

MÉTODOS DE DETECÇÃO E VALIDAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DA CREATINA, CREATININA E FOSFOCREATINA EM FLUIDOS E TECIDOS BIOLÓGICOS: ARTIGO DE REVISÃO

Erika F. Ferrari, Roberta S. Carreiro da Costa, Antônio C.G. Prianti Jr., Rodrigo A. L. Osorio, Wellington Ribeiro

Universidade do Vale do Paraíba/Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos, SP
ferrarierika@yahoo.com.br / gton@univap.br

Resumo- A Creatina é um constituinte nutricional encontrado naturalmente em alimentos de origem animal e sintetizado pelo organismo humano. Embora seja um componente dietético não essencial, quando suplementado, tem demonstrado benefícios fisiológicos e fisopatológicos. A creatina é mais frequentemente mensurada utilizando-se o método de reação colorimétrica com ácido pícrico, neste método, porém, é comum a interferência de outras substâncias na detecção. Deste modo, várias metodologias têm sido reportadas para análise de creatina, creatinina e fosfocreatina, tanto de forma isolada, quanto determinações simultâneas. As diversas técnicas empregando eletrospray e espectrometria de massa possibilitam um excelente limite de quantificação aliado a elevados coeficientes de precisão e exatidão.

Palavras-chave: Creatina, creatinina, fosfocreatina, cromatografia, métodos analíticos

Área do Conhecimento: Farmácia (Ciências da Saúde)

Introdução

A creatina (Cr, ácido acético α -metilguanidina) é um constituinte nutricional encontrado naturalmente em alimentos de origem animal e sintetizado pelo organismo humano a partir dos aminoácidos glicina, arginina e metionina (WALKER, 1979). Em frações proporcionais constantes, a Cr e sua forma fosforilada, a fosfocreatina (CrP), passam por um metabolismo de primeira-ordem não-enzimático sendo excretado na urina na forma de creatinina (Crn) (WALKER, 1979; WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000).

Embora seja um componente dietético não essencial, quando suplementado, tem demonstrado benefícios fisiológicos em atletas, em modelos de experimentação animal e no tratamento de pacientes com várias doenças musculares, neurológicas e neuromusculares (PERSKY; BRAZEAU; HOCHAUS, 2003), tais como Distrofia Muscular de Duchenne (FELBER *et al.*, 2000) e *miastenia gravis* (STOUT *et al.*, 2001).

Deficiências no metabolismo da Cr têm sido descobertas com relação a sua síntese (deficiências de AGAT e GAMT) (STÖCKLER *et al.*, 1994; 1996; SCHULZE, 1997; VAN DER KNAAP *et al.*, 2000; ITEM *et al.*, 2001) e transporte (defeito no CT1) (CECIL *et al.*, 2001; SALOMONS *et al.*, 2001)

Revisão Bibliográfica

A Cr é mais frequentemente mensurada utilizando-se o método de reação colorimétrica

com ácido pícrico (método de Jaffé), produzindo uma faixa de absorção entre 485-520 nm. Neste método, porém, é comum a interferência de outras substâncias na detecção como, por exemplo, bilirrubinas, proteínas e cetonas (JAFFÉ, 1886; OWEN, WEAR, KEEVIL, 2006). Nas últimas décadas vários problemas relativos à utilização do ácido pícrico para a quantificação da Cr têm sido reportados na literatura científica, principalmente devido à presença de reativos cromogênicos não derivados da Cr (YUEN *et al.*, 2004).

Deste modo, várias metodologias têm sido descritas para análise de Cr, Crn e CrP, tanto de forma isolada, quanto determinações simultâneas. Dentre elas encontram-se a cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por detecção ultravioleta (UV), detector diodo (DAD), eletrospray (ESI), espectrometria de massa (MS) e espectrometria por ressonância magnética (NMR) (HARMSSEN; DE TOMBE; DE JONG, 1982; DUNNETT; HARRIS; ORME, 1991; KLAAS, 2003; NIKOLIN *et al.*, 2004; YOKOYAMA *et al.*, 2000).

Durante a realização da cromatografia a escolha tanto da fase estacionária como da fase móvel, possibilita uma melhor separação da substância a ser analisada, conferindo uma grande vantagem em comparação com outros métodos (NIKOLIN, B. *et al.*, 2004).

Owen, Wear e Keevil (2006), dosaram Crn plasmática em camundongos utilizando cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa tandem (LC-MS/MS) e coluna de troca iônica, obtendo um tempo de corrida de 1,5 minutos e mínima supressão iônica.

O método apresentou um limite mínimo de quantificação de 5 $\mu\text{mol/L}$ e a imprecisão dos intra e inter-ensaios foram menores do que 5 e 7%, respectivamente. As amostras de plasma foram posteriormente analisadas por métodos enzimáticos e colorimétricos (método de Jaffé), a fim de comparação com os resultados obtidos pela LC-MS/MS. Em concentrações até 150 $\mu\text{mol/L}$ tanto o método colorimétrico, quanto o enzimático, apresentaram resultados semelhantes aos obtidos pela LC-MS/MS. Em concentrações acima deste valor, porém, a Crn foi subestimada do obtido por ambos os métodos colorimétrico e enzimático se comparados à LC-MS/MS. Com isso demonstraram que a LC-MS/MS é um método simples e sensível, eficaz para comparação de resultados, enquanto tanto o método de Jaffé quanto o enzimático, apresentam resultados questionáveis.

Um método simples para detecção simultânea de Cr e Crn em amostras de urina utilizando HPLC com coluna de fase reversa foi descrito por Yang (1998). A cromatografia foi realizada através do emprego de uma coluna C18 e detecção UV na faixa de 220 nm com fase móvel constituída de 0.02 mol/L de fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4). A recuperação de Cr e Crn foram 103.13, e 98.26%, respectivamente. As curvas de calibração foram lineares para valores compreendidos entre 2 e 200 $\mu\text{g/ml}$ para a Cr e entre 2 e 400 $\mu\text{g/ml}$ para a Crn. Os limites de detecção do método foram de 0.69 e 0.10 $\mu\text{g/ml}$ para a Cr e Crn, respectivamente.

Uma técnica de HPLC isocrática (gradiente isocrático) de separação de Cr e Crn com aplicação direta das amostras sanguíneas na coluna foi desenvolvida por Werner, Schneider e Emmert (1990). Foi utilizada uma pré-coluna para purificação da amostra. Dois comprimentos de onda simultâneos de detecção com detector de varredura diodo possibilitaram uma quantificação mais precisa dos componentes, sendo melhores os comprimentos de 210 e 234 nm, com um coeficiente de variação menor que 2% (Cr 3-5%). Foi obtida uma boa linearidade e 100% de recuperação do material biológico. Isto faz o método útil para finalidades clínicas ou como uma referência para outros métodos.

CARDUCCI e cols. (2006) desenvolveram um novo método de detecção e validação para concentrações plasmáticas de Cr, podendo ser utilizado em amostras sanguíneas secas, extraídas por solução de água e metanol. Este método utilizou análise de eluição empregando ionização por ESI-MS/MS, os limites de detecção foram de 0.30 $\mu\text{mol/l}$ de Cr e apresentaram boa linearidade na faixa de 3.57–624.7 $\mu\text{mol/l}$. A recuperação da amostra foi em torno de 93–101%. Além de apresentar grande rapidez (1 min) e confiabilidade, este método pode ser útil para

detectar alterações nos processos fisiopatológicos do metabolismo da Cr.

A metodologia analítica através do emprego de uma fase móvel isocrática e uma coluna de fase reversa com pareamento iônico foi descrita por Kock e cols. (1995) para separação e simultânea detecção por UV em 232 nm e é proposto como um método de determinação da Crn plasmática. A inexatidão do método foi determinada por NIST-SRM-909 (National Institute of Standards and Technology Standard Reference Material 909) e foi de 0,5%, com imprecisão de 0,8%. A imprecisão do intra-ensaio para a Crn foi de 0,4-0,5% no padrão e 0,6-0,8% nas amostras sanguíneas. Os resultados para a Crn têm sido comparados aos obtidos por diluição de isótopos em GC através de detecção por MS, utilizando como padrão interno a Crn marcada com os isótopos ^{13}C e $^{15}\text{N}_2$ e selecionando a detecção de massa em $m/e = 329$ e $m/e = 332$.

Marsilio e cols. (1999) relataram um método simples e seguro para determinação da concentração de Crn em amostras de plasma e urina. A corrida cromatográfica foi realizada em coluna C18 e a absorbância monitorada a 220 nm. A relação entre a concentração de Crn e o pico de área do padrão interno de Crn foi linear até 1,088 $\mu\text{mol/l}$. A precisão da corrida interna foi mensurada em diferentes concentrações de Cr variando entre 0.89% e 2.34% no plasma e de 0.34% e 1.10% na urina. O limite de detecção foi de 3.24 $\mu\text{mol/l}$ para o sinal. O método mostrou boa linearidade com referência ao procedimento de diluição do isótopo de GC-MS ($r=0.999$).

Para mensurar a concentração Cr livre, CrP e Cr total (CrP mais Cr) em corações de ratos perfundidos, foi utilizada NMR de fósforo-31 ($^{31}\text{P-NMR}$) e NMR de prótons ($^1\text{H-NMR}$), respectivamente. A Cr total foi mensurada por análise de HPLC a partir do extrato tecidual. Uma maior concentração de Cr ($\mu\text{mol/g}$ de peso seco) nos corações perfundidos foi observada na análise por HPLC (40.3 ± 2.38) em comparação à NMR (34.6 ± 1.95), porém não foram observadas diferenças significativas na quantificação de CrP entre os dois métodos de análise (UNITT *et al.*, 1992). Resultados semelhantes foram obtidos por Schneider e cols. (2000).

Considerações finais

Cr, Crn e CrP podem ser analisadas por uma grande variedade de métodos analíticos, tais como GC, HPLC UV, DAD, MS e NMR. A escolha do método depende de uma série de variáveis, que vão desde o tipo de coluna até a detecção simultânea da Cr e Crn. A análise por MS apresenta como vantagem a não utilização de processos de derivatização, fator que contribui para maior exatidão analítica. Além de permitir o

uso de padrões internos marcados com isótopos, conferindo maior precisão, exatidão e reprodutibilidade aos processos extrativos. Além disso, as diversas técnicas empregando ESI e MS possibilitam um excelente limite de quantificação.

Referências

- CARDUCCI, C. *et al.* Quantitative determination of guanidinoacetate and creatine in dried blood spot by flow injection analysis-electrospray tandem mass spectrometry. **Clin. Chim. Acta**, v. 364, p. 180 – 187, 2006.
- CECIL, K.M. *et al.* Irreversible brain creatine deficiency with elevated serum and urine creatine: a creatine transporter defect? **Ann. Neurol.**, v. 49, p. 401–404, 2001.
- DUNNETT, M.; HARRIS, R.C.; ORME, C.E. Reverse-phase ion-pairing high-performance liquid chromatography of phosphocreatine, creatine and creatinine in equine muscle. **Scand. Clin. Lab. Invest.**, v.51, n.2, p.137-141, 1991.
- FELBER, S. *et al.* Oral creatine supplementation in Duchenne muscular dystrophy: a clinical and ³¹P magnetic resonance spectroscopy study. **Neurol. Res.**, v.22, p.145– 150, 2000.
- HARMSSEN, E.; DE TOMBE, P.P.; DE JONG, J.W. Simultaneous determination of myocardial adenine nucleotides and creatine phosphate by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 230, n.1, p.131-136, 1982.
- ITEM, C.B. *et al.* Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 69, p. 1127–1133, 2001.
- JAFFÉ, M. über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. **Z. Phys. Chem.**, v. 10, p. 391–400, 1886.
- KLAAS, W. *et al.* MR spectroscopy of muscle and brain in guanidinoacetate methyltransferase (GAMT)-deficient mice: Validation of an animal model to study creatine deficiency. **Magn. Reson. Med.**, v. 50, n. 5, p. 936 – 943, 2003.
- KOCK, R. *et al.* A method for the simultaneous determination of creatinine and uric acid in serum by high-performance-liquid-chromatography evaluated versus reference methods. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 33, n. 1, p. 23-29, 1995.
- MARSILIO R, *et al.* Rapid determination of creatinine in serum and urine by ion-pair high-performance liquid chromatography. **Int. J. Clin. Lab. Res.**, v. 29, n. 3, p. 103-109, 1999.
- NIKOLIN, B. *et al.* High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. **Bosn. J. Basic Med. Sci.**, v. 4, n. 2, p. 5-9, 2004.
- OWEN LJ, WEAR JE, KEEVIL BG. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for serum creatinine and comparison with enzymatic and Jaffe methods. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 43, p. 118-23, 2006.
- PERSKY, A.M.; BRAZEAU, G.A.; HOCHAUS, G. Pharmacokinetics of the dietary supplement creatine. **Clin. Pharmacokinet.**, v.42, n.6, p. 557-574, 2003.
- SALOMONS, G.S. *et al.* X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 68, p. 1497–1500, 2001.
- SCHNEIDER, J. *et al.* Reduced (1)H-NMR visibility of creatine in isolated rat hearts. **Magn. Reson. Med.**, v. 43, n. 4, p. 497-502, 2000.
- SCHULZE, A. *et al.* Creatine deficiency syndrome caused by guanidinoacetate methyltransferase deficiency: diagnostic tools for a new inborn error of metabolism. **J. Pediatr.**, v. 131, p. 626–631, 1997.
- STÖCKLER, S. *et al.* Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: the first inborn error of creatine metabolism in man. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 58, p. 914-922, 1996.
- STÖCKLER, S. *et al.* Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism. **Pediatr. Res.**, v. 36, p. 409–413, 1994.
- STOUT, J.R. *et al.* Effects of resistance exercise and creatine supplementation on myasthenia gravis: a case study. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.33, p. 869 – 872, 2001.
- UNITT, J.F. *et al.* Determination of free creatine and phosphocreatine concentrations in the isolated perfused rat heart by ¹H- and ³¹P-NMR. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1133, n. 2, p. 115-20, 1992.
- VAN DER KNAAP, M.S. *et al.* Mental retardation and behavioural problems as presenting signs of a creatine synthesis defect. **Ann. Neurol.**, v. 47, p. 540–543, 2000.
- WALKER, J.B. Creatine: Biosynthesis, regulation and function. **Adv.Enzymol. Relat. Areas Mol. Bio.**, v.50, n.1, p. 177-242, 1979.

- WERNER, G.; SCHNEIDER, V.; EMMERT, J. Simultaneous determination of creatine, uric acid and creatinine by high-performance liquid chromatography with direct serum injection and multi-wavelength detection. **J. Chromatogr. B.**, v. 525, p. 265-275, 1990.
- WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiol. Rev.**, v. 80, p.1107-1213, 2000.
- YANG, Y.D. Simultaneous determination of creatine, uric acid, creatinine and hippuric acid in urine by high performance liquid chromatography. **Biomed Chromatogr.**, v. 12, n. 2, p. 47-49, 1998.
- YOKOYAMA, Y. *et al.* Low-capacity cation-exchange chromatography of ultraviolet-absorbing urinary basic metabolites using a reversed-phase column coated with hexadecylsulfonate. **J. Chromatogr. A**, v. 886, n.1-2, p. 297-302, 2000.
- YUEN, P.S.T. *et al.* A simplified method for HPLC determination of creatinine in mouse serum. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, v. 286, p. 1116-1119, 2004.