Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Samantha Christina Hermano Rodrigues

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE CROMATOGRAFIA A GÁS BIDIMENSIONAL PARA ABORDAGEM METABOLÔMICA EM CÉLULAS DERIVADAS DA PELE HUMANA EXPOSTAS AO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO E AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

Belo Horizonte

2023

UFMG/ICEX/DQ. 1.548
T. 706

Samantha Christina Hermano Rodrigues

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE CROMATOGRAFIA A GÁS BIDIMENSIONAL PARA ABORDAGEM METABOLÔMICA EM CÉLULAS DERIVADAS DA PELE HUMANA EXPOSTAS AO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO E AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

Orientadora: Prof.ª Dra. Zenilda de Lourdes Cardeal

Coorientador: Prof. Dr. Helvécio Costa Menezes

Belo Horizonte

2023

Ficha Catalográfica

R696d
2023
T

Rodrigues, Samantha Christina Hermano.
Desenvolvimento de método de cromatografia a gás bidimensional para abordagem metabolômica em células derivadas da pele humana expostas ao material particulado atmosférico e avaliação de citotoxicidade [manuscrito] / Samantha Christina Hermano Rodrigues. 2023.
123 f. : il., gráfs., tabs.

Orientadora: Zenilda de Lourdes Cardeal.
Coorientador: Helvécio Costa Menezes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.
Inclui bibliografia.
Anexos: f. 121-123.

1. Química analítica – Teses. 2. Bioquímica – Teses. 3. Ar – Poluição – Teses. 4. Aminoácidos – Metabolismo – Teses. 5. Preparação de amostra (Química) – Teses. 6. Pele – Teses. 7. Fibroblasto – Teses. 8. Cromatografia de gás – Teses. 9. Espectrometria de massa – Teses. I. Cardeal, Zenilda de Lourdes, Orientadora. II. Menezes, Helvécio Costa, Coorientador. III. Título.

CDU 043

Elaborada por Márcia Cavalcanti Moreira – CRB6/3847.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

UFMG
Programa de Pós-Graduação em Química
Departamento de Química - ICEx

"Desenvolvimento de método de cromatografia a gás bidimensional para abordagem metabolômica em células derivadas da pele humana expostas ao material particulado atmosférico e avaliação de citotoxicidade"

Samantha Christina Rodrigues

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Zenilda de Lourdes Cardeal - Orientadora
UFMG

Prof. Helvécio Costa Menezes - Coorientador
UFMG

Profa. Isarita Martins Sakakibara
UNIFAL

Prof. Fábio Augusto
UNICAMP

Profa. Leiliane Coelho André
UFMG/Farmácia

Prof. Evandro Piccin
UFMG

Belo Horizonte, 27 de junho de 2023.

Documento assinado eletronicamente por **Zenilda de Lourdes Cardeal**, **Professora do Magistério Superior**, em 28/06/2023, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Isarita Martins Sakakibara**, **Usuário Externo**, em 28/06/2023, às 13:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Helvecio Costa Menezes**, **Professor do Magistério Superior**, em 28/06/2023, às 15:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Leiliane Coelho Andre**, **Diretor(a) de unidade**, em 28/06/2023, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Fabio Augusto**, **Usuário Externo**, em 29/06/2023, às 10:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Evandro Piccin**, **Professor do Magistério Superior**, em 27/07/2023, às 21:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2423197** e o código CRC **68B9FCAE**.

Referência: Processo nº 23072.236959/2023-38 SEI nº 2423197

A Deus, autor e criador de todas as coisas, seu amor e cuidado infinito foram o sustento essencial para a conclusão desta obra. Ao Matheus, meu amor, apoio fundamental e constante. Aos meus filhos. À minha Família.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu amor, cuidado e sustento nas horas mais difíceis.

Ao meu esposo, Matheus Hermano, que sonhou e trilhou comigo este caminho. Agradeço pelas suas renúncias, ajuda, companheirismo e apoio tão importante quando eu mais precisava.

Aos meus pais, Sônia e Carlos, e ao meu irmão, Matheus, que sempre estiveram ao meu lado e foram suporte mesmo de longe.

Agradeço aos meus Professores e Orientadores, Professora Dra. Zenilda de Lourdes Cardeal e Professor Dr. Helvécio Costa Menezes, pelo rico conhecimento compartilhado, pelo suporte durante a pesquisa e por sempre estarem dispostos a escutar e discutir as ideias apresentadas.

Agradeço ao Professor Dr. Dawidson de Assis Gomes que, prontamente, abriu as portas de seu laboratório para que uma parte da minha pesquisa fosse realizada lá. Agradeço pelas dicas, pelo ensino na parte experimental e pelo rico conhecimento compartilhado.

Aos meus colegas do laboratório 171 por toda a disponibilidade e atenção. Em especial, agradeço ao colega Josimar pelo auxílio na parte cromatográfica, de *softwares* e por todo conhecimento compartilhado na parte de metabolômica. Aos colegas do laboratório de Imunologia Celular, que sempre foram muito acolhedores, em especial, à Majito (Maria). Agradeço por toda ajuda na parte biológica.

Agradeço aos Professores do Departamento de Química da UFMG com os quais tive contato e me proporcionaram participar de suas aulas.

Agradeço ao Departamento de Química, à Rede Mineira de Cromatografia Avançada, à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e aos órgãos de fomento que financiaram a minha pesquisa: ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A todos que me acompanharam nessa jornada, muito obrigada!

“Tudo que hoje eu sei é obra do Criador,
um dom do céu, foi Deus quem me deu.
A Ele sempre um canto de Amor, a Ele
sempre a minha voz e o meu louvor”

Juninho Cassimiro

Desenvolvimento de método de cromatografia a gás bidimensional para abordagem metabolômica em células derivadas da pele humana expostas ao material particulado e avaliação de citotoxicidade

RESUMO

O material particulado (MP) é uma mistura complexa de poluentes composta por partículas de vários tamanhos e diferentes composições presentes no ar que estão associadas a vários tipos de distúrbios ambientais e de saúde pública. No entanto, pesquisas relacionando os efeitos desses materiais na pele ainda estão em seus estágios iniciais. Neste estudo, investigou-se o perfil de aminoácidos, uma classe de metabólitos derivados das células de fibroblastos, após a exposição ao material particulado coletado em um ponto com tráfego intenso de carros e outro próximo a uma estação ecológica, ambos pontos dentro da Universidade Federal de Minas Gerais -UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Um método de preparo de amostra que englobava *quenching*, extração e derivatização dos analitos foi desenvolvido e avaliado utilizando um cromatógrafo a gás unidimensional. Os resultados apresentaram uma repetibilidade com valores de RSDs variando de 4,83 a 8,88 %, valores próximos aos encontrados na literatura, demostrando que o método proposto para análise dos aminoácidos derivados das células de fibroblastos foi alcançado com sucesso. Após essa etapa, foi otimizado o processo de exposição do material particulado, para isso, foram utilizados ensaios de citotoxicidade. Posteriormente, um método de alta seletividade e resolução para análise de aminoácidos foi desenvolvido e validado baseado em cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas (GC×GC-Q-TOFMS/MS). Foram obtidos valores de R^2 acima de 0,9011 para todos os aminoácidos, RSDs entre 5,01-24,56%, limite de detecção entre 0,08-4,09 mgL^{-1}, limite de quantificação entre 0,24 – 12,42 mgL^{-1} e recuperações na faixa de 46,29-95,46%, resultados satisfatórios tendo em vista a complexidade das etapas. Os passos de derivatização, temperatura do forno, os tipos de coluna de primeira e segunda dimensão, temperatura do injetor, temperatura da linha de transferência e do jato quente e, por fim, o período de modulação foram otimizados nessa etapa. Com todos os parâmetros ajustados, foram feitas as análises dos aminoácidos derivados das células de fibroblastos expostos ao $MP_{2,5}$ por GCxGC-Q-TOFMS/MS. Os impactos da exposição ao $MP_{2,5}$ nas células demonstraram estar relacionados à concentração das partículas. Um total de quatro aminoácidos foram regulados negativamente nas células expostas, dentre eles a

alanina, glicina, prolina e fenilalanina. Pela análise da via, a biossíntese de aminoacil-tRNA e a biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano foram destacadas como as principais vias metabólicas perturbadas pela exposição ao MP. No geral, os resultados obtidos ajudam a melhorar a compreensão da toxicidade do material particulado em contato com a pele e demonstram que o método desenvolvido de preparo de amostras junto à análise por GC×GC-Q-TOFMS/MS é adequado para pesquisa metabolômica em células de fibroblastos. Além disso, os resultados deste trabalho abrem novos caminhos para a realização de estudos subsequentes para elucidar a associação de mais classes de metabólitos da pele associados à exposição atmosférica.

Palavras chaves: metabolômica; poluição atmosférica; material particulado; aminoácidos; cromatografia gasosa.

Development of a two-dimensional gas chromatography method for metabolomics approach in cells derived from human skin exposed to atmospheric particulate matter and evaluation of cytotoxicity

ABSTRACT

Particulate matter (PM) is a complex mixture of pollutants composed of particles of various sizes and different compositions present in the air that are associated with various types of environmental and public health disturbances. However, research relating the effects of these materials on the skin is still in its early stages. In this study, were investigated the profile of amino acids, a class of metabolites derived from fibroblast cells, after exposure to particulate matter collected at a point with intense car traffic and another close to an ecological station, both points within the Federal University of Minas Gerais-UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. A sample preparation method that encompassed quenching, extraction and derivatization of analytes was developed and evaluated using a one-dimensional gas chromatograph. The results showed a repeatability ranging from 4.83 to 8.88, values close to those found in the literature, demonstrating that the proposed method for analysis of amino acids derived from fibroblast cells was successfully achieved. After this step, the particulate material exposure process was optimized, for which cytotoxicity assays were used. Subsequently, a high selectivity and resolution method for amino acid analysis was developed and validated based on comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC×GC-Q-TOFMS/MS). R^2 values above 0.9011 were obtained for all amino acids, RSDs between 5.01 -24.56%, limit of detection between 0.08-4.09 mg L^{-1}, limit of quantification between 0.24 – 12 ,42 mg L^{-1} and recoveries in the range of 46.29 – 95.46% satisfactory results in view of the complexity of the steps. The derivatization steps, oven temperature, first and second dimension column types, injector temperature, transfer line and hot jet temperature, and finally the modulation period were optimized in this step. With all parameters adjusted, analyses of amino acids derived from fibroblast cells exposed to $MP_{2.5}$ were carried out by GCxGC-Q-TOFMS/MS. The impacts of $PM_{2.5}$ exposure on cells have been shown to be related to particle concentration. A total of four amino acids were down-regulated in exposed cells, including alanine, glycine, proline, and phenylalanine. By pathway analysis, aminoacyl-tRNA biosynthesis and phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis were highlighted as the main metabolic pathways disturbed by PM exposure. Overall, the results obtained help to

improve the understanding of particulate matter toxicity in contact with the skin and demonstrate that the developed method of sample preparation together with GC×GC-Q-TOFMS/MS analysis is suitable for metabolomics research in fibroblast cells. Furthermore, the results of this work open new avenues for further studies to elucidate the association of more classes of skin metabolites associated with atmospheric exposure.

Keywords: metabolomics; atmospheric pollution; particulate matter; amino acids; gas chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.1: Estrutura de pele 23
Figura 2.1.2: Estrutura da epiderme 24
Figura 2.2.1: Absorção direta de poluentes no tecido cutâneo. a) Absorção somente de material particulado. B) Absorção de material particulado + radiação UV 30
Figura 2.3.1: Fluxo de trabalho da análise metabolômica da pele danificada utilizando a técnica GC/MS 35
Figura 2.3.2: Protocolos de amostragem de pele. 38
Figura 2.3.3: Esquema de reação de aminoácidos com cloroformatos de alquila na presença de um álcool alifático e piridina 45
Figura 2.3.4: Representação gráfica de um sistema GCxGC 50
Figura 3.2.1: Etapas do processo de derivatização dos aminoácidos para análises de GC/MS 76
Figura 3.3.1: Cromatograma obtido no modo SIM dos quatorze aminoácidos extraídos das células de fibroblastos e derivatizados com propil clroformato 78
Figura 3.3.2: Comparação da área dos picos normalizados pelo PI entre o padrão de aminoácidos e os aminoácidos obtidos do extrato das células HDFa depois de passar pelo método de preparo de amostra descrito nos itens 3.2.6, 3.2.7 e 3.2.8 79
Figura 3.3.3: Concentração de aminoácidos nas células de fibroblastos (n=10) 80
Figura 4.2.1: Etapas do processo de derivatização dos aminoácidos para análise de GCxGC-Q-TOFMS/MS 87
Figura 4.3.1: Diagrama de cores de aminoácidos (0,2 mg L^{-1}) obtido por GCxGC-Q-TOFMS/MS utilizando as colunas HP-5MS (^{1}D) e Rxi®-200 (^{2}D) e período de modulação de 6 s 91
Figura 4.3.2: Diagrama de cores de aminoácidos (0,2 mg L^{-1}) obtido por GCxGC-Q-TOFMS/MS utilizando as colunas Zebrom AA (^{1}D) e Rxi®-5 Sil MS (^{2}D) e período de modulação de 4 s 91
Figura 4.3.3: Diagrama de cores de aminoácidos (0,2 mg L^{-1}) obtido por GCxGC-Q-TOFMS/MS utilizando as colunas HP-5MS (^{1}D) e Rxi®-17 Sil MS (^{2}D) e período de modulação de 4 s 92
Figura 4.3.4: Diagrama de cores de um padrão de aminoácidos (0,5 mg L^{-1}) obtidos por GCxGC-Q-TOFMS/MS utilizando as colunas HP-5MS (^{1}D) e Stabilwax (^{2}D) e período de modulação de 8 s 93

Figura 4.3.5: Diagrama de cores de íon extraído de um padrão de 0,5 mg L^{-1} contendo 18 aminoácidos 94
Figura 5.2.1: Esquema do amostrador de grandes volumes para a coleta de $MP_{2,5}$ ... 103
Figura 5.2.2: Sistema de amostragem dos filtros: A) Amostrador de grandes volumes (AGV) B) AGV aberto C) AGV com filtro fixado no porta filtro 103
Figura 5.2.3: Esquema de suspensão do $MP_{2,5}$: A) Filtros amostrados (MP_{PAC} e MP_{ECO}, respectivamente) B) Suspensão decantada C) MP depositado no fundo o béquer..... 104
Figura 5.2.4: Reação do MTT com as ezimas celulares para a formação do composto formazan 105
Figura 5.2.5: Etapas do processo de derivatização dos aminoácidos derivados dos extratos celulares e análises por GCxGC-Q-TOFMS/MS..... 107
Figura 5.3.1: Citotoxicidade das células HDFa expostas a diferentes concentrações de MP. a) Citotoxicidade de HDFa exposto a MP_{ECO} b) Citotoxicidade de HDFa exposto a MP_{PAC} 108
Figura 5.3.2: Diagrama de cores da análise de aminoácidos derivados de células de fibroblastos obtidos por GCxGC-Q-TOFMS/MS utilizando como colunas HP-5MS (^{1}D) e Stabilwax (^{2}D) e período de modulação de 8s.. 109
Figura 5.3.3: Aminoácidos diferenciados entre os grupos controle, MP_{ECO} e MP_{PAC}. a) e c) aminoácidos diferenciados entre os grupos controle e MP_{ECO} e entre os grupos controle e MP_{PAC}; b) aminoácido diferenciado entre os grupos controle e MP_{ECO} e d) aminoácido diferenciado entre os grupos controle e $MP_{PAC.}$ (Controle n=5, MP_{ECO} n=4 e MP_{PAC} n=4)..... 110
Figura 5.3.4: Gráfico de dispersão de PC1xPC2 de amostra de células de fibroblastos controle e expostas ao MP_{ECO} e MP_{PAC}..... 111
Figura 5.3.5: Resumo das vias metabólicas analisadas pelo software MetaboAnalyst a) MP_{ECO} e b) MP_{PAC}. 1, biossíntese de aminoacil-tRNA; 2, Biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano..... 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.2.1: Tipos e tamanhos de material particulado 27
Tabela 2.2.2: Classes e fontes de poluentes atmosféricos 28
Tabela 2.3.1: Técnicas de amostragem para estudos de pele 37
Tabela 2.3.2: Resumo das técnicas de extração mais amplamente utilizadas no preparo de amostras para estudos metabolômicos 43
Tabela 2.3.3: Instrumentação analítica utilizada, coluna, modo de injeção, programa de temperatura e analitos identificados durante estudos metabolômicos de pele danificada 48
Tabela 3.2.1: Tempos de retenção, relações m/z para os fragmentos de cada aminoácido após derivatização com propil cloroformato 75
Tabela 3.3.1: Faixa linear, coeficiente de determinação (R^2) e precisão (n=8) dos aminoácidos analisados por GC/MS 81
Tabela 4.2.1: Condições de execução e método cromatográfico do sistema GCxGC-Q-TOFMS/MS para análise de aminoácidos. 88
Tabela 4.3.1. Picos de identificação reconhecidos na Figura 4.3.4 com base na comparação de seus espectros de massa para bancos de dados de referência (MS) e índices de retenção (IR) após análise GC×GC-Q-TOFMS/MS. 95
Tabela 4.3.2: Figuras de mérito como coeficiente de determinação (R^2), faixa linear, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) obtidas para a análise de aminoácidos por GCxGC-Q-TOFMS/MS. 97
Tabela 5.3.1: Análise da via de metabólitos diferenciadas nas células danificadas ... 112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácidos
AGV	Amostrador de grandes volumes
Ala	L-alanina
ANN	Rede neural artificial (*Artificial neural network*)
ANOVA	Análise de variância
Asp	L-ácido aspártico
ATP	Adenosina trifosfato
BSTFA	N, O-Bistrifluoroacetamida
CDTN	Centro de desenvolvimento de tecnologia nuclear
CNN	Redes Neurais Convolucionais (*Convolutional Neural Networks*)
^{1}D	Primeira dimensão
^{2}D	Segunda dimensão
DA	Dermatite atópica
DL	Deep learning
DLD	Dihidrolipoil desidrogenase
DMEM	Meio essencial mínimo modificado (*Dulbecco's Modified Eagle Medium)*
DIMS	Injeção direta no espectrômetro de massas (*Direct-Injection Mass Spectrometry)*
DQ	Departamento de Química
DI-SPME	Microextração em fase sólida-injeção direta
d-MSPE	Extração Magnética Dispersiva de Fase Sólida (*Dispersive Magnetic Solid Phase Extraction*)
ECF	Etil cloroformato
FID	Detector de ionização de chama
FTIR	Espectroscopia por Transformada de Fourier (*Fourier Transform Spectroscopy*)
GA	Algoritmo genético (*Genetic Algorithm*)
GABA	Ácido aminobutirínico
GC-HRTOFMS	Cromatografia gasosa de alta resolução
GC / MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (*Gas chromatography /mass spectrometry*)
GCXGC	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (*Comprehensive two-dimensional gas chromatography*)
GCxGC-Q-TOFMS/MS	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplado à espectrometria de massas de alta resolução com triplo quadrupolo-tempo de voo (*Comprehensive two-dimensional gas chromatography with quadrupole accurate mass time-of-flight mass spectrometry)*
Glu	L-ácido glutâmico
Gly	L-glicina
HaCat	Queratinócitos

HCA	Análise de agrupamento hierárquico (*Hierarchical cluster analysis*)
HDFa	Fibroblastos derivados da derme humana (*Human Dermal fibroblasts*)
His	L-histidina
HMDB	Banco de dados do metaboloma humano *(Human Metabolome Database)*
HPA's	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*)
HS-SPME	Microextração em fase sólida no headspace
IBCF	Isobutil cloroformato
ICA	Análise de componente independente (*Independent Component Analysis*)
ICB	Instituto de ciências biológicas
Ile	L-isoleucina
LC / MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (*Liquid Chromatography /Mass Spectrometry)*
LD	Limite de detecção
Leu	L-leucina
LICM	Laboratório de Imunologia Celular e Molecular
LLE	Extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*)
LQ	Limite de quantificação
Lys	L-lisina
MAD	Derivatização assistida por microondas (*Microwave Assisted Derivatization*)
MCF	Metil cloroformato
Met	L-metionina
ML	Aprendizado de máquinas (*Machine learning*)
MP	Material Particulado
$MP_{0,1}$	Material Particulado com diâmetro aerodinâmico <0,1µm
$MP_{2,5}$	Material Particulado com diâmetro aerodinâmico <2,5µm
MP_{10}	Material Particulado com diâmetro aerodinâmico <10 µm
MS	Espectrometria de massas
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida)
MTBSTFA	N-terc-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio)
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida Adenina oxidase
OPLS-DA	Análise discriminante de mínimos quadrados ortogonais parciais (*Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis*)
PANs	Nitratos de peróxiacila (*Peroxyacyl Nitrates*)
PBS	Tampão fosfato (*phosphate buffered saline)*
PCA	Análise de components principais (*Principal Component Analysis)*
PCF	Propil cloroformato
Phe	L-Fenilalanina
PLS	Mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares)*

PLS-DA	Análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares-Discriminat Analysis)*
PM	Período de modulação
Pro	L-Prolina
QC	Controle de qualidade
RF	Floresta aleatória (*Random Florest*)
RMCA	Rede mineira de cromatografia avançada
RMN	Ressonância Magnética nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species)*
SBSE	Extração Sorptiva com Barra Agitadora (*Stir bar sorptive extraction)*
SDS	Dodecil sulfato de sódio *(sodium lauryl sulfate*)
SD1	Solução derivatizante 1
SD2	Solução derivatizante 2
Ser	L-Serina
SIM	Monitoramento de Íon Selecionado (*Selected Ion Monitoring*)
SPE	Extração em fase sólida *(Solid Phase Extraction*)
SPME	Microextração em fase sólida (S*olid Phase Microextraction)*
SOM	Mapa de auto-organização (*Self Organizing Map)*
SVM	Máquina de vetores de suporte (S*upport Vector Machine)*
SVR	Regressão de suporte de vetor (S*upport Vector Regression*)
TBDMCS	terc-butildimetilclorossilano
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (*tricarboxylic acid)*
TFA	Ácido trifluroacético
TFME	Microextração de Filme Fino (*Thin-film microextraction)*
Thr	L-Treonina
TMCS	Trimetilclorossilano
TMS	Trimetilsililação
TOF	Tempo de voo (*time-of-fligth*)
tRNA	RNA transpotador
Trp	L-triptofano
Tyr	L-tirosina
UCA	Ácido cis e trans-urocânico
UV	Ultravioleta
Val	L-valina
VOC'S	Compostos Orgânicos Voláteis (*Volatile Organic Compounds*)
WHO	Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*

Sumário

1 INTRODUÇÃO 21

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 23

2.1 PELE 23

2.2 MATERIAL PARTICULADO 25

2.3 METABOLÔMICA DA PELE DANIFICADA 34

2.3.1 Amostragem 35

2.3.2 *Quentching* 38

2.3.3 Preparo de amostra – Extração 40

2.3.4 Preparo de amostra – Derivatização 44

2.3.5 O uso de GC/MS no estudo metabolômico da pele danificada 46

2.3.6 Avanços da análise cromatográfica – GCxGC uma ferramenta relevante para estudos metabolômicos 49

2.3.7 Interpretação de dados 52

2.3.8 Identificação de alguns biomarcadores 54

2.4 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA 56

3 CULTURA CELULAR, EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS E ANÁLISE POR GC/MS 70

3.1 OBJETIVOS 70

3.1.1 Objetivo geral 70

3.1.2 Objetivos específicos 70

3.2 PARTE EXPERIMENTAL 70

3.2.1 Reagentes, solventes, soluções e gases 70

3.2.2 Suprimentos e equipamentos 71

3.2.3 Softwares 72

3.2.4 Solução padrão de aminoácidos 72

3.2.5 Cultura de células de fibroblastos derivados de pele humana 73

3.2.6 Coleta das células 73
3.2.7 Extração dos metabólitos 73
3.2.8 Derivatização dos metabólitos 73
3.2.9 Sistema cromatográfico 76
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 77
3.4 CONCLUSÃO 82
3.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA 83
4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE ACOPLADA A UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS DO TIPO QUADRUPOLO E TEMPO DE VOO (GCXGC-Q-TOFMS/MS) DERIVADOS DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS 84
4.1 OBJETIVOS 84
4.1.1 Objetivo geral 84
4.1.2 Objetivos específicos 84
4.2 PARTE EXPERIMENTAL 84
4.2.1 Reagentes, solventes, soluções e gases 84
4.2.2 Suprimentos e equipamentos 85
4.2.3 Softwares 86
4.2.4 Soluções padrão de aminoácidos 86
4.2.5 Derivatização dos padrões de aminoácidos 86
4.2.6 Sistema e método cromatográfico 88
4.2.7 Otimização dos parâmetros do método cromatográfico 88
4.2.8 Estudo dos principais parâmetros de mérito 89
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 90
4.4 CONCLUSÃO 98
4.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA 99

5 ESTUDO PILOTO DA EXPOSIÇÃO DO MATERIAL PARTICULADO EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DERIVADOS DE PELE HUMANA. UMA ABORDAGEM METABOLÔMICA..... 100

5.1 OBJETIVOS 100

5.1.1 Objetivo geral 100

3.1.2 Objetivo específico 100

5.2 PARTE EXPERIMENTAL 100

5.2.1 Reagentes, solventes, soluções e gases 100

5.2.2 Suprimentos e equipamentos 101

5.2.3 Software 102

5.2.4 Amostragem do $MP_{2,5}$ 102

5.2.5 Suspensão do $MP_{2,5}$ 104

5.2.6 Ensaio de viabilidade celular 104

5.2.7 Exposição do $MP_{2,5}$ nas células 105

5.2.8 Coleta das células 106

5.2.9 Extração dos metabólitos 106

5.2.10 Derivatização dos aminoácidos 106

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 108

5.3.1 Citotoxicidade do material particulado 108

5.3.2 Alterações de metabólitos analisados por GC×GC-Q-TOFMS/MS 109

5.3.3 Discussão 113

5.4 CONCLUSÃO 116

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 117

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 119

ANEXOS 121

1 INTRODUÇÃO

O material particulado está associado a diversos problemas de saúde. A exposição crônica a poluentes do ar afeta o sistema biológico da pele, danificando sua superfície ou mais profundamente, induzindo doenças dermatológicas e acelerando o seu envelhecimento (Marrot, 2018). Materiais particulados de até 2,5 μm ($MP_{2,5}$) já foram relatados como possíveis causadores do estresse oxidativo e da inflamação na pele humana (Magnani et al., 2016). Estudos já demostraram também que as partículas poluentes alteram uma série de mediadores da família do fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina oxidase (NADPH) e regula, positivamente, fatores de transcrição sensíveis dentro dos núcleos celulares devido a esse elevado estresse oxidativo e mecanismos inflamatórios (Lee et al., 2016; Magnani et al., 2016; Rajagopalan et al., 2019; Romani et al., 2018; Verdin et al., 2019).

Entender as rotas bioquímicas que levam ao aparecimento dessas alterações na pele causadas pela poluição atmosférica é de fundamental importância para a prevenção e mecanismos de reparo desse órgão. A metabolômica pode ser uma ferramenta eficaz nesse tipo de estudo, pois é capaz de fornecer informações sobre mudanças qualitativas e quantitativas globais de um metabolismo, bem como identificar as vias bioquímicas e apresentar um estado fisiológico geral, como estresse ou hiperatividade do sistema (Kimball et al., 2012; Randhawa et al., 2014). Além disso, ela pode apresentar uma visão abrangente dos metabólitos primários e intermediários, bem como de compostos exógenos, como drogas e outros compostos químicos que constituem uma célula, tecido ou organismo (Calciolari & Donos, 2020; Cambiaghi et al., 2017; Kimball et al., 2012; Randhawa et al., 2014).

As estratégias de análise de dados metabolômicos são classificadas em dois grupos: direcionados (*target)* e não direcionados (*untarget*) (Gorrochategui et al., 2016). A análise direcionada para a classe de aminoácidos pode ser uma via interessante quando se deseja descobrir vários tipos de doenças ou modificações do sistema, devido ao fato desses compostos desempenharem papéis cruciais tanto no metabolismo anabólico quanto catabólico, pois fornecem energia metabólica, são precursores de muitos metabólitos-chave para o funcionamento do organismo, além de participarem dos blocos de construção das proteínas, ou seja, uma ferramenta complementar aos estudos proteômicos (Yang et al., 2017).

Diversas técnicas analíticas como ressonância magnética nuclear (RMN) (Carrola et al., 2016), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR- *Fourier-Transform Infrared*) (Rehman et al., 2012) e a injeção direta no espectrômetro de massas (DIMS – *Direct Injection Mass Spectrometry*) (Kuehne et al., 2017) podem ser aplicadas em estudos metabolômicos. Porém técnicas hifenizadas como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS- *Gas Chromatography- Mass Spectrometry*) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC/MS – *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) tornaram-se mais atrativas nesse campo de pesquisa, pois conjugam a capacidade de separação da cromatografia com a elevada seletividade da espectrometria de massas (Kanani et al., 2008; Khodadadi & Pourfarzam, 2020; X. W. Zhang et al., 2020).

GC/MS é uma das técnicas bem-conceituadas quando aplicadas a esse tipo de estudo devido a sua alta sensibilidade; resolução; reprodutibilidade; extenso banco de dados; menor custo de aquisição (quando comparado à LC/MS) e maior facilidade de operação. Além disso, melhores resultados podem ser obtidos com a utilização de duas colunas ortogonais com composições diferentes como na cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC) (Stilo et al., 2020).

Diante do apresentado, o objetivo geral deste estudo foi avaliar alterações metabólicas, para a classe de aminoácidos, em células de fibroblastos derivados da pele humana, expostas ao material particulado atmosférico ($MP_{2,5}$) coletado em dois diferentes pontos, um em uma via de intenso tráfego de carros e outro próximo a um parque ecológico. O estudo contou com investigação dos aminoácidos alterados nas células por meio de análise realizadas por cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (GCxGC-Q-TOFMS/MS).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE

A pele é um órgão funcionalmente sofisticado que está em constate renovação e manutenção de seus componentes. Em um ser humano adulto, sua área média pode chegar a dois metros quadrados e sua massa junto ao tecido subcutâneo pode atingir até vinte quilos. Ela é capaz de responder a distúrbios internos, pois permite que muitas das manifestações do organismo se expressem por alterações cutâneas, e a distúrbios externos, pois está em contato direto com o ambiente (Matwiejczuk et al., 2020).

A pele desempenha diversas funções essenciais para a manutenção da vida que compreende desde aspectos passivos como a proteção, e ativos como o sistema sensorial. Ela protege o corpo de altas variações de temperatura (termorregulação), radiação solar, espécies reativas de oxigênio (ROS), produtos químicos, micro-organismos e parasitas, bem como exibe diversas atividades como a síntese de Vitamina D_3, hormônios e melanina (Granger et al., 2020; Matwiejczuk et al., 2020).

O tecido cutâneo é composto por três camadas que conferem a ele flexibilidade e durabilidade, como a epiderme, a derme e a hipoderme. A epiderme é um epitélio plano queratinizado de múltiplas camadas e encontra-se firmemente acoplada à derme, tecido fibroso composto de colágeno e elastina. Abaixo da derme, reside o tecido conjuntivo adiposo, a hipoderme (Figura 2.1.1)(Arda et al., 2014; Matwiejczuk et al., 2020).

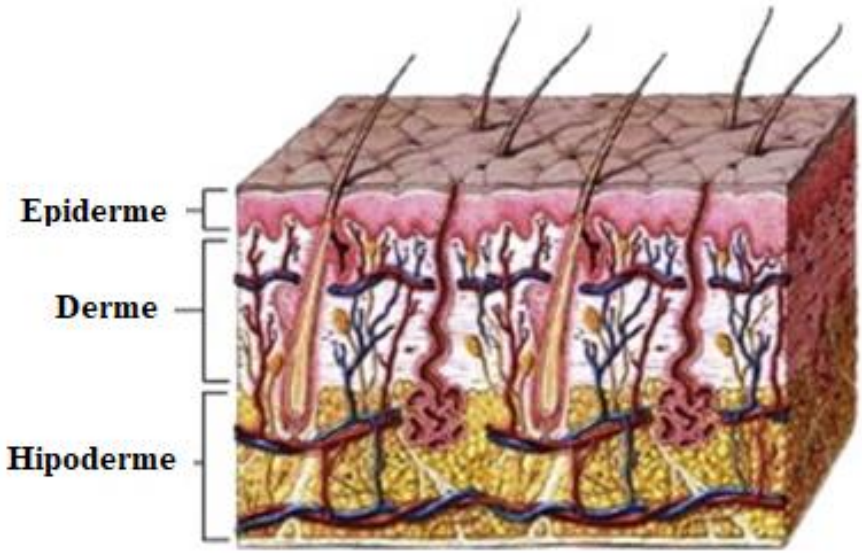

Figura 2.1.1: Estrutura de pele – Adaptado de Khavkin & Ellis, 2011

A epiderme é formada de quatro a cinco níveis de células de queratinócitos diferenciadas pela morfologia, grau de maturação e profundidade, dependendo da

localização do corpo. As camadas mais superficiais, cobertas por queratina, são justapostas umas às outras, em contrapartida, as mais profundas dividem–se continuamente e atravessam as camadas superiores até chegarem na superfície, onde morrem. Começando da parte mais profunda da epiderme em direção à superfície da pele, essas camadas são o estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido (não presente na pele fina) e estrato córneo (Figura 2.1.2)(Arda et al., 2014). Em geral, a espessura da epiderme pode variar de 0,1 mm nos locais mais finos como a pálpebra, até 1mm em locais mais espessos como nas plantas dos pés (Dréno, 2009).

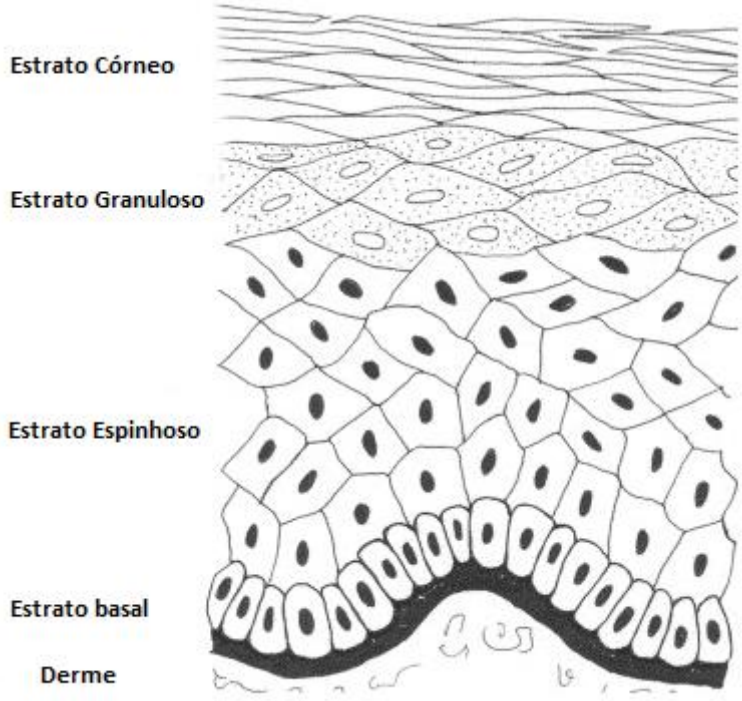

Figura 2.1.2: Estrutura da epiderme – Adaptado de Wickett & Visscher, 2006

A epiderme não possui vascularização, ela recebe seus nutrientes por contiguidade com a derme. Ambas estão conectadas por meio de duas diferentes lâminas: a lâmina lúcida, composta de filamentos âncora os quais conectam-se à membrana plasmática da célula basal na epiderme e a lâmina densa à qual é conectada à derme subjacente por meio de fibrilas de ancoragem de colágeno. A interface entre estas camadas é conhecida como junção dermoepidérmica ou zona da membrana basal a qual permite a nutrição da epiderme (ascendente) e a entrada de substâncias para a derme (descendente) (Losquadro, 2017).

A derme é a responsável pela resistência estrutural da pele, geralmente ela possui uma espessura maior que 2 mm podendo chegar até 4 mm. As forças de cisalhamento e a

resistência à ruptura da derme variam entre 5 a 15 Mpa (Mega pascal) na face e de até 27 Mpa na pele das costas. Ela é composta majoritariamente por células de fibroblastos os quais são os maiores produtores de colágeno, elastina e outros tipos de proteínas. Além disso, também estão presente na derme os vasos sanguíneos e linfáticos, receptores sensoriais, glândulas, músculos lisos e folículos pilosos (Losquadro, 2017; Wong et al., 2016).

Dentre todos os componentes presentes na derme, são os fibroblastos aqueles capazes de sintetizar e depositar no espaço extracelular todos os elementos constituintes necessários para o funcionamento da derme. Essas células são responsáveis pela diferenciação epitelial, pela regulação da inflamação, pela cicatrização de feridas e pela síntese de colágeno. Além disso, elas participam da síntese de matriz extracelular dérmica e dão suporte para vários outros tipos de células (Fernandes et al., 2016; Woodley, 2017).

Os fibroblastos possuem um papel importante na sustentação e saúde da pele e são diretamente afetados pela exposição ao material particulado, pois sua atividade proliferativa e metabólica diminui levando também à redução da síntese de substâncias estruturais como colágeno, elastina, ácido hialurônico entre outros (Reynolds et al., 2021). A exposição ao MP aumenta a produção de enzimas capazes de degradar as proteínas da matriz extracelular comprometendo a integridade da pele resultando na aparência de envelhecimento (Reynolds et al., 2020).

Por fim, abaixo da derme reticular encontra-se um tecido conjuntivo mais frouxo, a hipoderme. Essa camada é constituída por adipócitos separados por delicados septos de colágeno com estruturas nervosas, vasculares e linfáticas. Possui a função de prevenir os órgãos contra a perda de calor (isolante térmico) e de lesões mecânicas, mas também serve como reserva de fornecimento de energia (Khavkin & Ellis, 2011).

2.2 MATERIAL PARTICULADO

O material particulado (MP) é o termo usado para descrever um tipo de mistura complexa de poluentes, composto por partículas de vários tamanhos e diferentes composições presentes no ar. Essas partículas podem ser divididas em três categorias que dependem de sua dimensão: ultrafinos, aquelas com diâmetro aerodinâmico menores que 0,1 μm ($MP_{0,1}$); finos, aquelas que apresentam um diâmetro menor que 2,5 μm ($MP_{2,5}$) e grossos, com diâmetro aerodinâmico menor que 10 μm (MP10) (Englert, 2004).

O aporte de MP para o ambiente pode ocorrer por meio de fontes tanto externas quanto internas. As externas são provenientes, geralmente, de atividades industriais e de fontes móveis, como o tráfego rodoviário e aéreo. Essas fontes podem produzir poluentes primários como MPs, gases *(*CO_2, CO, SO_2, NO, NO_2, Nox) e compostos orgânicos voláteis (VOCs- *Volatile Organic Compounds*) como os hidrocarbonetos de baixa massa molar. As fontes internas, correspondem à queima de combustíveis fosseis, como biomassa (madeira, carvão, esterco), em ambientes fechados para aquecimento ou cozimento. Essas práticas podem gerar uma grande quantidade de MP, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) e monóxido de carbono (Fussell & Kelly, 2020; Krutmann et al., 2014a; Manisalidis et al., 2020).

O MP pode alterar-se por meio de reações fotoquímicas e calor, e formar os poluentes secundários como o ozônio e os nitratos de peróxiacila (PANs- *Peroxyacyl Nitrates*) os quais permanecem na atmosfera (troposfera) e se alojam tanto nas áreas urbanas quanto nas rurais, formando o que normalmente é conhecido como smog fotoquímico (Fussell & Kelly, 2020; Krutmann et al., 2014a; Manisalidis et al., 2020). A Tabela 2.2.1 mostra os tipos e diâmetros dos materiais particulados que podem ser encontrados tanto em ambientes externos quanto internos, e a Tabela 2.2.2 resume as classes e fontes de poluentes atmosféricos.

Tabela 2.2.1: Tipos e tamanhos de material particulado. Retirado de Manisalidis et al., 2020.

Modelo		**Diâmetro MP [µm]**
Contaminantes particulados	Smog	0,01-1
	Fuligem	0,01–0,8
	Fumo do tabaco	0,01-1
	Cinzas volantes	1-100
	Pó de cimento	8–100
Contaminantes Biológicos	Bactérias e esporos bacterianos	0,7-10
	Vírus	0,01-1
	Fungos e bolores	2-12
	Alérgenos (pelos de cães e gatos, pólen, poeira doméstica)	0,1–100
Tipos de Pó	Poeira atmosférica	0,01-1
	Poeira pesada	100-1000
	Poeira depositada	1-100
Gases	Diferentes contaminantes gasosos	0,0001–0,01

Tabela 2.2.2: Classes e fontes de poluentes atmosféricos. Retirado de Araviiskaia et al., 2019.

Classe de poluente do ar	**Nome/Exemplos**	**Fontes potenciais de poluentes**
Gasoso	Monóxido de carbono	Queima de combustível fóssil, emissão veicular
	Dióxido de nitrogênio	Queima de combustível, queima de madeira, emissões de veículos, incineração de resíduos
	Ozônio	Formado pela interação de VOCs e compostos de óxido de nitrogênio após fotoativação UV
	Dióxido de enxofre	Queima de combustível, emissões de veículos, transporte marítimo, instalações industriais, vulcões
Metais pesados	Arsênio	Fabricação de baterias, minerais
	Cádmio	Fabricação de baterias, indústria aeronáutica, fabricação de televisores
	Chumbo	Tinta à base de chumbo, material de encanamento
	Níquel	Fundição, soldagem, fabricação de baterias
Material Particulado (MP)	Grosso MP_{10} (2,5–10 μm)	Poeira da estrada, estradas não pavimentadas, incêndios florestais, degradação de resíduos, lixo eletrônico, processos de cozimento
	Fino $MP_{2,5}$ (<2,5 μm)	Queima de combustíveis fósseis, instalações industriais, transporte marítimo, queima de biomassa, incineração de resíduos, cozimento
	Ultrafino $MP_{0,1}$ (<0,1 μm)	Emissão de veículos, instalações industriais
Compostos orgânicos persistentes	Dioxinas, bifenilos policlorados semelhantes a dioxinas	Herbicidas, pesticidas, processos industriais, incêndios florestais, erupções vulcânicas
Compostos orgânicos semivoláteis	Hidroxitolueno butilado, dietil ftalato, nicotina (na forma de base livre), parabenos, dentre outros	Solventes, fragrâncias, bactericidas, agentes antimicrobianos, pisos, móveis
VOCs	Acetaldeído, dimetilformamida, formaldeído, hexano, estireno, tolueno, xileno	Queima de combustível, emissão de aeronaves, produtos domésticos, solventes químicos, tintas, vernizes, fumaça de cigarro

O material particulado está associado a diversos problemas de saúde. Segundo a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*-WHO, 2018), mais de noventa por cento da população urbana vive com níveis de poluentes acima do limite padrão permitido. Além disso, números publicados no relatório de poluição atmosférica da WHO de 2012 indicaram que 11,6 % de todas as mortes globais, em 2012, foram devido à poluição do ar, colocando, então, esse tópico como o maior risco individual à saúde ambiental do mundo (Krutmann et al., 2014a).

Pesquisas demostram que não apenas doenças pulmonares e cardiovasculares (Arbex et al., 2012; Brook et al., 2004) estão associadas à poluição atmosférica, mas também fatores como a depressão (Fan et al., 2020) e efeitos adversos no sistema nervoso em adultos (Shehab & Pope, 2019) já foram relatados como possíveis danos desse ambiente nocivo. Nesse sentido, como o principal órgão exposto a esses compostos, a pele também é afetada. Materiais particulados de até 2,5 μm ($MP_{2,5}$) já foram relatados como possíveis causadores do estresse oxidativo e da inflamação na pele humana (Magnani et al., 2016).

Mesmo desconhecendo a capacidade de penetração do MP na pele, diversos estudos ocupacionais indicaram que a absorção cutânea é uma rota direta de contaminação de poluentes (Fustinoni et al., 2010; Kammer et al., 2011; VanRooij et al., 1993). Além disso, foi demostrado que partículas menores que 1,5 μm de diâmetro penetram eficientemente nos folículos capilares até uma profundidade maior que 2 mm (Lademann et al., 2004). Isso indica que a rota transfolicular pode permitir que as partículas ambientais e seus constituintes ligados à superfície, como metal pesado e HPAs, alcancem células, como melanócitos, queratinócitos e até as camadas mais profundas da pele como a derme e, consequentemente, os fibroblastos (Figura 2.2.1)(Araviiskaia et al., 2019; Fussell & Kelly, 2020).

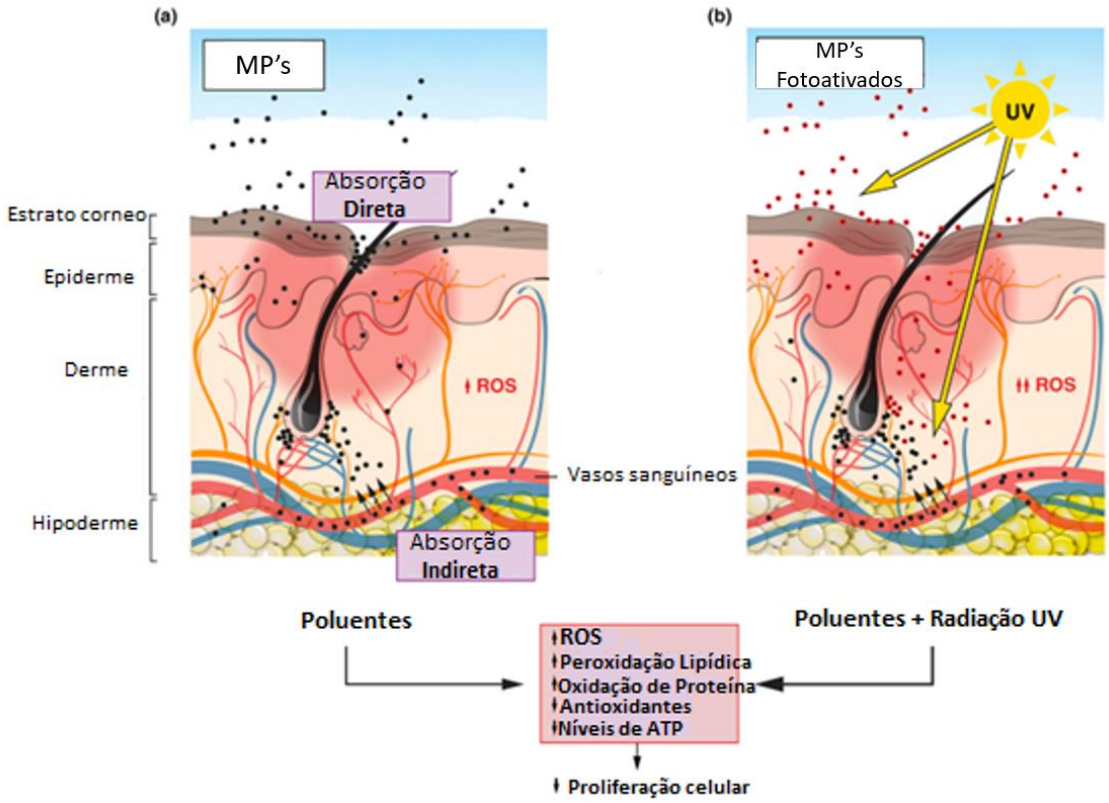

Figura 2.2.1: Absorção direta de poluentes no tecido cutâneo. A) Absorção somente de material particulado. B) Absorção de material particulado + radiação UV. Adaptado de Araviiskaia et al., 2019

É possível avaliar, de acordo com a literatura, que a exposição crônica a poluentes do ar afeta a saúde da pele, danificando sua superfície ou mais profundamente, induzindo doenças dermatológicas e acelerando o seu envelhecimento (Marrot, 2018). Estudos já demostraram que as partículas poluentes alteram uma série de mediadores da família do fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina oxidase (NADPH) e regula positivamente fatores de transcrição sensíveis dentro dos núcleos celulares devido ao elevado estresse oxidativo e mecanismos inflamatórios (Lee et al., 2016; Magnani et al., 2016; Rajagopalan et al., 2019; Romani et al., 2018; Verdin et al., 2019).

Um dos principais mecanismos pelos quais as partículas ambientais exercem um efeito prejudicial na pele é por meio das espécies reativas de oxigênio (ROS) que desregulam a homeostase (equilíbrio) desse órgão devido ao elevado estresse oxidativo que pode levar ao declínio de sua capacidade antioxidante e com isso a efeitos deletérios (Valacchi et al., 2012). Já foram relatados que partículas ricas em HPAs podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio que, em contato com a pele, contribuem para a geração de radicais livres e juntos interagem com a membrana plasmática rica em lipídeos e iniciam uma cascata de oxidação lipídica (Hu et al., 2017). O aumento das ROS

pode ativar a liberação de mediadores pró-inflamatórios de uma variedade de células da pele estimulando a infiltração cutânea por neutrófilos ativados e outras células fagocíticas que geram mais radicais livres estabelecendo, assim, um círculo vicioso(Valacchi et al., 2012).

Piao e colaboradores (2018) propuseram que a geração de ROS induzidas por $MP_{2,5}$ em queratinócitos epidérmicos humanos causou danos estruturais, incluindo oxidação do DNA, peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas. Os autores levantaram a hipótese de que a superprodução de ROS induzida por $MP_{2.5}$ afetou o retículo endoplasmático que estava associado à degradação de proteínas induzida por autofagia e morte celular programada. O $MP_{2.5}$ também induziu alterações estruturais das mitocôndrias promovendo o estresse oxidativo por meio da destruição dessas organelas levando à produção reduzida de adenosina trifosfato (ATP) e aumentando a degradação celular (Piao et al., 2018).

Além de intensificar o estresse oxidativo devido às pequenas partículas poluentes presente no ar as quais são transportadoras de diversos compostos, seja orgânico como os HPAs ou inorgânicos como os metais pesados, percebe-se que a poluição atmosférica também é um fator contribuinte importante para o envelhecimento da pele e outras doenças dermatológicas como dermatite atópica, acne, psoríase, câncer de pele, dentre outros (Magnani 2015; Vierkötter et al., 2010).

Já foi relatado que os HPAs presentes no material particulado desencadeiam o envelhecimento das células da pele humana (queratinócitos e fibroblastos) através da parada do ciclo celular, inibição do crescimento celular e apoptose (Dong et al., 2019; K. E. Kim et al., 2016). Ding et al., 2017 mediram a exposição interna de $MP_{2.5}$ em 30 residências, em Taizhou na China, no período de 2013-2014, e, com um modelo de regressão desenvolvido, eles descobriram que níveis de exposição de $MP_{2,5}$ foram associados positivamente com manifestações de envelhecimento da pele, com características relacionadas a rugas na testa e no lábio superior, flacidez das pálpebras, rugas finas na pele dorsal das mãos, entre outros (Ding et al., 2017). Em outro estudo, Krutmann e colaboradores (2014) utilizaram partículas de diesel aplicadas a queratinócitos e melanócitos humanos primários in vitro e os resultados mostraram o aparecimento de genes envolvidos na formação de rugas e de manchas (Krutmann et al., 2014b).

Martens e Nawrot (2018) relataram que exposições ambientais adversas podem levar a uma mudança molecular que resulta no processo de envelhecimento refletido pelo

encurtamento dos telômeros, um dos fatores presentes no processo de envelhecimento celular. Eles avançaram na hipótese do envelhecimento telômero-mitocondrial induzido pela poluição do ar, indicando que a formação de ROS pode explicar uma cascata de danos na qual tanto as mitocôndrias quanto os telômeros são afetados. Essa hipótese poderia explicar o mecanismo pelo qual a poluição do ar altera o fenótipo do envelhecimento (Martens & Nawrot, 2016, 2018).

Outra alteração de pele agravada pela poluição atmosférica é a dermatite atópica (DA) que compreende em uma doença inflamatória crônica e recorrente da pele com sintomas como coceira e eczema que, geralmente, começam na infância (K. E. Kim et al., 2016). Embora os mecanismos biológicos da DA permaneçam obscuros, a poluição ambiental tem sido apontada como um dos fatores complicadores da DA em pacientes com predisposição genética e mecanismos imunológicos (Flohr & Mann, 2014; Kimata, 2004). Em um estudo para avaliar os efeitos clínicos da poluição do ar nos sintomas de pele de crianças com DA, 30 pacientes de uma creche de Seul foram acompanhados, regularmente, de segunda a sexta-feira, durante 8 horas por dia, e suas pontuações diárias de sintomas foram registradas. Os autores observaram que a taxa dos sintomas de DA aumentaram significativamente à medida que a poluição aumentou levando à conclusão de que os poluentes atmosféricos internos levam à piora da DA em crianças (K. H. Kim et al., 2015).

A acne é uma doença inflamatória e multifatorial e, com isso, também é alvo das partículas poluentes ambientais. Pacientes com acne possuem uma alteração na microbiota da pele causada, principalmente, pelo *propionibacterium acnes* (*P. acnes*) o que leva a uma ativação da imunidade inata e, portanto, inflamação (Dréno et al., 2018). Um estudo ao longo de 2 anos, em Pequim, identificou que concentrações aumentadas de $MP_{2,5}$, MP_{10} e NO_2 foram, significativamente, associadas ao aumento do número de consultas ambulatoriais para acne vulgar (W. Liu et al., 2018). Além disso, um estudo chinês realizado durante 3 anos, mostrou a mesma relação entre a exposição de curto prazo à poluição do ar e ao aumento de consultas ambulatoriais para acne pós-adolescência, especialmente em mulheres (X. Li et al., 2021). A ocorrência de acne inflamatória em adultos libaneses também foi associada à exposição ambiental com altos níveis de NO_2 e ao emprego próximo a uma usina de energia conhecida por emitir CO_2, CO, SO_2, NO_2 e MP (El Haddad et al., 2021). Portanto, esses fatos indicam que a poluição ambiental afeta diretamente na gravidade e/ou no surgimento da doença em diferentes lugares do mundo.

A psoríase pode ser uma das doenças agravadas pelos contaminantes ambientais. Já foi relatado que o cádmio é um dos poluentes atmosféricos que afetam a patogênese da psoríase, pois pode comprometer a imunidade, e a perturbação microambiental e predispor ao agravamento da psoríase (Kamiya et al., 2019). Pacientes com psoríase grave apresentaram níveis mais elevados de cádmio no sangue quando comparados com a população em geral (Liaw et al., 2017). Em um outro estudo relacionando pacientes com psoríase e poluição atmosférica, foi descoberto que as concentrações de todos os poluentes investigados durante a pesquisa foram significativamente maiores nos 60 dias antes do surto de psoríase em comparação com a visita de controle, o que sugere que a poluição do ar pode ser um fator desencadeante para a piora dessa doença.

O risco de câncer de pele devido à exposição ao MP, embora não seja totalmente conhecido, é um fator que também deve ser levado em consideração (Kee et al., 2021). De acordo com vários estudos de coorte, existe uma correlação positiva entre a exposição de $MP_{2.5}$ e incidência de câncer de pele, incluindo melanoma (Avogbe et al., 2005; K. E. Kim et al., 2016; J. Liu et al., 2019). Um outro estudo usando células HaCaT relatou um risco de câncer por exposição a $MP_{2.5}$ com aumento de apoptose e respostas inflamatórias mediadas por interleucina (Y. Zhang et al., 2017). Quase todos os fatores de risco são baseados nos efeitos carcinogênicos dos componentes perigosos do $MP_{2.5}$, incluindo os HPAs, e na estimulação de seus sinais citotóxicos que levam à carcinogênese como, por exemplo, na produção exacerbada de níveis de ROS e secreção de citocinas pró-inflamatórias (Godic et al., 2014; Gorgizadeh et al., 2019; Haigh et al., 2001).

Diferentes estudos mostram que os fatores negativos da exposição ao material particulado na pele são muitos e que resultam em uma ampla gama de sinais visíveis e fisiológicos. Compreender os mecanismos que levam a esses processos prejudiciais é de suma importância para a aplicação de intervenções mais adequadas e seguras na preservação da saúde desse órgão. A metabolômica pode apresentar um caminho eficaz para o entendimento desses processos prejudiciais, pois é capaz de fornecer informações sobre mudanças qualitativas e quantitativas globais de um metabolismo, bem como identificar as vias bioquímicas e apresentar um estado fisiológico geral, como estresse ou hiperatividade do sistema (Kimball et al., 2012; Randhawa et al., 2014).

2.3 METABOLÔMICA DA PELE DANIFICADA

Os estudos metabolômicos envolvem a identificação e quantificação de metabólitos, ou seja, pequenas moléculas (<1500 Da), com o intuito de correlacionar suas alterações com estados patológicos, ou com o efeito de fatores externos. A metabolômica pode ser aplicada para entender melhor os processos da pele danificada, pois tem uma visão abrangente dos metabólitos primários e intermediários, bem como de compostos exógenos, como drogas e outros compostos químicos que constituem uma célula, tecido ou organismo (Calciolari & Donos, 2020; Cambiaghi et al., 2017; Kimball et al., 2012; Randhawa et al., 2014).

Esse campo de pesquisa pode apresentar dois tipos de abordagem analítica: análise direcionada, alvo, e não direcionada, não alvo. A abordagem direcionada geralmente é impulsionada por questões biológicas conhecidas, permite a detecção e quantificação mais precisas, mas requer que os compostos de interesse sejam conhecidos *a priori* e estejam disponíveis em sua forma purificada. A abordagem não direcionada, por sua vez, é orientada por uma hipótese e geralmente suas análises são realizadas de forma qualitativa observando mudanças totais nos padrões cromatográficos (Cambiaghi et al., 2017; Patti et al., 2012; Shulaev, 2006).

Os estudos metabolômicos podem utilizar diferentes técnicas de análise que permitem elevada confiabilidade na aquisição dos dados. Ressonância magnética nuclear (RMN) (Carrola et al., 2016), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) (Fukumoto et al., 2017; Kang et al., 2017) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC/MS) (Jacob et al., 2019) são algumas das técnicas analíticas que vêm sendo aplicadas em estudos metabolômicos. Devido à maior seletividade obtida pela espectrometria de massas, técnicas hifenizadas como GC/MS e LC/MS tornaram-se muito utilizadas nesse campo de pesquisa. O GC/MS, em particular, possui alta sensibilidade e resolução, boa reprodutibilidade, extenso banco de dados, menor preço de aquisição e maior facilidade de operação. Além disso, junto à derivatização, uma ampla gama de compostos de diferentes polaridades pode ser investigada com GC/MS (Kanani et al., 2008; Khodadadi & Pourfarzam, 2020; X. W. Zhang et al., 2020).

A metabolômica da pele danificada por meio de estressores ambientais encontra-se nos seus estágios iniciais. Muitos esforços ainda devem ser feitos para a busca de biomarcadores confiáveis e preditivos capazes de indicar o início dos efeitos negativos causados por essas partículas e, assim, propor alternativas para reverter ou prevenir esses

danos. Para alcançar o sucesso dessas investigações, se faz necessário que os pesquisadores estejam atentos a várias etapas que abrangem os estudos metabolômicos. Nesta revisão de literatura, foram resumidos os métodos atuais utilizados para amostragem e preparo de amostra de células e tecidos em estudos metabolômicos da pele danificada e sua determinação por GC/MS (Figura 2.3.1).

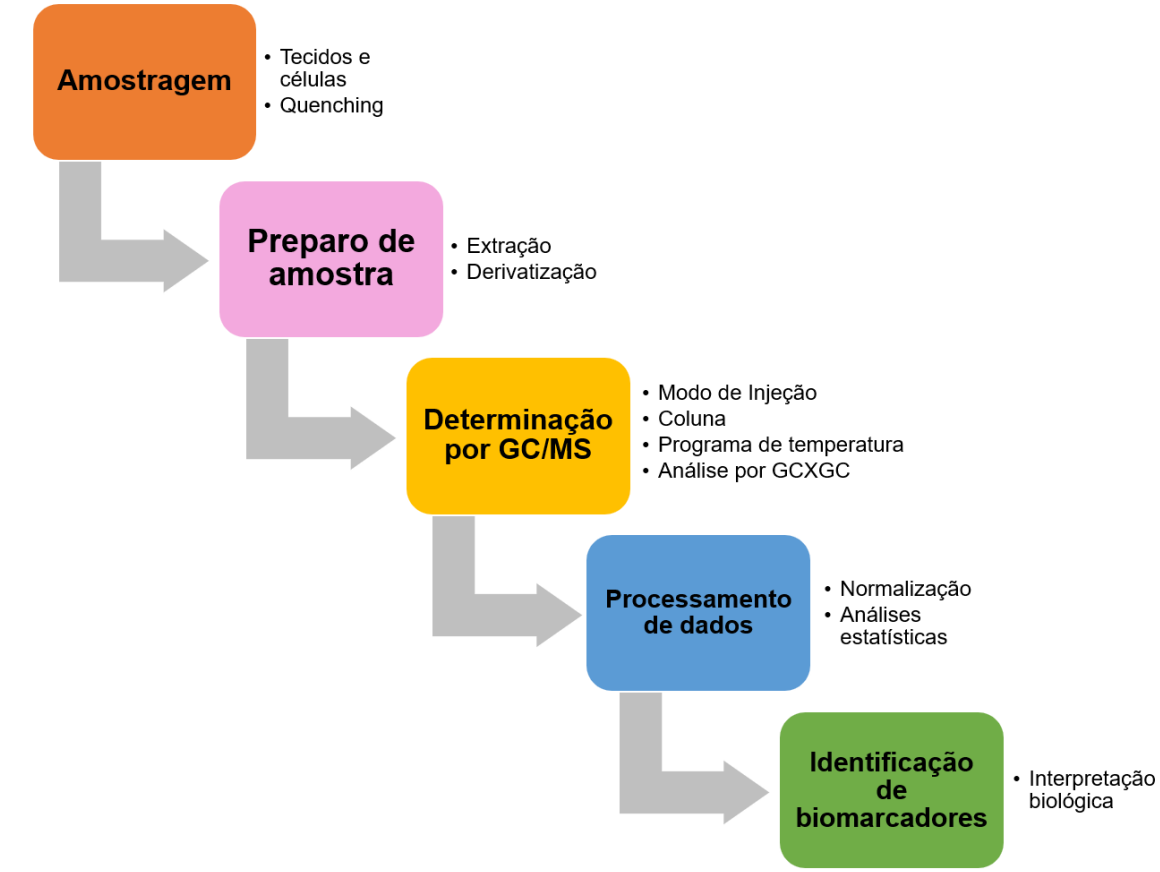

Figura 2.3.1: Fluxo de trabalho da análise metabolômica da pele danificada utilizando a técnica GC/MS

2.3.1 Amostragem

A coleta das amostras é uma etapa importante no estudo metabolômico, pois afeta diretamente a qualidade dos dados. Como a pele é o maior órgão do corpo humano, muitos métodos de amostragem podem ser aplicados para identificar biomarcadores cutâneos e entender os detalhes de sua composição molecular. Além disso, a amostragem de pele pode ser realizada em matrizes convencionais, como camadas do órgão (derme, epiderme ou gordura superficial), bem como análise de suor, sebo e compostos voláteis emanados por ela (Elpa et al., 2021; J. Li et al., 2017).

As técnicas de coleta mais comuns aplicadas para obtenção de amostras de pele incluem métodos invasivos como *stripping*, iontoforese, microagulhamento, microdiálise, bolha de sucção e biópsia (Tabela 2.3.1 e Figura 2.3.2). A biópsia é comumente empregada devido às vantagens como operação simples, preservação morfológica e coleta de alvos completos. No entanto, os métodos invasivos são considerados hostis ao paciente porque consomem tempo, causam dor e estão suscetíveis a um maior potencial de complicações. Como alternativa, métodos não invasivos, como células e tecidos da pele transplantados em cultura, pele humana reconstruída, homogeneizados microssomais e citoplasmáticos da pele e fluido de tecido da pele, podem ser aplicados, como amostragem amigável ao paciente (Elpa et al., 2021; J. Li et al., 2017).

Análises in vitro não invasivas, como células e tecidos transplantados em cultura, vêm ganhando atenção dos pesquisadores, pois esse tipo de amostragem oferece diversas vantagens como experimentos de fácil controle, maior reprodutibilidade, menor custo e facilidade de interpretação dos resultados quando comparados aos modelos invasivos que envolvem humanos ou animais. Além disso, variáveis como idade, sexo, variação entre indivíduos e controle populacional não são um problema para estudos in vitro envolvendo células da pele. Nesse sentido, esta revisão teve como foco a amostragem e preparação de amostras de células e tecidos da pele (León et al., 2013).

Tabela 2.3.1: Técnicas de amostragem para estudos de pele

Técnicas de amostragem	Parte coletada	Método	Vantagens	Limitações	Ref
Biópsia	Epiderme Derme Gordura superficial	Invasivo	Simples operação, preservação morfológica	Perdas e distorções significativas de informações durante a coleta e o manuseio variável das amostras Preparo de amostra complexo	(Paliwal et al., 2013)
Iontoforese reversa	Fluido Intersticial	Minimamente invasivo	Simples, possível adquirir uma variedade de analitos simultaneamente	Tempo gasto, interrupção por suor, precisam de calibração constante. Alguns fatores afetam o processo de transporte; como a espessura da pele, carga da pele, entre outros.	(Giri et al., 2017; Sieg et al., 2009)
Ultrassom	Fluido Intersticial	Minimamente invasivo	Acessibilidade minimamente invasiva às camadas mais profundas da pele e sensibilidade de amostragem temporal aprimorada	Potencial desnaturação de biomarcadores, dispositivo complexo	(Paliwal et al., 2013)
Microdiálise	Fluido intersticial	Invasivo	Amostras isentas de proteínas e prontamente analisáveis sem a necessidade de purificação analítica adicional.	Baixa recuperação relativa principalmente de substâncias muito lipofílicas	(Kreilgaard , 2002)
Bolha de sucção	Epiderme Fluido intersticial	Invasivo	Simples	Tempo de amostragem longo que pode alterar a estrutura do biomarcador	(Lei & Prow, 2019)
Microagulhamento	Fluido Intersticial	Minimamente invasivo	Simples de usar e baixo consumo de reagentes	Alta variação de amostragem devido a uma variedade de fatores que podem afetar a penetração da agulha e a quantidade de absorção da amostra, incluindo a espessura da pele e o tamanho da microagulha	(Lei & Prow, 2019)
Tira de fita	Estrato córneo Excreções cutâneas	Minimante invasivo	Rápido, conveniente e amigável ao paciente.	Falta de protocolo padronizado Amostragem heterogênea (variação nos detalhes do procedimento, como hidratação da pele, local do corpo e diferenças interindividuais)	(Paliwal et al., 2013)

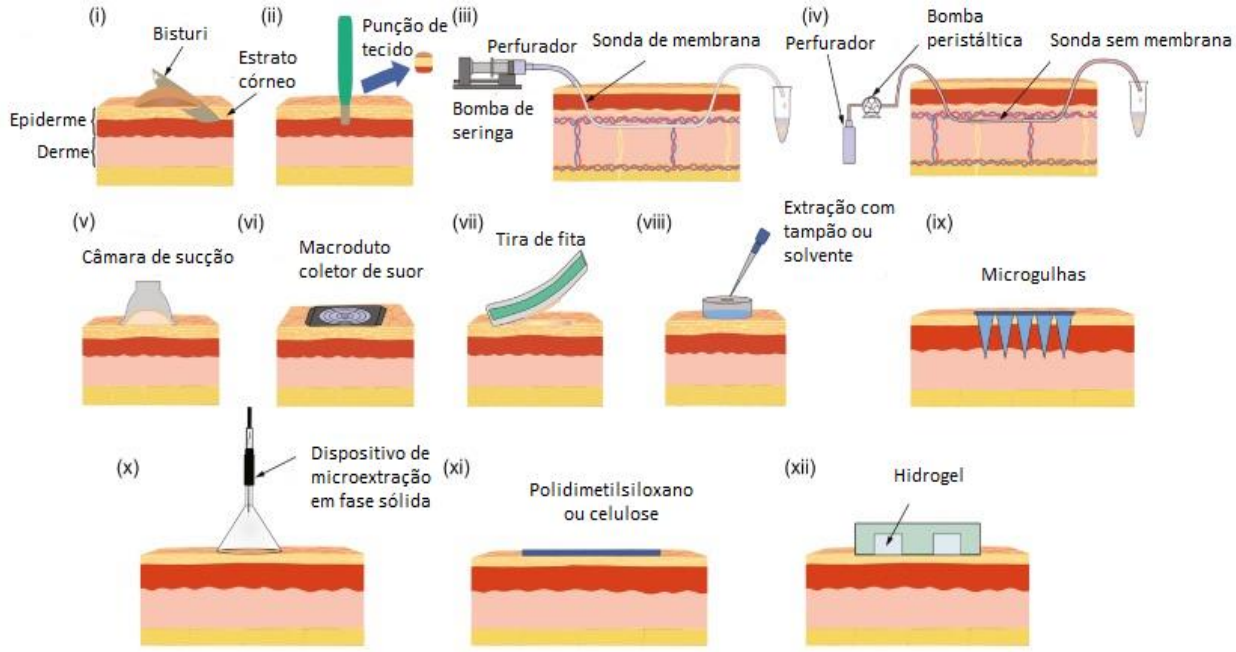

Figura 2.3.2: Protocolos de amostragem de pele.

Os protocolos de amostragem de pele, mostrados na Figura 2.3.2, podem ser categorizados como: invasivos (i–iv), que podem coletar amostras de tecido, fluido intersticial, epiderme e camadas de pele abaixo da epiderme, e são realizados na clínica por médicos especialistas; minimamente invasivo (v–ix) que pode coletar líquido intersticial da pele, estrato córneo e excreções cutâneas; e não invasivo (x–xii), que pode coletar excreções da pele ou voláteis emitidos. Adaptado de (Elpa et al., 2021).

2.3.2 *Quentching*

Para a análise de células e tecidos, uma maior representatividade do perfil metabolômico pode ser alcançada por meio de uma interrupção rápida e eficiente do metabolismo durante a amostragem. Essa interrupção tem o objetivo de suprimir alterações no perfil metabólico durante a análise. A etapa de *quentching* ou extinção metabólica visa interromper, instantaneamente, o metabolismo, inibindo enzimas endógenas para fornecer um resultado instantâneo do estado metabólico sem modificar o ambiente celular (Álvarez-Sánchez et al., 2010; Dettmer et al., 2011).

A desativação do metabolismo, principalmente em matrizes celulares, exige que a integridade do envelope celular seja cuidadosamente preservada, a fim de evitar possíveis perdas de analitos (Winder et al., 2008). Esse processo deve ser rápido o suficiente para interromper, instantaneamente, as alterações metabólicas. Além disso, é

importante destacar que a amostra extinta resultante deve ser passível de etapas subsequentes no procedimento analítico e não deve induzir qualquer tipo de variação nas propriedades físicas, químicas e quantitativas dos analitos na amostra (Mashego et al., 2007).

Convencionalmente, as células podem ser extintas com soluções de tripsina, no entanto, a influência nas concentrações intracelulares de metabólitos é considerável, pois essa enzima pode modificar o estado fisiológico das células devido à sua interação com proteínas de membrana. Além disso, o método convencional requer várias etapas demoradas e pode, portanto, levar a perdas consideráveis no número de metabólitos (Teng et al., 2009).

Outras estratégias que levam em consideração a rápida mudança nas condições da amostra, como mudança de pH e temperatura, podem ser aplicadas. O pH pode ser alterado submetendo as amostras a valores extremos, através da adição de hidróxido de potássio ou hidróxido de sódio para soluções básicas, e ácido perclórico ou ácido clorídrico para soluções ácidas (Álvarez-Sánchez et al., 2010). A extinção por temperatura, por sua vez, é aplicada quando a amostra é resfriada a valores abaixo de -20 °C, usando nitrogênio líquido ou uma mistura fria de metanol (K. Zhang et al., 2019).

Wilkins et al., 2019 estudaram quatro métodos diferentes de extinção do metabolismo de células de fibroblastos derivados da pele humana: I- incubação com tripsina, II-coleta mecânica em solução PBS, III-adição de metanol 80 % pré-resfriado em gelo seco e IV- adição de metanol 80 % frio com posterior evaporação do solvente. Os autores observaram que a coleta mecânica em solução de PBS obteve a menor recuperação dos metabólitos devido a possíveis erros de ruptura de membrana e contaminação extracelular. Em contraste, a adição de 80% de metanol pré-resfriado em gelo seco obteve a melhor recuperação quando comparados com a incubação com tripsina ou adição e posterior evaporação de solução 80% de metanol (Wilkins et al., 2019).

Estudos como este também foram relatados por Bennett, et al., 2008 que obtiveram resultados satisfatórios na recuperação de metabólitos de fibroblastos humanos em crescimento aderente, quando a solução metanólica 80% a frio foi adicionada diretamente às células após a remoção do meio (Bennett, et al., 2008).

As amostras biológicas possuem uma matriz bastante complexa devido à presença de proteínas e uma grande variedade de componentes celulares e extracelulares; portanto, elas precisam ser tratadas para a aquisição de dados subsequentes. O preparo da amostra, na análise de alvos, geralmente visa enriquecer os metabólitos de interesse e remover

substâncias interferentes. Além disso, essa etapa deve ser simples e rápida para evitar perda e/ou degradação de metabólitos, reprodutível, robusta e incorporar uma etapa de extinção para obter perfis metabolômicos representativos e cobertura abrangente dos metabólitos (Gong et al., 2017; Vuckovic, 2012).

O preparo da amostra é uma etapa crítica em uma análise metabolômica, pois, junto à amostragem e ao armazenamento, fornece o conjunto de erros mais comuns dos métodos analíticos (Nunes de Paiva et al., 2014; Zeki et al., 2020). Além disso, a contaminação bacteriana e o próprio metabolismo podem causar degradação ou aparecimento de metabólitos. Portanto, para evitar qualquer erro de interpretação, as amostras devem estar livres de reações enzimáticas durante a fase de amostragem e preparo da amostra (Khodadadi & Pourfarzam, 2020).

2.3.3 Preparo de amostra – Extração

O preparo de amostra para análise metabolômica por GC/MS consiste em duas etapas principais: extração e derivatização. A extração permite manter alto rendimento do analito. Ela geralmente é feita com as técnicas de extração em fase sólida (SPE- *Solid Phase Extraction*), extração líquido-líquido (LLE- *Liquid Liquid Extraction*) ou precipitação de proteínas (PPT-*Protein Precipitation*). A derivatização, por sua vez, evita a degradação dos analitos, aumenta a volatilidade dos metabólitos contendo grupos funcionais polares, além de aumentar a sensibilidade do método (Zeki et al., 2020).

Diferentes tipos de extração resultam em diferentes recuperações de metabólitos. Mudanças simples, como a variação da temperatura, composição do solvente de extração ou tempo de armazenamento, causarão efeitos nos metabólitos que podem ser detectados. Assim, otimizar os protocolos de extração é de extrema importância para obter um estudo metabolômico mais confiável que permita recuperar o maior número de analitos (Ser et al., 2015).

As proteínas, por exemplo, podem estar presentes em grandes quantidades em um extrato e, assim, causar a supressão do sinal de compostos menos abundantes. Portanto, a eficácia de um método de extração pode ser alcançada pela precipitação de proteínas usando solventes orgânicos, como metanol e acetonitrila, ou desnaturando-as através de reações com ácidos ou com modificações da temperatura (R. Liu et al., 2018; Want et al., 2006).

O método de extração líquido-líquido pode ser aplicado quando se deseja separar os metabólitos de diferentes polaridades através do uso de solventes parcialmente miscíveis ou imiscíveis. Compostos como isopropanol, etanol, metanol ou uma mistura destes solventes podem ser aplicados para a extração de metabólitos polares. Em contraste, clorofórmio ou acetato de etila podem ser aplicados para extrair metabólitos não polares (He et al., 2020; Katja Dettmer, Pavel A. Aronov, 2007).

Vários métodos foram relatados para a extração de metabólitos intracelulares usando solventes como metanol, mistura de água com clorofórmio em diferentes proporções (Y. Liu et al., 2012), metanol frio (Volmer et al., 2011; Wilkins et al., 2019), acetonitrila fria (Dietmair et al., 2010), entre outros. No entanto, a mistura de metanol e água foi o solvente que apresentou a maior recuperação de metabólitos em células de fibroblastos (Bennett et al., 2008; Y. Liu et al., 2012; Wilkins et al., 2019) e em amostras de tecido (Randhawa et al., 2013, 2014).

A extração em fase sólida (SPE) é utilizada quando a separação dos analitos da matriz interferente é necessária ou quando se deseja concentrar os analitos, aumentando a sensibilidade e melhorando os limites de detecção. A SPE envolve adsorção em material sólido apropriado seguida de dessorção com um solvente bem selecionado. Portanto, a SPE através da retenção seletiva, limita a interferência devido à seleção cuidadosa de um adsorvente com forte afinidade pelo analito (Płotka-Wasylka et al., 2016).

Geralmente, a acessibilidade a baixos volumes, análise de traços, e a complexidade de amostras biológicas são questões críticas em metabolômica. Assim, a microextração em fase sólida (SPME-*Solid Phase Microextraction*) pode ser uma alternativa à técnica LLE e SPE, que utilizam grande volume de amostra, alto consumo de solventes orgânicos e, consequentemente, elevado volume de resíduos, capacidade limitada dos sorventes e efeitos de matriz. (Hemmati et al., 2020).

A SPME consiste em um equilíbrio de partição do analito entre a matriz e uma fibra de sílica revestida com uma fase polimérica de extração (sorvente) que pode ser líquida ou sólida. Esse método é simples e permite a amostragem, pré-tratamento, enriquecimento e introdução de amostra em uma única etapa sem o uso de solvente. Além disso, apresenta portabilidade e automação para estudos de metabolômica (Huang et al., 2019).

Diferentes tipos de fases estacionárias podem ser aplicadas ao revestimento de fibra de sílica para obter maior seletividade dos analitos alvo. A fibra SPME pode ser aplicada no modo *headspace* (HS-SPME) ou por imersão direta (DI-SPME- *Direct*

Immersion). No modo HS, a fibra é exposta no espaço acima da amostra, o que permite o fracionamento de analitos voláteis em matrizes complexas, além de prevenir danos ao revestimento da fibra, supressão de sinal e contaminação do instrumento (Pawliszyn 1997; Katja Dettmer, Pavel A. Aronov, 2007).

Em contraste, no modo direto, a fibra é colocada diretamente na matriz o que permite amostragens in vivo sem degradação de amostras e preservação dos analitos. Além disso, esse método permite a extração de compostos endógenos semivoláteis ou não voláteis, como aminoácidos, ácidos graxos, peptídeos, proteínas e lipídios (Huang et al., 2019). Um de seus inconvenientes é incrustação da fase de extração por adsorção irreversível de macromoléculas da matriz da amostra, o que leva a uma diminuição substancial na vida útil do revestimento e a possíveis efeitos de matriz. A fim de reverter esses obstáculos, fibras mais resistentes e seletivas têm sido o alvo de diversas pesquisas (Souza-Silva & Pawliszyn, 2015).

Outras variações do SPE também foram aplicadas para análise metabolômica alvo como microextração de filme fino (TFME-*Thin-film microextraction*), extração sorptiva com barra agitadora (SBSE-*Stir bar sorptive extraction*), extração magnética dispersiva de fase sólida (d-MSPE- *Dispersive magnetic solid-phase extraction*), entre outras, todas com a intenção de reduzir alguma perda ou inconveniência causada por outros métodos (Huang et al., 2019).

Finalmente, a ultrafiltração pode ser aplicada a amostras in vivo e pode ser descrita como uma técnica de amostragem que possibilita extrair fisicamente amostras biológicas do tecido alvo (P. Li & Bartlett, 2014). A ultrafiltração consiste na extração de amostras biológicas através de uma membrana semipermeável que filtra as moléculas de acordo com seu peso. Devido à propriedade do filtro da membrana, todas as impurezas a depender do tamanho molecular, são bloqueadas no lado do tecido da membrana, enquanto as moléculas de interesse, geralmente menores, passam pela membrana para o lado do coletor (Volmer et al., 2011). A Tabela 2.3.2 descreve, resumidamente, os métodos de extração normalmente empregados em estudos metabolômicos, destacando suas vantagens e desvantagens.

Tabela 2.3.2: Resumo das técnicas de extração mais amplamente utilizadas no preparo de amostras para estudos metabolômicos

Método de Extração	Descrição	Vantagens	Desvantagens	Ref
Precipitação de proteínas (PPT)	Adição de um solvente orgânico à matriz biológica, seguido de centrifugação e filtração.	Simples e fácil de aplicar Elevada recuperação Alta precisão e exatidão	Não é muito seletivo e possui problemas de coeluição causado pelas impurezas remanescentes	(He et al., 2020; P. Li & Bartlett, 2014)
Extração Líquido-Líquido (LLE)	Migração de soluto de uma fase do solvente para outra, as duas fases sendo imiscíveis ou ligeiramente miscíveis	Baixo custo e fácil implementação Mais seletivo que a precipitação de proteínas	Demorado, muitas vezes envolvendo solventes tóxicos Efeito de matriz causado pelas impurezas remanescentes	(He et al., 2020; P. Li & Bartlett, 2014)
Extração em fase sólida (SPE)	Enriquecimento de analitos por adsorção em material sólido apropriado seguido por dessorção com um solvente bem selecionado	Alta especificidade Ampla cobertura de analitos	Baixa recuperação Alto custo	(Pinu & Villas-Boas, 2017)
Microextração em fase sólida (SPME)	Utilização de fibra revestida com fase de extração, capaz de extrair o analito sem necessidade prévia de precipitação da proteína.	Pouco preparo de amostra Amostragem direta Capacidade de automação	Fragilidade das fibras	(Filipiak & Bojko, 2019)
Ultrafiltração	Filtração por meio de uma membrana semipermeável que permite a passagem de moléculas de uma determinada faixa de massa. Geralmente essa filtração é realizada sob pressão negativa.	Simples Alta reprodutibilidade Amostragem direta	Técnica semiquantitativa Alto custo Capacidade de extração de metabólitos limitada	(P. Li & Bartlett, 2014)

Para análise alvo ou no estudo do perfil metabólico quantitativo, no qual se deseja analisar compostos conhecidos, o preparo da amostra pode ser acompanhado da adição de padrões marcados com isótopos estáveis, a fim de otimizar o processo de extração e facilitar a identificação dos analitos. E no caso de baixa concentração de metabólitos, o procedimento de extração pode incluir uma fase de pré-concentração para atingir os limites de detecção da técnica analítica aplicada (Katja Dettmer & Pavel A. Aronov, 2007).

2.3.4 Preparo de amostra – Derivatização

Uma etapa fundamental para a metabolômica por GC/MS é a derivatização de compostos polares ou termicamente instáveis. Essa etapa é realizada com o objetivo de reduzir a polaridade, aumentar a estabilidade térmica e a volatilidade dos analitos. Assim, moléculas que possuem grupos funcionais com hidrogênios ativos, como ácidos carboxílicos, álcoois, aminas e tióis podem ser derivatizadas antes da análise cromatográfica (Rohloff, 2015).

O processo de derivatização química pode ser feito por meio de alquilação, acilação, ou sililação com o auxílio de processos físicos como agitação e aquecimento, micro-ondas, ou instrumentação automatizada que permitem a derivação das amostras ao longo do tempo. Essas etapas podem ser aplicadas a fim de melhorar o desempenho do preparo da amostra, reduzindo o tempo e facilitando as reações (Khodadadi & Pourfarzam, 2020).

A trimetilsililação (TMS) é o processo de derivatização frequentemente utilizado devido à sua ampla cobertura, relativa simplicidade e força de sililação comparável. O TMS usa reagentes como MSTFA (N-metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida), MTBSTFA (N-terc-Butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida) e BSTFA (N, O-Bistrifluoroacetamida). O desempenho das reações de sililação pode ser melhorado pela adição de um catalisador. Substâncias como trimetilclorossilano (TMCS), terc-butildimetilclorossilano (TBDMCS), ácido trifluoroacético (TFA) e piridina são amplamente utilizados como catalisadores para a reação de derivatização por sililação. Essas substâncias auxiliam na estabilidade hidrolítica da mistura e aumentam a sua reatividade (Beale et al., 2018; Qiu & Ree, 2014).

Um dos pré-requisitos fundamentais para que esse tipo de derivatização ocorra é a necessidade de se obter extratos livres de água residual para evitar qualquer tipo de hidrólise indesejada que interfira no resultado. Assim, a fim de garantir uma derivatização

completa da amostra, uma quantidade excessiva desses reagentes é usada para consumir qualquer umidade presente no recipiente de reação (Beale et al., 2018).

Cloroformatos de alquila, como cloroformato de metila (MCF- *methyl chloroformate*), cloroformato de etila (ECF- *ethyl chloroformate*), cloroformato de propila (PCF- *propyl chloroformate*) e cloroformato de isobutila (IBCF- *isobutyl chloroformate*), podem ser aplicados como um reagente alternativo para derivatização em amostras aquosas. Esses compostos interagem com as moléculas alvo, substituindo o átomo de hidrogênio ativo nos grupos carboxila, amino ou hidroxila fenólica por um grupo alquila (Figura 2.3.3). Uma das principais vantagens dos cloroformatos de alquila é que a reação pode ser realizada em meio aquoso em poucos minutos e sem a necessidade de aquecimento. Outros benefícios são o baixo custo dos reagentes e a separação nítida de seus derivados por meio de um solvente orgânico (Beale et al., 2018; H. Y. Zhang et al., 2018).

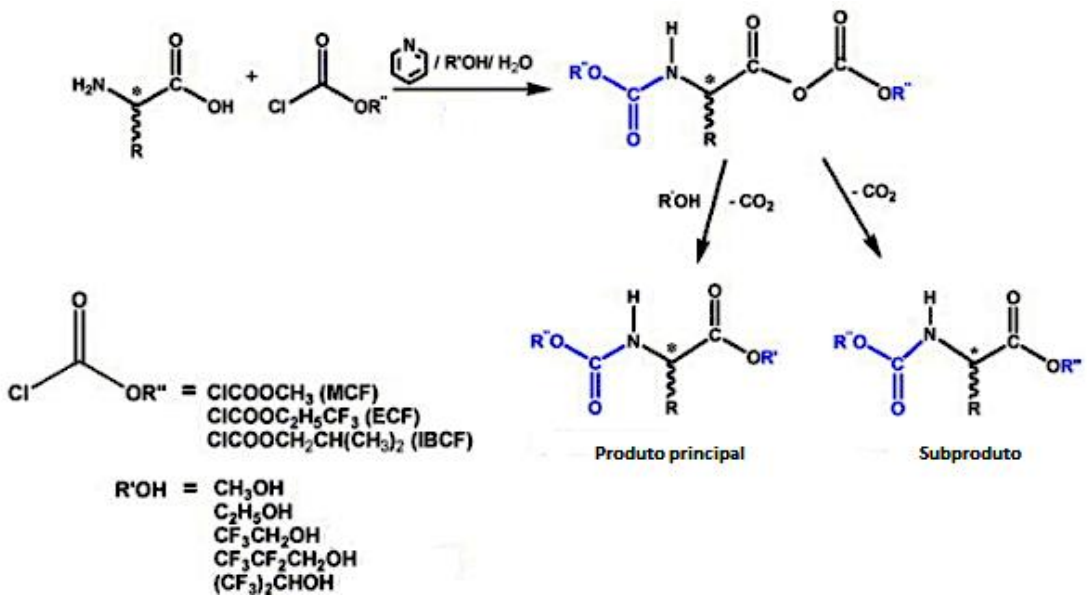

Figura 2.3.3: Esquema de reação de aminoácidos com cloroformatos de alquila na presença de um álcool alifático e piridina. Adaptado de Zampolli et al., 2007.

Na análise metabolômica por GC/MS, os processos de derivatização geralmente são acompanhados por uma etapa de oximação a qual serve para simplificar o cromatograma, reduzir os picos de carboidratos e proteger α-cetoácidos e aldeídos da descarboxilação e tautomerismo do ceto-enol. Hidroxilamina e alcoxamina são reagentes frequentemente usados nesse processo (Fiehn, 2016; Moros et al., 2017; Scalbert et al., 2009).

Resultados satisfatórios para análise metabolômica de células de fibroblastos foram obtidos utilizando etoxiamina após MTBSTFA com 1% de TBDMCS e uma etapa extra para derivatizar os aminoácidos com 6-aminoquinolil-hidroxisuccinimidil N-carbamato (Wilkins et al., 2019), ou também BSTFA (contendo 1% de TMCS) após a oxidação com metoxiamina em piridina (Y. Liu et al., 2012).

Por fim, os processos físicos são de fundamental importância para a conclusão da etapa de derivatização, pois podem facilitar, acelerar e/ou promover reações. Existem muitas estratégias para essa etapa, como derivatização *off-line*, derivatização assistida por micro-ondas (MAD – *Microwave Assisted Derivatization*) e aquelas compostas por sistemas automatizados.

A derivatização off-line geralmente se refere àquela feita a partir de extratos secos que são reconstituídos no reagente de derivatização, aquecidos por um tempo, com ou sem agitação, e após a derivatização as amostras são transferidas para frascos limpos antes da análise. Esse tipo de método é, de longe, o mais aplicado em estudos de metabolômica. Contudo, a derivatização off-line pode apresentar algumas limitações como a variação de acordo com o tempo em que as amostras ficam estagnadas até serem analisadas, e os longos tempos de incubação (Beale et al., 2018).

Uma estratégia para mitigar esses erros é o uso de micro-ondas ou ultrassom que possui a capacidade de reduzir drasticamente o tempo necessário para derivatizar as amostras (Söderholm et al., 2010). Y. Liu et al., 2011 utilizaram ultrassom após derivatização off-line de metabólitos endógenos de células de fibroblastos. Eles observaram que esse método aumentou, significativamente, a eficiência da derivatização dos metabólitos e reduziu, drasticamente, o tempo (Y. Liu et al., 2011). Outro tipo de estratégia é a derivatização, que ocorre em poucos segundos dentro da câmara do injetor (*liner*) do sistema GC. Para isso, a amostra e o reagente de derivatização podem ser injetados separadamente ou simultaneamente por meio de uma injeção em multicamadas tipo “sanduíche” com espaço de ar entre elas, o que aumenta a reprodutibilidade e automatiza a sequência analítica (Marsol-Vall et al., 2016).

2.3.5 O uso de GC/MS no estudo metabolômico da pele danificada

O revestimento de entrada do GC é onde as amostras são introduzidas no instrumento para evitar contato com as paredes de metal do GC. Escolher a câmera de injeção correta é crucial para obter resultados reprodutíveis e precisos em qualquer tipo

de análise baseada em metabolômica por GC. As câmeras de injeção com estrangulamento interno são as mais indicadas para a análise metabolômica alvo no modo *split*, pois permitem uma melhor discriminação da massa molar. As câmeras de injeção preenchidas com lã de vidro também são indicadas nesse tipo de estudo, pois a lã de vidro atua como um filtro para compostos não voláteis, protegendo o injetor e a coluna (Khodadadi & Pourfarzam, 2020).

Os modos de injeção *split* e *splitless* foram bem utilizados em estudos metabolômicos de pele danificada. No entanto, o modo *split* é geralmente preferido, pois os metabólitos presentes nessas amostras apresentam uma variedade de concentrações e, ao escolher o modo de *splitless*, pode haver alguma sobrecarga na coluna (Tabela 2.3.3).

Para a escolha da coluna, deve-se considerar os tipos de fases estacionárias para obter maior seletividade dos analitos, a faixa de temperatura para permitir boa resolução em um curto espaço de tempo e a quantidade de amostra para evitar condições de sobrecarga. As colunas amplamente utilizadas na metabolômica da pele danificada contêm a fase estacionária de 5% de difenil com 95% de dimetilpolissiloxana com uma dimensão de 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm (comprimento × diâmetro interno × espessura do filme) (Moon et al., 2015; Park, HM, Shin, J., Kim, 2014; Wilkins et al., 2019). No entanto, colunas com dimensões menores, por exemplo, 20 m × 0,18 × 0,18 µm, também foram utilizadas(Randhawa et al., 2013, 2014). Esse tipo de coluna, além de oferecer maior resolução de pico, também limita a capacidade de amostragem, comprometendo a sensibilidade (Khodadadi & Pourfarzam, 2020). A Tabela 2.3.3, mostra a instrumentação analítica utilizada para estudar a metabolômica da pele danificada por meios intrínsecos ou fatores exógenos, como exposição à radiação ultravioleta. Os parâmetros verificados são coluna, modo de injeção, programa de temperatura e os tipos de analitos identificados.

Tabela 2.3.3: Instrumentação analítica utilizada, coluna, modo de injeção, programa de temperatura e analitos identificados durante estudos metabolômicos de pele danificada

Matriz	Quenching	Coluna*	Modo de injeção	Programa de Temperatura	Analizador de massas	Compostos identificados	Referências
Tecido	Nitrogênio líquido	HP-5 (20 m×0.18 ×0.18 μm)	split	A temperatura inicial do forno foi de 60 °C elevada a 340°C a uma taxa de 18°C/min, aproximadamente	Quadrupolo	Glicose, lactato, 3fosfoglicerato, carnitina, acetilcarnitina, butirilcarnitina, octanoilcarnitina, glicerol, metabolismo da glutationa, entre outros	(Randhawa et al., 2013)
Tecido	MeOH 80%	HP-5 (20 m×0.18 ×0.18 μm)	split	A temperatura inicial do forno foi de 60°C elevada a 340°C a uma taxa de 18°C/min, aproximadamente	Quadrupolo	Aminoácidos, nucleotídeos, açúcares, peptídeos, cofatores, metabolismo lipídico e outros	(Randhawa et al., 2014)
Tecido	MeOH 80%	Rtx-5MS (29.8 m × 0.25 mm × 0.25 μm)	split 10:1.	A temperatura inicial do forno foi de 75°C por 2 minutos, aumentada para 300°C a uma taxa de 15°C/min e mantida a 300°C por 3 minutos.	Q-TOF	GC = metabólitos primários, aminoácidos, ácidos graxos e sacarídeos LC = fosfolipídios MS = ceramida	(Park, HM, Shin, J., Kim, 2014)
Tecido	MeOH 80% a frio	Rtx-5MS (29.8 m × 0.25 mm ×0.25 μm	split 5:1	A temperatura inicial do forno foi de 75°C por 2 min, elevado a 300°C a uma taxa de 15°C/min e então mantido a 300°C por 3 min	TOF	Metabólitos do ciclo do TCA (ácido tricarboxílico): piruvato, ácido cítrico, ácido málico e ácido fumárico	(Moon et al., 2015)
Célula	MeOH 80% a frio	DB-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)	splitless	A temperatura inicial do forno foi de 120°C ajustada com as seguintes taxas: aumentada para 180°C a 25°C/min; elevado para 270°C a 6°C/min; aumentado para 325°C a 30°C/min	Quadrupolo	Metabólitos do ciclo do TCA: ácido 2-hidroxiglutárico, ácido alfa-cetoglutárico, ácido cis-acônico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido isocítrico, ácido lático, ácido málico, ácido oxaloacético e ácido succínico	(Wilkins et al., 2019)

* comprimento × diâmetro interno × espessura do filme

Nas investigações metabolômicas baseadas em GC são geralmente utilizados analisadores de massas do tipo quadrupolo e tempo de voo (TOF-*Time-of-Flight*). A alta resolução de massa e a rápida taxa de varredura tornam o TOF uma das tecnologias mais vantajosas para a deconvolução de picos sobrepostos e é uma importante ferramenta para identificar compostos desconhecidos. No entanto, os analisadores do tipo quadrupolo são os mais utilizados em estudos metabolômicos, pois apresentam m enor custo, são fáceis de usar, fornecem varredura rápida e são adequados para determinar massas e íons de fragmentos compostos; além disso, seus resultados são de fácil interpretação (Higgins Keppler et al., 2018; Zeki et al., 2020). Analisadores seriados (GC/MS/MS), como o triplo quadrupolo, são alternativas para o estudo metabolômico direcionado da pele danificada, pois essa técnica permite maior sensibilidade e precisão para análises quantitativas (Newman et al., 2019).

Tecnologias recentes de alta resolução, como os analisadores do tipo orbitrap, também têm sido aplicadas em estudos metabolômicos. Embora os analisadores orbitrap tenham ganhado interesse devido à alta velocidade de aquisição, alta resolução espectral e maior precisão de massa, eles ainda são pouco aplicados devido ao seu custo elevado e ao suporte computacional pouco desenvolvido que torna o ganho absoluto pouco explorado (Gruber et al., 2020; Stettin et al., 2020).

2.3.6 Avanços da análise cromatográfica – GCxGC uma ferramenta relevante para estudos metabolômicos

Mesmo fornecendo alta capacidade de pico, as colunas capilares padrão podem apresentar um poder de separação ineficiente quando aplicadas à análise de amostras biológicas muito complexas. Para aumentar o poder de separação das colunas e evitar coeluições em análises de matrizes complexas Liu e Phillips (1991) desenvolveram a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC-*Comprehensive two-dimensional gas chromatography*). Na GCxGC, duas colunas são acopladas em série através de um modulador. O eluato que emerge da primeira coluna (^{1}D) é concentrado e rapidamente enviado para a segunda coluna (^{2}D) (Figura 2.3.4). Estes processos de separação são independentes (ortogonais) e possibilitam a transferência completa da amostra da ^{1}D para a ^{2}D apresentando diversas vantagens em relação à técnica cromatográfica unidimensional (GC) (Z. Liu & Phillips, 1991).

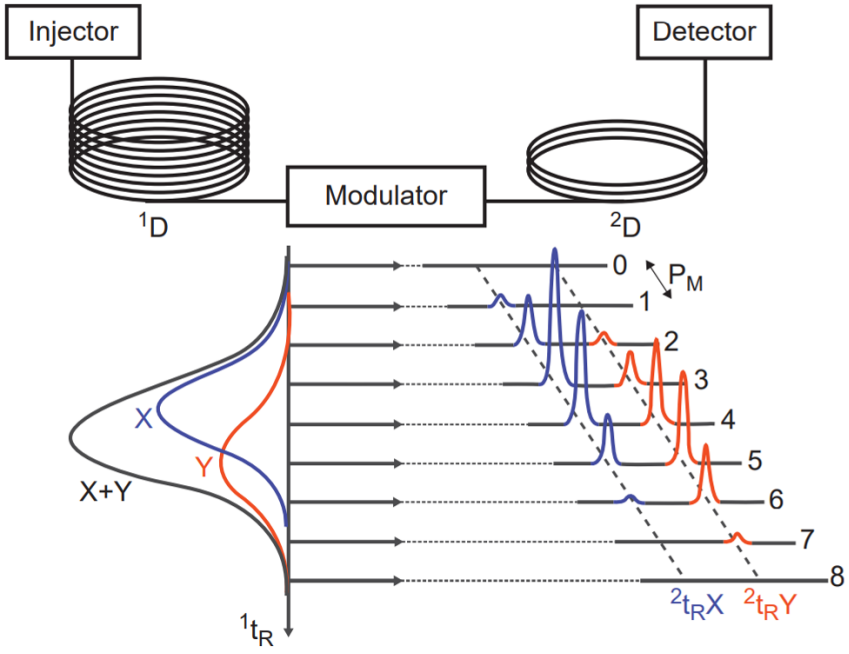

Figura 2.3.4: Representação gráfica de um sistema GCxGC. Retirado de Semard et al., 2009

A capacidade de pico da GC×GC é muito superior quando comparado à GC, visto que mais compostos podem ser separados em uma mesma corrida devido à presença de uma segunda coluna que potencializa a separação dos componentes da mistura. Acompanha esse maior poder de separação uma diminuição na razão entre o sinal / ruído (S/N), o que é apropriado para a detecção de metabólitos minoritários. Compostos com características químicas similares ou da mesma classe aparecem em regiões estruturadas no diagrama de contorno gerado, facilitando desse modo sua identificação (Pedroso et al., 2009).

Na GC×GC, a primeira coluna possui dimensões convencionais (geralmente 30 m de comprimento e cerca de 0,20 mm de diâmetro interno e aproximadamente 0,2 ou 0,3 µm de espessura da fase estacionária). A segunda coluna, por sua vez, é curta e estreita, como as colunas utilizadas em cromatografia gasosa rápida (*Fast GC*), com comprimento de até 2 m, diâmetro interno de aproximadamente 0,10 mm e aproximadamente 0,1 µm de espessura de fase estacionária. Com essa configuração, a eluição na ^{2}D ocorre por completo, em alguns segundos, antes que a injeção da fração seguinte, por parte do modulador, aconteça; e o tempo total da corrida não é prolongado.

A composição das colunas deve ser, idealmente, ortogonal, ou seja, seus princípios de separação devem ser independentes e diferentes, como utilizar, por exemplo, uma coluna de baixa polaridade na ^{1}D e de alta polaridade na ^{2}D (Pedroso et al., 2009).

O modulador é considerado o coração do sistema GC×GC, permitindo que todo efluente da primeira coluna seja focalizado e periodicamente (em segundos) injetado na segunda coluna. Além disso, a focalização do efluente possibilita a obtenção de picos mais estreitos no final da segunda dimensão melhorando a sensibilidade dessa técnica. Vários moduladores estão disponíveis comercialmente; os baseados em temperatura, com interfaces de aquecimento ou criogênicos, e os moduladores baseados em válvulas que utilizam meios pneumáticos para realizar a modulação. No entanto, os moduladores criogênicos são os mais amplamente utilizados devido à sua aplicação bem-sucedida para muitos tipos de compostos e sua capacidade de produzir larguras de pico muito pequenas (Edwards et al., 2011).

A GCxGC apresenta-se como uma técnica analítica bem estabelecida para elucidar matrizes complexas como as utilizadas em estudos metabolômicos (Almstetter et al., 2012; Mondello et al., 2008). Essa técnica permite um perfil detalhado de compostos conhecidos (analitos direcionados) de duas a cinco vezes maior quando comparado à cromatografia unidimensional. Além disso, cromatogramas em duas dimensões são altamente precisos e permitem a aquisição de uma impressão digital exclusiva de determinada amostra (Stilo et al., 2020). A impressão digital de uma amostra é fundamental quando se deseja descobrir as alterações causadas no metabolismo ao longo dos anos ou por meios exógenos, e pode ser uma alternativa muito eficaz no estudo metabolômico da pele danificada (Mondello et al., 2008; Wu et al., 2009).

Para exemplificar o poder de uma análise por GCxGC, (Welthagen et al., 2005) aplicaram a técnica na análise complexa dos perfis de metabólitos do tecido do baço de camundongos. Cromatogramas bidimensionais mostraram que a qualidade e a sensibilidade do espectro de massas foram melhoradas pelo poder de resolução aprimorado do GC×GC. Nesse trabalho, foram identificados 1200 metabólitos em comparação com 500 compostos identificados na cromatografia unidimensional. Além disso, os resultados mostraram que os compostos identificados eram muito semelhantes aos relatados anteriormente em estudos de RMN e outros métodos em tecidos de mamíferos (Welthagen et al., 2005).

2.3.7 Interpretação de dados

Experimentos em metabolômica fornecem muitas informações sobre o estado bioquímico de células, tecidos ou organismos, mas produzem uma enorme quantidade de dados que requerem alta capacidade de processamento e interpretação. O processamento desses dados pode ocorrer em duas etapas distintas: pré-processamento em que os dados brutos são alinhados, filtrados, detectados e normalizados para simplificar a análise subsequente e a etapa de análise que usa ferramentas univariadas ou multivariadas para que os dados processados possam ser interpretados (Nunes de Paiva et al., 2014).

Para informações cromatográficas baseadas em MS, a etapa de pré-processamento visa, em primeiro lugar, melhorar a visualização dos picos removendo o ruído. Na detecção, são identificados todos aqueles sinais que apresentam intensidades relativas acima do ruído, e o alinhamento visa corrigir diferenças nos tempos de retenção entre as corridas e combinar dados de diferentes amostras (Blekherman et al., 2011; Hilario et al., 2006; Nunes de Paiva et al., 2014). Além disso, para simplificar a matriz de dados, pode-se utilizar uma etapa a mais de deconvolução que objetiva separar os picos sobrepostos a fim de melhorar a quantificação e minimizar erros e variabilidades no processo de identificação (Hilario et al., 2006; Ren et al., 2015).

A normalização visa remover variações indesejadas nas abundâncias dos íons entre as medições devido a erros experimentais e/ou alterações biológicas (González-Riano et al., 2020; Nunes de Paiva et al., 2014), uma vez que a normalização pré-aquisição tem como objetivo evitar grandes variações de concentração que resultariam em intensidades não lineares na detecção por espectrometria de massas, e a pós-aquisição está relacionada à remoção de variações biológicas e experimentais (Chen et al., 2017; González-Riano et al., 2020). Métodos que utilizam padrões internos ou externos e amostras agrupadas de controle de qualidade (QC-*Quality Control*) são constantemente aplicados para remover esses tipos de variações biológicas. Outros métodos baseados em flutuações estatísticas ou modelos, no entanto, são mais promissores para a remoção de variações experimentais, bem como biológicas (Chen et al., 2017).

Após o pré-processamento, os dados devem ser analisados para apresentar informações relevantes por meio de análise estatística. A aplicação dessas ferramentas depende do tipo de informação que se deseja obter. Se o objetivo é resumir, explorar e descobrir, mas as informações anteriores sobre a identidade da amostra são desconhecidas, métodos não supervisionados podem ser utilizados. Análise de

agrupamento hierárquico (HCA-*Hierarchical Cluster Analysis*), análise de componentes principais (PCA- *Principal Component Analysis*), análise de agrupamento de dados (*cluestering)*, análise de componente independente (ICA-*Independent Component Analysis*), ou um tipo de rede neural como o mapa de auto-organização (SOM-*Self Organizing Map*) são os métodos mais amplamente utilizados (Blekherman et al., 2011; Ren et al., 2015).

Por outro lado, quando a identidade da amostra é conhecida e o objetivo do estudo é descobrir biomarcadores característicos e classificá-los, métodos supervisionados são aplicados. Análise de variância (ANOVA), mínimos quadrados parciais (PLS- *Partial Least Squares*), análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA- *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*), análise discriminante de mínimos quadrados ortogonais parciais (OPLS-DA- *Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis*), regressão de suporte de vetor (SVR- *support vector regression*), entre outros podem ser usados nessa etapa (Blekherman et al., 2011; Ren et al., 2015; Shulaev, 2006).

Os algoritmos de aprendizado de máquina (ML- *Machine Learning*) também podem ser aplicados para analisar esses conjuntos de dados. Essa ferramenta permite elucidar mecanismos celulares complexos, identificar assinaturas moleculares e prever resultados clínicos de grandes conjuntos de dados biomédicos. Além disso, ML pode ser usado em abordagens multiômicas para integrar mais de um método, como genômica, proteômica e metabolômica, em que a quantidade de dados é muito maior e a integração mais complexa. Outro ponto positivo desse artefato é que ele pode facilitar a análise integrativa, abordando de forma eficaz desafios como a assimetria da dimensionalidade, em que o número de variáveis é diferente do número de amostras, heterogeneidade de dados, dados ausentes e desequilíbrio de classes (Mirza et al., 2019).

O ML oferece um amplo espectro de algoritmos desenvolvidos com interfaces acessíveis. É possível citar a análise de dados baseada em redes neurais artificiais (ANN-*artificial neural network*), redes neurais convolucionais (CNN- *convolutional neural network*), floresta aleatória (RF- *random forest*), máquina de vetores de suporte (SVM-*support vector machine*), algoritmo genético (GA- *genetic algorithm*), entre outros, como ferramentas recentes de aprendizagem de máquina supervisionada para análise metabolômica (Liebal et al., 2020).

O novo subdomínio de ML que incorpora arquiteturas complexas de redes neurais artificiais, conhecidas como aprendizado profundo (DL – *Deep learning*), apresenta uma abordagem interessante para integração de dados ômicos e medicina de precisão. Essa

ferramenta é eficiente porque é capaz de codificar e modelar muitas formas de dados complexos, como dados numéricos, de texto, áudio e imagem, tanto no modo supervisionado quanto em configurações não supervisionadas (Grapov et al., 2018).

A última etapa é a interpretação dos dados e sua correlação com o contexto biológico. Para isso, os pesquisadores podem contar com um extenso número de bancos de dados contendo informações detalhadas sobre diversos metabólitos. Os bancos de dados incluem o *Human Metabolome Database* (HMDB), *MassBank, METLIN*, *PubChem*, entre outros (Azad & Shulaev, 2019; Cambiaghi et al., 2017; Johnson et al., 2015; Ren et al., 2015).

Os dados metabolômicos também podem ser integrados com outras ciências ômicas para a obtenção de uma visão abrangente de todos os processos biológicos envolvidos. As ferramentas de visualização baseadas em rede podem ser amplamente aplicadas, além da integração com o conhecimento biológico derivado da literatura anterior e dados experimentais. Algumas ferramentas como *MetaboAnalyst, MetaCore TM, 3Omics e InCroMAP* podem ser usadas. Dentre eles, o *MetaboAnalyst* se destaca por ser uma plataforma mais completa baseada na internet de acesso gratuito (Cambiaghi et al., 2017).

Finalmente, o processamento dos dados em geral e a caracterização dos metabólitos deve ser compatível com o procedimento experimental e o objetivo da pesquisa. No entanto, devido à diversidade de dados gerados, a escolha de um modelo de tratamento ainda é muito complexa.

2.3.8 Identificação de alguns biomarcadores

A composição química da matriz da pele contém uma enorme quantidade de informações sobre os processos metabólicos. Um estudo utilizando GC/MS e LCMS/MS para a identificação de biomarcadores em pele danificada pelo sol mostrou que um subconjunto de 122 metabólitos foi significativamente diferente em biópsias extraídas de locais expostos ao sol em comparação com biópsias de regiões protegidas pelo sol. Desses 122 metabolitos identificados, 46 tiveram suas concentrações diminuídas, enquanto 76 apresentaram concentrações superiores quando comparados ao controle. Os metabólitos identificados pertenciam a um total de 52 vias biológicas, e um subconjunto de 42 vias apresentava um ou mais metabólitos significativamente diferentes. Essas vias englobam

aminoácidos, nucleotídeos, açúcares, peptídeos, cofatores e metabolismo lipídico (Randhawa et al., 2014).

Estudo semelhante foi realizado por Park e colaboradores (2014) em que alterações em metabólitos causadas pela radiação UVB na pele de camundongos foi identificada. Aminoácidos, ácidos graxos, lipídios, nucleotídeos, carboidratos e ácido cis e trans-urocânico (UCA) foram identificados como substâncias discriminantes entre os grupos. De todos os metabólitos alterados, o cis-UCA e o colesterol mostraram as diferenças mais significativas após a exposição ao UVB por 6 e 12 semanas (Park, HM, Shin, J., Kim, 2014).

Alterações de metabólitos causadas pelo fotoenvelhecimento da pele também foram associadas ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Moon e colaboradores (2015) descobriram que a dihidrolipoil desidrogenase (DLD) foi a única proteína do ciclo do TCA que mostrou uma diminuição na expressão após a exposição à radiação ultravioleta em camundongos. E para confirmar seus resultados, usando GC/TOF/MS, eles identificaram 2 metabólitos, ácido málico e ácido fumárico, que tiveram suas concentrações reduzidas após a exposição ao UVB. Com os resultados, os autores correlacionaram que a diminuição da enzima DLD pode contribuir para o aumento do dano oxidativo, redução do metabolismo energético, regulação do metabolismo do Fe e acidose metabólica (Moon et al., 2015).

Análises por GC/MS também foram aplicadas ao estudo metabolômico de compostos orgânicos voláteis para descobrir biomarcadores de câncer de pele. Abaffy e colaboradores (2013) identificaram níveis elevados de ácido láurico (C12:0) e ácido palmítico (C16:0) no melanoma, que se correlacionaram com o aumento do estresse oxidativo e com a desregulação da síntese lipídica, uma característica conhecida desse tipo de câncer (Abaffy et al., 2013).

Vários tipos de pesquisa foram feitos para identificar possíveis marcadores de pele danificada com base na metabolômica usando GC/MS. No entanto, eles ainda estão nos estágios iniciais e muito focados no fotoenvelhecimento. Assim, maiores esforços devem ser feitos para obter respostas mais concretas para a análise metabolômica da pele danificada, não apenas por radiação UV, mas também para outras áreas da experiência clínica, como dermatite, psoríase, eczema, alterações causadas por poluentes ambientais, entre outros.

2.4 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abaffy, T., Möller, M. G., Riemer, D. D., Milikowski, C., & DeFazio, R. A. (2013). Comparative analysis of volatile metabolomics signals from melanoma and benign skin: A pilot study. *Metabolomics*, *9*(5), 998–1008. https://doi.org/10.1007/s11306-013-0523-z

Almstetter, M. F., Oefner, P. J., & Dettmer, K. (2012). Comprehensive two-dimensional gas chromatography in metabolomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *402*(6), 1993–2013. https://doi.org/10.1007/s00216-011-5630-y

Álvarez-Sánchez, B., Priego-Capote, F., & Castro, M. D. L. de. (2010). Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *29*(2), 120–127. https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.004

Araviiskaia, E., Berardesca, E., Bieber, T., Gontijo, G., Sanchez Viera, M., Marrot, L., Chuberre, B., & Dreno, B. (2019). The impact of airborne pollution on skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *33*(8), 1496–1505. https://doi.org/10.1111/jdv.15583

Arbex, M. A., Santos, U. de P., Martins, L. C., Saldiva, P. H. N., Pereira, L. A. A., & Braga, A. L. F. (2012). Air pollution and the respiratory system. *Jornal Brasileiro de Pneumologia: Publicacao Oficial Da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisilogia*, *38*(5), 643–64355. https://doi.org/10.1590/S1806-37132012000500015

Arda, O., Göksügür, N., & Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology*, *32*(1), 3–13. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.021

Avogbe, P. H., Ayi-Fanou, L., Autrup, H., Loft, S., Fayomi, B., Sanni, A., Vinzents, P., & Møller, P. (2005). Ultrafine particulate matter and high-level benzene urban air pollution in relation to oxidative DNA damage. *Carcinogenesis*, *26*(3), 613–620. https://doi.org/10.1093/carcin/bgh353

Azad, R. K., & Shulaev, V. (2019). Metabolomics technology and bioinformatics for precision medicine. *Briefings in Bioinformatics*, *20*(6), 1957–1971. https://doi.org/10.1093/bib/bbx170

Beale, D. J., Pinu, F. R., Kouremenos, K. A., Poojary, M. M., Narayana, V. K., Boughton, B. A., Kanojia, K., Dayalan, S., Jones, O. A. H., & Dias, D. A. (2018). Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics*, *14*(11), 1-31. https://doi.org/10.1007/s11306-018-1449-2

Bennett, B. D., Yuan, J., Kimball, E. H., & Rabinowitz, J. D. (2008). Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach. *Bone*, *3*(8), 1299–1311. https://doi.org/10.1038/jid.2014.371

Blekherman, G., Laubenbacher, R., Cortes, D. F., Mendes, P., Torti, F. M., Akman, S., Torti, S. V., & Shulaev, V. (2011). Bioinformatics tools for cancer metabolomics. *Metabolomics*, *7*(3), 329–343. https://doi.org/10.1007/s11306-010-0270-3

Brook, R. D., Franklin, B., Cascio, W., Hong, Y., Howard, G., Lipsett, M., Luepker, R., Mittleman, M., Samet, J., Smith, S. C., & Tager, I. (2004). Air pollution and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the expert panel on population and prevention science of the American Heart Association. *Circulation*, *109*(21), 2655–2671. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000128587.30041.C8

Calciolari, E., & Donos, N. (2020). Proteomic and Transcriptomic Approaches for Studying Bone Regeneration in Health and Systemically Compromised Conditions. *Proteomics - Clinical Applications*, *14*(3), 1900084. https://doi.org/10.1002/prca.201900084

Cambiaghi, A., Ferrario, M., & Masseroli, M. (2017). Analysis of metabolomic data: Tools, current strategies and future challenges for omics data integration. *Briefings in Bioinformatics*, *18*(3), 498–510. https://doi.org/10.1093/bib/bbw031

Carrola, J., Bastos, V., Ferreira De Oliveira, J. M. P., Oliveira, H., Santos, C., Gil, A. M., & Duarte, I. F. (2016). Insights into the impact of silver nanoparticles on human keratinocytes metabolism through NMR metabolomics. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *589*, 53–61. https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.08.022

Chen, J., Zhang, P., Lv, M., Guo, H., Huang, Y., Zhang, Z., & Xu, F. (2017). Influences of Normalization Method on Biomarker Discovery in Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Based Untargeted Metabolomics: What Should Be Considered? *Analytical Chemistry*, *89*(10), 5342–5348. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b05152

Dettmer, K., Nürnberger, N., Kaspar, H., Gruber, M. A., Almstetter, M. F., & Oefner, P. J. (2011). Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: Optimization of harvesting and extraction protocols. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *399*(3), 1127–1139. https://doi.org/10.1007/s00216-010-4425-x

Dietmair, S., Timmins, N. E., Gray, P. P., Nielsen, L. K., & Krömer, J. O. (2010). Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: Development of a metabolite extraction protocol. *Analytical Biochemistry*, *404*(2), 155–164. https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.04.031

Ding, A., Yang, Y., Zhao, Z., Hüls, A., Vierkötter, A., Yuan, Z., Cai, J., Zhang, J., Gao, W., Li, J., Zhang, M., Matsui, M., Krutmann, J., Kan, H., Schikowski, T., Jin, L., & Wang, S. (2017). Indoor PM2.5 exposure affects skin aging manifestation in a Chinese population. *Scientific Reports*, *7*(1), 15329. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15295-8

Dong, Y. mao, Liao, L. ying, Li, L., Yi, F., Meng, H., He, Y. fan, & Guo, M. miao. (2019). Skin inflammation induced by ambient particulate matter in China. *Science of the Total Environment*, *682*, 364–373. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.155

Dréno, B. (2009). Anatomy and physiology of skin and cutaneous annexes. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, *136*(SUPPL. 10), S247–S251. https://doi.org/10.1016/S0151-9638(09)72527-X

Dréno, B., Bettoli, V., Araviiskaia, E., Sanchez Viera, M., & Bouloc, A. (2018). The influence of exposome on acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *32*(5), 812–819. https://doi.org/10.1111/jdv.14820

Edwards, M., Mostafa, A., & Górecki, T. (2011). Modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography: 20 years of innovation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *401*(8), 2335–2349. https://doi.org/10.1007/s00216-011-5100-6

el Haddad, C., Gerbaka, N. E., Hallit, S., & Tabet, C. (2021). Association between exposure to ambient air pollution and occurrence of inflammatory acne in the adult population. *BMC Public Health*, *21*(1), 1-14. https://doi.org/10.1186/s12889-021-11738-0

Elpa, D. P., Chiu, H. Y., Wu, S. P., & Urban, P. L. (2021). Skin Metabolomics. In *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *32*(2), 66–75. https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.11.009

Englert, N. (2004). Fine particles and human health - A review of epidemiological studies. *Toxicology Letters*, *149*(1–3), 235–242. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.12.035

Fan, S. J., Heinrich, J., Bloom, M. S., Zhao, T. Y., Shi, T. X., Feng, W. R., Sun, Y., Shen, J. C., Yang, Z. C., Yang, B. Y., & Dong, G. H. (2020). Ambient air pollution and depression: A systematic review with meta-analysis up to 2019. *Science of the Total Environment*, *701*(1), 134721. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134721

Fernandes, I. R., Russo, F. B., Pignatari, G. C., Evangelinellis, M. M., Tavolari, S., Muotri, A. R., & Beltrão-Braga, P. C. B. (2016). Fibroblast sources: Where can we get them? *Cytotechnology*, *68*(2), 223–228. https://doi.org/10.1007/s10616-014-9771-7

Fiehn, O. (2016). Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*,*114*(1),30-4. https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114

Filipiak, W., & Bojko, B. (2019). SPME in clinical, pharmaceutical, and biotechnological research – How far are we from daily practice? *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *115*, 203–213. https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.029

Flohr, C., & Mann, J. (2014). New approaches to the prevention of childhood atopic dermatitis. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *69*(1), 56–61. https://doi.org/10.1111/all.12343

Fukumoto, T., Nishiumi, S., Fujiwara, S., Yoshida, M., & Nishigori, C. (2017). Novel serum metabolomics-based approach by gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry for detection of human skin cancers: Candidate biomarkers.

Journal of Dermatology, *44*(11), 1268–1275. https://doi.org/10.1111/1346-8138.13921

Fussell, J. C., & Kelly, F. J. (2020). Oxidative contribution of air pollution to extrinsic skin ageing. *Free Radical Biology and Medicine*, *151*, 111–122. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.038

Fustinoni, S., Campo, L., Cirla, P. E., Martinotti, I., Buratti, M., Longhi, O., Foà, V., & Bertazzi, P. A. (2010). Dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in asphalt workers. *Occupational and Environmental Medicine*, *67*(7), 456–463. https://doi.org/10.1136/oem.2009.050344

Giri, T. K., Chakrabarty, S., & Ghosh, B. (2017). Transdermal reverse iontophoresis: A novel technique for therapeutic drug monitoring. *Journal of Controlled Release*, 246, 30–38. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.007

Godic, A., Poljšak, B., Adamic, M., & Dahmane, R. (2014). The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/860479

Gong, Z. G., Hu, J., Wu, X., & Xu, Y. J. (2017). The Recent Developments in Sample Preparation for Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *47*(4), 325–331. https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1289836

González-Riano, C., Dudzik, D., Garcia, A., Gil-De-La-Fuente, A., Gradillas, A., Godzien, J., López-Gonzálvez, ángeles, Rey-Stolle, F., Rojo, D., Ruperez, F. J., Saiz, J., & Barbas, C. (2020). Recent developments along the analytical process for metabolomics workflows. *Analytical Chemistry*, *92*(1), 203–226. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04553

Gorgizadeh, M., Azarpira, N., Dehdari Veis, R., & Sattarahmady, N. (2019). Repression of melanoma tumor in vitro and in vivo by photothermal effect of carbon xerogel nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *176*, 449–455. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.032

Gorrochategui, E., Jaumot, J., Lacorte, S., & Tauler, R. (2016). Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *82*, 425–442. https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.004

Granger, C., Aladren, S., Delgado, J., Garre, A., Trullas, C., & Gilaberte, Y. (2020). Prospective Evaluation of the Efficacy of a Food Supplement in Increasing Photoprotection and Improving Selective Markers Related to Skin Photo-Ageing. *Dermatology and Therapy*, *10*(1), 163–178. https://doi.org/10.1007/s13555-019-00345-y

Grapov, D., Fahrmann, J., Wanichthanarak, K., & Khoomrung, S. (2018). Rise of deep learning for genomic, proteomic, and metabolomic data integration in precision medicine. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, *22*(10), 630–636. https://doi.org/10.1089/omi.2018.0097

Gruber, B., David, F., & Sandra, P. (2020). Capillary gas chromatography-mass spectrometry: Current trends and perspectives. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *124*, 115475. https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.007

Haigh, P. I., Lucci, A., Turner, R. R., Bostick, P. J., Krasne, D. L., Stern, S. L., & Morton, D. L. (2001). Carbon dye histologically confirms the identity of sentinel lymph nodes in cutaneous melanoma. *Cancer*, *92*(3), 535–541. https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010801)92:3<535::AID-CNCR1352>3.0.CO;2-3

He, Z., Luo, Q., Liu, Z., & Gong, L. (2020). Extensive evaluation of sample preparation workflow for gas chromatography-mass spectrometry-based plasma metabolomics and its application in rheumatoid arthritis. *Analytica Chimica Acta*, *1131*, 136–145. https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.029

Hemmati, M., Nix, C., Crommen, J., Servais, A. C., & Fillet, M. (2020). Benefits of microsampling and microextraction for metabolomics studies. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *127*, 115899. https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115899

Higgins Keppler, E. A., Jenkins, C. L., Davis, T. J., & Bean, H. D. (2018). Advances in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography in metabolomics. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *109*, 275–286. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.015

Hilario, M., Kalousis, A., Pellegrini, C., & Müller, M. (2006). Processing and classification of protein mass spectra. *Mass Spectrometry Reviews*, *25*(3), 409–449. https://doi.org/10.1002/mas.20072

Hu, R., Xie, X. Y., Xu, S. K., Wang, Y. N., Jiang, M., Wen, L. R., Lai, W., & Guan, L. (2017). PM2.5 exposure elicits oxidative stress responses and mitochondrial apoptosis pathway activation in HaCaT keratinocytes. *Chinese Medical Journal*, *130*(18), 2205–2214. https://doi.org/10.4103/0366-6999.212942

Huang, S., Chen, G., Ye, N., Kou, X., Zhu, F., Shen, J., & Ouyang, G. (2019). Solid-phase microextraction: An appealing alternative for the determination of endogenous substances - A review. *Analytica Chimica Acta*, *1077*, 67–86. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.054

Jacob, M., Gu, X., Luo, X., Al-Mousa, H., Arnaout, R., Al-Saud, B., Lopata, A. L., Li, L., Dasouki, M., & Abdel Rahman, A. M. (2019). Metabolomics distinguishes DOCK8 deficiency from atopic dermatitis: Towards a biomarker discovery. *Metabolites*, *9*(11), 274. https://doi.org/10.3390/metabo9110274

Johnson, C. H., Ivanisevic, J., Benton, H. P., & Siuzdak, G. (2015). Bioinformatics: The next frontier of metabolomics. *Analytical Chemistry*, *87*(1), 147–156. https://doi.org/10.1021/ac5040693

Kamiya, K., Kishimoto, M., Sugai, J., Komine, M., & Ohtsuki, M. (2019). Risk factors for the development of psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(18), 4347. https://doi.org/10.3390/ijms20184347

Kammer, R., Tinnerberg, H., & Eriksson, K. (2011). Evaluation of a tape-stripping technique for measuring dermal exposure to pyrene and benzo(a)pyrene. *Journal of Environmental Monitoring*, *13*(8), 2165–2171. https://doi.org/10.1039/c1em10245a

Kanani, H., Chrysanthopoulos, P. K., & Klapa, M. I. (2008). Standardizing GC-MS metabolomics. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *871*(2), 191–201. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.04.049

Kang, H., Li, X., Zhou, Q., Quan, C., Xue, F., Zheng, J., & Yu, Y. (2017). Exploration of candidate biomarkers for human psoriasis based on gas chromatography-mass spectrometry serum metabolomics. *British Journal of Dermatology*, *176*(3), 713–722. https://doi.org/10.1111/bjd.15008

Katja Dettmer, Pavel A. Aronov, and B. D. H. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev*, *26*(1), 51–78. https://doi.org/10.1038/jid.2014.371

Kee, N. G., Kim, H. S., Choi, H., Kim, H.-J., & Seo, Y. R. (2021). Genomic Approach to the Assessment of Adverse Effects of Particulate Matters on Skin Cancer and Other Disorders and Underlying Molecular Mechanisms. *Journal of Cancer Prevention*, *26*(3), 153–161. https://doi.org/10.15430/jcp.2021.26.3.153

Khavkin, J., & Ellis, D. A. F. (2011). Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, *19*(2), 229–234. https://doi.org/10.1016/j.fsc.2011.04.003

Khodadadi, M., & Pourfarzam, M. (2020). A review of strategies for untargeted urinary metabolomic analysis using gas chromatography–mass spectrometry. *Metabolomics*, *16*(6), 1–14. https://doi.org/10.1007/s11306-020-01687-x

Kim, K. E., Cho, D., & Park, H. J. (2016a). Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases. *Life Sciences*, *152*, 126–134. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.039

Kim, K. H., Kabir, E., & Kabir, S. (2015). A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environment International*, *74*, 136–143. https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.005

Kimata, H. (2004). Exposure to road traffic enhances allergic skin wheal responses and increases plasma neuropeptides and neurotrophins in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *207*(1), 45-49. http://www.elsevier-deutschland.de/artikel/647581

Kimball, A. B., Grant, R. A., Wang, F., Osborne, R., & Tiesman, J. P. (2012). Beyond the blot: Cutting edge tools for genomics, proteomics and metabolomics analyses and previous successes. *British Journal of Dermatology*, *166*(SUPPL. 2), 1–8. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10859.x

Kreilgaard, M. (2002). A ssessment of cutaneous drug delivery using microdialysis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *54*, S99-S121. www.elsevier.com/locate/drugdeliv

Krutmann, J., Liu, W., Li, L., Pan, X., Crawford, M., Sore, G., & Seite, S. (2014a). Pollution and skin: From epidemiological and mechanistic studies to clinical implications. *Journal of Dermatological Science*, *76*(3), 163–168. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.08.008

Krutmann, J., Liu, W., Li, L., Pan, X., Crawford, M., Sore, G., & Seite, S. (2014b). Pollution and skin: From epidemiological and mechanistic studies to clinical implications. *Journal of Dermatological Science*, *76* (3), 163–168. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.08.008

Kuehne, A., Hildebrand, J., Soehle, J., Wenck, H., Terstegen, L., Gallinat, S., Knott, A., Winnefeld, M., & Zamboni, N. (2017). An integrative metabolomics and transcriptomics study to identify metabolic alterations in aged skin of humans in vivo. *BMC Genomics*, *18*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/s12864-017-3547-3

Lademann, J., Schaefer, H., Otberg, N., Teichmann, A., Blume-Peytavi, U., & Sterry, W. (2004). Penetration von mikropartikeln in die menschliche haut. *Hautarzt*, *55*(12), 1117–1119. https://doi.org/10.1007/s00105-004-0841-1

Lee, C. W., Lin, Z. C., Hu, S. C. S., Chiang, Y. C., Hsu, L. F., Lin, Y. C., Lee, I. T., Tsai, M. H., & Fang, J. Y. (2016). Urban particulate matter down-regulates filaggrin via COX2 expression/PGE2 production leading to skin barrier dysfunction. *Scientific Reports*, *6*, 1–16. https://doi.org/10.1038/srep27995

Lei, B. U. W., & Prow, T. W. (2019). A review of microsampling techniques and their social impact. *Biomedical Microdevices*, *21*(4), 81. https://doi.org/10.1007/s10544-019-0412-y

León, Z., García-Cañaveras, J. C., Donato, M. T., & Lahoz, A. (2013). Mammalian cell metabolomics: Experimental design and sample preparation. *Electrophoresis*, *34*(19), 2762–2775. https://doi.org/10.1002/elps.201200605

Li, J., Xu, W., Liang, Y., & Wang, H. (2017). The application of skin metabolomics in the context of transdermal drug delivery. *Pharmacological Reports*, *69* (2), 252–259. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.10.011

Li, P., & Bartlett, M. G. (2014). A review of sample preparation methods for quantitation of small-molecule analytes in brain tissue by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Analytical Methods*, *6*(16), 6183–6207. https://doi.org/10.1039/c4ay00915k

Li, X., An, S. J., Liu, X. L., Ji, A. L., Cao, Y., Xiang, Y., Ma, X. Y., Hu, Q., Yuan, Z. Q., Li, Y. F., Lu, Y. G., & Cai, T. J. (2021). The association between short-term air pollution exposure and post-adolescent acne: The evidence from a time series analysis in xi'an, china. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, *14*, 723–731. https://doi.org/10.2147/CCID.S320248

Liaw, F. Y., Chen, W. L., Kao, T. W., Chang, Y. W., & Huang, C. F. (2017). Exploring the link between cadmium and psoriasis in a nationally representative sample. *Scientific Reports*, *7*(1), 1723. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01827-9

Liebal, U. W., Phan, A. N. T., Sudhakar, M., Raman, K., & Blank, L. M. (2020). Machine learning applications for mass spectrometry-based metabolomics. *Metabolites*, *10*(6), 1–23. https://doi.org/10.3390/metabo10060243

Liu, J., Chen, Y., Cao, H., & Zhang, A. (2019). Burden of typical diseases attributed to the sources of PM2.5-bound toxic metals in Beijing: An integrated approach to source apportionment and QALYs. *Environment International*, *131*, 105014. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105041

Liu, R., Chou, J., Hou, S., Liu, X., Yu, J., Zhao, X., Li, Y., Liu, L., & Sun, C. (2018). Evaluation of two-step liquid-liquid extraction protocol for untargeted metabolic profiling of serum samples to achieve broader metabolome coverage by UPLC-Q-TOF-MS. *Analytica Chimica Acta*, *1035*, 96–107. https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.034

Liu, W., Pan, X., Vierkötter, A., Guo, Q., Wang, X., Wang, Q., Seité, S., Moyal, D., Schikowski, T., & Krutmann, J. (2018). A Time-Series Study of the Effect of Air Pollution on Outpatient Visits for Acne Vulgaris in Beijing. *Skin Pharmacology and Physiology*, *31*(2), 107–113. https://doi.org/10.1159/000484482

Liu, Y., Chen, T., Qiu, Y., Cheng, Y., Cao, Y., Zhao, A., & Jia, W. (2011). An ultrasonication-assisted extraction and derivatization protocol for GC/TOFMS-based metabolite profiling. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *400*(5), 1405–1417. https://doi.org/10.1007/s00216-011-4880-z

Liu, Y., Cheng, Y., Chen, T., Zhang, Y., Wang, X., Zhao, A., Jia, W., Bo, Y., & Jin, C. (2012). GC/TOFMS analysis of endogenous metabolites in mouse fibroblast cells and its application in TiO 2 nanoparticle-induced cytotoxicity study. *Chromatographia*, *75*(21–22), 1301–1310. https://doi.org/10.1007/s10337-012-2315-4

Liu, Z., & Phillips, J. B. (1991). Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface. *Journal of Chromatographic Science*, *29*(5), 227–231. https://doi.org/10.1093/chromsci/29.6.227

Losquadro, W. D. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, *25*(3), 283–289. https://doi.org/10.1016/j.fsc.2017.03.001

Magnani, N. D., Muresan, X. M., Belmonte, G., Cervellati, F., Sticozzi, C., Pecorelli, A., Miracco, C., Marchini, T., Evelson, P., & Valacchi, G. (2016). Skin damage mechanisms related to airborne particulate matter exposure. *Toxicological Sciences*, *149*(1), 227–236. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv230

Manisalidis, I., Stavropoulou, E., Stavropoulos, A., & Bezirtzoglou, E. (2020). Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Frontiers in Public Health*, *8*, 1–13. https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00014

Marrot, L. (2018). Pollution and Sun Exposure: A Deleterious Synergy. Mechanisms and Opportunities for Skin Protection. *Current Medicinal Chemistry*, *25*(40), 5469–5486. https://doi.org/10.2174/0929867324666170918123907

Marsol-Vall, A., Balcells, M., Eras, J., & Canela-Garayoa, R. (2016). Injection-port derivatization coupled to GC-MS/MS for the analysis of glycosylated and non-glycosylated polyphenols in fruit samples. *Food Chemistry*, *204*, 210–217. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.089

Martens, D. S., & Nawrot, T. S. (2016). Air Pollution Stress and the Aging Phenotype: The Telomere Connection. *Current Environmental Health Reports*, *3*(3), 258–269. https://doi.org/10.1007/s40572-016-0098-8

Martens, D. S., & Nawrot, T. S. (2018). Ageing at the level of telomeres in association to residential landscape and air pollution at home and work: a review of the current evidence. *Toxicology Letters*, *298*, 42–52. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.06.1213

Mashego, M. R., Rumbold, K., De Mey, M., Vandamme, E., Soetaert, W., & Heijnen, J. J. (2007). Microbial metabolomics: Past, present and future methodologies. *Biotechnology Letters*, *29*(1), 1–16. https://doi.org/10.1007/s10529-006-9218-0

Matwiejczuk, N., Galicka, A., & Brzóska, M. M. (2020). Review of the safety of application of cosmetic products containing parabens. *Journal of Applied Toxicology*, *40*(1), 176–210. https://doi.org/10.1002/jat.3917

Mirza, B., Wang, W., Wang, J., Choi, H., Chung, N. C., & Ping, P. (2019). Machine learning and integrative analysis of biomedical big data. *Genes*, *10*(2), 87. https://doi.org/10.3390/genes10020087

Mondello, L., Tranchida, P. Q., Dugo, P., & Dugo, G. (2008). Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: A review. *Mass Spectrometry Reviews*, *27* (2), 101–124. https://doi.org/10.1002/mas.20158

Moon, E., Park, H. M., Lee, C. H., Do, S. G., Park, J. M., Han, N. Y., Do, M. H., Lee, J. H., Lee, H., & Kim, S. Y. (2015). Dihydrolipoyl dehydrogenase as a potential UVB target in skin epidermis; using an integrated approach of label-free quantitative proteomics and targeted metabolite analysis. *Journal of Proteomics*, *117*, 70–85. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.12.016

Moros, G., Chatziioannou, A. C., Gika, H. G., Raikos, N., & Theodoridis, G. (2017). Investigation of the derivatization conditions for GC-MS metabolomics of biological samples. *Bioanalysis*, *9*(1), 53–65. https://doi.org/10.4155/bio-2016-0224

Newman, M., Pratt, S. M., Curran, D. A., & Stanczyk, F. Z. (2019). Evaluating urinary estrogen and progesterone metabolites using dried filter paper samples and gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC–MS/MS). *BMC Chemistry*, *13*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s13065-019-0539-1

Nunes de Paiva, M. J., Menezes, H. C., & de Lourdes Cardeal, Z. (2014). Sampling and analysis of metabolomes in biological fluids. *Analyst*, *139*(15), 3683–3694. https://doi.org/10.1039/c4an00583j

Paliwal, S., Hwang, B. H., Tsai, K. Y., & Mitragotri, S. (2013). Diagnostic opportunities based on skin biomarkers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *50*(5), 546–556. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.10.009

Park, HM, Shin, J., Kim, J. et al. (2014). MS-based metabolite profiling reveals time-dependent skin biomarkers in UVB-irradiated mice. *Metabolomicsbolomics*, *10*(4), 663–676. https://doi.org/10.1007/s11306-013-0594-x

Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(4), 263–269. https://doi.org/10.1038/nrm3314

Pedroso, M. P., Antonio, L., Godoy, F. De, Henrique, C., Fidélis, D. V., Correa, E., Jesus, R., & Augusto, F. (2009). Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrandente (GCxGC). *Química Nova*, *32*(2), 421–430.

Piao, M. J., Ahn, M. J., Kang, K. A., Ryu, Y. S., Hyun, Y. J., Shilnikova, K., Zhen, A. X., Jeong, J. W., Choi, Y. H., Kang, H. K., Koh, Y. S., & Hyun, J. W. (2018). Particulate matter 2.5 damages skin cells by inducing oxidative stress, subcellular organelle dysfunction, and apoptosis. *Archives of Toxicology*, *92*(6), 2077–2091. https://doi.org/10.1007/s00204-018-2197-9

Pinu, F. R., & Villas-Boas, S. G. (2017). Extracellular microbial metabolomics: The state of the art. *Metabolites*, *7*(3), 43. https://doi.org/10.3390/metabo7030043

Płotka-Wasylka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M., & Namieśnik, J. (2016). Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *77*, 23–43. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.010

Qiu, Y., & Ree, D. (2014). Gas Chromatography in Metabolomics Study. *Advances in Gas Chromatography*, *March*, 83-101. https://doi.org/10.5772/57397

Rajagopalan, P., Jain, A. P., Nanjappa, V., Patel, K., Mangalaparthi, K. K., Babu, N., Cavusoglu, N., Roy, N., Soeur, J., Breton, L., Pandey, A., Gowda, H., Chatterjee, A., & Misra, N. (2019). Erratum: Proteome-wide changes in primary skin keratinocytes exposed to diesel particulate extract—A role for antioxidants in skin health. *Journal of Dermatological Science*, *96*(2), 114–124. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2019.08.009

Randhawa, M., Sangar, V., Tucker-Samaras, S., & Southall, M. (2014). Metabolic Signature of Sun Exposed Skin Suggests Catabolic Pathway Overweighs Anabolic Pathway. *PLoS ONE*, *9*(3), e90367. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090367

Randhawa, M., Southall, M., & Samaras, S. T. (2013). Metabolomic analysis of sun exposed skin. *Molecular BioSystems*, *9*(8), 2045–2050. https://doi.org/10.1039/c3mb25537a

Rehman, S., Xu, Y., Dunn, W. B., Day, P. J. R., Westerhoff, H. V., Goodacre, R., & Bayat, A. (2012). Dupuytren's disease metabolite analyses reveals alterations following initial short-term fibroblast culturing. *Molecular BioSystems*, *8*(9), 2274–2288. https://doi.org/10.1039/c2mb25173f

Ren, S., Hinzman, A. A., Kang, E. L., Szczesniak, R. D., & Lu, L. J. (2015). Computational and statistical analysis of metabolomics data. *Metabolomics*, *11*(6), 1492–1513. https://doi.org/10.1007/s11306-015-0823-6

Reynolds, W. J., Bowman, A., Hanson, P. S., Critchley, A., Griffiths, B., Chavan, B., & Birch-Machin, M. A. (2021). Adaptive responses to air pollution in human dermal fibroblasts and their potential roles in aging. *FASEB BioAdvances*, *3*(10), 855–865. https://doi.org/10.1096/fba.2021-00056

Reynolds, W. J., Hanson, P. S., Critchley, A., Griffiths, B., Chavan, B., & Birch-Machin, M. A. (2020). Exposing human primary dermal fibroblasts to particulate matter induces changes associated with skin aging. *FASEB Journal*, *34*(11), 14725–14735. https://doi.org/10.1096/fj.202001357R

Rohloff, J. (2015). Analysis of phenolic and cyclic compounds in plants using derivatization techniques in combination with GC-MS-based metabolite profiling. *Molecules*, *20*(2), 3431–3462. https://doi.org/10.3390/molecules20023431

Romani, A., Cervellati, C., Muresan, X. M., Belmonte, G., Pecorelli, A., Cervellati, F., Benedusi, M., Evelson, P., & Valacchi, G. (2018). Keratinocytes oxidative damage mechanisms related to airbone particle matter exposure. *Mechanisms of Ageing and Development*, *172*(March 2017), 86–95. https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.11.007

Scalbert, A., Brennan, L., Fiehn, O., Hankemeier, T., Kristal, B. S., van Ommen, B., Pujos-Guillot, E., Verheij, E., Wishart, D., & Wopereis, S. (2009). Mass-spectrometry-based metabolomics: Limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics*, *5*(4), 435–458. https://doi.org/10.1007/s11306-009-0168-0

Semard, G., Adahchour, M., & Focant, J.-F. (2009). Capítulo 2 Instrumentação básica para GC×GC. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 55, *15–48.* https://doi:10.1016/s0166-526x(09)05502-0

Ser, Z., Liu, X., Tang, N. N., & Locasale, J. W. (2015). Extraction parameters for metabolomics from cultured cells. *Analytical Biochemistry*, *475*, 22–28. https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.01.003

Shehab, M. A., & Pope, F. D. (2019). Effects of short-term exposure to particulate matter air pollution on cognitive performance. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-019-44561-0

Shulaev, V. (2006). Metabolomics technology and bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics*, *7*(2), 128–139. https://doi.org/10.1093/bib/bbl012

Sieg, A., Jeanneret, F., Fathi, M., Hochstrasser, D., Rudaz, S., Veuthey, J. L., Guy, R. H., & Begoña Delgado-Charro, M. (2009). Extraction of amino acids by reverse

iontophoresis in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *72*(1), 226–231. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.012

Söderholm, S. L., Damm, M., & Kappe, C. O. (2010). Microwave-assisted derivatization procedures for gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Molecular Diversity*, *14*(4), 869–888. https://doi.org/10.1007/s11030-010-9242-9

Souza-Silva, É. A., & Pawliszyn, J. (2015). Direct immersion solid-phase microextraction with matrix-compatible fiber coating for multiresidue pesticide analysis of grapes by gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (DI-SPME-GC-ToFMS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(18), 4464–4477. https://doi.org/10.1021/jf506212j

Stettin, D., Poulin, R. X., & Pohnert, G. (2020). Metabolomics benefits from orbitrap GC–MS—comparison of low-and high-resolution GC–MS. *Metabolites*, *10*(4), 143. https://doi.org/10.3390/metabo10040143

Stilo, F., Tredici, G., Bicchi, C., Robbat, A., Morimoto, J., & Cordero, C. (2020). Climate and Processing Effects on Tea (Camellia sinensis L. Kuntze) Metabolome: Accurate Profiling and Fingerprinting by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(10), 1–19. https://doi.org/10.3390/molecules25102447

Teng, Q., Huang, W., Collette, T. W., Ekman, D. R., & Tan, C. (2009). A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics. *Metabolomics*, *5*(2), 199–208. https://doi.org/10.1007/s11306-008-0137-z

Valacchi, G., Sticozzi, C., Pecorelli, A., Cervellati, F., Cervellati, C., & Maioli, E. (2012). Cutaneous responses to environmental stressors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1271*(1), 75–81. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06724.x

VanRooij, J. G. M., Bodelier-Bade, M. M., & Jongeneelen, F. J. (1993). Estimation of the dermal and respiratory uptake of PAH among 12 coke oven workers. *Human and Experimental Toxicology*, *12*(4), 352.

Verdin, A., Cazier, F., Fitoussi, R., Blanchet, N., Vié, K., Courcot, D., Momas, I., Seta, N., & Achard, S. (2019). An in vitro model to evaluate the impact of environmental fine particles (PM 0.3-2.5) on skin damage. *Toxicology Letters*, *305*(November 2018), 94–102. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.01.016

Vierkötter, A., Schikowski, T., Ranft, U., Sugiri, D., Matsui, M., Krämer, U., & Krutmann, J. (2010). Airborne particle exposure and extrinsic skin aging. *Journal of Investigative Dermatology*, *130*(12), 2719–2726. https://doi.org/10.1038/jid.2010.204

Volmer, M., Northoff, S., Scholz, S., Thüte, T., Büntemeyer, H., & Noll, T. (2011). Fast filtration for metabolome sampling of suspended animal cells. *Biotechnology Letters*, *33*(3), 495–502. https://doi.org/10.1007/s10529-010-0466-7

Vuckovic, D. (2012). Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and*

Bioanalytical Chemistry, *403*(6), 1523–1548. https://doi.org/10.1007/s00216-012-6039-y

Want, E. J., O'Maille, G., Smith, C. A., Brandon, T. R., Uritboonthai, W., Qin, C., Trauger, S. A., & Siuzdak, G. (2006). Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, *78*(3), 743–752. https://doi.org/10.1021/ac051312t

Welthagen, W., Shellie, R. A., Spranger, J., Ristow, M., Zimmermann, R., & Fiehn, O. (2005). Comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC × GC-TOF) for high resolution metabolomics: Biomarker discovery on spleen tissue extracts of obese NZO compared to lean C57BL/6 mice. *Metabolomics*, *1*(1), 65–73. https://doi.org/10.1007/s11306-005-1108-2

Wickett, R. R., & Visscher, M. O. (2006). Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control*, *34*(10 SUPPL.), 98–110. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.295

Wilkins, J., Sakrikar, D., Petterson, X. M., Lanza, I. R., & Trushina, E. (2019). A comprehensive protocol for multiplatform metabolomics analysis in patient-derived skin fibroblasts. *Metabolomics*, *15*(6), 1–9. https://doi.org/10.1007/s11306-019-1544-z

Winder, C. L., Dunn, W. B., Schuler, S., Broadhurst, D., Jarvis, R., Stephens, G. M., & Goodacre, R. (2008). Global metabolic profiling of Escherichia coli cultures: An evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites. *Analytical Chemistry*, *80*(8), 2939–2948. https://doi.org/10.1021/ac7023409

Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J. C., & Wong, J. K. (2016). The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology*, *25*(2), 92–98. https://doi.org/10.1111/exd.12832

Woodley, D. T. (2017). Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis: Implications for Wound Healing. *Dermatologic Clinics*, *35*(1), 95–100. https://doi.org/10.1016/j.det.2016.07.004

Wu, Z., Huang, Z., Lehmann, R., Zhao, C., & Xu, G. (2009). The application of chromatography-mass spectrometry: Methods to metabonomics. *Chromatographia*, *69*(SUPPL. 1), 23–32. https://doi.org/10.1365/s10337-009-0956-8

Yang, Y., Fan, T. W. M., Lane, A. N., & Higashi, R. M. (2017). Chloroformate derivatization for tracing the fate of Amino acids in cells and tissues by multiple stable isotope resolved metabolomics (mSIRM). *Analytica Chimica Acta*, *976*, 63–73. https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.014

Zampolli, M. G., Basaglia, G., Dondi, F., Sternberg, R., Szopa, C., & Pietrogrande, M. C. (2007). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of amino acid enantiomers as methyl chloroformate derivatives: Application to space analysis. *Journal of Chromatography A*, *1150*(1–2), 162–172. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.033

Zeki, Ö. C., Eylem, C. C., Reçber, T., Kır, S., & Nemutlu, E. (2020). Integration of GC–MS and LC–MS for untargeted metabolomics profiling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *190*, 113509. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113509

Zhang, H. Y., Zhang, P. P., Tan, X. X., Wang, Z. Z., Lian, K. Q., Xu, X. D., & Kang, W. J. (2018). Derivatization method for the quantification of lactic acid in cell culture media via gas chromatography and applications in the study of cell glycometabolism. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *1090*(May), 1–6. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.05.015

Zhang, K., Zhang, X., Bai, Y., Yang, L., Wu, T., Zhang, J., Li, L., Zhang, H., & Wang, H. (2019). Optimization of the sample preparation method for adherent cell metabolomics based on ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Analytical Methods*, *11*(29), 3678–3686. https://doi.org/10.1039/c9ay00326f

Zhang, X. W., Li, Q. H., Xu, Z. di, & Dou, J. J. (2020). Mass spectrometry-based metabolomics in health and medical science: A systematic review. *RSC Advances*, *10*(6), 3092–3104. https://doi.org/10.1039/c9ra08985c

Zhang, Y., Zheng, L., Tuo, J., Liu, Q., Zhang, X., Xu, Z., Liu, S., & Sui, G. (2017). Analysis of PM2.5-induced cytotoxicity in human HaCaT cells based on a microfluidic system. *Toxicology in Vitro*, *43*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.018

3 CULTURA CELULAR, EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS E ANÁLISE POR GC/MS

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo geral

Avaliar os métodos de coleta, *quenching* e extração, descritos na literatura, para análise de aminoácidos derivados de células de fibroblastos de pele humana.

3.1.2 Objetivos específicos

- Investigar a extração dos metabólitos das células de fibroblastos derivados de pele humana
- Aplicar o método de preparo de amostra estudado para a análise dos aminoácidos por GC/MS.
- Avaliar as principais figuras de mérito para o método desenvolvido por GC/MS.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

Os experimentos de cultura celular foram realizados, em parceria com o Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. E as análises cromatográficas foram realizadas nos laboratórios de cromatografia avançada (RMCA) – 171 e 173 do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.2.1 Reagentes, solventes, soluções e gases

- Água ultrapura, purificador de água Purelab Classic da Elga (Reino Unido)
- 3-Metilpiridina grau GC (≥ 99,0%), Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)
- Propil cloroformato (98%), Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)
- Iso-octano grau HPLC (≥ 99,5%), Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);
- Clorofórmio grau HPLC (≥ 99,8%), J.T.Baker (Darmstadt, Alemanha);
- 1-propanol grau HPLC (≥ 99,9%), Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);

- Gás hélio comprimido, pureza de 99,999%, Air Products (Mogi das Cruzes, Brasil);
- Gás nitrogênio industrial comprimido, Air Products (Mogi das Cruzes, Brasil);
- Solução aquosa de hidróxido de sódio (0,33 mol L^{-1});
- Solução de detergente neutro, 5% v/v, Cromoline, Cromotech (Diadema, Brasil);
- Padrões de aminoácidos, Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);
- Solução derivatizante 1(SD1) 77:23 v/v (77 % de 1-propanol com 23% de 3-metilpiridina), armazenado a −4 °C;
- Solução derivatizante 2 (SD2) 17,4: 11: 71,6 v/v (17,4% de propil cloroformato, 11,0 % de iso-octano 11,0% e 71,7% de clorofórmio), armazenado a −4 °C;
- Tampão fosfato (PBS), ThermoScientific (West Palm Beach, EUA);
- Solução de detergente neutro, 5% v/v, Cromoline, Cromotech (Diadema, Brasil);
- DMEM-Meio Essencial Mínimo, ThermoScientific (West Palm Beach, EUA);
- Soro Bovino Fetal, Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);
- Células HDFa 500 K cells/vial each - C0135C, ThermoScientific (São Paulo, Brasil)

3.2.2 Suprimentos e equipamentos

- Micropipetas 2,0-20,0 μL, 50,0-200,0 μL e 100,0-1000,0 μL; ThermoScientific (West Palm Beach, Alemanha)
- Termômetro de mercúrio, escala -10 a 110 °C, resolução 0,5 °C;
- Agitador magnético com aquecimento, Fisatom, 752A (São Paulo, Brasil);
- Refrigerador, Consul (São Bernardo do Campo Brasil);
- Microsseringa para injeção líquida 10,0 μL, Agilent Tecnology Inc. (Santa Clara, EUA);
- Tubos de ensaio, Laborglass (São Paulo, Brasil);
- Frascos de vidro transparentes 2,0 mL, Laborglass (São Paulo, Brasil);
- Agitador de tubos tipo vortex, modelo QL 901, Biomixer (Jacareí, São Paulo)
- Balança analítica, incerteza de medição u = ± 0,00001 g, modelo AUW220D, Shimadzu (Kyoto, Japão)
- Balão volumétrico de volumes variados, Laborglass (São Paulo, Brasil)
- Bloco de alumínio 8x6x8cm

- Sistema de purificação de água Milli Q, Merck Millipore (ELGA veolia, Brasil)
- Coluna Capilar ZB-AAA (10 m × 0,25 mm × 0,1 μm), Phenomenex (Califórnia, EUA
- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas do tipo quadrupolo, modelo GC/MS QP2010 Plus, Shimadzu (Kyoto, Japão);
- Placas de cultura celular de 60 mm, ThermoScientific (West Palm Beach, EUA)
- Garrafas para cultura celular, ThermoScientific (West Palm Beach, EUA)
- Incubadoras de CO_2
- Banho de ultrassom, modelo SONITOP 404 A, Soni-Tec do Brasil (São Bernardo do Campo, Brasil)
- *Speed vaccum concentrator plus*, Eppendorf (Hamburgo, Alemanha)

3.2.3 Softwares

- GCMS solution®, versão 4.45, Shimadzu (Kyoto, Japão)
- OriginPro® 9 SR0, versão 2021 (Northampton, EUA)
- Excel 2013, Microsoft (Redmond, EUA)

3.2.4 Solução padrão de aminoácidos

Foram preparados soluções-estoque de 1000,0 mg L^{-1} individuais dos 14 padrões analíticos de aminoácidos (pureza ≥ 99%) em água ultrapura. Os aminoácidos utilizados neste estudo foram: L-alanina (Ala), glicina (Gly), L-valina (Val), L-leucina (Leu), L-isoleucina (Ile), L-treonina (Thr), L-prolina (Pro), L-metionina (Met), L-ácido aspártico (Asp), L-fenilalanina (Phe), L-ácido glutâmico (Glu), L-lisina (Lys), L-tirosina (Tyr), L-triptofano (Trp) e por fim, L-norvalina (Norv) como padrão interno (PI). As soluções foram preparadas em balões calibrados e armazenadas em refrigerador, a 4°C. As soluções trabalho foram preparadas a partir da solução estoque.

3.2.5 Cultura de células de fibroblastos derivados de pele humana

Os fibroblastos derivados da derme humana adulta (HDFa), adquiridos da ThermoScientific (CAS-C0135C, São Paulo, Brasil) foram mantidos em uma solução composta de L-glutamina, cloridrato de piridoxina e alta concentração de glicose conhecida como meio Eagle modificado Dulbecco (DMEM) da ThermoScientific (West Palm Beach, EUA), com 10% (v/v) de soro fetal bovino (PBS) e solução de penicilina-estreptomicina a 1% (v/v) em atmosfera umidificada de 5% de CO_2 a 37°C. O meio foi substituído a cada dois dias. As células HDFa foram semeadas em frascos de 75 cm^2 ou placas de poços de 30 mm para todos os ensaios.

3.2.6 Coleta das células

Depois que as células cresceram 95 % de confluência, o meio foi removido e a cultura foi lavada duas vezes com PBS por 30 s. Em seguida, foram adicionados 450,0 mL de metanol 80 % (v/v) (pré-resfriado em freezer a -80°C e mantido em gelo) sob agitação por cerca de 20 s. As células foram separadas em metanol utilizando um raspador (*scraper*) de borracha por cerca de 1 min. Posteriormente, a suspensão foi transferida para um tubo tipo *Eppendorf* e armazenada a -80°C até a análise dos aminoácidos. A coleta das células foi baseada no trabalho de Wilkins et al., (2019).

3.2.7 Extração dos metabólitos

Antes das análises, as amostras coletadas em solução de metanol foram secas em um *speed vaccum* a 30 ºC por cerca de 4 h. Posteriormente, os sedimentos celulares foram sonicados em 100,0 µL de PBS e incubados em gelo por 10 min. Em seguida, foram adicionados 450,0 µL de solução fria de metanol/acetonitrila (1:1 v/v) com subsequente centrifugação por 10 min a uma velocidade de 14.000 g. O sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio e seco a vácuo a 45 ºC por, aproximadamente, 30 min. A extração dos metabólitos foi baseada no trabalho de Wilkins et al., (2019), com algumas modificações).

3.2.8 Derivatização dos metabólitos

Ao frasco de reação com extrato seco foram adicionados 100,0 µL de solução padrão de 20,0 mg L^{-1}, 165,0 µL de água ultrapura e 100,0 µL de padrão interno (PI) (L-norvalina na concentração de 23,0 mg L^{-1}). Em seguida, foram adicionados 80,0 µL de solução derivatizante 1 (SD1) junto a 120,0 µL de solução 0,33 mol L^{-1} de NaOH. O tubo

de ensaio foi agitado por 12 s, aquecido em bloco térmico a 60 ºC por mais 12 s e, novamente, agitado 12 s. Após essa etapa, foram adicionados 50,0 μL de solução derivatizante 2 (SD2) ao meio, a solução foi agitada por 12 s, aquecida a 60 °C por 12 s e, novamente, agitada por mais 12 s. O tubo ficou em repouso por 1 min, posteriormente agitado por 12 s. Por fim, foram adicionados ao frasco de reação 250,0 μL de iso-octano. O tudo foi agitado por 12 s e colocado em repouso por mais 1 min. Após esse tempo, um volume de 100,0 μL da fase superior (orgânica) do sistema bifásico formado foi pipetado. Essa alíquota foi transferida para um frasco de 2,0 mL, seca em fluxo de nitrogênio gasoso até que toda a fase líquida evaporasse. Em seguida, foi adicionado 10,0 μL de iso-octano sob agitação de 12 s. Por fim, 1,0 μL dessa solução foi injetado no sistema GC/MS e os aminoácidos foram determinados no modo SIM de acordo com o método descrito por Batista et al., 2020 (Tabela 3.2.1). Os passos otimizados do processo de derivatização estão descritos no esquema da Figura 3.2.1.

Tabela 3.2.1: Tempos de retenção, relações m/z para os fragmentos de cada aminoácido após derivatização com propil cloroformato (Batista et al., 2020)

Aminoácido	Abreviação	Tempo de retenção (min)	Relação *m/z* dos íons (intensidade em %)
Alanina	Ala	3,58	130,0(100,0); 88,0(22,2) e 70,0(21,2)
Glicina	Gly	3,71	116,0(100,0);74,0(30,4) e102,0(29,7)
Valina	Val	3,95	116,0(100,0); 158,0(87,0) e 72,0(78,7)
Norvalina	Norv	4,10	158,0(100,0); 72,0(77,4) e 116,0(18,3)
Leucina	Leu	4,19	172,0(100,0); 86,0(52,4) e 74,0(15,2)
Isoleucina	Ile	4,25	130,0(100,0);172,0(92,7) e 101,0(47,4)
Treonina	Thr	4,48	101,0(100,0); 74,0(55,5) e 116,0(8,9)
Prolina	Pro	4,60	70,0(100,0); 156,0(72,2) e 69,0(5,7)
Ácido Aspártico	Asp	5,28	216,0(100,0); 88,0(60,9) e 130,0(55,8)
Metionina	Met	5,31	61,0(100,0); 101,0(69,0) e 116,0(12,4)
Ácido Glutâmico	Glu	5,64	84,0(100,0); 170,0(38,5) e 172,0(15,0)
Fenilalanina	Phe	5,68	91,0(100,0); 74,0(87,2) e 116,0(14,5)
Lisina	Lys	6,96	170,0(100,0); 84,0(41,4) e 116,0(12,0)
Tirosina	Tyr	7,44	107,0(100,0); 206,0(28,0) e 74,0(10,7)
Triptofano	Trp	7,74	130,0 (100,0); 102,0(2,0) e 158,0(1,2)

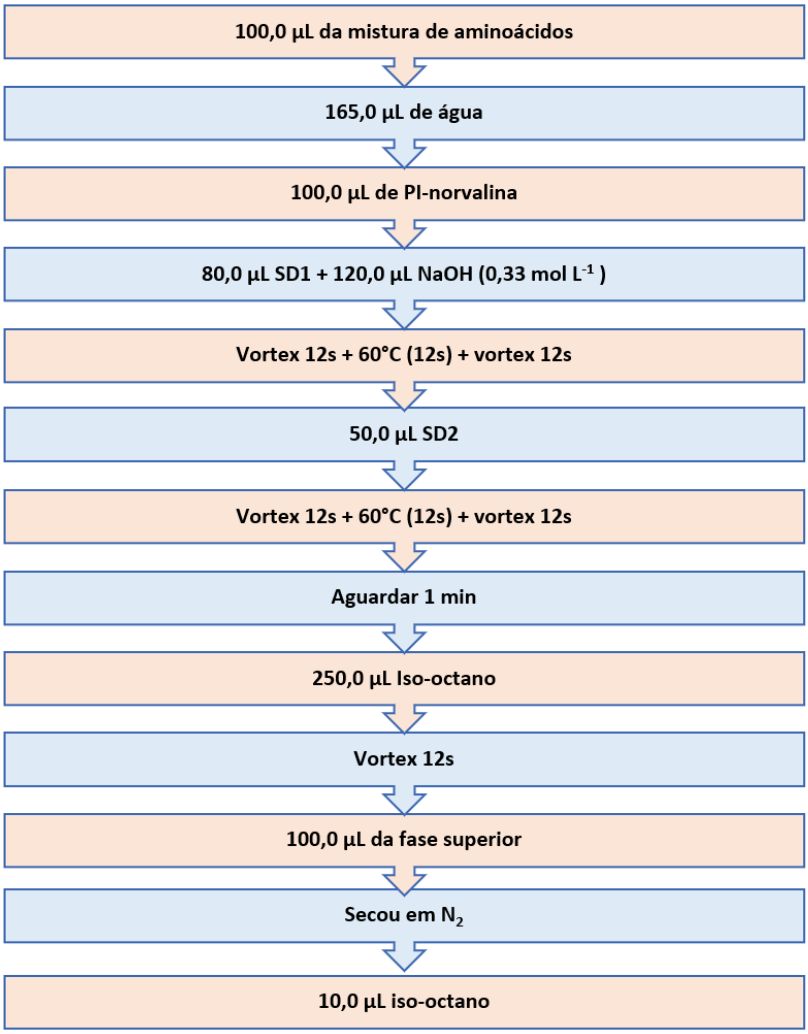

Figura 3.2.1: Etapas do processo de derivatização dos aminoácidos para análises de GC/MS

3.2.9 Sistema cromatográfico

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema GC/MS QP2010 - Plus da Shimadzu (Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas com um analisador do tipo quadrupolo e uma fonte de ionização por impacto de elétrons (EI). Uma coluna capilar Zebron, modelo ZB-AAA (10 m × 0,25 mm × 0,1 µm), da Phenomenex (Califórnia, EUA) foi utilizada e o volume de amostra injetado foi de 1,0 µL, com o injetor operado a 280 °C, no modo *split*, usando uma razão de divisão 1:20. O gás de arraste utilizado foi o hélio (99,999%), a um fluxo de 1,5 mL min^{-1}. O programa de temperatura do forno começou em 70 °C, mantido por 1 min, seguido de aquecimento a uma taxa de

30°C min^{-1} até 270 °C e patamar de 3 min. A interface GC/MS foi mantida a 290 °C, e a ionização ocorreu na temperatura de 240 °C com 70 eV de energia.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos de *quentching*, extração e derivatização de aminoácidos foram baseados na literatura apresentando pequenas modificações e aperfeiçoamentos. Uma linhagem celular de fibroblastos da derme humana foi utilizada neste estudo e resultados relevantes foram adquiridos, considerando todos os tratamentos estatísticos realizados para observar a variância e a confiabilidade dos dados. Para a análise cromatográfica, foi adicionado ao extrato um padrão de quatorze aminoácidos (Alanina, Glicina, Valina, Leucina, Isoleucina, Treonina, Prolina, Ácido aspártico, Metionina, Ácido glutâmico, Fenilalanina, Lisina, Tirosina, Triptofano e Padrão interno-Norvalina), que foram previamente selecionados com base no trabalho de Batista et al., 2020. A análise cromatográfica foi realizada no modo SIM e os íons m/z selecionados para identificação estão descritos na Tabela 3.2.1.

É possível observar, na Figura 3.3.1, o cromatograma obtido na análise de aminoácidos extraídos das células HDFa depois do procedimento de preparo de amostra. Com exceção do ácido aspártico com a metionina e do ácido glutâmico com a fenilalanina, pode-se verificar boa separação entre os aminoácidos. Além disso, o tempo total de análise foi de 10 min, um fator muito importante quando se busca analisar várias réplicas como nos estudos metabolômicos.

A Figura 3.3.2 mostra as áreas dos aminoácidos (normalizadas pelo padrão interno PI - Norvalina) de uma amostra padrão e de um extrato de células de HDFa após o processo de *quentching*, extração e derivatização. Pode-se observar que todos os analitos apresentaram um aumento relativo na área do pico, quando comparados com os resultados da análise do padrão da mistura de aminoácidos, indicando que os métodos de *quentching*, extração e derivatização foram bem-sucedidos. Além disso, esses resultados indicaram que as células fibroblastos possuem elevada concentração de alguns aminoácidos o que pode ser um importante indicador para estudos subsequentes. Na Figura 3.3.3, é possível observar o gráfico que mostra a concentração de aminoácidos nas células de fibroblastos (n= 10).

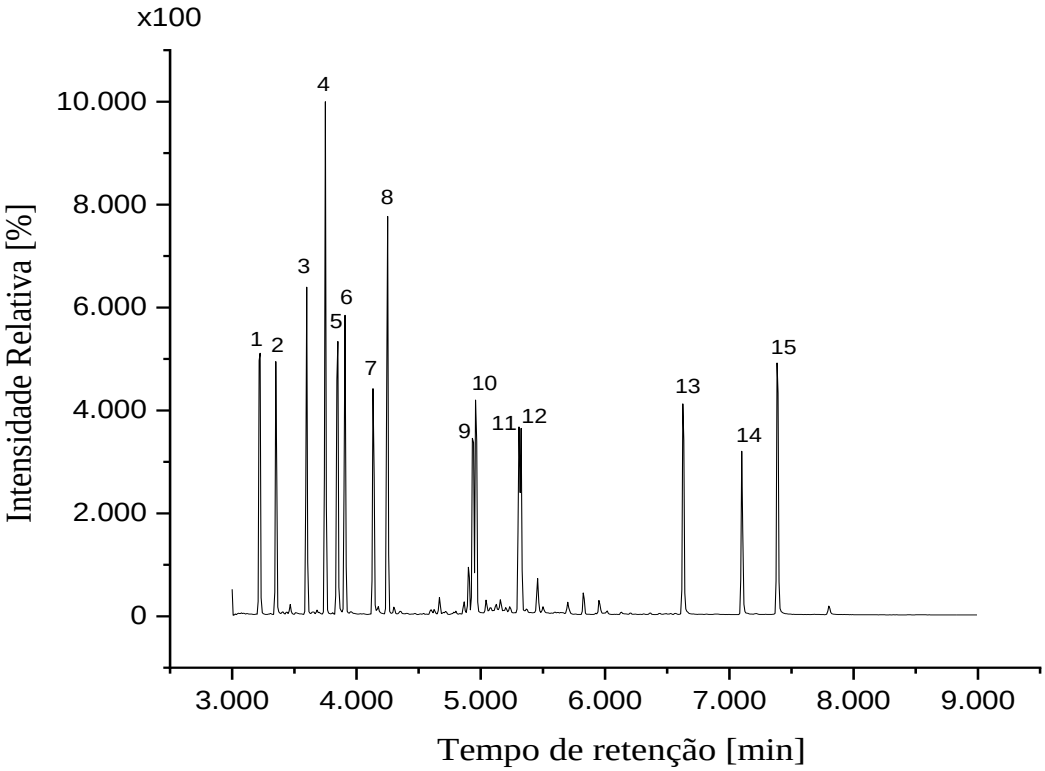

Figura 3.3.1: Cromatograma obtido no modo SIM dos quatorze aminoácidos extraídos das células de fibroblastos e derivatizados com propil clroformato. (1-Ala, 2-Gly, 3- Val, 4-PI-Norv, 5-Leu, 6-Ile, 7-Thr, 8-Pro, 9- Asp, 10-Met, 11-Glu, 12-Phe, 13-Lys, 14-Try, 15-Trp).

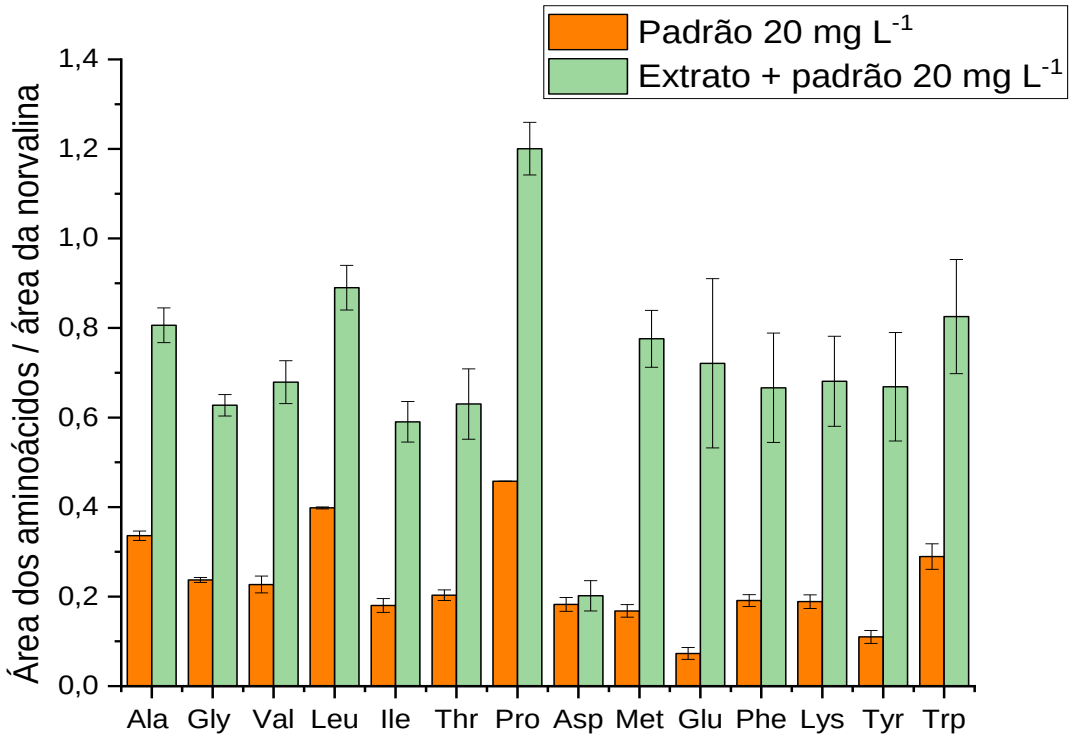

Figura 3.3.2: Comparação da área dos picos normalizados pelo PI entre o padrão de aminoácidos e os aminoácidos obtidos do extrato das células HDFa depois de passar pelo método de preparo de amostra descrito nos itens 3.2.6, 3.2.7 e 3.2.8. Todos os aminoácidos na concentração de 20,0 mg L^{-1}, e norvalina a 23,0 mg L^{-1}. Padrão n=3 e extrato n=10

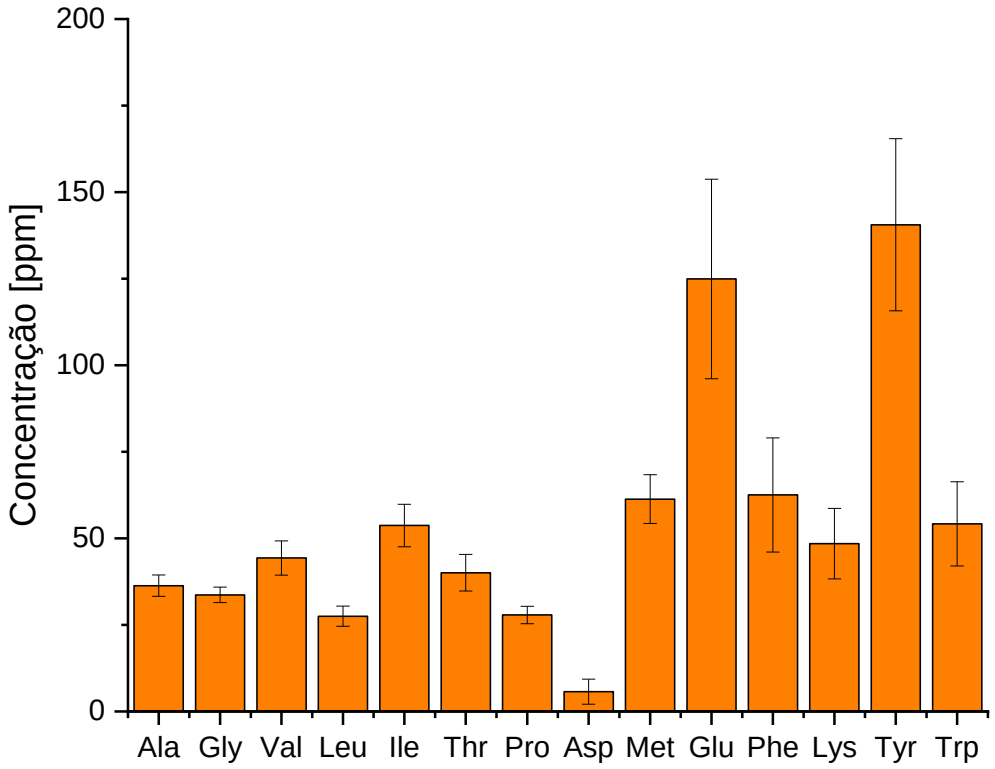

Figura 3.3.3: Concentração de aminoácidos nas células de fibroblastos (n=10)

Batista, et al.; (2020) validou o método de derivatização e análise e encontrou bons resultados com precisão variando de 1,9 a 11,4 % e limites de detecção e quantificação nas faixas de 0,04 a 1,60 mg L^{-1} e 0,08 e 2,76 mg L^{-1}, respectivamente. Para este trabalho, como pequenas modificações foram realizadas no processo de derivatização, e com intuito de aumentar a confiabilidade dos resultados, foi construída uma nova curva analítica aumentando a faixa linear, devido à elevada concentração dos aminoácidos nas células. Além disso, foi avaliada a precisão dos experimentos com o objetivo de investigar se tal procedimento poderia vir a ser reprodutível.

Por meio da Tabela 3.3.1, é possível analisar os valores da equação da reta, coeficiente de variação e a precisão dos resultados obtidos depois dos tratamentos estatísticos realizados levando em consideração a distribuição dos dados, a exclusão de *outliers* e a variância das amostras. Foram encontrados valores de R^2 acima de 0,9228. O desvio padrão relativo (RSD) variou de 4,83 a 13,71%. Com exceção da fenilalanina, a

variação máxima para todos os aminoácidos ficou abaixo de 8,88% indicando pouca variação experimental, apesar da complexidade das etapas. Resultados semelhantes foram vistos nos trabalhos de Chen e colaboradores (2010), nos quais obtiveram-se valores de RSD entre 2,10 e 9,30% para aminoácidos derivatizados com metil cloroformato (Chen et al., 2010). É importante ressaltar que algumas coeluições ocorreram entre os aminoácidos ácido aspártico e metionina e ácido glutâmico e fenilalanina, e, talvez, por esse motivo a repetibilidade da fenilalanina ficou comprometida.

Tabela 3.3.1: Faixa linear, coeficiente de determinação (R^2), precisão (n=8) dos aminoácidos analisados por GC/MS.

Aminoácidos	**Faixa Linear (mg L^{-1})**	**Equação da reta (mg L^{-1})**	**R^2**	**Precisão RSD (%)**
				P_3
Alanina	1,0 a 50,0	y=0,0133x+0,0568	0,9572	4,83
Glicina	1,0 a 50,0	y=0,011x+0,0176	0,9542	6,47
Valina	1,0 a 50,0	y=0,0102x+0,0230	0,9753	7,86
Leucina	1,0 a 50,0	y=0,0172x+0,0394	0,9497	6,42
Isoleucina	1,0 a 50,0	y=0,0078x+0,0155	0,9531	9,35
Treonina	1,0 a 50,0	y=0,0108x+0,0013	0,9551	5,24
Prolina	1,0 a 50,0	y=0,0246x+0,0227	0,9562	6,68
Ácido aspártico	1,0 a 50,0	y= 0,0074x+0,0235	0,9283	8,23
Metionina	1,0 a 50,0	y=0,00957x+0,0033	0,9837	7,63
Glutamina	1,0 a 50,0	y=0,00496x+0,0035	0,9904	7,80
Fenilalanina	1,0 a 50,0	y=0,0078x+0,0226	0,9645	13,71
Lisina	1,0 a 50,0	y=0,0104x-0,0314	0,9228	8,83
Tirosina	1,0 a 50,0	y=0,0043x-0,0051	0,9360	8,88
Triptofano	1,0 a 50,0	y=0,0113x-0,0129	0,9611	5,84

Geralmente, a etapa de preparo de amostra em estudos metabolômicos baseados em GC/MS consome muito tempo devido aos processos de *quentching*, coleta, extração e uma etapa a mais de derivatização. Além disso, o preparo de amostra é uma das fases que apresenta a maior porcentagem de erros nesses tipos de estudos (Nunes de Paiva et

al., 2014; Zeki et al., 2020). Esses desafios mostram a importância de se desenvolver métodos eficientes e reprodutíveis para se obter resultados seguros na busca de biomarcadores preditivos de doenças.

Os resultados obtidos neste trabalho foram promissores, pois consumiu menos tempo de aquisição das análises ao mesmo tempo em que apresentou um novo método de preparo de amostra eficiente e reprodutível, que uniu um protocolo de *quentching* e extração com outro de derivatização por alquilação para análise de aminoácidos derivados de células de fibroblastos e análise por GC/MS. Foi possível observar cromatogramas mais limpos, com menos ruídos e um tempo total de preparo de amostra menor quando comparado com outros trabalhos descritos na literatura, principalmente àqueles que utilizaram a derivatização por sililação (Van Der Werf et al., 2005; Wilkins et al., 2019; Zheng et al., 2013).

3.4 CONCLUSÃO

Um novo método de preparo de amostra foi desenvolvido para análise de aminoácidos derivados de células de fibroblastos. Resultados satisfatórios foram obtidos nessa etapa. Devido à elevada concentração de aminoácidos, foi possível perceber que esses analitos foram extraídos das células. Os resultados de linearidade e repetibilidade confirmaram esse feito demostrando elevados valores de R^2 maiores que 0,9228 e RSD entre 4,83 e 13,71%, que foram resultados satisfatórios levando em consideração a complexidade das etapas.

Pode se dizer que o método aqui proposto é bastante promissor, pois até onde se sabe ainda não foi desenvolvido método de análise de aminoácidos por GC/MS derivados de células de fibroblastos. Além disso, unir diferentes trabalhos da literatura e obter resultados satisfatórios é um grande passo para os estudos subsequentes nos quais se deseja investigar testes mais complexos como alterações de pele causadas pele exposição ambiental.

3.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Batista, J. M., Neves, M. J., Pereira, A. G., Gonçalves, L. S., Menezes, H. C., & Cardeal, Z. L. (2020). Metabolomic studies of amino acid analysis in Saccharomyces cells exposed to selenium and gamma irradiation. *Analytical Biochemistry*, *597*(February),tps://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113666

Chen, W. P., Yang, X. Y., Hegeman, A. D., Gray, W. M., & Cohen, J. D. (2010). Microscale analysis of amino acids using gas chromatography-mass spectrometry after methyl chloroformate derivatization. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *878*(24), 21tps://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.06.027

Nunes de Paiva, M. J., Menezes, H. C., & de Lourdes Cardeal, Z. (2014). Sampling and analysis of metabolomes in biological fluids. *Analyst*, *139*(15), 36tps://doi.org/10.1039/c4an00583j

Van Der Werf, M. J., Fiehn, O., Dunn, W. B., Ellis, D., Greef, J. V, Stroobant, P., Heijden, R., V. D; Fiehn, O., & Weckwerth, W. (2005). Microbial Metabolomics with Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, *32*(2), 12tps://doi.org/10.1021/ac051683

Wilkins, J., Sakrikar, D., Petterson, X. M., Lanza, I. R., & Trushina, E. (2019). A comprehensive protocol for multiplatform metabolomics analysis in patient-derived skin fibroblasts. *Metabolomics*, *15*(tps://doi.org/10.1007/s11306-019-1544-z

Zeki, Ö. C., Eylem, C. C., Reçber, T., Kır, S., & Nemutlu, E. (2020). Integration of GC–MS and LC–MS for untargeted metabolomics profiling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *190*,tps://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113509

Zheng, X., Qiu, Y., Zhong, W., Baxter, S., Su, M., Li, Q., Xie, G., Ore, B. M., Qiao, S., Spencer, M. D., Zeisel, S. H., Zhou, Z., Zhao, A., & Jia, W. (2013). A targeted metabolomic protocol for short-chain fatty acids and branched-chain amino acids. *Metabolomics*, *9*(4), tps://doi.org/10.1007/s11306-013-0500-6

4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE ACOPLADA A UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS DO TIPO QUADRUPOLO E TEMPO DE VOO (GCXGC-Q-TOFMS/MS) DERIVADOS DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS

4.1 OBJETIVOS

4.1.1 Objetivo geral

Desenvolver um método de análise de aminoácidos derivatizados com propil cloroformato por cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo e tempo de voo (GCXGC-Q-TOFMS/MS).

4.1.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições do GCxGC, como jogo de colunas, programação de temperatura do forno, período de modulação, temperatura e tempo do jato quente, temperatura do injetor, fluxo do gás, temperatura da linha de transferência e temperatura da fonte de ionização.
- Validar o método GCxGC-Q-TOFMS/MS desenvolvido com determinação dos principais parâmetros de desempenho.

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

As análises do presente capítulo foram realizadas nos laboratórios de cromatografia avançada (171 e 169A) do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2.1 Reagentes, solventes, soluções e gases

- Água ultrapura, purificador de água Purelab Classic da Elga (Reino Unido)
- 3-Metilpiridina grau GC (≥ 99,0%), Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)
- Propil cloroformato (98%), Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)
- Iso-octano grau HPLC (≥ 99,5%), Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);

- Clorofórmio grau HPLC (≥ 99,8%), J.T.Baker (Darmstadt, EUA);
- 1-propanol grau HPLC (≥ 99,9%), Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);
- Gás hélio comprimido, pureza de 99,999%, Air Products (Mogi das Cruzes, Brasil);
- Gás nitrogênio industrial comprimido, Air Products (Mogi das Cruzes, Brasil);
- Solução aquosa de hidróxido de sódio (0,33 mol L-1);
- Solução de detergente neutro, 5% v/v, Cromoline, Cromotech (Diadema, Brasil);
- Padrões de aminoácidos, Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);
- Solução derivatizante 1(SD1) 77:23 v/v (77,0 % de 1-propanol com 23,0% de 3-metilpiridina), armazenado a −4 °C;
- Solução derivatizante 2 (SD2) 17,4: 11: 71,6 v/v (17,4% de propil cloroformato, 11,0 % de iso-octano e 71,6% de clorofórmio), armazenado a −4 °C;

4.2.2 Suprimentos e equipamentos

- Micropipetas 2,0-20,0 μL, 50,0-200,0 μL e 100,0-1000,0 μL; ThermoScientific (West Palm Beach, Alemanha)
- Termômetro de mercúrio, escala -10 a 110 °C, resolução 0,5 °C;
- Agitador magnético com aquecimento, Fisatom, 752A (São Paulo, Brasil);
- Refrigerador, Consul (São Bernardo do Campo Brasil);
- Microsseringa para injeção líquida 10,0 μL, Agilent Tecnology Inc. (Santa Clara, EUA);
- Tubos de ensaio, Laborglass (São Paulo, Brasil);
- Frascos de vidro transparentes 2,0 mL, Laborglass (São Paulo, Brasil);
- Agitador de tubos tipo vortex, modelo QL 901, Biomixer (Jacareí, São Paulo)
- Balança analítica, incerteza de medição u = ± 0,00001 g, modelo AUW220D, Shimadzu (Kyoto, Japão)
- Balão volumétrico de volumes variados, Laborglass (São Paulo, Brasil)
- Bloco de alumínio 8x6x8cm
- Sistema de purificação de água Milli Q Merck Millipore (ELGA veolia, Brasil)
- Coluna Capilar HP-5MS (30 m x 250 μm x 0,25 μm), Agilent Tecnology Inc. (Santa Clara, EUA);

- Coluna Capilar ZB-AAA (10 m × 0,25 mm × 0,1 μm), Phenomenex (Califórnia, EUA
- Coluna Capilar Rxi®-17sil MS (2 m x 150 μm x 0,15 μm), Restek Corporation (New Jersey, EUA)
- Coluna Capilar Rxi®-200 (2 m x 150 μm x 0,15 μm), Restek Corporation (New Jersey, EUA)
- Coluna Capilar Stabilwax (2 m x 150 μm x 0,15 μm), Restek Corporation (New Jersey, EUA)

4.2.3 Softwares

- GC Image versão 2.9r2 GCxGC-HRMS (Lincoln, EUA)
- OriginPro® 9 SR0, versão 2021 (Northampton, EUA)
- Excel 2013, Microsoft (Redmond, EUA)

4.2.4 Soluções padrão de aminoácidos

Foram preparadas soluções-estoque de 1000,0 mg L^{-1} individuais dos 17 padrões analíticos de aminoácidos (pureza ≥ 99%) em água ultrapura. Os aminoácidos utilizados neste estudo foram: L-alanina (Ala), glicina (Gly), L-valina (Val), L-leucina (Leu), L-isoleucina (Ile), L-treonina (Thr), y-ácido aminobutirínico (GABA), L-prolina (Pro), L-metionina (Met), L-ácido aspártico (Asp), L-serina (Ser), L-fenilalanina (Phe), L-ácido glutâmico (Glu), L-lisina (Lys),L-histidina (His), L-tirosina (Tyr), L-triptofano (Trp) e por fim, L-norvalina (Norv) como padrão interno (PI). As soluções foram preparadas em balões calibrados e armazenadas em refrigerador, a 4 °C. Soluções trabalho foram preparadas a partir da solução estoque.

4.2.5 Derivatização dos padrões de aminoácidos

Foram adicionados 100,0 μL de solução dos 17 aminoácidos (0,5 mg L^{-1}) seguidos de 100,0 μL de solução contendo o padrão interno-norvalina (1,0 mg L^{-1}) ao frasco de reação. Posteriormente, foram adicionados 165,0 μL de água ultrapura, para a diluição, seguido de 80,0 μL de solução derivatizante 1 (SD1) junto a 120,0 μL de solução a 0,33 mol L^{-1} de NaOH. O frasco foi agitado por 12 s, aquecido em bloco térmico a 60 ºC

por mais 12 s e, novamente, agitado por 12 s. Após essa etapa, foram adicionados 50,0 µL de solução derivatizante 2 (SD2) ao meio, a solução foi agitada por 12 s, aquecida a 60 °C por 12 s e, novamente, agitada por 12 s, deixada 1 min de repouso e, posteriormente, agitada por mais 12 s. Por fim, adicionou-se 250,0 µL de iso-octano. A solução foi agitada por 12 s e colocada em repouso até a separação das fases. Após esse tempo, um volume de 200,0 µL da fase superior (orgânica) do sistema bifásico formado foi transferido para um frasco de 2,0 mL, seca em fluxo de nitrogênio gasoso até toda a fase líquida evaporar. Em seguida, foi adicionado 20,0 µL de iso-octano para análise (Batista et al., 2020, com modificações). Os passos otimizados do processo de derivatização estão no esquema da Figura 4.2.1.

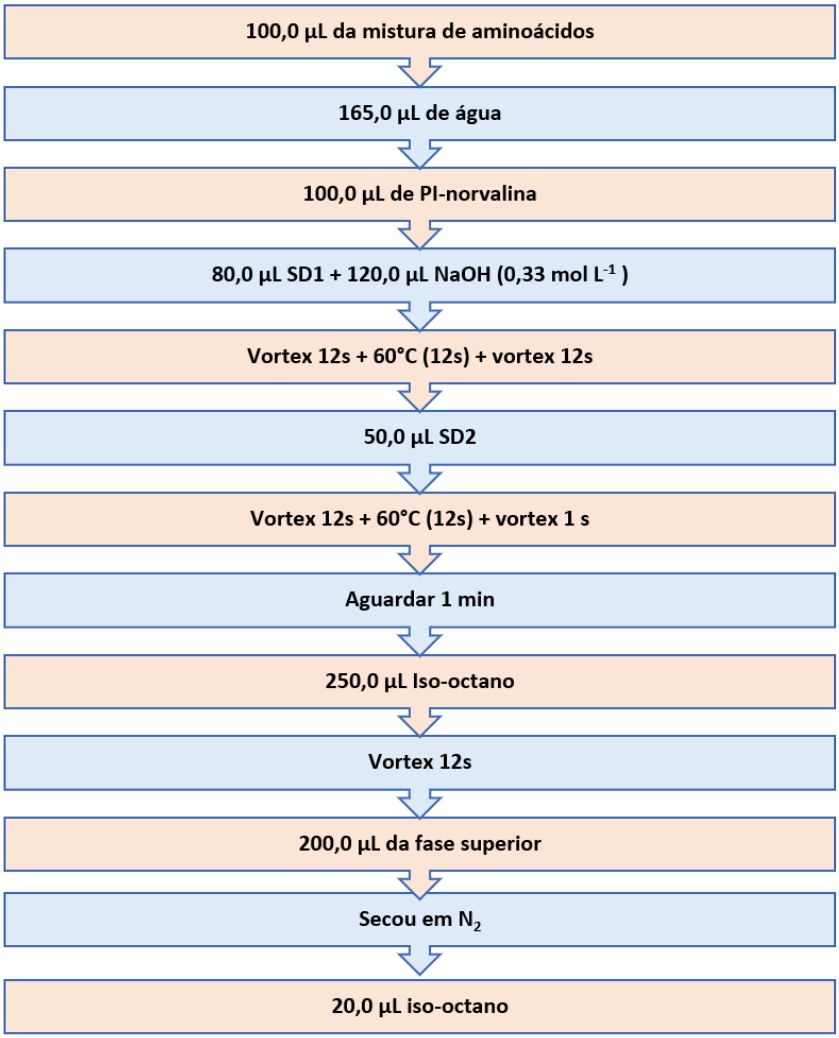

Figura 4.2.1: Etapas do processo de derivatização dos aminoácidos

4.2.6 Sistema e método cromatográfico

As análises dos aminoácidos foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Agilent, modelo7890B GC), acoplado a um espectrômetro de massas com analisador híbrido quadrupolo - tempo de voo Q-TOFMS/MS (Agilent, modelo 7250 GC/Q-TOF), fabricado em Wilmington, DE, US. No sistema GCxGC, foi usado um modulador de loop térmico (Zoex, modelo ZX2), fabricado em Houston, TX, US. Os programas Agilent MassHunter e o GC Image versão 2.9r2 GCxGC-HRMS foram usados para a aquisição e tratamento dos dados (diagramas de contorno) junto a um sistema de busca equipado com uma biblioteca NIST 107 versão 2.3 (2017). As condições de execução e o método cromatográfico do sistema GCxGC-Q-TOFMS/MS são mostradas na Tabela 4.2.1.

Tabela 4.2.1: Condições de execução e método cromatográfico do sistema GCxGC-Q-TOFMS/MS para análise de aminoácidos.

Condições do GC	
Coluna da primeira dimensão	HP-5MS, Agilent (30 m x 250 µm x 0,25 µm)
Coluna da segunda dimensão	Stabilwax ,Resteck (2 m x 150 µm x 0,15 µm)
Volume de injeção	1 µL
Modo de injeção	Split 1:10
Fluxo de hélio	1.2 mL min^{-1}
Temperatura do injetor	280 °C
Programação do forno	Início: 120 °C, 3 °C min^{-1} até 150 °C Rampa 1: 150 °C, 1 °C min^{-1} até 160 °C Rampa 2: 160 °C, 5 °C min^{-1} até 260 °C (4 min)
Tempo total da corrida	44 min
Condições do modulador térmico	
Período de modulação	8s
Fluxo do jato frio	13 L min^{-1}
Temperatura do jato quente	275°C
Tempo do jato quente	350 ms
Condições do Q-TOFMS/MS	
Temperatura da linha de transferência	260°C
Temperatura da fonte	240°C
Temperatura do quadrupolo	150°C
Faixa de massa monitorada	45 m/z – 450 m/z
Taxa de aquisição espectral	50 Hz

4.2.7 Otimização dos parâmetros do método cromatográfico

Foi desenvolvido um novo método de cromatografia bidimensional abrangente para as análises de aminoácidos derivatizados com propil cloroformato. Além das modificações na programação de temperatura do forno, avaliaram-se dois parâmetros importantes de

GCxGC, o conjunto de colunas utilizadas na primeira e segunda dimensão e o período de modulação. Foram testadas as colunas HP-5MS (5%-fenil - polidimetilsiloxana) e Zebrom, ZB-AAA para a primeira dimensão. Essa escolha foi baseada, de acordo com trabalhos anteriores que apresentaram boa separação para análises uni e bidimensionais de aminoácidos (Kaspar et al., 2008; Mayadunne et al., 2005). Para a segunda dimensão, foram avaliados quatro tipos de colunas, a Rxi®-17sil MS (similar a 50 % fenil 50 % dimetil polisiloxano), a Rxi®-200 (50 % trifluoropropilmetil 50 % dimetil polisiloxano) ambas de média polaridade, a Rxi®- 5sil MS (5% fenil 95% Dimetil Polisiloxano) não polar e a Stabilwax (100% polietilenoglicol) de alta polaridade. Para os períodos de modulação, foram avaliados os valores de 4 s, 6 s e 8 s.

4.2.8 Estudo dos principais parâmetros de mérito

Os seguintes parâmetros de mérito foram avaliados: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão e recuperação com os ensaios baseados nas orientações do Guia da Eurachem (Eurachem, 2014). Para a construção das curvas de calibração, utilizou-se de 6 soluções padrão de aminoácidos solubilizados em água ultrapura em uma concentração crescente de 0,2 mg L^{-1}. Os pontos foram avaliados em triplicata e as concentrações variaram de 0,7 a 1,7 mg L^{-1} para metionina e 0,3 a 1,3 mg L^{-1} para os demais aminoácidos. Os LDs e LQs foram calculados a partir do desvio padrão de 10 análises do branco (solução aquosa derivatizada sem a presença dos padrões). Para o estudo de precisão, utilizou-se de 6 replicatas nas concentrações de 0,7 e 1,3 mg L^{-1}. As análises das 6 replicatas para o estudo da precisão intraensaio foram realizadas no mesmo dia, enquanto o estudo da precisão interensaio foi realizado em 2 dias consecutivos. A precisão intra e interensaio foi avaliada através do cálculo do desvio padrão relativo (RSD). A recuperação foi feita para um nível de concentração (0,7 mg L^{-1}) com seis replicatas utilizando como matriz uma amostra de solução padrão de aminoácidos. Os ensaios de recuperação foram realizados todos da mesma maneira como descrito nos passos 3.2.7 e 3.2.8.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3 mostram os resultados da análise de aminoácidos utilizando o conjunto de colunas HP-5MS (^{1}D) e Rxi®-200 (^{2}D), Zebrom AA (^{1}D) e Rxi®-5 Sil MS (^{2}D) e HP-5MS (^{1}D) e Rxi®-17 Sil MS (^{2}D), respectivamente. O jogo de colunas utilizando HP-5MS (^{1}D) e Stabilwax (^{2}D) (Figura 4.3.4) foi o que apresentou melhores resultados devido às suas manchas bem definidas, sem caudas e espalhadas pelo diagrama. Os compostos identificados forneceram uma métrica de alta correspondência com a biblioteca e uma variação razoável nos índices de retenção abaixo de 3,5% (Tabela 4.3.1). Para melhorar a visualização dos analitos, foi obtido um diagrama de cores (Figura 4.3.5) utilizando uma combinação de íon extraído de acordo com as relações massas cargas (M/Z), descritos na Tabela 4.3.1.

Comparando com trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo de cromatografia avançada (RMCA) usando GC unidimensional e comparado com os resultados descritos no capítulo 3, o método de análise por GCxGC apresentou diversas vantagens. Uma delas foi a identificação dos compostos serina, histidina e ácido aminobutirínico não visualizados em GC/MS. Outro fator foi a separação completa entre o ácido aspártico e metionina e ácido glutâmico e fenilalanina. Por fim, é possível observar um aumento na detectabilidade do método no qual um padrão de 0,5 mg L^{-1} foi o suficiente para a identificação de todos os compostos quando comparado ao capítulo anterior, que foi utilizado um padrão de 20 mg L^{-1} para todas as otimizações.

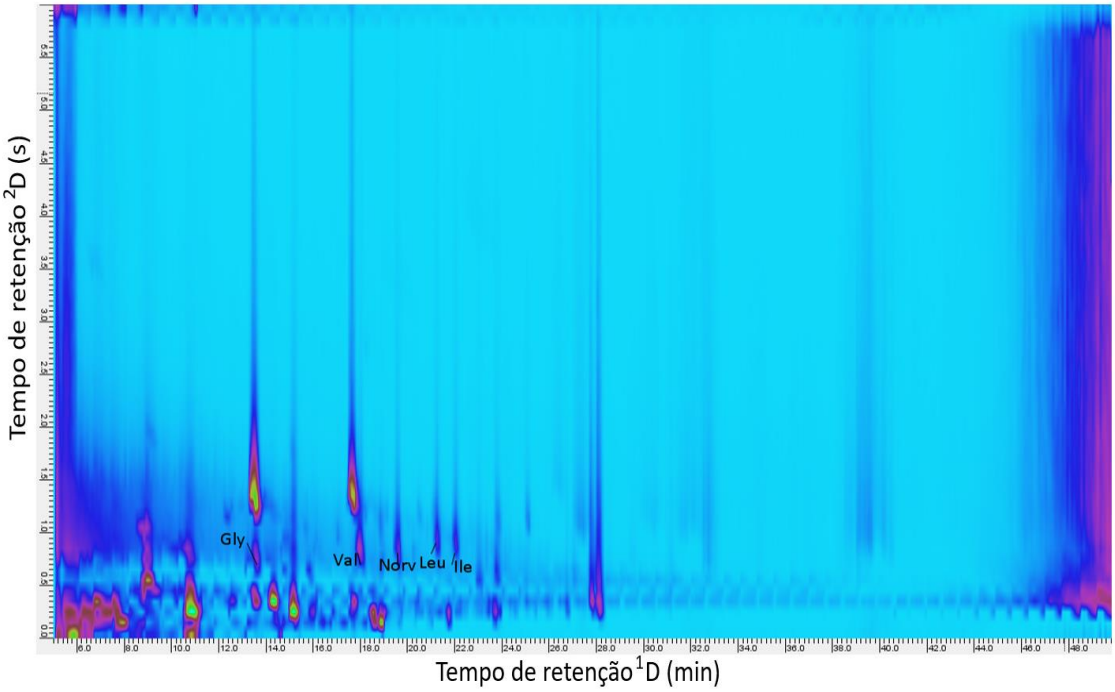

Figura 4.3.1: Diagrama de cores de aminoácidos (0,2 mg L^{-1}) obtido por GCxGC-Q-TOFMS/MS utilizando as colunas HP-5MS (^{1}D) e Rxi®-200 (^{2}D) e período de modulação de 6 s. As condições do injetor, o programa de temperatura do forno, condições do modulador e do Q-TOF/MS são idênticas às descritas na Tabela 4.2.1.

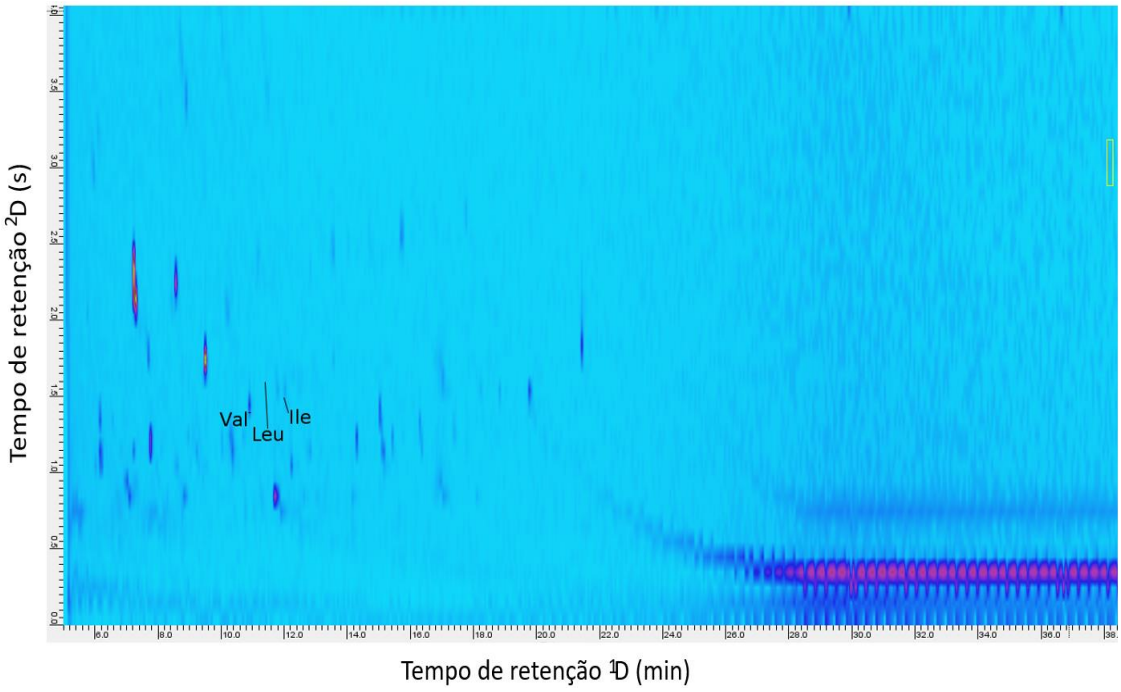

Figura 4.3.2: Diagrama de cores de aminoácidos (0,2 mg L^{-1}) obtido por GCxGC-Q-TOFMS/MS utilizando as colunas Zebrom AA (^{1}D) e Rxi®-5 Sil MS (^{2}D) e período de

modulação de 4 s. As condições do injetor, o programa de temperatura do forno, condições do modulador e do Q-TOF/MS são idênticas às descritas na Tabela 4.2.1.

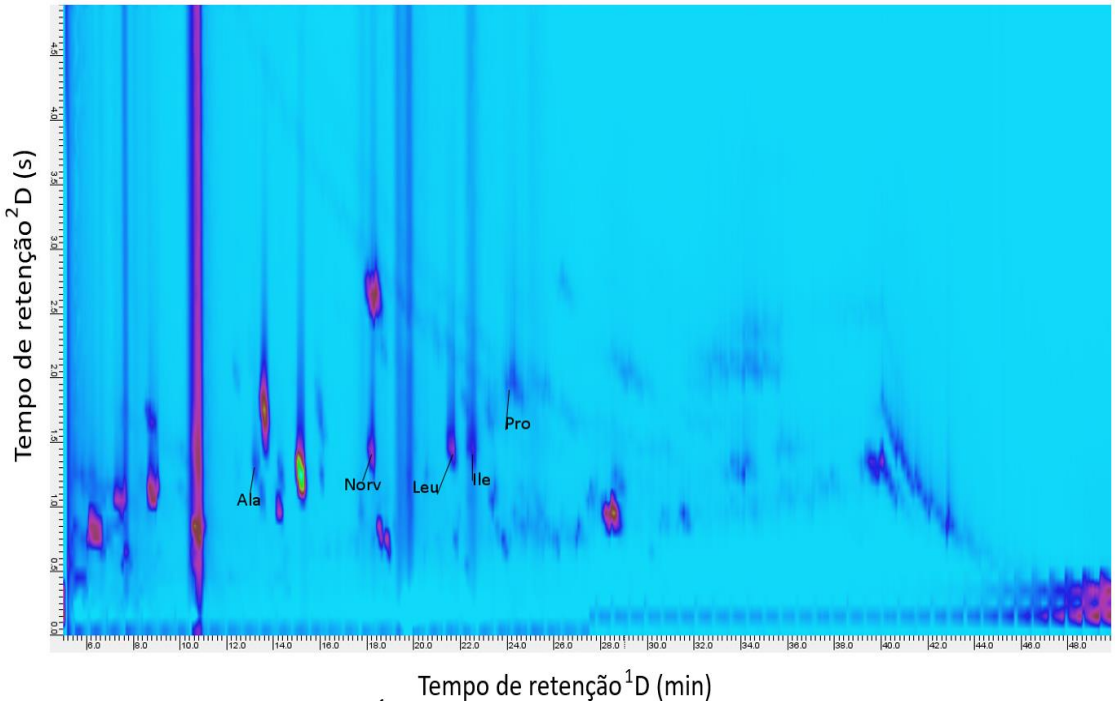

Figura 4.3.3: Diagrama de cores de aminoácidos (0,2 mg L^{-1}) obtido por GCxGC-Q-TOFMS/MS utilizando as colunas HP-5MS (^{1}D) e Rxi®-17 Sil MS (^{2}D) e período de modulação de 4 s. As condições do injetor, o programa de temperatura do forno, condições do modulador e do Q-TOF/MS são idênticas às descritas na Tabela 4.2.1.

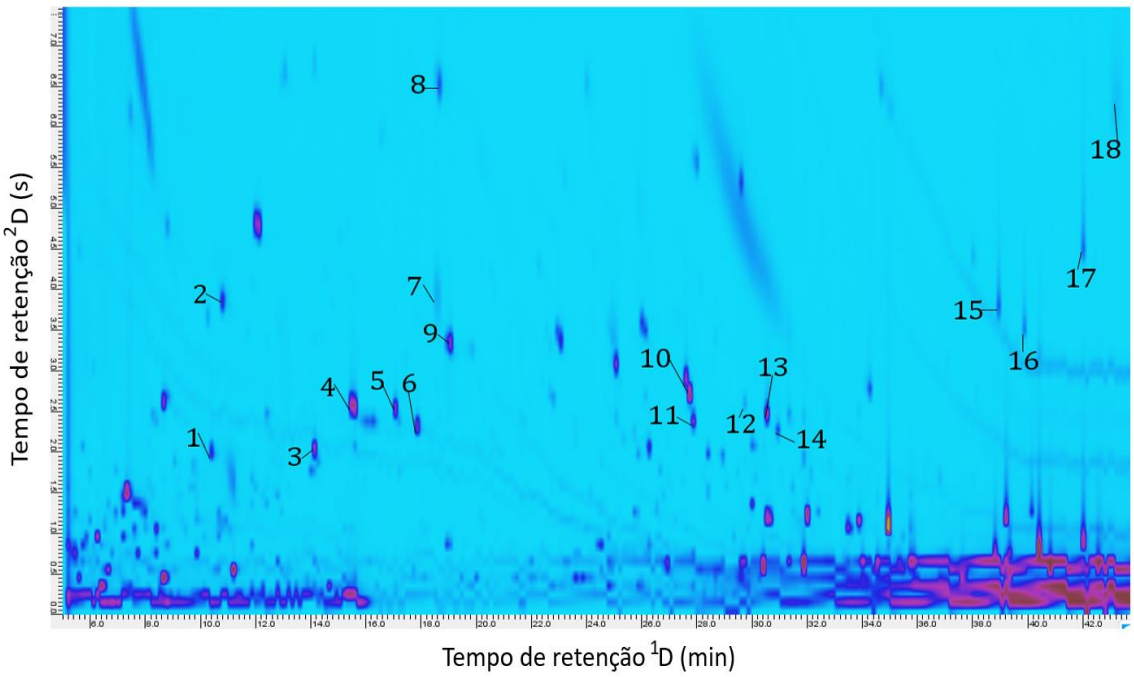

Figura 4.3.4: Diagrama de cores de um padrão de aminoácidos (0,5 mg L^{-1}) obtidos por GCxGC-Q-TOFMS/MS utilizando as colunas HP-5MS (D^1) e Stabilwax (^2D) e período de modulação de 8 s. (1- alanina, 2-glicina, 3-valina, 4-Norvalina (PI), 5-leucina, 6-isoleucina,7-Treonina, 8-ácido aminobutirínico, 9-Prolina, 10-metionina, 11-ácido aspártico, 12-serina, 13-fenilalanina, 14-ácido glutâmico, 15-lisina, 16-histidina, 17-tirosina e 18-triptofano). As condições do injetor, o programa de temperatura do forno, condições do modulador e do Q-TOF/MS estão descritas na Tabela 4.2.1.

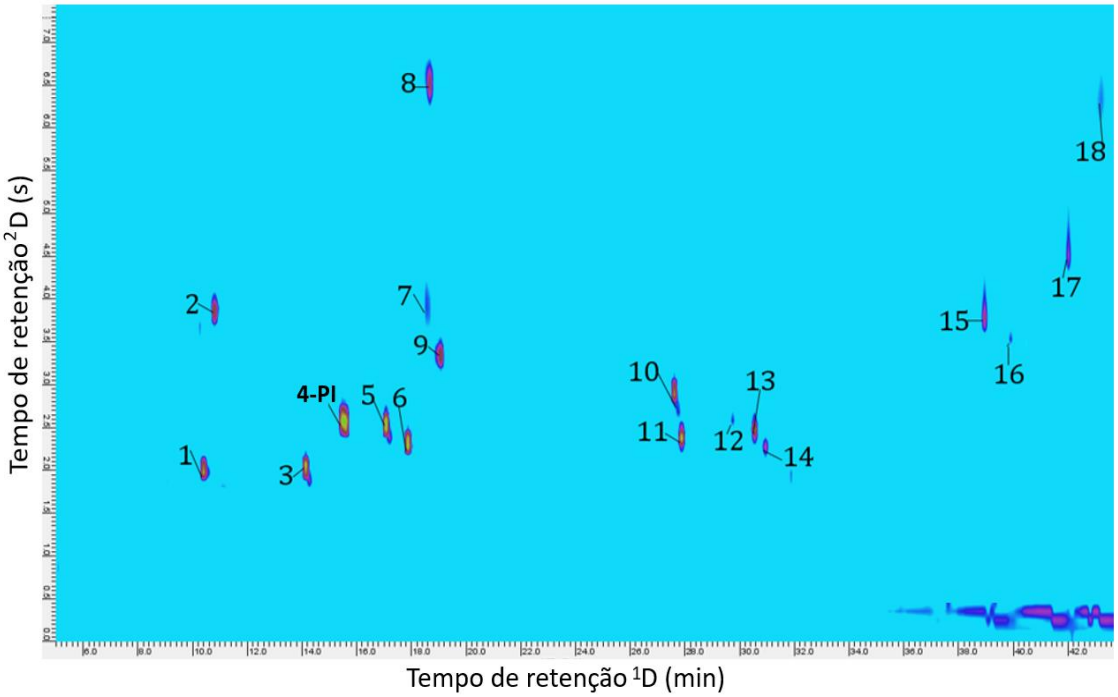

Figura 4.3.5: Diagrama de cores de íon extraído de um padrão de 0,5 mg L^{-1} contendo 18 aminoácidos. (1-alanina, 2-glicina, 3-valina, 4-Norvalina (PI), 5-leucina, 6-isoleucina,7-Treonina,8-ácido aminobutirínico (Gaba), 9-Prolina, 10-metionina, 11-ácido aspártico, 12-serina, 13-fenilalanina, 14-ácido glutâmico, 15-Lisina, 16-Histidina, 17-Tirosina e 18-triptofano). As condições do injetor, o programa de temperatura do forno, condições do modulador e do Q-TOF/MS estão descritas na Tabela 4.2.1.

Tabela 4.3.1. Picos de identificação reconhecidos na Figura 4.3.4 com base na comparação de seus espectros de massa para bancos de dados de referência (MS) e índices de retenção (IR) após análise GC×GC/Q-TOFMS/MS.

Número do Pico	$^{1}t_R$	$^{2}t_R$	Composto	m/z fragmentação do Padrão	IR Literatura	IR Calculado	Erro (%)
1	10,33	1,92	Alanina	130,88,131	1458	1478,9	1,41
2	10,73	3,84	Glicina	116,74,102	1471	1494,7	1,58
3	14,06	2,02	Valina	116,158,72	1572	1592,3	1,27
4	15,40	2,53	Norvalina	158,72,116	1683	1624,2	3,50
5	17,00	2,53	Leucina	172,86,116	1640	1660,6	1,24
6	17,80	2,23	Isoleucina	130,172,74	1659	1678,8	1,17
7	18,46	3,84	Treonina	101,74,56	1664	1693,9	1,76
8	18,60	6,48	Gaba	144,88,112	1718	1697,0	1,22
9	19,00	3,34	Prolina	156,70,114	1695	1705,9	0,63
10	27,66	2,73	Metionina	101,61,203	1907	1935,0	1,47
11	27,80	2,33	Ácido aspártico	216,130,88	1909	1940,0	1,59
12	29,66	2,53	Serina	86,128,55	1981	2011,1	1,49
13	30,46	2,43	Fenilalanina	148,74,91	2058	2044,4	0,66
14	30,86	2,23	Ácido Glutâmico	84,142,230	2031	2061,1	1,46
15	38,86	3,74	Lisina	170,128,84	2465	2447,1	0,72
16	39,80	3,44	Histidina	81,136,167	2515	2488,2	1,07
17	41,93	4,45	Tirosina	107,164,206	2647	2587,5	2,29
18*	43,13	6,27	Triptofano	130,207,131	2664	-	-

Os tempos de retenção nas colunas ^{1}D ($^{1}t_R$) e ^{2}D ($^{2}t_R$) são apresentados por ordem de eluição. Os índices de retenção calculados foram obtidos com base nos tempos de retenção no conjunto de colunas. *Não foram identificados os índices de retenção do alcano correspondente e por isso o IR calculado não foi apresentado e nem o erro associado

Foi realizada a validação estudando as principais figuras de mérito. A Tabela 4.3.2 descreve os resultados obtidos durante a etapa de validação. Todos os tratamentos estatísticos foram realizados e a homoscedasticidade dos dados comprovada, bem como análises de variância e presença de outliers removida. No estudo de linearidade, os valores dos coeficientes de determinação (R^2) foram maiores que 0,9011 para todos os aminoácidos. Os valores de precisão apresentaram RSDs para os compostos analisados entre 5,01 - 24,56% no ponto de 0,7 mg L^{-1} para ambos os ensaios interdias e intradias. O limite de detecção determinado nesta validação ficou na faixa de 0,08 mg L^{-1} a 4,09 mg L^{-1} e o limite de quantificação ficou na faixa de 0,24 mg L^{-1} a 12,42 mg L^{-1}, apresentando resultados satisfatórios devido à alta concentração de aminoácidos presentes nas células. Os valores de recuperação estão na faixa de 46,29 % a 95,46 %, com exceção do ácido

aminobutírico (GABA) que apresentou recuperação de 36,47 % e, talvez por esse motivo não tenha sido identificado nas amostras reais como poderá ser visualizado no capítulo posterior. Em termos gerais, os valores obtidos na validação apresentaram resultados satisfatórios devido ao número de etapas do procedimento analítico que o método apresenta.

Até o quanto se sabe, não há muitos trabalhos na literatura sobre método de GCxGC-Q-TOFMS/MS validado para análise de aminoácidos. Esses estudos ainda se encontram em seus estágios iniciais e muito focados na observação de enantiômeros de aminoácidos (Junge et al., 2007; Waldhier et al., 2011). Uma pesquisa sobre a análise enantiomérica de D-Aminoácidos livres no soro por cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo (GC×GC/TOFMS) apresentou RSDs abaixo de 5,0 % para aminoácidos, com exceção de D -Alanina (12,2%), ácido D-aspártico (16,6%) e D-asparagina (9,9%), enquanto nas análises unidimensionais geralmente apresentava RSDs inferiores a 4% (Waldhier et al., 2011). Em outro trabalho sobre o perfil metabólico sérico não direcionado por GC×GC/TOFMS, os autores obtiveram RSDs entre 0,5 e 26,3 % para a classe de aminoácidos (di Giovanni et al., 2020). Percebe-se, com a análise desses dados, que a precisão do método desenvolvido, mesmo que alta para alguns compostos, ainda está de acordo com o descrito na literatura. Além disso, pode-se observar que melhores valores foram obtidos em análises unidimensionais. Isso pode ser devido às grandes variáveis em uma análise bidimensional como temperatura do forno, temperatura dos fluxos de ar quente e frio dos moduladores, período de modulação, entre outros.

Tabela 4.3.2: Figuras de mérito como coeficiente de determinação (R^2), faixa linear, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) obtidas para a análise de aminoácidos por GCxGC-Q-TOFMS/MS.

[a]Aminoácidos	Faixa linear (mg L^{-1})	R^2	RSD (%) Interdia		RSD (%) Intradia		LD (mg L^{-1})	LQ (mg L^{-1})	Rec (%)
			P_3	P_6	P_3	P_6			
Alanina	y=0,3036x+0,0166	0,9335	5,91	9,24	6,96	5,25	0,41	1,26	81,14
Glicina	y=0,4439x-0,0207	0,9103	9,98	10,97	10,49	29,44	1,03	3,14	78,84
Valina	y=0,2594x+0,1439	0,9296	11,65	14,31	17,63	9,13	0,48	1,47	86,24
Leucina	y=0,4963x+0,0071	0,9118	10,44	7,31	7,18	6,95	0,27	0,84	54,00
Isoleucina	y=0,2087x+0,1515	0,9123	10,40	16,12	9,70	5,05	0,99	3,00	49,01
Treonina	y=0,096x+0,01403	0,9859	18,15	11,41	13,42	19,40	3,79	11,49	95,46
Prolina	y=0,8355x-0,0496	0,9132	8,78	9,56	5,18	7,30	0,09	0,27	59,57
Gaba	y=0,3776x-0,0173	0,9239	5,01	12,30	5,73	10,69	0,08	0,24	36,47
Metionina	y=0,4545x-0,0581	0,9249	5,91	9,24	6,96	5,25	0,44	1,35	57,13
Ácido aspártico	y=0,3874x-0,0175	0,9011	5,01	12,30	6,96	28,36	0,30	0,92	91,11
Serina	y=0,0725x-0,0028	0,9199	14,96	11,42	24,56	28,28	1,30	3,95	71,29
Fenilalanina	y=1,0689x-0,1537	0,9062	11,13	7,35	6,60	9,10	0,36	1,07	46,29
Ácido Glutâmico	y=0,1692x-0,0156	0,9056	7,46	25,99	17,64	49,49	3,10	9,40	93,41
Lisina	y=0,451x-0,0247	0,9296	8,24	13,80	19,37	27,74	0,95	2,87	69,52
Histidina	y=0,1647x+0,0196	0,9028	10,83	9,10	23,38	36,64	4,09	12,42	84,43
Tirosina	y=0,3594x+0,09978	0,9582	17,39	6,76	21,30	21,18	2,57	7,81	62,75
Triptofano	y=0,3091x+0,0101	0,9430	20,98	11,67	15,24	24,83	0,96	2,92	54,70

[a] Compostos listados por ordem de eluição

Um fator que deve ser levado em consideração neste trabalho é o conjunto de colunas e o detector utilizado. No estudo de Mayadunne et al., 2005 sobre o desenvolvimento de um método GCXGC para análise de aminoácidos derivatizados por alquilcloroformatos, os autores identificaram que o conjunto de colunas polares/apolares apresentou melhores resultados quando comparado com um conjunto de colunas apolares/polares. Além disso, os autores demonstraram que melhores resultados foram obtidos por GCxGC-FID, quando comparado ao GCxGC-Q-TOF/MS (Mayadunne et al., 2005). Por outro lado, os resultados deste estudo contribuíram para o aprimoramento de um método GCxGC para análise de aminoácidos pré-existente, pois utilizou um conjunto

de colunas diferentes (apolares/polares) e encontrou resultados satisfatórios como boa separação das manchas (*blobs)* utilizando um detector de elevada seletividade como o Q-TOFMS/MS. Além disso obteve-se *blobs* bem definidos e sem caudas, com boa correspondência com a biblioteca Nist, disponível no sistema. Outro fator positivo foi o tempo de análise que diminuiu, em média, 20 min quando comparado ao trabalho citado.

4.4 CONCLUSÃO

Em suma, os dados adquiridos demonstraram que foi possível desenvolver um método para a classe de aminoácidos derivatizados de forma rápida e eficaz com propil cloroformato e ainda identificá-los com determinada confiabilidade por GCxGC. No entanto, mais estudos são necessários para melhorar algumas figuras de mérito e obter, cada vez mais, um método seguro, confiável e robusto para detecção de biomarcadores.

4.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Batista, J. M., Neves, M. J., Pereira, A. G., Gonçalves, L. S., Menezes, H. C., & Cardeal, Z. L. (2020). Metabolomic studies of amino acid analysis in Saccharomyces cells exposed to selenium and gamma irradiation. *Analytical Biochemistry*, *597*(February), 113666. https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113666

di Giovanni, N., Meuwis, M. A., Louis, E., & Focant, J. F. (2020). Untargeted Serum Metabolic Profiling by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-High-Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*, *19*(3), 1013–1028. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00535

Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). **ISBN 978-91-87461-59-0**.

Junge, M., Huegel, H., & Marriott, P. J. (2007). Enantiomeric analysis of amino acids by using comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Chirality*, *19*(3), 228–234. https://doi.org/10.1002/chir.20371

Kaspar, H., Dettmer, K., Gronwald, W., & Oefner, P. J. (2008). Automated GC-MS analysis of free amino acids in biological fluids. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *870*(2), 222–232. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.06.018

Mayadunne, R., Nguyen, T. T., & Marriott, P. J. (2005). Amino acid analysis by using comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *382*(3), 836–847. https://doi.org/10.1007/s00216-005-3083-x

Waldhier, M. C., Almstetter, M. F., Nürnberger, N., Gruber, M. A., Dettmer, K., & Oefner, P. J. (2011). Improved enantiomer resolution and quantification of free d-amino acids in serum and urine by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1218*(28), 4537–4544. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.039

5 ESTUDO PILOTO DA EXPOSIÇÃO DO MATERIAL PARTICULADO EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DERIVADOS DE PELE HUMANA. UMA ABORDAGEM METABOLÔMICA.

5.1 OBJETIVOS

5.1.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da exposição a agentes tóxicos presentes no material particulado atmosférico por meio da análise metabolômica direcionada (*target*) de aminoácidos derivadas de fibroblastos da pele humana usando GCxGC-Q-TOFMS/MS.

3.1.2 Objetivo específico

- Coletar o material particulado (MP) em Belo Horizonte, Minas Gerais
- Definir um método de exposição do material particulado nas células de fibroblastos de pele humana
- Fazer ensaios de citoxicidade
- Expor o MP nas células e avaliar por GCxGC-Q-TOFMS/MS as alterações causadas nos aminoácidos derivados de fibroblastos

5.2 PARTE EXPERIMENTAL

As análises presentes neste capítulo foram realizadas em colaboração com o Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) e com o Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Além das análises nos laboratórios de cromatografia avançada (171 e 169A) do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

5.2.1 **Reagentes, solventes, soluções e gases**

- Água ultrapura, purificador de água Purelab Classic da Elga (Reino Unido)
- Gás nitrogênio industrial comprimido, Air Products (Mogi das Cruzes, Brasil);

- Tampão fosfato (PBS- *phosphate buffered saline*), ThermoScientific (West Palm Beach, EUA);
- Solução de detergente neutro, 5% v/v, Cromoline, Cromotech (Diadema, Brasil);
- MEM-Meio Essencial Mínimo, ThermoScientific (West Palm Beach, EUA);
- Soro Bovino Fetal, Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);
- MTT- brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), Invitrogen, Thermo Fisher Scientific: M6494 (West Palm Beach, EUA);
- Dodecil sulfato de sódio (SDS), Thermo Scientific (São Paulo, Brasil);
- Ácido Clorídrico, Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)

5.2.2 Suprimentos e equipamentos

- Amostrador de grandes volumes para coleta de material particulado $MP_{2,5}$, Energética, (Rio de Janeiro, Brasil);
- Mufla, modelo Q318M24, Quimis, (Diadema, Brasil).
- Banho de ultrassom, SONITOP 404A, Soni-tech do Brasil (São Bernardo do Campo, Brasil).
- Estufa, Biomatic (Porto Alegre, Brasil).
- Freezer, Consul (São Bernardo do Campo, Brasil).
- Filtros de fibra de quartzo (20,3 cm × 25,4 cm e 0,47 mm de espessura), Whatman (Maidstone, Reino Unido);
- Kit de calibração para amostrador de grandes volumes, Graseby-Anderson (Atlanta, USA).
- Detergente neutro, Cromoline Química Fina (Diadema, Brasil)
- Leitor de microplacas Multiskan GO; Thermo Fisher Scientific (MA, EUA)
- Placas de cultura celular de 30 mm, ThermoScientific (West Palm Beach, EUA)
- Garrafas para cultura celular, ThermoScientific (West Palm Beach, EUA)
- Incubadoras de CO_2
- Micropipetas 2,0-20,0 μL, 50,0-200,0 μL e 100,0-1000,0 μL; ThermoScientific (West Palm Beach, Alemanha)

5.2.3 Software

- GC Image versão 2.9r2 GCxGC-HRMS (Lincoln, EUA)
- OriginPro® 9 SR0, versão 2021 (Northampton, EUA)
- Excel 2013, Microsoft (Redmond, EUA)
- Prism 6 (La Jolla, CA, EUA)

5.2.4 Amostragem do $MP_{2,5}$

O material particulado foi coletado em colaboração com o Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), utilizando um amostrador de grandes volumes (AGV) para recolher as partículas em suspensão com diâmetro aerodinâmico menor ou igual a 2,5 µm ($MP_{2,5}$), como o mostrado na Figura 5.2.1. A coleta foi feita em dois pontos na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, um próximo à portaria principal do campus da UFMG (19°51'47.3"S 43°57'30.2"W)- $MP_{PAC;}$ e outro próximo ao parque da estação ecológica da UFMG (19º87’34.7”S, 43º97’24.8”W) - MP_{ECO}. O principal critério para a escolha desses locais foi a proximidade com uma avenida de intenso tráfego de veículos (MP_{PAC}) e a proximidade com um local de maior quantidade de árvores e tráfego de veículos reduzido (MP_{ECO}).

O período de amostragem foi de março de 2022 a abril de 2022. Foram realizadas 17 coletas durante esse tempo com frequência média de quatro coletas por semana, e tempo de amostragem de 24 h (Anexo 1 e 2). Para coletar o $MP_{2,5}$ foram utilizados filtros de quartzo. Antes do uso, os filtros de quartzo foram pré-aquecidos a 400 °C por 4 h para reduzir umidade e matéria orgânica. Após o processo de pré-tratamento, os filtros foram deixados em dessecador por, pelo menos, 24 h e posteriormente utilizados.

O protocolo para a coleta foi realizado da seguinte maneira: o filtro de quartzo foi inserido no amostrador e, devidamente, fixado no porta filtro (Figura 5.2.2). Após a amostragem, o filtro e foi recolhido em folha de alumínio, transportado para laboratório, e armazenado a -18°C.

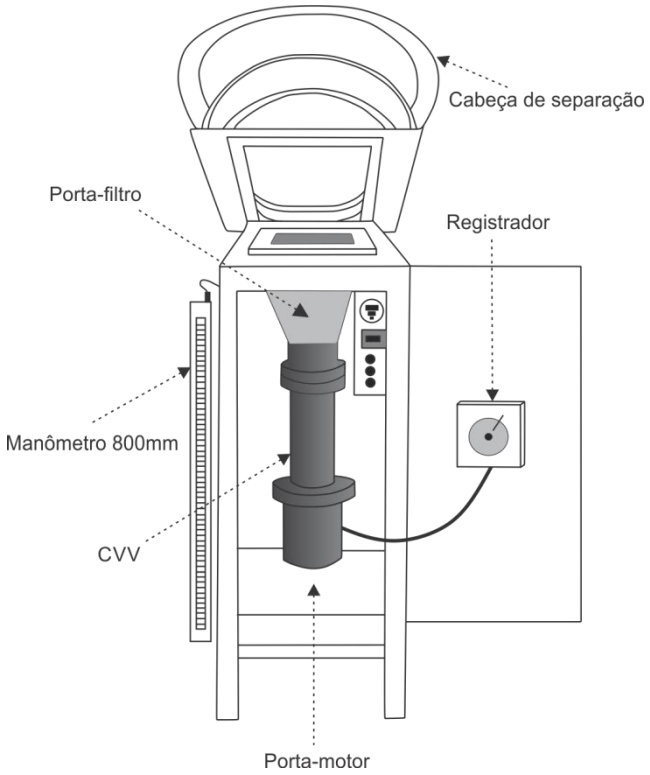

Figura 5.2.1: Esquema do amostrador de grandes volumes para a coleta de $MP_{2,5}$ (Macedo, 2015)

A B C

Figura 5.2.2: Sistema de amostragem dos filtros: A) Amostrador de grandes volumes (AGV) B) AGV aberto C) AGV com filtro fixado no porta filtro

5.2.5 Suspensão do $MP_{2,5}$

Uma fração de, aproximadamente, 10 x 12 cm dos filtros coletados foi selecionada aleatoriamente para a extração do material particulado. As partes selecionadas foram cortadas em pequenos pedaços, imersas em água destilada e sonicadas por 30 min para facilitar a remoção do MP do filtro. O sobrenadante foi transferido para um béquer limpo, e ao frasco contendo os filtros foi adicionado mais água destilada, e sonicado por mais 30 min. Essa etapa foi repetida 3 vezes até a completa limpeza dos filtros e remoção de todo o material particulado. O sobrenadante foi transferido para um béquer e a suspensão foi deixada em repouso *overnight*. Após completa decantação do material, o sobrenadante foi removido e a fração decantada foi seca sob fluxo de nitrogênio (Figura 5.2.3). Posteriormente, as partículas foram pesadas e ressuspensas em meio essencial mínimo (DMEM) de acordo com as concentrações de teste e armazenadas a 4 °C. Esse procedimento de extração do MP foi baseado em Q. Li et al., 2017 com algumas modificações.

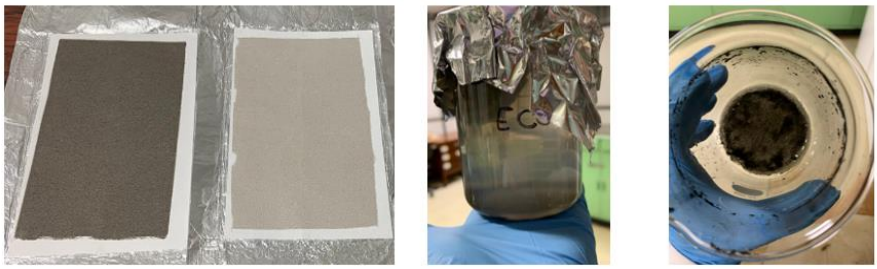

Figura 5.2.3: Esquema de suspensão do $MP_{2,5}$: A) Filtros amostrados (MP_{PAC} e MP_{ECO}, respectivamente) B) Suspensão decantada C) MP depositado no fundo o béquer

5.2.6 Ensaio de viabilidade celular

Antes de expor as células ao material particulado, foram feitos testes de citoxicidade a fim de verificar qual a concentração necessária para manter, ao menos, 50 % de células vivas, visto que o objetivo do trabalho foi de verificar as alterações em níveis metabólicos e, para isso, era necessário que as células permanecessem vivas.

A viabilidade celular foi medida usando MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) (Mosmann, 1983). Para o ensaio MTT, as células HDFa foram

semeadas ($1,0 \times 10^4$ células/poço) em placas de 96 poços. Após 24 h de incubação (37 °C, 95% de umidade e 5% de CO_2), as células foram tratadas com 100,0 µL de diferentes concentrações de MP_{ECO} (0,312; 0,625; 1,250; 2,500; 5,000 e 10,000 mg L^{-1}) e MP_{PAC} (0,312; 0,625; 1,250; 2,500; 5,000 e 10,000 mg L^{-1}). Os experimentos foram realizados em triplicata, incluindo 3 poços em branco e 3 poços de controle não tratados. Após mais 24 h de incubação, o meio foi removido e lavado com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em seguida, 10 µl de solução de MTT (5 mg ml^{-1}) e 90 µl de DMEM foram adicionados por poço. As placas foram incubadas por 3 h até a cristalização do formazan (Figura 5.2.4) e os sais de formazan foram dissolvidos 100 µl de solução de dodecil sulfato de sódio-10% HCl (v/v). A absorbância foi medida a 570 nm, usando um leitor de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific, MA, EUA). A absorbância dos poços em branco foi subtraída de cada medição e a viabilidade celular foi calculada em função da porcentagem da absorbância do grupo controle. Os dados foram processados no software La Jolla Prism 6 da La Jolla (CA, EUA). O valor da concentração inibitória de 50% (IC50) foi calculado a partir do gráfico da curva de dose-resposta.

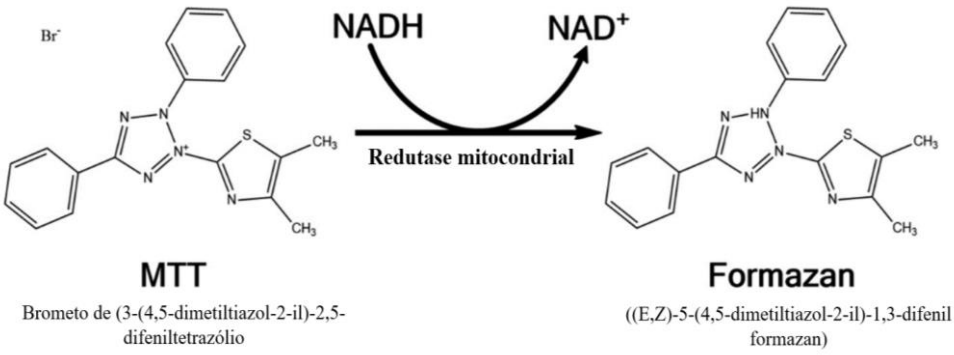

Figura 5.2.4: Reação do MTT com as enzimas celulares para a formação do composto formazan

5.2.7 Exposição do $MP_{2,5}$ nas células

Para realizar os ensaios de exposição, as células foram cultivadas em placas de 30 mm (1×10^5 células/poço) em meio de crescimento completo (DMEM) a 37 °C, em uma atmosfera de 5 % de CO_2. Após 48 h, foram adicionados 100,0 µl de solução de material particulado, de acordo com o IC50 encontrado e mantido a cultura por mais 24 h. Posteriormente, as células foram colhidas e as análises realizadas.

5.2.8 Coleta das células

Mesmo procedimento descrito no item 3.2.6

5.2.9 Extração dos metabólitos

Mesmo procedimento descrito no item 3.2.7

5.2.10 Derivatização dos aminoácidos

Ao extrato seco, foram adicionados 265,0 μL de água ultrapura, seguido de 100,0 μL de solução contendo o padrão interno-norvalina (1,0 mg L^{-1}). Posteriormente, foram adicionados 80,0 μL de solução derivatizante 1 (SD1) junto a 120,0 μL de solução a 0,33 mol L^{-1} de NaOH. O tubo de ensaio foi agitado por 12 s, aquecido em bloco térmico a 60 ºC por mais 12 s e, novamente, agitado por 12 s. Após essa etapa, foram adicionados 50,0 μL de solução derivatizante 2 (SD2) ao meio, a solução foi agitada por 12 s, aquecida a 60 °C por 12 s e, novamente, agitada por 12 s. Manteve-se 1 min de repouso e, posteriormente, o frasco de reação foi agitado por mais 12 s. Por fim, adicionou-se 250,0 μL de iso-octano. A solução foi agitada por 12 s e colocada em repouso até a separação das fases. Após esse tempo, um volume de 200,0 μL da fase superior (orgânica) do sistema bifásico formado foi transferido para um frasco de 2,0 mL, seco em fluxo de nitrogênio gasoso até toda a fase líquida evaporar. Em seguida, foi adicionado 20,0 μL de iso-octano para análise (Batista et al., 2020, com modificações). Os passos otimizados do processo de derivatização estão no esquema da Figura 5.2.5.

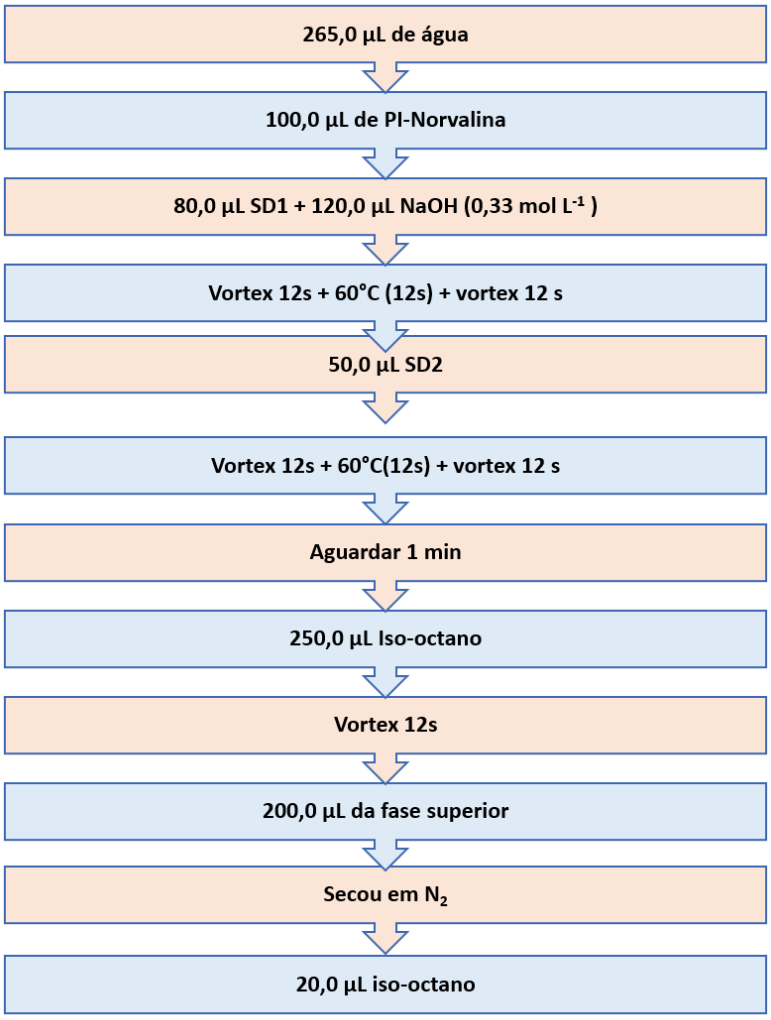

Figura 5.2.5: Etapas do processo de derivatização dos aminoácidos derivados dos extratos celulares

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Citotoxicidade do material particulado

Para determinar a citotoxicidade do material particulado ($MP_{2,5}$) coletado em duas diferentes áreas, as células foram expostas a diferentes concentrações de $MP_{2,5}$ variando de 0,312 a 10,000 mg L^{-1}, após incubação por 24 h (Figura 5.3.1). A viabilidade celular em ambos os tratamentos foi, significativamente, diminuída com o aumento da concentração quando comparada às células de controle. Nesse ensaio, o IC50 para MP_{ECO} foi de 0,9498 mg L^{-1} e um R^2 de 0,9500 indicando a elevada confiabilidade dos resultados. E o IC50 para o MP_{PAC} foi de 0,4116 mg L^{-1} com um R^2 de 0,9700. A viabilidade mostrou dependência obvia do gradiente de concentração (p-valor <0,05). Além disso, é possível observar que a curva de viabilidade do material particulado coletado perto de uma avenida urbana é mais acentuada do que a obtida pelo material coletado perto de uma área ecológica, indicando que os constituintes do MP_{PAC} possuem maior toxicidade quando comparado ao $MP_{ECO,}$ como era de se esperar. Considerando esses resultados, a concentração selecionada para os testes posteriores foram: MP_{ECO} (0,9000 mg L^{-1}) e MP_{PAC} (0,400 mg L^{-1}).

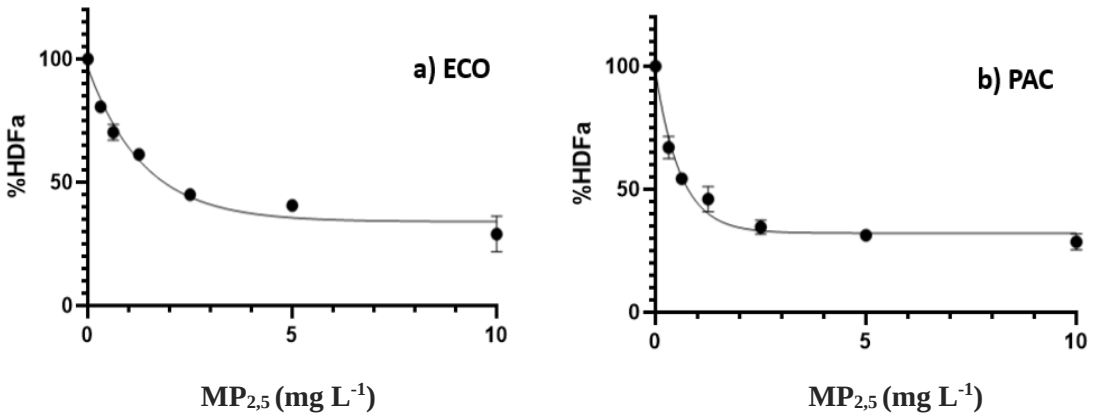

Figura 5.3.1: Citotoxicidade de células HDFa expostas a diferentes concentrações de MP. a) Citotoxicidade de HDFa exposto a MP_{ECO} b) Citotoxicidade de HDFa exposto a MP_{PAC}

5.3.2 Alterações de metabólitos analisados por GC×GC-Q-TOFMS/MS

A Figura 5.3.2 mostra o diagrama de cores obtido por GCxGC para a análise de aminoácidos derivados de células de fibroblastos. Percebe-se que os analitos (enumerados na figura) estão bem separados, com *blobs* bem definidos e sem calda. Os outros *blobs* contidos no diagrama são produtos secundários da derivatização, os próprios reagentes e também podem ser atribuídos a algumas impurezas presentes nas etapas de preparo de amostra. Os resultados obtidos mostram que a técnica GCxGC-Q-TOFMS/MS é sensível e capaz de distinguir claramente os analitos investigados.

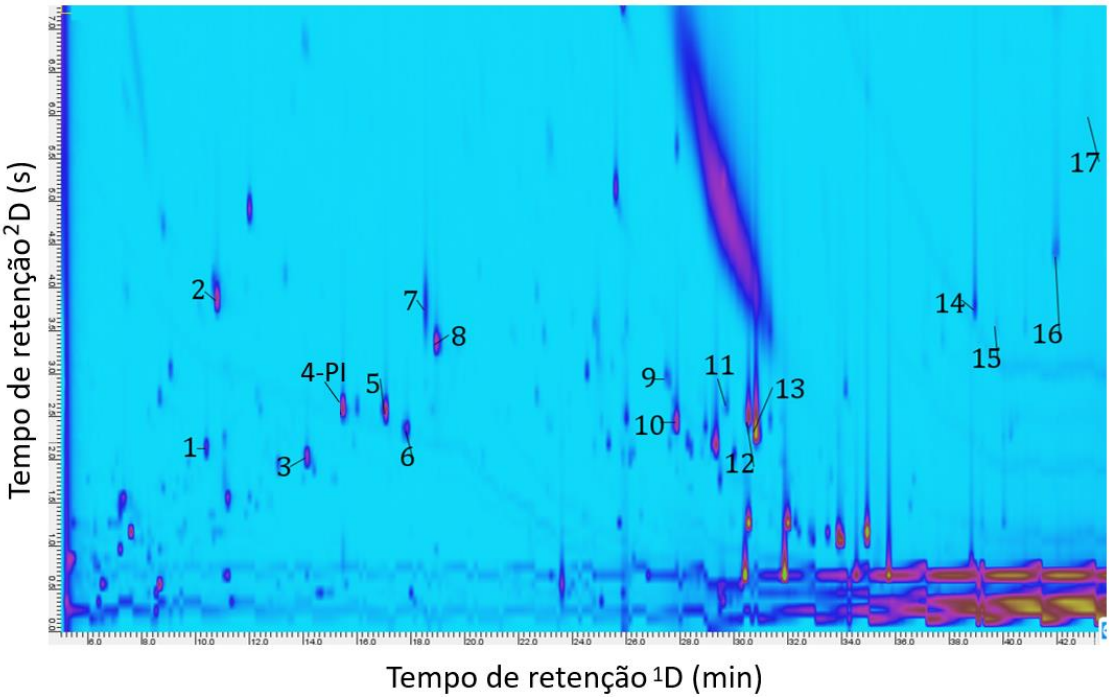

Figura 5.3.2: Diagrama de cores da análise de aminoácidos derivados de células de fibroblastos obtidos por GCxGC-Q-TOFMS/MS utilizando como colunas HP-5MS (^{1}D) e Stabilwax (^{2}D) e período de modulação de 8s. (1- alanina, 2-glicina, 3-valina, 4-Norvalina (PI), 5-leucina, 6-isoleucina,7-treonina,8-prolina, 9-metionina, 10-ácido aspártico, 11-serina, 12-fenilalanina, 13-ácido glutâmico, 14-lisina, 15-histidina, 16-tirosina e 17-triptofano).

Alguns critérios foram adotados para a verificar quais aminoácidos apresentaram valores diferentes entre os grupos analisados. O tratamento estatístico usando ANOVA (p-valor < 0,05) junto ao teste de Turkey foram utilizados para descobrir diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos tratados. A partir desses testes, verificou-

se que alguns aminoácidos tiveram suas concentrações diminuídas nos grupos MP_{ECO} e MP_{PAC}. A Figura 5.3.3 exemplifica os aminoácidos diferenciados entre os grupos.

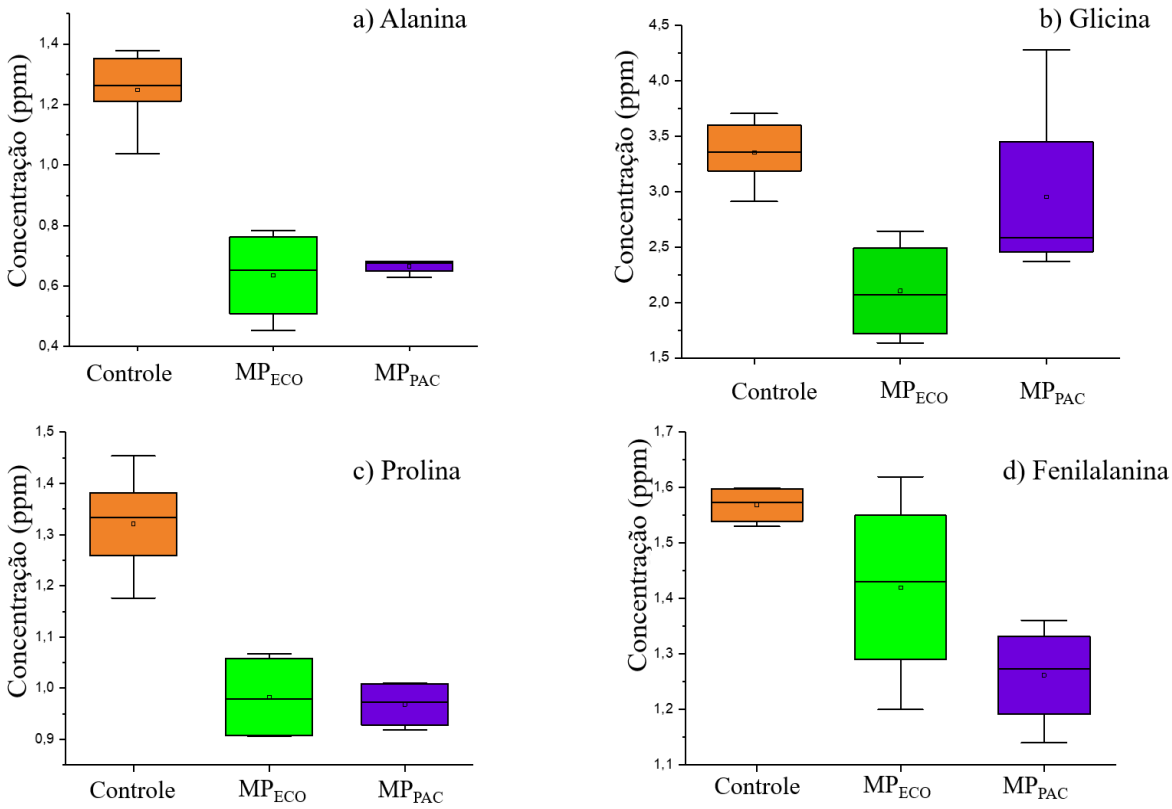

Figura 5.3.3: Aminoácidos diferenciados entre os grupos controle, MP_{ECO} e MP_{PAC}. a) e c) aminoácidos diferenciados entre os grupos controle e MP_{ECO} e entre os grupos controle e MP_{PAC}; b) aminoácido diferenciado entre os grupos controle e MP_{ECO} e d) aminoácido diferenciado entre os grupos controle e $MP_{PAC.}$ (Controle n=5, MP_{ECO} n=4 e MP_{PAC} n=4)

Os dados previamente tratados estatisticamente no formato de concentração foram importados para metaboanalyst 5.0 para visualização da separação entre os grupos. A Figura 5.3.4 representa o gráfico PCA para os três tipos de amostras, controle, tratadas com PM_{ECO} e tratadas com PM_{PAC}. É possível observar uma clara separação entre as amostras de controle e as tratadas com PM_{PAC} e a menor diferenciação dos dados quando as células são tratadas com o material particulado coletado em área mais próxima à estação ecológica. Por meio dessa análise, é possível inferir que existe uma clara correlação entre poluição e alterações metabólicas nas células de fibroblastos, pois quanto mais poluído o local, maior a diferença entre os grupos.

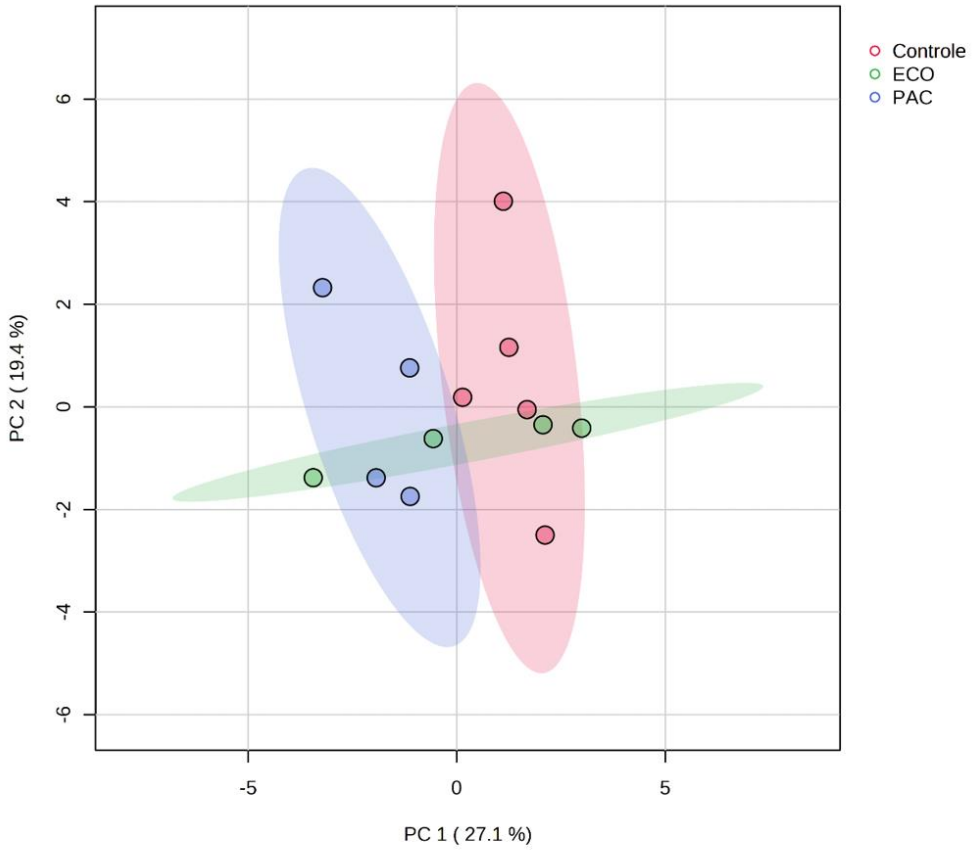

Figura 5.3.4: Gráfico de dispersão de PC1xPC2 de amostra de células de fibroblastos controle e expostas ao MP_{ECO} e MP_{PAC}.

Na mesma plataforma, MetaboAnalyst 5.0, a análise da via metabólica foi investigada. Para isso, os aminoácidos diferenciados entre os grupos foram importados, separadamente, para cada grupo e a análise foi realizada. Um total de 8 vias metabólicas foram modificadas para o grupo tratado com MP_{ECO} e um total de 6 vias metabólicas foram modificadas para o grupo tratado com MP_{PAC}. Em ambos os grupos, a via de biossíntese de aminoacil-tRNA foi a via mais significativamente alterada, seguida pela via de biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano alterada apenas no grupo MP_{PAC}. O resumo da análise das vias metabólicas alteradas é mostrado na Figura 5.3.5 com os resultados detalhados na Tabela 5.3.1.

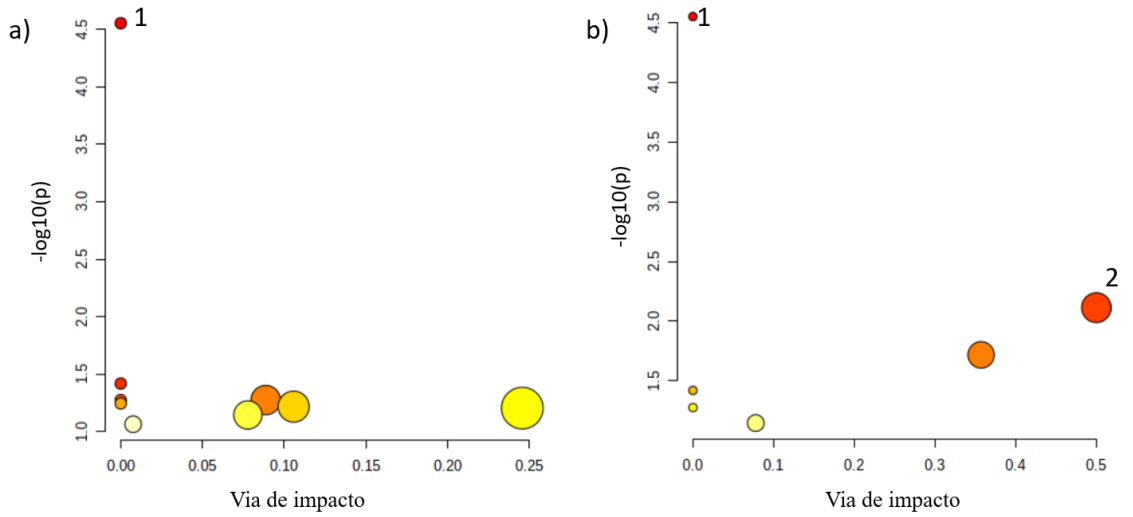

Figura 5.3.5: Resumo das vias metabólicas analisadas pelo software MetaboAnalyst a) MP_{ECO} e b) MP_{PAC}. 1, biossíntese de aminoacil-tRNA; 2, Biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano

Tabela 5.3.1: Análise da via de metabólitos diferenciadas nas células danificadas

	Total	**Hits**	**p Bruto**	**Ajuste de Holm**	**FDR**	**Impacto**	**Grupo**
Biossíntese de aminoacil-tRNA	48	3	2.79E-5	0.00234	0.00234	0	**ECO**
Metabolismo de selenocomposto	20	1	0.0382	1	0.750	0	
Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato	28	1	0.0532	1	0.750	0	
Metabolismo da Glutationa	28	1	0.0532	1	0.750	0.08873	
Metabolismo da porfirina e da clorofila	30	1	0.0569	1	0.750	0	
Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato	32	1	0.0607	1	0.750	0.10582	
Metabolismo da glicina, serina e treonina	33	1	0.0625	1	0.750	0.2457	
Metabolismo de Arginina e Prolina	38	1	0.0718	1	0.753	0.0778	
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48	3	2.79E-5	0.00234	0.00234	0	**PAC**
Biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano	4	1	0.00772	0.64134	0.324	0.5	
Metabolismo da fenilalanina	10	1	0.0192	1	0.53879	0.357	
Metabolismo de selenocomposto	20	1	0.0382	1	0.80297	0	
Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato	28	1	0.0532	1	0.89467	0	
Metabolismo da arginina e prolina	38	1	0.0718	1	1	0.0778	

5.3.3 Discussão

Neste trabalho, utilizou-se a técnica GC×GC-Q-TOFMS/MS para identificar alterações metabólicas direcionadas para a classe de aminoácidos associadas a exposições de poluentes atmosféricos coletados em dois pontos distintos, MP_{ECO} e MP_{PAC}, em células de fibroblastos derivados da pele humana. Os resultados sugeriram que a exposição de curto prazo ao MP_{ECO} e MP_{PAC} induziu alterações nas vias metabólicas e causou alterações significativas em alguns aminoácidos derivados das células HDFa. Várias vias biológicas foram associadas à exposição ambiental ao $MP_{2,5}$. Entre elas, algumas alterações comuns tanto ao MP_{ECO} quanto ao MP_{PAC}, como o metabolismo da alanina, aspartato e glutamato, que já foi associado como uma via alterada durante processos de inflamação aguda (Z. Li et al., 2021).

Os poluentes do ar entram na pele através de nanopartículas e geram quinonas, que são produtos químicos do ciclo redox que produzem espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS estimulam a liberação de mediadores pró-inflamatórios, o que resulta no acúmulo de neutrófilos e outras células fagocíticas que geram ainda mais radicais livres, resultando em um ciclo vicioso de inflamação e deficiências metabólicas. Além disso, essas espécies interagem com a membrana plasmática rica em lipídios, iniciando uma reação de peroxidação lipídica que desencadeia atividade proteolítica, causando mais dano tecidual e efeitos deletérios na pele, como envelhecimento precoce, lentigos, melasma, dermatite atópica, câncer, acne, entre outros (Dong et al., 2019; Kim et al., 2016; Roberts, 2021).

A biossíntese de aminoacil-tRNA (b-tRNA) foi uma via significativamente afetada pelas exposições ao MP_{ECO} e MP_{PAC} (Figura 5.3.4). Essa via, junto às enzimas aminoacil tRNA sintetase (aaRS), são fatores-chave necessários para a biossíntese de proteínas e viabilidade celular, além disso, a expressão dessas enzimas pode estar patologicamente associada a várias doenças humanas, incluindo doenças neuronais, câncer, doenças autoimunes, diabetes que também podem resultar em doenças de pele (Park et al., 2008). Kalkhof et al., 2015 identificaram que proteínas e aminoácidos foram regulados negativamente em resposta à exposição ao benzo[a]pireno (B[a]P) em hepatócitos murinos de maneira dependente do tempo. Os autores concluíram, portanto, que a síntese proteica, o metabolismo lipídico e a disfunção da membrana foram identificadas como efeitos específicos do B[a]P. Desse modo, a diminuição da atividade metabólica associada aos HPAs e os níveis reduzidos de aminoácidos observados

sugerem que a tradução foi suprimida após a exposição ao material particulado (Kalkhof et al., 2015).

Outra via identificada com a exposição ao MP_{PAC} foi a biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano. A fenilalanina é um aminoácido essencial precursor da tirosina. Foi relatado que o metabolismo da tirosina desempenha um papel importante na síntese do hormônio tireoidiano, catecolamina e melanina (Du et al., 2020). O material particulado pode carregar íons metálicos e/ou compostos orgânicos como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos -HPAs que são altamente lipofílicos e podem penetrar nas camadas mais profundas da pele. Os HPAs são, frequentemente, ligados à superfície do MP derivado da combustão, e podem ligar-se aos receptores de hidrocarbonetos arílicos e induzir a proliferação de melanócitos (Krutmann et al., 2014). Vierkötter et al., 2010 associaram os sintomas de envelhecimento da pele com a formação de manchas de pigmentação causadas pela exposição ao MP em locais de grande tráfego automotivo (Vierkötter et al., 2010). Aparentemente, as partículas de MP desenvolvem danos na pele não apenas diretamente, como foi demonstrado, mas também desencadeando indiretamente uma série de vias de sinalização, como estresse oxidativo e alterações nos níveis de melanina (Magnani et al., 2016).

Neste estudo, a título de comparação, os dois tipos de material particulado foram coletados no mesmo dia e horário e nas mesmas condições de temperatura, e a única diferença entre eles é que o MP_{PAC} foi coletado próximo a uma avenida com tráfego intenso e o MP_{ECO} próximo a uma estação ecológica com pouco tráfego de veículos (Anexo 3). Mesmo com essa diferença de tráfego entre os dois tipos de coleta, observou-se que tanto a exposição ao MP_{ECO} quanto ao MP_{PAC} apresentou vias metabólicas alteradas. No entanto, o MP_{PAC} apresentou alterações mais significativas (Figura 5.3.5), o que era de se esperar, visto que, a concentração de poluentes ambientais nesse local era mais concentrada. Esses resultados sugerem que as vias alteradas no metabolismo das células expostas ao MP_{ECO} se devem ao fato de que, mesmo com pouco tráfego de carros, a pequena concentração de partículas ainda oferece certa toxicidade.

A exposição ao MP_{ECO} e MP_{PAC} causou uma diminuição significativa (p-valor < 0,05) nos níveis de alguns aminoácidos celulares (Figura 5.3.3), quando comparado com os resultados obtidos no grupo controle. A alanina, por exemplo, composto regulado negativamente nos dois tipos de exposição, é um aminoácido não essencial produzido pelo organismo através da conversão do piruvato e funciona como uma importante fonte de energia (Guo et al., 2014). Níveis diminuídos de alanina podem ser um indício de que

o nível de piruvato está regulado negativamente e como o piruvato é o principal carreador de NH_4^+ do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para o ciclo da ornitina, a diminuição do piruvato leva a um enfraquecimento do ciclo do TCA e, consequentemente, a uma diminuição da energia celular. Muitas doenças no corpo humano são acompanhadas por distúrbios metabólicos do metabolismo energético nas células (Shi et al., 2019). A transferência de energia intracelular é via ATP, e a produção de ATP está relacionada ao metabolismo energético das células, principalmente no ciclo do TCA e na glicólise (Yamamoto et al., 2021).

Resultados semelhantes podem ser visualizados no trabalho de Shi et al., 2019, no qual encontraram níveis reduzidos de alanina e outros aminoácidos em tecidos hepáticos expostos a partículas finas. Os autores concluíram, a partir da análise dos dados, que a exposição ao $MP_{2.5}$ perturbou o metabolismo dos aminoácidos, o ciclo do TCA, o ciclo da ureia e o metabolismo das purinas, o que causou certo grau de dano hepático e estresse oxidativo (Shi et al., 2019). Esses resultados sugerem, então, que níveis reduzidos de alanina podem afetar o metabolismo das células da pele e levar a vários tipos de lesões ainda desconhecidas e que merecem investigação.

A prolina, outro aminoácido regulado negativamente em ambos os tipos de exposição, é um AA secundário necessário para a biossíntese de proteínas, além de ter um papel crítico na bioenergética celular, osmorregulação, proteção contra estresse, bloqueio do ciclo celular, autofagia e apoptose (Oberkersch & Santoro, 2019; Phang et al., 2010). Um estudo metabolômico e transcriptômico mostrou alterações reduzidas de prolina na pele envelhecida, quando comparada à pele jovem (Kuehne et al., 2017). Os autores correlacionaram esse resultado a um desequilíbrio na osmorregulação na pele envelhecida.

Os osmólitos orgânicos regulam o volume celular, atuam como protetores da perda de água epidérmica e, além disso, desempenham diversos papéis na proteção das células contra estressores externos (Kuehne et al., 2017). De acordo com esses dados, sugere-se que tanto o MP_{ECO} quanto o MP_{PAC} podem ser indicativos de aspectos que levam ao envelhecimento celular devido a alterações significativas em seus aminoácidos. Além disso, já foi relatado que que níveis regulados negativamente de prolina afetam a síntese de colágeno e promovem uma série de cascatas metabólicas que interferem tanto na estrutura da pele quanto no processo de cicatrização de feridas (Murakami et al., 2012).

Os estudos descritos na literatura, junto aos resultados adquiridos nesta pesquisa, mostram que o material particulado afeta o metabolismo das células de fibroblastos

derivados da pele que, por sua vez, pode apresentar alterações tanto em níveis internos como o próprio metabolismo, quanto em níveis externos como o aparecimento de manchas, rugas e doenças na pele. Embora os resultados sejam promissores, ainda é cedo para indicar um biomarcador para esse tipo de exposição, visto que serão necessários mais testes e replicatas que possibilitem maior abrangência no tratamento dos dados.

5.4 CONCLUSÃO

Um método inédito baseado em GC×GC-Q-TOFMS/MS foi desenvolvido para a análise de aminoácidos derivados de células de fibroblastos da pele humana. Pode-se observar, pelos resultados obtidos, que o método desenvolvido foi eficaz para este tipo de estudo. Devido à alta sensibilidade e seletividade do método, foi possível identificar alguns aminoácidos regulados negativamente em células expostas ao material particulado, como alanina e prolina. Por meio das análises de vias, foi possível identificar as vias metabólicas alteradas como o metabolismo de alanina, aspartato e glutamato que está associado à inflamação aguda e estresse oxidativo e a biossíntese de aminoacil-tRNA relacionado à supressão da atividade metabólica. Além disso, pode-se concluir comparando os dois tipos de material particulado coletado, MP_{ECO} e MP_{PAC}, que, mesmo com uma pequena quantidade de tráfego, as partículas coletadas ainda apresentaram certa toxicidade quando expostas às células de fibroblastos.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Batista, J. M., Neves, M. J., Pereira, A. G., Gonçalves, L. S., Menezes, H. C., & Cardeal, Z. L. (2020). Metabolomic studies of amino acid analysis in Saccharomyces cells exposed to selenium and gamma irradiation. *Analytical Biochemistry*, *597*(February), 113666. https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113666

Dong, Y., Liao, L., Li, L., Yi, F., Meng, H., He, Y., & Guo, M. (2019). Skin inflammation induced by ambient particulate matter in China. *Science of the Total Environment*, *682*, 364–373. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.155

Du, X., Zeng, X., Pan, K., Zhang, J., Song, L., Zhou, J., Chen, R., Xie, Y., Sun, Q., Zhao, J., & Kan, H. (2020). Metabolomics analysis of urine from healthy wild type mice exposed to ambient PM2.5. *Science of the Total Environment*, *714*, 136790. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136790

Guo, P., Wang, J., Dong, G., Wei, D., Li, M., Yang, M., & Kong, L. (2014). NMR-based metabolomics approach to study the chronic toxicity of crude ricin from castor bean kernels on rats. *Molecular BioSystems*, *10*(9), 2426–2440. https://doi.org/10.1039/c4mb00251b

Kalkhof, S., Dautel, F., Loguercio, S., Baumann, S., Trump, S., Jungnickel, H., Otto, W., Rudzok, S., Potratz, S., Luch, A., Lehmann, I., Beyer, A., & von Bergen, M. (2015). Pathway and time-resolved benzo[a]pyrene toxicity on Hepa1c1c7 cells at toxic and subtoxic exposure. *Journal of Proteome Research*, *14*(1), 164–182. https://doi.org/10.1021/pr500957t

Kim, K. E., Cho, D., & Park, H. J. (2016). Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases. *Life Sciences*, *152*, 126–134. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.039

Krutmann, J., Liu, W., Li, L., Pan, X., Crawford, M., Sore, G., & Seite, S. (2014). Pollution and skin: From epidemiological and mechanistic studies to clinical implications. *Journal of Dermatological Science*, *76*(3),163–168. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.08.008

Kuehne, A., Hildebrand, J., Soehle, J., Wenck, H., Terstegen, L., Gallinat, S., Knott, A., Winnefeld, M., & Zamboni, N. (2017). An integrative metabolomics and transcriptomics study to identify metabolic alterations in aged skin of humans in vivo. *BMC Genomics*, *18*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/s12864-017-3547-3

Li, Q., Kang, Z., Jiang, S., Zhao, J., Yan, S., Xu, F., & Xu, J. (2017). Effects of ambient fine particles PM2.5 on human HaCaT cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *14*(1), 72. https://doi.org/10.3390/ijerph14010072

Li, Z., Liang, D., Ye, D., Chang, H. H., Ziegler, T. R., Jones, D. P., & Ebelt, S. T. (2021). Application of high-resolution metabolomics to identify biological pathways perturbed by traffic-related air pollution. *Environmental Research*, *193*, 110506. https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110506

Macedo, D. F. D. Avaliação da exposição à poluição ambiental por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em material particulado atmosférico em diferentes áreas urbanas. 2015. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte

Magnani, N. D., Muresan, X. M., Belmonte, G., Cervellati, F., Sticozzi, C., Pecorelli, A., Miracco, C., Marchini, T., Evelson, P., & Valacchi, G. (2016). Skin damage mechanisms related to airborne particulate matter exposure. *Toxicological Sciences*, *149*(1), 227–236. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv230

Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal oflmmunologicalMethods* (Vol. 65).

Murakami, H., Shimbo, K., Inoue, Y., Takino, Y., & Kobayashi, H. (2012). Importance of amino acid composition to improve skin collagen protein synthesis rates in UV-irradiated mice. *Amino Acids*, *42*(6), 2481–2489. https://doi.org/10.1007/s00726-011-1059-z

Oberkersch, R. E., & Santoro, M. M. (2019). Role of amino acid metabolism in angiogenesis. In *Vascular Pharmacology*, *112*, 17–23. https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.11.001

Park, S. G., Schimmel, P., & Kim, S. (2008). Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(32), 11043-11049. https://doi.org/10.1073/pnas.0802862105

Phang, J. M., Liu, W., & Zabirnyk, O. (2010). Proline metabolism and microenvironmental stress. *Annual Review of Nutrition*, *30*, 441–463. https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104638

Roberts, W. (2021). Air pollution and skin disorders. *International Journal of Women's Dermatology*, *7* (1), 91–97. https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2020.11.001

Shi, C., Han, X., Mao, X., Fan, C., & Jin, M. (2019). Metabolic profiling of liver tissues in mice after instillation of fine particulate matter. *Science of the Total Environment*, *696*, 133974. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133974

Vierkötter, A., Schikowski, T., Ranft, U., Sugiri, D., Matsui, M., Krämer, U., & Krutmann, J. (2010). Airborne particle exposure and extrinsic skin aging. *Journal of Investigative Dermatology*, *130*(12), 2719–2726. https://doi.org/10.1038/jid.2010.204

Yamamoto, T., Sato, K., Yamaguchi, M., Mitamura, K., & Taga, A. (2021). Development of simultaneous quantitative analysis of tricarboxylic acid cycle metabolites to identify specific metabolites in cancer cells by targeted metabolomic approach. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *584*, 53–59. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.10.072

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foi desenvolvido um método inédito que uniu amostragem, preparo de amostra e derivatização com análises baseadas em GCxGC-Q-TOFMS/MS para o estudo de aminoácidos obtidos de células de fibroblastos derivados da pele humana. Foram investigados, no primeiro momento, os passos de preparo de amostras baseados na literatura em um cromatógrafo unidimensional. Os resultados demostraram valores elevados de aminoácidos nas células de fibroblastos, além de valores de R^2 maiores que 0,9228 e RSD entre 4,83 e 13,71% considerados resultados satisfatórios, levando em consideração a complexidade das etapas.

Tendo como base esses dados, foi desenvolvido, em um segundo momento, o método de análise de aminoácidos por cromatografia bidimensional. O jogo de colunas que apresentaram melhores condições para as análises de aminoácidos derivatizados com propil cloroformato foi HP5-MS, apolar, na primeira dimensão e Stabilwax, polar, na segunda dimensão e um período de modulação de 8s. O método apresentou valores de R^2 maiores que 0,9011, RSDs entre 5,01 e 24,56% para o ponto de 0,7 mgL^{-1}, LD e LQ variando de 0,08 – 4,09 mgL^{-1} e 0,24 - 12,42 mgL^{-1}, respectivamente, e, por fim, recuperações entre 46,29 – 95,46% com exceção do ácido aminobutirínico (GABA) que apresentou 36,47 % de recuperação e, talvez por isso não tenha sido visualizado nas amostras reais. De uma forma geral, o método desenvolvido apresentou valores satisfatórios devido ao elevado número de etapas do procedimento analítico, além de resultados inéditos quando comparado com a literatura disponível.

No terceiro momento do estudo, foram coletados o material particulado em dois pontos distintos, um próximo a uma via de intenso tráfego de carro (MP_{PAC}) e outro ponto próximo a uma estação ecológica (MP_{ECO}) e, por meio de ensaios de viabilidade celular, foi investigada a toxicidade dessas partículas. Como era de se esperar, o MP_{PAC} apresentou uma toxicidade mais acentuada quando comparado ao MP_{ECO}. Contudo, mesmo fornecendo menos toxicidade, a concentração de partículas de MP_{ECO} expostas nas células ainda foram consideráveis demostrando que, mesmo com pouco tráfego de veículos, o MP_{ECO} possui substâncias que são tóxicas às células.

Posteriormente, com as análises feitas por GCxGC-Q-TOFMS/MS foi possível investigar os aminoácidos alterados nas células de fibroblastos quando expostos ao MP. Os resultados demostraram que a Alanina e a Prolina foram os dois aminoácidos regulados negativamente nas células expostas e, por meio da análise de vias, foi possível

identificar a biossíntese aminoacil-tRNA como uma das principais vias alteradas depois da exposição. Diante dos resultados e com base nas informações disponíveis na literatura, foi possível correlacionar essas alterações a uma série de respostas como a diminuição da energia celular, desregulação da homeostase celular, diminuição da síntese de colágeno, interferência na cicatrização de feridas e a uma supressão da biossíntese de proteínas.

Por fim, foi possível concluir que, os resultados obtidos neste estudo forneceram uma nova visão sobre os danos da poluição atmosférica às células da pele e demonstraram que a metabolômica baseada em análises de aminoácidos ainda pode ser muito mais explorada, pois fornece muitas informações ainda desconhecidas e abrangentes. Além disso, até o quanto se sabe, este foi o primeiro trabalho relacionando um estudo metabolômico para a classe de aminoácidos derivados de fibroblastos de pele humana e análise por GC×GC-Q-TOFMS/MS.

ANEXO A - Dados da amostragem do material particulado no ponto da estação ecológica (ECO)

Filtro	Data		Horário		Peso		Pressão atmosférica		Manômetro Inicial		Monômetro Final		Temperatura		Volume amostrado (m^3)	Peso Líquido MP (g)	[MP] ($\mu g.m^{-3}$)
	Inicial	Final	Inicial	Final	inicial	Final	Inicial	Final	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Máxima	Mínima			
ECO 1	10/03/22	11/03/22	10:40	10:57	4,273	4,2966	696,05	691,6	31,2	30,6	31,2	30,6	30	20	1.517,22	0,0236	15,55
ECO 2	14/03/22	15/03/22	10:44	10,56	4,2726	4,2973	691,2	691,1	30,2	29,5	31,9	31,1	30	22	1.487,13	0,0247	16,61
ECO 3	15/03/22	16/03/22	11:05	11:05	4,2454	4,2707	691,1	692,2	31,2	31	31,7	31,1	31	18	-	-	-
ECO 4	16/03/22	17/03/22	11:15	11:29	4,2592	4,2805	692,2	692,7	30	30,5	31,7	31,1	30	17	1.510,79	0,0213	14,10
ECO 5	17/03/22	18/03/22	11:35	11:31	4,2621	4,2856	692,7	693	31,4	30,6	32	31,1	31	19	1.484,41	0,0235	15,83
ECO 6	21/03/22	22/03/22	10:15	10:24	4,2731	4,2868	693,4	694,1	30,5	30,4	31,2	30,5	27	16	1.514,04	0,0137	9,05
ECO 7	22/03/22	23/03/22	10:32	10:44	4,2671	4,2854	694,1	693,5	31,2	30,6	31,6	31	27	15	1.518,56	0,0183	12,05
ECO 8	23/03/22	24/03/22	10:50	10:50	4,2646	4,2904	693,5	693,3	31,2	30,6	31,6	31	28	16	1.495,66	0,0258	17,25
ECO 9*	24/03/22	25/03/22	10:53	10:54	4,267	4,396	693,3	691,6	31,3	30,7	32,2	31,6	28	17	1.497,17	0,1290	86,16
ECO 10	28/03/22	29/03/22	10:05	10:20	4,2515	4,301	693,3	692,3	31,4	31,1	32	31,3	32	18	1.503,99	0,0495	32,91
ECO 11	29/03/22	30/03/22	10:28	10:24	4,2735	4,3068	692,3	691,4	31	30,9	31,9	31,3	31	19	1.485,82	0,0333	22,41
ECO 12	30/03/22	31/03/22	10:31	10:37	4,274	4,3368	691,4	691,1	31,2	31,1	32,5	31,8	30	19	1.493,50	0,0628	42,05
ECO 13	31/03/22	01/04/22	10:43	10:45	4,2952	4,3356	691,1	692,4	31,7	31	31,8	31,1	31	19	1.489,44	0,0404	27,12
ECO 14	04/03/22	05/04/22	10:19	10:13	4,3013	4,3272	691,1	692,4	28,8	28,5	31,6	31	30	17	1.490,67	0,0259	17,37
ECO 15	05/03/22	06/04/22	10:18	10:26	4,2991	4,3361	692,4	692,1	31	30,4	32	31,3	31	18	980,25	0,0370	37,75
ECO 16	06/03/22	07/04/22	10:30	10:39	4,3044	4,3453	692,1	691,9	30,9	30,7	31,8	31,1	30	17	1.500,34	0,0409	27,26
ECO 17	07/03/22	08/04/22	10:46	10:46	4,317	4,3451	691,9	692,7	31,3	30,6	31,8	31,1	29	18	1493,28	0,0281	18,82

Anexo B - Dados da amostragem do material particulado no ponto da Portaria Antônio Carlos (PAC)

Filtro	Data		Horário		Peso		Pressão atmosférica (mmHg)		Manômetro Inicial		Monômetro Final		Temperatura		Volume amostrado (m^3)	Peso Líquido MP (g)	[MP] ($\mu g.m^{-3}$)
	Inicial	Final	Inicial	Final	inicial	Final	Inicial	Final	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Máxima	Mínima			
PAC 1	10/03/22	11/03/22	10:07	10:24	4,2815	4,309	694,14	695	30,9	35,1	32,6	36,6	30	20	1530,98	0,0275	17,96
PAC 2	14/03/22	15/03/22	11:23	11:30	4,2955	4,3242	694,2	693,9	31,6	35,5	32,9	36,8	30	22	1498,93	0,0287	19,95
PAC 3	15/03/22	16/03/22	11:37	11:38	4,265	4,2999	693,9	695,1	31,6	35,5	32,7	36,7	31	18	1509,69	0,0349	23,12
PAC 4	16/03/22	17/03/22	11:45	11:55	4,281	4,3073	695,1	695,7	31,6	35,5	32,9	36,8	30	17	1522,86	0,0263	17,27
PAC 5	17/03/22	18/03/22	12:03	12:00	4,283	4,3131	695,7	695,9	31,6	35,6	33,1	37,2	31	19	1505,31	0,0301	20,00
PAC 6	21/03/22	22/03/22	10:40	10:45	4,2482	4,2702	696,8	697,2	31	35	32	36,1	27	16	1532,08	0,0220	14,36
PAC 7	22/03/22	23/03/22	10:50	11:10	4,2773	4,3036	697,2	696,6	31,3	35,3	32,6	36,7	27	15	1541,71	0,0263	17,06
PAC 8	23/03/22	24/03/22	11:20	11:18	4,275	4,3006	696,6	696,5	31,4	35,4	32,7	36,8	28	16	1518,24	0,0256	16,86
PAC 9	24/03/22	25/03/22	11:25	11:25	4,2545	4,2811	696,5	694,6	31,5	35,5	32,9	36,9	28	17	1515,19	0,0266	17,56
PAC 10	28/03/22	29/03/22	10:30	10:45	4,2358	4,2792	696,4	695,5	31,5	35,4	32,6	36,6	32	18	1527,00	0,0434	28,42
PAC 11	29/03/22	30/03/22	10:55	10:50	4,2584	4,2921	695,5	694,5	31,1	35,1	32,5	36,5	31	19	1503,66	0,0337	22,41
PAC 12	30/03/22	31/03/22	10:54	11:00	4,2551	4,304	694,5	693,9	31,5	35,5	32,8	36,8	30	19	1513,24	0,0489	32,31
PAC 13	31/03/22	01/04/22	11:05	11:10	4,3067	4,3751	693,9	695,8	31,7	35,4	32,3	36,4	31	19	1512,12	0,0684	45,23
PAC 14	04/04/22	05/04/22	10:50	10:43	4,2878	4,322	696,7	695,8	30,5	35,1	32,5	36,5	30	17	1510,05	0,0342	22,65
PAC 15	05/04/22	06/04/22	10:48	10:52	4,291	4,3323	695,8	695,3	31,5	35,3	32,7	36,8	31	18	1515,10	0,0413	27,26
PAC 16	06/04/22	07/04/22	10:59	11:06	4,3132	4,359	695,3	694,8	31,4	35,3	32,6	36,7	30	17	1519,84	0,0458	30,13
PAC 17	07/04/22	08/04/22	11:12	11:12	4,3067	4,3496	694,8	695,7	31,5	35,4	32,7	36,8	29	18	1512,40	0,0429	28,37

Anexo C - Mapa indicando os pontos de coleta do material particulado

*A distância entre os pontos é de 1,8 Km, aproximadamente