



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE PTERINAS POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRO DE MASSAS DE
ALTA RESOLUÇÃO PARA DIAGNÓSTICO DE FENILCETONÚRIA ATÍPICA

JULIANA DE LIMA CASTRO

RIO DE JANEIRO
2016

JULIANA DE LIMA CASTRO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE PTERINAS POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRO DE MASSAS DE
ALTA RESOLUÇÃO PARA DIAGNÓSTICO DE FENILCETONÚRIA ATÍPICA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas.

Orientadora: Fernanda Bertão Scalco

Rio de Janeiro

2016

“Uma pessoa só pode receber o que lhe é dado dos céus.”

João 3:27b

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele a glória para todo o sempre.

Aos meus pais Julio e Leonete, por cultivarem em mim, desde o princípio, o sonho de chegar aonde eu cheguei e não medirem esforços para segurar a minha mão e me trazer até a realização dele. Obrigada mãe e pai.

Ao meu marido Luiz, por ser a minha força, a minha esperança e tudo o que eu precisei na hora em que eu precisei. Obrigada por me suportar, no sentido mais completo da palavra.

À minha vó, aos tios e tias, primos e primas por me perdoarem por estar um pouco ausente durante esse tempo. E por todo carinho e palavra de incentivo quando as coisas estavam realmente difíceis.

Aos que eu chamo de irmãos, Érica, Diogo, Leonardo e Vanessa por torcerem e me apoiarem sempre, mesmo à distância. Vocês são muito importantes em tudo que eu construí. À Livia, Carol, Evelyn e Nathália, por não só estudarmos juntas, mas também sonharmos juntas e marcarmos umas as outras. Obrigada por fazerem parte disso tudo.

À minha orientadora Fernanda por todo conhecimento somado à minha formação.

Ao estimado professor Henrique, por acreditar no meu potencial. Obrigada por estar presente durante toda primeira etapa da minha jornada acadêmica.

Ao Vinícius e à Amanda, por ajudarem a construir o meu conhecimento técnico. As coisas seriam muito difíceis sem vocês. Eu reconheço e agradeço o empenho em me ensinar e a amizade desenvolvida ao longo desse processo.

Aos meus amigos de trabalho Mariani, Karina, William, Sabrina, Rachel, Márcia e Patrícia Davies que representam todos os companheiros do LBCD que estão comigo todo dia, na alegria e na tristeza. À Angela e ao Júlio, pela contribuição na reta final e pela atenção de sempre. Obrigada a todos.

À equipe 16, em especial a Nina, por me ajudar e desejar que essa jornada chegasse ao final com sucesso.

A todos que direta e indiretamente contribuíram não só para minha formação acadêmica como pessoal, o meu sincero agradecimento.

RESUMO

PROJETO DE CURSO

TÍTULO: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE PTERINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO PARA DIAGNÓSTICO DE FENILCETONÚRIA ATÍPICA

ALUNO: Juliana de Lima Castro

ORIENTADOR: Fernanda Bertão Scalco, DBQ – Instituto de Química, UFRJ

Pterinas são substâncias de ocorrência natural, estruturalmente relacionadas ao grupo das pteridinas. Elas podem existir nas formas conjugada e não conjugada. Dentre as pterinas não conjugadas mais importantes está a tetraidrobiopterina (BH_4), que é um cofator essencial na função catalítica de várias enzimas como a fenilalanina hidroxilase (PAH). Uma das aplicações da detecção de pterinas em fluidos biológicos é o diagnóstico de fenilcetonúria (PKU) atípica, um erro inato de metabolismo por deficiência de BH_4 , que causa progressivamente retardo mental grave, convulsões, retardo psicomotor, comportamento agressivo, entre outros sintomas. Quatro tipos de PKUs atípicas são conhecidas por defeitos na biossíntese ou regeneração do BH_4 : deficiências de guanosina trifosfato cicloidrolase I (GTPCH I), de piruvil-tetraidropterina sintase (PTPS), deficiência de diidropteridina redutase (DHPR) e da pterina 4- α -carbinolamina desidratase (PCD). No metabolismo de BH_4 podem ser formados 7-biopterina, 7-neopterina, 6-biopterina, 6-neopterina, além de pterina e isoxantopterina. Neste trabalho foi desenvolvido um método analítico baseado na técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução focado na caracterização dos metabólitos de BH_4 para diagnóstico de PKU atípica. Após os ensaios de otimização da cromatografia e do modo de varredura de íons de espectrômetro de massas conclui-se que uma coluna de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), com partículas de diâmetro de 1,9 μm , foi a mais adequada para separar os isômeros 6-biopterina e 7-biopterina, e o modo de varredura de íons selecionados foi necessário para aumentar a sensibilidade do método e promover a detecção de isoxantopterina, que está em baixa concentração na urina. Com isso, a varredura de íons totais, importante para investigação de possíveis novos metabólitos de BH_4 , foi realizada simultaneamente à varredura de íons selecionados. O método proposto foi validado para os analitos 6-biopterina, pterina, isoxantopterina, 7-biopterina e 7-neopterina e mostrou boa linearidade, seletividade e repetitividade, entre outros parâmetros avaliados. Os resultados mostraram que para manter as concentrações dos metabólitos de BH_4 estáveis por longos períodos as amostras precisam ser submetidas a prévia oxidação antes de serem estocadas. Além da validação e estabilidade, foi estimado o intervalo de referência das pterinas para uma população saudável de 0 a 17 anos. O método desenvolvido se mostrou eficiente para a detecção dos marcadores do metabolismo de BH_4 e, conseqüentemente, para aplicação no diagnóstico de fenilcetonúria atípica.

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas dos compostos pteridínicos com o heterociclo comum destacado.....	10
Figura 2. Biotransformações que requerem tetraidrobiopterina (BH ₄) como cofator das enzimas principais: fenilalanina hidroxilase (PAH), tirosina hidroxilase (TRH) e triptofanohidroxilase (TPH).....	12
Figura 3. Estruturas químicas da tetraidrobiopterina e seus metabólitos.	13
Figura 4. Reação de conversão da fenilalanina em tirosina e os derivados secundários do metabolismo da fenilalanina.....	15
Figura 5. Esquema indicativo das mudanças nas concentrações urinárias dos metabólitos de BH ₄ e seus respectivos defeitos enzimáticos correspondentes. 6-neopterina (6-neo), 6-biopterina (6-bio) e 7-biopterina (7-bio).....	16
Figura 6. Cromatograma obtido pela análise de 6-biopterina e 7-biopterina com a coluna cromatográfica Zorbax C18.	24
Figura 7. Cromatograma obtido pela análise de 6-biopterina e 7-biopterina com a coluna cromatográfica Luna NH ₂	25
Figura 8. Cromatograma obtido pela análise de uma mistura padrão de pterinas em 50 ng/mL com a coluna cromatográfica Hypersil GOLD Amino.	27
Figura 9. Cromatograma obtido pela análise de uma mistura padrão de pterinas em 50 ng/mL com a coluna cromatográfica Hypersil GOLD Amino utilizando o método final.....	28
Figura 10. Comparação dos resultados obtidos a partir da análise de urina de indivíduo sadio utilizando o modo de varredura total de íons somente (A) e utilizando o modo de varredura de íons selecionados concomitantemente ao de varredura total de íons (B).....	29
Figura 11. Histogramas da concentração de pterinas em urinas de indivíduos sadios. Distribuição não normal. (A) 6-biopterina; (B) Pterina; (C) Isoxantopterina; (D) 6-neopterina.	33
Figura 12. Histogramas da concentração de pterinas em urinas de indivíduos sadios após transformação logarítmica. Distribuição normal. (A) 6-biopterina; (B) Pterina; (C) Isoxantopterina; (D) 6-neopterina.....	34
Figura 13. Resultados gráficos da avaliação da estabilidade da amostra de urina congelada a -20 °C.....	36

Lista de Tabelas

Tabela 1. Massas exatas do padrão interno e dos analitos.	22
Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas na coluna Zorbax C18, onde A é água e B é metanol. Volume de injeção = 10 µL.	23
Tabela 3. Condições cromatográficas utilizadas na coluna Luna NH2, onde A é água e B é acetonitrila. Volume de injeção = 3 µL.	24
Tabela 4. Condições cromatográficas utilizadas na coluna Hypersil GOLD Amino, onde A é água e B é acetonitrila. Volume de injeção = 3 µL.	26
Tabela 5. Condições cromatográficas finais utilizadas na coluna Hypersil GOLD Amino, onde A é água e B é acetonitrila. Volume de injeção = 3 µL.	27
Tabela 6. Resultados dos parâmetros avaliados na pré-validação do método de análise de pterinas em água MilliQ.	30
Tabela 7. Valores da concentração de pterinas em urinas de indivíduos sadios encontrados no presente trabalho e comparados com os publicados na literatura. ...	32

Lista de abreviações e siglas

BH₄ – (6R)-5,6,7,8-tetraidrobiopterina

6biopt – 6-biopterina

7biopt – 7-biopterina

6neopt – 6-neopterina

7neopt – 7-neopterina

Ixpt – Isoxantopterina

Pt – Pterina

6,7-DMPT- 6,7-dimetilpterina

PAH – Fenilalanina hidroxilase

TRH – Tirosina hidroxilase

TPH – Triptofano hidroxilase

PKU – Fenilcetonúria

GTPCHI – Guanosina trisfosfato cicloidrolase I

PTPS – piruvoil-tetraidropterina sintase

DHRP – diidropteridina redutase

PCD – pterina-4- α -carbinolamina desidratase

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CLUE – Cromatografia líquida de ultra eficiência

EMAR – Espectrometria de massas de alta resolução

DF – Detector por fluorescência

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	Pterinas e tetraidrobiopterina.....	10
1.2	Métodos de detecção de pterinas.....	13
1.3	Fenilcetonúria atípica	14
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
3	EXPERIMENTAL	19
3.1	Preparo das soluções	19
3.2	Preparo de amostra	19
3.3	Pré-validação.....	19
3.3.1	Repetitividade	19
3.3.2	Limite de detecção	20
3.3.3	Arraste.....	20
3.3.4	Linearidade	20
3.3.5	Seletividade/Especificidade.....	20
3.4	Preparo de amostra de indivíduo sadio	21
3.5	Análise de urina e valores típicos em indivíduos sadios.....	21
3.6	Estudo da estabilidade da urina	21
3.7	Condições instrumentais	21
3.8	Análise estatística.....	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	Otimização do método instrumental	23
4.1.1	Cromatografia	23
4.1.2	Espectrometria de massas.....	28
4.2	Pré-validação.....	30
4.3	Análise de urina e valores típicos em indivíduos sadios.....	30
4.4	Estabilidade da urina	35
5	CONCLUSÕES.....	38
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pterinas e tetraidrobiopterina

Pterinas são substâncias de ocorrência natural, estruturalmente relacionada ao grupo das pteridinas, apresentando como características principais o grupamento 2-amino-4-oxo e um heterociclo comum, o pirazino-[2,3D]-pirimidina (BLAU e THÖNY, 2008). Suas estruturas podem ser vistas na Figura 1.

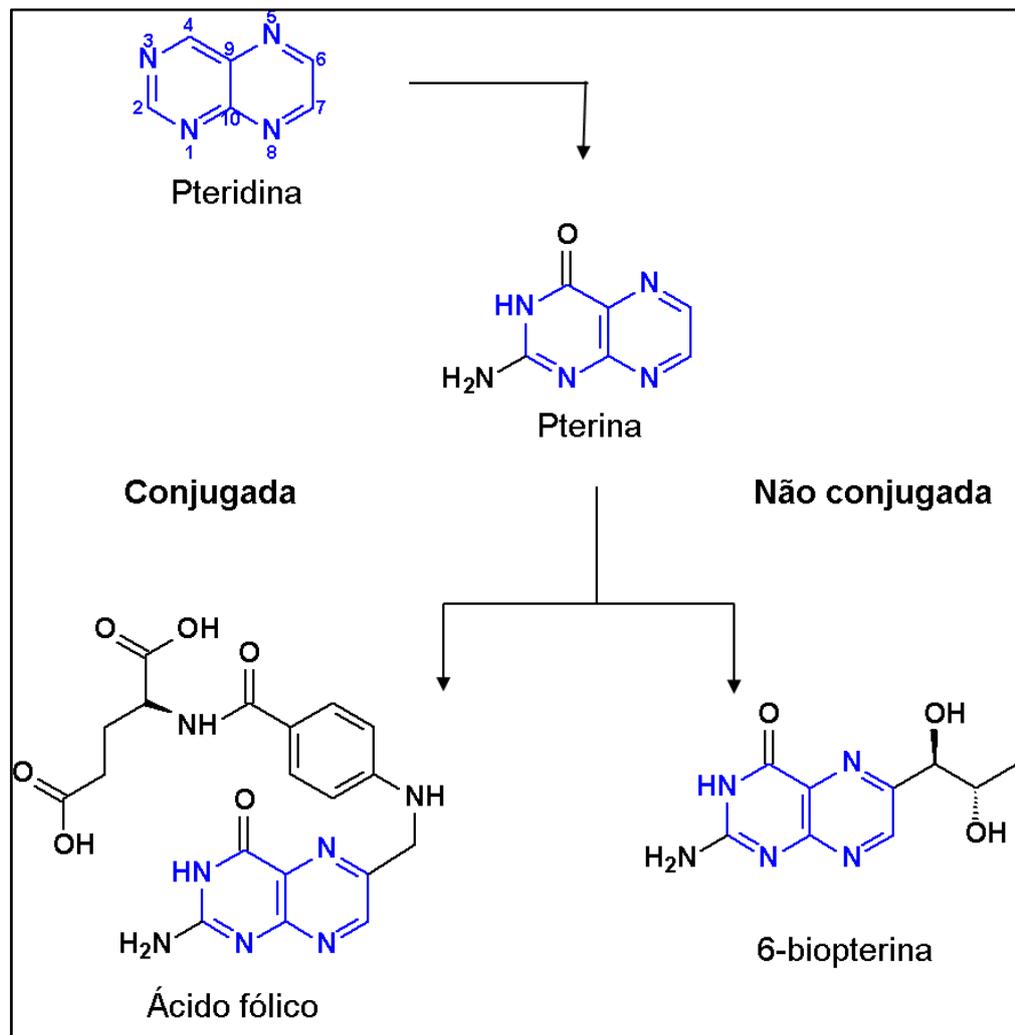


Figura 1. Estruturas dos compostos pteridínicos com o heterociclo comum destacado.

Essas moléculas podem ser classificadas em dois grandes grupos: as pterinas conjugadas, com cadeias laterais complexas (ácido fólico e derivados); e as não conjugadas, com cadeias laterais alifáticas na posição 6 ou 7 do anel principal da pterina. As pterinas desempenham função bioquímica importante na biossíntese de vitaminas e cofatores em diversos organismos. Um destes cofatores é o (6R)-5,6,7,8-tetraidrobiopterina (BH_4). A BH_4 tem sido reconhecida como a mais importante pterina não conjugada em humanos (KOSLINSKI *et. al.*, 2014) pois é essencial na função catalítica das enzimas fenilalanina hidroxilase (PAH) - responsável pela transformação de fenilalanina em tirosina; tirosina hidroxilase - responsável pela transformação de tirosina em dopamina e triptofano hidroxilase - responsável pela transformação de triptofano a 5-OH-triptofano, precursor da serotonina. A Figura 2 mostra as reações dependentes de BH_4 .

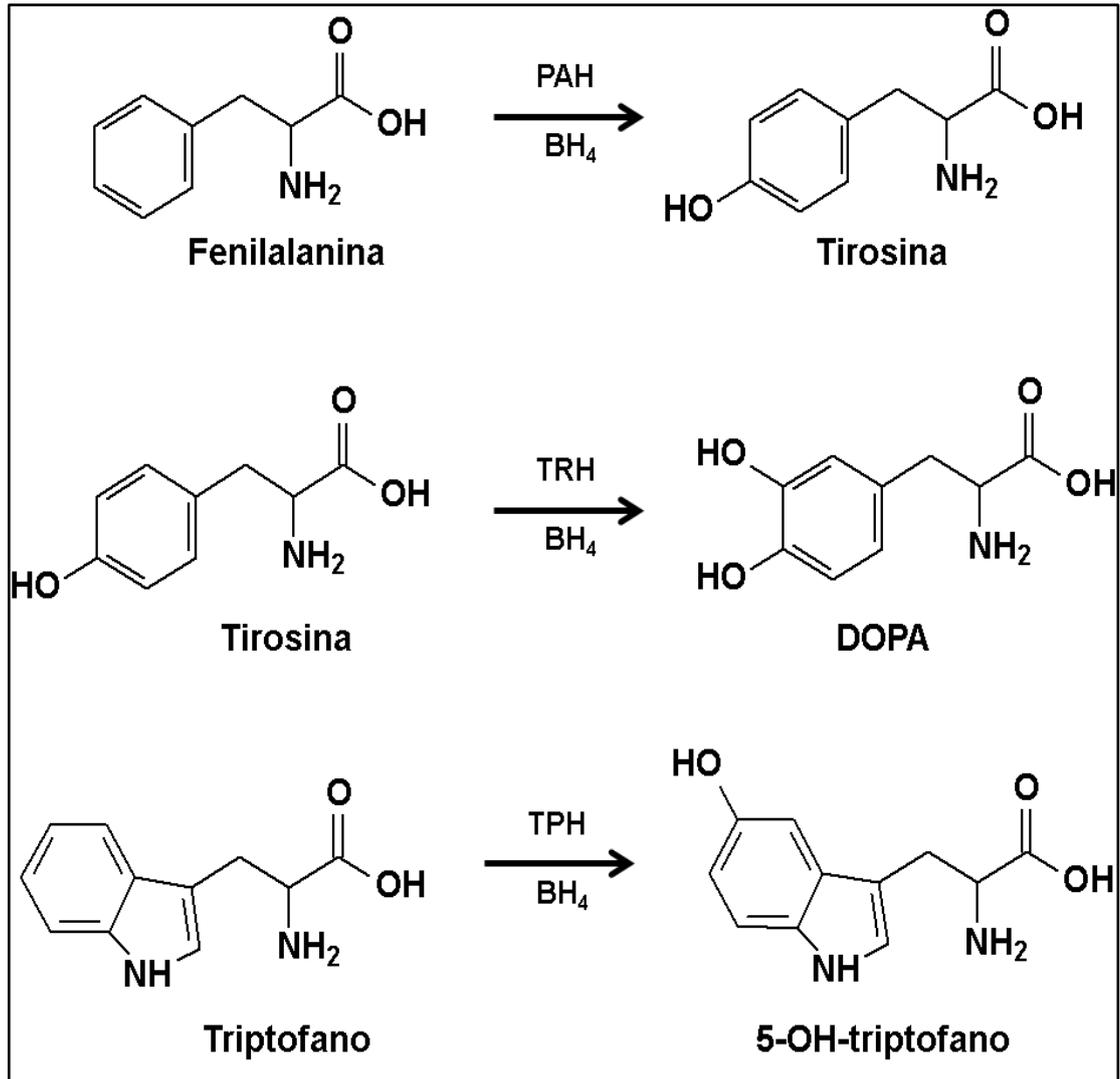


Figura 2. Biotransformações que requerem tetraidrobiopterina (BH_4) como cofator das enzimas principais: fenilalanina hidroxilase (PAH), tirosina hidroxilase (TRH) e triptofanhidroxilase (TPH).

As pterinas podem existir em diferentes estados de oxidação, porém somente o BH_4 , que é a forma completamente reduzida da molécula, é biologicamente ativo (BLAU e THONY, 2008). Os principais metabólitos de BH_4 são representados por outras pterinas não conjugadas como 6-biopterina, 7-biopterina, 6-neopterina, 7-neopterina, pterina e isoxantopterina, que também são produtos da oxidação de BH_4 . A Figura 3 mostra as estruturas químicas dos metabólitos de BH_4 .

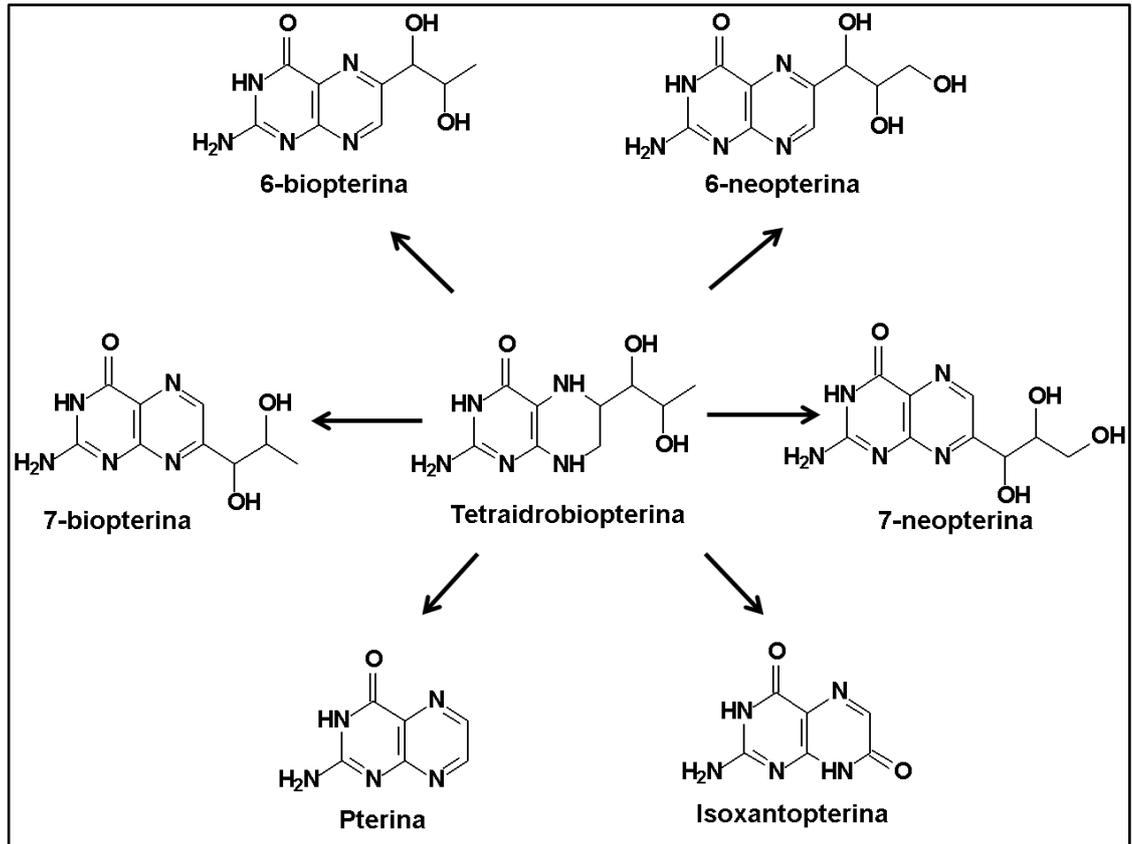


Figura 3. Estruturas químicas da tetraidrobiopterina e seus metabólitos.

1.2 Métodos de detecção de pterinas

Atualmente, os poucos métodos descritos para detecção e quantificação de pterinas utilizam principalmente cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção por fluorescência (CLAE-DF), sendo o de Fukushima, Stea e Niederwieser os mais adotados com adaptações ao longo dos anos (FUKUSHIMA e NIXON, 1980; STEA *et. al.*, 1980; NIEDERWIESER *et. al.*, 1984). Pterinas estão presentes em fluidos biológicos na sua forma mais reduzida, como tetraidrobiopterina, e por isso precisam ser oxidadas a espécies que sejam fluorescentes.

O método proposto para o presente trabalho está baseado na cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CLUE-EMAR). As partículas pequenas das colunas de CLUE tendem a permitir trocas do soluto na fase móvel e na fase estacionária mais rapidamente devido a menor profundidade dos poros das partículas (COLLINS *et. al.*, 2006). Assim, o soluto gasta um tempo menor entre a fase

móvel e a fase estacionária, eluindo em picos mais estreitos do que na CLAE. Com isso, a análise tem aumento de resolução e eficiência de separação, sendo então uma vantagem em relação aos métodos descritos na literatura. Já o espectrômetro de massas de alta resolução tem como característica importante a capacidade de resolver razões m/z com precisão até a terceira casa decimal. Isso significa que as substâncias podem ser investigadas a partir da sua massa exata, aumentando a seletividade da análise em comparação aos métodos que utilizam detecção por fluorescência.

1.3 Fenilcetonúria atípica

Uma das aplicações da detecção de pterinas em fluidos biológicos é para diagnóstico de fenilcetonúria atípica. A fenilcetonúria atípica é um erro inato de metabolismo decorrente de defeitos na síntese ou na regeneração do BH_4 (KAUFMAN et al., 1975). Observa-se que indivíduos com esta doença apresentam elevados níveis do aminoácido fenilalanina (hiperfenilalaninemia) e dos seus derivados, fenilpiruvato, fenilacetato e fenilactato (Figura 4), na urina e no sangue. Quando acumuladas no organismo, estas substâncias causam progressivamente retardo mental grave, além de convulsões, retardo psicomotor, comportamento agressivo, entre outros sintomas (CENTERWALL e CENTERWALL, 2000).

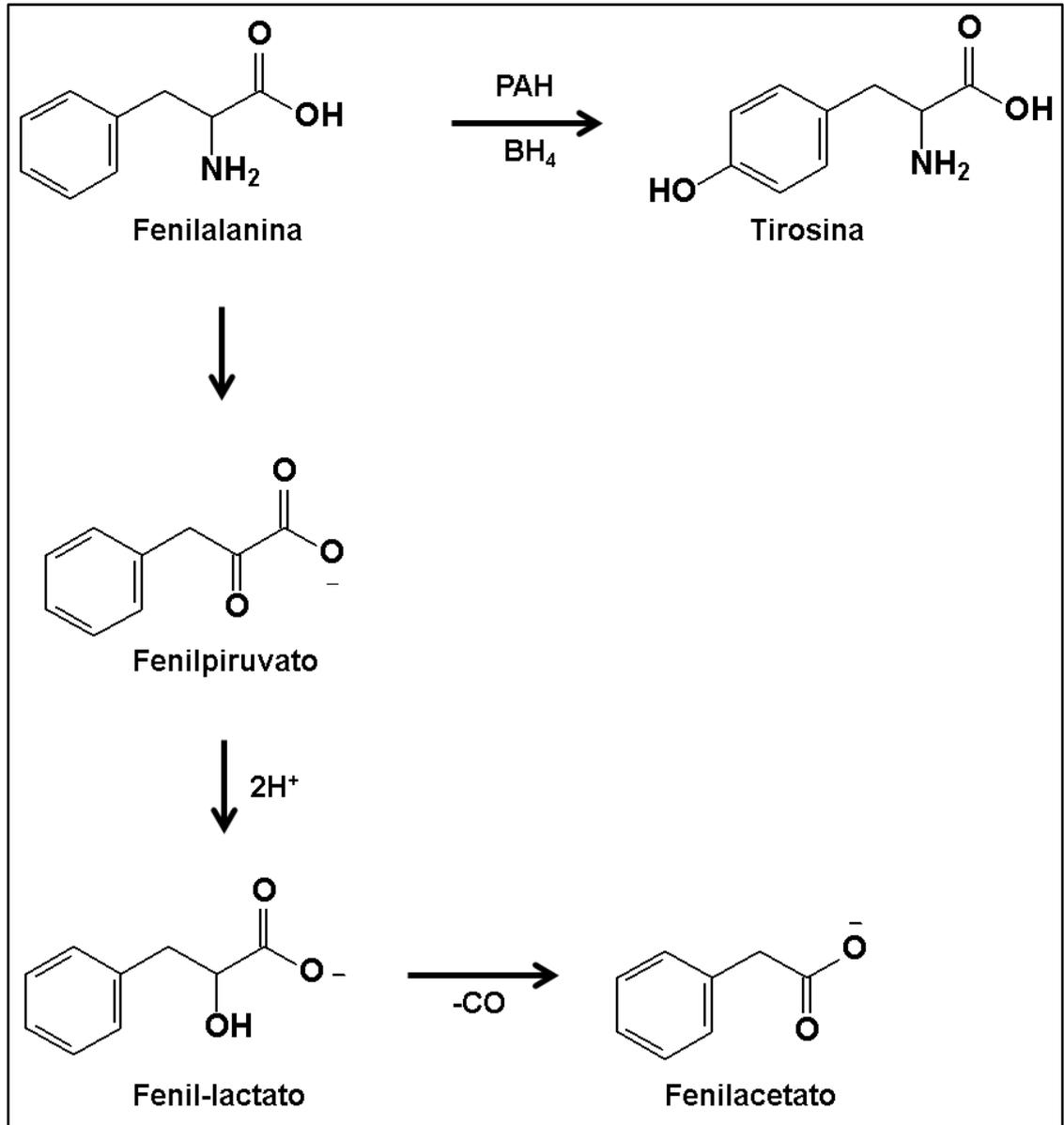


Figura 4. Reação de conversão da fenilalanina em tirosina e os derivados secundários do metabolismo da fenilalanina.

O diagnóstico da fenilcetonúria atípica é feito através da análise de pterinas em urina, já que são os marcadores urinários do metabolismo de BH₄ e o aumento e/ou a diminuição da concentração desses analitos na urina indicam qual defeito enzimático pode estar ocorrendo em sua rota metabólica. Atualmente são conhecidos quatro defeitos no metabolismo de BH₄, que envolvem as enzimas responsáveis pela biossíntese ou pela degradação do cofator. Os defeitos na biossíntese de BH₄ incluem as deficiências na enzima guanossina trifosfato ciclohidrolase I (GTPCH I) e na enzima piruvil-tetraidropterina sintase (PTPS). Já os defeitos na regeneração incluem as deficiências nas enzimas diidropteridina redutase (DHPR) e da pterina 4- α -

carbinolamina desidratase (PCD) (BLAU *et. al.*, 1989). A Figura 5 mostra um esquema de como as concentrações dos marcadores estão relacionados com as classificações de fenilcetonúria atípica.

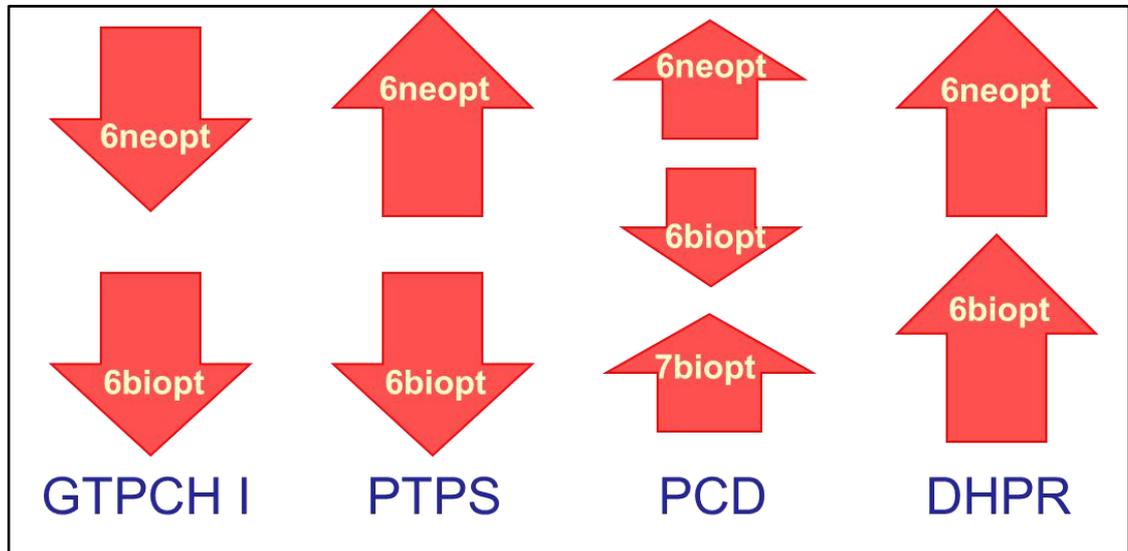


Figura 5. Esquema indicativo das mudanças nas concentrações urinárias dos metabólitos de BH₄ e seus respectivos defeitos enzimáticos correspondentes. 6-neopterin (6neopt), 6-biopterina (6biopt) e 7-biopterina (7biopt).

Quando o resultado da análise de pterinas apresenta uma diminuição na concentração de 6-biopterina e diminuição também de 6-neopterin, isso indica um defeito na enzima GTPCH I. Já quando há diminuição de 6-biopterina, mas um aumento em 6-neopterin, tem-se uma falha na enzima PTPS. O que diferencia o defeito na enzima PTPS da enzima PCD é o aumento ou aparecimento do sinal de 7-biopterina. E por fim, o aumento de concentração tanto de 6-neopterin quanto de 6-biopterina caracteriza a falha na enzima DHPR.

A fenilcetonúria atípica apresenta os mesmos sintomas neurológicos da sua variante fenilcetonúria clássica, porém com causas diferentes. Enquanto a fenilcetonúria clássica é causada por um defeito na enzima PAH, a fenilcetonúria atípica se apresenta como um defeito no metabolismo de BH₄, que por sua vez é o cofator da PAH. O tratamento de fenilcetonúria atípica consiste na administração de BH₄, 5-hidroxitriptofano, L-Dopa e inibidor de Dopa descarboxilase, simultaneamente, diferentemente da fenilcetonúria clássica que é tratada apenas com dieta de baixa ingestão de fenilalanina (DE MIRA e MARQUEZ, 2000). Com isso, é imprescindível o diagnóstico correto

da variante de fenilcetonúria para direcionamento do tratamento, através da análise do perfil de pterinas na urina do paciente. O tratamento inadequado não melhora os efeitos neurológicos da doença, pois não corrige a deficiência dos neurotransmissores dopamina e serotonina no sistema nervoso central do indivíduo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método de detecção de pterina em urina utilizando o sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (CLUE-EMAR) para diagnóstico de fenilcetonúria atípica.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver método de dosagem de pterinas em urina humana através da análise por injeção direta após diluição (abordagem *dilute and shoot*) utilizando o sistema CLUE-EMAR;
- Pré-validar a metodologia desenvolvida para fins de análise quantitativa de pterinas;
- Analisar por CLUE-EMAR amostras de indivíduos sadios visando estimar valores de referência de pterinas em urina;
- Avaliar a estabilidade das amostras de urina;

3 EXPERIMENTAL

3.1 Preparo das soluções

As soluções padrão de estoque foram preparadas em metanol na concentração de 100 µg/mL para todos os analitos, exceto isoxantopterina cuja concentração foi 50 µg/mL. Antes de ajustar o volume no balão volumétrico foram adicionadas, em cada solução, três gotas de HCl 6M e as soluções foram sonicadas por 15 minutos para completa dissolução dos padrões. A solução de trabalho com todos os analitos foi preparada na concentração de 5 µg/mL a partir da diluição apropriada em metanol. Todas as soluções foram estocadas a -20 °C.

3.2 Preparo de amostra

Uma alíquota de 500 µL de água ultrapura (MilliQ) foi fortificada com 6-biopterina, 7-biopterina, pterina, 6-neopterinina, 7-neopterinina e isoxantopterina na concentração de 200 ng/mL. Foram adicionados 20 µL de HCl 6M e 10 mg de MnO₂. A amostra foi agitada em vórtex rapidamente e em agitador orbital por 5 minutos. Em seguida, centrifugou-se a amostra a 13000 rpm por 20 minutos. Retirou-se uma alíquota de 20 µL do sobrenadante, com o cuidado de não coletar MnO₂, e diluiu-se em 80 µL de solução de acetonitrila/água (90:10; v:v). Logo em seguida, a amostra foi injetada no sistema CLUE-EMAR.

3.3 Pré-validação

3.3.1 Repetitividade

Analisaram-se sete replicatas de água fortificada com a mistura de padrões de pterinas a 200 ng/mL. A precisão do método foi calculada

analisando-se a dispersão entre as replicatas, considerando a razão entre as áreas do íon do analito e padrão interno

3.3.2 Limite de detecção

Duas amostras fortificadas com 10% e 50% da concentração de trabalho foram analisadas. O limite de detecção foi estimado como a concentração em que se observa a presença do pico com relação sinal/ruído maior ou igual a 3.

3.3.3 Arraste

Para o estudo do arraste injetou-se um controle fortificado na concentração de 400 ng/mL entre duas amostras brancas. O arraste foi avaliado pela ausência de picos correspondentes ao analito na segunda amostra branca.

3.3.4 Linearidade

Para a avaliação da linearidade do método foram analisadas 4 níveis de concentrações de 100 ng/mL, 200 ng/mL, 300 ng/mL e 400 ng/mL. Através de ajuste linear feito pelo programa Excel, avaliou-se se, na faixa de concentração proposta, o sinal analítico varia linearmente com a concentração.

3.3.5 Seletividade/Especificidade

Para o estudo da seletividade/especificidade do método foram analisados os espectros de massa dos analitos fortificados em água e os analitos em matriz. Dessa forma, foi verificada a ausência de substâncias interferentes nos tempos de retenção do analito e do padrão interno.

3.4 Preparo de amostra de indivíduo sadio

A uma alíquota de 500 μL de urina foram adicionados 20 μL de HCl 6M e 10 mg de MnO_2 . A amostra foi agitada em vórtex rapidamente e em agitador orbital por 5 minutos. Em seguida, centrifugou-se a amostra a 13000 rpm por 20 minutos. Retirou-se uma alíquota de 20 μL do sobrenadante, com o cuidado de não coletar MnO_2 , e diluiu-se em 80 μL de solução de acetonitrila/água (90:10; v:v). Injetou-se no sistema CLUE-EMAR.

3.5 Análise de urina e valores típicos em indivíduos sadios

Trinta amostras de urinas de indivíduos sadios diferentes de 0 a 17 anos, sendo 23 amostras de crianças menores que 3 anos e 7 amostras maiores de 3 anos, foram preparadas como descrito no item 3.4 e analisadas por CLUE-EMAR, a fim de se estimar o valor típico da concentração de pterinas nessa população. A unidade de concentração de pterinas em urina foi expressa em $\mu\text{mol/mol}$ de creatinina para ajustar o valor absoluto em função da diluição da urina coletada.

3.6 Estudo da estabilidade da urina

Uma amostra de urina de indivíduo sadio foi coletada e dividida em 4 alíquotas. A primeira alíquota foi analisada no dia da coleta. As demais foram congeladas e analisadas 48 horas, 7 dias e 10 dias após a coleta.

3.7 Condições instrumentais

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido acoplado à um detector de massas. O cromatógrafo foi um Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) usando a coluna analítica Hypersil GOLD Amino 2.1 mm x 150 mm D.I. e 1.9 μm de diâmetro de partícula (Thermo Scientific), com fase estacionária amino; temperatura da coluna 40 $^{\circ}\text{C}$; fase móvel A água

com 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de acetato de amônio e fase móvel B acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. O padrão interno utilizado na análise foi 6,7-dimetilpterina.

O espectrômetro de massas utilizado foi um Q-Exactive (Thermo Scientific). A medida de precisão (<5 ppm) foi garantida após a calibração com uma solução do kit de calibração fornecida pelo fabricante (contendo cafeína, MRFA e UltraMark). O abastecimento de gás nitrogênio é feito por um gerador (gerador de N₂, Peak Scientific) O fluxo do “sheath gas” e do “auxiliary gas” foram setados em 30 e 10 (unidades arbitrárias), respectivamente. A temperatura do capilar foi 350 °C, a voltagem do spray foi 3.10 kV no modo de ionização positivo. O instrumento operou em modo de aquisição total de íons de *m/z* 100 a 300 com resolução de 70000 e no modo de aquisição de íons selecionados, cujas massas exatas são apresentadas na Tabela 1. O controle de ganho automático (AGC) foi 10⁶.

Tabela 1. Massas exatas do padrão interno e dos analitos.

	Massa exata
6,7-Dimetilpterina	192,08799
Pterina	164,05056
Isoxantopterina	180,05160
6-biopterina	238,09347
7-biopterina	238,09347
6-neopterina	254,08838
7-neopterina	254,08838

3.8 Análise estatística

Para tratamento dos dados experimentais foi utilizado o programa MedCalc.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do método instrumental

4.1.1 Cromatografia

O primeiro desafio no desenvolvimento do método para detecção de pterinas em urina foi a escolha da coluna cromatográfica, que principalmente, separasse os isômeros 6-biopterina e 7-biopterina. Com essa intenção, testou-se inicialmente uma coluna Zorbax SB-C18 (2,1 x 50mm x 1,8 μ m, Agilent) com água como fase móvel A e metanol com fase móvel B. As condições cromatográficas estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas na coluna Zorbax C18, onde A é água e B é metanol. Volume de injeção = 10 μ L.

Tempo (min)	%A	%B	Fluxo (μ L/min)
0.00	97	3	600
1.00	97	3	600
4.00	90	10	600
8.00	90	10	600
10.00	30	70	600
12.00	97	3	600
12.50	97	3	600

Com essas condições observou-se que não houve separação entre os isômeros e a interação dos analitos com a fase estacionária também foi pequena, fazendo com que eles eluíssem juntos, logo no início da corrida. Esse resultado foi observado devido a natureza estrutural das moléculas de pterinas. Como são moléculas polares, elas interagiram pouco com a fase estacionária de caráter menos polar. O cromatograma obtido pela análise feita com a coluna Zorbax C18 é apresentado na Figura 6.

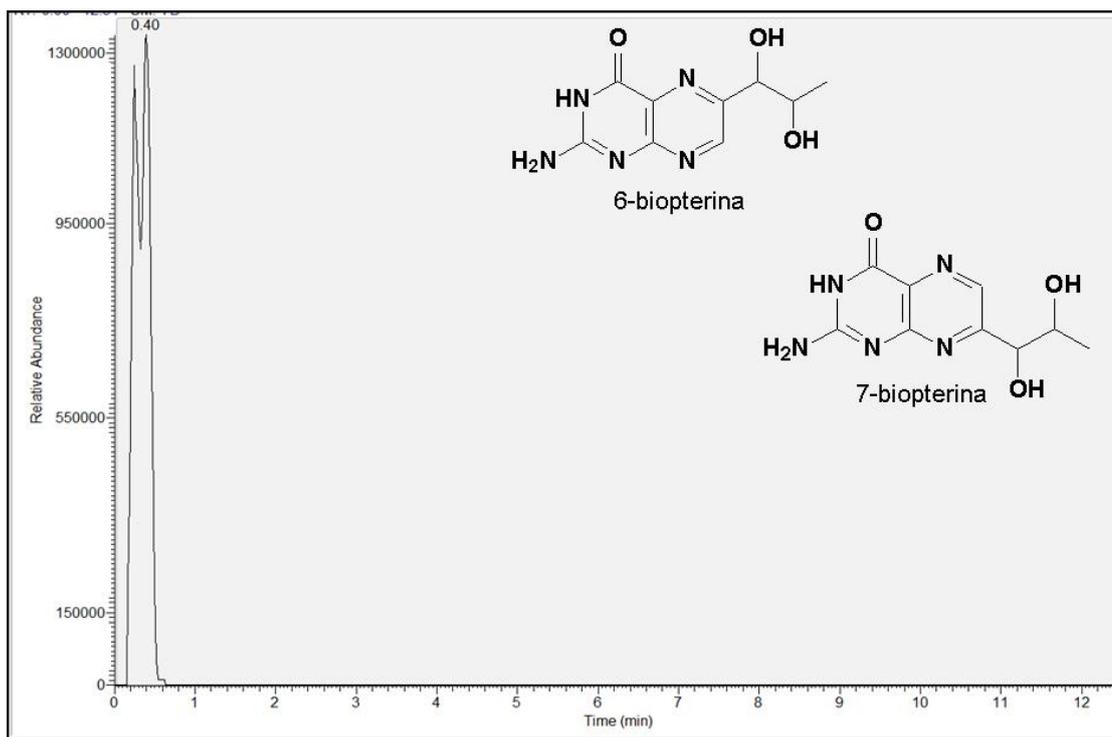


Figura 6. Cromatograma obtido pela análise de 6-biopterina e 7-biopterina com a coluna cromatográfica Zorbax C18.

Allegri *et. al.* (2012) utilizaram uma coluna cromatográfica com fase estacionária amino. Por ser mais polar que a C₁₈, ela tende a reter mais as pterinas e favorecer a separação cromatográfica entre elas. Com isso, testou-se a coluna analítica Luna NH₂ (2 mm x 150 mm x 3µm, Phenomenex), com as condições de gradiente de solvente mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições cromatográficas utilizadas na coluna Luna NH₂, onde A é água e B é acetonitrila. Volume de injeção = 3 µL.

Tempo (min)	%A	%B	Fluxo (µL/min)
0.00	5	95	400
1.00	5	95	400
19.00	30	70	400
20.00	30	70	400
23.00	60	40	400
24.00	80	20	400
27.00	5	95	400
30.00	5	95	400

Para utilização da coluna amino observou-se que o solvente acetonitrila foi melhor que metanol e que era necessário somente 3µL de volume de

amostra injetada para se obter a separação dos isômeros 6-biopterina e 7-biopterina. Embora essa condição tenha acrescentado 17,5 minutos à corrida, em relação a anterior, foi possível aumentar a interação dos analitos com a fase estacionária e separar dois isômeros de posição, além de diminuir o volume de injeção de amostra. A Figura 7 mostra o cromatograma obtido da análise de 6-biopterina e 7-biopterina.

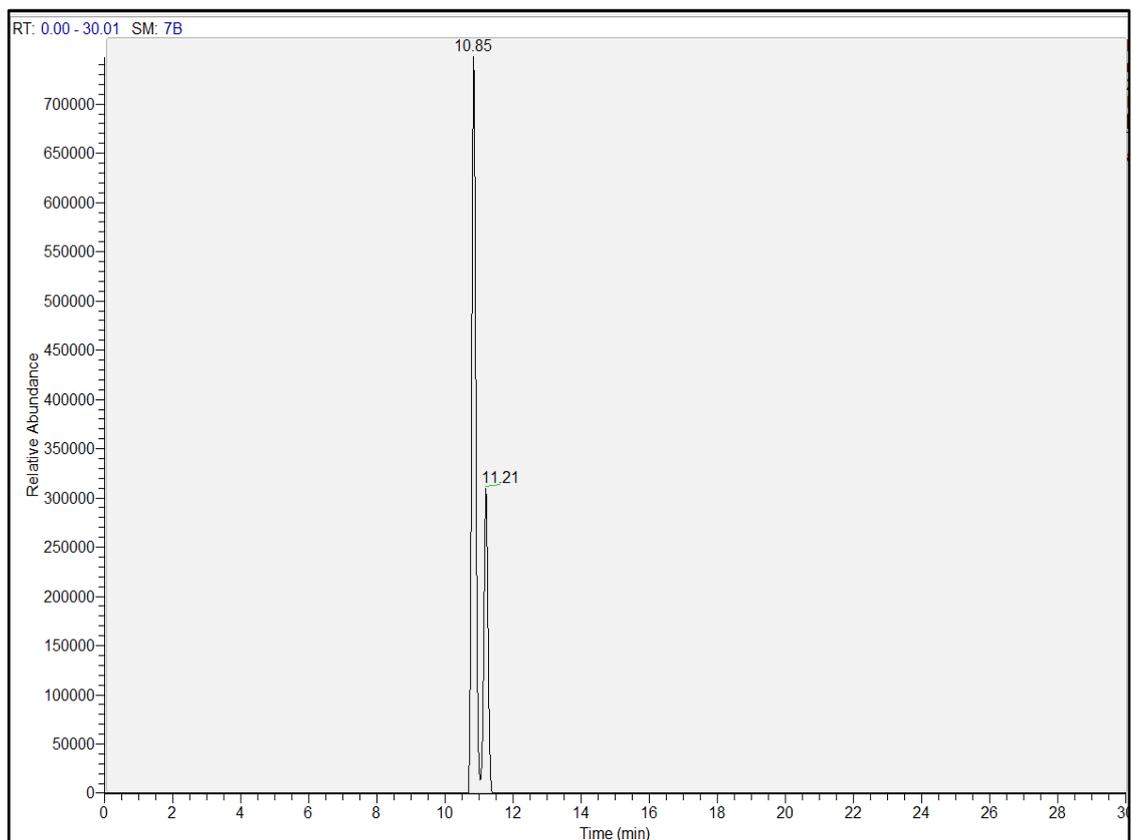


Figura 7. Cromatograma obtido pela análise de 6-biopterina e 7-biopterina com a coluna cromatográfica Luna NH₂.

O próximo passo foi testar a coluna amino Hypersil GOLD Amino (2,1 mm x 150 mm x 1,9 µm, Thermo), que possui partículas de diâmetro pequeno, caracterizando a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). As condições utilizadas nessa cromatografia podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4. Condições cromatográficas utilizadas na coluna Hypersil GOLD Amino, onde A é água e B é acetonitrila. Volume de injeção = 3 μ L.

Tempo (min)	%A	%B	Fluxo (μ L/min)
0.00	5	95	800
1.00	5	95	800
19.00	30	70	800
19.50	95	5	800
20.00	95	5	800
20.50	5	95	800
21.00	5	95	800

Utilizando essa coluna foi possível diminuir o tempo total de corrida cromatográfica de 30 minutos para 21 minutos, sem prejudicar a resolução entre os isômeros 6-biopterina e 7-biopterina. Isso ocorreu devido as moléculas eluírem em picos mais estreitos quando se utiliza colunas de CLUE, já que as partículas pequenas da fase estacionária tendem a permitir trocas mais rápidas do analito na fase móvel e nos poros das partículas devido a menor profundidade dos poros. O resultado da análise de uma mistura de padrões de pterinas, contendo, além de 6-biopterina e 7-biopterina, pterina, isoxantopterina, 6-neopterina, 7-neopterina e o padrão interno 6,7-dimetilpterina, na concentração de 50 ng/mL, pode ser observado na Figura 8.

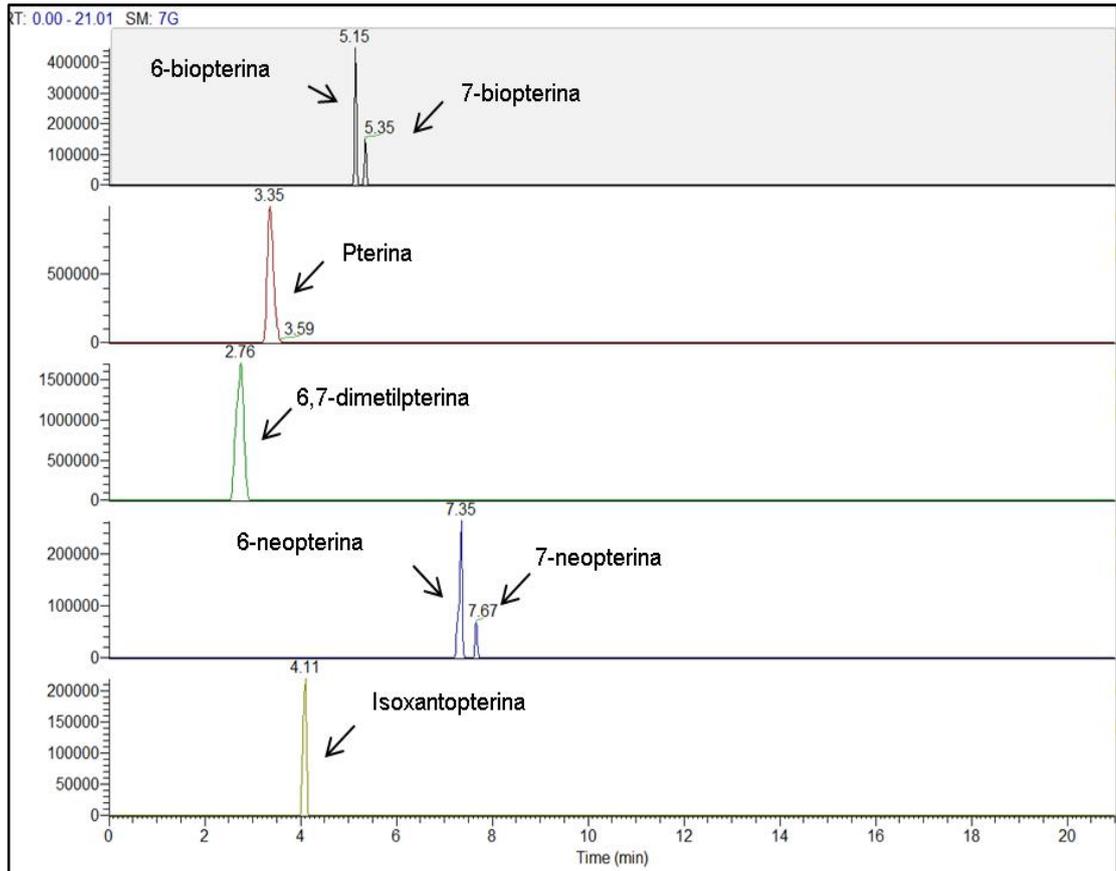


Figura 8. Cromatograma obtido pela análise de uma mistura padrão de pterinas em 50 ng/mL com a coluna cromatográfica Hypersil GOLD Amino.

Visando melhorar ainda mais o método instrumental, finalmente ajustou-se a cromatografia para 14 minutos e um fluxo de fase móvel de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. Com esses ajustes, o método final se tornou mais rápido e visou-se também uma maior preservação da fase estacionária com a diminuição do fluxo. As condições cromatográficas finais são mostradas na tabela 5 e o cromatograma da análise de solução padrão pode ser observado na Figura 9.

Tabela 5. Condições cromatográficas finais utilizadas na coluna Hypersil GOLD Amino, onde A é água e B é acetonitrila. Volume de injeção = 3 μL

Tempo (min)	%A	%B	Fluxo ($\mu\text{L}/\text{min}$)
0.00	10	90	400
7.50	10	90	400
7.60	30	70	400
10.00	30	70	400
10.10	10	90	400
14.00	10	90	400

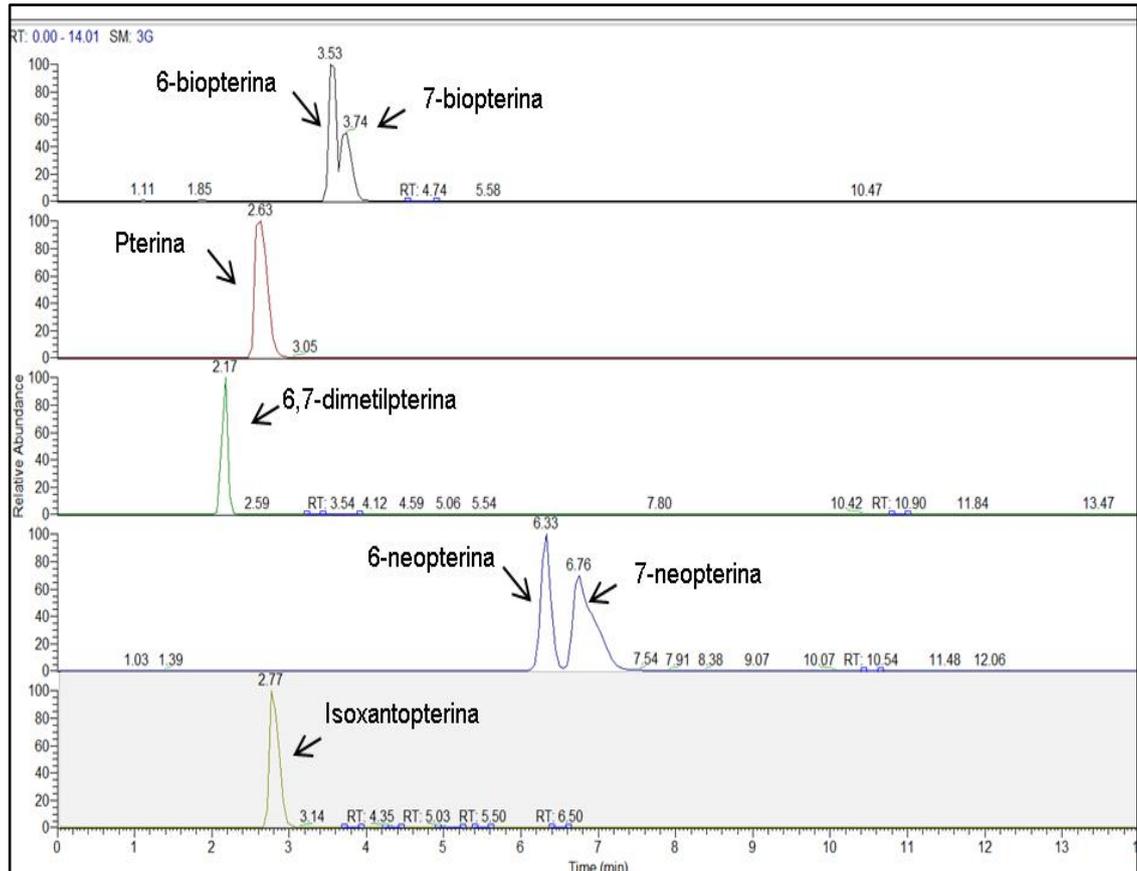


Figura 9. Cromatograma obtido pela análise de uma mistura padrão de pterinas em 50 ng/mL com a coluna cromatográfica Hypersil GOLD Amino utilizando o método final.

4.1.2 Espectrometria de massas

Para todas as análises de otimização da cromatografia foi utilizado um espectrômetro de massas de alta resolução em modo de varredura total de íons em uma faixa de m/z 100 a m/z 300. A análise de uma amostra de urina de indivíduo sadio foi realizada utilizando esse método e observou-se que não foi possível a detecção de isoxantopterina na urina e a detecção dos outros analitos também foi prejudicada pela baixa intensidade de sinal.

Para melhorar a detectabilidade e sensibilidade do método, optou-se por utilizar o modo de varredura de íons selecionados, fazendo com que o quadrupolo existente antes do analisador de massas do tipo orbitrap filtrasse somente os íons de interesse, diminuindo os interferentes e aumentando a sensibilidade da análise. Entretanto, a varredura total de íons é importante uma vez que possibilita a investigação de alvos desconhecidos, nesse caso, possíveis novos marcadores de fenilcetonúria atípica, cuja massa esteja

compreendida no intervalo de varredura do instrumento. Portanto, o método instrumental proposto dispõe de análise total de íons de m/z 100 a 300 e íons selecionados, simultaneamente, com poder de resolução de massas de 70000. A Figura 10 mostra uma comparação entre os cromatogramas obtidos pela análise de uma amostra de urina de indivíduo sadio utilizando apenas o modo de varredura total de íons e utilizando, concomitantemente, o modo de varredura de íons selecionados.

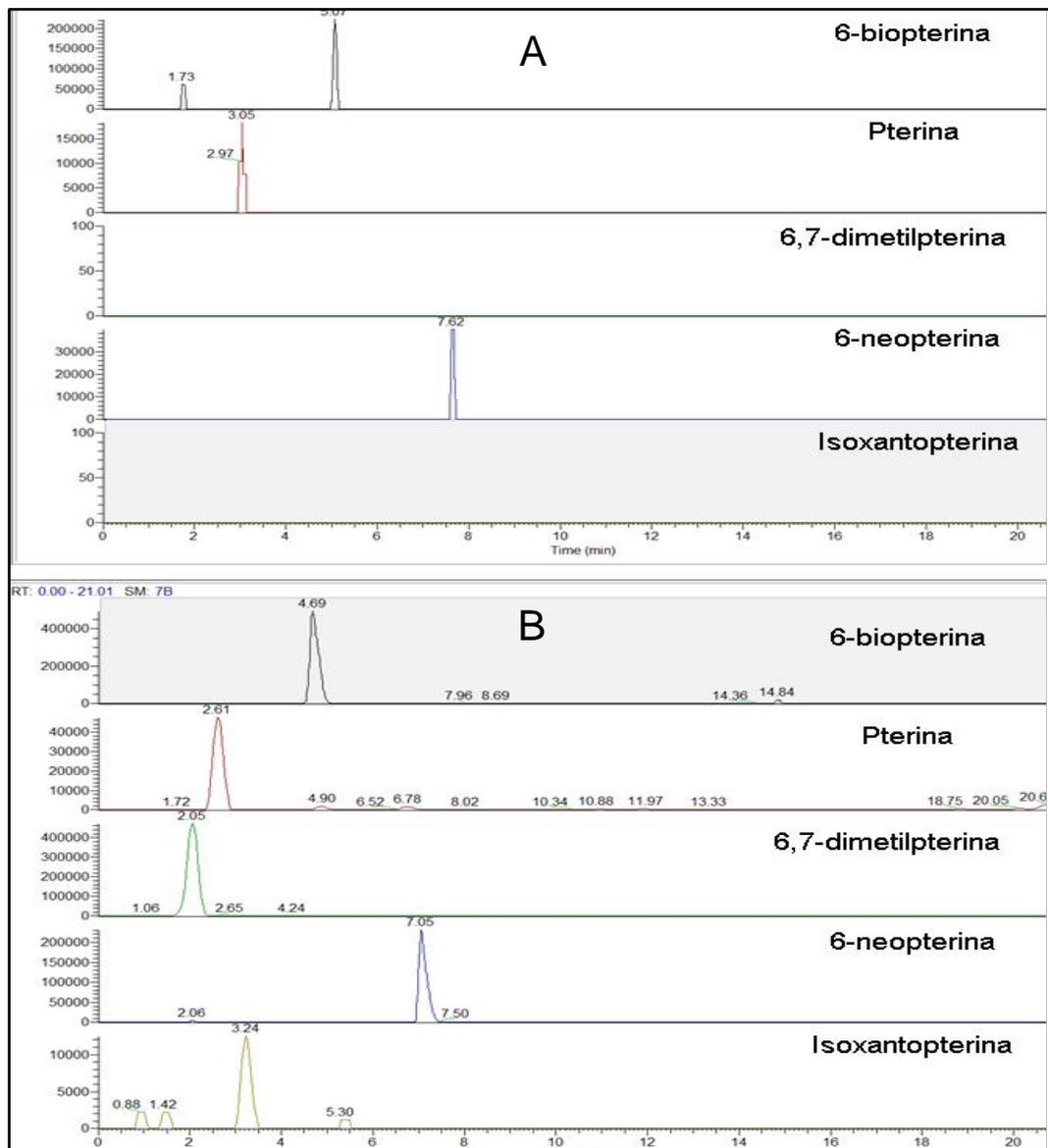


Figura 10. Comparação dos resultados obtidos a partir da análise de urina de indivíduo sadio utilizando o modo de varredura total de íons somente (A) e utilizando o modo de varredura de íons selecionados concomitantemente ao de varredura total de íons (B).

4.2 Pré-validação

Após o desenvolvimento e otimização das condições instrumentais foi feita a pré-validação do método. Uma dificuldade encontrada para realização da validação do método proposto residiu no fato de que não foi possível ter uma matriz urinária isenta de pterinas, já que são excretadas em altas concentrações em urina. Portanto, para se obter os parâmetros da validação foram utilizadas amostras de água MilliQ fortificadas com os analitos e o padrão interno 6,7-dimetilpterina na concentração de 200 ng/mL. Os resultados dos parâmetros avaliados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados dos parâmetros avaliados na pré-validação do método de análise de pterinas em água MilliQ.

	Pterina	Isoxantopterina	6-biopterina	7-biopterina	7-neopterina
Repetitividade (CV %)	19,3	13,1	22,9	23,4	19,0
Limite de detecção (ng/mL)	20	100	20	20	100
Arraste	Sem arraste	Sem arraste	Sem arraste	Sem arraste	Sem arraste
Linearidade (R²)	0,994	0,994	0,9967	0,9996	0,9815
Seletividade/Especificidade	OK	OK	OK	OK	OK

Embora tenha sido possível a detecção de 6-neopterina em urina, os ensaios de validação para o analito não foram satisfatórios, pois ele não apresentou boa detectabilidade em água.

4.3 Análise de urina e valores típicos em indivíduos saudáveis

Após a validação do método foi feita a avaliação de amostras de urina oxidadas para investigação do perfil típico de pterinas excretado por indivíduos saudáveis. Os metabólitos 6-biopterina, 6-neopterina, pterina e isoxantopterina foram detectados em todas as urinas, enquanto o metabólito 7-biopterina não foi detectado, ou por ser excretado naturalmente em concentrações muito baixas ou devido o sinal de 6-biopterina ser tão elevado que poderia encobrir a área de eluição do isômero 7. O metabólito 7-

biopterina é um marcador da falha no metabolismo da enzima PCD, e um aumento na concentração desse analito na urina pode sinalizar justamente essa disfunção. Portanto, em indivíduos sadios espera-se de fato que a concentração desse analito seja baixa. O metabólito 7-neopterina não está descrito na literatura como ocorrente natural na urina de indivíduo sadio.

Os valores de pterinas urinárias foram obtidos a partir da avaliação de 30 amostras de indivíduos sadios, sendo 23 com idade de 15 dias a 3 anos e os outros 7 variando de 4 a 17 anos de idade. Essa faixa etária foi escolhida por ser o alvo do diagnóstico de PKU atípica, após confirmação de hiperfenilalaninemia. É importante esclarecer que as hiperfenilalaninemias são detectadas ao nascimento, no exame conhecido como triagem neonatal ou "Teste do Pezinho", obrigatório no território nacional para todos os recém nascidos.

As concentrações obtidas para as pterinas validadas foram comparadas com os valores descritos na literatura. Nesse caso, para que a avaliação pudesse ser efetiva, foi utilizada estatística descritiva assim como nos dados da literatura. Essa comparação é mostrada na Tabela 7. Poucos trabalhos relatam os valores típicos de pterinas em urina, sendo que nenhum deles utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência e espectrometria de massas de alta resolução.

Tabela 7. Valores da concentração de pterinas em urinas de indivíduos sadios encontrados no presente trabalho e comparados com os publicados na literatura.

REFERENCIAS		MÉTODO	µmol/mol de creatinina			
			6-biopterina	Pterina	Isoxantopterina	6-neopterina
Presente trabalho	0 - 3 anos (n=23)	CLUE-EMAR	932 ± 597 (204 - 2741)	786 ± 656 (137 - 3214)	2262 ± 1785 (356 - 6608)	17325 ± 17989 (1360 - 60216)
	> 3 anos (n=7)		1445 ± 1272 (398 - 4109)	630 ± 355 (108 - 1185)	3307 ± 4192 (138 - 11608)	12111 ± 7955 (218 - 21296)
Allegriet. <i>al.</i> , 2011	0 - 10 anos (n=25)	CLAE-EM/EM	1236 ± 621 (349 - 2578)	220 ± 128 (51 - 514)	223 ± 256 (8 - 1260)	1609 ± 895 (194 - 3690)
	> 10 anos (n=16)		641 ± 373 (211 - 1718)	91 ± 55 (28 - 239)	90 ± 72 (2 - 265)	367 ± 253 (84 - 968)
Blau e Thöny, 2008	0 - 10 anos	CLAE-DF	500 - 3000	-	-	1100 - 4000
	> 10 anos		500 - 2700	-	-	200 - 1700
Steat. <i>al.</i> , 1981	Adultos 21 - 27a (n=27)	CLAE-DF	1173 ± 54	123 ± 7,5	120 ± 25	794 ± 34
Dhondt <i>et al.</i> , 1981	Crianças (n=6)	CLAE-DF	1125 ± 535 (466 - 1876)	-	-	672 ± 316 (244 - 1126)
	Adultos (n=12)		709 ± 162 (464 - 991)	-	-	280 ± 50 (231 - 382)
Rothler e Karobath, 1976	Adultos (n=9)	CLAE-DF	457 ± 165	-	-	223 ± 74

Observando os resultados obtidos para 6-biopterina em crianças com menos de 3 anos, pode-se afirmar que os valores do presente trabalho se aproximam dos valores relatados por quase todos os autores em faixas etárias semelhantes. Já para crianças com mais de 3 anos de idade, os valores obtidos não podem ser comparados com a literatura visto que, das sete amostras de crianças maiores de 3 anos analisadas, apenas duas eram maiores de 10 anos, tornando-se assim um universo amostral muito pequeno para que seja tirada alguma conclusão.

Para os metabólitos pterina e isoxantopterina os valores obtidos experimentalmente foram maiores que os descritos por Allegri *et al.*. Esse

resultado pode ser atribuído a amostras de urina mais diluídas, com níveis de creatinina menores. Ou até mesmo a uma possível saturação no detector utilizado por Allegri, fazendo com que, após uma determinada concentração do analito, a detecção seja invariável. O metabólito 6-neopterina, embora não tenha sido validado, foi avaliado como os demais já que pode ser detectado em todas as amostras de urina, a título de estudo. Para que os valores de referência sejam utilizados na aplicação do método futuramente, a validação desse analito será imprescindível.

Após a comparação dos valores obtidos experimentalmente com os valores descritos na literatura, buscou-se estimar um intervalo de referência de concentração de pterinas excretadas por indivíduos saudáveis. Para isso, foi necessário avaliar se a distribuição dos resultados para as trinta amostras investigadas era uma distribuição normal. Isso foi feito utilizando o programa MedCalc que construiu os histogramas a partir dos dados fornecidos e calculou o valor de W do teste de Shapiro-Wilk automaticamente, indicando a normalidade ou não normalidade da distribuição. A Figura 11 mostra os histogramas obtidos a partir dos resultados de concentração.

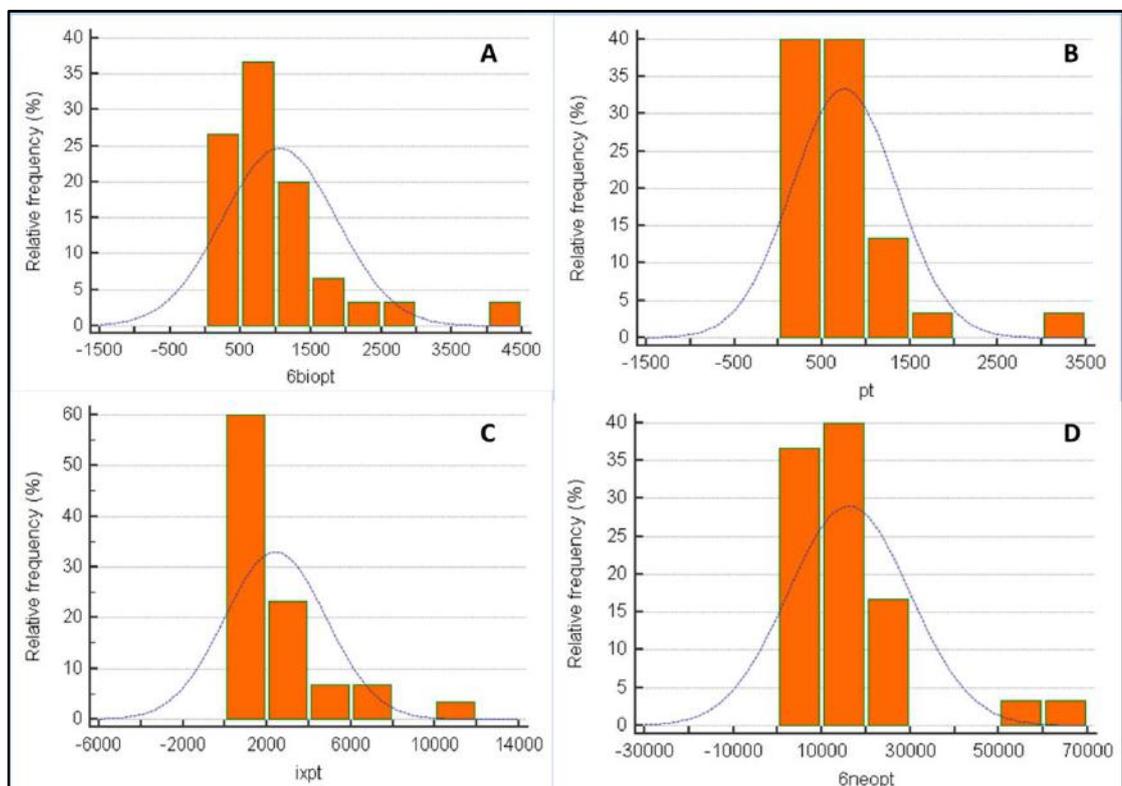


Figura 11. Histogramas da concentração de pterinas em urinas de indivíduos saudáveis. Distribuição não normal. (A) 6-biopterina; (B) Pterina; (C) Isoxantopterina; (D) 6-neopterina.

Observando os histogramas e o resultado do teste de Shapiro-Wilk gerados pelo programa, pode-se avaliar que, quando aplicados para todos os indivíduos sadios analisados, as distribuições das concentrações dos analitos não seguem um comportamento normal. Portanto, para calcular o intervalo de referência dessa população estudada, foi preciso usar uma transformada que tornasse a distribuição normal. A transformada escolhida foi a logarítmica. A Figura 12 mostra os histogramas obtidos após a análise estatística dos logarítimos dos valores.

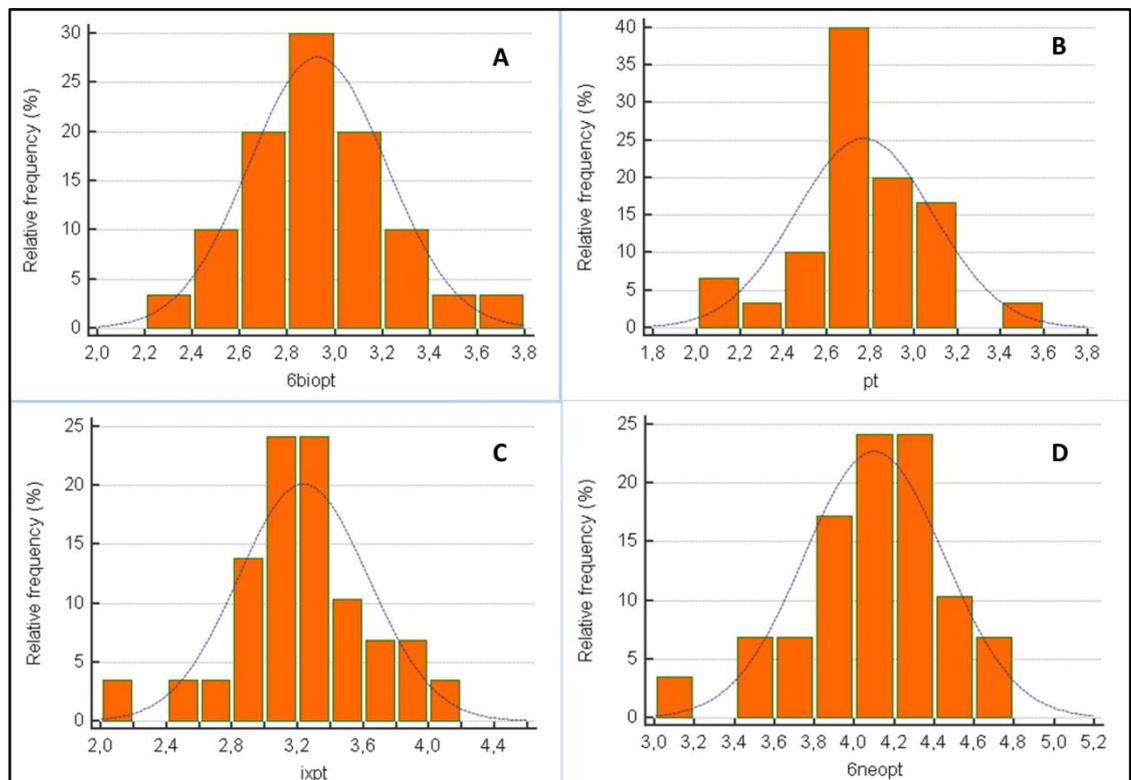


Figura 12. Histogramas da concentração de pterinas em urinas de indivíduos sadios após transformação logarítmica. Distribuição normal. (A) 6-biopterina; (B) Pterina; (C) Isoxantopterina; (D) 6-neopterina.

Aplicando a transformada logarítmica, foi possível observar pelos histogramas que a distribuição das concentrações dos analitos passou a ser normal. O programa também acusou a normalidade através do teste de Shapiro-Wilk após a transformada. Portanto, se tornou viável a utilização da abordagem paramétrica para a estimativa do intervalo de referência, também calculado automaticamente pelo programa. Nesse caso, o MedCalc analisou os dados utilizando os valores logarítmicos porém retornou o resultado do intervalo de referência para os valores absolutos das concentrações obtidas.

O intervalo de referência foi estimado baseando-se em um intervalo de confiança de 95%, ou seja, tem-se 95% de probabilidade que a concentração de pterinas da população de indivíduos de 0 a 17 anos, que foram os estudados no trabalho, esteja dentro do intervalo definido por esse experimento. A Tabela 8 mostra os intervalos de referência obtidos para cada analito.

Tabela 8. Intervalos de referência para uma população de indivíduos sadios de 0 a 17 anos.

	$\mu\text{mol/mol}$ de creatinina			
	6-biopterina	pterina	isoxantopterinina	6-neopterinina
Indivíduos sadios 0 - 17 anos (n=30)	228 - 3108	141 - 2439	286 - 10209	2563 - 61092

Para maior precisão dos valores mínimos e máximos desses intervalos, seria adequada a análise de um número maior de amostras, o que poderá ser feito posteriormente.

4.4 Estabilidade da urina

A estabilidade das amostras de urina é um fator muito importante a ser estudado tendo em vista que as mesmas precisariam ser enviadas de outro estado brasileiro ao Rio de Janeiro e poderiam ficar estocadas por dias até serem analisadas. Os resultados obtidos a partir da análise de uma amostra de urina estocada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, 7 dias e 10 dias são mostrados na Figura 13.

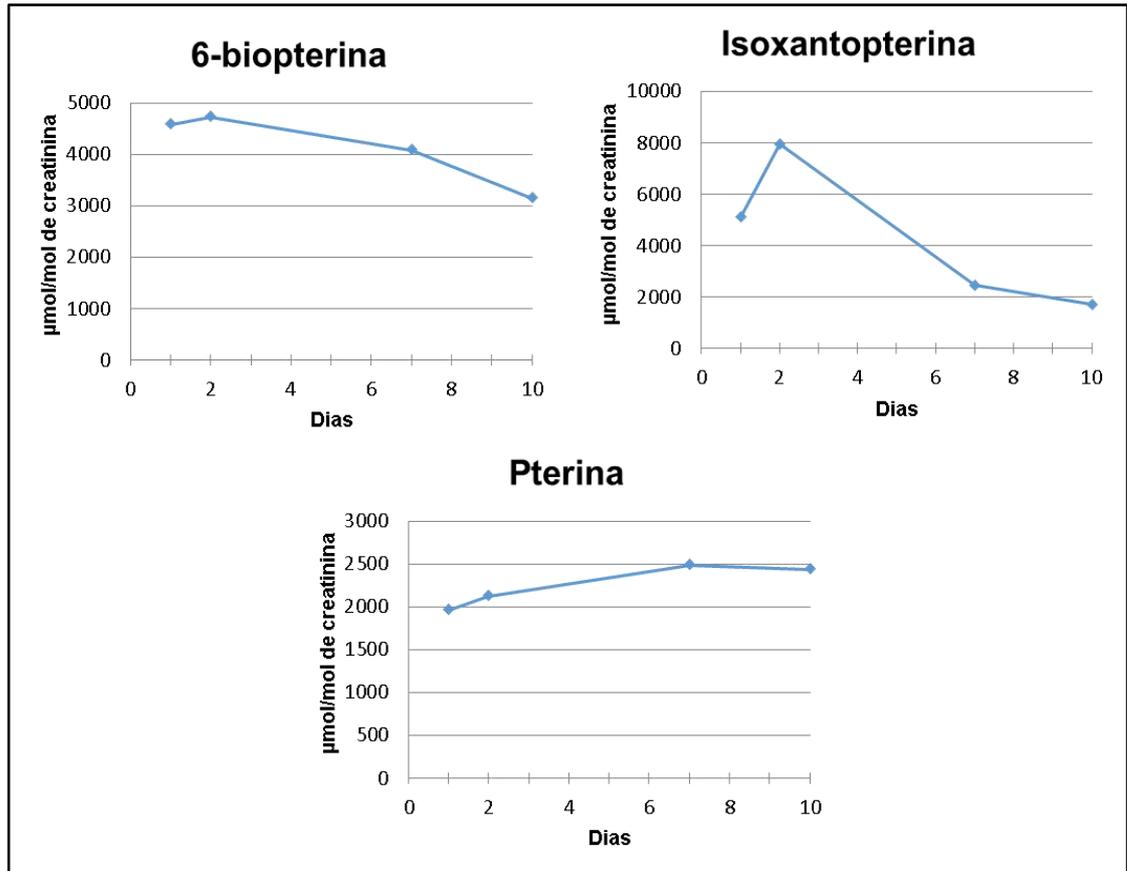


Figura 13. Resultados gráficos da avaliação da estabilidade da amostra de urina congelada a -20°C .

A partir dos resultados obtidos pode-se observar que a concentração de 6-biopterina diminuiu com o passar o tempo, a concentração de pterina aumentou e de isoxantopterina apresentou um aumento após 48 horas da coleta e depois diminuiu até o décimo dia após a coleta. A estabilidade das amostras não oxidadas, ou seja, contendo BH_4 , pode ter sido afetada por fatores como luz solar, temperatura e tempo de armazenamento, já que essa substância é passível de oxidação pela exposição ao meio ambiente. Os metabólitos 6-biopterina, pterina e isoxantopterina são endógenos e representam algumas das formas oxidadas do cofator BH_4 . Sabendo que BH_4 pode ser oxidado não enzimaticamente em pterina, por clivagem da cadeia lateral, é possível que isso tenha ocorrido ao longo dos dias em que a amostra ficou armazenada. Com a degradação de BH_4 em pterina, é considerável que a concentração do cofator disponível para a oxidação experimental em 6-biopterina e isoxantopterina também tenha diminuído, justificando a observação da diminuição das suas respectivas concentrações.

Sendo assim, caso haja necessidade de enviar a amostra para outro laboratório para ser analisada, é adequado oxidá-la, seguindo a metodologia proposta pelo trabalho, para que todo o BH_4 presente na amostra seja levado aos seus estados máximos de oxidação e garantir que a concentração dos marcadores não varie com o tempo.

5 CONCLUSÕES

O trabalho realizado permitiu o desenvolvimento e validação de um método analítico para detecção de pterinas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Esse método possibilitou a identificação, em alta resolução, das substâncias 6-biopterina, 7-biopterina, pterina, isoxantopterina, 6-neopterina e 7-neopterina, todos marcadores do metabolismo de BH_4 . Além disso, o método pode ser utilizado futuramente para investigação de novos metabólitos a partir dos dados brutos obtidos nesse projeto, já que foi empregado também o modo de varredura de íons totais, em uma faixa de m/z de 100 a 300. Sendo assim, obteve-se a aquisição de todas as moléculas que estavam dentro dessa faixa.

Com esse método também foi possível a análise de amostras de urina de indivíduos saudáveis, e a detecção de 6-biopterina, pterina, isoxantopterina e 6-neopterina. O metabólito 7-biopterina não foi detectado possivelmente por estar em baixa concentração. Não está descrito na literatura a ocorrência natural de 7-neopterina em fluidos biológicos.

Utilizando um software de análise estatística, foi possível estimar o intervalo de referência da concentração típica de pterinas em urina de uma população de indivíduos saudáveis de 0 a 17 anos com um intervalo de confiança de 95%. Comparando, a média dessa população com as concentrações descritas na literatura, observou-se que os valores são semelhantes.

Por fim, a estabilidade da amostra urina foi avaliada, concluindo-se que, para a amostra ser estável congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, é ideal que ela seja armazenada após o processo de oxidação. Isso garante que o BH_4 não oxide por fatores ambientais, fazendo com que a concentração dos metabólitos varie ao longo dos dias.

Dessa maneira, o método desenvolvido se mostrou eficiente para a detecção dos marcadores do metabolismo de BH_4 e, conseqüentemente, para aplicação no diagnóstico de fenilcetonúria atípica.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Proceder com a validação do método para o metabólito 6-neopterina, estudando alternativas de matriz em que o analito esteja ausente;

Analisar amostras de urina de pacientes com suspeita de PKU atípica, detectados através da Triagem Neonatal com aumento de fenilalanina no sangue;

Aplicar a metodologia proposta na análise de urina em papel de filtro e sangue em papel de filtro, facilitando ainda mais o deslocamento de amostras por todo o Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEGRI, G; COSTA NETO, H.J.B.; FERREIRA GOMES, L.N.L.; COSTA DE OLIVEIRA, M.L.; SCALCO, F.B.; DE AQUINO NETO, F.R. **Determination of six pterins in urine by LC-MS/MS**. *Bioanalysis*, v. 4, n.14, p. 1739-1746, 2012.

BLAU, N.; CURTIUS, H. C.; KUSTER, T.; MATASOVIC, A.; SCHOEDON, G.; DHONDT, J. L.; GUIBAUD, P.; GIUDICI, T.; BLASKOVICS, M. **Primapterinuria: a 112 new variant of atypical phenylketonuria**. *Journal of Inherited Metabolic Disease*.v.12, n. 2, p. 335-338, 1989.

BLAU, N; THÖNY, B. **Pterins and related enzymes**. In: *Laboratory guide to the methods in biochemical genetics*. Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 665-701.

CENTERWALL, S. A.; CENTERWALL, W. R. **The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist**. *Pediatrics*. v.105, (1Pt 1), p. 89-103, 2000.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. p.301

DE MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. **Diagnoses and treatment of phenylketonuria**. *Revista de Saúde Pública*, v. 34, n. 1, p. 86-96, 2000.

FUKUSHIMA, T.; NIXON, J. C. **Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids**. *Analytical Biochemistry*. v.102, n.1, p. 176-188, 1980.

KAUFMAN, S.; HOLTZMAN, N. A.; MILSTIEN, S.; BUTLER, L. J.; KRUMHOLZ, A. **Phenylketonuria due to a deficiency of dihydropteridine reductase**. *The New England Journal of Medicine*.v.293, n.16, p. 785-790, 1975.

KOŚLIŃSKI, P. et al. **Determination of pterins in urine by HPLC with UV and fluorescent detection using different types of chromatographic stationary phases (HILIC, RP C 8, RP C 18)**. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 91, p. 37-45, 2014.

NIEDERWIESER, A.; STAUDENMANN, W.; WETZEL, E. **High-performance liquid chromatography with column switching for the analysis of biogenic amine metabolites and pterins**. *Journal of Chromatography*. v.290 p. 237-246, 1984.

STEA, B.; HALPERN, R. M.; HALPERN, B. C.; SMITH, R. A. **Quantitative determination of pterins in biological fluids by high-performance liquid chromatography.** *Journal of Chromatography*.v.188 (2), p. 363-375, 1980.