ter sido garantido que a metodologia analítica desenvolvida para quantificação do retinol e ácido retinóico foi aprovada em todos os parâmetros analíticos de validação em matriz biológica preconizados pela Resolução-RE N° 899 da Anvisa, uma nova validação, porém, agora, em solução foi realizada.

O motivo da realização desta validação em solução está relacionado ao fato da matriz biológica (soro) conter quantidades endógenas de retinóides que não puderam ser eliminadas e, portanto, foi necessário quantificar as amostras a partir de curvas de calibração construídas em solução, conforme Rühl e Schweigert (2003) e Gundersen e colaboradores (2007). O índice de recuperação foi utilizado para o cálculo das concentrações dos analitos no soro de pacientes, de forma que a diferença entre as matrizes pudessem ser compensadas.

Na validação do método de quantificação a partir de curvas de calibração construídas em solução, foram investigados os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e estabilidade em solução nas condições de análise do método. Os critérios utilizados para aprovação também estão descritos na Resolução-RE N° 899 da Anvisa, porém não são os mesmos utilizados para matriz biológica. As alterações, nestes critérios, são:

- O coeficiente de correlação ( $r$ ) mínimo para aceitação das curvas analíticas é de 0,99;
- Para a precisão e exatidão intra-corrída são utilizadas três réplicas dos CQs (CQ\_CB, CQ\_CM e CQ\_CA) e a precisão inter-corrída é realizada em dois dias diferentes. O valor máximo aceito para DPR é de 5%.

Na nova validação foram alteradas as concentrações dos calibradores e CQs. Os novos valores utilizados foram:

**1º calibrador:** 0,25 ng/mL de ácido retinóico e 3 ng/mL de retinol

**2º calibrador:** 0,5 ng/mL de ácido retinóico e 6 ng/mL de retinol

**3º calibrador:** 1 ng/mL de ácido retinóico e 12 ng/mL de retinol

**4º calibrador:** 2 ng/mL de ácido retinóico e 24 ng/mL de retinol

**5º calibrador:** 4 ng/mL de ácido retinóico e 48 ng/mL de retinol

**6º calibrador:** 8 ng/mL de ácido retinóico e 96 ng/mL de retinol

**CQ\_CB:** 0,75 ng/mL de ácido retinóico e 9 ng/mL de retinol

**CQ\_CM:** 3 ng/mL de ácido retinóico e 36 ng/mL de retinol

**CQ\_CA:** 6 ng/mL de ácido retinóico e 72 ng/mL de retinol

#### **4.8 Preparo de Amostras dos Pacientes para Quantificação**

Após o descongelamento das amostras de soro dos pacientes, foram adicionados 10 µL de solução de PI 2 µg/mL a 990 µL deste soro. As amostras foram vortexadas e depois filtradas através de membranas de acetato de celulose de 0,45 µm. A amostra filtrada foi, então, submetida à EFS *on line*. As amostras foram quantificadas diretamente pelo software MassLynx 4.0.

Cada lote foi composto pelas amostras branco, zero, seis calibradores de concentrações diferentes em duplicata, amostras de quinze pacientes e CQs para garantir a precisão e exatidão do método analítico durante o tempo de análise de uma corrida analítica. No total foram analisados quatro lotes.

Para que o lote fosse aceito, as curvas de calibração precisavam ser aprovadas seguindo os mesmos critérios de aceitação utilizados na validação da metodologia analítica e, além disso, pelo menos 67% das amostras controles (CQ\_CB, CQ\_CM e CQ\_CA) que foram adequadamente distribuídas entre as amostras dos pacientes, constituindo pelo menos 5% do total das amostras a serem quantificadas, precisavam ser aprovadas. Para que estas amostras fossem aceitas foram necessários desvios menores que 15% dos seus respectivos valores nominais.

#### **4.9 Análise Estatística**

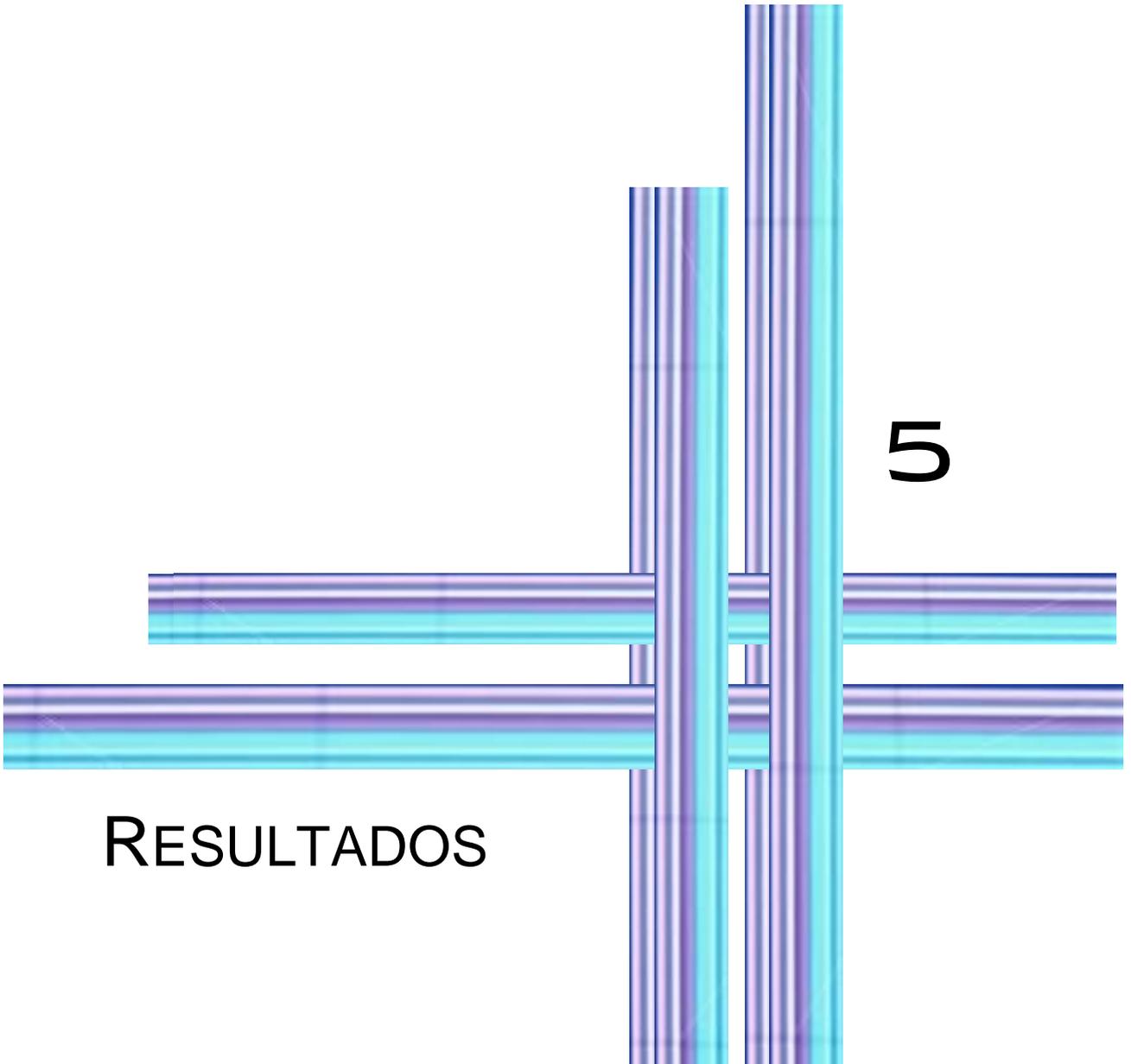
Para observar a existência de algum dado aberrante nos resultados dos ensaios de validação analítica, foi realizado o teste de Grubbs para o nível de significância de 5%

As análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico SPSS *for windows* versão 17.0. Na descrição da amostra, os dados foram expressos em média ± desvio padrão para variáveis numérica e percentual para as variáveis qualitativas.

As medidas de tendência central e de dispersão das variáveis contínuas foram calculadas. Aplicou-se o teste de aderência à curva normal Kolmogorov-Smirnov visando avaliar a simetria da curva de distribuição dos níveis séricos de retinol e demais parâmetros. Identificou-se a distribuição dos valores referidos como normal.

A comparação das variáveis numéricas entre dois grupos foi realizada pelo teste t-Student e a correlação entre as variáveis numéricas foram avaliadas pelo teste de correlação de Pearson.

O critério de determinação de significância foi o nível de 5%.



RESULTADOS

5

5

## 5.1 Resultados da Etapa Analítica

### 5.1.1 Definição dos Parâmetros de Espectrometria de Massas

Entre a ionização por ESI ou APCI, foi escolhido a ESI, pois neste modo obtivemos maior abundância relativa dos dois analitos. Dentre os modos de ionização testados, foi escolhido o ESI positivo, uma vez que encontramos dificuldade em ionizar o retinol em modo negativo.

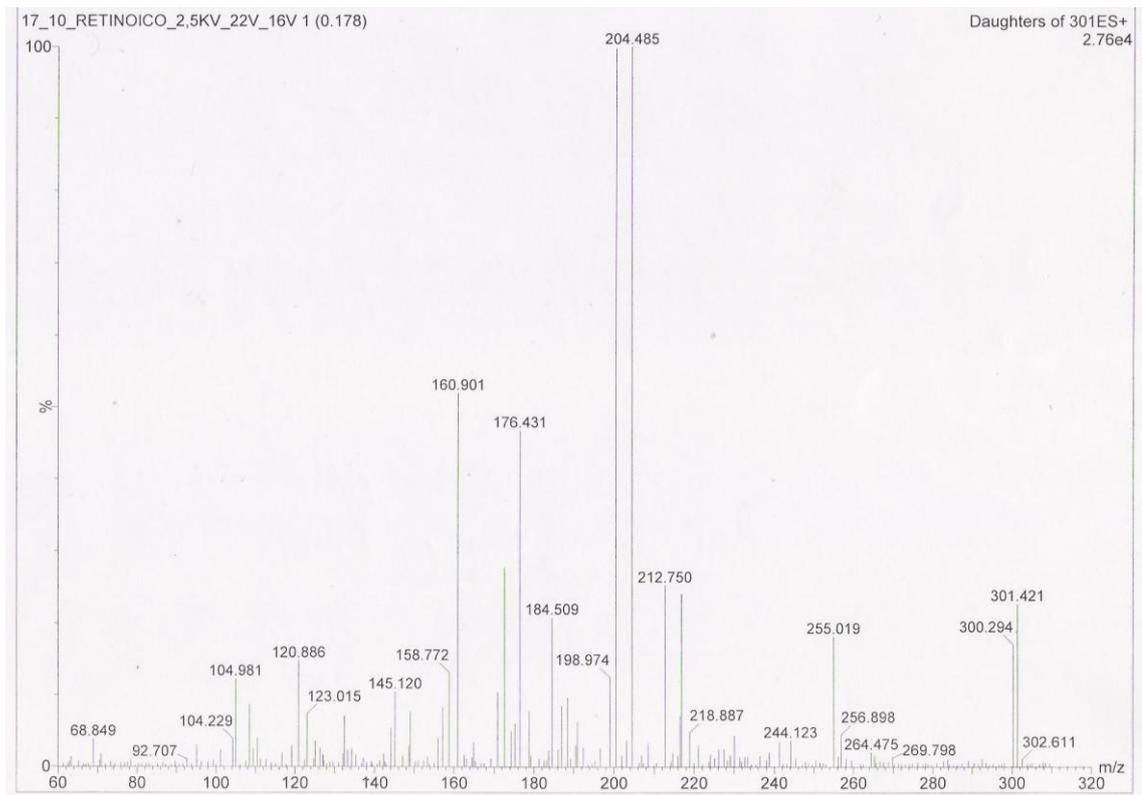
Inicialmente, foram feitos os fragmentogramas do retinol, ácido retinóico e acetato de retinila (PI), em diversas voltagens de cone e energias de colisão e, a partir daí, foram escolhidas as transições iônicas a serem monitoradas e as melhores voltagens para obtenção destas transições (quadro 6).

**Quadro 6.** Monitorização em modo MRM do retinol, ácido retinóico e acetato de retinila

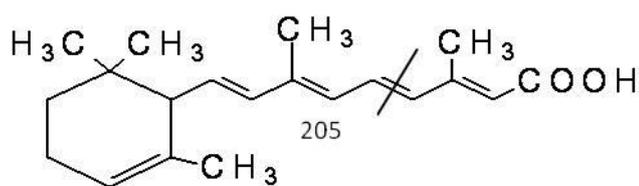
Analito	Transição iônica	Energia do cone de ionização (V)	Energia de colisão (V)
Retinol	m/z 269 → 93	30	30
Ácido retinóico	m/z 301 → 205	22	16
Acetato de retinila	m/z 269 → 93	30	30

A fragmentação do retinol em modo positivo com uma voltagem de 30 V no cone de ionização e uma energia de colisão de 30 V promove uma abundante transição m/z 269 → 93, correspondente à perda de uma molécula de água do íon precursor  $[M-H]^+$  e uma posterior quebra da molécula resultante gerando o fragmento 93, conforme as figuras 12 e 13 (CAPOTE *et al.*, 2007).





**Figura 14.** Fragmentograma do ácido retinóico. Fase móvel metanol:água com adição de ácido fórmico 0,1%, eletrospray positivo, cone de ionização 22 V e energia de colisão 16 V



**Figura 15.** Esquema de fragmentação proposto para a molécula de ácido retinóico.

Os outros parâmetros desenvolvidos para a EM foram:

- Energia de ionização no capilar: 2,5 kV
- Fluxo do gás de dessolvatação: 650 L/h

### **5.1.2 Definição dos Parâmetros Cromatográficos**

Durante o desenvolvimento do método analítico foram avaliadas várias colunas cromatográficas e combinações de fases móveis. Dentre as colunas testadas, a ACE AQ® foi a que forneceu melhores resultados para a resolução de picos interferentes, além de apresentar picos de formato simétrico para os analitos e PI.

Para a escolha da fase móvel, foram testados tampões e solventes que fossem compatíveis com a EM. Essencialmente, tampões e solventes não-voláteis foram excluídos para prevenir a precipitação na fonte de ionização. A escolha da melhor fase móvel entre os diferentes solventes testados foi baseada na separação cromatográfica, nos tempos de retenção e na intensidade dos analitos. A melhor fase móvel testada foi composta de 95% da mistura acetonitrila:metanol (55:45 v/v) com adição de 0,1% de ácido fórmico e 5% de tampão acetato de amônio 0,01M pH 6,9 com adição de 0,1% de ácido fórmico em um fluxo de 0,7 mL por minuto. A adição de ácido fórmico na fase móvel facilita a protonação dos analitos no modo positivo de ionização. Com esta fase móvel e a coluna ACE AQ®, os tempos de retenção foram de 5,24 minutos para o retinol; 5,08 minutos para o ácido retinóico e 6,03 minutos para o PI.

Assim, os parâmetros cromatográficos escolhidos para a metodologia analítica foram:

- Coluna: ACE AQ® C18 15 cm x 4,6 mm x 5 µm em temperatura ambiente
- Fase móvel A:B (5:95 v/v), onde fase móvel A é tampão acetato de amônio 0,01M pH 6,9 com adição de 0,1% de ácido fórmico e fase móvel B é acetonitrila:metanol (55:45 v/v) com adição de 0,1% de ácido fórmico
- Fluxo: 0,7 mL/min
- Volume de injeção: 100 µL

### **5.1.3 Eliminação dos Níveis Basais de Retinol e Ácido Retinóico**

Após a solução de retinol ser irradiada com lâmpada UV por um período de 180 minutos, não houve completa degradação do mesmo, tendo a área do analito

diminuído em cerca de 60%. Já para a solução de ácido retinóico ocorreu completa degradação em um período de 120 minutos. O soro branco foi irradiado por um período de 6,5 horas não havendo degradação completa de nenhum dos dois retinóides. A partir desses resultados, decidiu-se utilizar um pool de soro de voluntários, sem remover as quantidades basais dos retinóides, na validação da metodologia analítica.

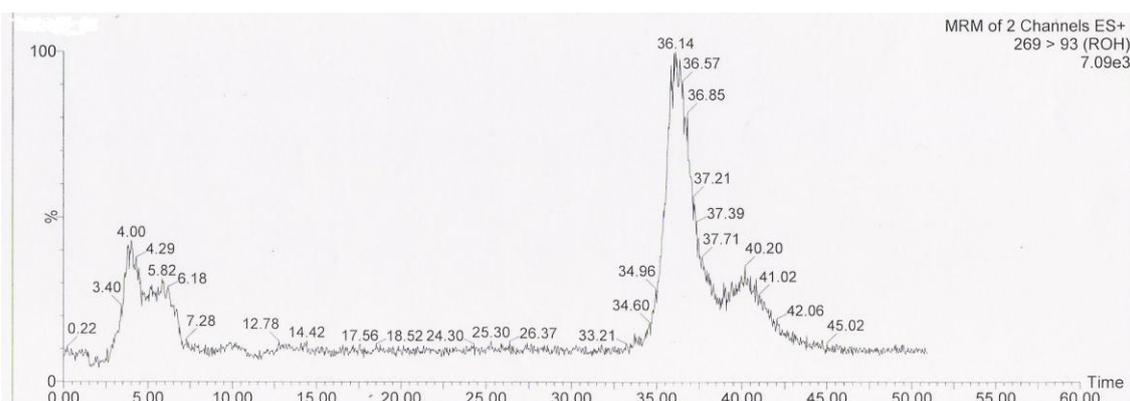
#### **5.1.4 Definição do Método de Extração**

Embora, a ELL tenha sido eficiente, ela não foi utilizada por apresentar alguns problemas. Primeiramente, ela ocorre em muitas etapas o que é um risco adicional à oxidação e isomerização dos analitos. Ela também requer grande contato do analista com a amostra biológica, o que neste caso é um risco para a segurança do mesmo, uma vez que muitos pacientes possuem cirrose de etiologia viral. Além disso, nosso objetivo era realizar uma única corrida analítica para a quantificação dos dois analitos, o que nesse caso não foi alcançado, uma vez que o retinol é extraído com a base, enquanto o ácido retinóico é extraído com o ácido, sendo então obtidos em frações diferentes da extração. Outro problema é que na fração básica são extraídos o retinol e todos os ésteres de retinila que na espectrometria de massas geram o fragmento de  $m/z$  269. Assim, seria necessária uma longa corrida cromatográfica para que houvesse uma separação adequada de todos esses ésteres.

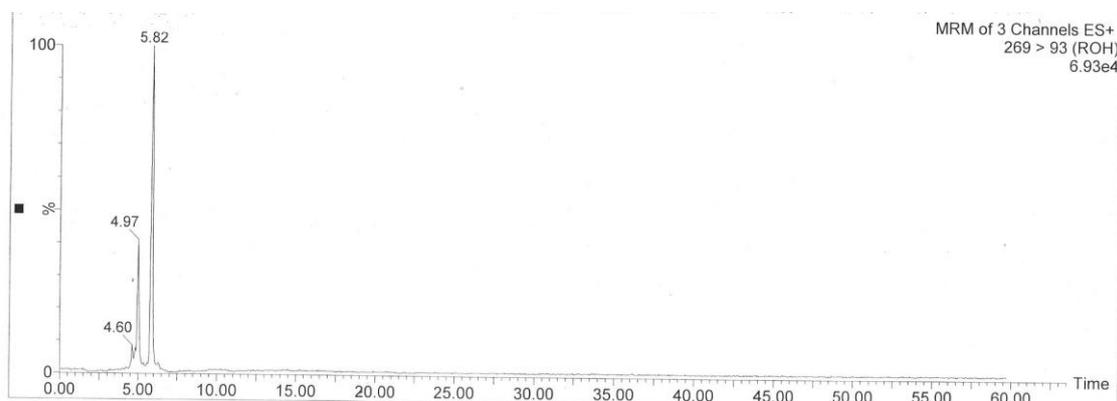
A grande vantagem da EFS está no fato de podermos escolher diferentes recheios para o cartucho e diversos solventes para realizar a extração, de forma que os ésteres de retinila fiquem presos ao cartucho e somente o retinol e o ácido retinóico sejam eluídos, de forma que a corrida cromatográfica possa ser rápida. Este fato foi demonstrado através do teste de injeção de solução e soro enriquecido com palmitato de retinila.

Segundo Got e colaboradores (1995), em uma corrida cromatográfica utilizando uma coluna de fase reversa, o acetato de retinila é o éster com menor tempo de retenção, sendo seguido pelo palmitato de retinila e posteriormente pelo oleato de retinila. Assim, quando fizemos a injeção direta da solução de palmitato de retinila pode-se observar o pico referente a esse éster no tempo de retenção

de 36,14 minutos (figura 16), porém quando realizamos a EFS do soro enriquecido com o palmitato de retinila e submetemos as mesmas condições de análise por 60 minutos, o pico referente ao palmitato não apareceu (figura 17), o que significa que este éster assim como os outros que são mais lipofílicos permanecem presos ao cartucho e não são eluídos.



**Figura 16.** Cromatograma obtido após injeção direta de solução de palmitato de retinila 200 ng/mL. A análise foi realizada em modo MRM, monitorando a transição  $m/z$  269  $\rightarrow$  93 para este analito.

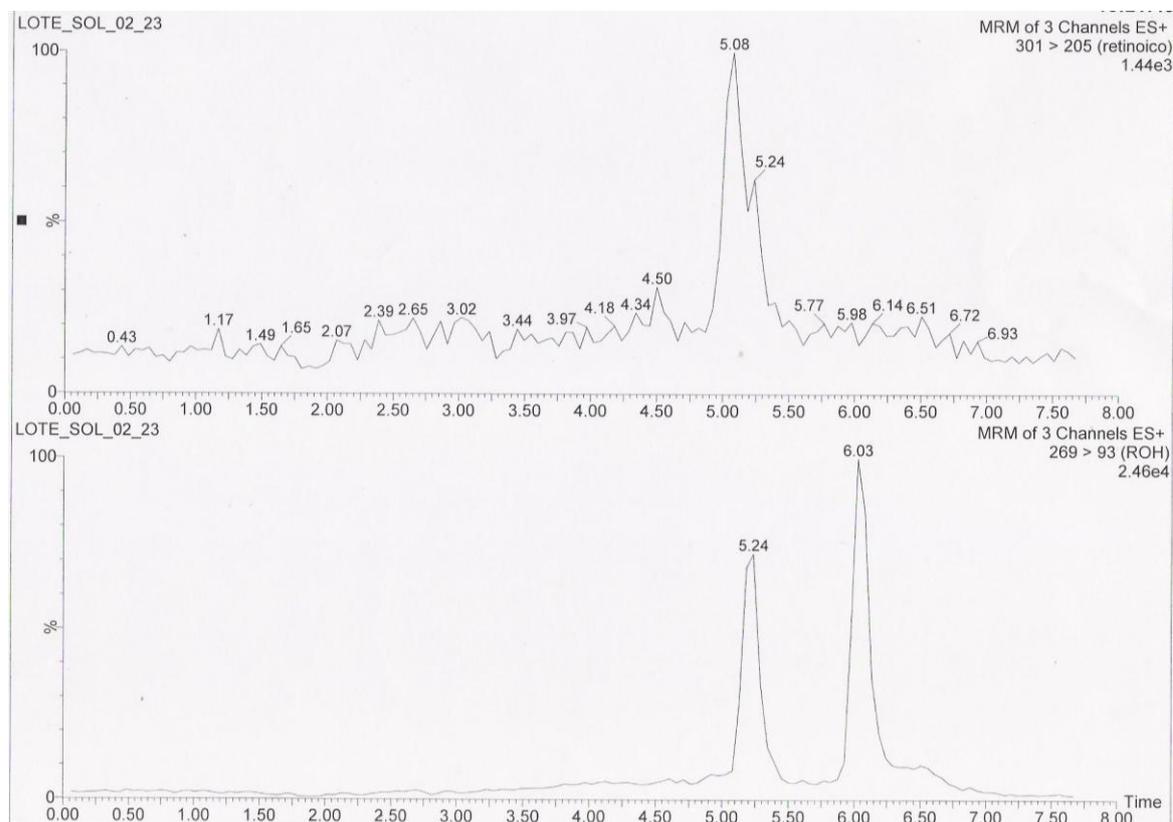


**Figura 17.** Cromatograma obtido após EFS de soro enriquecido com palmitato de retinila 200 ng/mL. A análise foi realizada em modo MRM, monitorando a transição  $m/z$  269  $\rightarrow$  93 para este analito.

A metodologia final desenvolvida para a EFS foi:

- Cartucho extrator fase HySphere C18 (EC), 8  $\mu$ m
- Condicionamento com 1,0 mL de ACN, fluxo de 8000  $\mu$ L/min
- Equilíbrio com 2,0 mL de água, fluxo de 8000  $\mu$ L/min
- Duas cargas com 100  $\mu$ L de soro
- Lavagem com 2,0 mL de água, fluxo de 8000  $\mu$ L/min
- Eluição com fase móvel por 3,5 minutos

A figura 18 mostra o cromatograma após a injeção de soro de um paciente com cirrose Child A, utilizando o método de EFS e CLAE-EMS desenvolvido e descrito anteriormente.



**Figura 18.** Cromatograma em modo MRM obtido a partir de amostra de soro de paciente com cirrose Child A, no tempo de colheita de 0h, submetida à EFS e monitorando as transições  $m/z$  269 → 93 para retinol ( $Tr = 5,24$  min) e PI ( $Tr = 6,03$  min) e  $m/z$  301 → 205 para ácido retinóico ( $Tr = 5,08$  min).

### 5.1.5 Validação da Metodologia Analítica em Matriz Biológica

- **Precisão e Exatidão**

As concentrações experimentais dos CQs utilizados para o cálculo de precisão e exatidão foram determinadas em três dias (Dia 1, 2 e 3) com o auxílio de curvas de calibração construídas especificamente para esse fim (tabelas 1-9). A precisão e exatidão inter-dias foram calculadas através da média entre os resultados de cada dia de precisão e exatidão intra-dia (tabelas 10 e 11)

Precisão e Exatidão Dia 1**Valores das constantes da equação da reta - ROH**

$$a = 0,00057 \quad b = 0,1546 \quad r = 0,9847$$

Onde ROH é retinol

**Tabela 1.** Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do retinol – ROH – Dia 1

	ROH CC1 ng/mL	% Dev	ROH CC2 ng/mL	% Dev	ROH CC3 ng/mL	% Dev	ROH CC4 ng/mL	% Dev	ROH CC5 ng/mL	% Dev	ROH CC6 ng/mL	% Dev
C. N	60		140		220		300		360		460	
Det. 1	60,9	1,4	134,4	-4,0	243,9	10,8	326,1	8,7	323	-15,0	467,2	1,6
Det. 2	57,1	-4,8	145,3	3,8	244,8	11,3	300,4	0,1	333,6	-12,2	452,3	-1,7

\* CC1: Concentração calibrador 1; CC2: Concentração calibrador 2; CC3: Concentração calibrador 3; CC4: Concentração calibrador 4; CC5: Concentração calibrador 5; CC6: Concentração calibrador 6; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica, %Dev: Desvio padrão percentual; C. N: concentração nominal conhecida de retinol.

**Valores das constantes da equação da reta - RCOOH**

$$a = 0,00421 \quad b = 0,008625 \quad r = 0,9909$$

Onde RCOOH é ácido retinóico

**Tabela 2.** Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do ácido retinóico – RCOOH – Dia 1

	RCOOH CC1 ng/mL	% Dev	RCOOH CC2 ng/mL	% Dev	RCOOH CC3 ng/mL	% Dev	RCOOH CC4 ng/mL	% Dev	RCOOH CC5 ng/mL	% Dev	RCOOH CC6 ng/mL	% Dev
C. N	1		2,8		4,6		6,4		8,2		10	
Det. 1	1,0	3,4	2,9	2,5	5,1	10,4	6,6	2,4	8,3	0,6	8,6	-13,8
Det. 2	0,9	-7,2	2,9	1,9	4,9	5,9	6,8	6,2	7,6	-7,2	9,5	-5,2

\* CC1: Concentração calibrador 1; CC2: Concentração calibrador 2; CC3: Concentração calibrador 3; CC4: Concentração calibrador 4; CC5: Concentração calibrador 5; CC6: Concentração calibrador 6; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica, %Dev: Desvio padrão percentual; C. N: concentração nominal conhecida de ácido retinóico.

**Tabela 3.** Precisão e exatidão do retinol – ROH e ácido retinóico – RCOOH – Dia 1: valores nominais e experimentais das seis réplicas das amostras controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CB), média (CM) e alta (CA)

	ROH CQ_CB ng/mL	ROH CQ_CM ng/mL	ROH CQ_CA ng/mL	RCOOH CQ_CB ng/mL	RCOOH CQ_CM ng/mL	RCOOH CQ_CA ng/mL
<b>Conc. Nominal</b>	120	190	345	2	5,5	7,5
<b>Det. 1</b>	136,1	200,9	392,6	2,2	6,2	8,6
<b>Det. 2</b>	119,0	177,8	369,7	1,8	5,7	8,2
<b>Det. 3</b>	118,2	165,2	321,1	2,1	5,2	8,2
<b>Det. 4</b>	119,8	171,1	301,6	1,9	4,8	8,3
<b>Det. 5</b>	107,2	180,3	331,6	2,3	5,5	8,3
<b>Det. 6</b>	—	177,3	—	2,2	6,0	7,6
<b>Média</b>	120,6	178,8	343,3	2,1	5,6	8,2
<b>DP</b>	10,3	12,2	37,1	0,2	0,5	0,3
<b>Prec.</b>	8,61	6,80	10,80	9,32	9,28	4,01
<b>Exat</b>	100,05	94,09	99,51	104,17	101,21	109,33

\*Conc. Nominal: concentração nominal conhecida de retinol ou ácido retinóico; DP: desvio padrão; Prec.: precisão; Exat.: exatidão; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica; Det. 3: valor de concentração encontrado para 3ª réplica; Det. 4: valor de concentração encontrado para 4ª réplica; Det. 5: valor de concentração encontrado para 5ª réplica; Det. 6: valor de concentração encontrado para 6ª réplica; --- valor da determinação foi excluído do cálculo por possuir %Dev maior do que 15 ou por ser aberrante no teste de Grubbs.

Precisão e Exatidão Dia 2

<b>Valores das constantes da equação da reta - ROH</b>		
a = 0,00064	b = 0,1831	r = 0,9945

Onde ROH é retinol

**Tabela 4.** Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do retinol – ROH – Dia 2

	ROH CC1 ng/mL	%Dev	ROH CC2 ng/mL	%Dev	ROH CC3 ng/mL	%Dev	ROH CC4 ng/mL	%Dev	ROH CC5 ng/mL	%Dev	ROH CC6 ng/mL	%Dev
<b>C. N</b>	60		140		220		300		360		460	
<b>Det. 1</b>	60,5	0,9	135,3	-3,3	232,5	5,7	282,2	-5,9	419,6	10,4	456,0	-0,9
<b>Det. 2</b>	59,5	-0,8	142,2	1,6	213,4	-3,0	314,1	4,7	366,3	-3,6	434,0	-5,6

\* CC1: Concentração calibrador 1; CC2: Concentração calibrador 2; CC3: Concentração calibrador 3; CC4: Concentração calibrador 4; CC5: Concentração calibrador 5; CC6: Concentração calibrador 6; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica, %Dev: Desvio Padrão percentual; C. N: concentração nominal conhecida de retinol.

**Valores das constantes da equação da reta - RCOOH**

$a = 0,002988$        $b = 0,008433$        $r = 0,9929$

Onde RCOOH é ácido retinóico

**Tabela 5.** Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do ácido retinóico – RCOOH – Dia 2

	RCOOH CC1 ng/mL	% Dev	RCOOH CC2 ng/mL	% Dev	RCOOH CC3 ng/mL	% Dev	RCOOH CC4 ng/mL	% Dev	RCOOH CC5 ng/mL	% Dev	RCOOH CC6 ng/mL	% Dev
C. N	1		2,8		4,6		6,4		8,2		10	
Det. 1	1,0	1,5	2,8	-0,1	4,8	4,6	5,9	-8,0	8,0	-2,6	10,2	1,8
Det. 2	1,0	-2,5	2,9	4,3	4,8	4,1	5,8	-9,7	7,7	-5,6	11,2	12,2

\* CC1: Concentração calibrador 1; CC2: Concentração calibrador 2; CC3: Concentração calibrador 3; CC4: Concentração calibrador 4; CC5: Concentração calibrador 5; CC6: Concentração calibrador 6; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica, %Dev: Desvio Padrão percentual; C. N: concentração nominal conhecida de ácido retinóico.

**Tabela 6.** Precisão e exatidão do retinol – ROH e ácido retinóico – RCOOH – Dia 2: valores nominais e experimentais das seis réplicas das amostras controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CB), média (CM) e alta (CA)

	ROH CQ_CB ng/mL	ROH CQ_CM ng/mL	ROH CQ_CA ng/mL	RCOOH CQ_CB ng/mL	RCOOH CQ_CM ng/mL	RCOOH CQ_CA ng/mL
Conc. Nominal	120	190	345	2	5,5	7,5
Det. 1	110,8	178,2	310,6	1,9	6,0	6,4
Det. 2	114,9	169,2	298,5	1,9	4,8	6,6
Det. 3	103,9	163,7	306,9	1,9	5,1	6,7
Det. 4	103,7	191,2	312,6	1,9	5,4	7,8
Det. 5	113,9	163,7	294,3	1,8	6,2	8,6
Det. 6	---	---	---	---	4,8	---
Média	109,4	173,2	304,6	1,9	5,4	7,2
DP	5,4	11,7	7,9	0,04	0,6	0,9
Prec.	4,90	6,74	2,59	2,38	11,17	13,08
Exat	91,20	91,16	88,28	94,00	97,88	96,27

\*Conc. Nominal: concentração nominal conhecida de retinol ou ácido retinóico; DP: desvio padrão; Prec.: precisão; Exat.: exatidão; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica; Det. 3: valor de concentração encontrado para 3ª réplica; Det. 4: valor de concentração encontrado para 4ª réplica; Det. 5: valor de concentração encontrado para 5ª réplica; Det. 6: valor de concentração encontrado para 6ª réplica; --- valor da determinação foi excluído do cálculo por possuir % Dev maior do que 15 ou por ser aberrante no teste de Grubbs.

Precisão e Exatidão Dia 3

**Valores das constantes da equação da reta - ROH**

$a = 0,000628$        $b = 0,1069$        $r = 0,9860$

Onde ROH é retinol

**Tabela 7.** Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do retinol – ROH – Dia 3

	ROH CC1 ng/mL	% Dev	ROH CC2 ng/mL	% Dev	ROH CC3 ng/mL	% Dev	ROH CC4 ng/mL	% Dev	ROH CC5 ng/mL	% Dev	ROH CC6 ng/mL	% Dev
C. N	60		140		220		300		360		460	
Det. 1	60,4	0,7	146,5	4,6	232,2	5,5	319,8	6,6	376,2	-1,0	403,8	-12,2
Det. 2	54,9	-8,5	154,2	10,1	235,2	6,9	305,4	1,8	379,9	0,0	392,7	-14,6

\* CC1: Concentração calibrador 1; CC2: Concentração calibrador 2; CC3: Concentração calibrador 3; CC4: Concentração calibrador 4; CC5: Concentração calibrador 5; CC6: Concentração calibrador 6; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica, %Dev: Desvio Padrão percentual; C. N: concentração nominal conhecida de retinol.

**Valores das constantes da equação da reta - RCOOH**

$a = 0,002786$        $b = 0,00555$        $r = 0,9884$

Onde RCOOH é ácido retinóico

**Tabela 8.** Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do ácido retinóico – RCOOH – Dia 3

	RCOOH CC1 ng/mL	% Dev	RCOOH CC2 ng/mL	% Dev	RCOOH CC3 ng/mL	% Dev	RCOOH CC4 ng/mL	% Dev	RCOOH CC5 ng/mL	% Dev	RCOOH CC6 ng/mL	% Dev
C. N	1		2,8		4,6		6,4		8,2		10	
Det. 1	1,0	1,9	3,1	9,3	4,9	6,9	5,9	-8,3	9,3	13,7	9,6	-4,3
Det. 2	1,0	-3,2	2,5	-10,0	4,9	5,8	6,4	0,8	8,1	-1,8	8,9	-10,8

\* CC1: Concentração calibrador 1; CC2: Concentração calibrador 2; CC3: Concentração calibrador 3; CC4: Concentração calibrador 4; CC5: Concentração calibrador 5; CC6: Concentração calibrador 6; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica, %Dev: Desvio Padrão percentual; C. N: concentração nominal conhecida de ácido retinóico.

**Tabela 9.** Precisão e exatidão do retinol – ROH e ácido retinóico – RCOOH – Dia 3: valores nominais e experimentais das seis réplicas das amostras controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CB), média (CM) e alta (CA)

	ROH CQ_CB ng/mL	ROH CQ_CM ng/mL	ROH CQ_CA ng/mL	RCOOH CQ_CB ng/mL	RCOOH CQ_CM ng/mL	RCOOH CQ_CA ng/mL
Conc. Nominal	120	190	345	2	5,5	7,5
Det. 1	116,7	209,7	301,1	2,1	6,2	8,5
Det. 2	135,2	203,9	313,6	2,2	5,6	6,8
Det. 3	122,3	206,0	309,6	2,3	6,1	7,8
Det. 4	115,1	202,2	350,9	2,1	5,2	8,4
Det. 5	108,3	178,9	312,3	7,7	5,9	8,3
Det. 6	130,0	---	---	---	---	7,6
Média	121,3	200,1	317,5	2,1	5,8	7,9
DP	10,0	19,3	0,2	0,2	0,4	0,6
Prec.	8,24	6,10	6,08	10,96	7,00	8,16
Exat	101,06	105,34	92,02	104,00	105,45	105,33

\*Conc. Nominal: **concentração nominal conhecida de retinol ou ácido retinóico**; DP: **desvio padrão**; Prec.: **precisão**; Exat.: **exatidão**; Det. 1: **valor de concentração encontrado para 1ª réplica**; Det. 2: **valor de concentração encontrado para 2ª réplica**; Det. 3: **valor de concentração encontrado para 3ª réplica**; Det. 4: **valor de concentração encontrado para 4ª réplica**; Det. 5: **valor de concentração encontrado para 5ª réplica**; Det. 6: **valor de concentração encontrado para 6ª réplica**; --- **valor da determinação foi excluído do cálculo por possuir % Dev maior do que 15 ou por ser aberrante no teste de Grubbs.**

Precisão e Exatidão Inter-dias

**Tabela 10.** Precisão e exatidão interdias para retinol em matriz biológica

Dia	CQ_CB		CQ_CM		CQ_CA	
	Prec	Exat	Prec	Exat	Prec	Exat
1	8,61	100,05	6,80	94,08	10,80	99,51
2	4,90	91,20	6,74	91,16	2,59	88,28
3	8,23	101,06	6,10	105,34	6,08	92,03
Interdias	7,25	97,44	6,54	96,86	6,49	93,28

\*Prec.: **precisão**; Exat.: **exatidão**; CQ\_CB: **controle de qualidade de concentração baixa**; CQ\_CM: **controle de qualidade de concentração média**; CQ\_CA :**controle de qualidade de concentração alta.**

**Tabela 11.** Precisão e exatidão interdias para ácido retinóico em matriz biológica

Dia	CQ_CB		CQ_CM		CQ_CA	
	Prec	Exat	Prec	Exat	Prec	Exat
1	9,32	104,17	9,28	101,21	4,01	109,33
2	2,38	94,00	11,17	97,88	13,08	96,27
3	10,96	104,00	7,00	105,45	8,16	105,33
<b>Interdias</b>	<b>7,55</b>	<b>100,72</b>	<b>9,15</b>	<b>101,52</b>	<b>8,42</b>	<b>103,64</b>

\*Prec.: **precisão**; Exat.: **exatidão**; CQ\_CB: **controle de qualidade de concentração baixa**; CQ\_CM: **controle de qualidade de concentração média**; CQ\_CA :**controle de qualidade de concentração alta**.

- **Limite de Detecção**

Através da injeção de soluções contendo concentrações decrescentes dos analitos até obtenção da relação sinal/ruído de 2:1, ficou estabelecido um limite de detecção de 0,25ng/mL para o ácido retinóico e 3 ng/mL para o retinol.

- **Limite de Quantificação**

O limite de quantificação foi estabelecido através do cálculo de precisão e exatidão para as concentrações de 1 ng/mL de ácido retinóico e 60 ng/mL de retinol (tabela 12). A curva utilizada para este cálculo foi a mesma da precisão e exatidão – Dia 1.

**Tabela 12.** Precisão e exatidão do retinol – ROH 60 ng/mL e ácido retinóico – RCOOH 1 ng/mL para determinação de limite de quantificação: valores nominais e experimentais de cinco réplicas

	ROH 60 ng/mL	% Dev	RCOOH 1 ng/mL	% Dev
Det. 1	56,7	-5,5	1,1	7,1
Det. 2	50,7	-15,4	1,0	-2,2
Det. 3	48,7	-18,8	1,1	13,2
Det. 4	53,6	-10,6	0,9	-5,4
Det. 5	61,7	2,9	1,2	15,4
Média	54,3		1,1	
DP	5,13		0,11	
Prec	9,45		10,8	
Exat	90,5		106,0	

\* Prec: **precisão**; Exat: **exatidão**; DP: **desvio padrão**; Det.1: **valor de concentração encontrado para 1ª réplica**; Det.2: **valor de concentração encontrado para 2ª réplica**; Det.3: **valor de concentração encontrado para 3ª réplica**; Det.4: **valor de concentração encontrado para 4ª réplica**; Det.5: **valor de concentração encontrado para 5ª réplica**; %Dev: **Desvio Padrão percentual**.

#### • **Índice de Recuperação**

A recuperação foi calculada através da injeção direta de soluções de retinol e ácido retinóico nas concentrações de CQ\_CB, CQ\_CM e CQ\_CA e PI separadamente. As áreas dos sinais cromatográficos foram comparadas com a área do soro extraído enriquecido com retinol, ácido retinóico e PI nas mesmas concentrações das soluções subtraído da área de cada analito no soro branco que corresponde à quantidade dos retinóides que já estava presente no soro.

O índice de recuperação foi expresso em percentual (R%) para as diferentes concentrações de retinol (tabela 13), ácido retinóico (tabela 14) e PI (tabela 15).

## RESULTADOS

**Tabela 13.** Áreas dos sinais cromatográficos correspondentes às amostras controle de retinol obtidas por injeção direta da solução e por extração em fase sólida de soro para cálculo do índice de recuperação

	CQ_CB SOL	CQ_CB EFS	CQ_CM SOL	CQ_CM EFS	CQ_CA SOL	CQ_CA EFS
Det.1	5832,769	1226,404	9179,644	1624,813	17707,52	2756,276
Det.2	5821,670	1287,714	8757,502	1666,593	19940,12	2778,064
Det.3	5630,968	1241,279	9769,674	1628,662	17643,22	2752,297
Det.4	5890,456	1254,349	8518,656	1628,154	21364,77	2757,022
Média	5793,966	1252,437	9056,369	1637,056	19163,91	2760,915
DP	112,971	26,143	548,470	19,766	1814,742	11,619
R (%)		21,62		18,08		14,41

\* R(%): índice de recuperação em porcentagem; DP: desvio padrão; Det.1: área do pico cromatográfico da 1ª réplica; Det.2: área do pico cromatográfico da 2ª réplica; Det.3: área do pico cromatográfico da 3ª réplica; Det.4: área do pico cromatográfico da 4ª réplica; SOL: área injeção direta da solução; EFS: área soro enriquecido com analitos submetido à EFS menos área soro branco submetido à EFS; CQ\_CB: controle de qualidade de concentração baixa; CQ\_CM: controle de qualidade de concentração média; CQ\_CA: controle de qualidade de concentração alta.

**Tabela 14.** Áreas dos sinais cromatográficos correspondentes às amostras controle de ácido retinóico obtidas por injeção direta da solução e por extração em fase sólida de soro, para cálculo do índice de recuperação

	CQ_CB SOL	CQ_CB EFS	CQ_CM SOL	CQ_CM EFS	CQ_CA SOL	CQ_CA EFS
Det.1	272,768	59,662	593,515	119,256	849,997	202,725
Det.2	280,712	54,258	597,152	117,518	841,428	208,298
Det.3	299,660	55,272	609,813	105,542	863,107	205,584
Det.4	297,281	53,092	637,877	---	864,770	202,045
Média	287,610	55,571	609,590	114,105	854,828	204,663
DP	12,995	2,869	20,111	7,467	11,106	2,868
R (%)		19,32		18,72		23,94

\* R(%): índice de recuperação em porcentagem; DP: desvio padrão; Det.1: área do pico cromatográfico da 1ª réplica; Det.2: área do pico cromatográfico da 2ª réplica; Det.3: área do pico cromatográfico da 3ª réplica; Det.4: área do pico cromatográfico da 4ª réplica; SOL: área injeção direta da solução; EFS: área soro enriquecido com analitos submetido à EFS menos área soro branco submetido à EFS; CQ\_CB: controle de qualidade de concentração baixa; CQ\_CM: controle de qualidade de concentração média; CQ\_CA: controle de qualidade de concentração alta.

**Tabela 15.** Áreas dos sinais cromatográficos correspondentes às amostras de PI obtidas por injeção direta da solução e por extração em fase sólida de soro para cálculo de índice de recuperação

	PI – SOL	PI – EFS
Det.1	108418,1	4654,768
Det. 2	118010,3	4595,582
Det. 3	136400,4	4926,537
Det. 4	---	---
Média	120942,9	4725,629
DP	14219,8	176,490
R (%)		3,91

\* R(%): índice de recuperação em porcentagem; DP: desvio padrão; Det.1: área do pico cromatográfico da 1ª réplica; Det.2: área do pico cromatográfico da 2ª réplica; Det.3: área do pico cromatográfico da 3ª réplica; Det.4: área do pico cromatográfico da 4ª réplica; SOL: área injeção direta da solução; EFS: área soro enriquecido com analitos submetido à EFS menos área soro branco submetido à EFS.

#### • Estabilidade dos Analitos em Solução

A estabilidade das soluções foi avaliada através de amostras de CQ deixadas durante 8 horas nas condições do laboratório. Estes resultados foram comparados com amostras de soluções de preparação recente. A estabilidade foi calculada pela fórmula empregada para o cálculo de exatidão, utilizando-se o valor da concentração da amostra recém-preparada como referência (ou concentração nominal) (tabelas 16-18).

#### Valores das constantes da equação da reta - ROH

$$a = 0,000507 \quad b = -0,01901 \quad r = 0,9909$$

Onde ROH é retinol

## RESULTADOS

**Tabela 16.** Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular estabilidade de soluções-padrão de retinol

	ROH CC1 ng/mL	% Dev	ROH CC2 ng/mL	% Dev	ROH CC3 ng/mL	% Dev	ROH CC4 ng/mL	% Dev	ROH CC5 ng/mL	% Dev	ROH CC6 ng/mL	% Dev
C. N	60		140		220		300		360		460	
Det. 1	66,7	11,2	132,7	-5,2	230,5	4,8	299,0	-0,3	397,1	4,5	489,8	6,5
Det. 2	56,7	-5,6	124,8	-10,8	209,1	-4,9	294,2	-1,9	368,9	-2,9	481,9	-4,8

\* CC1: Concentração calibrador 1; CC2: Concentração calibrador 2; CC3: Concentração calibrador 3; CC4: Concentração calibrador 4; CC5: Concentração calibrador 5; CC6: Concentração calibrador 6; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica, %Dev: Desvio padrão percentual; C. N: concentração nominal conhecida de retinol.

## Valores das constantes da equação da reta - RCOOH

$$a = 0,001043 \quad b = -0,00035 \quad r = 0,9949$$

Onde RCOOH é ácido retinóico

**Tabela 17.** Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular estabilidade de soluções-padrão de ácido retinóico

	RCOOH CC1 ng/mL	% Dev	RCOOH CC2 ng/mL	% Dev	RCOOH CC3 ng/mL	% Dev	RCOOH CC4 ng/mL	% Dev	RCOOH CC5 ng/mL	% Dev	RCOOH CC6 ng/mL	% Dev
C. N	1		2,8		4,6		6,4		8,2		10	
Det. 1	1,1	9,1	2,7	-4,9	5,0	9,5	5,8	-9,0	8,0	-2,9	11,4	14,3
Det. 2	0,9	-7,6	2,9	4,5	4,2	-8,8	5,6	-12,3	7,8	-4,8	11,3	12,7

\* CC1: Concentração calibrador 1; CC2: Concentração calibrador 2; CC3: Concentração calibrador 3; CC4: Concentração calibrador 4; CC5: Concentração calibrador 5; CC6: Concentração calibrador 6; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica, %Dev: Desvio padrão percentual; C. N: concentração nominal conhecida de ácido retinóico.

**Tabela 18.** Estabilidade de soluções de retinol e ácido retinóico: valores nominais e experimentais das três réplicas das amostras controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CB) e alta (CA)

	RETINOL				ÁCIDO RETINÓICO			
	CQ_CB RP	CQ_CB 8H	CQ_CA RP	CQ_CA 8H	CQ_CB RP	CQ_CB 8H	CQ_CA RP	CQ_CA 8H
<b>C. N.</b>	120	120	345	345	2	2	7,5	7,5
<b>Det. 1</b>	103,9	121,2	307,0	310,9	2,0	2,1	6,7	6,7
<b>Det. 2</b>	110,5	108,3	294,3	346,7	2,1	2,1	6,8	8,5
<b>Det. 3</b>	123,4	105,0	353,1	310,9	1,7	2,1	7,2	7,0
<b>Média</b>	111,5	113,1	316,1	321,8	1,9	2,1	7,1	7,2
<b>DP</b>	8,4	7,7	25,6	17,0	0,2	0,0	0,4	0,9
<b>EST</b>		101,46		101,80		108,62		102,48

\*C. N: concentração nominal conhecida de retinol ou ácido retinóico; DP: desvio padrão; EST: estabilidade; RP: solução recém-preparada; 8H: solução deixada em condições laboratoriais por 8h; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica; Det. 3: valor de concentração encontrado para 3ª réplica. Valores de concentração em ng/mL.

**• Estabilidade dos Analitos após Ciclos de Congelamento e Descongelo das Amostras Sorológicas, Curta Duração (8 horas) e nas Condições de Análise (pós-processamento)**

A quantificação dos analitos nas amostras submetidas aos ensaios de estabilidade foi realizada com o auxílio da mesma curva de calibração utilizada para o cálculo de precisão e exatidão – dia 2.

A estabilidade na matriz biológica foi calculada pela fórmula empregada para o cálculo de exatidão, utilizando-se o valor da concentração da amostra recém-preparada como referência (ou concentração nominal) (tabelas 19-21).

**Tabela 19.** Valores de concentrações de retinol e ácido retinóico em amostras submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento e recém-preparadas para cálculo de estabilidade

RETINOL				ÁCIDO RETINÓICO				
	CQ_CB RP	CQ_CB CCD	CQ_CA RP	CQ_CA CCD	CQ_CB RP	CQ_CB CCD	CQ_CA RP	CQ_CA CCD
C. N.	120	120	345	345	2	2	7,5	7,5
Det. 1	103,2	104,1	296,2	370,1	1,8	1,8	7,2	8,0
Det. 2	105,8	106,5	300,4	339,5	1,9	1,7	7,3	7,0
Det. 3	107,6	106,9	302,7	304,3	1,9	1,8	7,1	6,6
Média	105,5	105,8	299,8	338,0	1,9	1,8	7,2	7,2
DP	2,2	1,5	3,3	32,9	0,06	0,06	0,1	0,7
EST		100,28		112,74		94,64		100,00

\*C. N: concentração nominal conhecida de retinol ou ácido retinóico; DP: desvio padrão; EST: estabilidade; CQ\_CB: controle de qualidade de concentração baixa; CQ\_CA: controle de qualidade de concentração alta; RP: amostra recém-preparada; CCD: amostra submetida ao ciclo de congelamento e descongelamento; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica; Det. 3: valor de concentração encontrado para 3ª réplica. Valores de concentração em ng/mL.

**Tabela 20.** Valores de concentrações de retinol e ácido retinóico em amostras deixadas em condições laboratoriais por 8h e recém-preparadas para cálculo de estabilidade de curta duração

RETINOL				ÁCIDO RETINÓICO				
	CQ_CB RP	CQ_CB 8H	CQ_CA RP	CQ_CA 8H	CQ_CB RP	CQ_CB 8H	CQ_CA RP	CQ_CA 8H
C. N.	120	120	345	345	2	2	7,5	7,5
Det. 1	103,2	114,2	296,2	354,3	1,8	1,8	7,2	8,1
Det. 2	105,8	111,3	300,4	341,6	1,9	1,9	7,3	7,3
Det. 3	107,6	117,1	302,7	324,0	1,9	1,8	7,1	7,2
Média	105,5	114,2	299,8	341,2	1,9	1,8	7,2	7,6
DP	2,2	2,9	3,3	12,7	0,06	0,06	0,1	0,4
EST		108,21		113,81		98,21		105,21

\*C. N.: concentração nominal conhecida de retinol ou ácido retinóico; DP: desvio padrão; EST: estabilidade; CQ\_CB: controle de qualidade de concentração baixa; CQ\_CA: controle de qualidade de concentração alta; RP: amostra recém-preparada; 8H: amostra submetida às condições laboratoriais por 8h; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica; Det. 3: valor de concentração encontrado para 3ª réplica. Valores de concentração em ng/mL.

**Tabela 21.** Valores de concentrações de retinol e ácido retinóico em amostras deixadas no injetor por 22 h e recém-preparadas para cálculo de estabilidade pós-processamento

	RETINOL				ÁCIDO RETINÓICO			
	CQ_CB RP	CQ_CB 22H	CQ_CA RP	CQ_CA 22H	CQ_CB RP	CQ_CB 22H	CQ_CA RP	CQ_CA 22H
C. N.	120	120	345	345	2	2	7,5	7,5
Det. 1	103,2	107,8	296,2	315,4	1,8	1,9	7,2	6,9
Det. 2	105,8	116,6	300,4	345,4	1,9	1,8	7,3	7,2
Det. 3	107,6	107,5	302,7	312,6	1,9	1,8	7,1	7,8
Média	105,5	110,6	299,8	325,0	1,9	1,8	7,2	7,4
DP	2,2	5,2	3,3	14,9	0,06	0,06	0,1	0,4
EST		104,83		108,43		98,21		102,43

\*C. N.: concentração nominal conhecida de retinol ou ácido retinóico; DP: desvio padrão; EST: estabilidade; CQ\_CB: controle de qualidade de concentração baixa; CQ\_CA: controle de qualidade de concentração alta; RP: amostra recém-preparada; 22H: amostras deixadas no injetor por 22h; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica; Det. 3: valor de concentração encontrado para 3ª réplica. Valores de concentração em ng/mL.

### 5.1.6 Validação de Metodologia Analítica em Solução

- **Precisão e Exatidão**

As concentrações experimentais dos CQs utilizados para o cálculo de precisão e exatidão foram determinadas em dois dias (Dia 1 e Dia 2) com o auxílio de curvas de calibração, construídas especificamente para esse fim (Tabelas 22-27). A precisão e exatidão inter-dias foram calculadas através da média entre os resultados de cada dia de precisão e exatidão intra-dia (tabelas 28 e 29)

#### Precisão e Exatidão Dia 1

Valores das constantes da equação da reta - ROH

$$a = 0,083148 \quad b = -0,04275 \quad r = 0,9914$$

Onde ROH é retinol

## RESULTADOS

**Tabela 22.** Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do retinol (ROH) em solução– Dia 1

	ROH CC1 ng/mL	% Dev	ROH CC2 ng/mL	% Dev	ROH CC3 ng/mL	% Dev	ROH CC4 ng/mL	% Dev	ROH CC5 ng/mL	% Dev	ROH CC6 ng/mL	% Dev
C. N	3		6		12		24		48		96	
Det. 1	3,1	4,2	5,6	-6,9	12,0	-0,2	25,3	5,4	48,0	0,2	92,0	-4,2
Det. 2	3,0	1,6	5,5	-8,4	11,8	-1,7	27,2	13,2	50,6	5,4	87,8	-8,5

\* CC1: Concentração calibrador 1; CC2: Concentração calibrador 2; CC3: Concentração calibrador 3; CC4: Concentração calibrador 4; CC5: Concentração calibrador 5; CC6: Concentração calibrador 6; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica, %Dev: Desvio padrão percentual; C. N: concentração nominal conhecida de retinol.

**Valores das constantes da equação da reta - RCOOH**

$$a = 0,173036 \quad b = -0,00363 \quad r = 0,9949$$

Onde RCOOH é ácido retinóico

**Tabela 23.** Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do ácido retinóico (RCOOH) em solução – Dia 1

	RCOOH CC1 ng/mL	% Dev	RCOOH CC2 ng/mL	% Dev	RCOOH CC3 ng/mL	% Dev	RCOOH CC4 ng/mL	% Dev	RCOOH CC5 ng/mL	% Dev	RCOOH CC6 ng/mL	% Dev
C. N	0,25		0,50		1		2		4		8	
Det. 1	0,20	-2,8	0,50	-0,7	1,0	2,6	2,6	7,5	4,3	7,6	7,6	-4,8
Det. 2	0,30	3,0	0,50	-1,3	1,0	-4,6	2,0	2,0	4,3	7,3	7,3	-9,0

\* CC1: Concentração calibrador 1; CC2: Concentração calibrador 2; CC3: Concentração calibrador 3; CC4: Concentração calibrador 4; CC5: Concentração calibrador 5; CC6: Concentração calibrador 6; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica, %Dev: Desvio padrão percentual; C. N: concentração nominal conhecida de ácido retinóico.

## RESULTADOS

**Tabela 24.** Precisão e exatidão do retinol – ROH e ácido retinóico – RCOOH em solução – Dia 1: valores nominais e experimentais das três réplicas das amostras controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CB), média (CM) e alta (CA)

	ROH CQ_CB ng/mL	ROH CQ_CM ng/mL	ROH CQ_CA ng/mL	RCOOH CQ_CB ng/mL	RCOOH CQ_CM ng/mL	RCOOH CQ_CA ng/mL
Conc. Nominal	9	36	72	0,7	3	6
Det. 1	8,6	35,7	76,6	0,7	2,9	6,4
Det. 2	8,7	35,6	72,8	0,7	3	5,8
Det. 3	8,6	35,9	75,1	0,7	3,1	6,2
Média	8,6	35,7	74,8	0,7	3,0	6,1
DP	0,06	0,2	1,9	$1,36 \times 10^{-16}$	0,1	0,3
Prec.	2,40	0,43	2,56	$1,94 \times 10^{-14}$	3,33	4,98
Exat	95,93	99,26	103,94	100,00	100,00	102,22

\*Conc. Nominal: concentração nominal conhecida de retinol ou ácido retinóico; DP: desvio padrão; Prec.: precisão; Exat.: exatidão; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica; Det. 3: valor de concentração encontrado para 3ª réplica.

### Precisão e Exatidão Dia 2

#### Valores das constantes da equação da reta - ROH

$$a = 0,064134 \quad b = -0,04371 \quad r = 0,9917$$

Onde ROH é retinol

**Tabela 25.** Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do retinol (ROH) em solução– Dia 2

	ROH CC1 ng/mL	% Dev	ROH CC2 ng/mL	% Dev	ROH CC3 ng/mL	% Dev	ROH CC4 ng/mL	% Dev	ROH CC5 ng/mL	% Dev	ROH CC6 ng/mL	% Dev
C. N	3		6		12		24		48		96	
Det. 1	3,2	5,6	5,5	-8,6	11,9	-1,2	23,5	-2,3	45,2	-5,8	101,7	5,9
Det. 2	3,1	2,9	5,4	-9,6	12,9	7,2	21,9	-8,7	51,5	7,3	103,1	7,4

\* CC1: Concentração calibrador 1; CC2: Concentração calibrador 2; CC3: Concentração calibrador 3; CC4: Concentração calibrador 4; CC5: Concentração calibrador 5; CC6: Concentração calibrador 6; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica, %Dev: Desvio padrão percentual; C. N: concentração nominal conhecida de retinol.

**Valores das constantes da equação da reta - RCOOH**

$a = 0,130109$        $b = 0,01021$        $r = 0,9911$

Onde RCOOH é ácido retinóico

**Tabela 26.** Valores das concentrações dos calibradores empregados na construção da curva de calibração para calcular precisão e exatidão do ácido retinóico (RCOOH) em solução – Dia 2

	RCOOH CC1 ng/mL	%Dev	RCOOH CC2 ng/mL	%Dev	RCOOH CC3 ng/mL	%Dev	RCOOH CC4 ng/mL	%Dev	RCOOH CC5 ng/mL	%Dev	RCOOH CC6 ng/mL	%Dev
C. N	0,25		0,50		1		2		4		8	
Det. 1	0,30	12,1	0,5	2,5	0,9	-8,4	2,0	-2,3	3,9	-2,0	8,5	5,9
Det. 2	0,20	-6,3	0,5	-8,8	1,0	-0,3	1,8	-7,5	4,2	6,2	8,7	8,8

\* CC1: Concentração calibrador 1; CC2: Concentração calibrador 2; CC3: Concentração calibrador 3; CC4: Concentração calibrador 4; CC5: Concentração calibrador 5; CC6: Concentração calibrador 6; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica, %Dev: Desvio padrão percentual; C. N: concentração nominal conhecida de ácido retinóico.

**Tabela 27.** Precisão e exatidão do retinol – ROH e ácido retinóico – RCOOH em solução – Dia 2: valores nominais e experimentais das três réplicas das amostras controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CB), média (CM) e alta (CA)

	ROH CQ_CB ng/mL	ROH CQ_CM ng/mL	ROH CQ_CA ng/mL	RCOOH CQ_CB ng/mL	RCOOH CQ_CM ng/mL	RCOOH CQ_CA ng/mL
Conc. Nominal	9	36	72	0,7	3	6
Det. 1	8,7	38,8	72,8	0,7	3,1	6,1
Det. 2	9,0	36,0	72,5	0,7	3,0	6,4
Det. 3	8,9	35,8	72,5	0,7	2,9	6,3
Média	8,9	36,9	72,6	0,7	3,0	6,3
DP	0,2	1,7	0,2	$1,36 \times 10^{-16}$	0,1	0,2
Prec.	1,72	4,55	0,24	$1,94 \times 10^{-14}$	3,30	2,44
Exat	98,52	102,41	100,83	100,00	100,00	104,44

\*Conc. Nominal: concentração nominal conhecida de retinol ou ácido retinóico; DP: Desvio padrão; Prec.: precisão; Exat.: exatidão; Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica; Det. 3: valor de concentração encontrado para 3ª réplica.

Precisão e Exatidão Inter-dias**Tabela 28.** Precisão e exatidão interdias para solução de retinol

Dia	CQ_CB		CQ_CM		CQ_CA	
	Prec	Exat	Prec	Exat	Prec	Exat
1	2,40	96,30	0,43	99,26	2,56	103,94
2	1,72	98,52	4,55	102,41	0,24	100,83
<b>Interdias</b>	<b>2,06</b>	<b>97,41</b>	<b>2,49</b>	<b>100,83</b>	<b>1,40</b>	<b>102,38</b>

\*Prec.: **precisão**; Exat.: **exatidão**; CQ\_CB: **controle de qualidade de concentração baixa**; CQ\_CM: **controle de qualidade de concentração média**; CQ\_CA :**controle de qualidade de concentração alta**.

**Tabela 29.** Precisão e exatidão interdias para solução de ácido retinóico

Dia	CQ_CB		CQ_CM		CQ_CA	
	Prec	Exat	Prec	Exat	Prec	Exat
1	1,94x10 <sup>-14</sup>	100,00	3,33	100,00	4,98	102,22
2	1,94x10 <sup>-14</sup>	100,00	3,33	100,00	2,43	104,44
<b>Interdias</b>	<b>1,94x10<sup>-14</sup></b>	<b>100,00</b>	<b>3,33</b>	<b>100,00</b>	<b>3,71</b>	<b>103,33</b>

\*Prec.: **precisão**; Exat.: **exatidão**; CQ\_CB: **controle de qualidade de concentração baixa**; CQ\_CM: **controle de qualidade de concentração média**; CQ\_CA :**controle de qualidade de concentração alta**.

- **Estabilidade nas Condições de Análise**

Para avaliar a estabilidade da solução no tempo de corrida de uma curva analítica, soluções na concentração dos CQs foram deixadas no injetor por 4h e depois comparadas com soluções recém-preparadas (tabela 30).

**Tabela 30.** Estabilidade de soluções de retinol e ácido retinóico nas condições de análise: valores nominais e experimentais das três réplicas das amostras controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CB), média (CM) e alta (CA)

	RETINOL				ÁCIDO RETINÓICO			
	CQ_CB RP	CQ_CB 4H	CQ_CA RP	CQ_CA 4H	CQ_CB RP	CQ_CB 4H	CQ_CA RP	CQ_CA 4H
C. N.	9	9	72	72	0,75	0,75	6	6
Det. 1	9,5	9,9	69,7	74,2	0,90	0,90	5,4	6,9
Det. 2	9,9	8,4	76,4	76,4	0,80	0,80	6,5	6,5
Det. 3	8,2	9,6	75,8	77,7	0,80	0,80	6,6	6,1
Média	9,2	9,3	73,2	76,1	0,83	0,83	6,3	6,6
DP	0,9	0,8	3,4	1,8	0,06	0,06	0,6	0,3
EST		101,09		103,93		100,00		103,56

\*C. N.: concentração nominal conhecida de retinol ou ácido retinóico; DP: desvio padrão; EST: estabilidade; RP: solução recém-preparada; 4H: solução deixadas no injetor por 4h. Det. 1: valor de concentração encontrado para 1ª réplica; Det. 2: valor de concentração encontrado para 2ª réplica; Det. 3: valor de concentração encontrado para 3ª réplica. Valores de concentração em ng/mL.

## 5.2 Resultados da Etapa Clínica

### 5.2.1 Descrição da Amostra segundo Sexo e Idade

A amostra foi composta de 63 pacientes, sendo 39 pacientes do sexo masculino (61,9%) e 24 pacientes (38,1%) do sexo feminino.

A média de idade dos indivíduos foi de  $58,94 \pm 10,37$  anos, variando de 34 a 81 anos, sendo que 20,6% da amostra encontravam-se na faixa de 31 a 50 anos, 66,7% encontravam-se na faixa de 51 a 70 anos, enquanto 12,7% da amostra possuíam idade superior a 70 anos. A mediana de idade foi de 59,0.

Não houve diferença significativa entre os níveis basais de retinol ( $p=0,445$ ) e ácido retinóico ( $p=0,097$ ) séricos entre os sexos dos indivíduos da amostra (tabelas 31 e 32)

**Tabela 31.** Comparação do retinol sérico basal entre o sexo masculino e feminino

Sexo	n	Média ± DP (ng/mL)	p-valor
Masculino	39	76,45±26,01	0,445
Feminino	24	67,11±22,77	

\*n: número de pacientes

**Tabela 32.** Comparação do ácido retinóico sérico basal entre o sexo masculino e feminino

Sexo	n	Média ± DP (ng/mL)	p-valor
Masculino	39	2,34±1,10	0,097
Feminino	24	2,22±1,55	

\*n: número de pacientes

### 5.2.2 Distribuição dos Indivíduos de acordo com a Etiologia da Cirrose

Do total de pacientes, 1,6% possuem Cirrose Child A de etiologia criptogênica; 17,7% causada por VHB, 56,5% por VHC; 14,5% de etiologia alcoólica; 3,2% de etiologia alcoólica com associação de VHB; enquanto a etiologia de 6,5% dos pacientes é alcoólica associada com VHC (tabela 33).

**Tabela 33.** Distribuição da amostra segundo etiologia da doença e sexo

Etiologia da doença	n	%	Sexo masculino (n)	Sexo feminino (n)
Criptogênica	1	1,6	1	0
VHB	11	17,7	15	20
VHC	35	56,5	8	3
Alcoólica	9	14,5	8	1
Alcoólica + VHB	2	3,2	2	0
Alcoólica + VHC	4	6,5	4	0

\*n: número de pacientes

### 5.2.3 Comparação das Concentrações Séricas de Retinol, Ácido Retinóico e da Razão Retinol / Ácido Retinóico entre os Dois Grupos de Pacientes Divididos de Acordo com a Dose de Suplemento (1500 UI ou 2500 UI) nos Tempos Zero (T0), Cinco (T5) e Sete (T7) Horas

Dentre a amostra de 63 pacientes, 36 receberam dose de 1500 UI de palmitato de retinila, enquanto 27 receberam dose de 2500 UI deste suplemento.

- Não houve diferença significativa entre as concentrações séricas basais de retinol, ácido retinóico e da razão retinol / ácido retinóico ( $p=0,459$ ;  $p=0,320$  e  $p=0,332$ , respectivamente) entre os dois grupos de pacientes.
- Também não houve diferença significativa entre as concentrações séricas obtidas de retinol, ácido retinóico e da razão retinol / ácido retinóico quando comparadas as diferentes doses de palmitato de retinila administradas em um mesmo tempo de colheita de amostra (tabelas 34-36).

**Tabela 34.** Comparação da concentração sérica basal (T0) de retinol entre pacientes que receberam suplementações de 1500 UI e 2500 UI e das concentrações séricas de retinol obtidas após o recebimento da dose de palmitato de retinila nos tempos de cinco (T5) e sete horas (T7).

Tempo de Colheita de Amostras	Pacientes com Suplementação de 2500 UI		Pacientes com Suplementação de 1500 UI		<i>p</i> -valor
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	
T0	26	70,08 ± 20,78	34	74,94 ± 28,17	0,459
T5	26	75,33 ± 23,78	34	76,38 ± 28,06	0,583
T7	26	71,12 ± 23,35	34	71,62 ± 23,14	0,961

\*n: número de pacientes

**Tabela 35.** Comparação da concentração sérica basal (T0) de ácido retinóico entre pacientes que receberam suplementações de 1500 UI e 2500 UI e das concentrações séricas de ácido retinóico obtidas após o recebimento da dose de palmitato de retinila nos tempos de cinco (T5) e sete horas (T7).

Tempo de Colheita de Amostras	Pacientes com Suplementação de 2500 UI		Pacientes com Suplementação de 1500 UI		p-valor
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	
T0	26	2,50 ± 1,36	34	2,16 ± 1,23	0,320
T5	26	2,75 ± 1,13	34	2,50 ± 1,12	0,913
T7	26	2,58 ± 0,99	34	2,26 ± 1,10	0,610

\*n: número de pacientes

**Tabela 36.** Comparação da concentração sérica basal (T0) da razão retinol / ácido retinóico entre pacientes que receberam suplementações de 1500 UI e 2500 UI e das concentrações séricas da razão retinol / ácido retinóico obtidas após o recebimento da dose de palmitato de retinila nos tempos de cinco (T5) e sete horas (T7).

Tempo de Colheita de Amostras	Pacientes com Suplementação de 2500 UI		Pacientes com Suplementação de 1500 UI		p-valor
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	
T0	26	34,99 ± 18,04	34	39,40 ± 16,98	0,332
T5	26	30,84 ± 12,82	34	33,41 ± 12,88	0,869
T7	26	31,40 ± 14,50	34	36,48 ± 18,17	0,119

\*n: número de pacientes

#### **5.2.4 Correlação entre Marcadores Bioquímicos e Níveis Séricos de Retinol, Ácido Retinóico e da Razão Retinol/Ácido Retinóico nos Tempos Cinco (T5) e Sete (T7) Horas, após Administração de 1500 UI de Palmitato de Retinila**

Após a administração de 1500 UI de palmitato de retinila, os níveis séricos de retinol, ácido retinóico e da razão retinol / ácido retinóico não apresentou correlação com nenhum dos marcadores de lesão hepática (ALT e AST) e de função hepática (albumina, TAP e BT) que avaliamos (tabela 37).

**Tabela 37.** Correlação entre marcadores bioquímicos e concentrações séricas de retinol, ácido retinóico e razão retinol / ácido retinóico com nos tempos de cinco (T5) e sete (T7) horas após a administração de 1500 UI de palmitato de retinila

Marcador Bioquímico	Retinol Sérico T5 (ng/mL)		Ácido Retinóico Sérico T5 (ng/mL)		Razão Retinol / Ácido Retinóico Séricos T5 (ng/mL)		Retinol Sérico T7 (ng/mL)		Ácido Retinóico Sérico T7 (ng/mL)		Razão Retinol / Ácido Retinóico Séricos T7 (ng/mL)	
	$r_s$	$p$ -valor	$r_s$	$p$ -valor	$r_s$	$p$ -valor	$r_s$	$p$ -valor	$r_s$	$p$ -valor	$r_s$	$p$ -valor
ALT	-0,036	0,833	-0,088	0,611	-0,016	0,927	-0,106	0,538	-0,069	0,697	-0,107	0,547
AST	-0,143	0,407	-0,138	0,424	0,004	0,982	-0,244	0,151	-0,118	0,506	-0,146	0,409
Albumina	-0,021	0,903	0,052	0,763	0,063	0,716	0,123	0,475	0,137	0,440	-0,001	0,995
TAP	-0,118	0,498	-0,105	0,549	0,045	0,799	0,023	0,896	0,077	0,669	0,017	0,926
BT	0,077	0,655	0,032	0,852	-0,033	0,847	0,201	0,239	0,101	0,569	-0,072	0,685

\* ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; TAP: tempo e atividade de protrombina; BT: bilirrubina total;  $r_s$ : coeficiente de correlação de Pearson

### **5.2.5 Correlação entre Marcadores Bioquímicos e Níveis Séricos de Retinol, Ácido Retinóico e da Razão Retinol/Ácido Retinóico no Tempo Cinco Horas (T5) após Administração de 2500 UI de Palmitato de Retinila**

Após cinco horas da administração de 2500 UI de palmitato de retinila, os seguintes resultados foram observados:

- O marcador BT apresentou correlação negativa e significativa com os níveis séricos de retinol ( $p=0,038$ ) (tabela 38).
- Nenhum dos marcadores bioquímicos apresentou correlação com os níveis séricos de ácido retinóico (tabela 39).
- Os marcadores ALT, AST e albumina apresentaram correlação significativa com a razão retinol / ácido retinóico. ALT e AST apresentaram correlação positiva ( $p=0,021$  e  $p=0,041$ , respectivamente) enquanto a albumina apresentou correlação negativa ( $p=0,047$ ) (tabela 40).

**Tabela 38.** Correlação entre marcadores bioquímicos e concentrações séricas de retinol no tempo cinco horas (T5) após a administração de 2500 UI de palmitato de retinila

Marcador Bioquímico	Retinol Sérico (ng/mL)		
	n	$r_s$	<i>p</i> -valor
ALT	63	0,088	0,661
AST	63	0,035	0,862
Albumina	63	-0,126	0,531
TAP	62	0,334	0,088
BT	63	-0,402	0,038

\* ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; TAP: tempo e atividade de protrombina; BT: bilirrubina total;  $r_s$ : coeficiente de correlação de Pearson; n: número de pacientes

**Tabela 39.** Correlação entre marcadores bioquímicos e concentrações séricas de ácido retinóico no tempo cinco horas (T5) após a administração de 2500 UI de palmitato de retinila

Marcador Bioquímico	Ácido Retinóico Sérico (ng/mL)		
	n	$r_s$	<i>p</i> -valor
ALT	63	-0,338	0,085
AST	63	-0,331	0,091
Albumina	63	0,133	0,509
TAP	62	-0,092	0,649
BT	63	0,020	0,920

\* ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; TAP: tempo e atividade de protrombina; BT: bilirrubina total;  $r_s$ : coeficiente de correlação de Pearson; n: número de pacientes

**Tabela 40.** Correlação entre marcadores bioquímicos e concentrações séricas da razão retinol/ácido retinóico no tempo cinco horas (T5) após a administração de 2500 UI de palmitato de retinila

Marcador Bioquímico	Razão Retinol / Ácido Retinóico Séricos (ng/mL)		
	n	$r_s$	<i>p</i> -valor
ALT	63	0,441	0,021
AST	63	0,395	0,041
Albumina	63	-0,386	0,047
TAP	62	0,141	0,483
BT	63	-0,163	0,416

\* ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; TAP: tempo e atividade de protrombina; BT: bilirrubina total;  $r_s$ : coeficiente de correlação de Pearson; n: número de pacientes

### **5.2.6 Correlação entre Marcadores Bioquímicos e Níveis Séricos de Retinol, Ácido Retinóico e Razão Retinol/Ácido Retinóico no Tempo Sete Horas (T7) após Administração de 2500 UI de Palmitato de Retinila**

Após sete horas da administração de 2500 UI de palmitato de retinila, os seguintes resultados foram observados:

- Nenhum marcador bioquímico apresentou correlação com as concentrações séricas de retinol e ácido retinóico (tabelas 41 e 42).
- O marcador albumina sérica apresentou correlação significativa e negativa com a razão retinol/ácido retinóico ( $p=0,023$ ) (tabela 43).

**Tabela 41.** Correlação entre marcadores bioquímicos e concentrações séricas de retinol no tempo sete horas (T7) após a administração de 2500 UI de palmitato de retinila

Marcador Bioquímico	Retinol Sérico (ng/mL)		
	n	r <sub>s</sub>	p-valor
ALT	63	0,079	0,693
AST	63	0,006	0,975
Albumina	63	-0,279	0,159
TAP	62	0,238	0,231
BT	63	-0,279	0,158

\* ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; TAP: tempo e atividade de protrombina; BT: bilirrubina total; r<sub>s</sub>: coeficiente de correlação de Pearson; n: número de pacientes

**Tabela 42.** Correlação entre marcadores bioquímicos e concentrações séricas de ácido retinóico no tempo sete horas (T7) após a administração de 2500 UI de palmitato de retinila

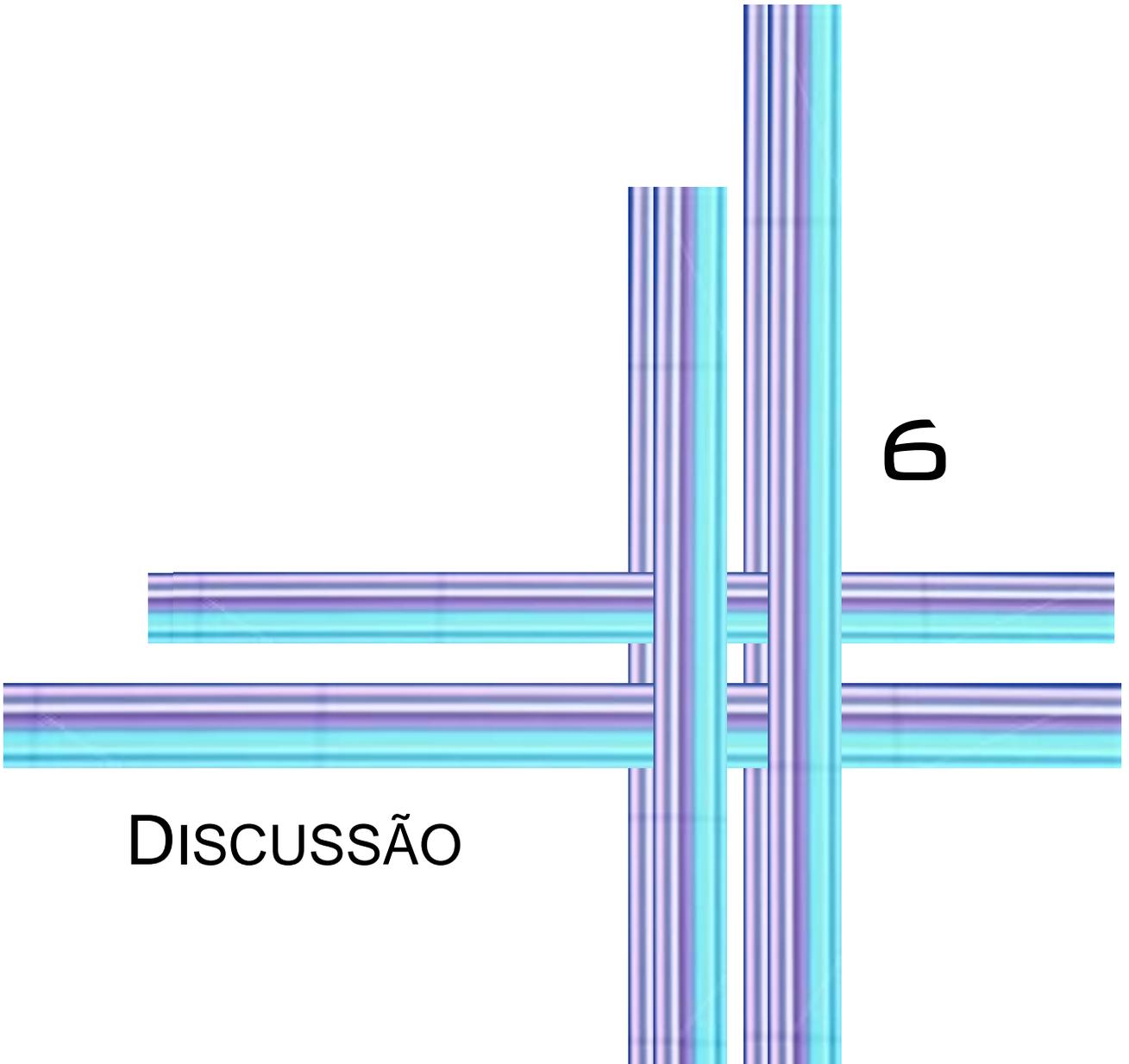
Marcador Bioquímico	Ácido Retinóico Sérico (ng/mL)		
	n	r <sub>s</sub>	p-valor
ALT	63	-0,261	0,189
AST	63	-0,229	0,251
Albumina	63	0,003	0,987
TAP	62	-0,237	0,233
BT	63	0,200	0,316

\* ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; TAP: tempo e atividade de protrombina; BT: bilirrubina total; r<sub>s</sub>: coeficiente de correlação de Pearson; n: número de pacientes

**Tabela 43.** Correlação entre marcadores bioquímicos e concentrações séricas da razão retinol/ácido retinóico no tempo sete horas (T7) após a administração de 2500 UI de palmitato de retinila

Marcador Bioquímico	Razão Retinol / Ácido Retinóico Séricos (ng/mL)		
	n	r <sub>s</sub>	p-valor
ALT	63	0,235	0,237
AST	63	0,167	0,404
Albumina	63	-0,435	0,023
TAP	62	0,138	0,491
BT	63	-0,217	0,277

\* ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; TAP: tempo e atividade de protrombina; BT: bilirrubina total; r<sub>s</sub>: coeficiente de correlação de Pearson; n: número de pacientes



DISCUSSÃO

6

## 6.1 Discussão da Etapa Analítica

### 6.1.1 Desenvolvimento e Validação de Metodologia para Quantificação de Retinol e Ácido Retinóico

A maioria das metodologias analíticas para quantificação de retinol e ácido retinóico séricos descritas na literatura apresentam limitações para o uso na rotina clínica. Dentre as limitações destacamos principalmente o tipo de extração e o tipo de detecção. A extração dos retinóides, a partir da amostra biológica, majoritariamente é por ELL (MEYER *et al.*, 1994; MIYAGI *et al.*, 2001; RÜHL, 2006) e, após separação cromatográfica, a detecção dos analitos é por espectrofotometria na região do ultravioleta (WYSS, 1995; RÜHL & SCHWEIGERT, 2003). Para os retinóides, esses métodos exigem longos tempos de execução, o que não é desejável em análises na rotina de laboratórios clínicos.

No presente trabalho, foi desenvolvido e validado um método para a quantificação simultânea de retinol e ácido retinóico empregando como método de extração a EFS e após separação cromatográfica a detecção dos analitos é por espectrometria de massas. Essa metodologia analítica apresenta vantagens quando comparada aos métodos de ELL e a detecção por UV.

A primeira vantagem está relacionada à maior especificidade do princípio de detecção. Devido à estrutura poliênica dos retinóides, todos eles absorvem na mesma faixa do UV, sendo necessário um maior tempo de cromatografia para evitar a coeluição dos analitos. No espectrômetro de massas, os analitos (retinóides) são detectados por íons de diferentes razões massa/carga. O retinol apresenta uma transição  $m/z$  269  $\rightarrow$  93, enquanto que o ácido retinóico apresenta a transição  $m/z$  301  $\rightarrow$  205.

Apesar dos ésteres de retinila presentes na matriz sofrerem hidrólise na fonte de ionização gerando retinol, que posteriormente sofre desidratação formando o íon de  $m/z$  269, não foi necessário realizar a separação cromatográfica na coluna, pois o emprego de uma força eluente seletiva na etapa de EFS evita que os ésteres sejam extraídos e cheguem à mesma. Assim, o uso combinado da EFS com a CLAE-EM, evitou que fossem necessários longos

tempos de análise, para uma criteriosa separação cromatográfica do retinol e seus ésteres antes do processo de detecção.

Neste estudo, as condições desenvolvidas para a EFS priorizaram a retenção dos ésteres na fase estacionária do cartucho extrator. Conforme demonstramos, o palmitato de retinila não é eluído na etapa de EFS. Nas condições do método, admite-se que os demais ésteres de cadeia longa (oleato, estearato, etc) também ficam presos ao cartucho, pois são mais lipofílicos que o palmitato e, portanto, apresentam maior tempo de retenção, conforme demonstrada em CLAE-UV operada em fase reversa (GOT *et al.*, 1995).

A automação do método de EFS quando operado em linha com a CLAE-EMS é outra vantagem da metodologia desenvolvida, uma vez que ela diminui o contato do analista com a amostra biológica, que no caso de pacientes com cirrose de etiologia viral está contaminada pelo vírus da hepatite. Outra característica positiva é diminuir o número de erros experimentais que podem ser atribuídos ao analista no momento de preparo da amostra, tais como: retiradas de alíquotas e diluições. Além disso, como os retinóides são sensíveis à luz, calor e oxigênio, é desejável que a extração ocorra em um menor número de etapas possíveis, de modo a evitar a degradação ou oxidação da amostra.

Quando comparado aos métodos tradicionais de extração e quantificação dos retinóides, nossa metodologia apresentou tempo de análise menor do que os encontrados na literatura. Enquanto analisamos uma amostra em 12 minutos, oito minutos de corrida cromatográfica e 4 minutos de extração, o método de Meyer e colaboradores (1994) e Wang e colaboradores (2001) requer 25 minutos para a corrida cromatográfica (não foi determinado o tempo de extração).

Assim, a metodologia desenvolvida neste trabalho mostrou-se útil para a aplicação na rotina clínica principalmente por apresentar tempo de análise reduzido e diminuir riscos de resultados falsos positivo, mais frequentes na CLAE-UV.

### **6.1.2 Eliminação dos Níveis Basais de Retinol e Ácido Retinóico no Soro Empregado para Construção das Curvas de Calibração**

Para a construção das curvas de calibração em métodos analíticos empregados para a quantificação de produtos endógenos é desejável eliminar os níveis basais da matriz biológica empregada.

Sabe-se que o retinol é muito sensível à radiação UV e que seus ésteres são rapidamente inativados em soluções aquosas e alcoólicas expostas à radiação, porém a extensão e a razão da degradação dependem do grau de exposição à luz. Este fato tem permitido a eliminação dos níveis basais de retinol em soro e plasma humano. Entretanto, em vários estudos, os níveis basais de retinol e retinóico têm sido determinados a partir de curvas de calibração construídas em salinas ou soluções alcoólicas (GOT *et al.*, 1995; VAN BREMEN *et al.*, 1998; TALWAR *et al.*, 1998; RÜHL & SCHWEIGERT, 2003; GUNDERSEN *et al.*, 2007).

Cherng e colaboradores (2005) mostraram que a irradiação de solução de palmitato de retinila em etanol gera uma série de produtos de fotodecomposição e EROS através de três diferentes mecanismos que envolvem reações em cadeia formadas por radicais livres, fotodissociação iônica e fotossensibilização do palmitato de retinila.

Allwood & Plane (1984 e 1986) mostraram que o retinol é degradado quando exposto à radiação UV e que essa degradação é não exponencial, sendo que uma possível explicação para este fato seria de que os produtos de degradação da vitamina A fornecem uma proteção para o retinol residual.

Neste trabalho não conseguimos realizar a degradação total do retinol e ácido retinóico de forma a eliminá-los do soro. Isto pode ter ocorrido porque os processos fotoquímicos envolvem a absorção de energia de ativação suficiente para que a reação aconteça e a habilidade da luz UV em fornecer energia radiante apropriada depende do comprimento de onda adequado (LIN & LANCHMAN, 1969 in ALLWOND & PLANE, 1986).

No trabalho realizado por Allwood & Plane (1986), foi utilizado um comprimento de onda na faixa de 290-400 nm, sendo necessários períodos de exposição entre 60 e 240 segundos para a degradação de cerca de 80-90% do

retinol, exceto para altas concentrações. No nosso estudo, nos primeiros minutos de retirada de alíquotas das soluções de retinol, observou-se uma redução na área do pico cromatográfico referente a este analito, mostrando que estava havendo degradação do mesmo. Porém, a partir de um determinado momento, a área do pico permaneceu constante, mostrando que não estava mais acontecendo degradação. Acreditamos que o fato de não ter havido degradação total da amostra esteja ligado ao fato de não estarmos trabalhando no comprimento de onda ideal da lâmpada UV, de modo que não houve energia suficiente para a ocorrência do processo fotoquímico e, além disso, por estarmos quantificando os produtos de decomposição por método analítico diferente (EMS) dos demais autores.

## **6.2. Discussão da Etapa Clínica**

### **6.2.1 Comparação das Concentrações Séricas de Retinol, Ácido Retinóico e da Razão Retinol / Ácido Retinóico entre os Dois Grupos de Pacientes Divididos de acordo com a Dose de Suplemento (1500 UI ou 2500 UI) nos Tempos Zero (T0), Cinco (T5) e Sete (T7) Horas**

Não houve diferença significativa entre as concentrações séricas basais de retinol ( $p=0,459$ ), ácido retinóico ( $p=0,320$ ) e razão retinol / ácido retinóico ( $p=0,332$ ), entre os dois grupos de suplementação. Da mesma maneira, não houve diferença significativa entre as concentrações dos analitos e sua razão quando comparado um mesmo tempo de colheita, em dosagens de suplementação diferentes.

Ao administrarmos a dose de 1500 UI de palmitato de retinila, a concentração sérica de retinol aumentou 1,92% (de 74,94 ng/mL para 76,38 ng/mL) no tempo de 5 horas. No tempo 7 horas, a concentração diminuiu 6,65% passando de 76,38 ng/mL para 71,62 ng/mL. O mesmo aconteceu com o ácido retinóico. Primeiramente, ocorreu um aumento de 15,74% (de 2,16 ng/mL para 2,50 ng/mL) em relação ao ácido retinóico basal, mas 7 horas após a administração ocorre uma diminuição de 9,6% (de 2,50 ng/mL para 2,26 ng/mL) em relação ao tempo de 5 horas.

A mesma relação ocorre com a dosagem de 2500 UI, primeiramente, no tempo de 5 horas, ocorre um aumento de 7,49% (de 70,08 ng/mL para 75,33 ng/mL) nas concentrações de retinol e de 10,0% (de 2,50 ng/mL para 2,75 ng/mL) para o ácido retinóico em relação aos níveis basais. Porém, 7 horas após a administração ocorre uma diminuição das concentrações dos retinóides (5,59% para o retinol, de 75,33 ng/mL para 71,12 ng/mL e 6,18% para o ácido retinóico, de 2,75 ng/mL para 2,58 ng/mL) quando comparado ao tempo de 5 horas.

Para as duas dosagens, observa-se uma diminuição da razão retinol / ácido retinóico no tempo de 5 horas (15,20% para 1500 UI e 11,86 % para 2500 UI) em relação ao tempo zero, isto porque o aumento percentual do ácido retinóico foi maior do que do retinol.

No tempo de 7 horas, a razão retinol / ácido retinóico também diminui em relação ao tempo zero, porém essa diminuição é menor do que no tempo de 5 horas (7,41% para 1500 UI e 10,26% para 2500 UI), mostrando que o palmitato de retinila administrado é inicialmente oxidado a ácido retinóico havendo um grande incremento na sua concentração no tempo de 5 horas. No tempo de 7 horas, o ácido retinóico continua sendo formado, porém como grande parte do retinol já foi utilizada, o incremento na concentração é menor.

Ou seja, até 5 horas após administrarmos a dose de palmitato de retinila, parte do retinol formado através da hidrólise do éster, se liga a apo-RBP e cai na circulação sanguínea, levando ao aumento dos seus níveis séricos. Porém, parte do retinol é oxidada a ácido retinóico, que também cai na circulação sanguínea, havendo assim um aumento nos níveis dos dois retinóides. No tempo de 7 horas, o retinol que foi formado no fígado já foi utilizado de uma das duas maneiras, ou se ligou a RBP e caiu na circulação sanguínea, ou foi biotransformado pelas enzimas hepáticas em outros metabólitos, de forma que as concentrações séricas de retinol diminuem e de ácido retinóico também. Deve-se observar que as concentrações de ácido retinóico podem ter diminuído por dois motivos: o primeiro está relacionado à falta de substrato (retinol) para que as enzimas hepáticas formem o ácido retinóico. O outro motivo é a utilização do ácido retinóico para a formação de outros metabólitos como 9-*cis*-, 4-hidroxi-9-*cis*-, 4-oxo-9-*cis*-, 13-*cis*-, 4-hidroxi-13-*cis*-, 4-oxo-13-*cis*-ácido retinóico.

### **6.2.2 Correlação dos Níveis Séricos de Retinol, Ácido Retinóico e Razão Retinol / Ácido Retinóico e Marcadores Bioquímicos**

Têm sido documentadas mudanças no metabolismo dos retinóides durante o desenvolvimento da cirrose hepática, porém a dinâmica das alterações dos níveis dos retinóides entre a circulação e o fígado ainda não é claramente entendido (NATARAJAN *et al.*, 2005).

Alguns estudos (NEWSOME *et al.*, 2000; ROCCHI *et al.*, 2001; YADAV *et al.*, 2002; PERES, 2006) quantificam o retinol e o correlacionam com marcadores bioquímicos de lesão e função hepática. Até o presente momento, nenhum outro trabalho correlacionou a razão entre retinol e ácido retinóico como possível biomarcador de doenças hepáticas crônicas. Nesta pesquisa, avaliamos essa razão por acreditar que através dela podemos ter uma melhor avaliação funcional do fígado, pois estaríamos estudando a atividade das enzimas relacionadas com a biotransformação do retinol ao ácido retinóico e, assim, a razão poderia ser um melhor marcador do que qualquer um desses retinóides isoladamente.

Para avaliar a função enzimática do fígado através da biotransformação do retinol, administramos duas dosagens diferentes de palmitato de retinila: a dose de 1500 UI que é a dosagem padrão do protocolo RDR, utilizado para avaliar a reserva hepática de retinol e uma dose desafio de 2500 UI, adicionando ao protocolo padrão, o tempo de colheita de 7 horas, uma vez que a maior parte dos nossos pacientes está numa faixa de 51 a 70 anos, possuindo baixo clearance pós-prandial de ésteres de retinila.

Para caracterizar uma eventual propriedade biomarcadora atribuída aos retinóides, correlacionamos as concentrações séricas de retinol, ácido retinóico e da razão retinol / ácido retinóico com os valores nominais de cinco marcadores bioquímicos. Dois deles (AST e ALT) são comumente utilizados para avaliar a lesão hepática, enquanto três deles (albumina, TAP e BT) avaliam a função hepática em pacientes com doença hepática crônica (GOPAL & ROSEN, 2000).

No presente estudo, o retinol sérico correlacionou-se negativa e significativamente com a BT ( $p=0,038$ ), na dosagem de 2500 UI e tempo de colheita de 5 horas. Rocchi e colaboradores (1991) e Peres (2006) também encontraram correlação negativa entre retinol e BT ( $p < 0,001$  e  $p=0,000$ ,

respectivamente), embora Newsome e colaboradores (2000) não tenham encontrado correlação entre essas variáveis.

Não encontramos correlação significativa das concentrações séricas de retinol com ALT, corroborando os achados de Peres (2006), Newsome e colaboradores (2000) e Yadav e colaboradores (2002). Em contraste, Rocchi e colaboradores (2001) observaram correlação significativa e negativa ( $p < 0,0001$ ) entre essas variáveis. Deve-se ressaltar que os estudos de Peres (2006) e Newsome e colaboradores (2000) incluíam indivíduos com doença hepática mais avançada do que os pacientes de Rocchi e colaboradores (2001).

Também não encontramos correlação entre os níveis séricos de retinol e AST, assim como Yadav e colaboradores (2002) que não encontraram significância estatística entre essas duas variáveis. Já Peres (2006) e Rocchi e colaboradores (2001) encontraram correlação negativa entre retinol e AST ( $p = 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente), enquanto Newsome e colaboradores (2000) não analisaram essa variável bioquímica.

Nosso trabalho também não apresentou correlação entre o retinol e TAP, assim como Newsome e colaboradores (2000), embora Peres (2006) e Rocchi e colaboradores (1991) tenham encontrado correlação negativa e significativa entre essas variáveis ( $p = 0,000$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).

Não encontramos correlação entre retinol e albumina sérica, enquanto Peres (2006), Rocchi e colaboradores (1991) e Newsome e colaboradores (2000) encontraram correlação positiva e significativa ( $p = 0,003$ ,  $p < 0,0001$  e  $p = 0,018$ ) entre essas variáveis. Um dos motivos para não termos encontrado correlação entre retinol e albumina pode ser o fato de nossos pacientes serem todos Child A enquanto que Peres (2006) e Newsome e colaboradores (2000) possuíam pacientes com graus de cirrose mais avançados.

Também na dosagem de 2500 UI de palmitato de retinila e tempo de colheita de 5 horas, as enzimas ALT e AST se correlacionaram positiva e significativamente com a razão retinol / ácido retinóico ( $p = 0,021$  e  $p = 0,041$ , respectivamente).

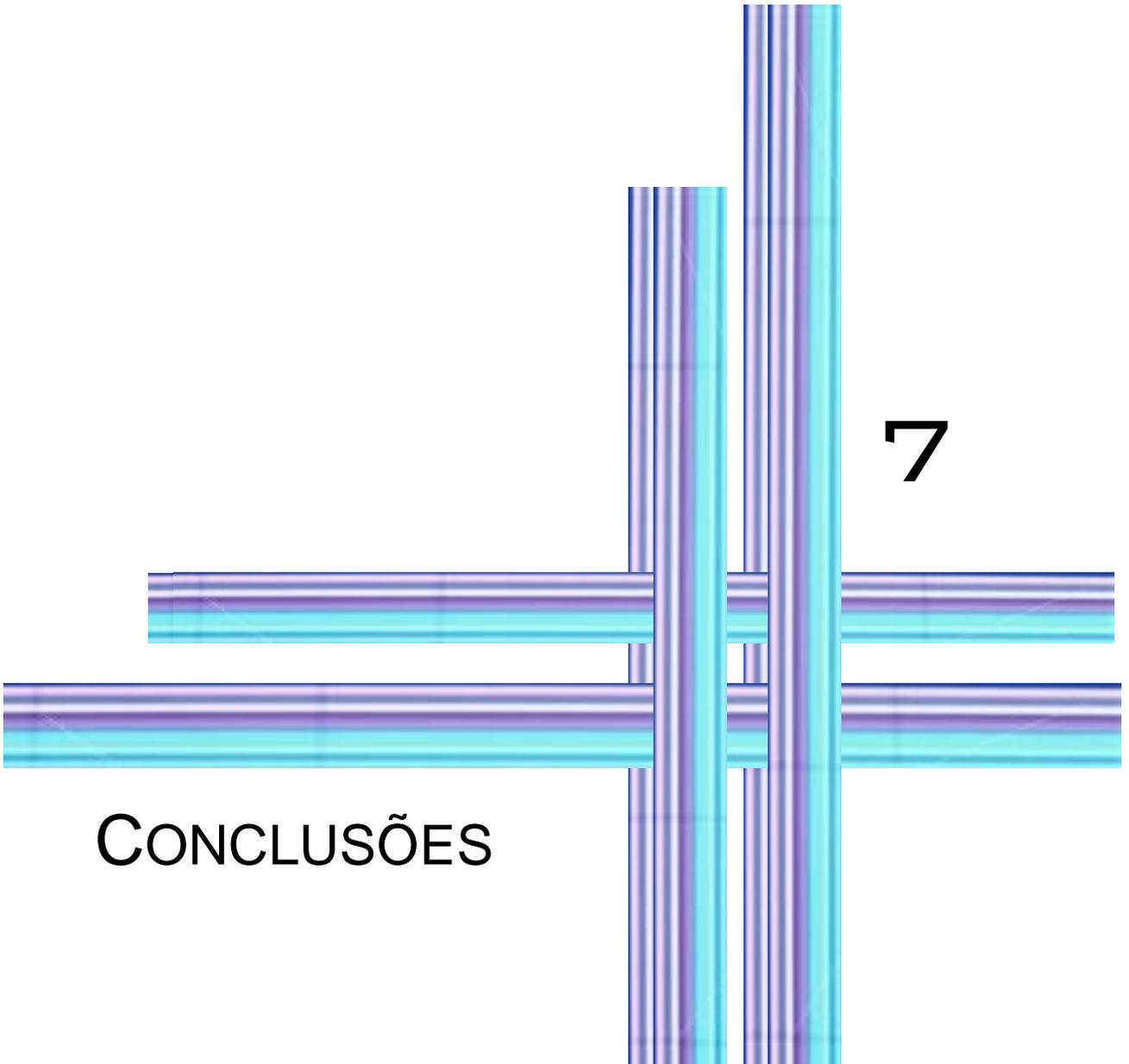
A razão retinol / ácido retinóico também se correlacionou negativa e significativamente com as concentrações de albumina sérica nos tempos de 5 ( $p = 0,047$ ) e 7 horas ( $p = 0,023$ ), após a dose de 2500 UI de palmitato de retinila.

Com relação à dosagem de 1500 UI, nem o retinol, nem o ácido retinóico e nem a razão entre eles apresentou correlação com nenhuma variável bioquímica que demonstra lesão hepática ou comprometimento da função hepática.

Para entendermos as diferenças entre as duas doses e os dois tempos de colheita, podemos considerar a cinética enzimática relacionada à biotransformação dos retinóides. A velocidade da reação enzimática, segundo a equação de Michaelis-Menten depende das concentrações do substrato e da enzima (NELSON & COX, 2006). A Cirrose Child A é considerada uma patologia leve quando comparada com os outros graus de cirrose (Child B e C) e até mesmo com cirrose Child A associada à CHC. Neste caso, acreditamos que o comprometimento das enzimas hepáticas ligadas à biotransformação do retinol ainda não seja tão grande e, por isso, ao administrarmos uma dosagem de 1500 UI, os teores enzimáticos conseguem biotransformar o retinol e, por isso, a dose não apresentou poder discriminatório para identificar correlação entre os retinóides e os marcadores bioquímicos.

Quando utilizamos a dose de 2500 UI, o teor enzimático requerido para biotransformar o retinol a ácido retinóico seguramente foi maior e, no tempo de colheita de 5 horas, foram observadas correlações do retinol à BT e da razão retinol / ácido retinóico à ALT, AST e albumina. Nessa dose, portanto, o poder discriminatório foi maior. No tempo de sete horas, a situação se assemelha ao tempo zero. As concentrações de retinol são tais que as enzimas conseguem biotransformar o retinol e, por isso, só encontramos correlação com a albumina sérica.

É provável que em patologias mais graves, como cirrose Child B e C, até mesmo com uma dosagem de 1500 UI e no tempo de 7 horas já seja possível detectar essas alterações nas concentrações de retinol e ácido retinóico, uma vez que as enzimas hepáticas estarão mais comprometidas, havendo maior poder discriminatório e conseqüentemente correlação com outros marcadores.

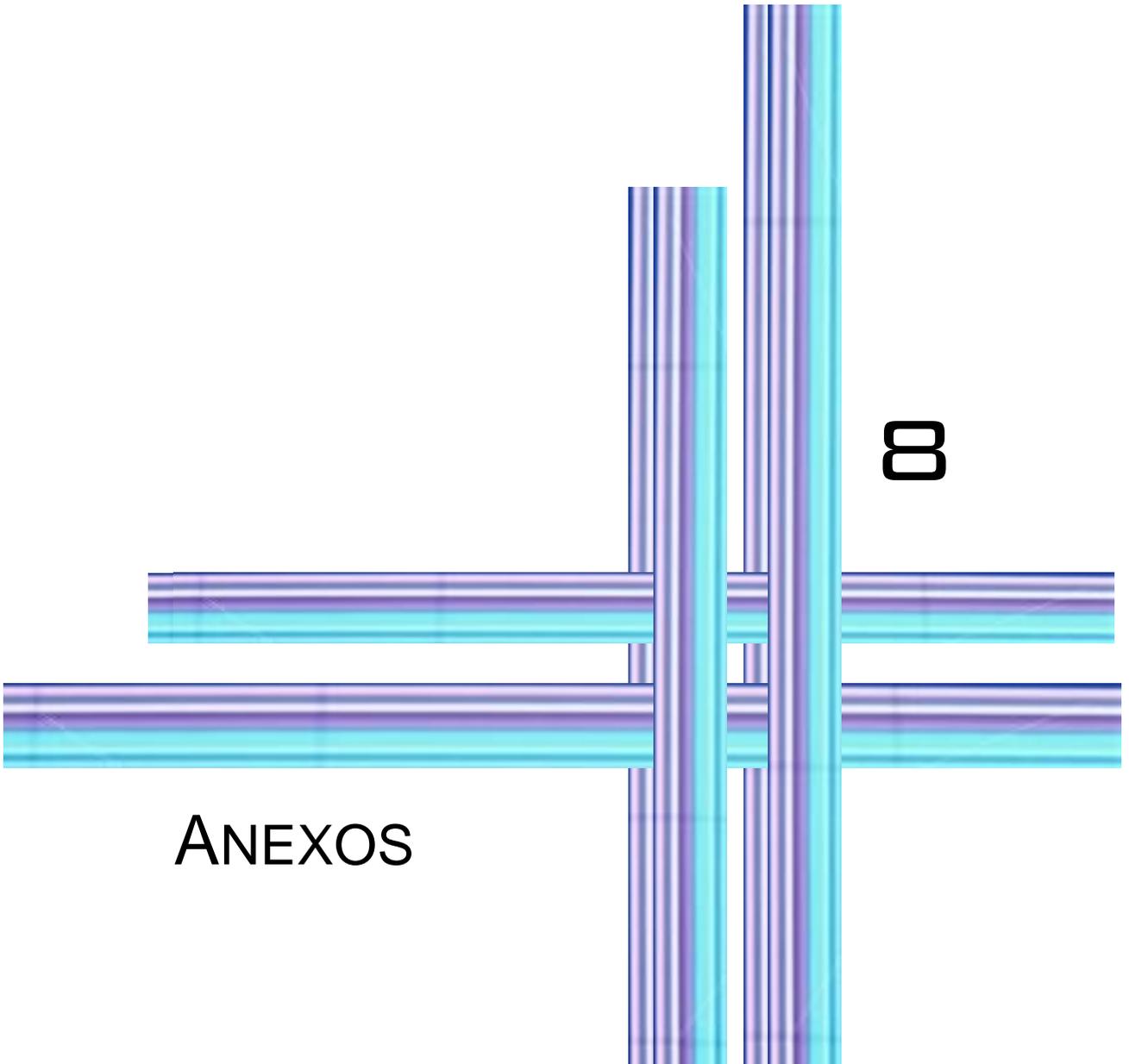


7

CONCLUSÕES

- ❖ A metodologia analítica desenvolvida demonstrou viabilidade de emprego na rotina clínica: permitiu a quantificação simultânea de retinol e ácido retinóico com precisão, exatidão, limite de quantificação e tempo de execução adequados ao fim proposto.
- ❖ A metodologia permitiu a quantificação dos analitos nas duas condições de suplementação: doses de 1500 UI e 2500 UI. Não houve diferença significativa entre as concentrações séricas de retinol, ácido retinóico e da razão retinol / ácido retinóico nas duas condições de suplementação.
- ❖ Somente a suplementação na dose de 2500 UI permitiu identificar correlações dos marcadores bioquímicos investigados com as concentrações séricas de retinol e com a razão entre as concentrações de retinol e ácido retinóico.
- ❖ Na cirrose Child A, o ácido retinóico não se correlacionou com nenhum dos marcadores bioquímicos investigados; o retinol correlacionou-se significativamente com a BT sérica enquanto que a razão entre as concentrações retinol/ácido retinóico correlacionou-se significativamente com a albumina, AST e ALT séricas.

Face às conclusões expostas, para fins do uso de retinóides como biomarcadores de dano hepático, recomenda-se o emprego do método de EFS-CLAE-EMS operado em ESI positivo, para determinar a razão entre as concentrações séricas de retinol e ácido retinóico 5 horas após a administração de uma dose de 2500 UI de palmitato de retinila.



ANEXOS

88

## ANEXO 1

## NÚCLEO DE PESQUISA EM MICRONUTRIENTES

Pesquisa: "Adaptação do Teste de avaliação indireta da reserva hepática de retinol para diagnóstico do estado nutricional de Vitamina A em pacientes com cirrose hepática e carcinoma hepatocelular"

Entrevistador: \_\_\_\_\_

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

A doença hepática pode levar a desnutrição e deficiência de vitamina A. Essa deficiência pode ser tratada sob orientação do nutricionista ou médico especialista.

Para saber se você apresenta esta deficiência, estamos realizando uma pesquisa denominada "Adaptação do teste de resposta relativa à dose para diagnóstico do estado nutricional de vitamina A em pacientes com cirrose hepática e carcinoma hepatocelular", para a qual solicitamos o seu consentimento.

É importante que no dia marcado você compareça em jejum de 12 horas ao Hospital para coleta de sangue, recebendo em seguida um desjejum e uma dose de 1500 ou 2500 UI de vitamina A. Após 5 e/ou 7 horas será realizada nova coleta de sangue. A dose suplementar de Vitamina A não oferece riscos de toxicidade, devido à administração de pequena dosagem e não apresenta efeito colateral.

Suas medidas corporais serão avaliadas. Qualquer dúvida poderá ser esclarecida pelo telefone 2543-7172/93170281 com a Pesquisadora Gabriela Chaves. Os resultados estarão disponíveis aos participantes.

Se você concorda em participar, por favor, assine o Termo de Consentimento abaixo:

Eu, abaixo assinado, dou meu consentimento livre e esclarecido para participar do Projeto de Pesquisa descrito acima, tendo recebido uma cópia deste termo de consentimento. Declaro, também, que tive oportunidade de questionar maiores detalhes sobre o estudo e que estou ciente de que meus dados permanecerão confidenciais e que não receberei nenhuma ajuda de custo pela minha participação. Assinando este termo, autorizo minha participação voluntária neste projeto, do qual eu posso me retirar a qualquer momento, sem penalidades, perda de benefícios ou tratamento que eu tenha direito.

NOME:.....

ASSINATURA:.....

PESQUISADOR:.....

## ANEXO 2

## NÚCLEO DE PESQUISA EM MICRONUTRIENTES

Pesquisa: "Adaptação do Teste de avaliação indireta da reserva hepática de retinol para diagnóstico do estado nutricional de Vitamina A em pacientes com cirrose hepática e carcinoma hepatocelular"

Entrevistador: \_\_\_\_\_

**1 – IDENTIFICAÇÃO**      Grupo Controle       Grupo 1       Grupo 2

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Prontuário: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_ Sexo      M      F

Profissão: \_\_\_\_\_ Escolaridade: \_\_\_\_\_

**2 – DIAGNÓSTICO:**

Cirrose A  Cirrose B  Cirrose C  CHC

**2.1 – Doenças**

**Associadas:** \_\_\_\_\_

**2.2 – Fármacos em**

**Uso:** \_\_\_\_\_

**3 – CHILD-PUGH:**

**Ascite:** Ausente  Ausente, controlada c/ diuréticos  Presente (facilmente detectável)

**Presença de edema:** \_\_\_\_\_

**Encefalopatia:** Ausente  Leve  Moderada a Severa

**3.1 – PONTUAÇÃO P/ GRAU DE GRAVIDADE DA DOENÇA HEPÁTICA (Pugh et al., 1973):****4 - ANAMNESE****4.1 - Complicações:**

**4.2-Varizes esofageanas:** ( )Sim ( )Não      **5.2- Sangramento:**( )Sim ( )Não n° de vezes: \_\_\_\_\_

4.3. Suplementação protéica/calórica em uso:

---

4.4. Suplementação vitamínica/mineral em uso:

---

4.5 - Faz dieta ou alguma restrição alimentar? ( )Sim ( )Não Qual tipo? \_\_\_\_\_

4.6 - Fazia uso de bebida alcoólica antes de ficar doente? ( )Sim ( )Não

#### VI-BÍOQUÍMICA:

Alfa fetoproteína	
Fosfatase alcalina	
Alanina aminotransferase (TGP)	
Aspartato aminotransferase (TGO) (AST)	
Gama GT	
Albumina	
Tempo de protrombina	Cliente: Controle: Atividade: INR:
Bilirrubina	Total(0,0-1,0): Direta: Indireta:

#### V - ANTROPOMETRIA:

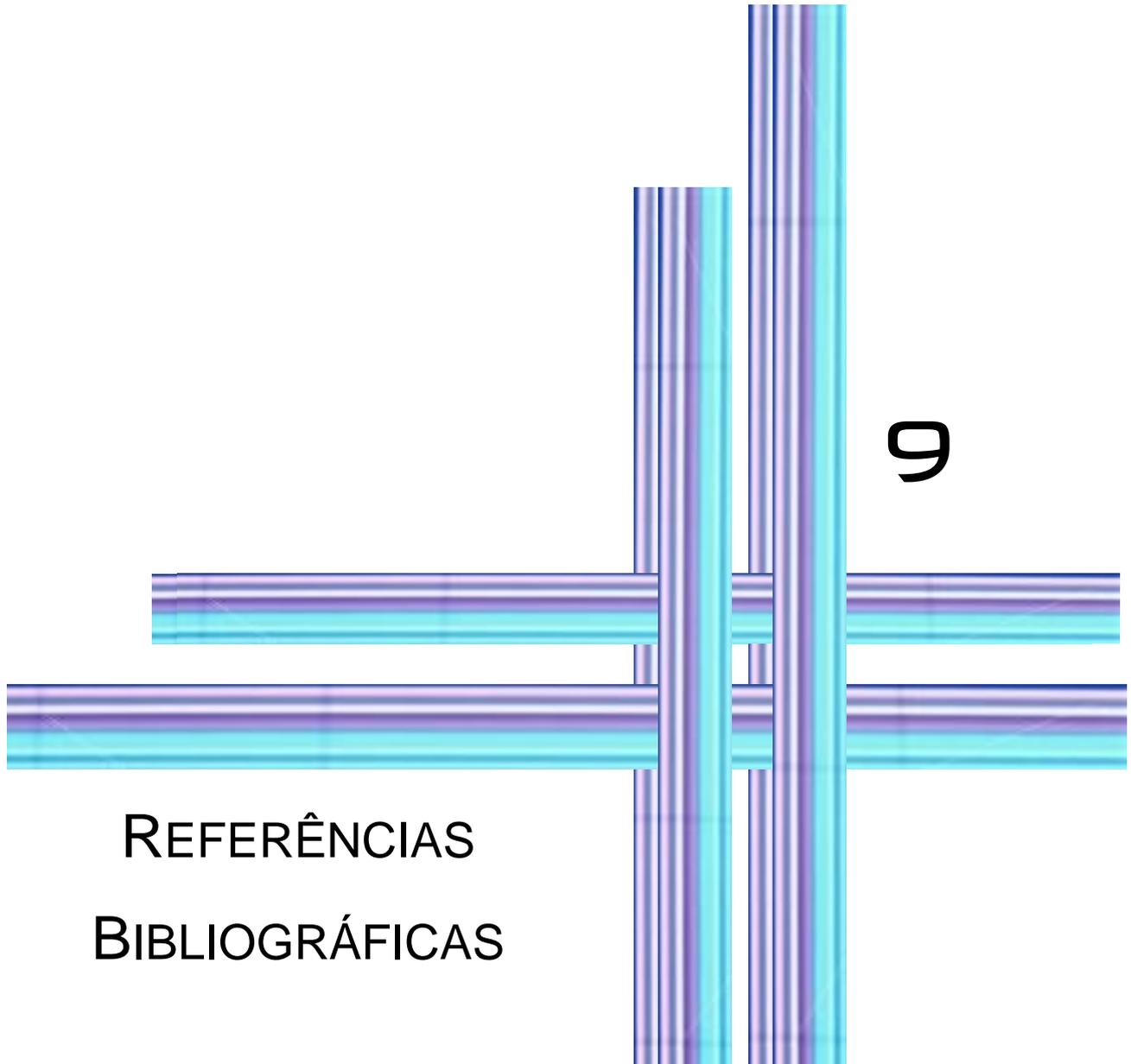
Dados antropométricos	Valores
Peso	
Altura	
Circunferência do braço	
Circunferência Muscular braquial	
Prega Cutânea Tricipital	

## ANEXO 3

## COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO PARA REVISTA CIENTÍFICA

**Analytical & Bioanalytical Chemistry****Simultaneous quantitative determination of all-trans-retinol and all-trans-retinoic acid in human serum of cirrhotic patients by automated solid-phase extraction coupled to liquid chromatography/tandem mass spectrometry**

Journal:	<i>Analytical and Bioanalytical Chemistry</i>
Manuscript ID:	ABC-01191-2010
Type of Paper:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	01-Jul-2010
Complete List of Authors:	COSTA, EDLAINE; Federal University of Rio de Janeiro CHAVES, GABRIELA; Federal University of Rio de Janeiro ESTRELA, RITA; Federal University of Rio de Janeiro RAMALHO, REJANE; Federal University of Rio de Janeiro PERES, WILZA; Federal University of Rio de Janeiro GONÇALVES, JOSÉ; Federal University of Rio de Janeiro
Keywords:	Simultaneous, Determination, Retinol, Retinoic acid, SPE, HPLC-MS/MS



REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS

- 
- AFDHAL, N. & NUNES, D. **Evaluation of liver fibrosis: a concise review.** *American Journal of Gastroenterology*, 99: 1160-1174, 2004.
- ALWOOD, M. C. & PLANE, J. H. **The degradation of vitamin A exposed to ultraviolet radiation.** *International Journal of Pharmaceutics*, 19: 207-213, 1984.
- ALWOOD, M. C. & PLANE, J. H. **The wavelength-dependent degradation of vitamin A exposed to ultraviolet radiation.** *International Journal of Pharmaceutics*, 31: 1-7, 1986.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **Espectrometria de massas e suas aplicações**, 2003.
- BARROS, C. B. **Validação de métodos analíticos.** *Biológico*, 64 (2): 175-177, 2002.
- BATALLER R & BRENNER D. **Liver fibrosis.** *The Journal of Clinical Investigation*, 115 (2): 209-218, 2005.
- BLANC, J. F.; BIOULAC-SAGE, P.; BALABAUD, C.; DESMOULIÈRE, A. **Investigation of liver fibrosis in clinical practice.** *Hepatology Research*, 32: 1-8, 2005.
- BLOMHOFF, R. **Hepatic retinol metabolism: role of the various cell types.** *Nutrition Reviews*, 45 (9), 257-263, 1987.
- BLOMHOFF, R. **Transport and metabolism of vitamin A.** *Nutrition Reviews*, 52 (2): S13-23, 1994.
- BLOMHOFF, R. & WAKE, K. **Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis.** *The FASEB Journal*, 5: 271-277, 1991.

- BRANDÃO, D. F.; RAMALHO, L. N. Z.; RAMALHO, F.S. ZUCOLOTO, S.; MARTINELLI, L. C.; SILVA, O. C. **Liver cirrhosis and hepatic stellate cells.** *Acta Cirúrgica Brasileira*, 21 (1): 54-57, 2006.

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RE Nº 899**, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos, 2003.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **A, B, C, D, E de hepatites para comunicadores.** Brasília, 2005a.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica** - 6. ed. – Brasília, 2005b.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Hepatites virais : o Brasil está atento** – 3. ed. – Brasília, 2008a.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de aconselhamento em hepatites virais.** Brasília, 2005c.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Material instrucional para capacitação em vigilância epidemiológica das hepatites virais**, Brasília, 2008b.

- BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. **Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão.** *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*. 13: 129-146, 2003.

- BULUX, J.; CARRANZA, E.; CASTAÑEDA, C.; SOLOMONS, N. W.; SOKOLL, L. J.; MORROW, F. D.; RUSSELL, R. M. **Studies on the application of the relative-dose-response test for assessing vitamin A status in older adults.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, 56: 543-547, 1992.

- CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. **Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático.** *Química Nova*, 31 (3): 669-675, 2008.

- CAPOTE, F. P.; JIMÉNEZ, J. R.; GRANADOS, J. M. M.; CASTRO, M. D. L. **Identification and determination of fat-soluble vitamins and metabolites in human serum by liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry with multiple reaction monitoring.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21: 1745-1754, 2007
- CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; QUESS, Q. B. **Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas.** *Química Nova*, 32 (4): 1021-1030, 2009.
- CAUSON, R. **Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion.** *Journal of chromatography B*, 689: 175-180, 1997.
- CHANG, S., ZHANG, S. H.; MAEDA, N.; BORENSZTAJN, J. **Hepatic clearance of chylomicron remnants in mice lacking apoprotein E.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1215 (1-2): 205-208, 1994.
- CHEN, H.; HOWALD, W. N.; JUCHAU, M. R. **Biosynthesis of all-trans-retinoic acid from all-trans-retinol: catalysis off all-trans- retinol oxidation by human P-450 cytochromes.** *Drug Metabolism and Disposition*, 28 (3): 315-322, 1999.
- CHERNG, S. H.; XIA, Q.; BLANKENSHIP, L. R.; FREEMAN, J. P.; WAMER, W. G.; HOWARD, P. C.; FU, P. P. **Photodecomposition of retinyl palmitate in ethanol by UVA light - formation of photodecomposition products, Reactive oxygen species and lipid peroxides.** *Chemical Research in Toxicology*, 18: 129-138, 2005.
- CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F. **O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos.** *Química Nova*, 31 (3): 623-636, 2008.
- CHING, S.; INGRAM, D.; HAHNEL, R.; BEILBY, J.; ROSSI, E. **Serum levels of micronutrients, antioxidants and total antioxidant status predict risk of breast cancer in a case control study.** *Journal of Nutrition*, 132: 303-306, 2002.

- CHRISTENSEN, E. **Prognostic models in chronic liver disease: validity, usefulness and future role.** *Journal of Hepatology*, 26: 1414-1424, 1997.
- COLLINS, H. C.; JARDIM, F. S. C. I. **Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica.** *Química Nova*, 24: 68-76, 2001.
- CONTE, V. P. **Carcinoma Hepatocelular. Parte 1. Considerações gerais e diagnóstico.** *Arquivos de Gastroenterologia*, 37(1): 58-68, 2000.
- DAWSON, H. D. & YAMAMOTO, Y. **Regulation of hepatic vitamin A storage in a rat model of controlled vitamin A status during aging.** *The Journal of Nutrition*, 130 (5): 1280-1286, 2000.
- DIAS, M. B. K. **Carcinoma Hepatocelular: História Natural e Sobrevida em Amostra Hospitalar no Rio de Janeiro.** Dissertação de Mestrado em Saúde Pública, sub-área Epidemiologia Geral, Fundação Oswaldo Cruz, 2003.
- DOOLEY, K.C. **Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory.** *Clinical Biochemistry*, 36: 471-81, 2003.
- FOCACCIA, R. e colaboração do Grupo de Hepatites Virais do Instituto de Infectologia Emílio Ribas. **Tratado de hepatites virais** — São Paulo: Editora Atheneu, 2003.
- FONTHAM, E. T. **Protective dietary factors and lung cancer.** *International Journal of Epidemiology*, 19: S32-S42, 1990.
- FURR, H. C. **Analysis of retinoids and carotenoids; problems resolved and unsolved.** *The Journal of Nutrition*, 134: 281S-285S, 2004.
- GELPÍ, E. **Contributions of liquid chromatography-mass spectrometry to "highlights" of biomedical research.** *Journal of Chromatography A*, 1000: 567-581, 2003.

- **Gilson Guide to SPE automation**, 1997.
- GONÇALVES, C. S., GOMES, M. O. Z., GONÇALVES, P. L., GONÇALVES, L. L., PEREIRA, F. E. L. **Hepatite alcoólica**. *Journal Brasileiro de Gastroenterologia*, 6 (2): 59-68, 2006.
- GONÇALVES, J.C.S., MONTEIRO, T.M., NEVES, C. S.; GRAM, K. R.; VOLPATO, N. M.; SILVA, V. A.; CAMINHA, R.; GONÇALVES, M. R.; SANTOS, F. M.; SILVEIRA, G. A.; NOËL, F. **On-line solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (SPE-HPLC-MS-MS) for quantification of bromazepan in human plasma**. *Therapeutic Drug Monitoring*, 27: 601-607, 2005.
- GOT, L.; GOUSSON, T.; DELACOUX, E. **Simultaneous determination of retinyl esters and retinol in human livers by reversed-phase high-performance liquid chromatography**. *Journal of Chromatography B*, 668: 233-239, 1995.
- GRESSNER, O. A.; WEISKIRCHEN, R.; GRESSNER, A. M. **Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction test**. *Clinica Chimica Acta*, 381: 107-113, 2007.
- GUNDERSEN, T. E.; BASTANI, N. E.; BLOMHOFF, R. **Quantitative high-throughput determination of endogenous retinoids in human plasma using triple-stage liquid chromatography/tandem mass spectrometry**. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21:1176-1186, 2007.
- GUNDERSEN, T. E. & BLOMHOFF, R. **Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples**. *Journal of Chromatography A*, 935: 13-43, 2001.
- HENDRIKS, H. F., BOSMA, A.; BROUWER, A. **Fat-storing cells: hyper- and hypovitaminosis A and the relationships with liver fibrosis**. *Seminars in Liver Disease*, 13 (1): 72-80, 1993.
- HENNION, M.C. **Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography**. *Journal of Chromatography A*, 856: 3-54, 1999.

- HONG, W. K.; LIPPMAN, S. M.; ITRI, L. M.; KARP, D. D.; LEE, J. S.; BYERS, R. M.; SCHANTZ, S. P.; KRAMER, A. M.; LOTAN, R.; PETERS, L. J. **Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck.** *The New England Journal of Medicine*, 323: 795-801, 1990.

- HUBERT, P.; CHIAP, P.; CROMMEN, J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; MERCIER, N.; BERVOAS-MARTIN, S.; CHEVALIER, P.; GRANDJEAN, D.; LAGORCE, P.; LALLIER, M.; LAPARRA, M. C.; LAURENTIE, M.; NIVET, J. C. **The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory.** *Analytica Chimica Acta*, 391: 135-148, 1999.

- HYÖTYLÄINEN, T. & RIEKKOLA, M. L. **Solid-phase extraction or liquid chromatography coupled on-line with gas chromatography in the analysis of biological samples.** *Journal of Chromatography B*, 817: 13-21, 2005.

- LIMDI, J. K. & HYDE, G. M. **Evaluation of abnormal liver function tests.** *Postgraduate Medical Journal*, 79: 307-312, 2003.

- LOERCH, J. D.; UNDERWOOD, B. A.; LEWIS, K. C. **Response of plasma levels of vitamin A to a dose of vitamin A as an indicator of hepatic vitamin A reserves in rats.** *The Journal of Nutrition*, 109 (5): 778-786, 1979.

- MAIO, R.; DICI, J. B.; BURINI, R.C. **Implicações do alcoolismo e da doença hepática crônica sobre o metabolismo de micronutrientes.** *Arquivos de Gastroenterologia*, 37 (1): 120-124, 2000.

- MANNING, D. S. & AFDHAL, N. H. **Diagnosis and quantitation of fibrosis.** *Gastroenterology*, 134: 1670-1681, 2008.

- MARILL J, CAPRON C, IDRES N, CHABOT G. **Human cytochrome P450s involved in the metabolism of 9-cis- e 13-cis-ácido retinóico.** *Biochemical Pharmacology*, 63: 933-943, 2002.

- MARILL J, CRESTEIL T, LANOTTE M, CHABOT G. **Identification of human cytochrome P450s involveds in the formation of all-*trans*-retinoic acid principal metabolites.** *Molecular Pharmacology*, 58:1341-1348, 2000.

- MCSORLEY L. & DALI, A. **Identification of human cytochrome P450 isoforms that contribute to all-*trans*-retinoic acid 4-hydroxylation.** *Biochemical Pharmacology*, 60: 517-526, 2000.

- MEYER, E.; LAMBERT, W. E.; LEENHEER, P. **Simultaneous determination of endogenous retinoic acid isomers and retinol in human plasma by Isocratic normal-phase HPLC with ultravioletdetection.** *Clinical Chemistry*, 40 (1): 48-51, 1994.

- MIYAGI, M.; YOKOYAMA, H.; SHIRAISHI, H.; MATSUMOTO, M.; ISHII, H. **Simultaneous quantification of retinol, retinal, and retinoic acid isomers by high-performance liquid chromatography with a simple gradiation.** *Journal of Chromatography B*, 757: 365-368, 2001.

- MOBARHAN, S.; RUSSELL, R. M.; UNDERWOOD, B. A.; WALLINGFORD, J.; MATHIESON, R. D.; AL-MIDANI, H. **Evaluation of the relative dose response test for vitamin A nutriture in cirrhotics.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34: 2264-2270, 1981.

- NADIN L. & MURRAY M. **Participation of CYP2C8 in retinoic acid 4-hidroxylation in human hepatic microsomes.** *Biochemical Pharmacology*, 58: 1201-1208, 1999.

- NATARAJAN, S. K.; THOMAS, S.; RAMACHANDRAN, A.; PULIMOOD, A. B.; BALASUBRAMANIAN, K. A. **Retinoid metabolism during development of liver cirrhosis.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 443: 93-100, 2005.

- NELSON, D. L. & COX, M. M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica – Capítulo 6, 4ª. Ed. São Paulo: Sarvier, 2006.**

- NEWSOME, P. N.; BELDON, I.; MOUSSA, Y.; DELAHOOKE, T. E.; POULOPOULOS, G.; HAYER, P. C.; PLEVRIS, J. N. **Low serum retinol levels**

**are associated with hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease.** *Alimentary, Pharmacology & Therapeutics*, 14: 1295-1301, 2000.

- OKUDA, H. **Hepatocellular carcinoma development in cirrhosis.** *Best Practice & Research clinical Gastroenterology*, 21 (1): 161-173, 2007.

- OKUNO, M.; MORIWAKI, H.; IMAI, S.; MUTO, Y.; KAWADA, N.; SUZUKI, Y.; KOJIMA, S. **Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF- $\beta$  in liver stellate cells.** *Hepatology*, 26: 913-921, 1997.

- OKUNO, M., SATO, T.; KITAMOTO, T.; IMAI, S.; KAWADA, N.; SUZUKI, Y.; YOSHIMURA, H.; MORIWAKI, H.; ONUKI, K.; MASUSHIGE, S.; MUTO, Y.; FRIEDMAN, S. L.; KATO, S.; KOJIMA, S. **Increased 9,13-di-cis-retinoic acid in rat hepatic fibrosis: implication for a potential link between retinoid loss and TGF-beta mediated fibrogenesis in vivo.** *Journal of Hepatology*, 30: 1073-1080, 1999.

- PASSOS, A. D. C. **Aspectos epidemiológicos das hepatites virais.** *Medicina – Ribeirão Preto*, 36: 30-36, 2003.

- PERES, W. A. F. **Relação entre o estado nutricional da vitamina A, estágios da doença e parâmetros bioquímicos de função e lesão hepática em pacientes com hepatite crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular pelo vírus da hepatite C.** Tese de Doutorado em Clínica Médica, Serviço de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

- PINZANI, M. & ROUBOUTS, K. **Liver fibrosis from bench to clinical targets.** *Digestive and Liver Disease*, 36: 231-242, 2004.

- PUGH, R. N. H.; MURRAY-LYON, I. M.; DAWSON, J. L.; PIETRONI, M. C.; WILLIAMS, R. **Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices.** *The British Journal of Surgery*, 60: 646-669, 1973.

- QUATTROCCHI, O. A.; ANDRIZZI, S. I. A.; LABA, R. F. **Introducción a la HPLC.** Ed Farro, Argentina, 1992.

- RASHED, M.S. **Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases.** *Journal of Chromatography B*, 758: 27-48, 2001.
- REEVES, H. L. & FRIEDMAN, S. **Activation of hepatic stellate cells – A key issue in liver fibrosis.** *Frontiers in Bioscience*, 7: 808-826, 2002.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** *Química Nova*, 27 (5): 771-780, 2004.
- ROCCHI, E.; BORGHINI, A.; PAOLILLO, F.; PRADELLI, M.; CASALGRANDI, G. **Carotenoids and liposoluble vitamins in liver cirrhosis.** *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 118 (2): 176-185, 1991.
- ROCCHI, E.; CASALGRANDI, G.; RONZONI, A.; ROSA, M. C.; CIONI, G.; MARAZZI, A.; MANENTI, A.; MARCHINI, S.; VENTURA, E. **Antioxidant liposoluble vitamins and carotenoids in chronic hepatitis.** *European Journal of Internal Medicine*, 12: 116-121, 2001.
- ROCHLING, F. A. **Evaluation of abnormal liver tests.** *Clinical Cornerstone* 3 (6): 1-12, 2001.
- ROCKEY, D. & FRIEDMAN, S. **Hepatic Fibrosis and Cirrhosis.** Chapter 6. Section I: Pathophysiology of the Liver. In: BOYER, T.; WRIGHT, T.; MANNS, M. *Zakim and Boyer's Hepatology*, Vol 2. New York: Elsevier, 2006.
- ROSS A. **Overview of retinoid metabolism.** *The Journal of Nutrition*, 123: 346-350, 1993.
- ROSS, A. C. & ZOLFAGHARI, R. **Regulation of hepatic retinol metabolism: perspectives from studies on vitamin A status.** *The Journal of Nutrition*, 134 (1): 269-275S, 2004.

- 
- ROOS, T. C.; JUGERT, F.K; MERK, H. F.; BICKERS, D. R. **Retinoid metabolism in the skin.** *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 50 (2): 315-333, 1998.
- RÜHL, R. **Method to determine 4-oxo-retinoic acids, retinoic acids and retinol in serum and cell extracts by liquid chromatography/diode-array detection atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20: 2497-2504, 2006.
- RÜHL, R & SCHWEIGERT, F. J. **Automated solid-phase extraction and liquid chromatographic method for retinoid determination in biological samples.** *Journal of Chromatography B*, 798: 309-316, 2003
- SCHRIEFER, A & CARVALHO, E. M. **Biomarcadores em medicina.** *Gazeta Médica da Bahia*, 78 (1): 47-51, 2008.
- SCHUPPAN, D. & AFDHAL, N. **Liver cirrhosis.** *Lancet*, 371: 838-851, 2008.
- SENNO, H. **Structure and function of hepatic stellate cells.** *Medical Electron Microscopy*, 37:3-15, 2004.
- SHIOTA G.; TSUCHIYA H.; HOSHIKAWA Y. **The liver as a target organ of retinoids.** *Hepatology Research*, 36: 248-254, 2006.
- SILVA, J. & BARBOSA, C. M. **Aplicações dos retinóides em cosmetologia.** *Cosmetics & Toiletries*, 20: 50-54, 2008.
- TALWAR, D.; HA, T. K. K.; COONEY, J.; BROWNLEE, C.; REILLY, D. **A routine method for the simultaneous measurement of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and five carotenoids in human plasma by reverse phase HPLC.** *Clinica Chimica Acta*, 270: 85-100, 1998.
- TZIMAS, G. & NAU, H. **The role of metabolism and toxicokinetics in retinoid teratogenesis.** *Current Pharmaceutical Design*, 7: 803-831, 2001.

- VALKOVA, M. **Hepatic fibrogenesis**. *Bratisl Lek Listy*, 103 (2): 76-85, 2002.
- VAN BREEMEN, R. B.; NIKOLIC, D.; XU, X.; XIONG, Y.; VAN LIESHOUT, M.; WEST, C. E.; SCHILLING, A. B. **Development of a method for quantification of retinol and retinyl palmitate in human serum using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry**. *Journal of Chromatography A*, 794: 245-251, 1998.
- WANG, Y.; CHANG, W. Y.; PRINS, G. S.; VAN BREEMEN, R. B. **Simultaneous determination of all-trans, 9-cis retinoic acid and retinol in rat prostate using liquid chromatography-mass spectrometry**. *Journal of Mass Spectrometry*, 36: 882-888, 2001.
- WINGERATH, T.; KIRSCH, D.; SPENGLER, B.; STAHL, W. **Analysis of cyclic and acyclic analogs of retinol, retinoic acid, and retinal by laser desorption ionization-, matrix- assisted laser desorption ionization-mass spectrometry, and UV/Vis Spectroscopy**. *Analytical Biochemistry*, 272: 232-242, 1999.
- WYSS, R. **Chromatography of retinoids**. *Journal of Chromatography*, 531: 481-508, 1990.
- WYSS, R. **Chromatographic and eletrophoretic analysis of biomedically important retinoids**. *Journal of Chromatography B*, 671: 381-425, 1995.
- YADAV, D.; HERTAN, H. I.; SCHWEITZER, P.; NORKUS, E. P.; PITCHUMONI, C. S. **Serum and liver micronutrient antioxidants and serum oxidative stress in patients with chronic hepatitis C**. *The American Journal of Gastroenterology*, 97 (10): 2634-2639, 2002.
- YAMANE, M.; TANAKA, Y.; MARUMO, F.; SATO, C. **Role of hepatic vitamin A and lipocyte distribution in experimental hepatic fibrosis**. *Liver*, 13: 282-287, 1993.
- ZHANG, Q.; DUNBAR, D.; KAMINSKY, L. **Human cytochrome P-450 metabolism of retinals to retinoic acids**. *Drug Metabolism and Disposition*, 28: 292-297, 1999.