

MARIA JOSÉ NUNES DE PAIVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE  
EXTRAÇÃO E DERIVATIZAÇÃO PARA ANÁLISES  
CROMATOGRÁFICAS DOS ÁCIDOS BILIARES E  
AMINOÁCIDOS EM ESTUDOS METABOLÔMICOS**

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

BELO HORIZONTE

2013

UFMG/ICEx/DQ.1000<sup>a</sup>

T.457<sup>a</sup>

**MARIA JOSÉ NUNES DE PAIVA**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE  
EXTRAÇÃO E DERIVATIZAÇÃO PARA ANÁLISES  
CROMATOGRÁFICAS DOS ÁCIDOS BILIARES E  
AMINOÁCIDOS EM ESTUDOS METABOLÔMICOS**

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

BELO HORIZONTE

2013

P149d Paiva, Maria José Nunes de  
2013 Desenvolvimento de métodos de extração e  
T derivatização para análises cromatográficas dos ácidos  
biliares e aminoácidos em estudos metabolômicos  
[manuscrito] / Maria José Nunes de Paiva. 2013.  
126 f. : il.

Orientadora: Zenilda de Lourdes Cardeal.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais. Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

Inclui anexos.

1. Química Analítica - Teses 2. Cromatografia de  
gás - Teses 3. Espectrometria de massa - Teses 4.  
Aminoácidos - Metabolismo - Teses 5. Ácidos - Teses I.  
Cardeal, Zenilda de Lourdes, Orientadora II. Título.

CDU 043



"Desenvolvimento de Métodos de Extração e Derivatização Para Análises Cromatográficas de Ácidos Biliares e Aminoácidos em Estudos Metabolômicos"

**Maria José Nunes de Paiva**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Zenilda de Lourdes Cardeal - Orientadora  
UFMG

Prof. Isabel Cristina Pereira Fortes  
UFMG

Prof. Rodinei Augusti  
UFMG

Prof. Cristina Sanches Giraud  
UFSJ

Prof. Isarita Martins Sakakibara  
UNIFAL

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2013.

## ***E Vamos À Luta***

Luiz Gonzaga do Nascimento Júnior

Eu acredito é na rapaziada  
Que segue em frente e segura o rojão  
Eu ponho fé é na fé da moçada  
Que não foge da fera e enfrenta o leão  
Eu vou à luta com essa juventude  
Que não corre da raia a troco de nada  
Eu vou no bloco dessa mocidade  
Que não tá na saudade e constrói a manhã desejada

Aquele que sabe que é negro o couro da gente  
Que segura a batida da vida o ano inteiro  
Aquele que sabe o sufoco de um jogo tão duro  
E apesar dos pesares ainda se orgulha de ser brasileiro  
Aquele que sai da batalha  
E entra num botequim  
Pede uma serva gelada  
E agita na mesa logo uma batucada  
Aquele que manda um pagode  
E sacode a poeira suada da luta e faz a brincadeira  
Pois o resto é besteira  
(Nós estamos pelaí)

# **DEDICATÓRIA**

*Ao meu amado Pai Jorge de Paiva*

*A minha mãe também amada Mãe Conceição do Jorge*

## AGRADECIMENTOS

A profa Dra. Zenilda de Lourdes Cardeal, obrigada pela orientação, que foi de grande importância para o conhecimento científico e de vida. Serei eternamente agradecida pela oportunidade.

Aos professores Evandro, Isabel e Rodinei pelas sugestões no exame de qualificação.

Ao meu Pai que tanto me mimou, protegeu, apoiou e ajudou. Sinto uma grande tristeza de não ter finalizado essa etapa da minha vida antes da sua partida e a minha Mãe, que com essa força toda é um exemplo para tudo que faço. Velhinha batuta, que sempre tem uma palavra de conforto e estímulo. Vocês meus amados, me ensinaram o valor da vida e o sentimento do amor, por isso a vida tem sentido.

Aos meus irmãos, José e Fernanda, que sempre aguentaram a minha chatice, nervosismo, teimosia e esse jeito bravo com as pessoas que amo. Obrigada pela ajuda e pela compreensão nesses últimos tempos. Não troco vocês por nada e amo ter vocês como irmãos. Vocês foram, são e serão sempre os meus anjos.

Ao Sérgio, Maria Helena, Bernardo e Iago que me acolheram tão carinhosamente nesses anos. Foram maravilhosos os dias com vocês, e espero que ainda tenhamos muito a ser vivido pela frente.

A Maria Helena, minha irmã por escolha, agradeço pelas conversas, amizade, estímulo e ajuda em todas as horas. Tudo isso foi muito importante nesses “tempos loucos” como você diz. E conte comigo, sempre, pra o que for preciso.

As minhas primas, madrinhas, irmãs e muito queridas Cacamo e Dedé, que desde o começo de tudo, e isso faz tempo, me guiaram, incentivaram, e ajudaram muito a escolher o caminho certo, e não o mais fácil ou lucrativo.

Ao meu amigo Helvécio, que me ajudou desde o começo e faz parte da minha família de Divinópolis. Obrigada pelos ensinamentos, pelas opiniões e pela tranquilidade transmitida nas horas de desespero com esse trabalho.

Ao Júlio César, pela amizade e colaboração analítica imprescindível.

Ao amigo Rodrigo Resende, obrigada pelo incentivo e colaboração. A sua ajuda foi essencial para o desenvolvimento do trabalho, a minha eterna gratidão.

A querida profa. Maria Elisa P. B. Siqueira, minha eterna orientadora e a profa. Edna Maria Alvarez-Leite, que me incentivaram e deram todo apoio para o doutorado na Química.

Aos amigos do Laboratório 167 e 171, Amauri, Breno, Cláudia, Helvécio, Isabela, Jaqueline, Júlio, Júnia, Marquinho, Miriany, Vanessa e as novas colaboradoras Daiana, Damiana, Lívia e Stella. Obrigada pela ajuda e desculpas pelas discussões. Sentirei saudades da hora do café e dos bons momentos.

A inesquecível turma de QAAI de 2009/2 Darliane, Isabela Fioravante, Jaqueline Paulo, Leonel e Silvéria. Que entre tudo aquilo pra estudar, conseguimos nos divertir e aproveitar o nosso tempo no DQ.

Aos amigos da UFSJ, Mari, Dany, Carlos, Frank, João Máximo, Victor, ..... pelo apoio e compreensão nas horas difíceis. Nunca vou esquecer o que vocês fizeram por mim.

Aos amigos de Cambuí, que não tem noção do conteúdo, mas torceram como nunca para a conclusão do trabalho. Agora vou poder sair do “confinamento” e ficar mais tempo com vocês. Olha ai Jander Braz as “escrituras”.

Às agências de fomento CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.



## RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos e validados métodos cromatográficos para a quantificação de ácido biliares no plasma sanguíneo e aminoácidos no líquido cefalorraquidiano. Para a análise dos ácidos biliares e aminoácidos foram desenvolvidos métodos de preparo de amostras baseados na derivatização assistida por micro-ondas. Estas análises foram efetuadas por cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas. A derivatização dos ácidos biliares foi realizada por meio da metoximação e sililação. O tempo de reação a potencia do micro-ondas e a quantidade de derivatizante foram otimizadas para um melhor rendimento analítico. A melhor condição obtida foi a adição de 40 µL de BSTFA com aquecimento a uma potencia de 210 W por 3 min. O método desenvolvido foi linear no intervalo de 0,78 e 20,0 µg mL<sup>-1</sup> e o intervalo da precisão variou de 1,08 a 9,32%. O método de análise para determinação dos aminoácidos, após a validação, foi aplicado em amostras reais de líquido cefalorraquidiano de pacientes hospitalizados com suspeita de infecção fungica. O planejamento experimental mostrou que o tempo de derivação ideal foi de 3 min na potencia de 210W. Os limites de detecção encontrados foram de 0,01 µmol L<sup>-1</sup> a 4,21 µmol L<sup>-1</sup> e os limites de quantificação foram de 0,02 µmol L<sup>-1</sup> a 7,07 µmol L<sup>-1</sup>. A precisão intra-ensaio variou de 4,12 a 15,59% e a interensaio de 6,36 a 18,71%. Para os aminoácidos todos os coeficientes de determinação ficaram acima de 0,990. Em seguida foi desenvolvido um método para análise dos ácidos biliares no plasma. Para a extração dos ácidos biliares presentes no plasma foi desenvolvido um método de microextração em fase líquida com fibra oca. A análise foi feita utilizando a cromatografia líquida de alto desempenho acoplada à espectrometria de massas. A otimização do procedimento de LPME em duas fases para a extração dos ácidos biliares apresentou limites de detecção entre 2,07 e 2,66 nmol L<sup>-1</sup> e limites de quantificação entre 10,35 e 13,20 nmol L<sup>-1</sup>. A precisão intra-ensaio variou de 3,3 a 11,9% e a para a concentração de 25,0 µg L<sup>-1</sup> e de 2,1 a 8,3% para a concentração de 100,0 µg L<sup>-1</sup>. O método apresentou linearidade no intervalo de 10,35 a 531,0 nmol L<sup>-1</sup>. A metodologia desenvolvida e validada foi aplicada à análise de ácidos biliares em plasma de trabalhadores expostos à solventes, e

em voluntários não expostos. Os métodos desenvolvidos mostraram-se adequados para todas as determinações feitas no plasma e no líquido cefalorraquidiano. O método para análise de aminoácido utilizando derivatização assistida por micro-ondas mostrou ser simples, rápido, sensível e seletivo. O método para análise dos ácidos biliares por microextração em fase líquida apresentou elevada sensibilidade, baixo consumo de solventes, e boa recuperação.

## ABSTRACT

This work presents the development and validation of chromatographic methods for quantification of bile acid in blood plasma and amino acids in cerebrospinal fluid. Sample preparation methods based on microwave assisted derivatization were developed for analyzing bile acids and amino acids. The derivatization of bile acids was performed using the two-step process of methoximation and silylation. The reaction time, power and quantity of N,O-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) + 1 % trimethylchlorosilane (TCMS) were optimized to improve the derivatization. The optimized derivatization conditions required 210 W for 3 min. The MAD method exhibited linearity with respect to cholic acid between 0.78 and 20.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  with an LOQ of 0.23  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and a precision ranging from 1.08 to 9.32% CV. The amino acids samples were analyzed by gas chromatography with a mass spectrometric detector. The validated methodology for determination of amino acids was applied to real samples of cerebrospinal fluid from hospitalized patients with suspicion of fungal infection. The experimental design used to optimize the conditions showed that the optimal derivatization time was 3 min with a microwave power of 210 W. The sensitivity was very good, with limits of detection (LDs) ranging from 0.01  $\text{mol L}^{-1}$  to 4.24  $\text{mol L}^{-1}$  and limits of quantification (LQs) ranging from 0.02 to 7.07  $\text{mol L}^{-1}$ . The precision, measured using the relative standard deviation (RSD), ranged from 4.12 to 15.59% for intra-day analyses and from 6.36 to 18.71% for inter-day analyses. The coefficients of determination ( $R^2$ ) were above 0.990 for all amino acids. Next, a hollow fiber-liquid phase microextraction method was developed for sampling and preconcentration of bile acids present in plasma samples. The analyses were performed by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The optimized two-phase LPME procedure for the extraction of bile acids showed limits of detection between 2.07 and 2.66  $\text{nmol L}^{-1}$  and limits of quantification between 10.35 and 13.20  $\text{nmol L}^{-1}$ . The intra-assay precision ranged from 3.3 to 11.9% (25.0  $\text{mg L}^{-1}$ ) and 2.1 to 8.3% at the concentration of 100.0  $\text{mg L}^{-1}$ . The developed method was linear over the range of 10.35 to 531.0  $\text{nmol L}^{-1}$  for all analytes. The methodology was validated and applied to the analysis of bile

acids in plasma of workers exposed to solvents, and volunteers not exposed. The developed methods shown to be appropriate for both determinations in plasma and cerebrospinal fluid. The amino acid method using microwave assisted derivatization shows to be suitable for bio monitoring analysis, easy, quick, sensitive, and selective. The method for bile acids analysis by hollow fiber liquid phase microextraction showed high sensitivity, low solvent consumption, and good recovery.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> - Relação entre as tecnologias <i>ômicas</i> .....	7
<b>Figura 2.1</b> - Estrutura dos principais ácidos biliares – ácido cólico (1); ácido litocólico (2); ácido chenodesoxicólico (3); ácido ursodesoxicólico (4) presentes no plasma. ....	22
<b>Figura 2.2</b> – Grupos funcionais derivatizados por sililação.....	24
<b>Figura 2.3</b> – Estrutura dos reagentes sililantes.....	25
<b>Figura 2.4</b> - Reação geral para a sililação utilizando BSTFA.....	26
<b>Figura 2.5</b> - Fluxograma do método para a derivatização assistida por micro-ondas dos ácidos biliares.....	32
<b>Figura 2.6</b> - Espectro de massas do ácido cólico sililado na concentração de 1,0 mg L <sup>-1</sup> , para a derivatização com aquecimento convencional a temperatura de 100 °C por 60 min e por micro-ondas com aquecimento por 3 minutos em uma potencia de 240 W....	34
<b>Figura 2.7</b> - Cromatograma de massas do padrão de ácido cólico derivatizado a 1,0 mg L <sup>-1</sup> após a derivatização convencional com aquecimento a 100°C por 60 minutos, por GC/MS, modo positivo, em varredura completa (full scan 50 - 900) com extração do íon de m/z 426.....	35
<b>Figura 2.8</b> - Cromatograma de massas do padrão de ácido cólico derivatizado a 1,0 mg L <sup>-1</sup> após a derivatização utilizando aquecimento por micro-ondas na potencia de 240W por 3 minutos por GC/MS, modo positivo, em varredura completa (full scan 50 - 900) com extração do íon de m/z 426. ....	35
<b>Figura 2.9</b> - Fragmentação do ácido ursodesoxicólico sililado com a formação de composto com m/z de 518 pela perda de [TMSOH].....	37
<b>Figura 2.10</b> - Espectro de massas do ácido ursodesoxicólico sililado na concentração de 1,0 mg L <sup>-1</sup> , para a derivatização por micro-ondas com aquecimento por 3 minutos em uma potencia de 240 W .....	37

<b>Figura 2.11</b> - Rendimento da derivatização frente a diferentes potências e tempo de derivatização. ....	39
<b>Figura 2.12</b> - Rendimento da derivatização frente a diferentes proporções de reagentes. ....	40
<b>Figura 2.13</b> - Curva de analítica para a determinação da linearidade dos ácidos cólico e Ursodesoxicólico. ....	42
<b>Figura 3.1</b> - Estrutura Básica dos ácidos biliares primários e secundários e seus conjugados (A) e seus radicais substituintes. ....	48
<b>Figura 3.2</b> - Representação esquemática da da microextração em fase líquida (LPME) empregando configuração em “U” (A) e do tipo “haste” (“rod-like”) (B). ....	50
<b>Figura 3.3</b> - Representação da Microextração em fase líquida (LPME) para a extração dos analitos no modo de duas fases (A) sendo o lúmen da fibra oca preenchido com solvente orgânico e para a extração no modo de três fases (B) sendo o interior da fibra preenchido com solvente aquoso. ....	52
<b>Figura 3.4</b> - Diagrama esquemático de espectrômetro de massas íon-trap – time-of-flight (MS-IT-TOF). ....	59
<b>Figura 3.5</b> - Dispositivo de microextração em fase líquida – LPME. ....	62
<b>Figura 3.6</b> – Fluxograma do método para extração dos ácidos biliares por Microextração em fase líquida (LPME) utilizando o modo de duas fases. ....	63
<b>Figura 3.7</b> - Perfil cromatográfico da mistura dos padrões dos ácidos biliares por LC/MS-IT-TOF após a otimização das condições instrumentais. ....	67
<b>Figura 3.8</b> - Comparação dos modos de extração de 2 e 3 fases para a extração dos ácidos biliares utilizando como fase aceptora octanol e hidróxido de amônio $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ . ....	70
<b>Figura 3.9</b> - Gráfico de Pareto obtido após planejamento fatorial $2^3$ com ponto central para extração dos ácidos biliares no plasma por LPME. ....	71

<b>Figura 3.10</b> - Superfície de resposta obtida a partir da desejabilidade dos modelos de regressão para os ácidos biliares. ....	73
<b>Figura 3.11</b> - Variância das áreas em função da área media dos picos para a curva de calibração dos ácidos biliares no plasma por LPME.....	75
<b>Figura 3.12</b> - Distribuição das concentrações dos ácidos biliares $\text{nmol L}^{-1}$ nas amostras de plasma de indivíduos do grupo controle (1 a 11) e do grupo exposto (12 a 21). ....	81
<b>Figura 4.1</b> - Representação das superfícies de resposta obtidas a partir da função de desejabilidade dos modelos de regressão dos aminoácidos. ....	96
<b>Figura 4.2</b> - Perfil cromatográfico da mistura de L-aminoácido ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em aCSF após a derivatização utilizando BSTFA + 1% TCMS por GC/MS.....	97
<b>Figura 4.3</b> - Espectro de massas e estrutura dos aminoácidos sililados após a sililação e análise por GC/MS. ....	99
<b>Figura 4.4</b> - Comparação do rendimento da derivatização em relação a centrifugação sob refrigeração e filtração. ....	100

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> - Estratégias analíticas para pesquisa em metabolômica. ....	9
<b>Tabela 1.2</b> - Métodos analíticos, tipos analitos, matrizes utilizadas e técnica de preparo de amostras utilizadas nos estudos metabolômicos .....	12
<b>Tabela 2.1</b> - Padrões de fragmentação dos ácidos biliares sililados e identificados por GC/MS.....	33
<b>Tabela 2.2</b> - Tempo de retenção, faixa linear, limite de detecção e quantificação na análise quantitativa dos ácidos biliares utilizando aquecimento por micro-ondas. ....	43
<b>Tabela 3.1</b> - Coeficiente de ionização dos ácidos Biliares (pKa), coeficiente de partição octanol-água (Log P) dos ácidos biliares na forma não dissociada (Log P <sub>HA</sub> ) e dos solventes utilizados na LPME e coeficiente de partição octanol-água (Log P) dos ácidos biliares na forma dissociada (Log P <sub>A<sup>-</sup></sub> ) .....	51
<b>Tabela 3.2</b> - Parâmetros avaliados no planejamento 2 <sup>3</sup> com ponto central utilizando sistema de 2 fases (octanol) e 3 fases (octanol/hidróxido de amônia). ....	60
<b>Tabela 3.3</b> - Matriz experimental de extração por LPME de duas fases para os ácidos biliares com os valores codificados para o planejamento Doehlert.....	61
<b>Tabela 3.4</b> - Características da separação e análise cromatográfica. ....	66
<b>Tabela 3.5</b> - Faixa de concentração, equação da reta e coeficiente de determinação no estudo da linearidade para os ácidos biliares após a extração por LPME (2 fases) e análise por LC/MS-IT-TOF.. ....	76
<b>Tabela 3.6</b> - Limite de detecção e quantificação para os ácidos biliares no plasma utilizando a LPME.....	77
<b>Tabela 3.7</b> - Estudo da Precisão e Recuperação dos ácidos biliares usando o método LPME-LCMS-IT-TOF.....	78



<b>Tabela 3.8</b> - Medidas descritivas para as concentrações dos ácidos biliares (nmol/L) e parâmetros clássicos de função hepática nos grupos exposto e controle. ....	80
<b>Tabela 4.1</b> - Matriz experimental da derivatização dos aminoácidos com os valores codificados entre parênteses para o planejamento fatorial $2^3$ . ....	92
<b>Tabela 4.2</b> - Matriz experimental da derivatização dos aminoácidos com os valores codificados para o planejamento Doehlert. ....	93
<b>Tabela 4.3</b> - Tempo de retenção, m/z dos íons e suas intensidades e íons utilizados para a quantificação dos aminoácidos por GC/MS .....	98
<b>Tabela 4.4</b> - Coeficiente de determinação, equação da reta, limites de detecção e limites de quantificação para os aminoácidos por GC/MS após derivatização assistida por micro-ondas.....	102
<b>Tabela 4.5</b> - Valores da recuperação e precisões intra e inter-ensaio para os derivados silylados dos aminoácidos por GC/MS.. ....	103
<b>Tabela 4.6</b> - Comparação das figuras de mérito entre o método desenvolvido e os métodos para análise de aminoácidos encontrados na literatura.....	105
<b>Tabela 4.7</b> - Concentração média e faixa de concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) nas amostras de LCR humano (n-16).....	106

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Ácidos Biliares
aCSF	<i>Artificial Cerebrospinal Fluid</i>
ALT	Alanina Amino Transferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato amino Transferase
BSTFA	N,O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida)
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CDL	<i>Curved Dessolvation Line</i>
CG	Cromatografia Gasosa
CGxCG	Cromatografia Gasosa multidimensional Abrangente
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CSF	<i>Cerebrospinal Fluid</i>
CV	Coeficiente de Variação
Da	Dalton
DIC	Detector por Ionização em Chama
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DTE	1,4 – Ditioeritritol
EC/MS	Eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas
ECF	Etilcloroformato
EI	Impacto de Eletron ( <i>Electron impact</i> )
ELL	Extração líquido-líquido
EM	Espectrometria de Massas
EPC	Equipamento de Proteção Coletiva
EPI	Equipamento de proteção individual
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EUA	Estados Unidos da América ( <i>United States of America</i> )
FA	Fosfatase Alcalina
FFD	Full Fatorial Design
GCxGC-ToFMS	Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente ( <i>Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography</i> )
GC/MS	Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas ( <i>Gas</i>

	<i>Chromatography-Mass Spectrometry)</i>
GCA	Ácido Glicocólico ( <i>Glicocholic acid</i> )
GCDCA	Ácido Glicochenodesoxicólico ( <i>Glicochenodesoxycholic acid</i> )
G-GT	Gama Glutamiltransferase
HF-LPME	<i>Hollow fiber- Liquid Phase Microextraction</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana ( <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ( <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> )
HS-SPME	<i>Head space - Solid Phase Microextraction</i>
IPA	Isopropanol
LC/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas ( <i>Liquid chromatography - mass spectrometry</i> )
LCA	Ácido Litocólico ( <i>Lithocholic acid</i> )
LC-FTICR-MS	<i>Liquid chromatography/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry</i>
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplado a espectrometria de massas em sequência ( <i>liquid chromatography Tandem mass spectrometry</i> )
LCMS-IT-TOF	Cromatógrafo Líquido acoplado a Espectrômetro de Massa híbrido <i>Ion Trap – Time-of-Flight</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LD	Limite de Detecção
Log P	Logarítmo do Coeficiente de partição octanol/água
LPME	<i>Liquid phase microextraction</i>
LQ	Limite de Quantificação
m/Z	Razão massa/carga
MAD	<i>Microwave assisted derivatization</i>
MMLLE	<i>Microporous membrane liquid-liquid extraction</i>
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinário
MMQP	Método dos Mínimos Quadrados Ponderado
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i>
MSTFA	N-metil-(trimetilsilil) trifluoroacetamida

NR	Normas Regulamentadoras
P	Coeficiente de partição octanol/água
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação de um ácido
PTFE	Politetrafluoretileno
R <sup>2</sup>	Coeficiente de Determinação
RNA	Ácido ribonucleico ( <i>ribonucleic acid</i> )
SCFE	Fluído super crítico ( <i>Supercritical fluid</i> )
SDME	Microextração em gota suspensa ( <i>single drop microextraction</i> )
SIM	<i>Select ion monitoring</i>
SLE	<i>Suported liquid membrane</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extração em Fase Sólida ( <i>Solid Phase Extraction</i> )
SPMD	<i>Semipermeable Membrane Devices</i>
SPME	Microextração em Fase Sólida ( <i>Solid Phase Microextraction</i> )
TCA	Ácido Taurocólico ( <i>Taurocholic acid</i> )
TCDCA	Ácido taurochenodesoxicólico ( <i>Taurochenodesoxycholic acid</i> )
TDCA	Ácido Desoxicólico ( <i>Desoxycholic acid</i> )
TFA	Ácido trifluoroacético
TIC	Cromatograma total de íons ( <i>Total ion chromatogram</i> )
TLCA	Ácido Taurolitocólico ( <i>Taurolithocholic Acid</i> )
TMCS	Trimetilclorosilano
TMSI	Trimetilsililimidazol
TOF	<i>Time of flight</i>
UDCA	Ácido Ursodesoxicólico ( <i>ursodesoxycholic acid</i> )
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPLC	<i>Ultra Performance liquid chromatography</i>
UV	Ultra Violeta
UV	Detector por absorção ultravioleta
W	Watts

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>II</b>
<b>RESUMO</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>XIII</b>
<b>CAPÍTULO 1 - ASPECTOS GERAIS</b>	<b>1</b>
1.1 RELEVANCIA E OBJETIVOS	2
1.2 ASPECTOS GERAIS	4
1.2.1 EXPOSIÇÃO A SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS HEPATOTÓXICAS	4
1.2.2 ANÁLISE DO METABOLOMA	6
1.2.3 PREPARO DE AMOSTRA	10
1.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
<b>CAPITULO 2 - DERIVATIZAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS BILIARES</b>	<b>21</b>
2.1 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.2 OBJETIVO	28
2.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	28
2.3.1 PADRÃO DOS ÁCIDOS BILIARES	28
2.3.1.1 Preparo de Soluções Padrão	28
2.3.2 REAGENTES E SOLVENTES	29
2.3.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS – INSTRUMENTAÇÃO	29
2.3.4 EQUIPAMENTOS	30
2.3.5 PROCEDIMENTO DE DERIVATIZAÇÃO	31
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
2.4.1 CONFIRMAÇÃO DOS COMPOSTOS DERIVATIZADOS	32
2.4.2 OTIMIZAÇÃO DA DERIVATIZAÇÃO POR MICRO-ONDAS	38

2.4.3 ESTUDO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO DO MÉTODO	41
2.5 CONCLUSÕES	43
2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

### **CAPITULO 3 - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS BILIARES NO PLASMA POR LPME**

#### **USANDO LCMS-IT-TOF** **46**

3.1 REVISÃO DA LITERATURA	47
3.1.1 EXTRAÇÃO POR MEMBRANAS	49
3.1.1.1 Modo de Extração Utilizando HF-LPME	50
3.1.2 CÁLCULO TEÓRICO DA CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS NO MÉTODO LPME	52
3.2 OBJETIVOS	54
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	54
3.3.1 AMOSTRAS	54
3.3.1.1 Características da População Estudada	55
3.3.2 REAGENTES E SOLVENTES	56
3.3.2.1 Preparo de Soluções	56
3.3.3 EQUIPAMENTOS	57
3.3.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS	58
3.3.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	60
3.3.5.1 Planejamento Fatorial Completo Aplicado ao Procedimento de Extração por LPME de 2 e 3 Fases	60
3.3.5.2 Planejamento Doehlert Aplicado ao Procedimento de Extração por LPME de 2 e 3 Fases	61
3.3.6 MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA	62
3.3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	64
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.4.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS ÁCIDOS BILIARES	64
3.4.2 ESTUDO DOS MODOS DE EXTRAÇÃO POR LPME	68
3.5.2. PROCEDIMENTO DE OTIMIZAÇÃO	68
3.4.3 ESTUDOS DOS PARÂMETROS DE MÉRITO	73
3.4.4 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS BILIARES EM SANGUE DE TRABALHADORES EXPOSTOS A SOLVENTES	78
3.5 CONCLUSÕES	82
3.6 REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS	82

**CAPITULO 4 - DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA.** **84**

4.1 REVISÃO DA LITERATURA	85
4.2 OBJETIVO	87
4.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	87
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	87
4.3.1 REAGENTES	87
4.3.1.1 Preparo de Soluções	88
4.3.2 EQUIPAMENTOS	89
4.3.3 PROGRAMAS COMPUTACIONAIS	89
4.3.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO	90
4.3.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	90
4.3.6 PREPARO DE AMOSTRA E PROCESSO DE DERIVATIZAÇÃO	94
4.3.7 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	94
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
4.4.1 PROCEDIMENTO DE OTIMIZAÇÃO	95
4.4.2 ESTUDO DE PARÂMETROS DE MÉRITO DO MÉTODO	101
4.4.3 ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR)	106
4.5 CONCLUSÕES	107
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

**CAPITULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS** **110**

**ANEXOS** **113**

## **CAPÍTULO 1 - ASPECTOS GERAIS**



## 1.1 RELEVANCIA E OBJETIVOS

Atualmente existe uma grande preocupação quanto à utilização e a exposição à substâncias químicas. Entretanto, toda matéria é constituída por substâncias químicas e estas estão presentes nos alimentos e medicamentos que consumimos, nas roupas que usamos, no ambiente de trabalho, na água e inevitavelmente no ar que respiramos. De acordo com o registro geral de substâncias químicas (*CAS Registry*) existem mais de 78 milhões de substâncias orgânicas e inorgânicas registradas e a cada dia cerca de 15000 novas substâncias são adicionadas. Porém, os aspectos tóxicos e como é realizado o controle da exposição a estas substâncias são escassos. Além da exposição a substâncias presentes no ambiente de trabalho, a exposição à poluição ambiental é mais expressiva. Isso ocorre principalmente nos grandes centros onde existe um maior lançamento de resíduos industriais nos rios, destino inadequado do lixo doméstico e maior emissão de poluentes ambientais (Landrigan, 1992; Niosh, 1995; Química, 1995; CAS, 2014).

No Brasil a exposição no ambiente de trabalho é controlada pelas normas regulamentadoras através da lei 3214 de 1978 do Ministério do Trabalho, onde a NR-15 e a NR-7 preveem, respectivamente valores limites de exposição e parâmetros para controle biológico da exposição ocupacional a agentes químicos (Brasil., 1999).

O monitoramento de substâncias nos ambientes de trabalho pode não refletir a quantidade absorvida das substâncias, sendo que fatores como, tempo de permanência no local de exposição e as características individuais, podem afetar a absorção. Para evitar o dano produzido por estas substâncias propõe-se a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) e equipamentos de proteção coletiva (EPC) e a monitorização dos sistemas biológicos. Nas atividades de monitorização biológica o bioindicador é a substância inalterada, ou seu produto de biotransformação ou alterações bioquímicas ou hematológicas que apresentem correlação com a exposição (Aitio e Kallio, 1999; Kato, Garcia e Wünsch Filho, 2007). Entretanto, estas alterações na maioria das vezes não refletem o efeito promovido pela

substância, menos ainda com precocidade, sendo que a detecção precoce pode diminuir a ocorrência dos efeitos danosos à saúde. Além do mais, a avaliação dos indicadores biológicos depende da sua presença nos materiais biológicos com informações toxicológicas referentes a cinética e mecanismo de ação assim como de métodos analíticos adequados para sua determinação (Neves, 1999).

Após a descoberta do genoma humano novas tecnologias *ômicas* surgiram e estão sendo aplicadas para a descoberta de novos perfis de doenças entre elas as promovidas pela exposição à substâncias químicas e ainda a presença de novos biomarcadores. Entre essas tecnologias podemos citar o estudo do metaboloma, que nas suas diferentes modalidades atua diretamente aplicado a esta finalidade. Como o número de metabólitos é de aproximadamente 3000 compostos os quais apresentam características diferentes, novos métodos analíticos devem ser desenvolvidos para as análises das vias metabólicas, dos metabólitos alvos ou do conjunto destas substâncias (Nicholson e Wilson, 2003; Dunn e Ellis, 2005; Nielsen e Oliver, 2005; Patti, 2011). Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos de derivatização, extração, identificação e quantificação é o principal objetivo deste trabalho visando a sua aplicação para contribuir no diagnóstico e prevenção de doenças e intoxicação. A metodologia desenvolvida é composta pela derivatização que foi realizada utilizando micro ondas. A microextração em fase líquida foi realizada utilizando fibra oca HF-LPME. As técnicas utilizadas para a separação foram a cromatografia gasosa e líquida, acopladas a espectrometria de massas.

O presente trabalho está dividido em cinco capítulos. No primeiro capítulo serão abordados os conceitos da monitorização da exposição a substâncias químicas, a definição de metabolômica e suas estratégias e os métodos analíticos e amostras utilizados para a sua determinação.

No segundo capítulo serão abordados os aspectos referentes à derivatização dos ácidos biliares por meio da silição assistida as micro-ondas como fonte de aquecimento, e a otimização do método analítico.

No terceiro capítulo serão abordados o desenvolvimento de um método de microextração em fase líquida utilizando membrana oca para a determinação de ácidos biliares por LC/MS e sua aplicação na análise do plasma de indivíduos expostos e não expostos a solventes.

No quarto capítulo serão abordados os aspectos da análise dos aminoácidos no líquido cefalorraquidiano (LCR) para o estudo do metaboloma. Será apresentada também a otimização e aplicação do método em amostras de pacientes hospitalizados e portadores do HIV.

O último capítulo, se refere a conclusão geral e as perspectivas de trabalho.

## **1.2 ASPECTOS GERAIS**

### **1.2.1 Exposição a Substâncias Químicas Hepatotóxicas**

Para prevenir as exposições excessivas e potenciais intoxicações ocupacionais, é realizada a monitorização do ambiente de trabalho e do próprio trabalhador (monitorização biológica). Entretanto, para que a monitorização biológica possa ser realizada é necessária a existência de parâmetros bioquímicos, biológicos ou funcionais, em amostras biológicas dos indivíduos expostos, que se correlacionem com a exposição ou ação da substância no organismo. Esses parâmetros são denominados biomarcadores, bioindicadores ou indicadores biológicos, e são representados pelos próprios compostos inalterados, produtos de biotransformação ou substâncias endógenas presentes em amostras de urina, sangue ou outra matriz biológica (Jakubowski e Trzcinka-Ochocka, 2005; Schmidt, 2006; Torres Pombo, Lama Varela e Torres Rivas, 2011). Os bioindicadores podem ser classificados em biomarcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade (Aitio e Kallio, 1999).

A monitorização biológica da exposição aos solventes clorados, até o momento, é feita utilizando-se os biomarcadores de exposição também denominados bioindicadores de dose interna, que se correlacionam com o

amplo conceito de “dose interna”, ou seja, que podem representar tanto a concentração do xenobiótico absorvido pelo organismo, quanto à quantidade da substância que foi distribuída e está, por exemplo, acumulada em determinado local. Eles permitem a avaliação da exposição a cada substância individualmente, e seus valores limites são interpretados também deste modo (Imbriani *et al.*, 2001; Jakubowski e Trzcinka-Ochocka, 2005).

É necessário considerar também as diversas interações que podem ocorrer entre os diferentes solventes absorvidos pelos indivíduos expostos, especialmente, na biotransformação. As interações metabólicas afetam a eliminação dos produtos formados, aumentando ou diminuindo a concentração urinária destes. Assim, a avaliação da exposição realizada pela determinação do metabólito urinário pode subestimar o nível real da absorção de um determinado solvente (Thomas *et al.*, 1996; Lof e Johanson, 1998; Viau, 2004)

É importante, portanto, que ao lado da biomonitorização de dose interna, que seja realizado sempre que possível a avaliação das alterações relacionadas com a ação dos xenobióticos no organismo. É a chamada monitorização biológica de efeito que utiliza os biomarcadores de efeito que são as alterações, bioquímicas, fisiológicas ou comportamentais, precoces e reversíveis, que podem ser mensuradas em amostras biológicas e se relacionam com a ação do xenobiótico no organismo. Os biomarcadores de efeito, quando utilizados com finalidade preventiva, representam alterações biológicas não adversas. Muitas vezes, no entanto, as alterações relacionadas à ação da substância no organismo já correlacionam com o aparecimento de efeitos adversos, ou seja, nesses casos, está sendo diagnosticada, precocemente, uma intoxicação (Ikeda, 1999; Jakubowski e Trzcinka-Ochocka, 2005; Schmidt, 2006).

Atualmente, a necessidade da detecção precoce de disfunção hepática tornou-se mais importante, devido a maior restrição do uso de solventes com maiores efeitos nocivos e as medidas utilizadas para o controle da exposição (higiene industrial) serem cada vez mais aplicadas. Assim, a preocupação é maior com os efeitos crônicos, advindos de exposição a baixas concentrações ambientais de solventes, que podem causar doenças subclínicas, danos

hepáticos, renais e cerebrais (Anagnostopoulos *et al.*, 2004; Baker, 2008; Keski-Santti *et al.*, 2010; Escobar *et al.*, 2011; Toros *et al.*, 2011; Ramirez *et al.*, 2012).

A determinação da atividade das enzimas transaminases, fosfatase alcalina e  $\gamma$ -glutamil-transferase que são os parâmetros bioquímicos clássicos e menos sensíveis à avaliação precoce, é utilizada na avaliação da ação da maioria dos agentes hepatotóxicos conhecidos (De Paiva e De Siqueira, 2005).

Frente a esse fato, estudos de testes mais sensíveis para avaliar a hepatotoxicidade têm sido propostos, com a finalidade de detectar as alterações tóxicas no estágio inicial de desenvolvimento, impedindo a instalação do dano hepático e as alterações das funções fisiológicas essenciais à saúde humana. Dentro desse contexto destacam-se os ácidos biliares (AB), uma vez que, a regulação do metabolismo desses ácidos é uma das principais funções do fígado e alterações detectáveis nos níveis dos AB podem refletir uma disfunção hepática ainda em estágio inicial.

Dados existentes na literatura deixam evidente que os ácidos biliares podem ser utilizados como indicadores biológicos de efeito, porém a exposição a diferentes concentrações ou mistura de solventes pode não ser evidenciada na análise dos ácidos biliares totais (De Paiva e De Siqueira, 2005; Hao *et al.*, 2011).

A determinação dos ácidos biliares totais é um indicador importante na avaliação do dano hepático, e a sensibilidade e especificidade dessa determinação, aliada às diferentes ações hepatotóxicas desenvolvidas pelos hidrocarbonetos alifáticos clorados, motiva a avaliação dos ácidos biliares individuais como possíveis indicadores biológicos precoces do dano hepático promovido pelos solventes.

### **1.2.2 Análise do Metaboloma**

É cada vez mais evidente que nossa capacidade de modificar o perfil metabólico ajudará a descobrir muitas áreas anteriormente inacessíveis da

biologia (Kell, 2004). Analogamente à outras tecnologias "ômicas", o metaboloma é definido como a análise quali e/ou quantitativa dos metabólitos com peso molecular de até 1500 (Da) presentes num fluido biológico, célula ou organismo sob um dado conjunto de condições fisiológicas. O uso das tecnologias pós-genômica é muito importante para comprovar a associação entre marcadores moleculares e doenças (Goldsmith *et al.*, 2010). Entretanto a complexidade da análise de DNA, RNA, proteínas, e suas alterações convergiu para a análise dos metabólitos mesmo apresentando um número significativo de metabólitos a serem analisados (Lewis, Asnani e Gerszten, 2008).

Em todas as tecnologias *ômicas*, os componentes individuais (transcriptoma, proteoma e metaboloma) são complexos. Uma alteração no DNA reflete na alteração de várias proteínas, que por sua vez influencia diretamente a produção dos vários metabólitos. Entretanto, a alteração metabólica pode ser produzida pela alteração de uma ou mais proteínas envolvidas na produção do metabólito (Nielsen e Oliver, 2005; Álvarez-Sánchez, Priego-Capote e Luque De Castro, 2010). A Figura 1.1 mostra a relação entre as tecnologias *ômicas*.

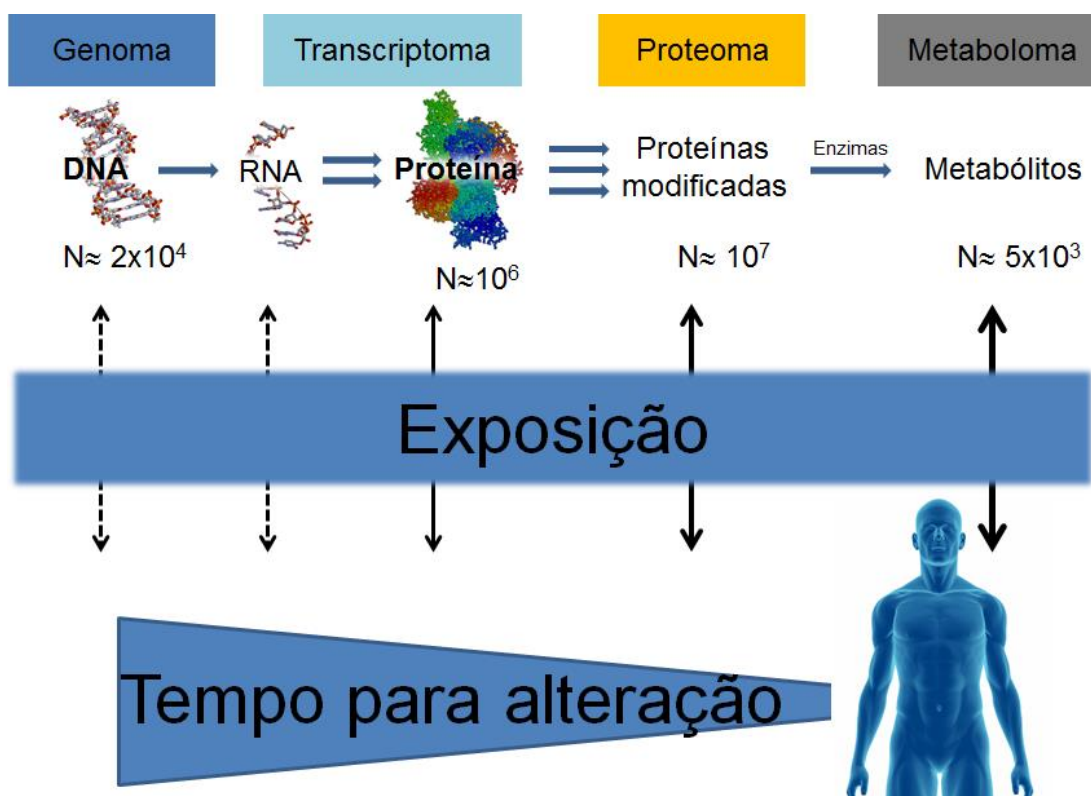


Figura 1.1 - Relação entre as tecnologias *ômicas*.

O conceito de metaboloma, como uma visão global de metabólitos produzidos por um organismo foi introduzido na década de 70 e os métodos existentes eram insuficientes para analisar o perfil do metaboloma humano. A metabolômica envolve o estudo de moléculas pequenas de células, tecidos, órgãos ou outros fluidos biológicos. Fazem parte desse conjunto de pequenas moléculas os metabólitos primários e intermediários, assim como as substâncias exógenas e seus metabólitos, como fármacos e outras substâncias químicas (Kaddurah-Daouk, Kristal e Weinshilboun, 2008; Sana, Waddell e Fischer, 2008). No estudo do metaboloma, a análise das pequenas moléculas pode representar um problema, pois as amostras são extremamente complexas e a identidade química pode ser mascarada/ocultada. Porém, a identificação e quantificação destes metabolitos específicos podem indicar o crescimento normal ou a presença de alterações celulares provocadas por poluentes presentes no ambiente de trabalho, uso de medicamentos ou drogas de abuso, e a exposição a poluentes ambientais (Sana, Waddell e Fischer, 2008).

O perfil metabólico constituído por pequenas moléculas com reconhecimento de transcrição e expressão/atividade proteica, pode ser utilizado para o estabelecimento de possíveis substâncias causadoras de doenças ou mesmo de substâncias benéficas ao organismo. Este estudo possibilita uma resposta mais rápida, do que a avaliação da alteração no transcriptoma, proteoma ou genoma. Um exemplo da precocidade da análise do metaboloma foi a descoberta da alcaptonuria pelo acúmulo de ácido homegenístico, devido a um erro inato do metabolismo (Vangala e Tonelli, 2007). O *Fingerprint* de uma doença específica pode ser definido pela interação dos métodos de alta definição de genoma, proteoma e metaboloma (Quinones e Kaddurah-Daouk, 2009).

O perfil metabólico, que é interpretado como a assinatura metabólica, tem sido utilizado como ferramenta para o esclarecimento do mecanismo de diversas doenças cardiovasculares, neurológicas (Lewis, Asnani e Gerszten, 2008; Quinones e Kaddurah-Daouk, 2009), alterações neuro-motoras, depressão, doença de Alzheimer (Dagani *et al.*, 1993; Xia *et al.*, 2009; Kaddurah-Daouk *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2013), efeitos

tóxicos de medicamentos, nutrição e câncer (Davis e Milner, 2004; Kato *et al.*, 2009; Oresic, 2009) oferecendo informações complementares às informações do genoma e proteoma (Teng *et al.*, 2009). Esses perfis são compostos por dezenas de metabólitos oriundos quali e/ou quantitativamente em estados patológicos ou através de exposição à substâncias químicas em várias situações (Kaddurah-Daouk, Kristal e Weinshilboum, 2008).

As diversas formas de analisar o metaboloma e suas características estão resumidas na Tabela 1.1.

**Tabela 1.1** - Estratégias analíticas para pesquisa em metabolômica.

<b>Critério</b>	<b>Metaboloma</b>	<b>Perfil Metabolico</b>	<b>“Fingerprinting”</b>	<b>Metabolito alvo</b>
Objetivo	Análise global dos metabólitos	Metabólitos para um grupo de metabólitos	Screening das amostras para classificação	Análise de poucos metabólitos
Seletividade dos metabólitos	Não	Sim	Não	Sim
Via metabólica específica	Não	Sim	Não	Sim
Amostras biológicas		Células, tecidos e fluídos biológicos		
Preparo de amostras	Genérico	Seletivo	Genérico	Seletivo
Análise	Qualitativa e quantitativa	Qualitativa e quantitativa	Qualitativa	Qualitativa e quantitativa
Métodos analíticos	GC/MS, LC/MS, CE/MS, NMR	GC/MS, LC/MS, CE/MS, NMR	GC/MS, LC/MS, CE/MS, NMR	GC/MS, LC/MS, CE/MS, NMR
Tempo de análise	Extenso	Extenso	Curto	Extenso



### 1.2.3 Preparo de Amostra

Os experimentos em metaboloma incluem o preparo de amostra, as análises instrumentais, o processamento e a interpretação dos dados. Todas essas etapas podem ser realizadas de diferentes maneiras, pois depende de fatores como natureza da amostra e da técnica analítica disponível.

O preparo de amostra é uma das etapas de maior desafio na química analítica requerendo um grande tempo para ser efetuada e muitas vezes esta etapa é subestimada na análise do metaboloma. Em um sistema biológico, o número de substâncias químicas e a variedade de classes de compostos podem ser superiores a um milhão de substâncias (Moco *et al.*, 2007; Danielsson *et al.*, 2010), porém o número de metabolitos para microorganismos simples pode variar de 240 para simples bactérias como *Mycoplasma pneumoniae* a 800 para *Escherichia coli*. (Van Der Werf *et al.*, 2007). Por existirem ainda muitos genes não descobertos nos genomas e a ampla especificidade de muitos substratos, este número pode ser ainda duas ou três vezes maior.

O primeiro requisito para a análise de metaboloma é o uso de técnicas abrangentes disponíveis devido a variedade de metabólitos possíveis (Kell, 2004). Identificar e quantificar os metabólitos é difícil pela diversidade das classes de compostos químicos presentes como peptídeos, carboidratos, lipídios, nucleosídeos e a presença dos produtos do catabolismo de compostos exógenos bem como pelo comportamento cinético, o que dificulta os protocolos de coleta (Stitt e Fernie, 2003; Saghatelian e Cravatt, 2005; Wishart *et al.*, 2008). Além disso, o elevado número de metabolitos individuais com uma grande variação em suas estruturas químicas dificultam as análises e requerem técnicas avançadas de separação e análise (Stitt e Fernie, 2003).

A seleção dos metabolitos a serem identificados e quantificados pode ser feita de acordo com a via metabólica a ser estudada e apresenta elevada importância na interpretação dos dados obtidos (Villas-Boas, Hojer-Pedersen *et al.*, 2005, XIA Jian-Fei, 2009). Geralmente os métodos usados são extração por solventes, extração em fase sólida (SPE) ou cromatografia por imunoafinidade.

Os métodos de extração por solventes são utilizados para a análise de metabólitos intracelulares e plasmáticos, porém é importante que a interrupção do metabolismo seja conseguida rapidamente com alteração na temperatura ou alteração de pH, no caso de determinação dos metabólitos provenientes de cultura de células ou microorganismos. Novos métodos de extração como a SPME e extração com membranas estão sendo aplicados nos estudos de metaboloma (Vuckovic *et al.*, 2010; Dixon *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2012). A Tabela 1.2 mostra os diversos métodos de extração e determinação para estudos de metaboloma.

Diferentes técnicas de separação acopladas a espectrometria de massas (MS) possibilitam a identificação e quantificação do perfil metabólico de microorganismos, celulares e humanos tais como, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS) (Kiefer, Portais e Vorholt, 2008), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) (Pasikanti, Ho e Chan, 2008; Tiziana Pacchiarotta, 2010), eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas (EC/MS) (Monton e Soga, 2007; Garcia-Perez *et al.*, 2008).

Em relação as amostras utilizadas para a análise do metaboloma, sangue e urina são as matrizes biológicas mais comuns de se utilizar na determinação do perfil metabólico, pois são matrizes utilizadas rotineiramente e de fácil coleta, sendo que a coleta da urina é preferida por não ser invasiva (Zhang *et al.*, 2007). Porém, pesquisas feitas em outras matrizes como o líquido céfalo-raquidiano (LCR) ou tecidos proveniente de biopsias, são importantes devido à simplicidade da matriz em relação ao plasma e ao fato de ter relevância em várias doenças diretamente relacionadas ao sistema nervoso central (SNC), sendo que a sua composição está relacionada à produção de metabólitos no cérebro, como por exemplo sobre as lesões cerebrais na doença de Parkinson e na esclerose múltipla (Wishart *et al.*, 2008).

**Tabela 1.2** - Métodos analíticos, tipos analitos, matrizes utilizadas e técnica de preparo de amostras utilizadas nos estudos metabolômicos (continua)

Referência	Analitos	Matriz	Preparo de amostras	Método
(Flores-Valverde e Hill, 2008)	Esteróides, glicocortóides e progestógenos	Ovários e fígado	SPE	UPLC-TOF MS
(Wu <i>et al.</i> , 2009)	Carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos	Urina	Metanol	GC-MS
(Snyder <i>et al.</i> , 2010)	L-β-Metilamino-alanina	Tecidos	LLE	GC x GC-ToFMS
(Uhl <i>et al.</i> , 2011)	Glicerofosfolípídeos	Plasma	Methanol	LC-MS/MS
(Caldeira <i>et al.</i> , 2012)	Cicloalcanos, aldeídos aromáticos e cetonas	Ar exalado	HS-SPME	GC x GC-ToFMS

**Tabela 1.2** - Métodos analíticos, tipos analitos, matrizes utilizadas e técnica de preparo de amostras utilizadas nos estudos metabolômicos . (concluído)

Referência	Analitos	Matriz	Preparo de amostras	Método
(Rocha <i>et al.</i> , 2012)	Hidrocarbonetos, aminas, amidas, ésteres, cetonas, aldeídos, álcoois, terpenóides	Urina	HS-SPME	GC x GC-ToFMS
(Wang <i>et al.</i> , 2012)	Ácidos graxos	Soro ou plasma	ELL ou LLE	GC-MS
(Zheng, Dixon e Li, 2012)	Aminoácidos	Saliva	Acetona (-20 °C)	LC-FTICR-MS.
(Paiva <i>et al.</i> , 2013)	Aminoácidos	CSF	Metanol (-20 °C)	GC-MS

As análises em matrizes biológicas complexas como plasma, soro, sangue total, urina, saliva e diversos tecidos, que muitas vezes apresentam teores proteicos elevados, necessitam de processos de preparo de amostra adequado para proporcionar a extração de um maior número de analitos possíveis. Outro fator que importante para o preparo das amostras é a presença destes analitos em baixas concentrações (Fu, Guan e Bao, 2006; Álvarez-Sánchez, Priego-Capote e Castro, 2010).

Entre as técnicas utilizadas para preparo de amostras biológicas estão a extração líquido-líquido (ELL) (Legido-Quigley *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011; Matysik, Klunemann e Schmitz, 2012), extração em fase sólida (SPE) (Zivanovic *et al.*, 2008; Arvidsson *et al.*, 2009; Kuklenyik *et al.*, 2011), extração com fluido supercrítico (SCFE) (Taguchi, Fukusaki e Bamba, 2013), e após a sua introdução em 1990 a microextração em fase sólida (SPME) (Dixon *et al.*, 2011). Recentemente com a finalidade de aumentar a eficiência da extração a combinação de 2 técnicas de extração vem sendo utilizada (Rezaee e Mashayekhi, 2012). Para a maioria dos compostos orgânicos a extração líquido-líquido é utilizada convencionalmente seguida ou não de derivatização. Porém, a extração líquido-líquido e o método de derivatização convencional, requerem um extensivo trabalho laboratorial, consumindo grandes quantidades de solventes orgânicos que são tóxicos e requerendo um tempo prolongado de análise. A utilização de grande volume de solventes e amostras são as desvantagens da ELL convencional.

Desse modo, com a finalidade de diminuir o volume de amostra utilizada na extração e a utilização de solventes em grande escala, a miniaturização das técnicas de extração vem chamando atenção, pelas vantagens oferecidas assim como a redução das etapas do preparo de amostra e a possibilidade de aplicação da técnica no diagnóstico de diversos tipos de doenças (Pena-Pereira, Lavilla e Bendicho, 2010; Silva, Passos e Camara, 2012).

Entre as principais técnicas de microextração existentes destacam-se a microextração em fase sólida (SPME), a microextração em gota suspensa (SDME) e a extração por membranas incluindo a extração com fase líquida suportada em membranas (SLE- “*supported liquid membrane*”), extração líquido-

líquido em membrana microporosa (MMLLE -“*microporous membrane liquid-liquid extraction*”) e a microextração em fase líquida (LPME – “*liquid phase microextraction*”) (Arthur e Pawliszyn, 1990; Rasmussen *et al.*, 2000; Majors, Jonsson e Mathiasson, 2003; Rasmussen e Pedersen-Bjergaard, 2004).

A SPME foi introduzida com a finalidade de reduzir o volume de amostra necessária para a utilização, diminuição do consumo de solvente, possibilidade de automação e injeção *on-line*, maior seletividade e especificidade na extração e aplicações direta *in vivo* (Arthur e Pawliszyn, 1990; Esrafil, Yamini e Shariati, 2007; Souza Silva, Risticovic e Pawliszyn, 2013)

A SDME foi introduzida por Jeannot e Cantwel em 1996, onde uma microgota de solvente orgânico imiscível em água é acondicionada em uma barra de PTFE para imersão na amostra, após a extração dos analitos de interesse, a microgota é retirada e injetada em um cromatógrafo a gás. (Jeannot e Cantwell, 1996). A técnica foi modificada, utilizando uma microseringa como suporte e não mais a barra de PTFE. Apesar dos analitos que possuem alto coeficiente de partição, atingirem altas concentrações, já que são transferidos por difusão, a SDME parece não ser tão robusta, apresentando perdas de solvente principalmente pela agitação da amostra (Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, 2005; Fu, Guan e Bao, 2006).

A extração por membranas é mais robusta e apresenta alta seletividade, o que permite obter extratos livres de interferentes e análise em níveis de traços devido a concentração dos analitos na fase de extração (Jonsson e Mathiasson, 2003). Na SLE o solvente orgânico é imobilizado em uma membrana porosa, formando uma barreira entre as fases aquosas. A fase orgânica está entre as duas fases aquosa. Após o ajuste do pH da fase aquosa os analitos são transferidos para a fase aceptora, que apresenta pH contrário a fase doadora, a fim de impedir a volta dos analitos para a fase doadora. A fase aceptora é transferida para a o GC ou HPLC e analisada (Jonsson e Mathiasson, 1999).

Em virtude do crescimento e aplicações dos estudos de metaboloma, o desenvolvimento de novos métodos de extração, derivatização e determinação são necessários para a análise mais abrangente destes metabólitos.

### 1.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITIO, A.; KALLIO, A. **Toxicology Letters**, v. 108, n. 2-3, p. 137-147, 1999.
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B.; PRIEGO-CAPOTE, F.; CASTRO, M. D. L. D. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 120-127, 2010.
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 111-119, 2010.
- ANAGNOSTOPOULOS, G. *et al.* **Acta Gastro-Enterologica Belgica**, v. 67, n. 4, p. 355-357, 2004.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, 1990.
- ARVIDSSON, B. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 3, p. 291-297, 2009.
- BAKER, E. L. **Annals of Neurology**, v. 63, n. 5, p. 545-547, 2008.
- BRASIL. **Segurança e medicina do trabalho: Lei n. 6514, de 22 de dezembro de 1997, normas regulamentadoras (NR) aprovadas pela portaria 3214, de 8 de junho de 1978.** São Paulo: Atlas 1999.
- CALDEIRA, M. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1254, p. 87-97, 2012.
- CAS REGISTRY – **Chemical abstracts service** – Disponível em: [www.cas.org/content/chemical-substances](http://www.cas.org/content/chemical-substances). Acesso em: 05 de Janeiro de 2014.
- DANIELSSON, A. P. H. *et al.* **Analytical Biochemistry**, v. 404, n. 1, p. 30-39, 2010.
- DE PAIVA, M. J. N.; DE SIQUEIRA, M. **Biomarkers**, v. 10, n. 6, p. 456-463, 2005.
- DIXON, E. *et al.* **Plos One**, v. 6, n. 4, 2011.
- DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285-294, 2005.
- ESCOBAR, O. A. *et al.* **Revista De Nefrologia Dialisis Y Trasplante**, v. 31, n. 3, p. 132-137, 2011.

- ESRAFILI, A.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S. **Analytica Chimica Acta**, v. 604, n. 2, p. 127-133, 2007.
- FLORES-VALVERDE, A. M.; HILL, E. M. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 22, p. 8771-8779, 2008.
- FU, H. F.; GUAN, J. Y.; BAO, J. J. **Analytical Sciences**, v. 22, n. 12, p. 1565-1569, 2006.
- GARCIA-PEREZ, I. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1204, n. 2, p. 130-139, 2008.
- GOLDSMITH, P. *et al.* **Journal of Surgical Research**, v. 160, n. 1, p. 122-132, 2010.
- HAO, S. R. *et al.* **Metabolomics**, v. 7, n. 3, p. 400-412, Sep 2011.
- IKEDA, M. **Toxicology Letters**, v. 108, n. 2-3, p. 99-106, 1999.
- IMBRIANI, M. *et al.* **Industrial Health**, v. 39, n. 3, p. 225-230, 2001.
- JAKUBOWSKI, M.; TRZCINKA-OCHOCKA, M. **Journal of Occupational Health**, v. 47, n. 1, p. 22-48, 2005.
- JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 13, p. 2236-2240, 1996.
- JONSSON, J. A.; MATHIASSEN, L. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 318-325, 1999.
- JONSSON, J. A.; MATHIASSEN, L. **Lc Gc Europe**, v. 16, n. 10, p. 683, 2003.
- KADDURAH-DAOUK, R.; KRISTAL, B. S.; WEINSHILBOUM, R. M. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 48, p. 653-683, 2008.
- KATO, M.; GARCIA, E. G.; WÜNSCH FILHO, V. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 32, p. 06-10, 2007.
- KELL, D. B. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 296-307, 2004.
- KESKI-SANTTI, P. *et al.* **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 83, n. 6, p. 703-712, 2010.
- KIEFER, P.; PORTAIS, J. C.; VORHOLT, J. A. **Analytical Biochemistry**, v. 382, n. 2, p. 94-100, 2008.
- KUKLENYIK, Z. *et al.* **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 24, p. 3606-3618, 2011.
- LANDRIGAN, P. J. **American Journal of Public Health**, v. 82, p. 941-943, 1992.
- LEGIDO-QUIGLEY, C. *et al.* **Biomedical Chromatography**, v. 24, n. 7, p. 737-743, 2010.



- LEWIS, G. D.; ASNANI, A.; GERSZTEN, R. E. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 2, p. 117-123, 2008.
- LOF, A.; JOHANSON, G. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 28, n. 6, p. 571-650, 1998.
- MAJORS, R. E.; JONSSON, J. A.; MATHIASSEN, L. **Lc Gc North America**, v. 21, n. 5, p. 424, 2003.
- MATYSIK, S.; KLUENEMANN, H. H.; SCHMITZ, G. **Clinical Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 1557-1564, 2012.
- MOCO, S. *et al.* **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 855-866, 2007.
- MONTON, M. R. N.; SOGA, T. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, p. 237-246, 2007.
- NEVES, H. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 1, p. 35-46, 1999.
- NICHOLSON, J. K.; WILSON, I. D. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 8, p. 668-676, 2003.
- NIELSEN, J.; OLIVER, S. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 11, p. 544-546, 2005.
- NIOSH. **National institute for occupational safety and health. Registry of toxic effects of chemical substances**, 1995.
- PAIVA, M. J. N. D. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 931, p. 97-102, 2013.
- PASIKANTI, K. K.; HO, P. C.; CHAN, E. C. Y. **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 2, p. 202-211, 2008.
- PATTI, G. J. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 24, p. 3460-3469, 2011.
- PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. **Journal of Chromatography B**, v. 817, n. 1, p. 3-12, 2005.
- PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 617-628, 2010..
- QUÍMICA, A. B. D. **Guia de fontes de informação em química e engenharia química no brasil**. Rio de Janeiro: ABQ 1995.
- QUINONES, M. P.; KADDURAH-DAOUK, R. **Neurobiology of Disease**, v. 35, n. 2, p. 165-176, 2009.
- RAMIREZ, N. *et al.* **Environment International**, v. 39, n. 1, p. 200-209, 2012.
- RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 1-10, 2004.

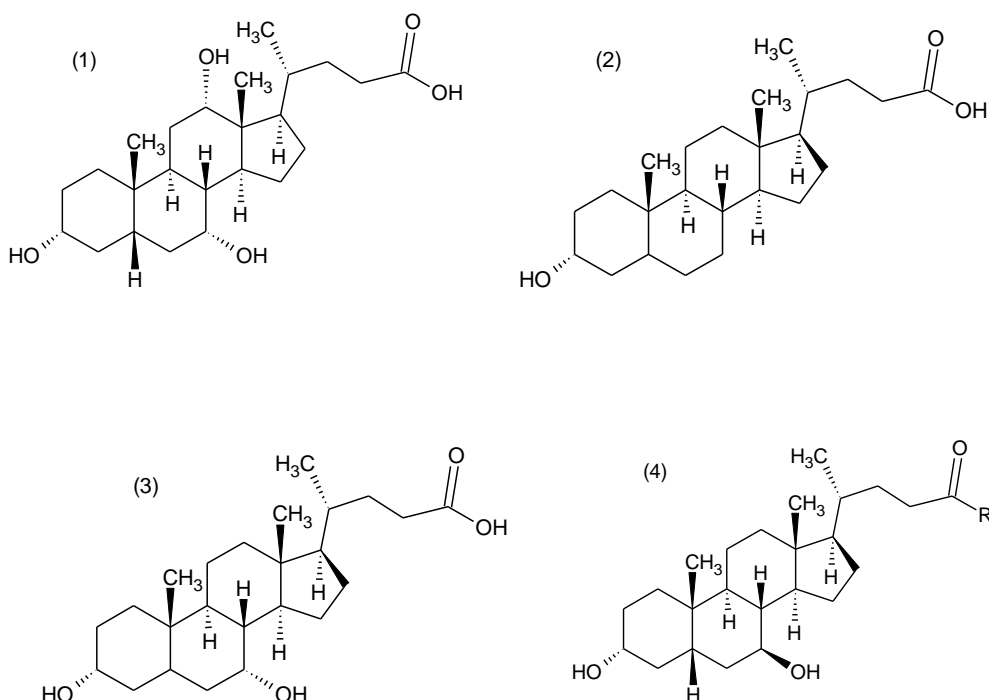
- RASMUSSEN, K. E. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 873, n. 1, p. 3-11, 2000.
- REZAEI, M.; MASHAYEKHI, H. A. **Analytical Methods**, v. 4, n. 9, p. 2887-2892, 2012.
- ROCHA, S. M. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1252, p. 155-163, 2012.
- SAGHATELIAN, A.; CRAVATT, B. F. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 1, p. 62-68, 2005.
- SANA, T. R.; WADDELL, K.; FISCHER, S. M. **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 2, p. 314-321, 2008.
- SCHMIDT, C. W. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. A700-A705, 2006.
- SILVA, C. L.; PASSOS, M.; CAMARA, J. S. **Talanta**, v. 89, p. 360-368, 2012.
- SNYDER, L. R. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 27, p. 4639-4647, 2010.
- SOUZA SILVA, E. A.; RISTICEVIC, S.; PAWLISZYN, J. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, n. 0, p. 24-36, 2013.
- STITT, M.; FERNIE, A. R. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 136-144, 2003.
- TAGUCHI, K.; FUKUSAKI, E.; BAMBIA, T. **Journal of Chromatography A**, v. 1299, p. 103-109, 2013.
- THOMAS, R. S. *et al.* **American Industrial Hygiene Association Journal**, v. 57, n. 1, p. 23-32, 1996.
- TIZIANA PACCHIAROTTA, E. N. *et al.* **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 21, p. 205 - 213, 2010.
- TOROS, A. B. *et al.* **Renal Failure**, v. 33, n. 1, p. 15-18, 2011.
- TORRES POMBO, J.; LAMA VARELA, A.; TORRES RIVAS, M. J. **Environmental limit values and biological exposure indices for chemical agents**. 2011. 45-49.
- UHL, O. *et al.* **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 30, p. 3556-3564, 2011.
- VAN DER WERF, M. J. *et al.* **Analytical Biochemistry**, v. 370, p. 17-25, 2007.
- VANGALA, S.; TONELLI, A. **Aaps Journal**, v. 9, n. 3, p. E284-E297, 2007.
- VIAU, C. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 197, n. 3, p. 38, 2004.

- VUCKOVIC, D. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 4041-4060, 2010.
- WANG, D. C. *et al.* **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 6, p. 1057-1066, 2012.
- WISHART, D. S. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 2, p. 164-173, 2008.
- WU, H. *et al.* **Analytica Chimica Acta**, v. 648, n. 1, p. 98-104, 2009.
- ZHANG, Q. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 854, n. 1-2, p. 20-25, 2007.
- ZHENG, J.; DIXON, R. A.; LI, L. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 24, p. 10802-10811, 2012.
- ZHU, P. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 25, p. 2487-2493, 2011.
- ZIVANOVIC, L. *et al.* **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 3, p. 575-585, 2008.

**CAPITULO 2 - DERIVATIZAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-  
ONDAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS BILIARES**

## 2.1 REVISÃO DA LITERATURA

Os ácidos biliares são ácidos esteroidais produzidos durante o metabolismo hepático do colesterol, todos com um grupamento carboxila localizado na cadeia lateral (Batta e Salen, 1999; Fini, Feroci e Roda, 2002; Burkard, Von Eckardstein e Rentsch, 2005). Eles estão presentes em vários fluidos biológicos, em diferentes composições e quantidades, na sua forma ionizada. A composição qualitativa dos ácidos biliares na bile, soro e urina, varia de acordo com suas propriedades físico-químicas e com as diferentes taxas de absorção intestinal e depuração (Roda, Piazza e Baraldini, 1998; Fini, Feroci e Roda, 2002).



**Figura 2.1** – Estrutura dos principais ácidos biliares – ácido cólico (1); ácido litocólico (2); ácido chenodesoxicólico (3); ácido ursodesoxicólico (4) presentes no plasma.

O metabolismo hepático e intestinal dos ácidos biliares pode ser influenciado por doenças hepáticas e gastrintestinais. Assim, alterações na síntese hepática, no metabolismo intracelular, na excreção e absorção intestinal ou na recaptura dos ácidos biliares do plasma resultam em distúrbios no metabolismo dos ácidos biliares (Roda, Piazza e Baraldini, 1998; Montet *et al.*, 2002; Burkard, Von Eckardstein e Rentsch, 2005). O aumento da concentração de sais biliares no sangue ocorre devido a alterações na captura hepatocelular, provocadas por substâncias químicas e têm sido considerados como indicadores sensíveis na detecção precoce da disfunção hepática (Roda, Piazza e Baraldini, 1998; Montet *et al.*, 2002; Kullak-Ublick, Stieger e Meier, 2004; Burkard, Von Eckardstein e Rentsch, 2005; De Paiva e De Siqueira, 2005; Cheng, Buckley e Klaassen, 2007; Geier *et al.*, 2007).

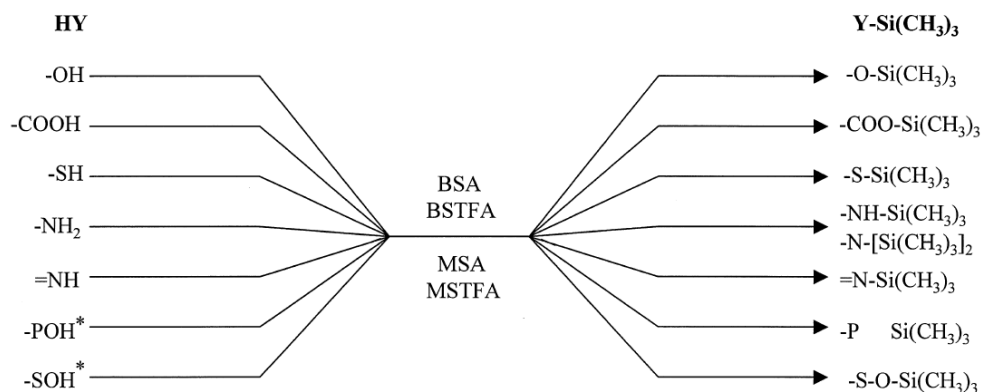
Os ácidos biliares estão presentes em baixas concentrações ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no plasma e muitos deles como os ácidos chenodesoxicólico, desoxicólico e ursodesoxicólico (Figura 2.1) são estruturalmente similares. Isso implica que a determinação e quantificação dos ácidos biliares, analisados individualmente, exige métodos sensíveis e específicos. Existem vários métodos descritos na literatura para a determinação dos ácidos biliares em diferentes matrizes (Mashige *et al.*, 1981; Iida *et al.*, 1995; Iida *et al.*, 2004; Burkard, Von Eckardstein e Rentsch, 2005). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido usada para a determinação dos ácidos biliares, porém a sua combinação com a detecção ultravioleta (UV) não apresenta sensibilidade e seletividade necessárias, devido aos poucos grupos cromóforos existentes nas moléculas (Burkard, Von Eckardstein e Rentsch, 2005). Por outro lado, Iida *et al.*, 1995 propuseram um método de cromatografia em fase gasosa (CG) utilizando coluna capilar e detector por ionização em chama, para determinar os ácidos biliares, após derivatização.

Os requisitos para separação e análise de compostos utilizando a cromatografia gasosa são a volatilidade e a estabilidade térmica. Para análise de muitos compostos que não apresentam estas características, como os ácidos carboxílicos, aminas, aldeídos, fenóis é necessário que se proceda a uma derivatização, pois eles apresentam baixa volatilidade são termolábeis produzindo cromatogramas de difícil interpretação devido aos múltiplos picos e

a não separação de seus estereoisômeros (Wells, 1999; Schummer *et al.*, 2009; Kouremenos *et al.*, 2010). Além de fornecer condições para análise por cromatografia gasosa a derivatização diminui a polaridade dos compostos e aumenta a sensibilidade e seletividade do detector para os analitos de interesse (Wells, 1999; Shareef, Angove e Wells, 2006; Schummer *et al.*, 2009; Kouremenos *et al.*, 2010).

As reações de derivatização, que podem ser realizadas nas carboxilas, hidroxilas e grupamentos oxo das moléculas dos ácidos biliares, aumentam a estabilidade dos analitos para sua determinação por CG, mas apresentam como desvantagem, o aumento no tempo total de realização das análises (Batta e Salen, 1999; Batta *et al.*, 2002; Burkard, Von Eckardstein e Rentsch, 2005; Alnouti, Csanaky e Klaassen, 2008; Bobeldijk *et al.*, 2008; Griffiths e Sjoval, 2010).

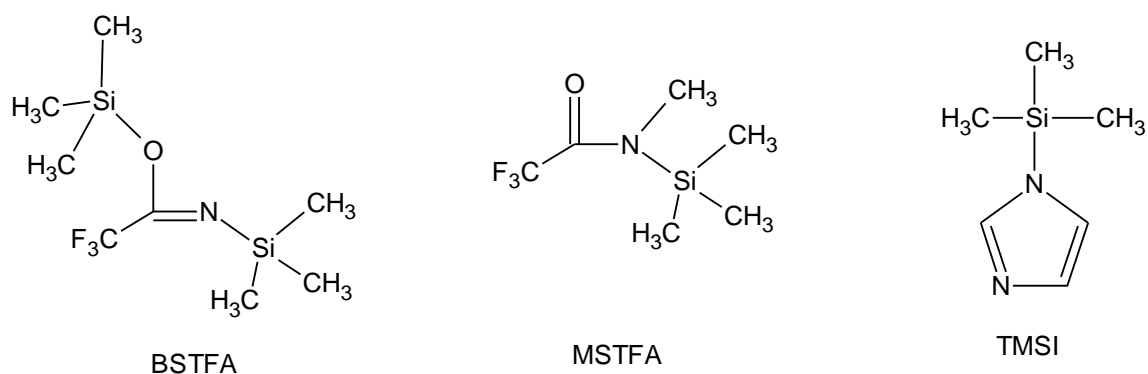
Os compostos derivatizados podem ser separados em colunas cromatográficas com fases apolares. Os tipos de derivatização utilizados em cromatografia gasosa são a sililação, acilação, alquilação e condensação (formação de oximas e condensação de amins com compostos carbonílicos) (Drozd, 1981).



**Figura 2.2** – Grupos funcionais derivatizados por sililação

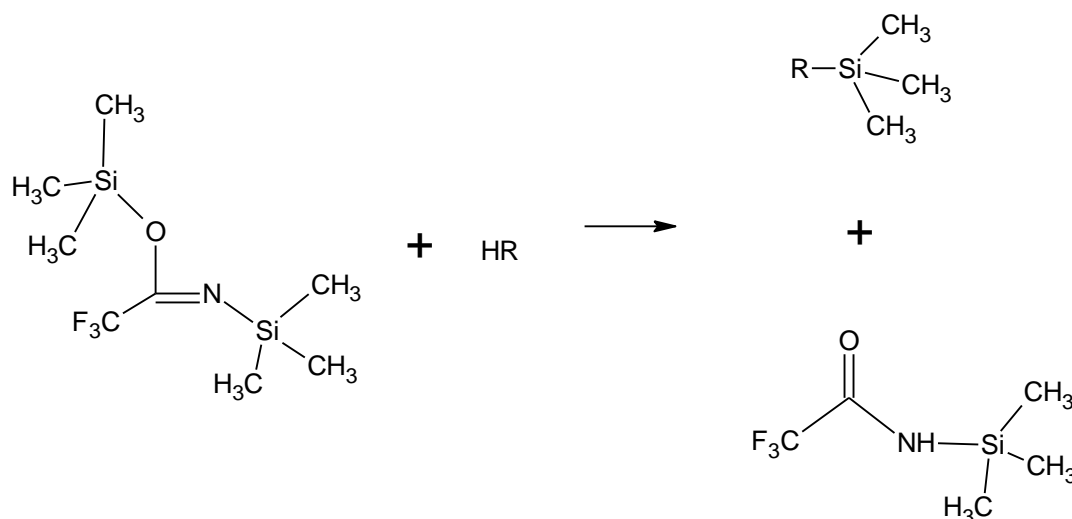
As reações de sililação devem ser feitas com controle de temperatura e de tempo, pois a diminuição da temperatura e/ou tempo de reação para a sililação pode reduzir significativamente a concentração dos produtos formados, além de aumentar a possibilidade de formação de interferentes. Os grupos

funcionais passíveis de sililação e os seus produtos estão demonstrados na figura 2.2. Outra possibilidade para a diminuição da derivatização é a força de doação do grupo silil. Entre os sililantes utilizados, TMSI (trimetilsililimidazol), BSTFA (N,O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida) e MSTFA (N-metil-(trimetilsilil) trifluoroacetamida) apresentam respectivamente força decrescente de doação do grupo silil. A estrutura química dos reagentes sililantes e a reação geral de sililação estão representadas respectivamente nas figuras 2.3 e 2.4. Estes reagentes são usados na derivatização de hormônios esteroides (Zhou, Wang e Jia, 2007; Bowden *et al.*, 2009), de ácidos biliares em amostras ambientais (Batta *et al.*, 2002; Griffiths e Wang, 2009) e em metaboloma (Griffiths e Wang, 2009; Kouremenos *et al.*, 2010). Zhou *et al.* (2007) usaram a adição de 0,5% de TMSI ao BSTFA ou MSTFA para prevenir a formação de múltiplos derivados sililados e aumentar a eficiência de derivatização de compostos com vários sítios de derivatização, como o etiniestradiol. Como a sililação é uma reação de substituição nucleofílica o TMSI atua como agente desprotonante facilitando a sililação. Este efeito é semelhante ao efeito promovido pela adição da piridina na reação (Zhou, Wang e Jia, 2007).



**Figura 2.3** – Estrutura química dos reagentes sililantes





**Figura 2.4** - Reação geral para a sililação utilizando BSTFA.

Na literatura são descritos diversos métodos de derivatização para os ácidos biliares, com formação de compostos sililados (Batta *et al.*, 2002; Iida *et al.*, 2004; Sebok *et al.*, 2008; Tyagi, Edwards e Coyne, 2009). O método proposto por Tyagi, 2009, propõe o uso de uma mistura de BSTFA:piridina (1:1, v/v) aquecida a 60 °C por 30 minutos. Em outro método proposto por Casas-Catalan, 2004 foi utilizado etilcloroformato (ECF) para formação de etil éster nos grupos carboxílicos e trimetilsililimidazol (TMSI) para a sililação das hidroxilas por 20 min a 40 °C. (Casas-Catalan *et al.*, 2004; Tyagi, Edwards e Coyne, 2009).

Diversos tipos de compostos derivatizantes são propostos para a sililação, com formação dos mesmos compostos derivatizados, diferenciando apenas no rendimento da formação e do número de interferentes (Kumar *et al.*, 2011). Vários estudos mostram a utilização de diferentes procedimentos e misturas de derivatizantes, tais como o MSTFA:NH<sub>4</sub>I:DTE (500:4:2, 40 µL, 60°C, 30 min), MSTFA:TMSI:TMCS (100:2:5, 40 µL, 60°C, 30 min), MSTFA:TMCS (100:1:40 µL, 60°C, 30 min), e BSTFA:TMCS (100:1, 40 µL, 60°C, 30 min) (Tyagi, Edwards e Coyne, 2009; Kumar *et al.*, 2011). A mistura contendo NH<sub>4</sub>I, que foi utilizada para a derivatização, gerou um composto sililado que apresentou a melhor estabilidade e abundância de íons usados na

identificação. Entretanto o tempo para a reação foi mais extenso e pode ser 10 vezes maior que o aquecimento por micro-ondas.

Na derivatização utilizando aquecimento convencional o tempo é fundamental para sililação em todos os sítios, e pode ser longo. Entretanto o tempo gasto pode ser reduzido através de aquecimento por micro-ondas. Assim como na derivatização convencional a derivatização assistida por micro-ondas requer a otimização da potência e tempo de aquecimento.

A derivatização assistida por micro-ondas apresenta vantagens como a diminuição do tempo de aquecimento e conseqüentemente reduzir o tempo de preparo a amostras (Damm *et al.*, 2010; Liebeke, Wunder e Lalk, 2010). No método de derivatização utilizando o aquecimento convencional em bloco aquecedor o tempo para a derivatização pode ser de 50 a 120 min, sendo que com a derivatização utilizando o aquecimento por micro-ondas o tempo pode ser reduzido à poucos minutos.

A energia irradiada pelas micro-ondas não induz diretamente as reações químicas ou degradação, mas aquece eficientemente as misturas. A eficiência é atribuída à rápida transferência de energia e a capacidade dos reagentes de absorver as micro-ondas. A velocidade cinética da reação aumenta, promovida pela rápida transferência de energia transferida reduzindo o tempo requerido para a derivatização. Ainda a derivatização assistida por micro-ondas é de fácil manipulação ou manuseio com ausência de aquecimento no frasco de reação (Damm *et al.*, 2010; Fiamegos, Karatapanis e Stalikas, 2010; Liebeke, Wunder e Lalk, 2010).

Ranz (2008) e Kouremenos (2010) avaliaram o potencial da derivatização assistida por micro-ondas para a derivatização de herbicidas e para análise de metaboloma. No estudo realizado por Kouremenos, para diferentes classes de compostos (açúcares, ácidos graxos e cetonas) a derivatização completa de grupos específicos pode necessitar de um tempo adicional de aquecimento (Ranz *et al.*, 2008; Kouremenos *et al.*, 2010).

Este estudo apresenta pela primeira vez o uso de derivatização utilizando aquecimento por micro-ondas para a análise dos ácidos biliares.

## 2.2 OBJETIVO

Propor um novo procedimento analítico para determinação de ácidos biliares por GC/MS usando derivação assistida por micro-ondas.

### 2.2.1 Objetivos Específicos

Otimizar os reagentes e as quantidades de derivatizantes utilizados.

Obter um padrão de fragmentação para os ácidos biliares estudados.

Otimizar e validar o método de determinação dos ácidos biliares derivatizados utilizando a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

## 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.3.1 Padrão dos Ácidos Biliares

Todos os padrões de ácidos biliares foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA)

Ácido cólico (CA) 98% – Sigma - Aldrich

Ácido litocólico (LCA) – Sigma – Aldrich

Ácido ursodesoxicólico 99% (UDCA) – Sigma - Aldrich

#### 2.3.1.1 Preparo de Soluções Padrão

As soluções estoque foram preparadas em metanol grau HPLC e as soluções de trabalho foram preparadas em diclorometano:metanol (2:1). As soluções estoque foram preparadas na concentração de 1,0 g L<sup>-1</sup> e estocadas à -20 °C. A partir dessas soluções foram preparadas soluções de 1,0 mg L<sup>-1</sup>

que foram utilizadas para a otimização da derivatização por micro ondas. As soluções de trabalho foram estocadas à 4 °C.

### 2.3.2 Reagentes e Solventes

- Metanol, grau cromatográfico Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha), com grau de pureza de 99.9%.
- Água ultra-pura obtida de sistema Elga (SP, Brasil)
- Detergente neutro, Extran MA 02 da Merck (RJ, Brasil).
- Hélio N-50 da Air Products, com 99,999% de pureza.
- MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) - Sigma – Aldrich - (St. Louis, EUA)
- BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) + 1% TMCS - Sigma – Aldrich (St. Louis, EUA)
- Metoxamina PA - Fluka - (St. Louis, EUA)
- Acetato de etila - grau cromatográfico – Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha), com grau de pureza de 99.9%.
- Diclorometano - grau cromatográfico – Merck, KGaA (Darmstadt, Alemanha), com grau de pureza de 99.9%.
- Piridina, grau cromatográfico, Sigma-Aldrich Vo. (St. Louis, MO, EUA).

### 2.3.3 Análises Cromatográficas – Instrumentação

Foi utilizado um cromatógrafo a gás, modelo TRACE GC, equipado com injetor split/splitless, acoplado ao espectrômetro de massas modelo *Polaris Q*, com analisador de massas tipo *Ion Trap*, com ionização por impacto de elétrons (EI), marca Thermo Electron. Coluna cromatográfica capilar de fase estacionária 5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, (30m x 0,25mm x 0,25µm Restek). As condições cromatográficas foram testadas para estabelecer as condições ideais de separação. A temperatura do injetor (TI) foi de 280 °C, e foram testadas as temperaturas de 250, 280 e 300 °C. A temperatura da fonte foi de 200 °C e a temperatura de interface de 250 °C. O gás de arraste utilizado

foi o Hélio (pureza de 99,999%) a um fluxo constante de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  sendo injetado um volume de  $1,0 \mu\text{L}$ .

A programação de temperatura para forno de colunas na análise dos ácidos biliares foi: temperatura inicial de  $100^\circ\text{C}$  com patamar de 1 min, seguido de aquecimento a  $12 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  até  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ , seguido de aquecimento a  $3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  até  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  com patamar final de 4 min. O injetor operou no modo sem divisão (*Splitless*) durante 1 min, seguido de divisão (*Split*) na razão de 1:20. O espectrômetro de massas operou no modo impacto de elétrons (EI) com energia de 70 eV. As análises foram realizadas no modo varredura total de íons (faixa de 50–900 *m/z*). Após o estabelecimento dos íons gerados com a fragmentação, as análises foram realizadas no modo *full scan* e foram analisadas pela extração dos íons selecionados de acordo com os dados mostrados na Tabela 2.1.

Para a derivatização foi utilizado um forno de micro-ondas Philco (faixa de potencia de 10 a 800 Watts). O tempo total da corrida cromatográfica foi de 25 min e a aquisição e análise de dados foi feita com o programa Xcalibur da Thermo Finnigan (USA).

Após a caracterização dos ácidos cólico, ursodesoxicólico e litocólico as condições de programação de temperatura do forno foi modificada com a finalidade de diminuir o tempo de análise para: temperatura inicial de  $120^\circ\text{C}$  com patamar de 1min, aquecimento a  $15 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$  até  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ , aquecimento a  $5 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$  até  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  permanecendo por 4 minuto.

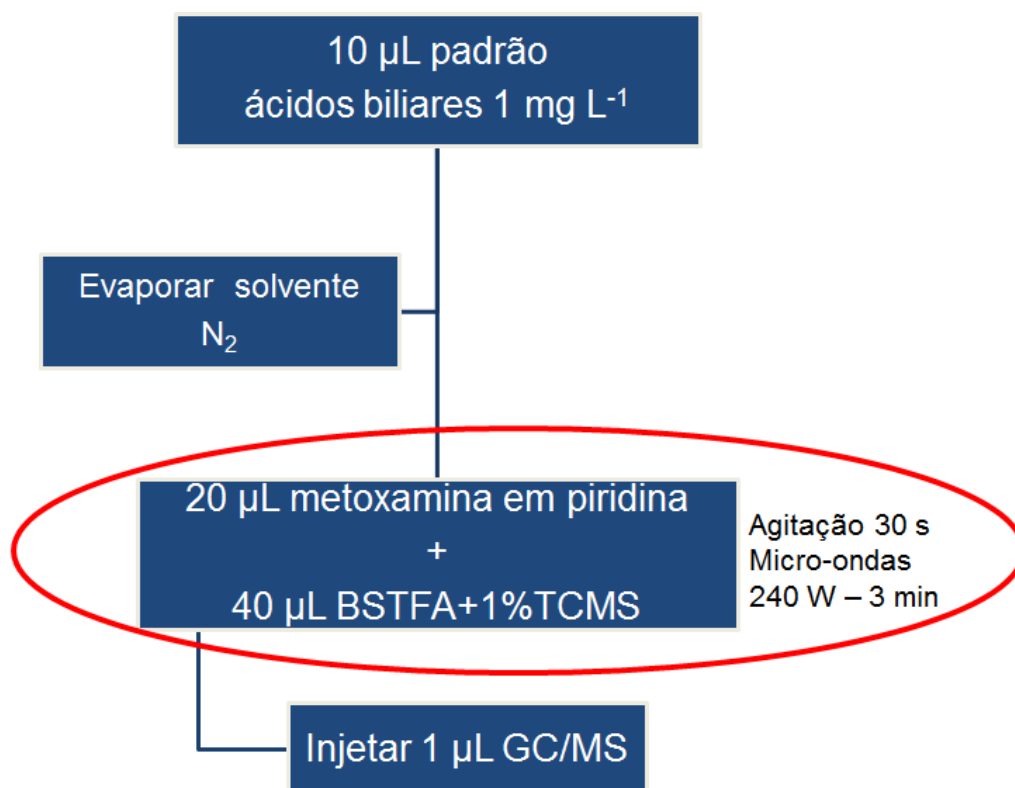
#### 2.3.4 Equipamentos

- Microseringas de  $50,0$  e  $100,0 \mu\text{L}$  (Hamilton – Reno, EUA)
- Frasco de vidro transparente com tampa de rosca e lacre de polipropileno de capacidade de  $2,0$  e  $10,0 \text{ mL}$  (supelco, Bellefonte, EUA);
- Balança analítica resolução  $0,01 \text{ mg}$ , modelo AX200 da Shimadzu (Columbia, USA).

- Estufa Biomatic Aparelhos Científicos Ltda (Porto Alegre, Brasil).
- Chapa aquecedora com controle de temperatura e agitação magnética da IKA RHon (Wilmington, USA).
- Bloco de alumínio 8,0 x 6,0 x 8,0 cm.
- Agitador de tubos Vortex, modelo AP 56 (Phoenix, São Paulo, Brasil)
- Agitador magnético Ika (Staufen, Alemanha);
- Pipetas automáticas de diferentes capacidades de volume, Finnpiette® e Oxford®;
- Forno de micro-ondas Philco 18 L modelo PMS 18N2 (faixa de potencia de 10 a 800 Watts);

### 2.3.5 Procedimento de Derivatização

Uma alíquota de 10,0  $\mu\text{L}$  de solução de trabalho contendo a mistura dos ácidos biliares (cólico, ursodesoxicólico e litocólico) na concentração de 1,0 mg  $\text{L}^{-1}$  foi transferida para um tubo de vidro de 2,0 mL inserido dentro do frasco de análise (*insert*). O solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio a temperatura ambiente. Posteriormente 20,0  $\mu\text{L}$  de metoxamina em piridina foram adicionados nas concentrações de 20,0 g  $\text{L}^{-1}$  e 40,0  $\mu\text{L}$  de BSTFA + 1% TCMS foram adicionados sequencialmente. O *insert* foi acondicionado em tubo de vidro com tampa de silicone de 2,0 mL. A etapa final do processo de derivatização foi o aquecimento da mistura utilizando micro-ondas. A figura 2.5 mostra o fluxograma do método para a derivatização dos ácidos biliares utilizando aquecimento por micro-ondas. O rendimento da derivatização foi comparado com o procedimento de derivatização convencional em bloco aquecedor. Diferentes potências (160, 240, 320, 480 e 640 watts) em diferentes tempos de derivatização (1, 2, 3, 4 e 5 min) foram avaliados em um conjunto de experimentos para avaliar a resposta, a reprodutibilidade e a velocidade da derivatização usando aquecimento por micro-ondas.



**Figura 2.5-** Fluxograma do método para a derivatização assistida por micro-ondas dos ácidos biliares.

## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.4.1 Confirmação dos Compostos Derivatizados

O padrão de fragmentação dos ácidos biliares sililados foi estudado para possibilitar a sua identificação. Foram analisadas as perdas de grupamentos metila e trimetilsilil, além de outras fragmentações que apresentaram íons de relação  $m/z$  com intensa abundância. A Tabela 2.1 fornece informações sobre os íons formados para os ácidos biliares estudados.

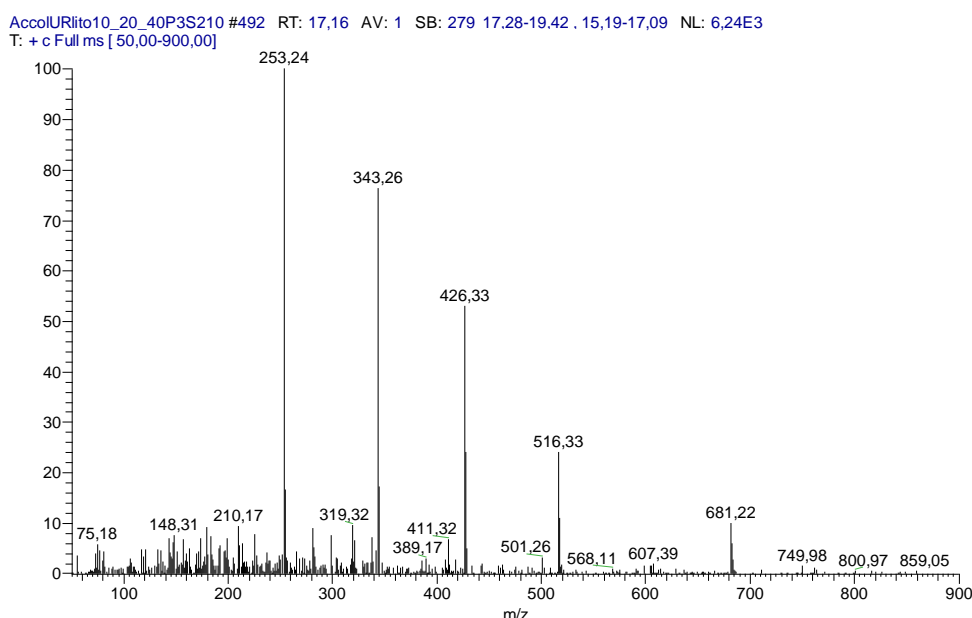
**Tabela 2.1** - Padrões de fragmentação dos ácidos biliares após a derivatização utilizando reagente sililante (BSTFA) e aquecimento por micro-ondas com posterior análise por GC-MS.

Ácido Biliar	$t_r$ (min)	Fragmentos de íons selecionados utilizados para a identificação de cada ácido biliar ( $m/z$ )		
		$[M]^+$	$[M-15]^+$	Fragmentos de íons mais abundantes $m/z$
Cólico	17,19	696,5	681	$[M-2TMSOH]^+=516$ $[M-(2TMSOH+SiCH_3)_4]^+=428$ $[M-3TMSOH]^+=426$
Ursodesoxicólico	17.59	608.5	593	$[M-2TMSOH]^+=428$ $[M-(15+2TMSOH)]^+=413$

$[M]^+$  íon molecular.

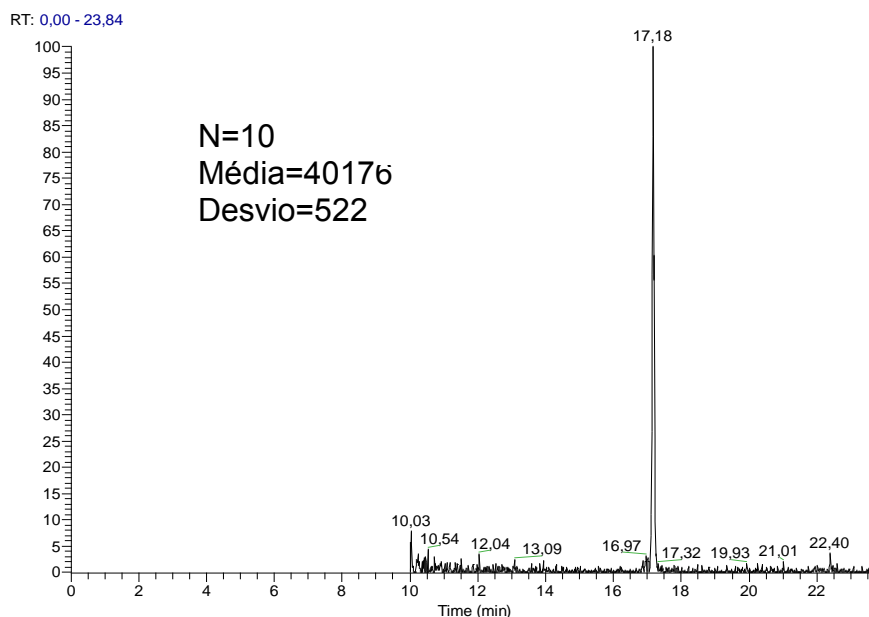


A perda de um grupamento de metila [M-15] gera um fragmento de  $m/z$  681 que foi utilizado, inicialmente, para identificar o ácido cólico. Porém este é o fragmento de menor intensidade (15,76%) como mostrado na Tabela 2.1. O íon de  $m/z$  426 é o referente a perda de [M-3TMSOH]. Este é um dos fragmentos mais abundantes (47,94%) do ácido cólico e foi também usado para avaliar o rendimento do sistema de derivatização estudado. O fragmento de  $m/z$  516 é referente a perda de [M-2TMSOH]. Este íon apresenta maior intensidade relativa do ácido cólico e foi o fragmento utilizado para sua identificação. O íons de  $m/z = 428$ , de intensidade próxima a 20%, não pode ser usado, pois o cromatograma obtido para a pesquisa deste íons apresentam muitos interferentes. O espectro de massas para o ácido cólico esta apresentados na Figura 2.6.

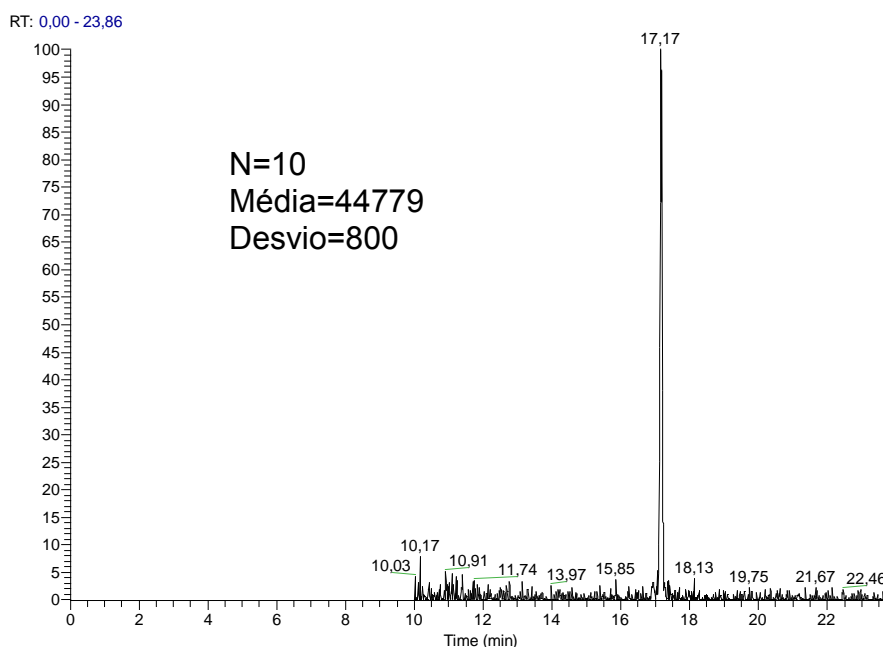


**Figura 2.6** - Espectro de massas do ácido cólico silylado na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , para a derivatização com aquecimento convencional a temperatura de  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  por 60 min e por micro-ondas com aquecimento por 3 minutos em uma potencia de 240 W.

A Figura 2.7 mostra o cromatograma obtido para o ácido cólico, utilizando a derivatização convencional na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  a  $100^\circ\text{C}$  por 60 minutos e a Figura 2.8 a derivatização por micro-ondas à 240 Watts por 3 min.



**Figura 2.7** - Cromatograma de massas do padrão de ácido cólico derivatizado a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  após a derivatização convencional com aquecimento a  $100^\circ\text{C}$  por 60 minutos, por GC/MS, modo positivo, em varredura completa (full scan 50 - 900) com extração do íon de  $m/z$  426.



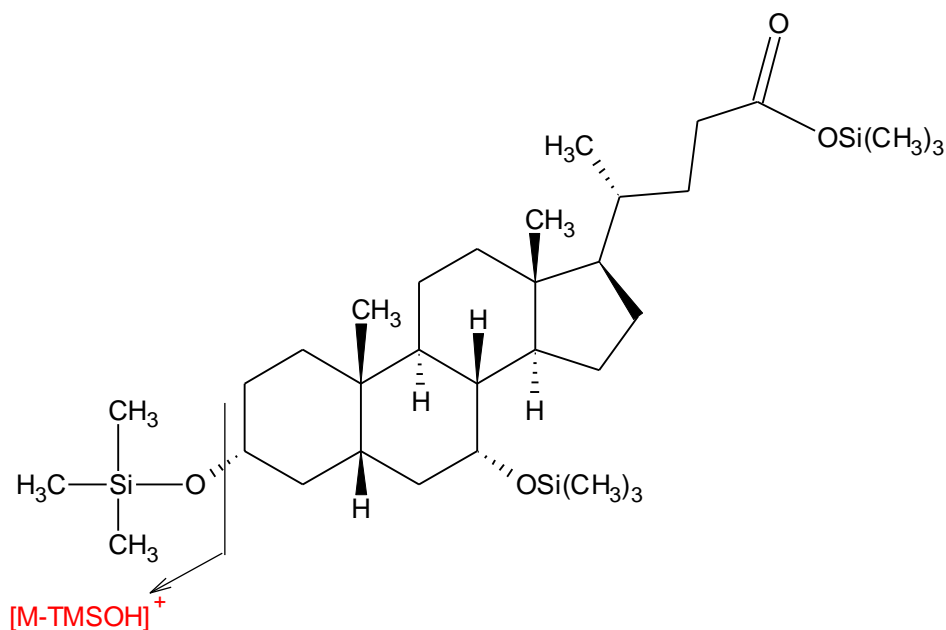
**Figura 2.8** - Cromatograma de massas do padrão de ácido cólico derivatizado a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  após a derivatização utilizando aquecimento por micro-ondas na potencia de 240W por 3 minutos por GC/MS, modo positivo, em varredura completa (full scan 50 - 900) com extração do íon de  $m/z$  426.

Na comparação das médias das áreas dos picos obtidas após a derivatização realizada pelas duas formas de aquecimento, verifica-se que não há diferença entre a eficiência da derivatização na formação dos compostos sililados. A formação dos compostos foi avaliada pelo padrão de fragmentação dos analitos sililados. Sendo assim, a utilização das micro-ondas para o aquecimento durante a derivatização é viável e possibilita a redução tempo de reação de 60 para 3 minutos.

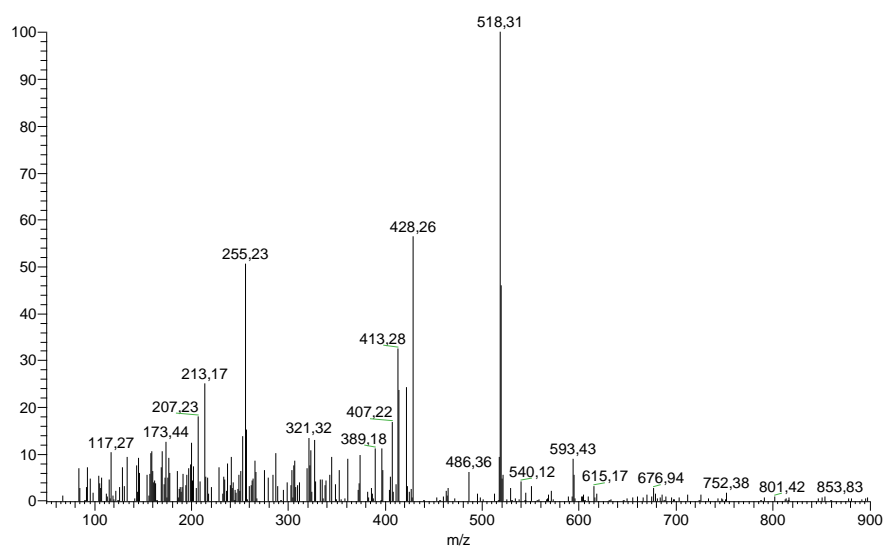
Para o ácido ursodesoxicólico o fragmento de  $m/z$  413, representa a perda de  $2\text{TMSOH} + \text{CH}_3$ . Este fragmento apresenta 32% de intensidade e é o menor entre os fragmentos pesquisados, entretanto a literatura sugere este fragmento para a identificação da presença do ácido ursodesoxicólico (Sebok, 2008).

O íon que apresenta 100% de intensidade relativa refere-se ao composto com  $m/z = 518$ . Este fragmento é formado pela perda do TMSOH (Figura 2.9). A literatura não sugere a utilização deste íon para a identificação do ácido ursodesoxicólico (Sebok *et al.*, 2008), entretanto como a pesquisa dos outros fragmentos de  $m/z$  sugeridos apresentam menor intensidade relativa e maior possibilidade de interferência, o íon de  $m/z$  518 foi o escolhido para a identificação do ácido ursodesoxicólico. O espectro de massas do ácido ursodesoxicólico referente ao composto sililado, está representado na Figura 2.10.

O ácido litocólico foi inicialmente adicionado ao grupo de compostos presente no estudo. Entretanto a dificuldade de elucidação da fragmentação, para correta identificação do composto, inviabilizou o estudo deste analito entre os analitos estudado. Sendo assim, foram feitos estudos complementares somente para os ácidos cólico e ácido ursodesoxicólico.



**Figura 2.9** - Fragmentação do ácido ursodesoxicólico sililado com a formação de composto com  $m/z$  de 518 pela perda de  $[TMSOH]$ .



**Figura 2.10** - Espectro de massas do ácido ursodesoxicólico sililado na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , para a derivatização por micro-ondas com aquecimento por 3 minutos em uma potencia de 240 W.

### 2.4.2 Otimização da Derivatização por Micro-Ondas

Recentemente alguns pesquisadores (Damm *et al.*, 2010 e Kouremenos, *et al.*, 2010) utilizaram o aquecimento por micro-ondas para a derivatização de diferentes analitos extraídos de diferentes matrizes, entretanto a utilização de micro-ondas para a sililação dos ácidos biliares ainda não foi estudada.

As etapas otimizadas para a derivatização dos ácidos biliares foram: quantidades de reagentes para a sililação, variação da potencia do micro-ondas e tempo de reação. Os volumes da solução BSTFA + 1% de TCMS estudados foram de 10,0 µL, 20,0 µL, 40,0 µL, 50,0 µL, 60,0 µL e 100,0 µL. A melhor resposta foi obtida para 40,0 µL. A derivatização completa depende da quantidade de reagente derivatizante proporcional aos analitos de interesse. Volumes menores dos reagentes derivatizantes são insuficientes para a derivatização completa e enquanto o excesso destes reagentes derivatizantes aumentam o número de picos no cromatograma total de íons (TIC).

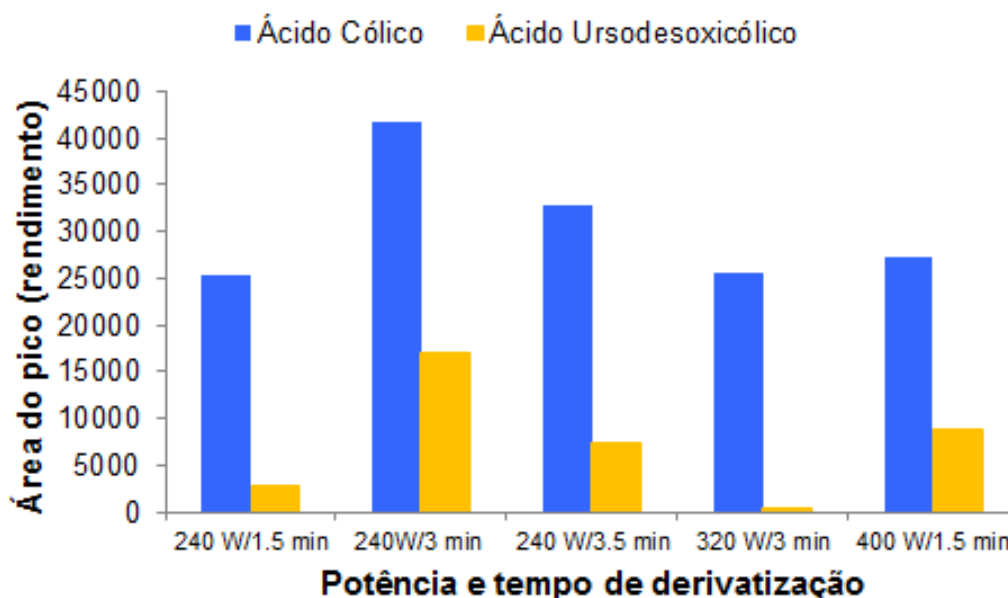
Para o estudo da potência (W) e tempo de irradiação (min), padrões e derivatizantes foram submetidos a radiação de micro ondas em potencia de 160, 240, 320, 480 e 640 Watts por 1, 2, 3, 4 e 5 minutos. Cada condição foi testada em triplicata. A potencia de 240 Watts e o tempo de 180 segundos, foram as condições de melhor rendimento para a derivatização obtida para o ácido cólico e ursodesoxicólico e apresentaram repetibilidade aceitável (%CV <20%).

A presença de interferentes é um problema comum quando a sililação é realizada em compostos que têm na sua estrutura grupamentos carboxílicos e fenólicos. Os ácidos biliares são derivatizados especificamente nesses grupos. Porém, a otimização das condições minimizam esta possibilidade de interferência, que é comumente encontrada (Zhou, Wang e Jia, 2007; Kouremenos *et al.*, 2010).

Assim como na derivatização convencional, o estabelecimento da potencia e tempo de derivatização é necessário para garantir a derivatização completa e evitar a formação de interferentes. A Figura 2.11 mostra o rendimento da derivatização em diferentes condições de potência e

temperatura para a mistura de (10:20:40)  $\mu\text{L}$  – padrão de ácido biliar + metoxamina + (BSTFA + 1% TMCS). Houve uma perda na formação dos ácidos biliares estudados com o aumento da potencia e diminuição da temperatura. Uma diminuição no rendimento dos produtos formados pela reação de derivatização foi verificada com a potência de 320 W e um intervalo de tempo de 90 s. A melhor condição foi com aquecimento a uma potencia de 240 W durante 180 s.

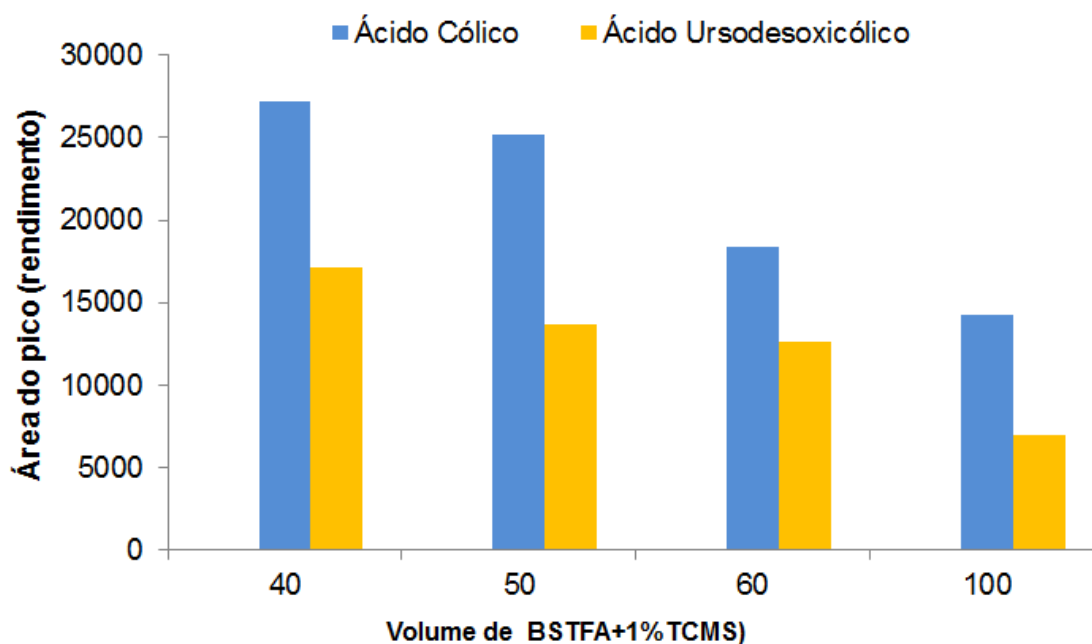
A mesma perda no rendimento da derivatização, devido ao aumento da potencia do micro-ondas, foi relatada por Kouremenos *et al.* (2010), em seu estudo, onde o aumento da potencia de 150 para 300 watts em um tempo de 90 segundos, diminuiu três vezes a formação dos compostos sililados, afetando a intensidade da resposta. Outro fator importante a ser considerado é que com o aumento da temperatura no sistema fechado, o aumento da pressão interna pode degradar os compostos sililados formado o que contribui para a degradação e formação de interferentes.



**Figura 2.11** - Rendimento da derivatização frente a diferentes potências e tempo de derivatização.

Outro parâmetro avaliado foi a proporção de derivatizante utilizado. O MSTFA foi utilizado inicialmente como agente silante, entretanto a adição de MSTFA, não promoveu a derivatização nos ácidos biliares e outros agentes sililantes foram testados. A mistura do reagente derivatizante escolhida foi o BSTFA + 1 % de TCMS e metoxamina.

A Figura 2.12 mostra os resultados obtidos utilizando diferentes volumes de derivatizantes. Uma mistura de padrão de ácido biliar:metoxamina:(BSTFA + 1%TMCS) de 10:20:40  $\mu$ L foi a melhor condição estudada, apresentando melhores resultados. Os resultados obtidos com a derivatização possibilitaram a identificação correta dos ácidos biliares e a separação cromatográfica. A derivatização incompleta mostra o aparecimento de mais de um pico cromatográfico referente a um mesmo analito (Zhou, Wang e Jia, 2007). A mesma interferência foi verificada por Kouremenos *et al.* (2010) para a análise de outros compostos.



**Figura 2.12** - Rendimento da derivatização frente a diferentes proporções de reagentes.

Os resultados obtidos neste trabalho para as reações de derivatização utilizando micro-ondas mostram padrões de fragmentação semelhantes aos

resultados encontrados por Sebok *et. al.*, 2008, na determinação convencional (100°C por 1 hora) de ácidos biliares utilizando GC/MS.

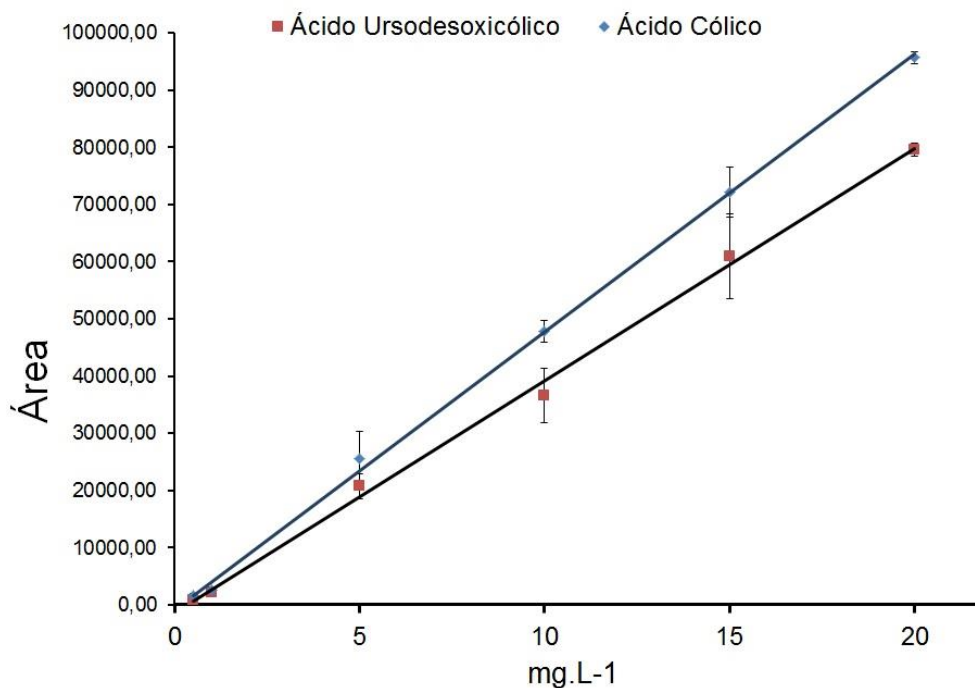
### 2.4.3 Estudo dos Parâmetros de Mérito do Método

As curvas de calibração para os ácidos biliares (cólico e ursodesoxicólico) foram feitas em seis níveis de concentração (0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg L<sup>-1</sup>) em triplicada para cada concentração. A análise das variâncias das áreas dos picos da curva de calibração em função da média das áreas não foi constante para os ácidos cólico e ursodesoxicólico (dados não mostrados), sendo a heterocedasticidade confirmada pelo teste F para 95% de confiança.

Sendo assim o cálculo das equações de regressão foi realizado utilizando o método dos mínimos quadrados ponderados pelas variâncias da resposta. A Figura 2.13 mostra a curva analítica para o ácido cólico ( $y = 4849,8x - 764,15$ ) apresenta  $R^2 = 0,999$  ( $p < 0,0001$ ). Para a faixa linear de trabalho de concentrações de 0,78 a 20 mg L<sup>-1</sup> a massa injetada variou de 0,129 a 3,30 ng. Estes resultados são semelhantes ao do estudo realizado por Sebok (2008), que obteve uma faixa linear de 0,43 a 3,46 ng.

Para o ácido ursodesoxicólico, a curva analítica obtida ( $y = 4056,1x - 1334,9$ ) apresentou linearidade satisfatória na faixa de  $0,44 \pm 0,01$  a  $20,0 \pm 0,02$  mg L<sup>-1</sup> com  $R^2 = 0,9975$  ( $p < 0,0001$ ).





**Figura 2.13** - Curva analítica para a determinação da linearidade dos ácidos cólico e Ursodesoxicólico.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados de acordo com a recomendação da EURACHEM Guide através de 10 medidas consecutivas do branco. Os valores de LOD foram 0,23 e 0,13 mg L<sup>-1</sup> para o ácido cólico e ursodesoxicólico, respectivamente. Os valores de LOQ foram de 0,78 mg L<sup>-1</sup> e 0,44 mg L<sup>-1</sup> para o ácido cólico e ursodesoxicólico respectivamente. Estes valores são menores que os valores encontrados em outros estudos (Sebok *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2011).

No estudo da precisão intra-ensaio (repetibilidade) dez (10) replicatas nas concentrações de 1,0, 10,0 e 20,0 mg L<sup>-1</sup> foram analisadas no mesmo dia. O coeficiente de variação médio foi de 4,76 % e 8,70 % para o ácido cólico e ácido ursodesoxicólico respectivamente.

**Tabela 2.2** - Tempo de retenção, faixa linear, limite de detecção e quantificação na análise quantitativa dos ácidos biliares utilizando aquecimento por micro-ondas.

	$t_r$ (min)	Faixa Linear (mg L <sup>-1</sup> )	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	Precisão		
					CV %		
					1,0 (mg L <sup>-1</sup> )	10,0 (mg L <sup>-1</sup> )	20,0 (mg L <sup>-1</sup> )
Ácido cólico	17,19	0,78-20	0,23	0,78	9,32	3,90	1,08
Ácido Ursodesoxicólico	17,59	0,44-20	0,13	0,44	11,71	13,02	1,38

Os resultados da repetitividade são semelhantes aos obtidos por Damm *et al.* (2010) que estudou a derivatização utilizando aquecimento por micro-ondas para fármacos e drogas de abuso.

## 2.5 CONCLUSÕES

Este estudo apresenta um método alternativo utilizando a cromatografia gasosa, acoplada a espectrometria de massa para identificação e quantificação dos ácidos biliares utilizando derivatização assistida por micro-ondas. O padrão de fragmentação forneceu os íons característicos da perda de metila, TMSOH e Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> que são os fragmentos esperados na identificação dos ácidos biliares. Foram avaliadas neste estudo a variação do protocolo de aquecimento no forno de micro-ondas. Este procedimento foi validado e demonstrou precisão e linearidade aceitáveis. Um estudo das variáveis interferentes no processo de derivatização foi realizado, e a derivatização completa foi conseguida após a adição de metoxamina. A irradiação das micro-ondas não induziu diretamente as reações químicas e/ou a degradação dos compostos

formados, mas é um método eficaz de aquecimento das misturas dos reagentes e assim reduz o tempo de preparação da amostra, necessário para a obtenção dos produtos derivatizados e com condições para identificar e quantificar os ácidos biliares . Comparando-se derivatização convencional com a derivatização utilizando micro-ondas, verifica-se que ambas resultaram em produtos totalmente derivatizados, adequados para a identificação e quantificação.

## 2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALNOUTI, Y.; CSANAKY, I. L.; KLAASSEN, C. D. **Journal of Chromatography B**, v. 873, n. 2, p. 209-217, 2008.
- BATTA, A. K.; SALEN, G. **Journal of Chromatography B**, v. 723, n. 1-2, p. 1-16, 1999.
- BATTA, A. K. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 775, n. 2, p. 153-161, Aug 5 2002.
- BOBELDIJK, I. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 2, p. 306-313, 2008.
- BOWDEN, J. A. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 27, p. 3237-3242, 2009.
- BURKARD, I.; VON ECKARDSTEIN, A.; RENTSCH, K. M. **Journal of Chromatography B**, v. 826, n. 1-2, p. 147-159, 2005.
- CASAS-CATALAN, M. J. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 2, p. 269-276, 2004.
- CHENG, X.; BUCKLEY, D.; KLAASSEN, C. D. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 11, p. 1665-1676, 2007.
- DAMM, M. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 1, p. 167-170, 2010.
- DE PAIVA, M. J. N.; DE SIQUEIRA, M. **Biomarkers**, v. 10, n. 6, p. 456-463, 2005.
- DROZD, J. **Chemical derivatization in gas chromatography**. Elsevier Science, 1981. 246p.
- FIAMEGOS, Y. C.; KARATAPANIS, A.; STALIKAS, C. D. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 5, p. 614-621, 2010.
- FINI, A.; FEROCI, G.; RODA, A. **Polyhedron**, v. 21, n. 14-15, p. 1421-1427, 2002.

- GEIER, A. *et al.* **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 3, p. 283-308, 2007.
- GRIFFITHS, W. J.; SJOVALL, J. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 1, p. 80-84, 2010.
- GRIFFITHS, W. J.; WANG, Y. Q. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 26, p. 2778-2805, 2009.
- IIDA, T. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1057, n. 1-2, p. 171-176, 2004.
- IIDA, T. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 689, n. 1, p. 77-84, 1995.
- KOUREMENOS, K. A. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 21, p. 1761-1770, 2010.
- KULLAK-UBLICK, G. A.; STIEGER, B.; MEIER, P. J. **Gastroenterology**, v. 126, n. 1, p. 322-342, 2004.
- KUMAR, B. S. *et al.* **Analytical Biochemistry**, v. 408, n. 2, p. 242-252, 2011.
- LIEBEKE, M.; WUNDER, A.; LALK, M. **Analytical Biochemistry**, v. 401, n. 2, p. 312-314, 2010.
- MASHIGE, F. *et al.* **Clinical Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 1352-1356, 1981 1981.
- MONTET, A. M. *et al.* **Alcohol and Alcoholism**, v. 37, n. 1, p. 25-29, 2002.
- RANZ, A. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1192, n. 2, p. 282-288, 30 2008.
- RODA, A.; PIAZZA, F.; BARALDINI, M. **Journal of Chromatography B**, v. 717, n. 1-2, p. 263-278, 1998.
- SCHUMMER, C. *et al.* **Talanta**, v. 77, n. 4, p. 1473-1482, 2009.
- SEBOK, A. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1211, n. 1-2, p. 104-112, 2008.
- SHAREEF, A.; ANGOVE, M. J.; WELLS, J. D. **Journal of Chromatography A**, v. 1108, n. 1, p. 121-128, 2006.
- TYAGI, P.; EDWARDS, D. R.; COYNE, M. S. **Water Air and Soil Pollution**, v. 198, n. 1-4, p. 45-54, 2009.
- WELLS, R. J. **Journal of Chromatography A**, v. 843, n. 1-2, p. 1-18, 1999.
- ZHOU, Y. Q.; WANG, Z. J.; JIA, N. **Journal of Environmental Sciences-China**, v. 19, p. 879-884, 2007.

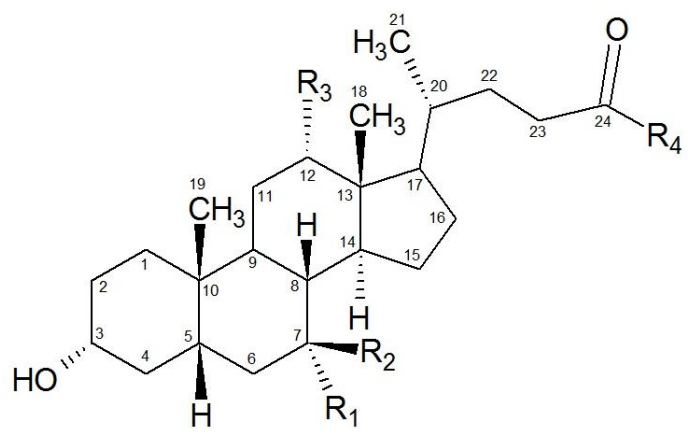
**CAPITULO 3 - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS BILIARES NO  
PLASMA POR LPME USANDO LCMS-IT-TOF**

### 3.1 REVISÃO DA LITERATURA

Entre os metabólitos produzidos a partir do colesterol, estão os ácidos biliares, que apresentam na sua estrutura um grupo carboxílico na posição 23 da cadeia lateral do grupo esteróide e um grupo hidroxila na posição  $3\alpha$  ou  $3\beta$  do anel A (Roda, Piazza e Baraldini, 1998; Fini, Feroci e Roda, 2002; Griffiths e Sjovall, 2010).

Estes compostos são determinados nos fluídos biológicos utilizando técnicas espectrofotométricas e cromatográficas (Mashige *et al.*, 1981; Roda, Piazza e Baraldini, 1998; Fini, Feroci e Roda, 2002; Bentayeb *et al.*, 2008). No método espectrofotométrico são determinados os ácidos biliares totais, enquanto na separação cromatográfica, a identificação e quantificação de todos, é feita individualmente. Como os ácidos biliares apresentam similaridade entre si, à determinação individual de cada um destes pode indicar mais especificamente o dano hepático (Cheng, Buckley e Klaassen, 2007). Para a determinação individual dos ácidos biliares a cromatografia acoplada à espectrometria de massas tem sido utilizada para as análises. A cromatografia gasosa apresenta maior sensibilidade e resolução, porém faz necessária a derivatização prévia dos analitos, o que pode ser um fator limitante em relação a etapa de extração utilizada (Iida *et al.*, 1995; Batta e Salen, 1999; Iida *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2011). As análises por LC-MS vêm sendo utilizadas e não necessitam de derivatização prévia dos analitos e os procedimentos de extração são compatíveis com a análises instrumental (Alnouti, Csanaky e Klaassen, 2008; Bentayeb *et al.*, 2008; Taguchi, Fukusaki e Bamba, 2013). A Figura 3.1 mostra a estrutura dos ácidos biliares.

(A)



(B)

Ácido Biliar	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
<b>Cólico</b>	OH	H	OH	OH
<b>Deoxicólico</b>	H	H	OH	OH
<b>Chenodeoxicólico</b>	OH	H	H	OH
<b>Ursodeoxicólico</b>	H	OH	H	OH
<b>Litocólico</b>	H	H	H	OH
<b>Glicocólico</b>	OH	H	OH	Glicina
<b>Taurocólico</b>	OH	H	OH	Taurina
<b>Glicodeoxicólico</b>	H	H	OH	Glicina
<b>Taurodeoxicólico</b>	H	H	OH	Taurina
<b>Glicichenodeoxicólico</b>	OH	H	H	Glicina
<b>Taurochenodeoxicólico</b>	OH	H	H	Taurina
<b>Glicoursodeoxicólico</b>	H	OH	H	Glicina
<b>Tauroursodeoxicólico</b>	H	OH	H	Taurina
<b>Glicolitocólico</b>	H	H	H	Glicina
<b>Taurolitocólico</b>	H	H	H	Taurina

**Figura 3.1** - Estrutura Básica dos ácidos biliares primários e secundários e seus conjugados (A) e seus radicais substituintes.

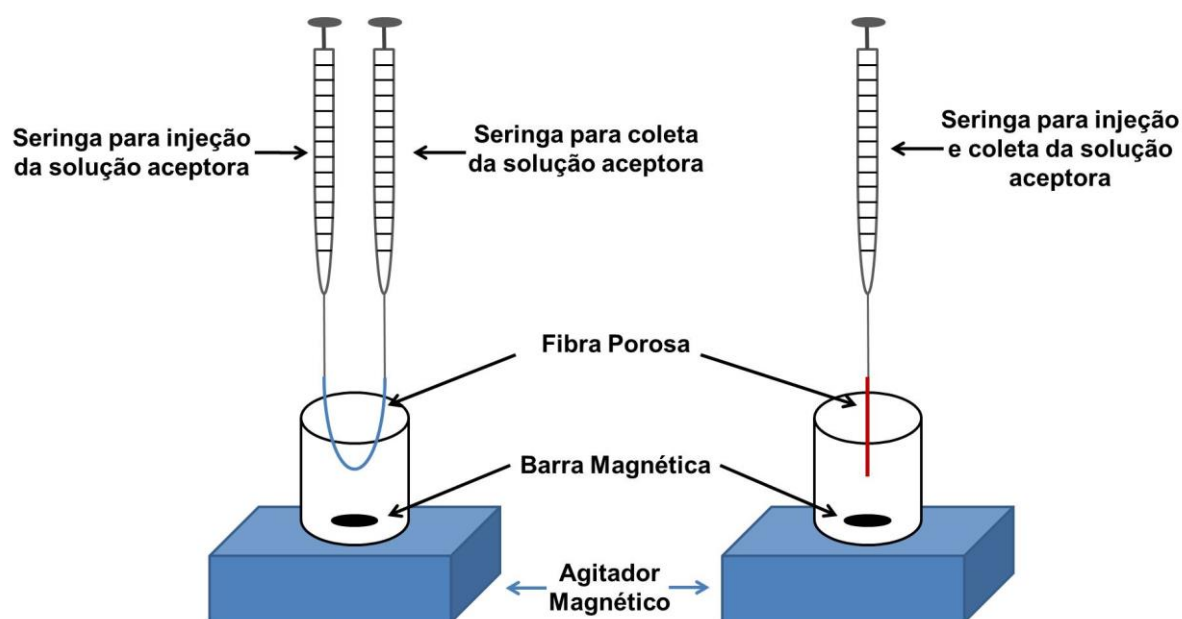
### 3.1.1 Extração por Membranas

Entre as principais técnicas de extração por membrana existentes, destacam-se a extração suportada por membranas (SLE- “supported liquid membrane”), e a extração líquido-líquido em membrana microporosa (MMLLE - “microporous membrane liquid-liquid extraction” (Jonsson e Mathiasson, 1999; Rasmussen, Knut Einar *et al.*, 2000; Majors, Jonsson e Mathiasson, 2003; Rasmussen e Pedersen-Bjergaard, 2004). Rasmussen e Pedersen-Bjergaard (2004) introduziram a técnica de microextração em fase líquida com fibras ocas, “hollow fiber liquid-phase microextraction” – HF-LPME que combina o conceito da extração com membranas (SLM e MMLLE), pequeno volume de solventes orgânicos (fase aceptora) e matriz biológica (fase doadora), favorecendo a transferência dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica (Psillakis e Kalogerakis, 2003; Rasmussen e Pedersen-Bjergaard, 2004; Lambropoulou e Albanis, 2005; Huang, Chen e Huang, 2009)

Há duas configurações principais em que a LPME é empregada: configuração tipo “haste” (“rod-like”), onde somente uma microseringa é utilizada para injetar e coletar a fase aceptora (Figura 3.2 A) e configuração em “U” (Figura 3.2 B), que utiliza duas microseringas conectadas à fibra (Jonsson e Mathiasson, 1999; Rasmussen, K. E. *et al.*, 2000; Rasmussen e Pedersen-Bjergaard, 2004).

Uma membrana capilar porosa e hidrofóbica (fibra oca) é impregnada com o solvente orgânico de extração e o seu lúmen é preenchido com microlitros de uma fase aceptora (outro solvente orgânico). Com isso, a fase aceptora não entra em contato direto com a matriz aquosa (fase doadora), permitindo utilizar agitação constante durante a extração (Jonsson e Mathiasson, 1999). Devido ao pequeno diâmetro dos poros, geralmente de 0,2  $\mu\text{m}$ , proteínas não são extraídas, o que é extremamente vantajoso nas análises de matrizes biológicas complexas. Além disso, o baixo custo de cada unidade de extração possibilita o seu uso uma única vez, evitando problemas de “carry-over”, efeito normalmente observado em outras técnicas de extração por membranas.





**Figura 3.2** - Representação esquemática da da microextração em fase líquida (LPME) empregando configuração em “U” (A) e do “haste” (“rod-like”) (B).

#### 3.1.1.1 Modo de Extração Utilizando HF-LPME

A extração HF-LPME pode ser realizada utilizando um sistema de duas ou três fases. No sistema de duas fases, a fase aquosa (fase doadora) contém os analitos que serão extraídos através de um solvente orgânico imiscível em água, que ficará imobilizado nos poros da membrana. O mesmo solvente orgânico utilizado na impregnação dos poros da membrana será introduzido no interior da fibra em volumes pequenos e compatíveis com o comprimento da fibra.

No modo de três fases o analito também está na fase doadora (aquosa) e será extraído por solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros da membrana. Em seguida o analito é transferido para uma solução aquosa (fase aceitadora) presente no interior da fibra. Na LPME de três fases a fase orgânica atua como barreira entre as fases aquosas para impedir o contato entre elas (Jonsson e Mathiasson, 1999). O coeficiente de partição octanol/água dos ácidos biliares estudado está entre 0,49 a 3,5 como mostra a tabela 3.1..

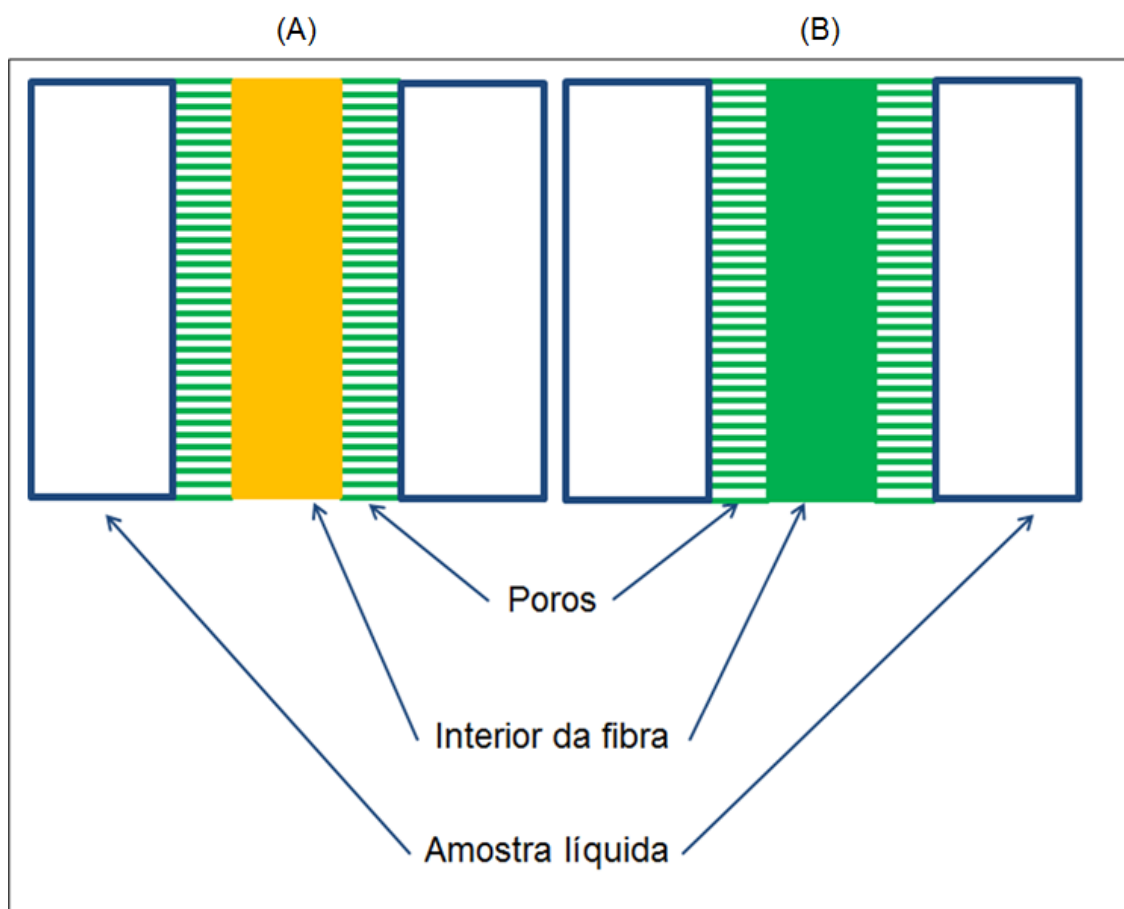
**Tabela 3.1** - Coeficiente de ionização dos ácidos Biliares (pKa), coeficiente de partição octanol-água (Log P) dos ácidos biliares na forma não dissociada (Log P<sub>HA</sub>) e dos solventes utilizados na LPME e coeficiente de partição octanol-água (Log P) dos ácidos biliares na forma dissociada (Log P<sub>A<sup>-</sup></sub>).

<b>Ácido Biliar</b>	<b>pKa</b>	<b>Log P<sub>HA</sub></b>	<b>Log P<sub>A<sup>-</sup></sub></b>
<b>Ursodesoxicólico</b>	6,58	3	2,16
<b>Hiodesoxicólico</b>	6,58	3,08	2,33
<b>Glicochenodesoxicólico</b>	4,3	2,12	0,49
<b>Cólico</b>	6,4	2,93	2,01
<b>Taurolitocólico</b>	< 2,0	0,49	-3,27
<b>Desoxicólico</b>	6,58	3,5	2,69
<b>Litocólico</b>	6,78	3,42	2,43
<b>Hexano</b>		4	
<b>Tolueno</b>		2,73	
<b>Benzeno</b>		2,13	
<b>Octanol</b>		3,15	

A Tabela 3.1 mostra o coeficiente de partição octanol/água dos solventes que podem ser utilizados como fase aceptora na LPME de duas fases.

A LPME de 2 fases é utilizada para extrair analitos de característica neutra ou de baixa polaridade. Já o sistema de três fases é mais indicado para analitos moderadamente hidrofóbicos com grupos ionizáveis (ácidos ou bases fracas) (Pedersen-Bjergaard, Ho e Rasmussen, 2002). Geralmente, quando se usa extração por LPME os analitos são separados e identificados por

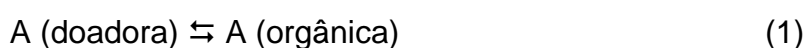
cromatografia líquida ou eletroforese capilar. A Figura 3.3 mostra o esquema da LPME no modo de 2 e 3 fases.



**Figura 3.3** - Representação da Microextração em fase líquida (LPME) para a extração dos analitos no modo de duas fases (A) sendo o lúmen da fibra oca preenchido com solvente orgânico e para a extração no modo de três fases (B) sendo o interior da fibra preenchido com solvente aquoso.

### 3.1.2 Cálculo Teórico da Concentração dos Analitos no Método LPME

Nos sistemas de duas fases os analitos são transferidos da amostra aquosa (fase doadora) para a fase orgânica (fase aceptora) presentes nas paredes porosas e interior da fibra capilar. O processo de equilíbrio pode ser descrito de acordo com a seguinte equação:



onde A representa o analito de interesse. O coeficiente de partição é definido como:

$$K_{org/d} = \frac{C_{eq,org}}{C_{eq,d}} \quad (2)$$

onde:

$C_{eq,org}$  = é a concentração de A na solução orgânica (acceptora) em equilíbrio

$C_{eq,d}$  = é a concentração de A na solução doadora em equilíbrio

Baseado na equação (2) e no balanço de massas do sistema de LPME de 2 fases, a recuperação (R) do analito no equilíbrio pode ser calculada como:

$$R = \frac{K_{org/d} V_{org}}{K_{org/d} V_{org} + V_d} \times 100 \quad (3)$$

onde:

$V_{org}$  = é o volume total de fase orgânica no sistema (soma do solvente orgânico presente nos poros da membrana e no lúmen da fibra)

$V_d$  = é o volume total da amostra

De acordo com a equação (3) a recuperação depende do coeficiente de partição, do volume de solvente orgânico e do volume da amostra. Altas recuperações são obtidas para compostos com elevado coeficiente de partição. O rendimento pode ser aumentado testando diferentes solventes, ajustando o pH do meio de acordo com o pKa dos analitos e adicionando sais na solução doadora (efeito “*salting out*”) (Ho, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, 2002).

### 3.2 OBJETIVOS

Desenvolver e validar um método de microextração em fase líquida com fibra oca de polipropileno para determinação de ácidos biliares por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução LC-MS-IT-TOF.

Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras de plasma de voluntários expostos a solventes e em voluntários não expostos a solventes.

Realizar um estudo comparativo entre as concentrações dos ácidos biliares presente no plasma e a atividade dos parâmetros de função hepática.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1 Amostras

Para aplicar o método desenvolvido e validado foram coletadas amostras de sangue de 10 pessoas expostas a solventes orgânicos, técnicos de laboratório e funcionários da manutenção de equipamentos e peças constituíram o grupo que apresentam contato com solventes orgânicos, clorados, alifáticos e 11 voluntários, não expostos ocupacionalmente a qualquer tipo de solvente, formaram o grupo controle.

Todos os voluntários da pesquisa foram submetidos a um questionário (Anexo 1) sobre itens como identificação, condições de trabalho, hábitos pessoais, presença de patologias, etc. Assinaram um termo de consentimento pós informação de participação do trabalho (Anexo 2). O protocolo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Anexo 3).

Todas as amostras de sangue destinadas às análises dos ácidos biliares e dos demais parâmetros bioquímicos de função hepática (10 mL) foram colhidas, de ambos os grupos, no Laboratório de Análises Toxicológicas da UFMG.

### 3.3.1.1 Características da População Estudada

**Grupo em contato com solventes** - Os trabalhadores apresentavam idade média  $\pm$  desvio de  $37,4 \pm 9,5$  anos e tempo de trabalho médio  $\pm$  desvio de  $9,5 \pm 9,2$  meses. Entre as atividades desenvolvidas pelos trabalhadores está a manipulação direta de solventes orgânicos e clorados. Os trabalhadores do setor de manutenção tiveram exposição aos solventes presente em tintas e/ou removedores de tintas (*tíner*), assim como desengraxantes. Os demais se expuseram a solventes através da limpeza de laboratórios de pesquisa e/ou ensino de química. Todos os expostos a solventes nos laboratórios relataram o uso de luvas, óculos de proteção e máscara. Entretanto, os trabalhadores da manutenção relataram não utilizar nenhum equipamento de proteção individual (EPI).

A jornada de trabalho oscilou de 40 a 48 horas semanal, com horário fixo de trabalho. O tempo de exposição aos solventes foi variável, visto que as atividades não são rotineiras. Entretanto, a exposição pode ter sido intensa pelo não uso dos EPI's e pela duração do tempo de trabalho.

A coleta de sangue foi realizada em jejum e o material acondicionado em tubo com heparina, sendo o plasma separado em duas porções, logo após a coleta das amostras, e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise dos parâmetros clássicos de função hepática e dos ácidos biliares.

**Grupo controle** - Os indivíduos do grupo controle, voluntários não expostos a solventes, com idade média  $\pm$  desvio de  $46,54 \pm 17,38$  anos foram escolhidos aleatoriamente, excluindo os portadores de hepatopatias. A coleta e acondicionamento das amostras foi realizada da mesma maneira em relação aos voluntários expostos.

Fora utilizados kits da Bioclin<sup>®</sup> para a determinação dos parâmetros clássicos de função hepática. O protocolo seguido para cada parâmetro foi o sugerido pelo fabricante dos kits. Para a determinação  $\delta$ -GT, foi utilizado o método cinético e para a a determinação das transaminases e fosfatase alcalina foi

utilizado o método colorimétrico. Os protocolos de análise estão descritos no anexo 4.

### 3.3.2 Reagentes e Solventes

Os solventes utilizados como constituintes de fase móvel (metanol e acetonitrila) foram de grau cromatográfico obtidos respectivamente da Merck KGaA (Darmstadt, Germany) e J. T. Baker (Philipsburg, EUA). O ácido fórmico e ácido acético, utilizados como modificador/aditivo de fase móvel foram obtidos respectivamente da J.T. Baker (Philipsburg, EUA) e Fluka (Buch, Suíça).

Os padrões dos ácidos biliares, ácido cólico (CA) 98%, ácido litocólico (LCA), ácido hiodesoxicólico 98%, ácido ursodesoxicólico 99% (UDCA), ácido glicochenodesoxicólico (GCDCA), ácido glicocólico (GCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido taurochenodesoxicólico (TCDCA), ácido taurocólico (TCA) e ácido taurolitocólico (TLCA) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

O ácido clorídrico (37%) foi obtido da Merck KGaA (Darmstadt, Germany). A água utilizada na preparação das soluções foi purificada no sistema de purificação de água Elga.

Os solventes e reagentes utilizados na otimização da LPME foram o n-octanol e o octanoato de etila obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), e o hidróxido de amônio 28,0 – 30% foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) . O sulfato de sódio anidro utilizado para alterar a força iônica do meio foi obtido da Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Toda a vidraria utilizada foi lavada utilizando detergente neutro, Extran MA 02 da Merck (RJ, Brasil).

#### 3.3.2.1 Preparo de Soluções

As soluções estoque foram preparadas em metanol grau HPLC na concentração de 1,0 g L<sup>-1</sup>. A partir desta solução foram preparadas soluções de trabalho por diluição nas concentrações de 1,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> para a otimização

das condições cromatográficas e do método de extração. Para a validação do método foram feitas por diluição das soluções padrão nas concentrações de 50,0, 125,0, 250,0, 375,0, 500,0, 750,0 e 1000,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  em metanol:água (50:50, v/v). Para a obtenção das amostras controle foram utilizadas as concentrações de 125,0 e 500,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  no mesmo solvente. Todas as soluções foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

O plasma artificial foi preparado em tampão HEPES (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  pH 7,4) contendo 100 mg/dL glicose, 4,0 g/dL albumina, 1,0 g/dL  $\gamma$ -globulina, 170 mg/dL de colesterol, 8,5 mg/dL ácido láctico, 36,6 mg/dL uréia, 5,4 mg/dL ácido úrico e 11,1 mg/dL de glicerol.

### 3.3.3 Equipamentos

- Balança analítica de 0,01 mg de precisão, modelo AX200 da Shimadzu (Columbia, EUA);
- Banho de ultrassom USC 1600 da Unique (Indaiatuba, SP, Brasil) com frequência de 40 kHz e potência de 135 W;
- Pipetas automáticas de diferentes capacidades de volume, Finnpipette<sup>®</sup>, Oxford<sup>®</sup> e Thermo<sup>®</sup>;
- Microseringas de 10,0, 50,0 e 100,0  $\mu\text{L}$  (Hamilton, Reno, EUA);
- Frasco de vidro transparente com tampa de rosca e lacre de polipropileno de capacidade de 2,0 e 10,0 mL (Supelco, Bellefonte, EUA)
- Frasco de vidro com capacidade para 20,0 mL (Supelco, Bellefont, EUA)
- Membrana capilar de polipropileno, Accurel PP Q3/2 (600  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, 0,2  $\mu\text{m}$  de tamanho dos poros e 200  $\mu\text{m}$  de espessura da parede) (Wuppertal, Alemanha)
- Barra de agitação magnética (10,0 x 3,0 mm);
- Frasco de vidro transparente com tampa de rosca e lacre de polipropileno de capacidade de 10,0 e 20,0 mL (supelco, Bellefonte, EUA).
- Estufa Biomatic Aparelhos Científicos Ltda (Porto Alegre, Brasil).

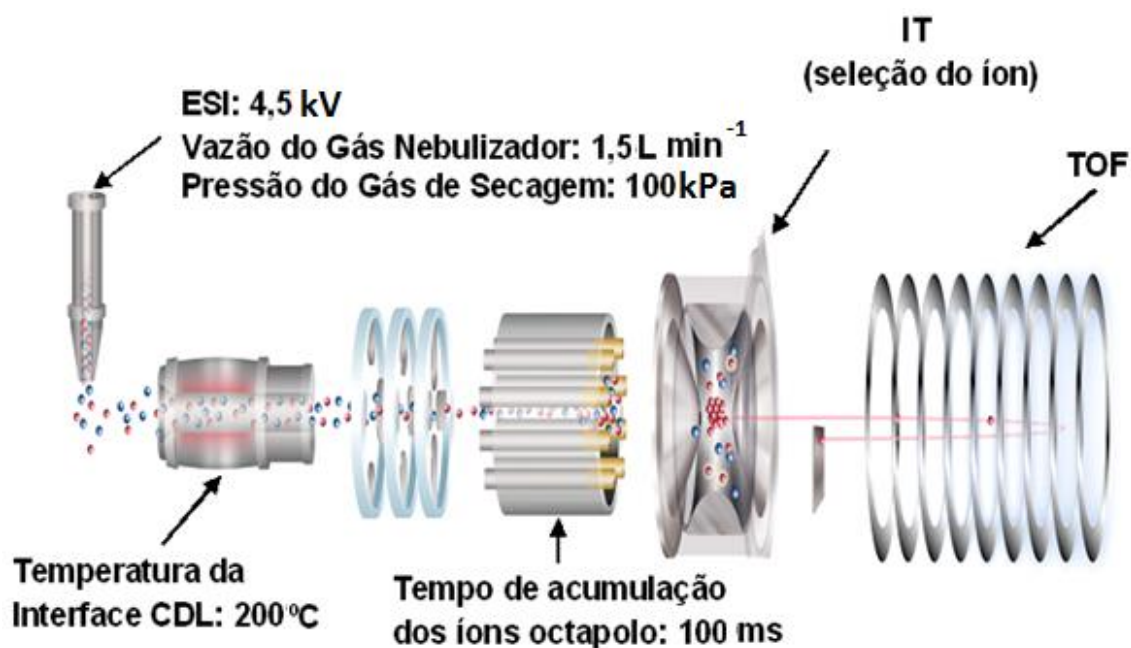


- Agitador magnético com aquecimento e controle de temperatura da marca IKA RHot (Staufen, Alemanha).

### 3.3.4 Análise por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas

A identificação e quantificação dos ácidos biliares foram realizadas por meio de um sistema de cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas híbrido contendo analisadores do tipo *ion trap* e *TOF* em sequência (LCMS-IT-TOF). O cromatógrafo líquido consiste de um sistema Prominence, equipado com bombas binárias, modelo LC-20AD (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e amostrador automático modelo SIL 20AC (Shimadzu Corporation). O espectrômetro de massas (Shimadzu IT-TOF) utilizado neste estudo é equipado com fonte de ionização *electrospray* (modo negativo: -3,5 kV; modo positivo: +4,5 kV). O aparelho possui dois analisadores de massas em série um “*ion trap* (IT)” seguido de um “TOF – *time of flight*”, que confere alta sensibilidade e resolução na obtenção de espectros (Figura 3.4).

Para otimização das condições cromatográficas, trabalhou-se com uma solução-padrão contendo os analitos de interesse, obtida através de diluições sucessivas da respectiva solução-estoque dos ácidos biliares na concentração de 1,0 g L<sup>-1</sup>. A solução de trabalho foi preparada em metanol/água (50:50; v/v) obtendo-se a concentração de 1,0 µg mL<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 1,0 mL foi acondicionado em frascos de vidro e esta solução foi então injetada no módulo de injetor automático no cromatógrafo líquido, alterando as seguintes variáveis: diferentes tipos e composições de fase móvel, (metanol/água, acetonitrila/água, ambas com 0,01; 0,05 e 0,1% de ácido fórmico (J.T.Backer); a vazão da fase móvel; a forma de aquisição dos íons (SCAN - *mass scan range* e SIM - *single ion monitoring*); e o tempo de acumulação dos íons.



(Fonte: Adaptado de Shimadzu, 2007).

**Figura 3.4** - Diagrama esquemático de espectrômetro de massas íon-trap – time-of-flight (MS-IT-TOF).

Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna C<sub>18</sub> ACE (50 mm x 2,1 mm x 3,0 µm de diâmetro de partícula). A fase móvel escolhida foi água (fase A) e metanol (fase B) ambos acidificados com 0,01 % de ácido fórmico. O volume de amostra injetado foi 20 µL e o fluxo da fase móvel igual a 0,2 mL.min<sup>-1</sup>. A corrida cromatográfica foi realizada no modo gradiente onde as razões entre as fases móveis (A/B) foram modificadas da seguinte forma: a proporção de metanol em água variou de 30 a 50 % em 2 minutos. Em seguida, aumentou-se para 65 % de metanol em 3 minutos e estabilizou-se por mais 1,5 minutos. Logo após a estabilização, aumentou-se para 85% em 7 minutos, e depois para 100 % em 1,5 minutos, mantendo em 100% por 3,5 minutos. Finalmente, reduziu-se e estabilizou-se para 30 % de metanol em 4,5 minutos, totalizando 23 minutos de análise cromatográfica.

### 3.3.5 Planejamento Experimental

#### 3.3.5.1 Planejamento Fatorial Completo Aplicado ao Procedimento de Extração por LPME de 2 e 3 Fases

Para o preparo de amostras utilizando a LPME foi realizado um planejamento  $2^3$  (*Full Fatorial Design* – FFD) com ponto central, utilizando os módulos de 2 e 3 fases. As variáveis avaliadas, que interferem no rendimento da extração foram aplicadas de modo idêntico aos dois tipos de fases estudadas e estão descritas na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2** - Parâmetros avaliados no planejamento  $2^3$  com ponto central utilizando sistema de 2 fases (octanol) e 3 fases (octanol/hidróxido de amônia).

Experimento	Tempo (min.)	Adição de sal	pH
1	15 (–)	10% (–)	1 (–)
2	15 (–)	10% (–)	5 (+)
3	15 (–)	30% (+)	1 (–)
4	15 (–)	30% (+)	5 (+)
5	45 (+)	10% (–)	1 (–)
6	45 (+)	10% (–)	5 (+)
7	45 (+)	30% (+)	1 (–)
8	45 (–)	30% (+)	5 (+)
9	30 (0)	20% (0)	3 (0)

### 3.3.5.2 Planejamento Doehlert Aplicado ao Procedimento de Extração por LPME de 2 e 3 Fases

Após o planejamento fatorial completo foi feito um planejamento Doehlert utilizando as variáveis mais significativas. As variáveis avaliadas encontram-se na Tabela 3.3. O modelo foi ajustado por meio da análise de variância (ANOVA) e os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

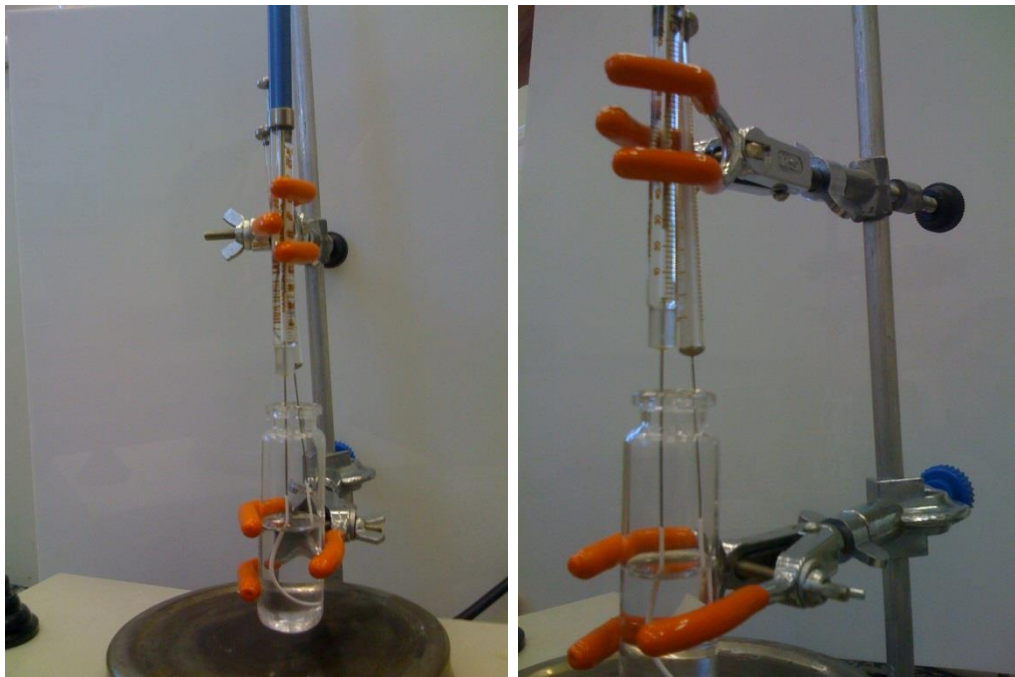
**Tabela 3.3** - Matriz experimental de extração por LPME de duas fases para os ácidos biliares com os valores codificados para o planejamento Doehlert.

Experimento	Tempo (t, min)	pH
1	30 (-0,5)	1 (-0,87)
2	60 (+0,5)	1 (-0,87)
3	75 (+1)	3 (0)
4	60 (+0,5)	5 (+0,87)
5	30 (-0,5)	5 (+0,87)
6	15 (-1)	3 (0)
7	45 (0)	3 (0)
8	45 (0)	3 (0)
9	45 (0)	3 (0)

### 3.3.6 Microextração em Fase Líquida

Para a otimização do método utilizando a LPME, 200,0  $\mu\text{L}$  de plasma fortificado com padrão dos analitos estudados foram adicionados em frasco de vidro de 20,0 mL contendo 17,8 mL de água ultra pura em  $\text{pH}=1$ , foi também adicionado sal de acordo com o planejamento de experimentos. Amostras de plasma (branco) assim como de água ultrapura, foram analisadas para avaliar a presença de interferentes na matriz biológica e a pureza dos reagentes.

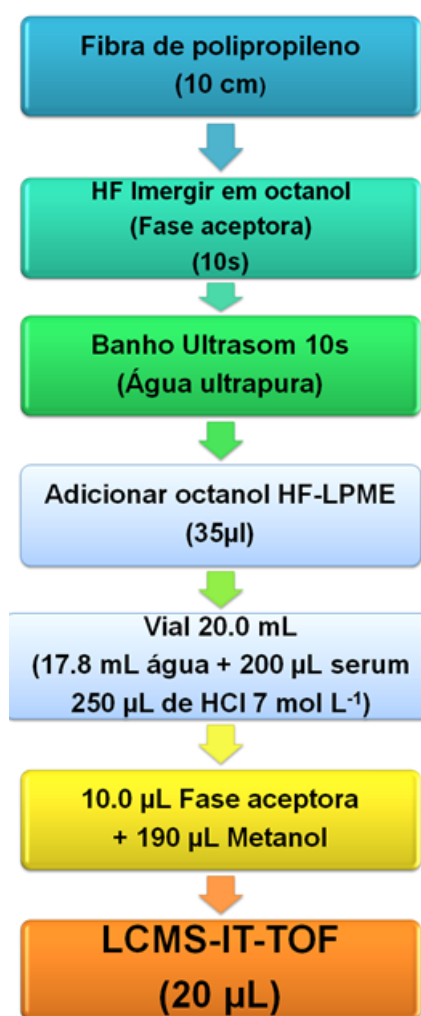
Nos experimentos de validação e aplicação do método a fibra oca foi fixada em agulhas de aço inox em suporte feito por septos de borracha (Figura 3.5)



**Figura 3.5** - Dispositivo de microextração em fase líquida – LPME.

A cada experimento, a fibra oca de polipropileno foi cortada em segmentos de 10,0 cm de comprimento tendo as extremidades fixada em 2 agulhas de micro seringas. A fibra foi imersa em octanol por 10 s para a impregnação dos poros da membrana, sendo em seguida introduzida em um béquer com água e submetida à sonicação por 10 s para a retirada do excesso de solvente. Posteriormente, a impregnação dos poros e retirada do excesso de solvente um volume de 35,0  $\mu\text{L}$  de octanol (fase aceptora) foi introduzido no

interior da fibra. As duas microseringas foram fixadas em suporte e haste metálica e a membrana capilar foi imersa na fase doadora sob agitação magnética (1000 rpm), A fixação da fibra foi feita de modo que as pontas da fibra não ficassem submersas na fase doadora. Após o tempo necessário para a extração, a fase aceptora foi retirada pela microseringa e 10,0  $\mu\text{L}$  foi transferido para um “insert” de vidro contendo 190,0  $\mu\text{L}$  de metanol. Uma alíquota de 20,0  $\mu\text{L}$  foi injetado no LCMS/MS para análises. A figura 3.6 mostra o fluxograma do método para a extração dos ácidos biliares presente no plasma por LPME.



**Figura 3.6** – Fluxograma do método para extração dos ácidos biliares por Microextração em fase líquida (LPME) utilizando o modo de duas fases.

### 3.3.7 Validação do método

Após o planejamento de experimentos para a otimização da extração foi feita a validação do método para a garantia e segurança dos resultados obtidos utilizando o guia da EURACHEM, 2002.

As curvas analíticas foram realizadas em triplicata nas concentrações de 10,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cada um dos ácidos biliares estudados, sendo submetidos ao processo de extração otimizado. A regressão linear assim como os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foram obtidos para as áreas dos picos em função das concentrações. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para a verificação da linearidade das curvas analíticas.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir da média e desvio padrão de 10 análises do branco.

A menor concentração quantificada com precisão inferior a 15% foi considerado o limite de quantificação. Foram avaliadas 10 replicatas de amostras fortificadas com cada um dos ácidos biliares na concentração de 10,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  em plasma. Para o estudo de precisão e recuperação, utilizou-se 10 replicatas das amostras de plasma fortificados nas concentrações de 25,0 e 100,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . As análises das replicatas para o estudo da precisão intraensaio, foram feitas no mesmo dia. O estudo da precisão inter-ensaio foi realizado em 3 dias consecutivos sendo realizada a análise de 10 replicatas. Para o estudo de recuperação dos ácidos biliares nas concentrações estudadas foram determinadas utilizando as curvas analíticas feitas no mesmo dia.

## 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.4.1 Análise Cromatográfica dos Ácidos Biliares

Para a análise cromatográfica utilizando LC-MS-IT-TOF foram avaliados os seguintes parâmetros: composição e vazão da fase móvel, a forma de aquisição dos íons para a melhor resposta. Após a otimização foram obtidas as

seguintes condições: A fonte de *electrospray* operou no modo negativo ionização, com fluxo de gás de nebulização ( $N_2$ ) constante a  $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ; A interface e o CDL (*curved desolvation line*) foram operadas a uma temperatura constante de  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ . A faixa de relação massa/carga ( $m/z$ ) analisada foi de 100 a 600, sendo que o método foi dividido em diferentes segmentos de acordo com o tempo de retenção e a massa exata de cada um dos ácidos biliares no modo de aquisição por monitoramento de íon específico (SIM), conforme descrito na Tabela 3.4.

Geralmente, quando as moléculas são de característica ácida as análises são feitas no modo negativo e a desprotonação da molécula faz com que sejam produzidos íons em maior abundância o que é ideal para a identificação e quantificação dos analitos. Com esse propósito a fonte ionização por *electrospray* operou no modo negativo neste e em outros trabalhos (Bentayeb *et al.*, 2008; Scherer *et al.*, 2009), entretanto a adição de compostos básico na fase móvel não foi utilizada assim como no estudo realizado por Bobeldijk *et al* (2008).

Em outros estudos utilizando a cromatografia líquida para a análise dos ácidos biliares, as colunas utilizadas foram colunas polares de 100 mm utilizando como fase móvel metanol/água (95:5; v/v) com 0,2% (p/v) de formiato de amônia e 0,1% (p/v) de ácido fórmico, de no modo isocrático (Taguchi, Fukusaki e Bamba, 2013). Scherer *et al* (2009) utilizou uma coluna  $C_{18}$  com partículas de  $1,8 \mu\text{m}$  em um gradiente de concentração em pH básico (Scherer *et al.*, 2009). Bentayeb *et al.* (2008) utilizou UPLC com uma coluna  $C_{18}$  de 100 mm e utilizando gradiente de eluição com uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (p/v) (A) e metanol com ácido fórmico (0,1%) em metanol (B) (Bentayeb *et al.*, 2008). Alnouti *et al.* (2008) utilizaram também um gradiente de eluição com 5% acetonitrila em metanol (fase A) e  $7.5 \text{ mmol L}^{-1}$  de acetato de amônia em pH 4 usando  $10 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido acético (fase B) (Alnouti, Csanaky e Klaassen, 2008). A fase móvel utilizada por Bobeldijk *et al.* (2008) foi um gradiente de fase A (5% de metanol em água contendo  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  de

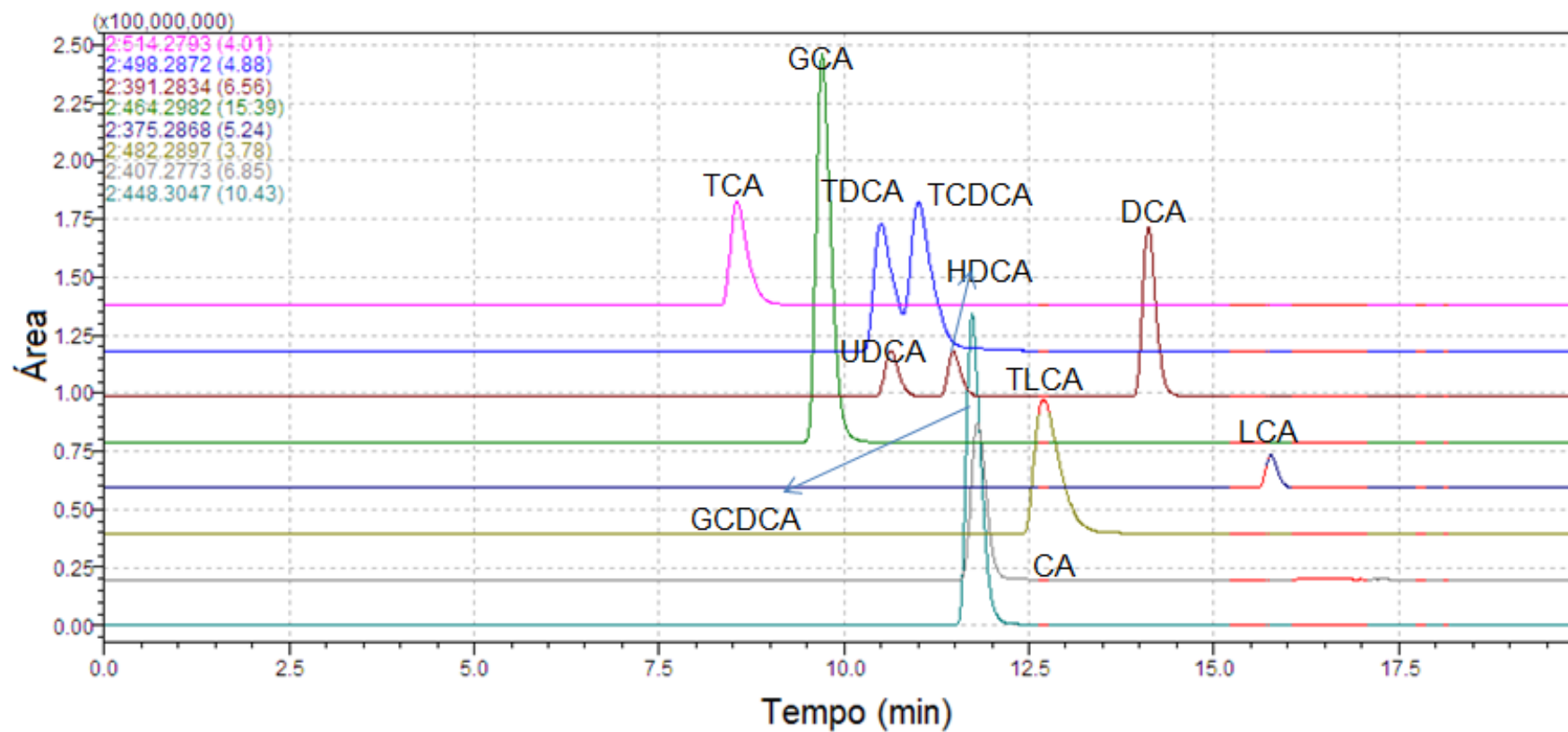


acetato da amônia); fase B (metanol com 2mmol L<sup>-1</sup>) e fase C (acetato da amônia 2mmol L<sup>-1</sup> em IPA-metanol 3:2; v/v).

A Figura 3.7 mostra o cromatograma obtido após a otimização das condições cromatográficas para a análise dos ácidos biliares estudados.

**Tabela 3.4** - Características da separação e análise cromatográfica.

Ácido biliar	Segmento	Tempo Retenção (min)	Modo Aquisição	Tempo Aquisição (min)	Relação m/z (M-H) <sup>-</sup>
	1		SCAN	0 – 6,5	100 - 600
<b>TCA</b>	2	7,392	SIM	6,50 – 8,60	514,2793
<b>GCA</b>	3	8,943	SIM	8,60 – 9,60	464,3012
<b>TDCA</b>		9,688			498,2899
<b>TCDCA</b>		10,216			498,2899
<b>UDCA</b>		10,446			391,2848
<b>HDCA</b>	4	11,306	<u>SIM</u>	9,60 – 12,00	391,2848
<b>GCDCA</b>		11,301			448,3063
<b>CA</b>		11,609			407,2797
<b>TLCA</b>	5	12,044	SIM	12,00–13,50	482,2940
<b>DCA</b>	6	13,951	SIM	13,5 – 15,00	391,2848
<b>LCA</b>	7	15,598	SIM	15,0 – 16,50	375,2899
	8		SCAN	16,5 – 23,00	100 - 600



**Figura 3.7** - Perfil cromatográfico da mistura dos padrões dos ácidos biliares por LC/MS-IT-TOF após a otimização das condições instrumentais.

### 3.4.2 Estudo dos Modos de Extração por LPME

A microextração em fase líquida utilizando fibra oca (HF-LPME) pode ser utilizada em 2 modos, de duas fases e três fases de acordo com as características do(s) analito(s). Os ácidos biliares são compostos de características ácidas (Figura 3.1) e no pH plasmático apresenta-se em maior proporção na sua forma ionizada. Sendo assim, o pH do meio e o modo de duas ou três fases podem apresentar diferentes rendimentos de extração. A extração de compostos ácidos por LPME utilizando o modo de 3 fases será mais efetiva quando a fase aceptora for de característica básica. Os experimentos com o modo de 2 e 3 fases foi feito utilizando como fase aceptora octanol e hidróxido de amônia  $0,15 \text{ mol L}^{-1}$  respectivamente.

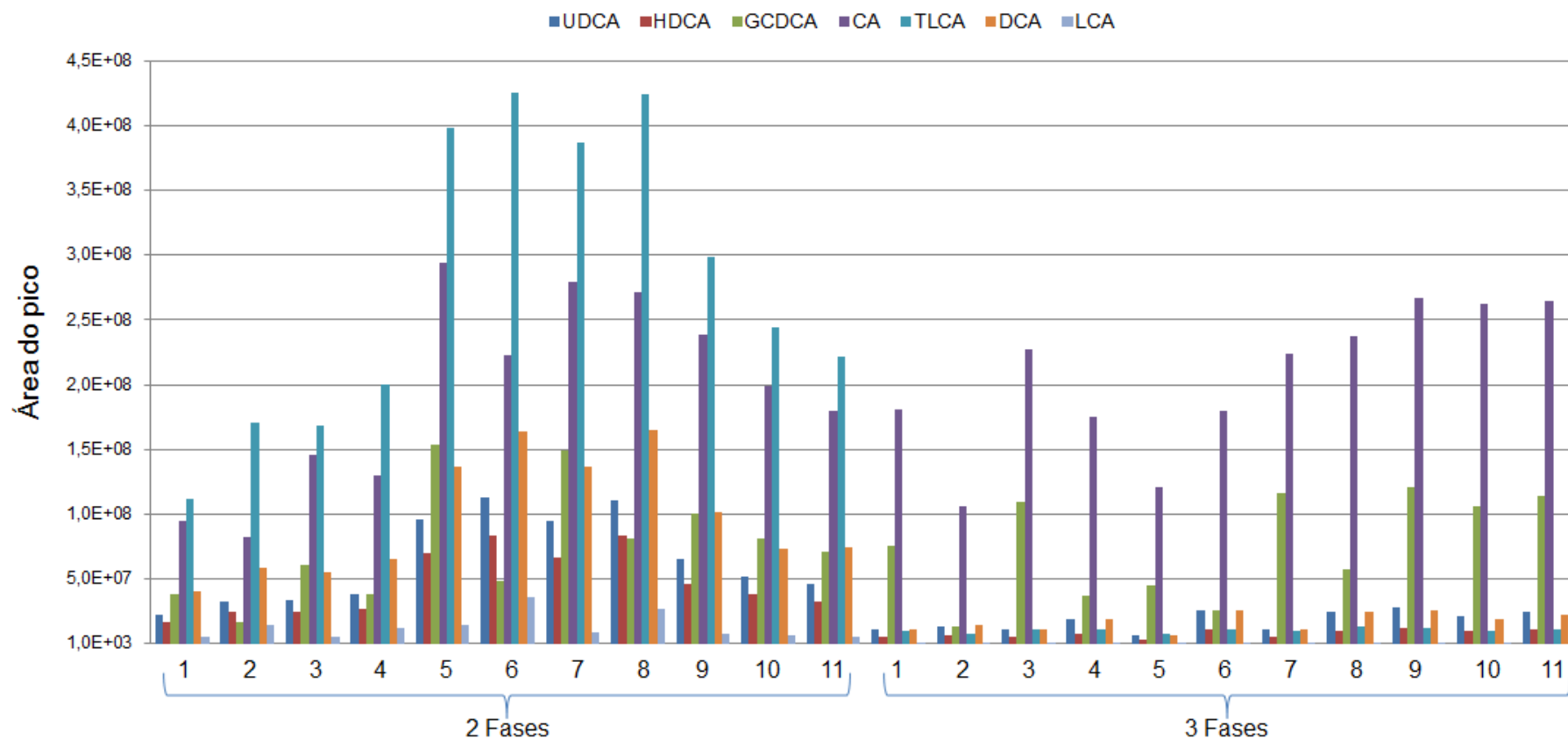
A Figura 3.8 mostra o resultado da extração por LPME usando o modo de duas fases e três fases. Foi feito o teste de comparação das médias da extração de todos os compostos verificando-se que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os resultados de 2 e 3 fases, sendo o rendimento de 2 fases maior para quase todos ácidos biliares estudados. Além do mais o tempo de melhor rendimento para a extração foi de 45 min. Deste modo, o modo de 2 fases foi o escolhido para a extração dos ácidos biliares do plasma.

Após a definição do modo de extração de duas fases, foram testados diferentes solventes (octanol, octanoato de etila e tolueno). O maior rendimento obtido foi para o octanol como fase aceptora.

### 3.5.2. Procedimento de Otimização

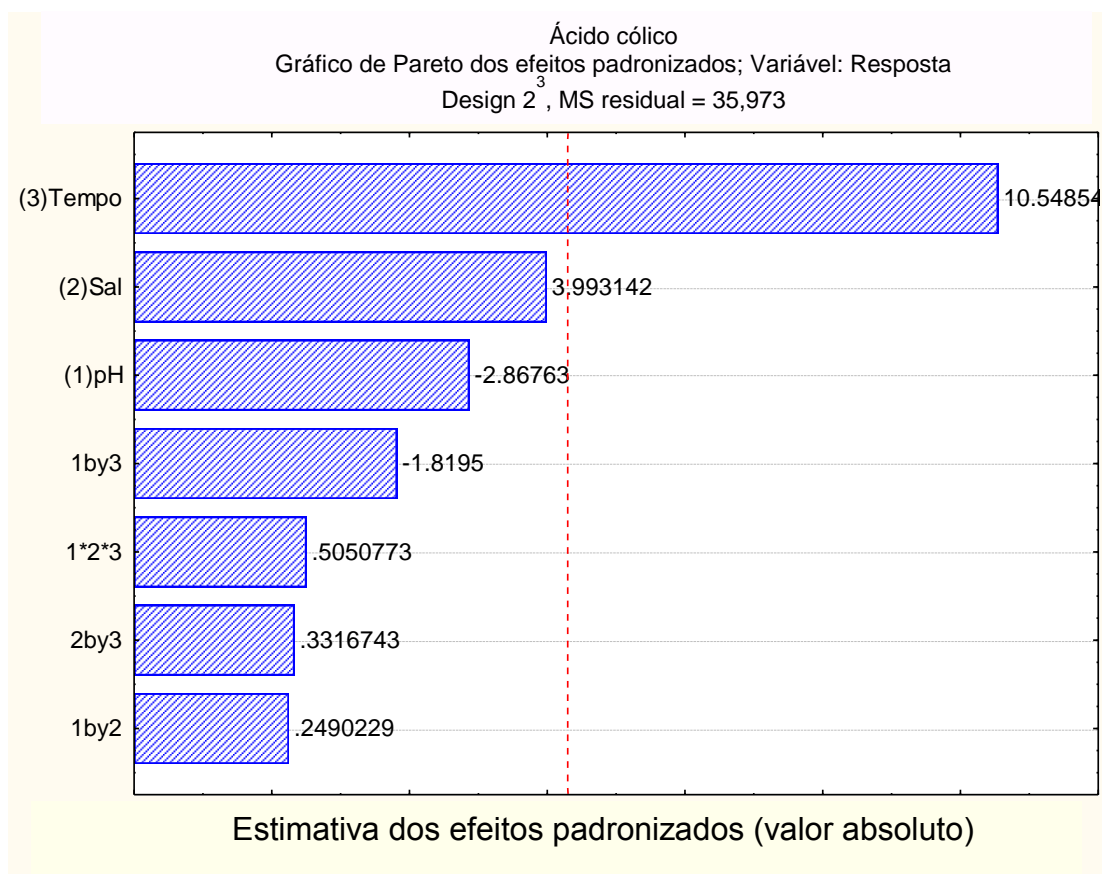
No desenvolvimento do método para extração dos ácidos biliares utilizando a LPME alguns fatores influenciaram o rendimento da extração como: a adição de sais, o ajuste de pH, o solvente e a fase aceptora. Na análise dos resultados dos efeitos, obtidos no planejamento fatorial  $2^3$  utilizando gráficos de Pareto (Figura 3.9), observou-se que o tempo de extração foi a variável que influenciou positivamente o rendimento da extração

para o ácido cólico. A adição de sal, e o pH não apresentaram influência significativa ( $p > 0,05$ ).



**Figura 3.8** - Comparação dos modos de extração de 2 e 3 fases para a extração dos ácidos biliares utilizando como fase aceitadora octanol e hidróxido de amônio 0,15 mol L<sup>-1</sup>.

A adição de sais na amostra pode ser benéfica, principalmente para a extração de compostos mais polares devido ao efeito *salting-out*. Como os ácidos biliares apresentam polaridade e acidez variada este efeito pode aumentar o rendimento da extração. A variação da adição de sal, 10, 20 e 30% de  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , não apresentou influência significativa ( $p > 0,05$ ) no rendimento da extração. Os níveis de pH utilizados neste estudo estavam na faixa ácida, isso contribuiu para que essa variável não apresentasse influência significativa no rendimento. Entretanto, a natureza ácida dos analitos evidencia a necessidade de incluir esta variável em um posterior estudo para a otimização das condições de extração. Por isso foi proposto um planejamento Doehlert para melhor avaliar influencia do pH, e do tempo de extração.



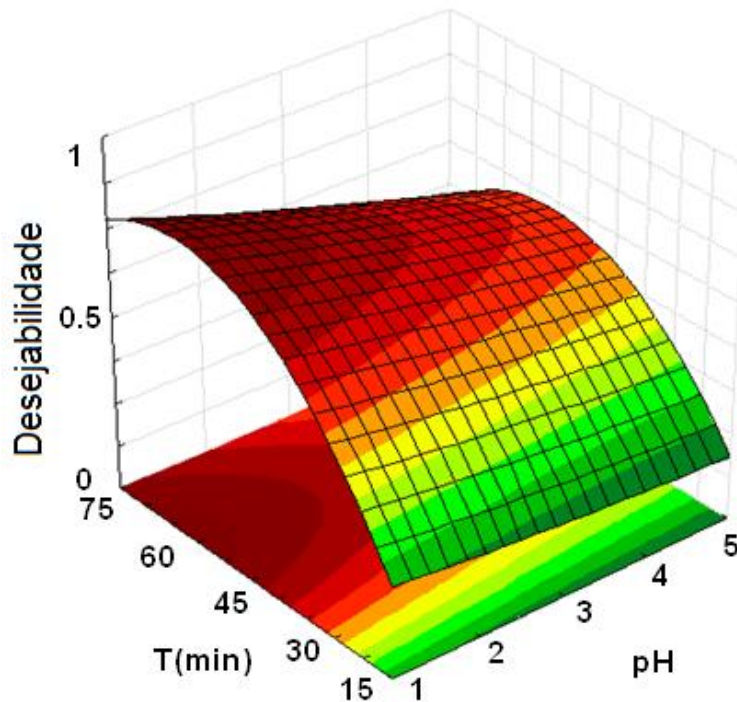
**Figura 3.9** - Gráfico de Pareto obtido após planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central para extração do ácido cólico no plasma por LPME.

Os ajustes foram validados pela análise de variância (ANOVA) e os valores menores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Foram feitas as análises para todos os ácidos biliares que apresentaram o mesmo perfil de resposta para o ácido cólico.

O ajuste do pH do meio de 5 para 1 aumentou em mais 200% o rendimento da extração do ácido taurolitocólico devido ao baixo  $pK_a$  (1,4) deste analito. Entretanto, o aumento do tempo de extração proporcionou o aumento no rendimento (acima de 50%), da extração de todos os analitos com exceção ao ácido taurolitocólico.

Com o objetivo de estabelecer as melhores condições experimentais para a extração de todos os ácidos biliares estudados nesse domínio experimental, foi feito o planejamento Doehlert com as variáveis de tempo de extração e pH, em seguida foi feito o agrupamento de todas as superfícies de respostas em uma única resposta por meio da média geométrica através da função desejabilidade. A Figura 3.10 mostra a superfície de resposta obtida com a função desejabilidade para os ácidos biliares. Valores próximos a 1 são desejáveis para uma melhor rendimento da extração de todos os analitos em estudo. O tempo de extração foi de 60 minutos sendo o pH da fase aceptora igual a 1.

Foi feito também um estudo rendimento de extração em função da adição de modificadores de fase, na fase aceptora. Foram feitas adições de três modificadores: metanol, etanol e acetonitrila, em três diferentes proporções, 0,5; 1,0 e 3,0%.



**Figura 3.10** - Superfície de resposta obtida a partir da desejabilidade dos modelos de regressão para os ácidos biliares.

A utilização destes solventes foi realizada com a finalidade de aumentar a extração dos compostos mais polares como os compostos conjugados com a glicina e taurina como os ácidos taurocólico e glicocólico. No entanto, a adição do modificador não apresentou aumento no rendimento da extração para os compostos conjugados e não conjugados. Além do mais, a adição de acetonitrila promoveu a diminuição do rendimento da extração para todos os compostos.

### 3.4.3 Estudos dos Parâmetros de Mérito

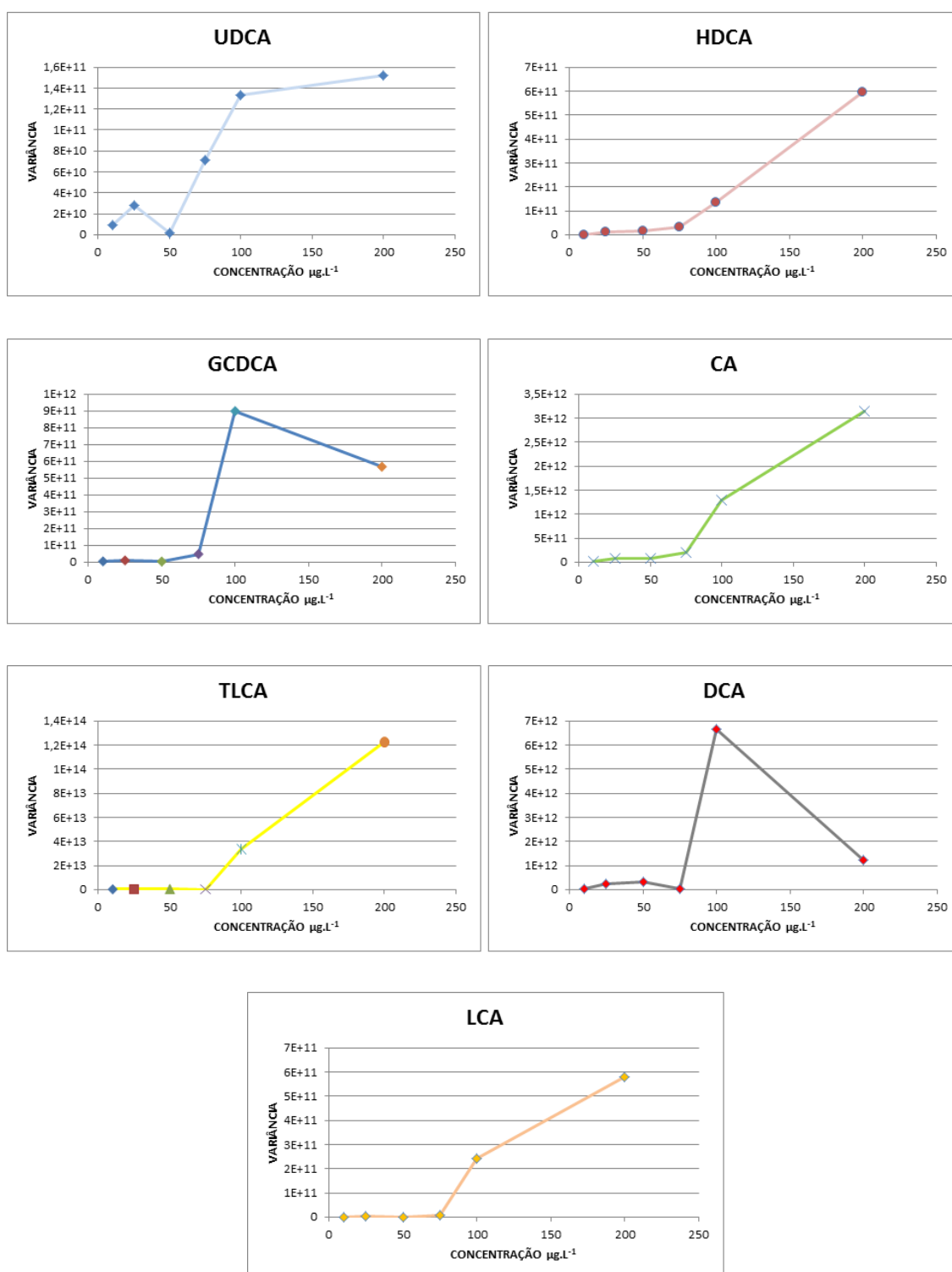
O primeiro parâmetro de mérito avaliado foi a linearidade. Para o estudo da linearidade foram construídas curvas analíticas com 6 (seis) níveis de concentração em triplicata, utilizando o plasma branco adicionado dos analitos no intervalo de concentrações entre 20,6 e 413,9 nmol L<sup>-1</sup>, para o analito de maior massa molar (ácido taurolitocólico) e de 26,5 a 531,5, para o analito de menor massa molar (ácido litocólico). A Figura 3.11 mostra as variâncias das



áreas dos picos das curvas analíticas em função das áreas médias (concentração) para os ácidos biliares. A inspeção visual mostra que não há aleatoriedade na distribuição dos resíduos, indicando heterocedasticidade dos dados. Entretanto o teste de Cochran, no nível de confiança de 95%, indicou que a variância dos resíduos para os ácidos ursodesoxicólico (UDCA) e glicochenodesoxicólico (GCDCA) são iguais, sendo os dados para estes analitos homocedásticos. Após estes resultados foram feitas as regressões lineares para os analitos. Para os compostos que os dados foram homocedásticos foi aplicado o método dos mínimos múltiplos quadrados ordinários (MMQO) e para os que apresentaram heterocedasticidade dos dados o método dos mínimos múltiplos quadrados ponderado (MMQP).

A linearidade foi observada entre a concentração e a área do pico com coeficiente de determinação acima de 0,990 (valor de  $p < 0,05$ ). Os valores do coeficiente de determinação assim como a faixa estudada para cada analito e a equação da reta estão apresentados na Tabela 3.5.

O método desenvolvido permitiu a detecção de concentrações que variaram entre 2,069 a 2,659 nmol L<sup>-1</sup>, o que representa uma quantidade de massa entre 0,1182 e 0,1519 pmol detectada respectivamente. O limite de quantificação variou de 10,35 a 13,29 nmol L<sup>-1</sup>. Os valores para cada analito estão descritos na Tabela 3.6. Os limites de detecção deste trabalho são semelhantes aos encontrados por Kaori *et al.* (2013) onde os ácidos biliares foram extraídos por fluido supercrítico (Taguchi, Fukusaki e Bamba, 2013).



**Figura 3.11** - Variância das áreas em função da área média dos picos para a curva de calibração dos ácidos biliares no plasma por LPME.

**Tabela 3.5** – Faixa de concentração, equação da reta e coeficiente de determinação no estudo da linearidade para os ácidos biliares após a extração por LPME (2 fases) e análise por LC/MS-IT-TOF.

	<b>Composto</b>	<b>Faixa de concentração (nmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Equação da reta</b>	<b>Coeficiente de determinação</b>
<b>1</b>	UDCA	12,75 a 509,0	$y=26611376,17x+236970$	$R^2=0,99837$
<b>2</b>	HDCA	12,75 a 509,0	$Y=28077300X+1036,72943$	$R^2=0,99837$
<b>3</b>	GCDCA	11,13 a 445,0	$Y=46500200X+22067,08822$	$R^2=0,99909$
<b>4</b>	CA	12,25 a 489,0	$Y=50153600X-186773,6764$	$R^2=0,99782$
<b>5</b>	TLCA	10,35 a 413,8	$Y=160013000X-261840,24801$	$R^2=0,99957$
<b>6</b>	DCA	12,75 a 509,0	$Y=45887700X+729279,81968$	$R^2=0,99725$
<b>7</b>	LCA	13,29 a 531,0	$y=9411160x+47100,25442$	$R^2=0,99278$

Entretanto, os valores do LD e LQ foram menores que os encontrados por Scherer *et al.* (Scherer *et al.*, 2009) que encontraram limites de detecção de 40 ng mL<sup>-1</sup> o que representa uma concentração em mol L<sup>-1</sup> 10 vezes maior do que as concentrações obtidas neste trabalho.

**Tabela 3.6** - Limite de detecção e quantificação para os ácidos biliares no plasma utilizando a LPME.

<b>Composto</b>	<b>LD</b>	<b>LQ</b>	<b>%CV</b>
	<b>(nmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>(nmol L<sup>-1</sup>)</b>	
<b>UDCA</b>	2,549	12,75	8,63
<b>HDCA</b>	2,549	12,75	2,99
<b>GCDCA</b>	2,226	11,13	6,23
<b>CA</b>	2,449	12,25	13,65
<b>TLCA</b>	2,069	10,35	12,7091
<b>DCA</b>	2,549	12,75	10,1195
<b>LCA</b>	2,658	13,29	5,7198

A precisão do método foi estudada em duas concentrações diferentes 25,0 µg L<sup>-1</sup> e 100 µg L<sup>-1</sup> com análises intra-ensaio e interensaio. A precisão intra-ensaio, apresentou variação entre 3,32 e 11,93% para a menor concentração e, entre 2,11 e 8,28 % para a maior concentração. A precisão interensaio, feita em 3 dias consecutivos, teve variações entre 5,67 e 12,29% para a menor concentração e 8,99 e 15,98% para a maior concentração. No estudo realizado por Bentayeb *et al.* (2008), os valores da precisão interensaio foram maiores, CDCA (16%), UDCA (19%) e LCA (23%) que os encontrados no presente estudo foi de (UDCA) 10,8 e (LCA) 16%. Os valores da % CV para a precisão intra-ensaio foram semelhantes entre os estudos. Sendo assim, o método LPME-LCMS-IT-TOF desenvolvido para a análise dos ácidos biliares apresenta valores aceitáveis menores do que 20%.

Foi realizado o estudo de recuperação nos mesmos níveis de concentração (25,0 µg L<sup>-1</sup> e 100,0 µg L<sup>-1</sup>) obtendo-se valores entre 89,26% e 100,52% e 99,31 e 107,38% para as menores e maiores concentrações

respectivamente. Os valores de precisão intra e interensaio e as recuperações de cada analito estão descritas na Tabela 3.7.

**Tabela 3.7** - Estudo da Precisão e Recuperação dos ácidos biliares usando o método LPME-LCMS-IT-TOF.

Ácido Biliar	25,0 µg L <sup>-1</sup>			100,0 µg L <sup>-1</sup>		
	Recuperação	Precisão		Recuperação	Precisão	
		Intra-ensaio	Inter-ensaio		Intra-ensaio	Inter-ensaio
	%	% CV		%	% CV	
UDCA	98,0	4,4	10,4	100,7	3,6	10,8
HDCA	97,5	4,1	7,046	99,4	3,6	7,6
GCDCA	100,5	3,3	6,1	101,2	3,6	9,0
CA	93,7	5,3	5,7	100,2	2,1	7,8
TLCA	95,3	3,9	6,7	102,6	4,4	13,8
DCA	97,2	11,9	12,3	107,4	8,3	17,2
LCA	89,3	5,2	8,5	99,3	6,6	16,0

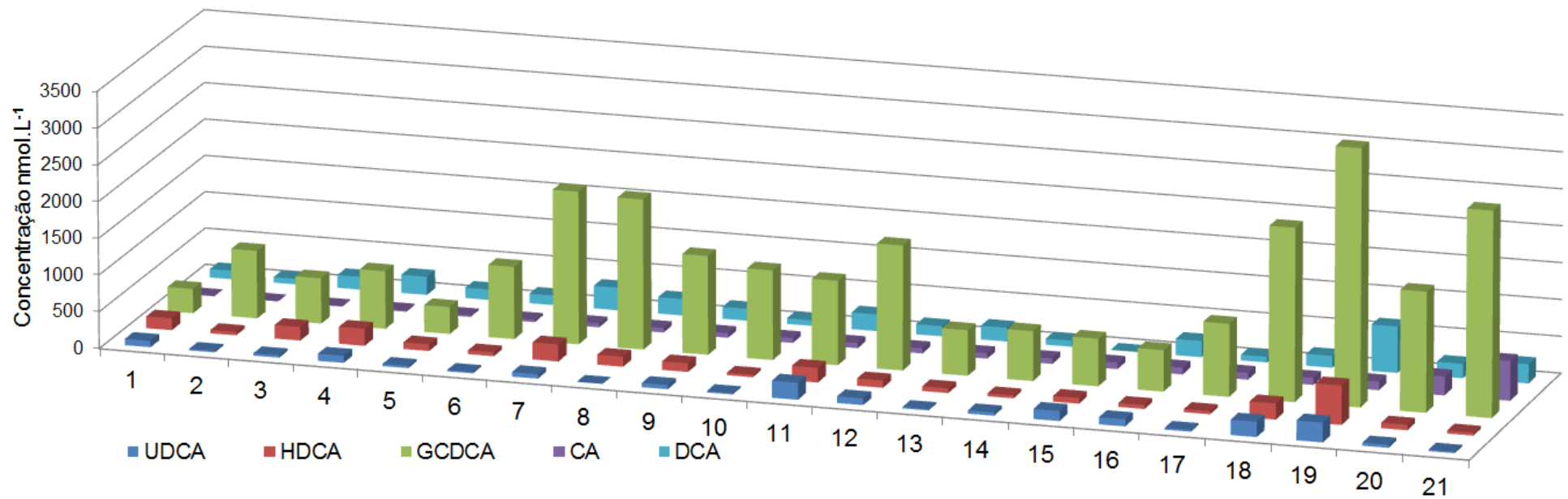
#### 3.4.4 Determinação dos Ácidos Biliares em Sangue de Trabalhadores Expostos a Solventes

Os resultados de cada analito para as amostras dos indivíduos do grupo controle e exposto determinados pelo método desenvolvido utilizando a HF-LPME e LC-MS-IT-TOF estão descritos na Tabela 3.8 e na Figura 3.12. Os valores médios para os ácidos biliares presentes no plasma dos trabalhadores são semelhantes aos valores encontrado no estudo realizado por Scherer *et al.* (2008). Na análise dos parâmetros clássicos de função hepática nenhum valor encontrado nas amostras dos indivíduos exposto e controle foi maior que os valores de referencia preconizado.

A análise ao nível de confiança de 95% mostra que existe diferença significativa entre os indivíduos do grupo controle e exposto para o ácido cólico ( $p=0,023$ ). Entretanto não há diferença significativa entre os dois grupos para os outros ácidos biliares e para todos os parâmetros clássicos de função hepática realizados. Em estudo anterior realizado por Paiva *et al.* (2005) foi observada uma diferença significativa nos valores encontrados para os ácidos biliares totais e para a fosfatase alcalina, entre os indivíduos do grupo exposto e controle (De Paiva e De Siqueira, 2005). A diferença pode ser explicada tanto pela alteração de alguns ácidos biliares em relação a outros, como pela não determinação de todos os ácidos biliares presentes no plasma, visto que na análise espectrofotométrica que foi realizada, os ácidos biliares são determinados como ácidos biliares totais e não individualmente.

**Tabela 3.8** - Medidas descritivas para as concentrações dos ácidos biliares (nmol/L) e parâmetros clássicos de função hepática nos grupos exposto e controle.

Ácidos Biliares nmol L <sup>-1</sup>	Grupo Controle		Grupo Exposto		Scherer (2008)
	Média±Desvio	Min - Max	Média ± Desvio	Min - Max	Min - Max
<b>UDCA</b>	60,05 ± 64,41	1,34 - 232,01	94,71 ± 85,50	18,18 - 276,10	21,0 – 330,0
<b>HDCA</b>	134,98 ± 73,01	34,35 - 232,24	124,21 ± 153,22	39,51 - 533,48	30,0 – 670,0
<b>GCDCA</b>	1076,73 ± 585,18	331,19-2079,00	1556,47 ± 1059,38	561,01 3580,66	470,0 – 3210,0
<b>CA</b>	36,98 ± 26,88	3,72 - 69,75	149,53 ± 147,21	69,84 - 537,87	53,0 – 680,0
<b>DCA</b>	171,97 ± 73,96	76,55 - 309,51	196,10 ± 171,10	2,04 - 631,37	58,0 – 1320,0
<b>Parâmetros de função hepática</b> U.L <sup>-1</sup>					VR
<b>AST (TGO)</b>	20,10 ± 16,73	5,81 a 58,14	15,12 ± 16,49	5,81 a 58,14	
<b>ALP (TGP)</b>	26,97 ± 14,07	11,62 a 58,14	18,62 ± 9,02	5,8 a 34,92	
<b>G-GT</b>	11,51 ± 11,18	4,42 a 42,0	15,17 ± 12,85	2,95 a 44,20	
<b>FA</b>	37,22 ± 14,86	20,10 a 71,36	32,28 ± 12,05	19,53 a 56,90	



**Figura 3.12** - Distribuição das concentrações dos ácidos biliares nmol L<sup>-1</sup> nas amostras de plasma de indivíduos do grupo controle (1 a 11) e do grupo exposto (12 a 21).



### 3.5 CONCLUSÕES

O método HF-LPME-LCMS/IT/TOFMS que foi desenvolvido neste trabalho é uma alternativa para o preparo e análise dos ácidos biliares no plasma.

O planejamento de experimentos utilizando a função desejabilidade permitiu a otimização do modo de extração por 2 fases, usando octanol como fase aceptora em extrações de 60 min em pH 1.

O método proposto apresenta parâmetros de mérito adequados, pois apresenta excelente linearidade, baixos limites de detecção e de quantificação, e alta precisão e recuperação

A análise dos ácidos biliares também mostrou condições satisfatórias para o emprego na sua avaliação nos indivíduos expostos e não expostos a solventes.

### 3.6 REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS

- ALNOUTI, Y.; CSANAKY, I. L.; KLAASSEN, C. D. **Journal of Chromatography B**, v. 873, n. 2, p. 209-217, 2008.
- BATTA, A. K.; SALEN, G. **Journal of Chromatography B**, v. 723, n. 1-2, p. 1-16, 1999.
- BENTAYEB, K. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 869, n. 1-2, p. 1-8, 2008.
- CHENG, X.; BUCKLEY, D.; KLAASSEN, C. D. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 11, p. 1665-1676, 2007.
- DE PAIVA, M. J. N.; DE SIQUEIRA, M. **Biomarkers**, v. 10, n. 6, p. 456-463, 2005.
- FINI, A.; FEROCI, G.; RODA, A. **Polyhedron**, v. 21, n. 14-15, p. 1421-1427, 2002.
- GRIFFITHS, W. J.; SJOVALL, J. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 1, p. 23-41, 2010.

- HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. **Analyst**, v. 127, n. 5, p. 608-613, 2002.
- HUANG, S. P.; CHEN, P. S.; HUANG, S. D. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 20, p. 4347-4353, 2009.
- IIDA, T. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1057, n. 1-2, p. 171-176, 2004.
- IIDA, T. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 689, n. 1, p. 77-84, 1995.
- JONSSON, J. A.; MATHIASSEN, L. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 318-325, 1999.
- JONSSON, J. A.; MATHIASSEN, L. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 325-334, May 1999.
- KUMAR, B. S. *et al.* **Analytical Biochemistry**, v. 408, n. 2, p. 242-252, 2011.
- LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. **Journal of Chromatography A**, v. 1072, n. 1, p. 55-61, 2005.
- MAJORS, R. E.; JONSSON, J. A.; MATHIASSEN, L. **Lc Gc North America**, v. 21, n. 5, p. 424, 2003.
- MASHIGE, F. *et al.* **Clinical Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 1352-1356, 1981.
- PEDERSEN-BJERGAARD, S.; HO, T. S.; RASMUSSEN, K. E. **Journal of Separation Science**, v. 25, n. 3, p. 141-146, 2002.
- PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 565-574, 2003.
- RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 1-10, 2004.
- RASMUSSEN, K. E. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 873, n. 1, p. 3-11, 2000.
- RASMUSSEN, K. E. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 873, n. 1, p. 3-11, 2000.
- RODA, A.; PIAZZA, F.; BARALDINI, M. **Journal of Chromatography B**, v. 717, n. 1-2, p. 263-278, 1998.
- SCHERER, M. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 30, p. 3920-3925, 2009.
- TAGUCHI, K.; FUKUSAKI, E.; BAMBA, T. **Journal of Chromatography A**, v. 1299, p. 103-109, 2013.

**CAPITULO 4 - DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM  
AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA  
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA.**

## 4.1 REVISÃO DA LITERATURA

A determinação quantitativa dos metabólitos nos sistemas biológicos é muito importante para o diagnóstico de doenças como diabetes, câncer, doença de Alzheimer e Parkinson (Tortorella, Aragona e Nussdorfer, 1999; Zhang *et al.*, 2004; Fonteh *et al.*, 2007; Sheikh-Ali *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2009; Ooi *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012) e os aminoácidos são substâncias muito utilizadas para esta finalidade (Kouremenos *et al.*, 2010; Stoop *et al.*, 2010). A análise qualitativa e quantitativa dos aminoácidos nos fluídos corpóreos podem ser utilizadas como indicadores precoces de doenças neurológicas (Zhang *et al.*, 2004; Toczyłowska *et al.*, 2006; Fonteh *et al.*, 2007; Kouremenos *et al.*, 2010; Stoop *et al.*, 2010) assim como podem também ser utilizadas para determinar os erros inatos do metabolismo (Toczyłowska *et al.*, 2006).

A análise dos aminoácidos nos fluídos corpóreos é frequentemente realizada utilizando métodos cromatográficos (Waterval *et al.*, 2009; Kvitvang *et al.*, 2011; Visser *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2012) sendo o método de referencia a cromatografia líquida de troca iônica usando derivatização com Ninidrina e detecção UV (Leboucher *et al.*, 1997). Outros métodos de cromatografia líquida descritos utilizaram os detectores de arranjo de fotodiodos e de fluorescência (Schwarz, Roberts e Pasquali, 2005), sistema de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (LC-ESI-MS/MS)(Piraud, Vianey-Saban, Bourdin, *et al.*, 2005; Piraud, Vianey-Saban, Petritis, *et al.*, 2005; Kaspar *et al.*, 2009; Stoop *et al.*, 2010) e a espectrometria de massas sequencial. (UPLC-MS/MS)(Waterval *et al.*, 2009; Visser *et al.*, 2011). Entretanto, as determinações utilizando a cromatografia líquida podem necessitar de um maior tempo de análise (Visser *et al.*, 2011) com um maior custo (Kaspar *et al.*, 2009) e com menor sensibilidade (Waterval *et al.*, 2009).

Por outro lado, a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa é considerada um técnica de referência para análise de metabólitos devido às várias vantagens técnicas, como boa separação, alta sensibilidade, robustez e bibliotecas numerosas (Vallejo *et al.*, 2009; Kvitvang *et al.*, 2011; Ooi *et al.*, 2011).

Quando os metabólitos de interesse presentes nas amostras não são voláteis a derivatização dos analitos é necessária (Kopka, 2006; Liebeke, Wunder e Lalk, 2010; Mandalakis, Apostolaki e Stephanou, 2010; Waldhier *et al.*, 2010). Vários reagentes são utilizados para derivatização, incluindo cloroformato de metila, heptafluorobutanol e anidrido trifluoroacético (Kaspar *et al.*, 2008; Waldhier *et al.*, 2010; Kvitvang *et al.*, 2011).

Entre as reações de derivatização, a reação de sililação é normalmente utilizada. A piridina é utilizada com finalidade de desprotonar o sítio de derivatização em moléculas ácidas e é adicionada antes do reagente sililante (Wishart *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Kouremenos *et al.*, 2010). A reação de sililação para a derivatização dos aminoácidos envolve a reação simultânea dos grupos amino e carboxila em uma única etapa. Para a reação acontecer de maneira completa, evitando a formação de múltiplos compostos o aquecimento é fundamental. Este aquecimento pode ser feito de maneira convencional ou utilizando um forno de micro-ondas. Comparando a derivatização usando aquecimento por micro-ondas em relação ao aquecimento convencional, as micro-ondas proporcionam um menor tempo de reação, uma melhor resposta relativa e resulta em menor presença de artefatos na análise de diversos compostos como aminoácidos, açúcares e ácidos graxos. Entre essas vantagens a maior delas é o tempo reduzido de aquecimento (Kouremenos *et al.*, 2010). Existem poucos métodos de cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC/MS) utilizando a sililação descritos para a análise de aminoácidos em fluidos biológicos. Os métodos GC/MS para análise de aminoácidos utilizando outros reagentes de derivatização apresentam boas resoluções, entretanto aminoácidos que são importantes no diagnóstico de doenças neurológicas, como o ácido glutâmico e do triptofano, não são detectados (Waldhier *et al.*, 2010), e a serina e treonina não são quantificadas com confiabilidade, devido a interações secundárias (interconversão) entre estes analitos (Kaspar *et al.*, 2009).

## 4.2 OBJETIVO

Desenvolver e validar um método confiável e robusto para análise dos aminoácidos em amostras biológicas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas usando procedimento de derivatização alternativo por micro-ondas.

### 4.2.1 Objetivos Específicos

- Otimizar as condições cromatográficas (temperatura do forno e fluxo da fase móvel) para obter uma boa resolução para os 16 aminoácidos estudado.
- Padronizar a derivatização dos aminoácidos usando forno de micro-ondas como fonte de aquecimento;
- Desenvolver um procedimento de derivatização por silição mais simples e rápido que possa ser aplicado para diversas matrizes biológicas;
- Desenvolver metodologia analítica para a determinação de aminoácidos em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes.

## 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.3.1 Reagentes

- Água ultra-pura obtida de sistema Elga (SP, Brasil)
- Detergente neutro, Extran MA 02 neutro da Merck (RJ, Brasil);
- Hélio N-50, Air Products (Mogi das Cruzes, SP, Brasil), com 99,999% de pureza;
- Nitrogênio gasoso da Air Products (Mogi das Cruzes, SP, Brasil), com 99,999% de pureza;
- Cloreto de metileno e acetona grau HPLC, Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

- Padrões dos aminoácidos L-alanina, L-glicina, sarcosina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina, L-serina, L-treonina, L-ácido aspártico, L-metionina, L-prolina, L-cisteína, L-ácido glutâmico, L-fenilalanina, L-asparagina, L-lisina e L-Tirosina obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA);
- Metanol grau HPLC obtido da Merck KGaA (Darmstadt, Germany);
- BSTFA (*N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) + TMCS (trimetil cloro silano) (99:1 v/v), obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA);
- Piridina anidra (99.8% m/m) obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA);
- Cloridrato de metoxamina (98% m/m) obtido da Fluka (St. Louis, MO, EUA);
- Reagentes de grau analítico: cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato monobásico de potássio, bicarbonato de sódio, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, 4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazina etanosulfônico (HEPES) e glicose foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA);

#### 4.3.1.1 Preparo de Soluções

As soluções estoque de cada um dos aminoácidos foram preparadas na concentração inicial de  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  em metanol e estocadas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . As soluções de trabalho foram preparadas na concentração de  $10,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  em metanol. Estas soluções foram utilizadas para otimizar o procedimento de derivatização utilizando como aquecimento o forno de micro-ondas. Estas soluções foram estocadas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Foi preparada uma solução aquosa contendo todos os aminoácidos na concentração de  $15,0 \text{ mg L}^{-1}$  para o grupo 1 (L-alanina, sarcosina, L-glicina, L-serina, L-leucina e L-isoleucina e L-valina);  $30,0 \text{ mg L}^{-1}$  para o grupo 2 (L-treonina, L-ácido aspártico, L-metionina, L-prolina, L-cisteína, L-ácido glutâmico e L-fenilalanina) e  $40,0 \text{ mg L}^{-1}$  para o grupo 3 (L-asparagina, L-lisina e L-tirosina); para os estudos de validação do método.

A solução artificial de líquido cefaloraquidiano foi preparada em tampão HEPES ( $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) contendo  $127,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  NaCl,  $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  KCl,  $1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $26,0 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ ,  $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ ,  $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  e  $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de glicose com o borbulhamento de uma mistura de 95% v/v  $\text{O}_2$  e 5% v/v  $\text{CO}_2$ .

#### 4.3.2 Equipamentos

- Balança analítica resolução 0,01 mg, modelo AX200 da Shimadzu (Columbia, EUA);
- Banho de ultrassom USC 1600 da Unique (Indaiatuba, SP, Brasil) com frequência de 40 kHz e potência de 135 W;
- Pipetas automáticas de diferentes capacidades de volume, Finnpipette<sup>®</sup>, Oxford<sup>®</sup> e Thermo<sup>®</sup>;
- Microseringas de 10,0  $\mu\text{L}$  (Hamilton, Reno, EUA)
- Frasco de vidro transparente com tampa de rosca e lacre de polipropileno de capacidade de 2,0 e 10,0 mL (Supelco, Bellefonte, EUA)
- Agitador de tubos Vortex, modelo AP 56 (Phoenix, São Paulo, Brasil)
- Agitador magnético Ika (Staufen, Alemanha);
- Forno de micro-ondas Electrolux 18 L (faixa de potencia de 10 a 700 Watts);

#### 4.3.3 Programas Computacionais

- LabSolution da Shimadzu Corporation, para aquisição e processamentos dos dados do GC/MS;
- Origin versão 8.0 da OriginLab Corp. (EUA) para verificação da normalidade dos dados, testes de hipóteses, e curvas de calibração;



- Statistica versão 7.0 da Statsoft Inc.(Tulsa, EUA) para processamento dos planejamentos experimentais.

#### 4.3.4 Sistema Cromatográfico

Foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu modelo GC-2010 acoplado a espectrômetro de massas do tipo simples quadrupolo, modelo QP-2010, (Kyoto, Japão). A separação cromatográfica foi feita em coluna capilar Rt<sub>x</sub>-5MS (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano - Restek) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. O gás de arraste utilizado foi o gás Hélio com 99.999% de pureza a um fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A programação do forno foi a seguinte: temperatura inicial de 80° C com aquecimento de 8° C/min até 200° C, seguido de um aumento de temperatura a uma taxa de 30° C/min até 300° C, mantida por 3 min.

As amostras (alíquota de 1,0 µL) foram injetadas manualmente com microseringa Hamilton de 10,0 mL. O injetor operou a 280° C do modo *splitless* por 3 min. Seguido no modo *split* a uma taxa de 1:20.

A fonte de íons operou a temperatura de 200° C e a interface GC/MS foi mantida a 260° C. O espectrômetro de massas operou no modo impacto de eletrons (EI) a 70 eV. A análise foi realizada simultaneamente no modo de varredura (full scan 45-300 m/z) e no modo específico para cada íon SIM (single ion monitoring). A quantificação foi realizada usando os íons de m/z especificados na Tabela 4.3. O processamento e aquisição de dados foi feito pelo software LabSolution da Shimadzu.

#### 4.3.5 Planejamento Experimental

Para otimizar a derivatização utilizando micro-ondas foi realizado um estudo com um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> (*Full Fatorial Design* – FFD) para investigar as seguintes variáveis: tempo de derivatização (t), a potência do forno de micro-ondas (P), e a quantidade de reagente utilizado na derivatização. Os níveis mínimos e máximos dos parâmetros foram

selecionados com base em protocolos que utilizam derivatização dos aminoácidos e micro-ondas como fonte de aquecimento (Schwarz, Roberts e Pasquali, 2005; Kaspar *et al.*, 2008). Tendo em vista o rápido aquecimento utilizando as micro-ondas, potências elevadas e um longo tempo de aquecimento poderia causar degradação dos aminoácidos. Por outro lado, pequenas quantidades de reagentes derivatizantes poderiam não ser suficientes para promover uma completa reação de derivatização.

Foi feito ainda um planejamento Doehlert utilizando as variáveis mais significativas no planejamento fatorial completo, com o objetivo de atingir a região ótima da área investigada. O modelo foi ajustado por meio da análise de variância (ANOVA) e os valores foram considerados significativos para  $p < 0,05$ . Quando aplicado à duas variáveis, o planejamento Doehlert requer a execução de sete experimentos (Campaña, A. M. G. *et al.* 1997). A resposta experimental (Y) em função das variáveis (X1 e X2) é dada pela equação 1:

$$Y = b_0 + b_1 (X_1) + b_2 (X_1)(X_1) + b_3 (X_2) + b_4 (X_2)(X_2) + b_5 (X_1)(X_2) \quad (1)$$

onde  $b_0$  é o termo constante,  $B_1$  e  $B_3$  são os coeficientes dos termos lineares,  $B_2$  e  $B_4$  são os coeficientes para os termos quadrático e  $b_5$  é o coeficiente de interação entre os dois fatores. O ajuste do modelo foi validado pela análise de variância (ANOVA). Os valores de  $p$  menores que 0,05 foram considerados significativos. Entretanto, devido a este procedimento utilizar testes de resposta múltipla, foi usada a função desejabilidade para obter uma condição satisfatória e simultânea entre todas as respostas. Esta aproximação é definida como a média geométrica das desejabilidades individuais. A função de desejabilidade transforma uma resposta estimada em um valor sem escala, chamada de desejabilidade ( $d_i$ ). A desejabilidade é um valor entre 0 e 1, e aumenta à medida que o valor de resposta correspondente torna-se mais desejável (referencia). A desejabilidade geral (D), é um outro valor entre 0 e 1, que representa a média geométrica dos valores individuais de desejabilidade ( $d_i$ ):

$$D = (d_1 d_2 \dots d_n)^{1/n} \quad (2)$$

Os valores das variáveis experimentais estudadas no planejamento  $2^3$  estão apresentados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** - Matriz experimental da derivatização dos aminoácidos com os valores codificados entre parênteses para o planejamento fatorial  $2^3$ .

Ensaio	Tempo de derivatização	Potencia do micro-ondas	Quantidade de reagente derivatizante
1	2(-1)	140(-1)	40(-1)
2	2(-1)	140(-1)	100(+1)
3	2(-1)	280(+1)	40(-1)
4	2(-1)	280(+1)	100(+1)
5	4(+1)	140(-1)	40(-1)
6	4(+1)	140(-1)	100(+1)
7	4(+1)	280(+1)	40(-1)
8	4(+1)	280(+1)	100(+1)
9	3(0)	210(0)	70(0)
10	3(0)	210(0)	70(0)
11	3(0)	210(0)	70(0)

As condições experimentais para o planejamento Doehlert para os valores reais e codificados de cada fator são mostradas na tabela 4.2.

**Tabela 4.2** - Matriz experimental da derivatização dos aminoácidos com os valores codificados para o planejamento Doehlert.

Ensaio	Tempo de derivatização (t, min)	Potencia do micro-ondas (P, Watts)
1	2,5 (-0,5)	140 (-0,87)
2	3,5 (+0,5)	140 (-0,87)
3	4 (+1)	210 (0)
4	3,5(+0,5)	280 (+0,87)
5	2,5 (-0,5)	280(+0,87)
6	2 (-1)	210 (0)
7	3 (0)	210 (0)
8	3 (0)	210 (0)
9	3 (0)	210 (0)

O ponto central foi feito em triplicata e foi utilizado para estimar o erro experimental.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico Statistica 8.0 para Windows a partir StatSoft Inc. (Tulsa, OK, EUA).

#### 4.3.6 Preparo de Amostra e Processo de Derivatização

Uma alíquota de 200,0 µL do líquido cefalorraquidiano foi transferida para um tubo de polipropileno de 2,0 mL tipo Eppendorf e a este tubo foram adicionados 800,0 mL de metanol à temperatura de -10 ° C. A mistura foi agitada vigorosamente durante 1 min em agitador de tubos tipo vortex e após centrifugada a 10.000 rpm durante 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, 200,0 µL do sobrenadante foi transferido para um frasco para evaporação do solvente à temperatura ambiente sob fluxo de nitrogênio. Para a diminuição do resíduo de sal, a centrifugação foi realizada sob refrigeração (4°C) e a amostra diluída foi eluída em coluna contendo resina de troca iônica. Após a evaporação do solvente, 15,0 mL da solução de metoxamina em piridina na concentração de 20,0 mg mL<sup>-1</sup> e 35,0 µL de BSTFA com TMCS foram adicionados a tubo de vidro, o qual foi fechado, agitado em vórtex durante 30 s e aquecido em um forno de micro-ondas doméstico de 700 W de potência, equipado internamente com um suporte giratório. Para as amostras que apresentaram respostas superior a faixa linear foram diluídas 1:10 para posterior análise. Em todos os experimentos, o frasco foi colocado sempre no mesmo lugar do prato para garantir que a irradiação fosse uniforme em todos os experimentos. Inicialmente, uma série de experimentos com diferentes potências e tempos foram realizados para avaliar a resposta, reprodutibilidade, e velocidade de análise.

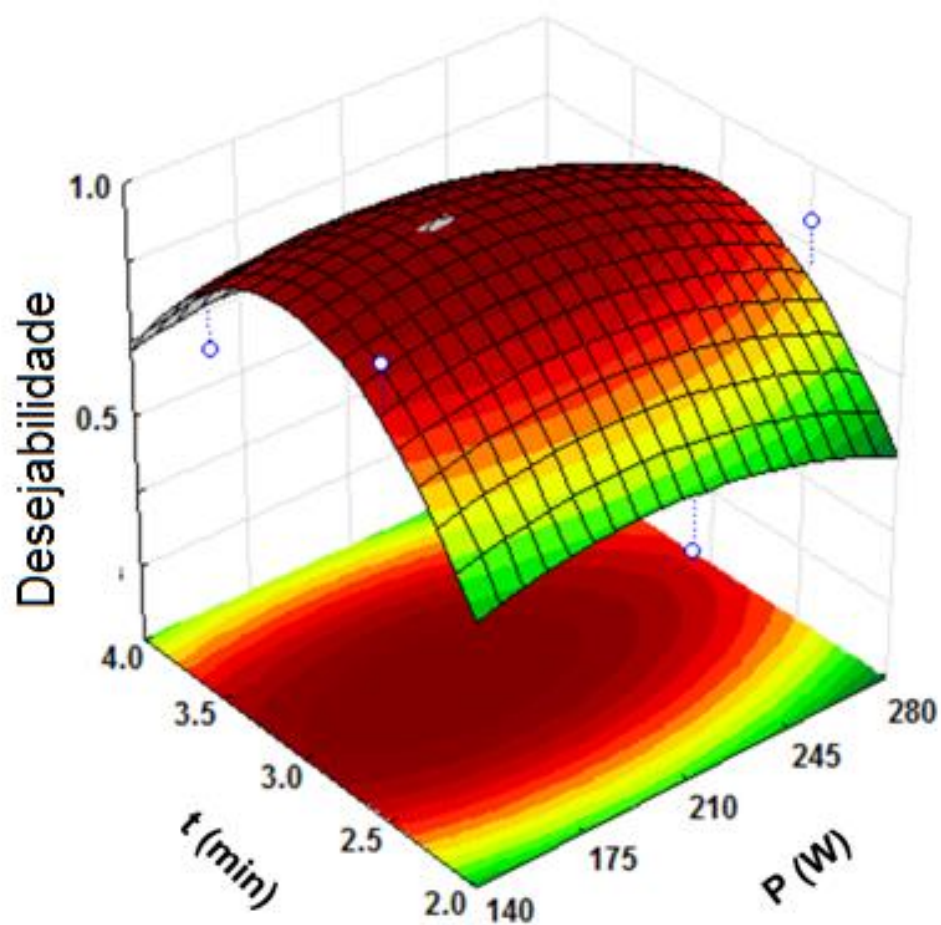
#### 4.3.7 Coleta das Amostras Biológicas

As amostras de líquido cefalorraquidiano foram coletadas por punção lombar de 16 pacientes hospitalizados na Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte. Os pacientes apresentavam suspeita de infecção f com sintomas característicos de meningite criptocócica, e aguardavam resultado microbiológico para o início da terapia supressiva antimicrobiana. A coleta das amostras seguiu o protocolo proposto que teve aprovação do comitê de ética (protocolo n° 082/2010).

## 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1 Procedimento de Otimização

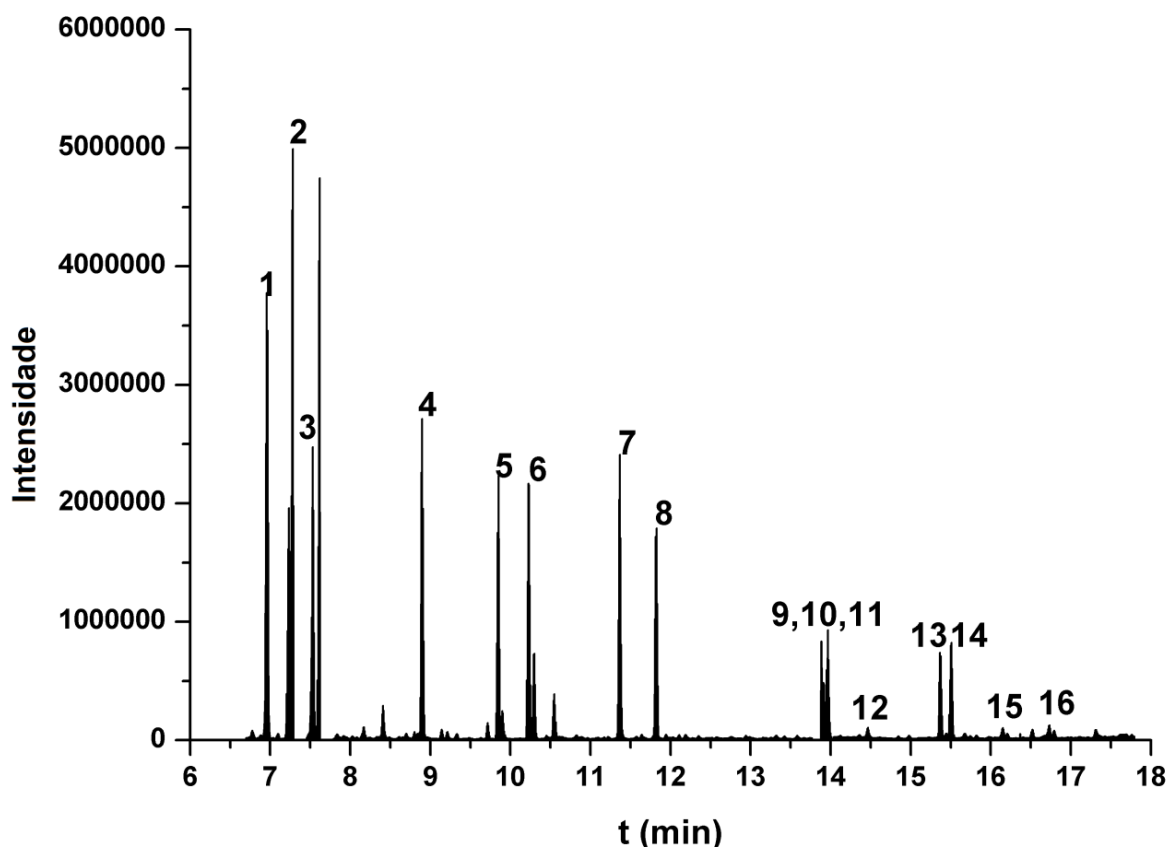
Na análise dos resultados dos efeitos, obtidos no planejamento utilizando gráficos de Pareto, observou-se que o tempo de derivatização e a potência utilizada no micro-ondas apresentaram efeito significativo. Porém, a quantidade de reagente de derivatização (BSTFA + 1% TCMS) não apresentou efeito significativo sobre o rendimento da derivatização dos aminoácidos (para um valor de  $p < 0,05$ ). Para os aminoácidos de menor massa molar (L-alanina, L-glicina, sarcosina, L-valina, L-serina e L-treonina) o tempo de derivatização apresentou menor influência que para os aminoácidos de maior massa molar. Além disso, foi observada uma interação significativa entre o tempo e a potência de micro-ondas para a reação de derivatização dos aminoácidos. Por esta razão, estes dois parâmetros foram usados no planejamento Doehlert, e a quantidade de reagente de derivatização foi ajustada para 50,0  $\mu\text{L}$ . Uma estimativa dos coeficientes ( $b_0$ - $b_5$ ) do modelo polinomial de segundo grau indicado pela Equação 1 foi realizada com as respostas experimentais do planejamento Doehlert. O nível de significância para cada regressão foi calculado pela análise de variância e os resultados mostraram que os modelos se adequam bem. As superfícies de resposta obtidas a partir de modelos de regressão de cada analito foram então combinados na função desejabilidade, onde a média geométrica das respostas foi calculada. A função desejabilidade pode ter um valor que varia de 0 (indesejável) a 1 (desejável). A Figura 4.1 mostra a superfície de resposta após a aplicação da função desejabilidade para todos os aminoácidos de acordo com o tempo de derivação e da potência de micro-ondas.



**Figura 4.1** - Representação das superfícies de resposta obtidas a partir da função de desejabilidade dos modelos de regressão dos aminoácidos.

As condições desejadas para a derivatização de todos os aminoácidos estudados foram 3 min e potencia de 210 W.

A Figura 4.2 mostra o cromatograma obtido, usando as condições otimizadas.



**Figura 4.2** - Perfil cromatográfico da mistura de L-aminoácido ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em aCSF após a derivatização utilizando BSTFA + 1% TCMS por GC/MS.

Após estabelecidas as condições ideais de derivatização e de separação cromatográfica foram definidos os íons a serem utilizados para a identificação e quantificação de cada um dos aminoácidos. A Figura 4.3 mostra as estruturas e os espectros de massas de alguns aminoácidos estudado após a reação de derivatização com BSTFA + 1% TCMS.

A Tabela 4.3 mostra os tempos de retenção, e os íons ( $m/z$ ) escolhidos para a identificação e quantificação.

Para avaliar a presença de interferentes provenientes da presença de proteínas plasmática foi feita a filtração do extrato em diferentes condições. Os resultados do estudos para avaliar a interferência de resíduos de proteínas e da interferência dos sais presente no líquido cefalorraquidiano está apresentado na Figura 4.4.



**Tabela 4.3** – Tempo de retenção, m/z dos íons e suas intensidades e íons utilizados para a quantificação dos aminoácidos por GC/MS

No	Aminoácido	Tempo de retenção	m/z dos íons (intensidade)	Quantificação íons (m/z)
1	L-Alanina	7,64 ± 0,02	116(100)+73(53,6)	116
2	Glicina	7,42 ± 0,01	102(100)+73(68,4)	102
3	Sarcosina	7,86 ± 0,02	116(100)+73(52)	116
4	L-Valina	9,21 ± 0,02	144(100)+ 73(40,6)	144
5	L-Leucina	10,13 ± 0,02	158(100)+73(42,4)	158
6	L-Isoleucina	10,53 ± 0,02	158(100)+73(50,4)	158
7	L-Serina	11,64 ± 0,02	73(100)+204(75,2)	204
8	L-Treonina	12,09 ± 0,02	73(100)+218(46,0)	218
9	L-Metionina	14,16 ± 0,02	176(100)+128(60,0)	176
10	L-Ácido Aspartico	14,18 ± 0,02	73(100)+232(81,2)	232
11	L-Prolina	14,25 ± 0,02	156(100)+73(53,6)	156
12	L-Cisteina	14,71 ± 0,02	73(100)+220(88,8)	220
13	L-Ácido Glutâmico	15,63 ± 0,03	246(100)+128(32,4)	246
14	L-fenilalanina	15,77 ± 0,02	218(100)+192(71,2)	218
15	L-Asparagina	16,43 ± 0,03	116(92,40)+231(51,2)	231
16	L-Lisina	16,80 ± 0,03	84(100)+156(55,6)	156

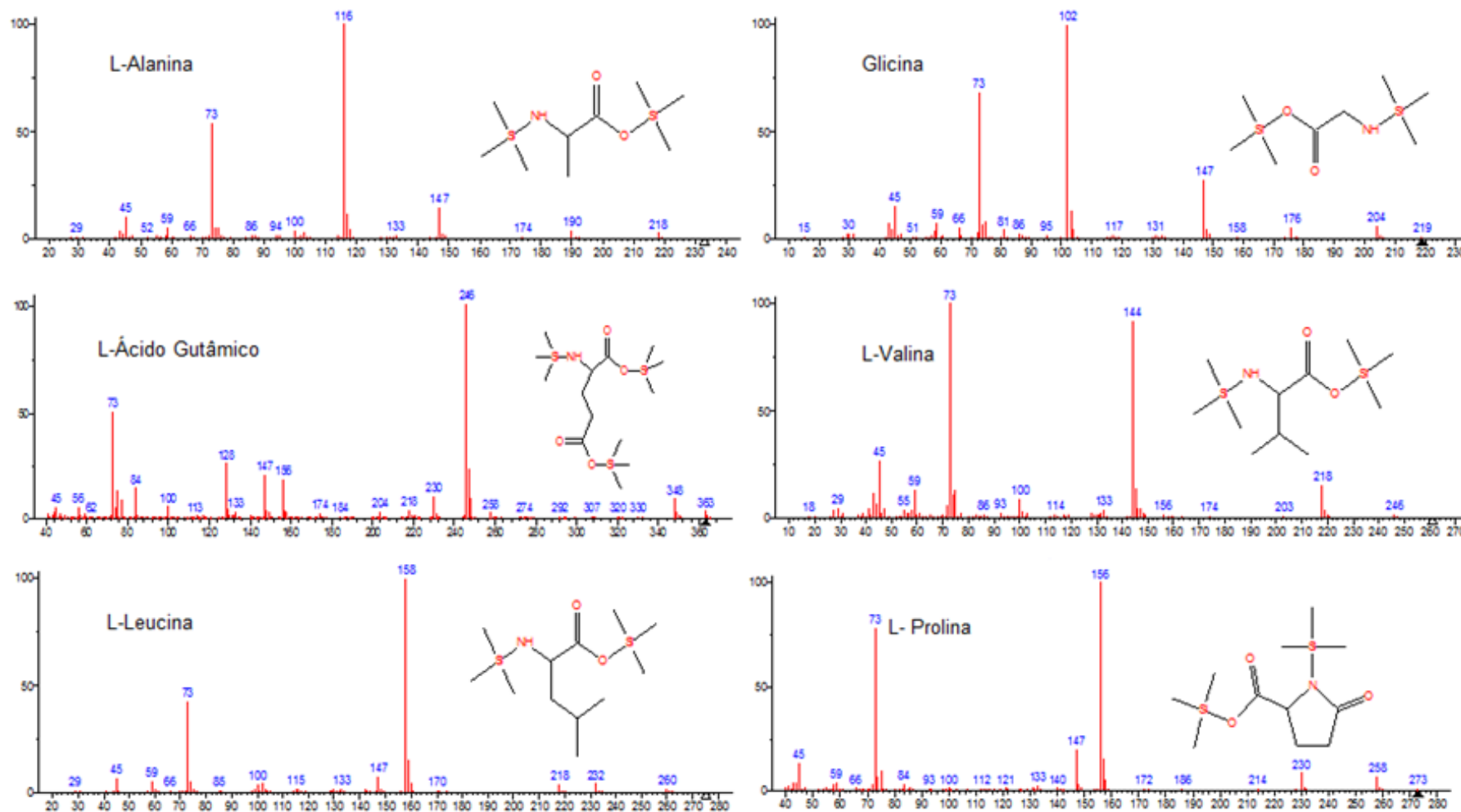
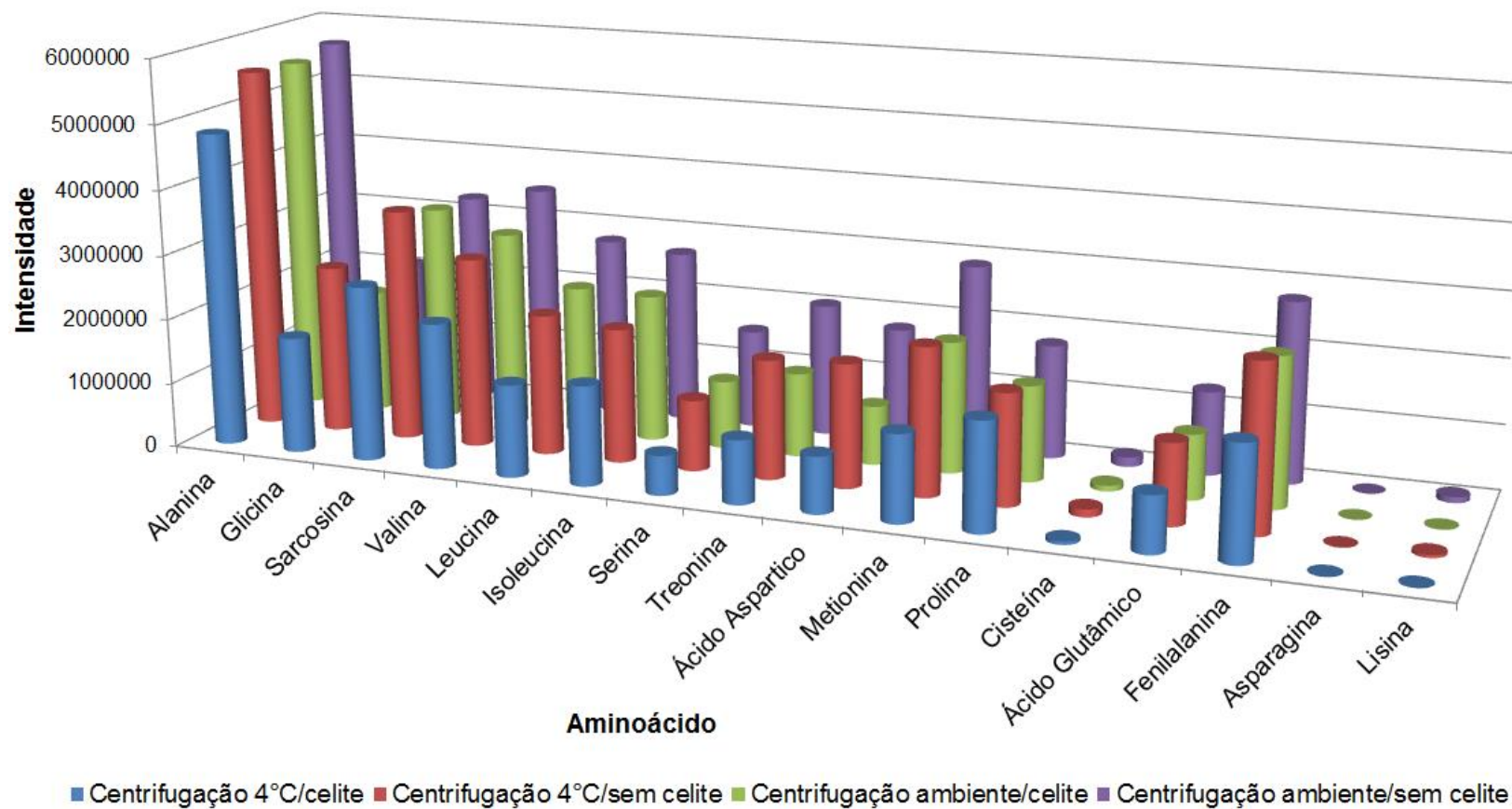


Figura 4.3 - Espectro de massas e estrutura dos aminoácidos siliados após a silição e análise por GC/MS.



**Figura 4.4** - Comparação do rendimento da derivatização em relação a centrifugação sob refrigeração e filtração.

A condição de melhor rendimento foi obtida com adição de metanol a -10 °C), centrifugação à temperatura ambiente sem eluir a mistura em colunas de resina de troca iônica.

#### 4.4.2 Estudo de parâmetros de mérito do método

Após a otimização das condições para a derivatização foi feito o estudo para avaliar a linearidade do método, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para os diferentes aminoácidos estudados. Para o estudo da linearidade foram construídas curvas analíticas com 6 (seis) níveis de concentração em triplicata, utilizando aCSF adicionado dos analitos no intervalo de concentração entre 0,1 e 133,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Foram avaliadas as variâncias das áreas dos picos da curva analíticas em função das áreas médias, sendo constante a distribuição das variâncias para todos os analitos. A homocedasticidade dos dados foi confirmada pelo teste *F* no nível de confiança de 95%. Diante da homocedasticidade das respostas instrumentais, os modelos lineares foram construídos para as curvas analíticas pelo método dos mínimos quadrados ordinário. A resposta instrumental encontrada para os aminoácidos foi linear na faixa de concentrações estudada, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) acima de 0,990 (valor de  $p < 0,05$ ) exceto para a cisteína que apresentou  $R^2 = 0,975$ .

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir de 10 medidas consecutivas do branco, segundo as recomendações da Eurachem. O LD encontrado para os aminoácidos foi de 0,01  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (L-ácido Glutâmico), e 4,24  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (L-lisina). Os limites de detecção de todos os compostos estão apresentados na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4** – Coeficiente de determinação, equação da reta, limites de detecção e limites de quantificação para os aminoácidos por GC/MS após derivatização assistida por micro-ondas.

N°	Aminoácido	(R <sup>2</sup> )	Equação	LD (μmol L <sup>-1</sup> )	LQ (μmol L <sup>-1</sup> )
1	L-Alanina	0,9947	y = 1.806,856x - 555,256	0,38 ± 0,02	0,64 ± 0,03
2	Glicina	0,9906	y = 1.409,631x - 730,369	0,40 ± 0,02	0,66 ± 0,03
3	Sarcosina	0,9934	y = 1.375,310x - 560,214	0,33 ± 0,02	0,54 ± 0,03
4	L-Valina	0,9927	y = 1.240.296x - 553,944	0,18 ± 0,01	0,30 ± 0,02
5	L-Leucina	0,9900	y = 502577x - 54795	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,01
6	L-Isoleucina	0,9939	y = 887696x - 678291	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01
7	L-Serina	0,9917	y = 1.197.722x - 671,758	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,01
8	L-Treonina	0,9931	y = 487062x - 218300	0,36 ± 0,01	0,60 ± 0,02
9	L-Metionina	0,9976	y = 462093x - 286107	0,12 ± 0,01	0,20 ± 0,02
10	L-Ácido Aspartico	0,9928	y = 289232x - 165100	0,10 ± 0,01	0,17 ± 0,01
11	L-Prolina	0,9915	y = 502577x - 54795	1,05 ± 0,12	1,74 ± 0,20
12	L-Cisteina	0,9750	Y = 1720x + 427,5	2,43 ± 0,36	4,04 ± 0,60
13	L-Ácido Glutâmico	0,9955	y = 423916x - 281816	0,010 ± 0,001	0,02 ± 0,01
14	L-fenilalanina	0,9911	y = 534014x - 430841	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,01
15	L-Asparagina	0,9934	Y = 37772x + 201,98	0,12 ± 0,02	0,19 ± 0,03
16	L-Lisina	0,9957	Y = 40832x + 45595	4,24 ± 0,60	7,07 ± 0,96

**Tabela 4.5** – Valores da recuperação e precisões intra e inter-ensaio para os derivados sililados dos aminoácidos por GC/MS.

N°	Aminoácido	Recuperação (%)	Precisão (%)	
			Intraensaio	Inter-ensaio
1	L-Alanina	102 ± 5	5,08	11,39
2	Glicina	110 ± 5	4,41	15,46
3	Sarcosina	98 ± 6	6,08	18,71
4	L-Valina	115 ± 7	6,36	13,08
5	L-Leucina	121 ± 14	11,98	16,46
6	L-Isoleucina	117 ± 12	10,11	17,74
7	L-Serina	125 ± 9	7,07	19,06
8	L-Treonina	128 ± 5	4,12	17,07
9	L-Metionina	126 ± 5	8,61	18,48
10	L-Ácido Aspartico	123 ± 11	4,19	17,06
11	L-Prolina	119 ± 14	6,09	6,36
12	L-Cisteina	128 ± 16	15,04	18,22
13	L-Ácido Glutâmico	129 ± 9	7,58	17,88
14	L-fenilalanina	121 ± 8	6,48	18,13
15	L-Asparagina	97 ± 14	15,30	17,78
16	L-Lisina	88 ± 12	15,59	17,58

Os limites de quantificação (LQ) encontrados variaram de 0,02 a 7,07  $\mu\text{mol L}^{-1}$  também para o ácido glutâmico e lisina, respectivamente.

O estudo de recuperação foi feito adicionando padrões dos aminoácidos ao aCSF nas concentrações de 0,10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 10,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 100,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os valores das concentrações encontradas, para cada uma das adições, foram

calculados utilizando as curvas analíticas em aCSF. A precisão encontrada para cada um dos aminoácidos variou de 88,5 a 129%. Os valores da precisão e recuperação estão descritos na Tabela 4.5. Os mesmos valores de concentração foram utilizados para o estudo de precisão.

A precisão intraensaio (10 replicatas no mesmo dia) variou de 4,12 a 15,59%. A precisão intermediária (5 replicatas em 3 dias consecutivos) apresentou valores entre 6,36 a 18,71%. Os valores da %CV de cada um dos aminoácidos para o estudo de precisão são mostrados na Tabela 4.5 e são semelhantes aos valores encontrados para outros estudos (Wishart *et al.*, 2008; Waldhier *et al.*, 2010). A Tabela 4.6 mostra uma comparação do método desenvolvido com outros métodos encontrados na literatura para análise de aminoácidos em fluídos biológicos.

O método proposto apresenta diversas vantagens como menor tempo para o procedimento de derivatização em relação à derivatização utilizando aquecimento convencional, limites de quantificação inferiores aos níveis esperados para os aminoácidos em fluídos biológicos e cultura de células e baixo custo. O método otimizado mostrou também boa precisão, com um intervalo de recuperação maior que os métodos presentes na literatura. Os compostos analisados no método são utilizados para o diagnóstico de diversas patologias. Entretanto os aminoácidos arginina e histidina não foram analisados devido à instabilidade térmica de seus derivados.

**Tabela 4.6** - Comparação das figuras de mérito entre o método desenvolvido e os métodos para análise de aminoácidos encontrados na literatura.

Referencia	Derivatização (tempo)	Método	LOQ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Precisão (reprodutibilidade)	Exatidão (recuperação)	Número de analitos analisados	Matrizes	Tempo de análise
Schwarz <i>et al.</i> 2005	OPA-3MPA <sup>1</sup>	HPLC/DAD	12(citrulline) 423(glutamate)	1,6 – 5,9%	90 - 110%	23	Plasma	130 min
Kaspar <i>et al.</i> 2009	iTRAQ (30 min)	LC-MS/MS	0,5 – 50	$\leq 18,34\%$	91 - 106%	20 L-AA	Urina	25 min
Kaspar <i>et al.</i> 2009	PCF <sup>2</sup> (30 min)	GC/MS	0,3 – 30	$\leq 21,18\%$	98 – 111%	18 L-AA	Urina	20 min
Waldhier <i>et al.</i> 2010	MeOH/MCF <sup>3</sup>	GC-MS Rt- $\gamma$ DEXsa column	0,07 – 31,25	$\leq 5\%$	87,2 – 119,3%	10 L-AA	Plasma e urina	42 min
Waterval <i>et al.</i> 2009	Sem derivatização	UPLC-MS/MS	40 – 287	6 – 10%	90 – 100%	22 L-AA	Plasma e urina	30 min
Visser <i>et al.</i> 2011	s-(NIFE) <sup>4</sup> (20 min)	UPLC-MS/MS	No report	3 - 18% CSF	85,5 – 102,6%	19 D-AA	LCR, Plasma e urina	25 min
Present study	BSTFA <sup>5</sup> (3 min)	GC/MS	0,02 – 7,07	6,4 – 18,7%	88 – 129%	16 L-AA	LCR	21 min

1 - *o*-fitalaldeído/3 ácido mercaptopropionico

2 – Propilcloroformato

3 – Metanol/etilcloroformato

4 – Solução de tetraborato de sódio em acetonitrile e ácido clorídrico

5 - N,O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida



#### 4.4.3 Análise de Aminoácidos em Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

O método validado utilizando MAD-GC/MS foi utilizado para analisar os aminoácidos em amostras de LCR humano que apresentaram resultado positivo para o diagnóstico de HIV. Foram feitas análises de LCR de 16 pacientes hospitalizados e os resultados das análises estão mostrados na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7** - Concentração média e faixa de concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) nas amostras de LCR humano (n=16).

	Aminoácido	Mediana	Faixa de concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
1	L-Alanina	19,94	10,70 – 81,91
2	Glicina	6,88	5,59 – 14,41
3	Sarcosina	4,86	4,08 – 10,14
4	L-Valina	9,32	6,70 – 51,65
5	L-Leucina	6,70	5,02 – 29,59
6	L-Isoleucina	4,15	3,35 - 7,03
7	L-Serina	7,92	6,14 – 13,06
8	L-Treonina	7,58	4,52 – 10,55
9	L-Metionina	10,43	9,91 – 20,53
10	L-Ácido Aspartico	6,21	6,18 – 12,39
11	L-Prolina	375	155,58 – 480,18
12	L-Cisteina	1046,72	550,27 – 2590,45
13	L-Ácido Glutâmico	13,00	8,22 – 16,58
14	L-fenilalanina	4,80	2,83 – 16,80
15	L-Asparagina	1,10	0,25 – 3,90
16	L-Lisina	10,37	9,74 – 20,47

Os resultados indicam que o método pode ser utilizado na análise quali e quantitativa dos aminoácidos presente no LCR. Atualmente, na base de dados do metaboloma de LCR de humanos, 308 metabólitos são identificados. Entre esses compostos estão um número significativo de metabólitos que são neurotransmissores, incluindo os aminoácidos excitatórios como gaba e glutamato. A maioria dos compostos apresentam tamanho inferior a 400 Da, que é compatível com a capacidade de moléculas atravessarem a barreira hematoencefálica. Todos os 16 aminoácidos estudados foram encontrados nas amostras analisadas em concentrações médias que variaram entre 1,10 a 1046,72  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , em concentrações elevadas para a L-cisteína, L-prolina e L-alanina.

A L-cisteína apresentou concentrações entre 550,27 a 2590,45  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , enquanto a L-asparagina apresentou menores valores, de 0,25 a 3,90  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . As amostras de LCR analisadas foram de pacientes com diagnóstico positivo de HIV, que apresentam infecções criptocócica confirmadas ou aguardando confirmação. Os valores elevados de L-cisteína podem ser devido a presença de toxinas devido a infecções presentes nesses pacientes como a meningites meningocócica. Os valores encontrados para os outros aminoácidos são semelhantes aos valores encontrados em outros estudos.

#### 4.5 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicam que a derivatização assistida por micro-ondas (MAD), utilizando como derivatizante o BSTFA e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas GC / MS é uma técnica alternativa viável para a determinação das concentrações de aminoácidos em amostras biológicas. O planejamento fatorial utilizando um modelo  $2^3$  e um planejamento Doehlert utilizando a função de desejabilidade foram usadas para a otimização das condições de derivatização apresentando resultados satisfatórios. A derivatização foi realizada em uma única etapa, o que limita a utilização de reagentes, e resultando num tempo de análise curto. O método desenvolvido apresentou excelente linearidade, repetibilidade e precisão, e, os limites de quantificação e de detecção são compatíveis com as

concentrações dos aminoácidos presente nos fluídos biológicas. O método validado foi aplicado com êxito para a análise de L-aminoácidos em amostras de líquido cefaloraquidiano humano em pacientes com diagnóstico positivo para AIDS. O protocolo de análise proposto é um método promissor que pode ser usado no LCR e também para análise de aminoácidos em outros fluidos biológicos como a urina, o soro e tecidos, no diagnóstico laboratorial de patologias.

#### 4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A, J. *et al.* **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 24, p. 8086-8094, 2005.
- BECKER, S. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 883–884, n. 0, p. 68-75, 2012.
- CAMPAÑA, A. M. G. *et al.* **Analytica Chimica Acta**, v. 348, n. 1–3, p. 237-246, 1997.
- FONTEH, A. N. *et al.* **Amino Acids**, v. 32, n. 2, p. 213-224, 2007
- KASPAR, H. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 20-21, p. 1838-1846, 2009.
- KASPAR, H. *et al.* **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 870, n. 2, p. 222-232, 2008.
- KOPKA, J. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 312-322, 2006
- KOUREMENOS, K. A. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 21, p. 1761-1770, 2010.
- KVITVANG, H. F. N. *et al.* **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 7, p. 2705-2711, 2011.
- LEBOUCHER, J. *et al.* **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 8, p. 1421-1428, 1997.
- LIEBEKE, M.; WUNDER, A.; LALK, M. **Analytical Biochemistry**, v. 401, n. 2, p. 312-314, 2010.
- MANDALAKIS, M.; APOSTOLAKI, M.; STEPHANOU, E. G. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 1, p. 143-150, 2010.
- OOI, M. *et al.* **Inflammation Research**, v. 60, n. 9, p. 831-840, 2011.
- PIRAUD, M. *et al.* **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 22, p. 3287-3297, 2005.
- PIRAUD, M. *et al.* **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 12, p. 1587-1602, 2005.

- SCHWARZ, E. L.; ROBERTS, W. L.; PASQUALI, M. **Clinica Chimica Acta**, v. 354, n. 1-2, p. 83-90, 2005.
- SHEIKH-ALI, M. *et al.* **Diabetes Care**, v. 31, n. 4, p. 643-647, 2008.
- STOOP, M. P. *et al.* **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, n. 9, p. 2063-2075, 2010.
- TOCZYLOWSKA, B. *et al.* **Brain Research**, v. 1104, p. 183-189, 2006.
- TORTORELLA, C.; ARAGONA, F.; NUSSDORFER, G. G. **Life Sciences**, v. 65, n. 26, p. 2823-2827, 1999.
- VALLEJO, M. *et al.* **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 6, p. 1517-1524, 2009.
- VISSER, W. F. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 40, p. 7130-7136, 2011.
- WALDHIER, M. C. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 15-16, p. 1103-1112, 2010.
- WATERVAL, W. A. H. *et al.* **Clinica Chimica Acta**, v. 407, n. 1-2, p. 36-42, 2009.
- WISHART, D. S. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 2, p. 164-173, 2008.
- WU, H. *et al.* **Analytica Chimica Acta**, v. 648, n. 1, p. 98-104, 2009.
- XIA, J.-F. *et al.* **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 136-143, 2009.
- ZHANG, A. *et al.* **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 4, p. 1079-1088, 2012.
- ZHANG, W. *et al.* **Analyst**, v. 129, n. 3, p. 229-234, 2004.

## **CAPITULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nesta tese foram apresentados os resultados referentes ao desenvolvimento, validação e aplicação dos métodos para a determinação de ácidos biliares e aminoácidos em matrizes biológicas. Foram desenvolvidos métodos para identificação e quantificação dos ácidos biliares por cromatografia gasosa, dos aminoácidos no líquido cefalorraquidiano, e dos ácidos biliares por cromatografia líquida de alta eficiência.

Para amostragem e preconcentração dos ácidos biliares foi desenvolvido um método de microextração em fase líquida com fibra oca como técnica de extração. Os valores de recuperação, precisão, exatidão, e limites de detecção foram similares aos métodos descritos na literatura. A principal vantagem deste método de extração está na minimização do uso de solventes orgânicos. Este método, desenvolvido e validado, foi aplicado em amostras de plasma de trabalhadores expostos a solventes orgânicos, e em voluntários não expostos a solventes.

A derivatização assistida por micro-ondas foi utilizada com sucesso para análise dos ácidos biliares e aminoácidos por cromatografia gasosa. Esta técnica de derivatização permitiu reduzir significativamente o tempo de análise. O agente derivatizante utilizado mostrou-se adequado para vários grupos químicos, o que possibilitou a análise dos aminoácidos em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes hospitalizados com suspeita de infecção bacteriana. O método para a determinação dos ácidos biliares mostrou-se adequado para a análise destes metabólitos em plasma de trabalhadores expostos a solventes.

Os resultados encontrados mostram a capacidade dos métodos propostos para detectar baixas concentrações, e alterações de alguns metabólitos em matrizes biológicas.

Os métodos desenvolvidos contribuíram de forma significativa para a área da metabolômica, permitindo o estudo de vias metabólicas e de marcadores específicos para doenças relacionadas à exposição a agentes químicos. Portanto, esses métodos podem ser utilizados para o diagnóstico, e prevenção das alterações dos sistemas biológicos. O aumento das concentrações de cisteína em pacientes com suspeita de infecção bacteriana,

e as diferenças significativas entre as concentrações de ácido cólico entre os grupos controle e exposto, indicaram que essas substâncias podem ser considerados potenciais marcadores biológicos.

O perfil dos ácidos biliares presente no plasma apresentou evidências da alteração precoce em relação aos parâmetros de função hepática, e demonstrou condições satisfatórias para o emprego destes compostos como biomarcadores da exposição a substâncias hepatotóxicas.

O uso de técnicas hífenadas como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas demonstraram ser importantes ferramentas analíticas para o estudo do metaboloma.

O presente trabalho tem como perspectivas, comparar a sensibilidade da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com a Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas para as análises dos ácidos biliares e aminoácidos

Utilizar o método para a determinação dos ácidos biliares por LC/MS-IT/TOF para trabalhadores expostos especificamente a solventes clorados e a medicamentos hepatotóxicos e a indivíduos não expostos a substâncias químicas hepatotóxicas.

Propor um método multi-classes para análise de metaboloma por Cromatografia bidimensional abrangente.

## **ANEXOS**



## Anexo 1

### QUESTIONÁRIO - GRUPO EXPOSTO

#### 1-) DADOS SOBRE A AMOSTRAGEM

Nº da amostra: \_\_\_\_\_

Data da coleta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Hora da coleta \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

#### 2-) INFORMAÇÕES PESSOAIS

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

Idade: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_

Local de trabalho: \_\_\_\_\_ Área de trabalho: \_\_\_\_\_

#### 3-) SOBRE O SEU TRABALHO (SE GRUPO EXPOSTO)

Quantas horas trabalha por dia? \_\_\_\_\_

Quantas vezes por semana você trabalha? \_\_\_\_\_

Há trabalha nessa ocupação? \_\_\_\_\_

Tem algum outro emprego ou bico? \_\_\_\_\_ ( ) sim ( ) não

Se sim, o que faz? \_\_\_\_\_

Usa equipamento de proteção? \_\_\_\_\_ ( ) sim ( ) não

Se sim, quais? \_\_\_\_\_

#### 4-) HÁBITOS PESSOAIS E DIETA

Você é fumante? ( ) sim ( ) não

Se sim, quantos cigarros fuma por dia? \_\_\_\_\_

Há quanto tempo fuma? \_\_\_\_\_

Fuma no local de trabalho? ( ) sim ( ) não

Você bebe?

Refrigerante ( ) sim ( ) não Quanto por dia? \_\_\_\_\_

Café ( ) sim ( ) não Quanto por dia? \_\_\_\_\_

Chá ( ) sim ( ) não Quanto por dia? \_\_\_\_\_

Cerveja ( ) sim ( ) não Quanto por dia?\_\_\_\_\_

Pinga ( ) sim ( ) não Quanto por dia?\_\_\_\_\_

Qual o tempo decorrido entre a ultima ingestão da bebida e a hora da coleta?\_\_\_\_\_

### **Dieta**

Conserva em lata ou vidro ( ) sim ( ) não

Queijo ( ) sim ( ) não

Frutas ( ) sim ( ) não

Mostarda ou ketchup ( ) sim ( ) não

Produtos dietéticos ( ) sim ( ) não

Qual o tempo decorrido entre a sua ultima refeição e a hora da coleta?\_\_\_\_\_

### **5-) SOBRE SUA SAÚDE**

Você tem dificuldades de se lembrar das coisas? ( ) sim ( ) não

Você tem memória curta? ( ) sim ( ) não

Você tem dificuldades para entender o que está lendo? ( ) sim ( ) não

Você fica nervoso ou irritado com muita facilidade? ( ) sim ( ) não

Você fica triste ou deprimido com certa frequência? ( ) sim ( ) não

Você se cansa muito fácil com pouco esforço físico? ( ) sim ( ) não

Você tem dor de cabeça ao menos uma vez por semana? ( ) sim ( ) não

Você já desmaiou? ( ) sim ( ) não

Você está tomando algum remédio? ( ) sim ( ) não

Qual?\_\_\_\_\_ Quantas vezes por dia?\_\_\_\_\_

Você tem pressão alta, diabete, etc.... ( ) sim ( ) não

Se sim, qual?\_\_\_\_\_

Você já teve hepatite, cirrose ou alguma doença do fígado? ( ) sim ( ) não

Se sim, qual? \_\_\_\_\_-

Você se machuca no serviço ( ) raramente ( ) as vezes ( ) sempre

Você dorme bem, acorda descansado? ( ) sim ( ) não

Você acorda durante a noite? ( ) sim ( ) não

## Anexo 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### PROJETO DE PESQUISA

Avaliação da exposição ocupacional a solventes clorados utilizando técnicas cromatográficas e novos métodos de extração

Prezado (a) Senhor (a),

Você está sendo convidado(a) para participar de uma pesquisa que tem por objetivo avaliar os ácidos biliares e aminoácidos como indicadores da exposição a solventes clorados. Estas análises podem auxiliar nas ações de vigilância e na adoção de medidas de controle do risco, visando a proteção e prevenção da saúde do trabalhador.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 9,0 mL do seu sangue e 50 mL de urina, em recipientes estéreis, apropriados e devidamente etiquetados. para realização de exames.

Na coleta de sangue pode correr uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por profissional experiente.

Seu nome, os dados fornecidos e os resultados dos exames serão mantidos em segredo.

Caso não queira participar deste estudo, não haverá nenhum comprometimento ao seu atendimento e tratamento.

Qualquer dúvida sobre a sua participação neste estudo poderá ser apresentada à Profa. Zenilda de Lourdes Cardeal ou à doutoranda Maria José Nunes de Paiva (Depto. de Química-ICEX)

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

**Responsáveis pelo projeto**

Profa.Zenilda de Lourdes Cardeal Tel. 3499-5725

Maria José Nunes de Paiva Tel.( 37) 9826-1645

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

Documento de identidade:\_\_\_\_\_

Assinatura:\_\_\_\_\_ Data:\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**COEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Av. Antônio Carlos, 6627

Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005

Campus Pampulha

Belo Horizonte, MG – Brasil

31270-901

Email:coep@prpq.ufmg.br

Telefax: 31 3409-4592

## Anexo 3

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da exposição ocupacional a solventes clorado utilizando técnicas cromatográficas e novos métodos de extração para a determinação dos ácidos biliares e aminoácidos

**Pesquisador:** Zenilda de Lourdes Cardeal

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 09698312.4.0000.5149

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências Exatas

**Patrocinador Principal:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 274.676

**Data da Relatoria:** 17/05/2013

#### Apresentação do Projeto:

A exposição às substâncias químicas pode provocar efeitos nocivos, o que poderá afetar a saúde dos expostos em decorrente da alteração do funcionamento do organismo. Os solventes clorados fazem parte desta lista de produtos que promovem efeitos nocivos. Estes são utilizados na indústria como desengraxante de superfícies metálicas, na lavagem a seco de produtos têxteis, solvente de borrachas, óleos e resinas, na fabricação de couros, produtos de limpeza entre outros. Os efeitos tóxicos dos solventes clorados variam em função do número de átomos de cloro presente na molécula do mesmo e produzem, de uma maneira geral, depressão do sistema nervoso central (SNC), ação hepatotóxica e nefrotóxica. Considerando a ação hepatotóxica, os principais solventes clorados são o Tetracloreto de carbono, Tricloretileno e Percloroetileno. O dano hepático pode ser hepatocelular, promovendo o aumento das transaminases oxaloacética e pirúvica, ou colestático, o que levará ao aumento de bilirrubinas, da fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase (G-GT) [1]. Estes parâmetros são utilizados atualmente para detecção de dano hepático sendo raramente feita análise dos ácidos biliares como biomarcador. Os ácidos biliares são ácidos compostos esteroidais produzidos durante o metabolismo hepático do colesterol e estão presentes em vários fluidos biológicos. A regulação dos ácidos biliares é uma das principais funções do fígado, ou seja, alterações no metabolismo e excreção desses ácidos refletem uma

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 274.676

disfunção hepática. O metabolismo hepático e intestinal dos ácidos biliares pode ser influenciado também por doenças hepáticas e gastrintestinais. Assim, alterações na síntese hepática, no metabolismo intracelular, na excreção e absorção intestinal ou na extração dos ácidos biliares do plasma resultam em distúrbios no metabolismo dos ácidos biliares. Embora os parâmetros bioquímicos clássicos sejam utilizados na avaliação da função hepática e como testes de triagem para a detecção da disfunção hepática provocada, por exemplo, pelos solventes, é necessário lembrar que a alteração dessas enzimas pode ocorrer, também, em doenças de origens não hepáticas. Além disso, as alterações quantitativas desses parâmetros bioquímicos se correlacionam com alterações hepáticas não mais em suas fases iniciais. No sistema nervoso, compostos neurotóxicos podem promover neuropatias axonopatias, mielopatias ou efeitos relacionados aos neurotransmissores. O glutamato e outros aminoácidos são neurotransmissores excitatórios. Após a descoberta que estes aminoácidos podem ser neurotóxicos, despertou grande interesse nestas excitotoxinas. A quantificação de diferentes aminoácidos presente no organismo é importante pois pode ser utilizada no diagnóstico de doenças como diabetes, câncer, Alzheimer, Parkinson pode ser utilizado como um indicador de alterações neurológicas. Considerando a importância do sistema nervoso central e sistema hepático para a saúde dos homens, torna-se claro a necessidade de serem monitoradas as exposições aos agentes neurotóxicos e hepatotóxicos, buscando evitar ou diagnosticar precocemente a ação nociva desses compostos. A preocupação com os trabalhadores expostos, entretanto, vem aumentando e algumas pesquisas com a finalidade de desenvolver testes de diagnóstico laboratorial precoce vêm sendo conduzidas objetivando a prevenção de disfunções hepáticas decorrentes da exposição no ambiente de trabalho. A hipótese a ser testada é que não existe diferença significativa de concentração dos ácidos biliares e aminoácidos entre os indivíduos expostos e não expostos a solventes.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

##### **Objetivo Primário:**

Verificar a concentração dos ácidos biliares e aminoácidos entre indivíduos expostos e não expostos a solventes clorados.

##### **Objetivo Secundário:**

(1) Propor novas técnicas de extração para os ácidos biliares e aminoácidos nos sangue por microextração em fase líquida LPME. (2) Determinação dos ácidos biliares individual utilizando LC-MS. Determinação dos aminoácidos por GC/MS com prévia derivatização utilizando microondas. (3) Determinar os níveis dos biomarcadores de exposição hoje existentes; triclorocompostos totais

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 274.676

(TCT) e ácido tricloroacético (TCA) em amostras de urina, nos trabalhadores expostos, respectivamente ao tricloretileno e percloroetileno (4) Fazer um estudo estatístico para validar as correlações entre grupo exposto e o grupo controle.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

De acordo com o projeto os riscos estão relacionados ao nervosismo e incômodo devido à coleta de sangue e possível formação de hematoma no local, que será minimizado pelo devido rigor deste procedimento por profissionais habilitados com experiência e capacidade técnica e em local com infra-estrutura adequada. O risco referentes aos voluntários, relacionado a sua identificação e resultados, será minimizado uma vez que a pesquisadora se compromete a manter o sigilo em utilizar as informações somente para esta pesquisa.

**Benefícios:**

Os benefícios do trabalho estão relacionados a utilização da análise dos ácidos biliares e aminoácidos como biomarcadores de efeito precoce a hepatotoxicidade e efeito neurotóxico dos solventes clorados, oferecendo suporte as ações de vigilância à saúde dos trabalhadores.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo transversal com grupo controle. Serão coletadas amostras de sangue (soro) e urina de 30 trabalhadores expostos (lavanderias), de ambos os sexos, e de faixa etária entre 21 e 60 anos que constituirão o grupo exposto. Serão coletadas também amostras de 30 indivíduos com características semelhantes ao grupo exposto, porém, não-expostos ocupacionalmente a solventes (grupo controle). A análise estatística da presença quali e quantitativa dos ácidos biliares e aminoácidos no sangue será realizada pelo método de qui-quadrado e pelo teste exato de Fisher. Os resultados ainda serão analisados pelos métodos de calibração multivariada como PCA, HCA e PLS-DA. O desfecho primário é o de conhecer a significação da determinação de ácidos biliares e aminoácidos na presença de hepato e neuropatias relacionada à exposição ocupacional a solventes clorados. O desfecho secundário é verificar se existe correlação entre os ácidos biliares e os bioindicadores clássicos usados na biomonitorização da exposição ocupacional. Caso seja verificada a alteração na excreção de ácidos biliares precocemente com relação à alteração dos indicadores da presença de patologia hepática, este biomarcador será de grande utilidade na prevenção de danos a este órgão. O projeto tem financiamento do CNPq.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Documentação apresentada: Projeto de Pesquisa; Folha de Rosto assinada pela pesquisadora e

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005  
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 274.676

pelo diretor do Instituto de Ciências Exatas (ICEX) da UFMG; Parecer consubstanciado aprovado pela Câmara do Departamento de Química; Compromisso assinado pela coordenadora e doutoranda; TCLE. TCLE: Deve conter as seguintes informações: (1) o objetivo do estudo deve ser mais claro e em linguagem acessível; (2) serão assinadas duas vias do TCLE e uma cópia deverá ficar com o sujeito da pesquisa; (3) que o material biológico coletado será utilizado somente pra a pesquisa; (4) endereço dos pesquisadores e local de assinatura para o pesquisador, que também deverá assinar o TCLE. No TCLE, os pesquisadores garantem que caso haja recusa não haverá nenhum comprometimento ao seu atendimento e tratamento. Entretanto, no projeto não existe nenhuma referencia quanto ao encaminhamento para tratamento.

**Recomendações:**

Foram esclarecidos as seguintes solicitações:

(1) Local de seleção dos voluntários: grupo exposto (trabalhadores) e do grupo controle (não expostos a solvente);

População estudada. Serão coletadas amostras de sangue (soro) e urina de 30 trabalhadores expostos, de ambos os sexos, e de faixa

etária entre 21 e 60 anos que constituirão o grupo exposto. Serão coletadas também amostras de 30 indivíduos com semelhantes características ao grupo exposto, porém, não-expostos ocupacionalmente a solventes que formarão o grupo controle. Análise

Grupo exposto (trabalhadores) serão recrutados na lavanderias de Belo Horizonte

Grupo controle (não expostos a solvente) : Universidade Federal de São João del Rey e Divinópolis, MG.

(2) O encaminhamento dos voluntários que necessitam tratamento, conforme esta mencionado no TCLE: no novo TCLE foi retirada esta informação sobre encaminhamento dos voluntários que necessitam tratamento.

(3) A data de início da coleta está prevista para 14/01/2013. Se necessário adequar a data de início da coleta após a aprovação do COEP. Coleta das amostras será entre 03/06/2013 a 14/06/2013 e a entrega dos resultados entre 15/07/2013 e 19/07/2013.

O TCLE foi adequado as solcitações que eram : (1) Esclarecer e detalhar melhor o objetivo do estudo em linguagem mais acessível, que seja de fácil compreensão para o voluntário; (2) Informar que serão assinadas duas vias do TCLE e que uma via ficará em posse do sujeito da pesquisa. (3) Informar que o material biológico coletado será utilizado somente para a pesquisa; (4) Deve constar além do nome e telefone o endereço da coordenadora e pesquisadora e o local para

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005  
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br



Continuação do Parecer: 274.676

assinatura do pesquisador (o pesquisador deverá também assinar o TCLE); (5) Informar no TCLE que o COEP deverá ser procurado somente em caso de dúvidas quanto as questões éticas.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Somos pela aprovação do projeto "Avaliação da exposição ocupacional a solventes clorado utilizando técnicas cromatográficas e novos métodos de extração para a determinação dos ácidos biliares e aminoácidos" da pesquisadora Zenilda de Lourdes Cardeal e da orientanda Maria José Nunes de Paiva.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 17 de Maio de 2013

---

**Assinador por:**  
**Maria Teresa Marques Amaral**  
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005  
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

# Anexo 4

## Bioclin

Português 1/2

### FOSFATASE ALCALINA K 019 INSTRUÇÕES DE USO

#### FINALIDADE

Método para a determinação da Fosfatase Alcalina. Teste colorimétrico, somente para uso diagnóstico *in vitro*.

#### PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Roy Modificado.

A Fosfatase Alcalina presente na amostra hidrolisa o substrato de timoftaleína monofosfato, liberando timoftaleína e fosfato inorgânico, em um tempo pré-determinado de 10 minutos. A atividade enzimática é proporcional à quantidade de timoftaleína formada, que é medida colorimetricamente. Com a adição do Reagente de Cor, a reação enzimática é inativada e a timoftaleína adquire cor azul. Como o substrato e o produto da reação apresentam cores diferentes, em meio alcalino, a coloração final é constituída por uma mistura de cores.



#### REAGENTES

**Número 1 - Substrato** - Conservar entre 15 e 30°C. Após o manuseio conservar entre 2 e 8°C em frasco bem vedado para evitar evaporação. O reagente pode apresentar turvação ou precipitado, fato que não interfere na sua qualidade. Agitar antes de usar. Contém: Timoftaleína monofosfato 40 mmol/L, solubilizante e estabilizador.

**Número 2 - Tampão** - Conservar entre 15 e 30°C. Após o uso, fechar o frasco para evitar contaminação com CO<sub>2</sub> do ar. Contém: Dietilanolamina 0,3 mol/L, pH 9,9, Citrato de sódio 10 mmol/L, surfactante e ativador.

**Número 3 - Reagente de Cor** - Conservar entre 15 e 30°C. Contém: Carbonato de sódio 150 mmol/L e Hidróxido de sódio 100 mmol/L.

**Número 4 - Padrão 40 UI** - Conservar entre 15 e 30°C. Após o manuseio conservar entre 2 e 8°C em frasco bem vedado para evitar evaporação. Contém: Timoftaleína 0,4 mmol/L (40 UI) e solubilizante.

#### APRESENTAÇÃO

Reagentes	Volume
Reagente Nº 1	5 mL
Reagente Nº 2	50 mL
Reagente Nº 3	200 mL
Reagente Nº 4	3 mL

#### EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Espectrofotômetro ou colorímetro, banho-maria 37°C, relógio ou cronômetro, pipetas, tubos de ensaio, Biocontrol N e Biocontrol P Bioclin. Encontram-se no mercado especializado de artigos para Laboratórios de Análises Clínicas.

Igual a 0,999, com estes resultados, pode-se concluir que o kit apresenta boa especificidade metodológica.

#### PRECISÃO

**REPRODUTIBILIDADE**  
Foram realizadas 20 dosagens sucessivas com três amostras com concentrações diferentes, encontrando-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (UI/L)	17,35	41,55	101,60
Desvio Padrão (UI/L)	0,75	0,76	0,76
Coefficiente de Variação (%)	4,29	1,83	0,74

#### REPRODUTIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens, durante três dias consecutivos, com três amostras de concentrações diferentes, encontrando-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (UI/L)	17,50	41,38	101,32
Desvio Padrão (UI/L)	0,22	0,14	0,26
Coefficiente de Variação (%)	1,24	0,35	0,24

#### Sensibilidade

A sensibilidade foi calculada a partir de 20 determinações de uma amostra isenta da presença de fosfatase. A média encontrada foi 0,419 UI/L, com desvio padrão de 0,004 UI/L. A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método, corresponde a 3 vezes o desvio padrão, sendo igual a 0,429 UI/L.

#### Linearidade

A reação é linear até 500 UI/L. Para valores maiores, diluir o soro com Cloreto de sódio 0,85%, repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

#### SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

A Fosfatase Alcalina está presente em altas concentrações nos ossos, fígado, intestino e placenta. Constitui um útil indicador de doenças hepáticas e de doenças ósseas associadas com hiperatividade osteoblástica. Condições em que a Fosfatase Alcalina está aumentada: nas doenças hepáticas e do trato biliar, na metástase do fígado e metástase óssea, na acromegalia, no hipertireoidismo, no raquitismo, na mononucleose infecciosa, na doença de Paget (atividade osteoblástica) e no crescimento ósseo fisiológico. Valores diminuídos da Fosfatase Alcalina podem ser observados no hipotireoidismo, retardado de crescimento nas crianças, hipofosfatase (erro metabólico inato), desnutrição grave.

#### NÚMERO DE TESTES

100 Testes/50 µL de amostra/2,5mL de Reagente  
200 Testes/25 µL de amostra/1,25mL de Reagente

**CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE**  
A temperatura de armazenamento e transporte deverá ser de 15 a 30°C. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

#### CUIDADOS ESPECIAIS

1- Somente para uso diagnóstico *in vitro*.  
2- Seguir com rigor a metodologia proposta para obtenção de resultados exatos.  
3- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes.  
4- Colunas descalcificadoras saturadas liberam água alcalina, ions diversos e agentes oxidantes e redutores, que podem alterar de forma significativa os resultados.  
5- O nível de água no banho-maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio.  
6- O Reagente Nº 3 deve ser manuseado com cuidado, pois apresenta ação corrosiva.  
7- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.  
8- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.

#### AMOSTRAS

Soro ou plasma (heparina) obtido livre de hemólise. O análio é estável 07 dias entre 2 e 8°C e 30 dias a 10°C negativos.

#### DESCRIÇÃO DO PROCESSO

##### TÉCNICA

A Bioclin recomenda, para uso do kit, utilizar como soro controle os kits Biocontrol N e P Bioclin.

Marcar 3 tubos de ensaio com as letras B (Branco), P (Padrão), A (Amostra) e proceder como a seguir:

	Branco	Padrão	Amostra
Reagente Nº1	50 µL	50 µL	50 µL
Reagente Nº2	500 µL	500 µL	500 µL
Reagente Nº4	—	50 µL	—
Incubar a 37°C por 2 minutos.			
Amostra	—	—	50 µL
Homogeneizar e incubar a 37°C por exatamente 10 minutos.			
Reagente Nº3	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL

Homogeneizar bem e determinar a absorbância da Amostra e do Padrão em 578 nm (570 - 590), acertando o zero com o Branco. A cor é estável por 60 minutos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - COLEMAN, C. M.; STROJE, R. C.: Clin. Chem. Acta 13: 401, 1966.  
2 - ROY, A. V.: Clin. Chem. 16:431, 1970.  
3 - ZAK, B.: Clin. Chim. Acta 3: 329, 1968.  
4 - BRITTENHAM, G.: Clin. Chim. Acta 91: 203, 1979.  
5 - TONKS, D. B.: Chim. Acta 2: 393, 1963.  
6 - CARL, A. B. and EDWARD, R. A.: Tietz Textbook of Clinical Chem 2nd ed., 1994, 1942-1943.

#### GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para o consumo, todos os reagentes Bioclin são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

#### DADOS DO FABRICANTE

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda  
Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca  
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil  
Tel.: (31) 3439-5454 - Fax: (31) 3439-5455  
E-mail: [bioclin@bioclin.com.br](mailto:bioclin@bioclin.com.br)  
CNPJ: 19.400.797/0001-07 - Indústria Brasileira

#### ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente  
Tel.: 0600 0315454.  
E-mail: [sac@bioclin.com.br](mailto:sac@bioclin.com.br)

Número de registro do kit de Fosfatase Alcalina na ANVISA: 10269360104.

Revisão: Janeiro/12

#### CÁLCULOS

Fosfatase Alcalina =  $\frac{\text{Absorbância da amostra} \times 40}{\text{Absorbância do padrão}}$  (UI/L)

Como a reação de cor segue a lei de Lambert Beer, pode-se usar o Fator de calibração:

Fator de calibração =  $\frac{\text{Concentração padrão (40 UI/L)}}{\text{Absorbância do padrão}}$

UI/L = Absorbância da amostra x Fator de calibração

Os resultados serão expressos em UI/L.

#### LIMITAÇÕES DO PROCESSO

A metodologia não pode ser adaptada em aparelhos de automação.

#### INTERFERENTES

Não utilizar amostras hemolisadas ou lipêmicas, pois tais amostras podem elevar falsamente os resultados.

#### CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens.

#### VALORES DE REFERÊNCIA

Os valores de referência em UI/L, para o presente método, foram obtidos através da determinação da Fosfatase Alcalina em populações sadias do sexo masculino e feminino.

Adultos: 12 a 43 UI/L

Crianças até 12 anos: 56 a 156 UI/L

Estes valores devem ser usados como orientação, sendo que cada laboratório deverá criar sua faixa de valores de referência, de acordo com a população atendida.

#### DESEMPENHO DO PRODUTO

##### CONTROLE DE QUALIDADE

##### Exatidão

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA**  
O Kit Fosfatase Alcalina foi comparado com outro método para dosagem de fosfatase, comercialmente disponível. Foram realizadas 07 análises e os resultados foram avaliados. A equação linear obtida foi  $Y = 1,009X - 0,117$ , com coeficiente de correlação linear

Português 2/2

#### SIMBOLOGIA UNIVERSAL

	NÚMERO DE CATÁLOGO		FABRICAÇÃO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (80% do dia do mês)		CONTROLE NEGATIVO
	UNIDADE DE TEMPERATURA (convertida)		PERIGO BIOLÓGICO
	CONTÉÚDO E SUFICIENTE PARA «N» TESTES		INFLAMÁVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO <i>IN VITRO</i>		TOXICO

**FINALIDADE**  
Método para a determinação da Gama GT. Teste cinético, somente para uso diagnóstico *in vitro*.

**PRINCÍPIO DE AÇÃO**  
Metodologia: Gsasz Modificado / Padronizado pela IFCC  
Este método baseia-se na IFCC (International Federation of Clinical Chemistry), no qual a  $\gamma$ -glutamyltransferase catalisa a transferência do radical Glutamil do substrato para a Glicilglicina formando  $\gamma$ -glutamylglicilglicina e 5-Amino-2-Nitrobenzoato. A velocidade de formação de 5-Amino-2-Nitrobenzoato em 405 nm é proporcional à atividade da enzima.

L- $\gamma$ -Glutamil-3-Carboxi-4-Nitroanilida + Glicilglicina  $\xrightarrow{\gamma$ -GT-  
L- $\gamma$ -Glutamylglicilglicina + 5-Amino-2-Nitrobenzoato

**REAGENTES**  
**Reagente Nº 1 - Tampão** - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Tampão Tris 133 mmol/L, Glicilglicina 138 mmol/L, e Adia Sódica 15,38 mmol/L.  
**Reagente Nº 2 - Substrato** - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: L- $\gamma$ -Glutamil-3-Carboxi-4-Nitroanilida 23 mmol/L, e Adia Sódica 15,38 mmol/L.

Apresentação	Reagente Nº 1	Reagente Nº 2
1	1 x 24 mL	1 x 6 mL
2	2 x 24 mL	2 x 6 mL
3	4 x 24 mL	4 x 6 mL
4	1 x 40 mL	1 x 10 mL
5	2 x 40 mL	2 x 10 mL
6	4 x 40 mL	4 x 10 mL
7	2 x 40 mL	1 x 20 mL
8	4 x 40 mL	2 x 20 mL

**EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS**  
Espectrofotômetro termotomizado, pipetas, tubos de ensaio, relogio ou cronometro, Biocontrol N e Biocontrol P Bioclin. Encontram-se no mercado especializado de artigos para Laboratórios de Análises Clínicas.

**CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE**  
A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. O transporte em temperaturas entre 15 e 30°C não deverá exceder 72 (setenta e duas) horas. Manter ao abrigo de luz e evitar umidade. Não congelar.

**CUIDADOS ESPECIAIS**  
1- Bomente para uso diagnóstico *in vitro* profissional.  
2- Seguir com rigor a metodologia proposta para obtenção de resultados exatos.  
3- A água utilizada no ensaio de materiais deve ser recente e livre de contaminantes.  
4- Colunas desionizadoras saturadas liberam água alcalina, ions diversos e agentes oxidantes e redutores, que podem alterar de forma significativa os resultados.

A equação linear obtida foi  $Y = 1,001X - 0,084$  e o coeficiente de correlação linear 0,999. Com estes resultados pode-se concluir que o kit apresenta boa especificidade metodológica.

**Repetibilidade**  
A repetibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração média (U/L)	10,90	27,65	209,10
Desvio Padrão (U/L)	0,50	0,88	0,72
Coefficiente de Variação (%)	4,74	3,06	0,34

**Reprodutibilidade**  
A reprodutibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração média (U/L)	10,40	27,63	209,72
Desvio Padrão (U/L)	0,18	0,03	0,54
Coefficiente de Variação (%)	1,73	0,11	0,26

**Sensibilidade**  
A sensibilidade foi calculada a partir de 20 determinações de uma amostra inserida no sistema de Gama GT. A média foi 2,620 U/L com desvio padrão de 0,008 U/L. A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método, corresponde à média mais 3 vezes o desvio padrão e é igual a 2,64 U/L.

**Linearidade**  
A reação é linear até a concentração de 750 U/L. Para uma variação na absorbância de 0,200, ocorre a determinação, diluindo a amostra 1:10 com solução de Cloreto de Sódio 9 g/L. Multiplicar o resultado obtido por 10.

**SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO**  
A Gama Glutamil Transferase é uma enzima sérica que origina-se primordialmente do Sistema Hepato Biliar (GHB). Em enfermidades do GHB, como na obstrução biliar intra e extra-hepática, seus níveis séricos alcançam valores de 5 a 30 vezes acima dos limites de Referência do Método (LRM).  
Outra sensibilidade em detectar icterícia obstrutiva, colangite e colecistite e superior à de enzimas como a Fosfatase Alcalina (ALP), Amilamíase (Leucinaminopeptidase - LAP) e  $\alpha'$ -Nucleotíase - NTP (U/L). Na hepatite infecciosa ocorrem aumentos de 2 a 5 vezes acima dos LRM. Em doenças pancreáticas associadas à obstrução hepato biliar os aumentos verificados estão na ordem de 5 a 15 vezes acima dos LRM. Em doenças ósseas os valores de Gama GT encontram-se dentro dos LRM sendo que a análise conjunta de Gama GT e ALP é um recurso valioso para distinguir doença hepática de doença óssea. Nas doenças musculares e na insuficiência renal seus níveis são normais, ocorrendo pequeno aumento na nefrose lipóide não tratada. No entanto, os valores encontram-se dentro dos LRM, exceto quando acompanhado de

6. É importante para o bom desempenho do teste, um rigoroso controle de tempo e temperatura.  
6- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.  
7- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.  
8- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.  
9- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

**AMOSTRAS**  
Soro ou plasma coagulado com heparina ou EDTA, obtido livre de hemólise. A enzima sérica é estável durante 12 dias entre 2 e 8°C. Anticoagulante contendo citrato, fluoreto ou oxalato inibem a atividade da Gama GT.

**DESCRIÇÃO DO PROCESSO**  
**PREPARO DO REAGENTE DE TRABALHO**  
Misturar 4 mL do Reagente Nº 1 com 1 mL do Reagente Nº 2. O Reagente de Trabalho é estável por 5 dias entre 15 e 30°C e 3 semanas entre 2 e 8°C.

**CONDIÇÕES DE REAÇÃO**  
É condição indispensável o uso de cubeta termotomizada a 37°C com comprimento óptico de 1 cm e leitura em 405 nm.

**TÉCNICA**  
A Bioclin recomenda, para uso do kit, utilizar como soro controle os kits Biocontrol N e P Bioclin.  
Adicionar 50  $\mu$ L de amostra a 1 mL de Reagente de Trabalho, misturar e transferir para cubeta termotomizada a 37°C e esperar 1 minuto. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronometro. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos. Calcular a média das diferenças de absorbância por minuto ( $\Delta$ Amim) e utilizar este valor para cálculo do resultado.

**CÁLCULOS**  
Considerando caminho óptico de 1 cm e a temperatura de reação 37°C, o cálculo será:  
 $Gama\ GT\ (U/L) = \Delta\ Amim \cdot x\ Fator\ de\ Calibração$

Filtro (nm)	Fator de Calibração
405	2210

**LIMITAÇÕES DO PROCESSO**  
O método cinético baseia-se na absorvibilidade molar de 5-Amino-2-Nitrobenzoato, por essa razão as leituras devem ser realizadas em um espectrofotômetro que cumpra as seguintes condições:  
Comprimento de onda: 405 nm  
Semi largura da banda de passagem: 10 nm  
Luz espalhada menor que 0,5%  
Cubetas de 10 mm termotomizadas

comprometimento hepático. O uso de drogas como Dilatim (Fenil Hidantoina), Fenobarbital, bem como o do Alcool, aumentam o nível da enzima, devido ao efeito tóxico hepático. Quanto ao Alcool, é altamente significativa a determinação de Gama GT no acompanhamento do tratamento de pacientes alcoólatras.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**  
1 - J. Biol. Chem., 1938, 128, 537 - 550.  
2 - DIMIOV, D. M.; KULHANEZ, V., Clin. Chim., Acta., 1.967, 16,271 - 273.  
3 - NAFTALIN, L.; GEXTOM, M.; WHITAKER, B. F.; TRACEY, D., Clin. Chim., Acta., 1.969, 26, 293 - 296.  
4 - QUACKER, G., Clin. Chem., 1.989, 15, 124 - 136.  
5 - IFCC Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of  $\gamma$ -Glutamyltransferase. Clin Chem Lab Med 2002; 40:734-758.  
6 - GOLDIN, G.J.; BRUGNARA C.; WONG, E.C. Pediatric Reference Intervals, 5.ed.Washington: AACO Press, 2005.p.98-99.

**GARANTIA DE QUALIDADE**  
Antes de serem liberados para o consumo todos os reagentes Bioclin são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

**QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda**  
Rua Teófilo de Menezes, 52 - Santa Branca  
CEP 31555-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil  
Tel.: (31) 3435.5454 - Fax: (31) 3435.5455  
E-mail: [bioclin@bioclin.com.br](mailto:bioclin@bioclin.com.br)  
CNPJ: 19.420.737/0001-07 - Indústria Brasileira

**OBELIS S.A.**  
Bd. General Wahnis, 53  
10330 Brussels, Belgium

**ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR**  
Serviço de Assessoria ao Cliente  
Tel.: 0800 0315454  
E-mail: [sac@bioclin.com.br](mailto:sac@bioclin.com.br)

Número de registro do Kit Gama GT Líquido Estável na ANVISA: 10289360129

Revisão: Fevereiro/2013



Algumas drogas como o Alcool, Feniltoína, Fenobarbital e outras podem elevar os níveis de Gama GT. Os Anticoncepcionais podem reduzir os níveis de Gama GT. Determinados soros controles possuem estabilizantes e/ou conservantes que podem interferir na linearidade, provocando variações nos  $\Delta$ A. Tal fato não ocorre com amostras biológicas.

**CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE**  
O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle de qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens.

**RASTRABILIDADE**  
A calibração do kit pode ser feita utilizando o fator de calibração teórico, baseado na absorvibilidade molar do 5-Amino-2-Nitrobenzoato, ou através do calibrador BIOCAL. A Bioclin recomenda o uso do calibrador BIOCAL, que é rastreável ao material de referência ERM-A462 / IFCC e ao método de referência da IFCC.

**VALORES DE REFERÊNCIA**  
Os valores de referência a seguir foram obtidos em populações saudáveis. As dosagens foram feitas em temperatura de 37°C.

	Masculino (U/L)	Feminino (U/L)
0 - 6 meses	12 - 122	15 - 152
6 - 12 meses	1 - 39	1 - 39
1 - 12 anos	3 - 22	4 - 22
13 - 18 anos	2 - 42	4 - 24
Adultos	$\leq 65$	$\leq 68$

Estes valores devem ser usados como orientação, sendo que cada laboratório deverá criar sua faixa de valores de referência, de acordo com a população atendida. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

**DESEMPENHO DO PRODUTO**  
**CONTROLE DE QUALIDADE**

**Exatidão**  
**RECUPERAÇÃO**  
A análise de recuperação foi feita com 05 determinações de amostras. As exatidões foram calculadas, e se encontraram em boa concordância com os valores de referência, obtendo uma recuperação entre 98 e 104%.

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA**  
O kit Gama GT foi comparado com outro método para Gama GT. Foram realizadas 7 análises e os resultados foram avulsos.

**SIMBOLOGIA UNIVERSAL**

	NÚMERO DE CATÁLOGO		FABRICAÇÃO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (Mês e Anos em inglês)		CONTROLE NEGATIVO
	LIMITES DE TEMPERATURA (operar em)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTÉUDO E EQUIPAMENTO PARA CADA TESTE		INFLAMMÁVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CUIDADO
	PRODUTO PARA TRANSPORTAR		TÓXICO
	REPRESENTANTE ELÉTRICO AUTORIZADO		MARCA CE
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		MATERIAL DE EMBALAGEM ESTERILIZADA

**TRANSAMINASE TGO**

REF: K034

**INSTRUÇÕES DE USO**

**FINALIDADE**  
Método para a determinação da Transaminase Oxalacética (AST ou TGO). Teste colorimétrico, somente para uso diagnóstico in vitro.

**PRINCÍPIO DE AÇÃO**  
Metodologia: Reitmann e Frankel  
A Transaminase catalisa a transferência do grupo amino de um Alfa-Aminocetoato para um Alfa-Cetoglutarato.



O Oxalacetato reage com a Dinitrofenilhidrazina. A intensidade de coloração da Hidrazona formada, em meio alcalino, é diretamente proporcional à quantidade de Oxalacetato, em determinado tempo, que por sua vez é função da atividade enzimática.

- REAGENTES**  
Número 1 - Substrato TGO - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Tampão Fosfato 0,1 mol/L (pH 7,4), Ácido L-Aspartico 0,153 mol/L, Ácido Alfa Cetoglutarico 2 mmol/L e Azida Sódica 7,7 mmol/L.  
Número 2 - Reagente de Cor - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: 2-Dinitrofenilhidrazina 1,0 mmol/L e Ácido Clorídrico 1,0 mol/L.  
Número 3 - Hidróxido de Sódio Concentrado - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Hidróxido de Sódio 5 mol/L.  
Número 4 - Padrão - Conservar entre 2 e 8°C. Homogeneizar bem antes de usar. Contém: Fluvalato de Sódio 2,53 mmol/L, Tampão Fosfato 0,1 mol/L (pH 7,4) e Azida Sódica 7,7 mmol/L.

**APRESENTAÇÃO**

REAGENTE	VOLUME
Nº 1	50 mL
Nº 2	50 mL
Nº 3	40 mL
Nº 4	4 mL

**EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS**  
Espectrofotômetro ou colorímetro, banho-maria (37°C), relógio ou cronômetro, pipetas, tubos de ensaio, papel monolug ou milimetrado, Bioclinol N e Bioclinol F Bioclin. Encontram-se no mercado especializado de artigos para Laboratórios de Análises Clínicas.

**CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE**  
A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. O transporte, em temperaturas entre 15 e 30°C, não deverá exceder a 72 (setenta e duas) horas. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade. Não congelar.

**CUIDADOS ESPECIAIS**  
1- Somente para uso diagnóstico in vitro profissional.  
2- Seguir com rigor a metodologia proposta para obtenção de resultados exatos.  
3- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes.  
4- Apesar do Substrato conter um conservante deve-se evitar contaminação bacteriana.

- 6- Devido a maior concentração de TGO nas hemácias, a hemólise prejudica o teste, fornecendo resultados falsamente elevados.  
6- Manusear com cuidado os Reagentes Nº 1 e Nº 4, que contêm Azida Sódica, pois são irritantes para pele e mucosas.  
7- O Reagente Nº 3 é cáustico, portanto deve-se evitar contato com a pele. O Reagente Nº 2 contém ácido e deve ser manipulado com cuidado, pois é irritante para pele e mucosas, podendo causar queimadura leve.  
8- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.  
9- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.  
10- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.  
11- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

**AMOSTRAS**  
Soro ou plasma (coletado com heparina ou EDTA). O analito é estável 4 dias entre 2 e 8°C e 2 semanas à 10°C negativos.

**DESCRIÇÃO DO PROCESSO**  
**PREPARO DO HIDRÓXIDO DE SÓDIO DE USO (0,4 N):**  
Transferir quantitativamente o conteúdo do frasco Nº 3 (Hidróxido de Sódio Concentrado - 40 mL) para um balão volumétrico de 500 mL e completar até a marca com água destilada ou deionizada livre de CO<sub>2</sub>. Homogeneizar bem e armazenar em frasco plástico. Estável em temperaturas entre 15 e 30°C.

**CURVA DE CALIBRAÇÃO**  
Não usar o método do fator para as dosagens de TGO, pois as absorbâncias não são diretamente proporcionais à atividade enzimática. Preparar com bastante rigor a curva de calibração descrita abaixo:

Tubo	Padrão	Substrato TGO	Água dest.	TGO U/ml
1	---	1,0 mL	200 µL	0
2	100 µL	0,9 mL	200 µL	24
3	200 µL	0,8 mL	200 µL	61
4	300 µL	0,7 mL	200 µL	114
5	400 µL	0,6 mL	200 µL	190

Adicionar a cada tubo 1,0 mL do Reagente Nº 2 (Reagente de Cor), homogeneizar e deixar em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Opcionalmente, este tempo pode ser reduzido para 5 minutos, incubando em banho-maria à 55°C. Adicionar 10,0 mL de Hidróxido de Sódio de Uso (0,4 N). Homogeneizar e deixar em repouso por 5 minutos. A cor permanece estável por 60 minutos. Determinar as absorbâncias ou transmittâncias em 505 nm (490 - 540 nm), acertando o zero

com água destilada ou deionizada. Traçar a curva de calibração, colocando na ordenada os valores de absorbância (papel milimetrado) ou transmittância (papel monolug), e na abscissa os valores de Unidades/mL.

**TÉCNICA**  
A Bioclin recomenda, para uso do kit, utilizar como soro controle os kits Bioclinol N e F Bioclin.

Marcar os tubos de ensaio para dosagem da TGO e proceder como a seguir:

	TGO
Reagente Nº 1	250 µL
Incubar a 37°C por 3 minutos	
Amostra	100 µL
Homogeneizar e Incubar a 37°C por 30 minutos	
Reagente Nº 2	250 µL
Homogeneizar e deixar em repouso por 20 minutos a temperatura ambiente ou por 5 minutos a 55°C	
Hidróxido de Sódio de Uso	2,5 mL

Homogeneizar por inversão e deixar em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Transferir para as cubetas e medir a absorbância ou transmittância em 505 nm (490 - 540 nm), acertando o zero com água destilada ou deionizada. A cor é estável por 30 minutos. Calcular os valores de TGO através da curva de calibração. Se o resultado obtido for acima de 180 unidades, diluir a amostra com NaCl 0,85% e proceder nova determinação. O valor obtido deve ser multiplicado pelo fator de diluição.

**LIMITAÇÕES DO PROCESSO**  
Testar periodicamente a calibração para detectar alguma alteração na resposta do espectrofotômetro ou do colorímetro.

**CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE**  
O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle de qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens.

**RASTREABILIDADE**  
O padrão do kit é rastreável ao material de referência ERM-AD47.

**VALORES DE REFERÊNCIA**  
Os valores de referência, em U/ml, para o presente método foram obtidos através da determinação de TGO em populações sadias do sexo masculino e feminino.  
TGO ..... 4 a 36 Unidades/mL  
Para converter os valores de Unidades/mL em Unidades Internacionais (UI), multiplicar por 0,462.

Estes valores devem ser usados como orientação, sendo que cada laboratório deverá criar sua faixa de valores de referência, de acordo com a população atendida. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

**DESEMPENHO DO PRODUTO**  
**CONTROLE DE QUALIDADE**

**Exatidão**  
**RECUPERAÇÃO**  
A análise de recuperação do kit Transaminase TGO foi feita com 05 determinações de amostras. As exatidões foram calculadas e se encontram em boa concordância com o valor de referência, obtendo uma recuperação entre 95 e 103%.

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA**  
O kit Transaminase TGO foi comparado com outro método para dosagem de TGO comercialmente disponível. Foram realizados 07 análises e os resultados foram avaliados. A equação linear obtida foi Y = 1,013X - 0,013 e o coeficiente de correlação 0,997. Com estes resultados, pode-se concluir que o kit apresenta boa especificidade metodológica.

**Reprodutibilidade**  
**REPETIBILIDADE**  
A repetibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (U/ml)	24,05	31,65	56,80
Desvio Padrão (U/ml)	0,78	0,81	0,79
Coefficiente de Variação (%)	3,16	2,57	1,39

**REPRODUTIBILIDADE**  
A reprodutibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (U/ml)	23,95	31,75	56,67
Desvio Padrão (U/ml)	0,10	0,10	0,36
Coefficiente de Variação (%)	0,42	0,31	0,64

**Sensibilidade**  
A sensibilidade foi calculada a partir de 20 determinações de uma amostra teste de TGO. A média encontrada foi de 3,377 U/ml, com desvio padrão de 0,006 U/ml. A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método, corresponde a média mais 3 vezes o desvio padrão, e é igual a 3,394 U/ml.

**SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO**  
O aumento da atividade da enzima Aspartato Amino Transferase - TGO/AST, de localização citocromossômica, reflete alterações de vários tecidos. Esta enzima encontra-se em alta concentração no coração, fígado, músculo esquelético, rins e pâncreas, e sua atividade

no plasma aumenta 6 a 8 horas, após infarto do miocárdio, alcançando um pico em 24 a 48 horas, após o acometimento. Consideráveis aumentos ocorrem em hepatites virais, tóxicas, doenças necróticas hepáticas (3 a 50 vezes o valor de Referência - VR), mononucleoses (20 vezes o VR), colestase intra-hepática (20 vezes o VR) e distrofias musculares (8 vezes o VR). Nas DH crônicas, associadas à necrose celular, devido ao aumento da liberação de AST (mitocondrial), pode ocorrer inversão da relação ALT/AST. Ocorre ainda aumento de seus níveis na mononucleose infecciosa e nas colestases intra e extra hepáticas.

**NÚMERO DE TESTES**  
200 Testes / 100 µL de amostra / 3 mL de Reagente

- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**  
1. CABAL, P., LEEPER, R., WROBLEWIKI, F., Am. J. Clin. Path. 26: 1101, 1956;  
2. LA DUE, J. S., WROBLEWIKI, F., KARMEN, A.: Science 120:497, 01954;  
3. MOHUN, A. F., COOK, L. J. Y.: Am. J. Clin. Path. 27:235, 1957;  
4. WROBLEWIKI, F., CABAUD, P., Am. J. Clin. Path. 27:235, 1957;  
5. TONKI, D. B.: Clin. Chem. 9: 217, 1963.

**GARANTIA DE QUALIDADE**  
Antes de serem liberados para o consumo, todos os reagentes Bioclin são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

**QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda**  
Rua Teles de Menezes, 32 - Santa Branca  
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil  
Tel.: (31) 3439.5454 - Fax (31) 3439.5465  
E-mail: [bioclin@quibasa.com.br](mailto:bioclin@quibasa.com.br)  
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

**H. J. OBELIS S.A.**  
Bd. Général Wauts, 53  
1030 Brussels, Belgium

**ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR**  
Serviço de Assessoria ao Cliente  
Tel.: 0800 0315454  
E-mail: [sac@bioclin.com.br](mailto:sac@bioclin.com.br)

Número de registro do kit de Transaminase TGO na ANVISA: 10269360139

Revisão: Agosto/2013

**SIMBOLOGIA UNIVERSAL**

	NÚMERO DE CATÁLOGO		FARMACEUTICO
	NÚMERO DO LOTE		CONTROL
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROL POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (ano dia do mês)		CONTROL NEGATIVO
	NÍVEL DE TEMPERATURA (exemplo: 4)		BIOBIOLOGICO
	O CONTÉUDO É SUFICIENTE PARA "N" TESTES		INFAMAVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CONTAMINADO
	PRODOTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		BIOBIOLOGICO
	REPRESENTANTE EUROPEU AUTORIZADO		MARCA CE
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO GULFUBIA SEA (EMBA LA GEM ESTIVER DANIFICADA)



# Bioclin

## TRANSAMINASE TGP

REF: K035

### INSTRUÇÕES DE USO

Português 1/2



#### FINALIDADE

Método para a determinação da Transaminase Piruvica (ALT ou TGP). Teste colorimétrico, somente para uso diagnóstico *in vitro*.

#### PRINCÍPIO DE AÇÃO

**Metodologia:** Reitmann e Franke!  
A Transaminase catalisa a transferência do agrupamento Amino de um Alfa-Aminóácido para um Alfa-Cetóácido.



O Piruvato reage com o Dinitrofenilhidrazina. A intensidade de coloração da Hidrazona formada, em meio ácido, é diretamente proporcional à quantidade de Piruvato, em determinado tempo, que, por sua vez, é em função da atividade enzimática.

#### REAGENTES

- Número 1 - Substrato de TGP ou ALT** - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Tampão Fosfato 0,1 mol/L (pH 7,4), L-Alanina 0,2 mol/L, Ácido Alfa Cetoglutárico 2 mmol/L e Ázida Sódica 7,7 mmol/L.  
**Número 2 - Reagente de Cor** - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: 2,4-Dinitrofenilhidrazina 1,0 mmol/L e Ácido Clorídrico 1,0 mol/L.  
**Número 3 - Hidróxido de Sódio Concentrado** - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Hidróxido de Sódio 5 mol/L.  
**Número 4 - Padrão** - Conservar entre 2 e 8°C. Homogeneizar bem antes de usar. Contém: Piruvato de Sódio 2,53 mmol/L, Tampão Fosfato 0,1 mol/L (pH 7,4) e Ázida Sódica 7,7 mmol/L.

#### APRESENTAÇÃO

Reagente	Volumen
Nº 1	50 mL
Nº 2	50 mL
Nº 3	40 mL
Nº 4	4 mL

#### EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Espectrofotômetro ou colorímetro, banho-maria (37°C), relação ou cronômetro, pipetas, tubos de ensaio, papel monolito ou milimetrado, Bioclinol N e Bioclinol P Bioclin. Encontram-se no mercado especializado de artigos para Laboratórios de Análises Clínicas.

#### CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. O transporte, em temperaturas entre 15 e 30°C, não deverá exceder a 72 (setenta e duas) horas. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade. Não congelar.

#### CUIDADOS ESPECIAIS

- 1- Somente para uso diagnóstico *in vitro* profissional.
- 2- Seguir com rigor a metodologia proposta para obtenção de resultados exatos.
- 3- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes.
- 4- Apesar do substrato conter preservativo, deve-se evitar contaminação bacteriana.

6- Manusear com cuidado os Reagentes Nº 1 e Nº 4, que contêm Ázida Sódica, pois são irritantes para pele e mucosas.  
8- O Reagente Nº 3 é cáustico; evitar contato com a pele. O Reagente Nº 2 contém ácido e deve ser manipulado com cuidado, pois é irritante para pele e mucosas, podendo causar queimadura leve.  
7- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.

8- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Atendimento ao Cliente) da Quibasa.  
9- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.  
10- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

#### AMOSTRAS

Soro ou plasma (coagulado com heparina ou EDTA). O analito é estável 4 dias entre 2 e 8°C e 2 semanas à 10°C negativos.

#### DESCRIÇÃO DO PROCESSO

**PREPARO DO HIDRÓXIDO DE SÓDIO DE USO (0,4 N)**  
Transferir quantitativamente o conteúdo do frasco Nº 3 (40 mL) para um balão volumétrico de 500 mL e completar até a marca com água destilada deionizada livre de CO<sub>2</sub>. Homogeneizar bem e armazenar em frasco plástico. Estável em temperaturas entre 15 e 30°C.

#### CURVA DE CALIBRAÇÃO

Não usar o método do fator para as dosagens de TGP, pois as absorbâncias não são diretamente proporcionais à atividade enzimática. Preparar com bastante rigor a curva de calibração descrita abaixo:

Tubo	Padrão	Substrato de TGP	Água destilada	TGP U/mL
1	---	1,0 mL	200 µL	0
2	100 µL	0,8 mL	200 µL	28
3	200 µL	0,6 mL	200 µL	57
4	300 µL	0,7 mL	200 µL	87
5	400 µL	0,6 mL	200 µL	150

Adicionar a cada tubo 1,0 mL de Reagente de Cor Nº 2, homogeneizar e deixar em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Opcionalmente, este tempo pode ser reduzido para 5 minutos, incubando em banho-maria a 55°C. Adicionar 10,0 mL de Hidróxido de Sódio de Uso (0,4 N). Homogeneizar e deixar em repouso por 5 minutos. A cor permanece estável por 60 minutos. Determinar as absorbâncias ou transmitâncias em 505 nm (450 - 540 nm), acertando o zero com água destilada ou deionizada. Traçar a curva de calibração, colocando na ordenada os valores de absorbância (papel milimetrado) ou transmitância (papel mililog), e na abcissa, os valores de U/mL.

#### TÉCNICA

A Bioclin recomenda, para uso do kit, utilizar como soro controle os kits Bioclinol N e P Bioclin.

Marcar os tubos de ensaio para dosagem da TGP e proceder como a seguir:

	TGP
Reagente Nº 1	250 µL
Incubar a 37°C por 3 minutos.	
Amostra	50 µL
Homogeneizar e incubar a 37°C por 30 minutos.	
Reagente Nº 2	250 µL
Homogeneizar e deixar em repouso por 20 minutos a temperatura ambiente ou por 5 minutos a 55°C.	
Hidróxido de Sódio de Uso	2,5 mL

Homogeneizar por inversão e deixar em repouso por 5 minutos, à temperatura ambiente. Transferir para as cubetas e medir a absorbância ou transmitância em 505 nm (450 - 540 nm), acertando o zero com água destilada ou deionizada. A cor é estável por 30 minutos. Calcular os valores de TGP através da curva de calibração.  
Se o resultado obtido for acima de 140 Unidades, diluir a amostra com NaCl 0,85% e proceder nova determinação. O valor obtido deve ser multiplicado pelo fator de diluição.

#### LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Testar periodicamente a calibração para detectar possíveis alterações na resposta do espectrofotômetro ou do colorímetro.

#### CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle de qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens.

#### RASTREABILIDADE

O padrão do kit é rastreável ao material de referência ERM-AD454.

#### VALORES DE REFERÊNCIA

Os valores de referência, em U/mL, para o presente método foram obtidos através da determinação de TGP em populações sadas do sexo masculino e feminino.  
TGP ..... 4 a 32 U/mL.  
Para converter os valores de U/mL em unidades internacionais (IU), multiplicar por 0,462.  
Estes valores devem ser usados como orientação, sendo que cada laboratório deverá criar sua faixa de valores de referência, de acordo com a população estudada.  
Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

#### DESEMPENHO DO PRODUTO

##### CONTROLE DE QUALIDADE

###### Exatidão

**RECUPERAÇÃO**  
A análise de recuperação do kit Transaminase TGP foi feita com 25 determinações de amostras. As exatidões foram calculadas e se encontraram em boa concordância com os valores de referência, obtendo uma recuperação entre 95 e 105%.

##### COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA

O kit Transaminase TGP foi comparado com outro método para dosagem de TGP comercialmente disponível. Foram realizadas 07 análises e os resultados foram avaliados. A equação linear obtida foi  $y = 0,993x + 0,107$  e o coeficiente de correlação 0,999. Com estes resultados, pode-se concluir que o kit apresenta boa especificidade metodológica.

##### Preção

###### REPETIBILIDADE

A repetibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração média (U/mL)	14,46	23,10	36,40
Desvio Padrão (U/mL)	0,51	0,79	0,94
Coefficiente de Variação (%)	3,53	3,41	2,96

###### REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração média (U/mL)	14,50	23,95	36,17
Desvio Padrão (U/mL)	0,05	0,23	0,21
Coefficiente de Variação (%)	0,34	0,95	0,59

##### Sensibilidade

A sensibilidade foi calculada a partir de 20 determinações de uma amostra senta de TGP. A média encontrada foi 2,369 U/mL, com desvio padrão de 0,012 U/mL. A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método, corresponde a média mais 3 vezes o desvio padrão, e é igual a 3,424 U/mL.

##### SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

O aumento da atividade da enzima Alanina Amino Transferase - TGP/ALT (de origem citoplasmática) reflete as alterações de vários tecidos. A maior atividade desta enzima está localizada no tecido hepático. Menores atividades ocorrem no músculo esquelético, coração, rins e pâncreas. Sua atividade encontra-se aumentada na hepatite viral e tóxica (20 - 50 ou 100 vezes o VRI), bem como em outras doenças hepáticas (DH), associadas à necrose hepática. Nas DH crônicas, associadas à necrose celular, devido ao aumento da liberação de AST (mitocondrial), pode ocorrer inversão na reação ALP/AST. Ocorre, ainda, aumento de seus níveis na mononucleose infecciosa e nas colitesais intra e extra hepáticas.

#### NÚMERO DE TESTES

200 Testes / 100 µL de Amostra / 3 mL de Reagente

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - CABAL, P., LEEPER, R., WROBLEWIKI, F., Am. J. Clin. Path. 26: 1101, 1956;
- 2 - LA DUE, J. S., WROBLEWIKI, F., KARMEN, A., Science 120:497, (1954);
- 3 - MOHUN, A. F., COOK, I. J. Y., Am. J. Clin. Path. 27:235, 1957;
- 4 - WROBLEWIKI, F., CABAUD, P., Am. J. Clin. Path. 27:235, 1957;
- 5 - TONKIN, D. B., Clin. Chem. 9: 217, 1963.

#### GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para o consumo, todos os reagentes Bioclin são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

#### QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 32 - Santa Branca  
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil  
Tel.: (31) 3436.5454 - Fax: (31) 3439.5455  
E-mail: [bioclin@bioclin.com.br](mailto:bioclin@bioclin.com.br)  
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

#### OBELIS S.A.

S/S. General Gattai, 53  
1030 Brussels, Belgium

#### ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Atendimento ao Cliente  
Tel.: 0800 0315454  
E-mail: [sac@bioclin.com.br](mailto:sac@bioclin.com.br)

Número de registro do kit Transaminase TGP na ANVISA: 10269360140

Revisão: Maio/2013

Português 2/2

#### SIMBOLÓGIA UNIVERSAL

REF	NÚMERO DE CATÁLOGO	FABRICAÇÃO POR
LOT	NÚMERO DO LOTE	CONTROLE
DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
DATA DE VALIDADE		CONTROLE NEGATIVO
NÍVEL DE TEMPERATURA PARA USO		RECU HIGIÊNICO
O CONTÉUDO DO KIT É PARA USO EM TESTES		INFAMMÁVEL
CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
PRODUTO SUJEITO A REGULAÇÃO		TÓXICO
REPRODUTIVO EUROPEU AUTORIZADO		MARCA CE
PROTEJA DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZE SEMPRE SEM ESTIVER LIMPIANDO



## An alternative derivatization method for the analysis of amino acids in cerebrospinal fluid by gas chromatography–mass spectrometry



Maria José Nunes de Paiva<sup>a,c</sup>, Helvécio Costa Menezes<sup>a</sup>, Paulo Pereira Christo<sup>d</sup>, Rodrigo Ribeiro Resende<sup>b</sup>, Zenilda de Lourdes Cardeal<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG 31270901, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG 31270901, Brazil

<sup>c</sup> Universidade Federal de São João Del Rei – CCO, Av. Sebastião Gonçalves Coelho, 400, Divinópolis, MG 35501296, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, Av. Francisco Sales, 1111, Belo Horizonte, MG 30150-221, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 January 2013

Accepted 17 May 2013

Available online 25 May 2013

#### Keywords:

L-Amino acids

Microwave-assisted derivatization

Gas chromatography

Mass spectrometry

### ABSTRACT

The determination of the concentrations of L-amino acids in cerebrospinal fluid (CSF) has been used to gain biochemical insight into central nervous system disorders. This paper describes a microwave-assisted derivatization (MAD) method using N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) as a derivatizing agent for determining the concentrations of L-amino acids in human CSF by gas chromatography with mass spectrometry (GC/MS). The experimental design used to optimize the conditions showed that the optimal derivatization time was 3 min with a microwave power of 210 W. The method showed good performance for the validation parameters. The sensitivity was very good, with limits of detection (LODs) ranging from 0.01  $\mu\text{mol L}^{-1}$  to 4.24  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and limits of quantification (LOQs) ranging from 0.02 to 7.07  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . The precision, measured using the relative standard deviation (RSD), ranged from 4.12 to 15.59% for intra-day analyses and from 6.36 to 18.71% for inter-day analyses. The coefficients of determination ( $R^2$ ) were above 0.990 for all amino acids. The optimized and validated method was applied to the determination of amino acid concentrations in human CSF.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Quantitative measurements of metabolites in biological systems have an important role and have been applied to the diagnosis of diseases, such as diabetes, cancer, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease [1–7]. Among these molecules are amino acids [8,9]. The presence and levels of free amino acids (FAAs) in body fluids can be early indicators of neurological disease [6,10] and can be used to diagnose inborn errors of metabolism [11].

The analysis of amino acids in body fluids is often performed using chromatographic methods. In the reference method, amino acids are analyzed by ion-exchange liquid chromatography followed by post-column ninhydrin derivatization and UV detection [12]. Methods described more recently include HPLC with photodiode array and fluorescence detection [13], liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) with electrospray ionization [8,14–16] and ultra-high-performance-liquid-chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) [11,17]. However, analysis by liquid

chromatography can be time-consuming [17] and expensive [14], and the sensitivity is often low [11].

Gas chromatography with mass spectrometry detection is regarded as the gold standard in metabolite analysis due to the technical advantages, such good separation, high sensitivity, robustness, and large spectrum libraries [3,18,19]. Whenever the metabolites of interest are nonvolatile in the original sample, sample derivatization is required [20–23]. When analyzing amino acids by GC/MS, several reagents are used for derivatization, including methyl chloroformate, heptafluorobutanol, and trifluoroacetic anhydride [19,22,24].

Silylation is commonly used to analyze metabolites by GC/MS, and pyridine, which is used as an acid scavenger, is often added before the silylating agent [9,25,26]. The silylation of amino acids involves the simultaneous reaction of the amino and carboxyl groups in a single step, and when a microwave is used for heating, the reaction time significantly shorter. In comparison with derivatization using conventional heating, derivatization using microwave heating has a better relative response ratio and results in fewer artifacts in the analysis of compounds such as amino acids, sugars, and fatty acids [9]. There are few gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS) methods described for the analysis of amino acids in biological fluids using silylating reagents [27,28]. The GC/MS methods described in the literature using other derivatizing reagents

\* Corresponding author. Tel.: +55 3134095725; fax: +55 3134095700.

E-mail addresses: [zenilda@ufmg.br](mailto:zenilda@ufmg.br), [zenilda.cardeal@gmail.com](mailto:zenilda.cardeal@gmail.com) (Z.d.L. Cardeal).

have high resolutions; however, glutamic acid and tryptophan, which are important in the diagnosis of neurological disorders, are not detected [22], and serine and threonine cannot be measured reliably due to secondary interactions with these analytes [14].

The aim of the present study was to develop and validate a reliable and robust alternative gas chromatography/mass spectrometry method based on a simple procedure of extraction and microwave-assisted derivatization (MAD) for the quantification of 16 amino acids, including glutamic acid, serine, and threonine, in cerebrospinal fluid and others biological fluids. This method could be used in metabolomics technologies.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemical and materials

The following amino acids were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA): L-alanine, L-glycine, sarcosine, L-valine, L-leucine, L-isoleucine, L-serine, L-threonine, L-aspartic acid, L-methionine, L-proline, L-cysteine, L-glutamic acid, L-phenylalanine, L-asparagine and L-lysine. HPLC-grade methanol was obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), and BSTFA (*N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) + TMCS (trimethylchlorosilane) (99:1 v/v) and anhydrous pyridine (99.8% m/m) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Methoxyamine hydrochloride (98% m/m) was obtained from Fluka (St. Louis, MO, EUA). Artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing 127  $\mu\text{mol L}^{-1}$  NaCl, 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  KCl, 1.2  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 26  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ , 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ , 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) and 10  $\text{mmol L}^{-1}$  glucose and bubbled with a carbogenic mixture (95% v/v  $\text{O}_2$  and 5% v/v  $\text{CO}_2$ ) was prepared. All reagents were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA). The aCSF was stored at 4 °C and prepared weekly. The standard solutions for each amino acid were prepared at an initial concentration of 1.0  $\text{mg mL}^{-1}$  in  $\text{H}_2\text{O}$  and stored at –20 °C. Primary standard mixtures with a concentration of 10.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  were prepared from the separate standard solutions in  $\text{H}_2\text{O}$  to optimize the microwave-assisted derivatization (MAD) procedure. These working solutions were stored at 4 °C.

### 2.2. Sample preparation and derivatization process

A sample of 200.0  $\mu\text{L}$  of aCSF was transferred to an Eppendorf tube, and 800.0  $\mu\text{L}$  of methanol at –10 °C was added to precipitate the protein. The extraction procedure was adapted from previously described methods [29]. The solution was vortex mixed for 1 min and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at room temperature. Then, 200.0  $\mu\text{L}$  of supernatant was transferred to a glass GC vial and evaporated to dryness at room temperature under  $\text{N}_2$ . Next, 15.0  $\mu\text{L}$  of methoxyamine in pyridine at 20.0  $\text{mg mL}^{-1}$  was added, followed by 35.0  $\mu\text{L}$  of BSTFA with TMCS. The solution was vortexed for 30 s and submitted to microwave irradiation in a domestic microwave oven (700 W power) equipped with a turning table. In all experiments, the vial was always placed at same point to ensure even irradiation. Initially, a set of experiments using varied power operations (high, medium and low) and different heating durations was performed to evaluate the response, reproducibility, and speed of the analysis using MAD.

### 2.3. Sample collection

A total of 16 CSF samples were obtained from hospitalized patients in Santa Casa de Misericórdia de BH (Belo Horizonte, Brazil). Patients presents suspect of bacterial infection (cryptococcal meningitis) with characteristic symptoms and waiting

**Table 1**  
Analytical characteristics of L-amino acid derivatives using select ion monitoring (SIM).

No	Amino acids	Retention time (min) <sup>a</sup>	Identification ions (m/z)	Quantitation ions (m/z)	Linearity ( $R^2$ )	LOD <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	LOQ <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Recovery <sup>b</sup> (%)		Precision <sup>c</sup> (%)	
								Inter	Intra	Inter	Intra
1	L-Alanine	7.64 ± 0.02	116(100)+73(53.6)	116	0.9947	0.38 ± 0.02	0.64 ± 0.03	102 ± 5	11.39	5.08	
2	Glycine	7.42 ± 0.01	102(100)+73(68.4)	102	0.9906	0.40 ± 0.02	0.66 ± 0.03	110 ± 5	15.46	4.41	
3	Sarcosine	7.86 ± 0.02	116(100)+73(52)	116	0.9934	0.33 ± 0.02	0.54 ± 0.03	98 ± 6	18.71	6.08	
4	L-Valine	9.21 ± 0.02	144(100)+73(40.6)	144	0.9927	0.18 ± 0.01	0.30 ± 0.02	115 ± 7	13.08	6.36	
5	L-Leucine	10.13 ± 0.02	158(100)+73(42.4)	158	0.9900	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.01	121 ± 14	16.46	11.98	
6	L-Isoleucine	10.53 ± 0.02	158(100)+73(50.4)	158	0.9939	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.01	117 ± 12	17.74	10.11	
7	L-Serine	11.64 ± 0.02	73(100)+204(75.2)	204	0.9917	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.01	125 ± 9	19.06	7.07	
8	L-Threonine	12.09 ± 0.02	73(100)+218(46.0)	218	0.9931	0.36 ± 0.01	0.60 ± 0.02	128 ± 5	17.07	4.12	
9	L-Methionine	14.16 ± 0.02	176(100)+128(60.0)	176	0.9976	0.12 ± 0.01	0.20 ± 0.02	126 ± 5	18.48	8.61	
10	L-Aspartic acid	14.18 ± 0.02	73(100)+232(81.2)	232	0.9928	0.10 ± 0.01	0.17 ± 0.01	123 ± 11	17.06	4.19	
11	L-Proline	14.25 ± 0.02	156(100)+73(53.6)	156	0.9915	1.05 ± 0.12	1.74 ± 0.20	119 ± 14	6.36	6.09	
12	L-Cysteine	14.71 ± 0.02	73(100)+220(88.8)	220	0.9750	2.43 ± 0.36	4.04 ± 0.60	128 ± 16	18.22	15.04	
13	L-Glutamic Acid	15.63 ± 0.03	246(100)+128(32.4)	246	0.9955	0.010 ± 0.001	0.02 ± 0.01	129 ± 9	17.88	7.58	
14	L-Phenylalanine	15.77 ± 0.02	218(100)+192(71.2)	218	0.9911	0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.01	121 ± 8	18.13	6.48	
15	L-Asparagine	16.43 ± 0.03	116(92.40)+231(51.2)	231	0.9934	0.12 ± 0.02	0.19 ± 0.03	97 ± 14	17.78	15.30	
16	L-Lysine	16.80 ± 0.03	84(100)+156(55.6)	156	0.9957	4.24 ± 0.60	7.07 ± 0.96	88 ± 12	17.58	15.59	

<sup>a</sup> Mean ± standard deviation ( $n = 10$ ).

<sup>b</sup> Mean ± standard deviation ( $n = 5$ ).

<sup>c</sup> Relative standard deviation ( $n = 5$ ).

**Table 2**  
Experimental 2<sup>3</sup> two-level full factorial and Doehlert design for L-amino acid extraction.

Design	Variables	Low level	High level	Significance
Factorial 2 <sup>3</sup>	Derivatization time (min)	2.0	4.0	Yes
	Microwave power (W)	140 (20%)	280 (40%)	Yes
	Amount derivatization reagent (μL)	40	100	No
Doehlert	Derivatization time (min)	2; 2.5; 3; 3.5; 4		
	Microwave power (W)	140 (20%); 210 (30%); 280 (40%)		

laboratorial diagnostic to effective suppressive therapy. The patients were screened in accordance with the guidelines established by the research ethics board (protocol N 082/2010). All samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use or sample preparation [30].

#### 2.4. Gas chromatography mass spectrometric analysis

The amino acid analysis was performed using a Shimadzu (Kyoto, Japan) model GC-2010/QP-2010 high-performance quadrupole GC/MS system. The mass spectrometer was operated in electron impact (EI) mode at 70 eV. Separation of the analytes was performed on a Restek (Bellefont, PA, USA) chemically bonded Rtx-5MS fused-silica capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm id  $\times$  0.25 μm film thickness) containing 5% diphenyl/95% dimethylpolysiloxane. The oven temperature program was as follows:  $80^{\circ}\text{C}$ , ramp to  $200^{\circ}\text{C}$  at  $8^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ , ramp to  $300^{\circ}\text{C}$  at  $30^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ , and hold at  $300^{\circ}\text{C}$  for 3 min. The injector was operated at  $280^{\circ}\text{C}$  in splitless mode for 3 min, followed by a 1:20 split ratio (RD). Helium with a purity of a 99.999% was used as the carrier gas at a flow rate of  $1.0\text{ mL min}^{-1}$ . Samples were injected manually with a  $10.0\ \mu\text{L}$  Hamilton micro syringe (Reno, NV, USA) in splitless mode with a 1 minute vent open time, and a volume of  $1.0\ \mu\text{L}$  was injected. The ion source temperature was  $200^{\circ}\text{C}$ , and the GC/MS interface was kept at  $260^{\circ}\text{C}$ . For identification and confirmation, each amino acid solution was prepared separately for derivatization under the optimized conditions. A  $1.0\ \mu\text{L}$  aliquot was injected into the GC/MS, and the analysis was performed in full scan mode (range 45–300  $m/z$ ) with a scan time of 2 scans  $s^{-1}$ . The retention times achieved and the ions that were used for identification and quantification are shown in Table 1. The quantification was performed using single ion monitoring (SIM). Signal acquisition and data processing were performed using the Shimadzu LabSolutions software (Kyoto, Japan). A domestic Philco model PRC-700W microwave (São Paulo, Brazil) was used for the MAD.

#### 2.5. Experimental design

For the optimization step, all the experiments were performed with aCSF. A study was conducted using a 2<sup>3</sup> two-level full factorial design (FFD) to investigate the following variables: derivatization time, microwave power, and amount of derivatization reagent. The experimental values of these variables are presented in Table 2. The minimum and maximum levels of the parameters were selected based on protocols that use MAD [13,24]. The Doehlert design (Table 2) was applied using the most significant variables with the objective of reaching the optimum region of the investigated area. When applied to two variables, the Doehlert design requires performing seven experiments [29]. The experimental response ( $Y$ ) as a function of the variables ( $X_1$  and  $X_2$ ) is given by Eq. (1):

$$Y = b_0 + b_1(X_1) + b_2(X_1)(X_1) + b_3(X_2) + b_4(X_2)(X_2) + b_5(X_1)(X_2) \quad (1)$$

where  $b_0$  is the constant term,  $b_1$  and  $b_3$  are the coefficients for the linear terms,  $b_2$  and  $b_4$  are the coefficients for the quadratic terms, and  $b_5$  is the coefficient for the interaction between the two factors. The fitting of the model was validated using analysis of variance

(ANOVA).  $P$ -values smaller than 0.05 were considered significant. However, because this procedure used multiresponse tests, it was necessary to use the desirability function to obtain a simultaneous and satisfactory compromise between all the responses. This approach is defined as the geometric mean of the individual desirabilities. The desirability function transforms an estimated response into a scale-free value, called the desirability ( $d_i$ ). The desirability is a value between 0 and 1 and increases as the corresponding response value becomes more desirable [30]. The overall desirability ( $D$ ), another value between 0 and 1, is the geometric mean of the individual desirability values ( $d_i$ ):

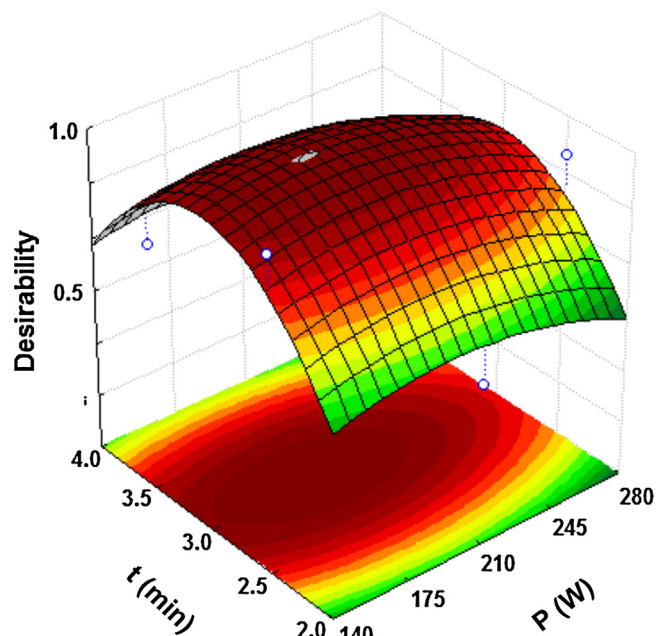
$$D = (d_1 d_2 \dots d_n)^{1/n} \quad (2)$$

Then, the optimal setting is determined by maximizing  $D$ . All the statistical analyses were performed using the statistical package Statistica 8.0 for Windows from StatSoft Inc. (Tulsa, OK, USA).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimization procedure

The analysis of the effects using Pareto charts showed that the derivatization time and microwave power had significant effects on the derivatization of the amino acids (for a  $p < 0.05$ ). The amount of the derivatization reagent did not have a significant effect. In addition, an important interaction was observed between the derivatization time and the microwave power for the derivatization of the amino acids. For this reason, these two parameters were used in a Doehlert design, and the amount derivatization reagent was set to  $50.0\ \mu\text{L}$ . The experimental conditions for the Doehlert



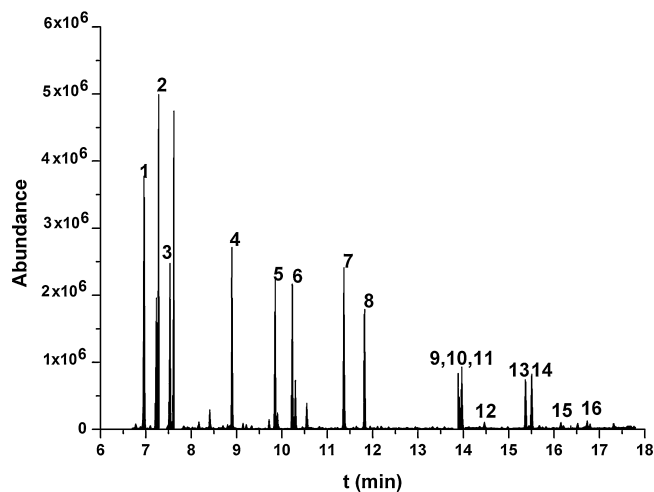
**Fig. 1.** Response surface for the combined desirability obtained from the Doehlert design experiments for all L-amino acids.



**Table 3**  
Comparison with published methods.

Reference	Derivatization (time)	Method	LOQ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Precision (reproducibility)	Accuracy (recovery)	Number of amenable analytes	Matrices	Runtime
Schwarz et al. [13]	OPA-3MPA <sup>1</sup>	HPLC/DAD	12(citrulline) 423(glutamate)	1.6–5.9%	90–110%	23	Plasma	130 min total time analysis
Kaspar et al. [14]	iTRAQ <sup>2</sup> (30 min)	LC-MS/MS	0.5–50	≤18.34%	91–106%	20 L-AA	Urine	25 min
Kaspar et al. [14]	PCF <sup>3</sup> (30 min)	GC/MS	0.3–30	≤21.18%	98–111%	18 L-AA	Urine	20 min
Waldhier et al. [22]	MeOH/MCF <sup>4</sup>	GC-MS Rt- $\gamma$ DEXsa column	0.07–31.25	≤5%	87.2–119.3%	10 L-AA	Plasma and urine	42 min
Waterval et al. [11]	Undersaturated	UPLC-MS/MS	40–287	6–10%	90–100%	22 L-AA	Plasma and urine	30 min
Visser et al. [17]	s-(NIFE) <sup>5</sup> (20 min)	UPLC-MS/MS	No report	3–18% CSF	85.5–102.6%	19 D-AA	CSF, Plasma and urine	25 min
Present study	BSTFA <sup>6</sup> (3 min)	GC/MS	0.02–7.07	6.4–18.7%	88–129%	16 L-AA	CSF	21 min

1 – O-phthalaldehyde 3-mercaptopropionic acid. 2 – isobaric tags for relative and absolute quantitation. 3 – propyl chloroformate. 4 – methanol/ethyl chloroformate. 5 – sodium tetraborate solution in acetonitrile and hydrochloric acid. 6 – N,O-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide.



**Fig. 2.** Chromatographic profiles of the L-amino acid mixture ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) in aCSF. The component numbering is given in Table 1.

design for the real and coded values of each factor are shown in Table 2. To assess the effect of each variable on the response, the variables were coded to eliminate the influence of their different magnitudes. The central point was obtained in triplicate and was used to estimate the experimental error. An estimation of the coefficients ( $b_0 - b_5$ ) of the second-degree polynomial model indicated by equation 1 was performed using the experimental responses. The level of significance for each regression was calculated by ANOVA and showed that the models fit well. The predictive ability under the experimental conditions used was assessed by the fractions of the explained variations ( $R^2$ ), which ranged from 0.965 to 0.982. The response surfaces obtained from the regression models of each analyte were then combined using the desirability function, in which the geometric mean of the responses was computed. The desirability function can have a value ranging from 0 (undesirable) to 1 (desirable). Fig. 1 shows the desirability profile combined for all the amino acids according to the derivatization time and microwave power. The desirable conditions for the derivatization of all amino acids studied were 3 min for the derivatization time and 210 W for the microwave power. Fig. 2 shows the chromatogram obtained using these conditions.

### 3.2. Quality control and quality assurance

Linearity was established for all the analytes using CSF spiked with analytes in the concentration range of  $0.1 - 133.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Six concentrations were analyzed, with three measurements at each concentration. Because of the homoscedasticity of the instrumental responses, linear models for the calibration curves were constructed by the ordinary least squares method. The instrumental response was found to be linear in the range of concentrations studied, with coefficients of determination ( $R^2$ ) above 0.990 ( $p < 0.05$ ) for all amino acids except cysteine (0.975). The detection limits (LODs) and quantification limits (LOQs) were calculated from 10 measurements with 95% confidence according to the Eurachem Guidelines [31]. The amino acids had LODs between  $0.01 \mu\text{mol L}^{-1}$  and  $4.24 \mu\text{mol L}^{-1}$ , and the range of the LOQ was  $0.02 - 7.07 \mu\text{mol L}^{-1}$ . The recovery test was performed with CSF samples spiked with  $0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $10.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  and  $100.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  of each amino acid. The concentrations were calculated using a calibration curve prepared using the aCSF matrix. The accuracy was then calculated for each amino acid and ranged from 88.5 to 129%. Three identical aCSF matrices were spiked with  $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $10.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  and  $100.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  of each amino acid to determine the intra-day and inter-day precision values. To

**Table 4**  
Median L-amino acid concentrations and concentration ranges ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) in samples of human CSF ( $n = 16$ ).

	Median	Range ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
L-Alanine	19.94	10.70–81.91
Glycine	6.88	5.59–14.41
Sarcosine	4.86	4.08–10.14
L-Valine	9.32	6.70–51.65
L-Leucine	6.70	5.02–29.59
L-Isoleucine	4.15	3.35–7.03
L-Serine	7.92	6.14–13.06
L-Threonine	7.58	4.52–10.55
L-Aspartic acid	10.43	9.91–20.53
L-Methionine	6.21	6.18–12.39
L-Proline	375	155.58–480.18
L-Cysteine	1046.72	550.27–2590.45
L-Glutamic acid	13.00	8.22–16.58
L-Phenylalanine	4.80	2.83–16.80
L-Asparagine	1.10	0.25–3.90
L-Lysine	10.37	9.74–20.47

determine the intra-day precision, the spiked CSF samples were derivatized independently and analyzed in one run. To determine the inter-day precision, spiked CSF samples were processed on three consecutive days. The precision was represented by the relative standard deviation (RSD). The intra-day precision ranged from 4.12 to 15.59%, and the inter-day precision ranged from 6.36 to 18.71%. These values are consistent with those obtained in other studies [21,26]. Table 1 lists the results of the method validation experiments. The Table 3 show a comparison of various published methods to analysis of amino acids in biological fluids. Our study presents advantages such as shorter time for derivatization (3 min), lower limits of quantification, below the expected levels of amino acids on biological fluids, and low cost per analysis. The optimized method also showed excellent reproducibility with RSD between 6.4 and 18.7% and the analytes studied are used to laboratorial diagnosis. However, amino acids such arginine and histidine cannot be analyzed by GC/MS due to the thermal instability to the derivatives. Relative to recovery the range is larger than published methods, moreover, is acceptable to GC/MS methods.

### 3.3. Application of the method to samples of CSF

The validated MAD–GC/MS method for the determination of amino acid concentrations was used to analyze human CSF samples from 16 patients with AIDS. The results, reported in Table 4, indicate that this method had good performance with respect to the detection and quantification of amino acids when applied to real samples of human CSF. All 16 amino acids were detected, and the median concentrations of L-amino acids varied from 1.10 to 1046.72  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , with much higher concentrations observed for L-cysteine, L-proline, and L-alanine. L-Cysteine had the largest range, 550.27–2590.45  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , whereas L-asparagine had the smallest range, 0.25–3.90  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . The elevated levels of L-cysteine recorded in the present study could be the release of toxins since the patients analyzed presented neurological diseases. The values found for the other amino acids were consistent with those from other studies [12,26].

## 4. Conclusions

The results of this study indicate that microwave-assisted derivatization with BSTFA followed by GC/MS analysis is a suitable alternative technique for the determination of amino acid concentrations in human cerebrospinal fluid. An experimental design using a  $2^3$  two-level full factorial design (FFD), a Doehlert design and the desirability function were used to optimize the derivatization parameters. The derivatization process is performed in a

single step, limiting the use of reagents and resulting in a short analysis time. This approach has excellent linearity, good repeatability and reproducibility, and sufficiently low detection and quantification limits. The validated method was successfully applied to the analysis of L-amino acids in human CSF samples from patients with AIDS. Therefore, the proposed analytical protocol is a promising method that could be used in CSF and also to other biological fluids which includes urine, serum and tissues in the clinical diagnosis.

## Acknowledgments

Funding for this study was provided by Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Helvécio Costa Menezes and Zenilda de Lourdes Cardeal are beneficiaries of financial assistance from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

## References

- [1] J.-F. Xia, Q.-L. Liang, P. Hu, Y.-M. Wang, G.-A. Luo, *Chin. J. Anal. Chem.* 37 (2009) 136.
- [2] A. Zhang, H. Sun, P. Wang, Y. Han, X. Wang, *J. Proteomics* 75 (2012) 1079.
- [3] M. Ooi, S. Nishiumi, T. Yoshie, Y. Shiomi, M. Kohashi, K. Fukunaga, S. Nakamura, T. Matsumoto, N. Hatano, M. Shinohara, Y. Irino, T. Takenawa, T. Azuma, M. Yoshida, *Inflamm. Res.* 60 (2011) 831.
- [4] M. Sheikh-Ali, B.S. Karon, A. Basu, Y.C. Kudva, L.A. Muller, J. Xu, W.F. Schwenk, J.M. Miles, *Diabetes Care* 31 (2008) 643.
- [5] C. Tortorella, F. Aragona, G.G. Nussdorfer, *Life Sci.* 65 (1999) 2823.
- [6] A.N. Fonteh, R.J. Harrington, A. Tsai, P. Liao, M.G. Harrington, *Amino Acids* 32 (2007) 213.
- [7] W. Zhang, Y.F. Xie, J. Gu, S.Y. Ai, J. Wang, K. Yamamoto, L.T. Jin, *Analyst* 129 (2004) 229.
- [8] M.P. Stoop, L. Coulier, T. Rosening, S. Shi, A.M. Smolinska, L. Buydens, K. Ampt, C. Stingl, A. Dane, B. Muilwijk, R.L. Luitwieler, P. Smitt, R.Q. Hintzen, R. Bischoff, S.S. Wijmenga, T. Hankemeier, A.J. van Gool, T.M. Luider, *Mol. Cell. Proteomics* 9 (2010) 2063.
- [9] K.A. Kouremenos, J.J. Harynyuk, W.L. Winniford, P.D. Morrison, P.J. Marriott, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 1761.
- [10] B. Toczyłowska, M. Chalimoniuk, M. Wodowska, E. Mayzner-Zawadzka, *Brain Res.* 1104 (2006) 183.
- [11] W.A.H. Waterval, J. Scheijen, M. Ortmans-Ploemen, C.D. Habets-van der Poel, J. Bierau, *Clin. Chim. Acta* 407 (2009) 36.
- [12] J. LeBoucher, C. Charret, C. Coudray-Lucas, J. Giboudeau, L. Cynober, *Clin. Chem.* 43 (1997) 1421.
- [13] E.L. Schwarz, W.L. Roberts, M. Pasquali, *Clin. Chim. Acta* 354 (2005) 83.
- [14] H. Kaspar, K. Dettmer, Q. Chan, S. Daniels, S. Nimkar, M.L. Daviglus, J. Stampler, P. Elliott, P.J. Oefner, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 1838.
- [15] M. Piraud, C. Vianey-Saban, K. Petritis, C. Elfakir, J.P. Steghens, D. Bouchu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 1587.
- [16] M. Piraud, C. Vianey-Saban, C. Bourdin, C. Acquaviva-Bourdain, S. Boyer, C. Elfakir, D. Bouchu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 3287.
- [17] W.F. Visser, N.M. Verhoeven-Duif, R. Ophoff, S. Bakker, L.W. Klomp, R. Berger, T.J. de Koning, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7130.
- [18] M. Vallejo, A. Garcia, J. Tunon, D. Garcia-Martinez, S. Angulo, J.L. Martin-Ventura, L.M. Blanco-Colio, P. Almeida, J. Egido, C. Barbas, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1517.
- [19] H.F.N. Kvitvang, T. Andreassen, T. Adam, S.G. Villas-Boas, P. Bruheim, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2705.
- [20] M. Liebeke, A. Wunder, M. Lalk, *Anal. Biochem.* 401 (2010) 312.
- [21] J. Kopka, *J. Biotechnol.* 124 (2006) 312.
- [22] M.C. Waldhier, K. Dettmer, M.A. Gruber, P.J. Oefner, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 1103.
- [23] M. Mandalakis, M. Apostolaki, E.G. Stephanou, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 143.
- [24] H. Kaspar, K. Dettmer, W. Gronwald, P.J. Oefner, *J. Chromatogr. B* 870 (2008) 222.
- [25] H. Wu, R. Xue, L. Dong, T. Liu, C. Deng, H. Zeng, X. Shen, *Anal. Chim. Acta* 648 (2009) 98.
- [26] D.S. Wishart, M.J. Lewis, J.A. Morrissey, M.D. Flegel, K. Jeroncic, Y. Xiong, D. Cheng, R. Eisner, B. Gautam, D. Tzur, S. Sawhney, F. Bamforth, R. Greiner, L. Li, *J. Chromatogr. B* 871 (2008) 164.

- [27] C.H. Deng, X.Y. Yin, L.J. Zhang, X.M. Zhang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 2227.
- [28] H.-R. Yoon, *Arch. Pharm. Res.* 30 (2007) 387.
- [29] A. Jiye, J. Trygg, J. Gullberg, A.I. Johansson, P. Jonsson, H. Antti, S.L. Marklund, T. Moritz, *Anal. Chem.* 77 (2005) 8086.
- [30] T. Rosenling, M.P. Stoop, A. Smolinska, B. Muilwijk, L. Coulier, S.N. Shi, A. Dane, C. Christin, F. Suits, P.L. Horvatovich, S.S. Wijmenga, L.M.C. Buydens, R. Vreeken, T. Hankemeier, A.J. van Gool, T.M. Luider, R. Bischoff, *Clin. Chem.* 57 (2011) 1703.
- [31] EURACHEM, *Guide to Quality in Analytical Chemistry na AID to Accreditation*, in: CITAC/EURACHEM, 2002.

## Research Article

# Microwave-Assisted Derivatization of Bile Acids for Gas Chromatography/Mass Spectrometry Determination

Maria José Nunes de Paiva,<sup>1,2</sup> Helvécio Costa Menezes,<sup>1</sup> and Zenilda de Lourdes Cardeal<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627 Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João Del Rei, Avenida Sebastião Gonçalves Coelho 400 Chanadour, 35501-296, Divinópolis, MG, Brazil

Correspondence should be addressed to Zenilda de Lourdes Cardeal; [zenilda.cardeal@gmail.com](mailto:zenilda.cardeal@gmail.com)

Received 8 July 2013; Accepted 7 August 2013

Academic Editors: D. J. Fletouris, R. K. Jyothi, A. Przyjazny, and I. Zhukov

Copyright © 2013 Maria José Nunes de Paiva et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Bile acids derived from cholesterol are produced in the liver, and their analysis is difficult due to their complex natures and their low concentrations in biological fluids. Mixtures of various derivatives, created via conventional heating, are used for such analyses. Microwave radiation is proposed to accelerate the derivatization process. This paper presents a mass fragmentation study and microwave-assisted derivatization (MAD) for the silylation of bile acids (cholic and ursodesoxycholic) prior to gas chromatography and mass spectrometry analysis. The derivatization was performed using the two-step process of methoximation and silylation. The reaction time, power, and quantity of N,O-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) + 1% trimethylchlorosilane (TCMS) were optimized to improve the derivatization. The optimized derivatization conditions required 210 W for 3 min. The MAD method exhibited linearity with respect to cholic acid between 0.78 and 20.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  with an LOQ of 0.23  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and a precision ranging from 1.08% to 9.32% CV. This optimized derivatization method is valid for the analysis of bile acids in different matrices.

## 1. Introduction

Bile acids (BAs) are steroidal compounds synthesized in the liver during cholesterol metabolism, and their major structural components include a steroid nucleus with a side chain and carboxyl groups [1–3]. BAs are predominantly present in biological fluids in their ionized form. The composition of BA in serum and urine varies with different physico-chemical properties and the rate of intestinal absorption by the liver [2, 4]. Its hepatic and intestinal metabolism can also be influenced by liver and gastrointestinal diseases. Therefore, modifications to the hepatic synthesis, intracellular metabolism, hepatic uptake, and biliary excretion can result in a disturbance in the metabolism of bile acids [1, 4, 5]. An increase in blood bile salts appears to result from changes in their hepatocellular uptake that are induced by chemical substances and can serve as a biological marker for the detection of liver damage [1, 4–6].

Bile acids are present in serum and urine at millimolar levels, and due to large differences in their chemical properties, such as lipophilicity and polarity, their separation and identification require accurate and sensitive methods. Several analytical methods based on chromatography techniques have been reported for detecting bile acids in biological fluids [1, 7–9]. Liquid chromatography (LC) coupled with evaporative light-scattering detection (ELSD) or conventional UV-Vis detection have limited sensitivity [1]. Iida et al. [8] proposed a gas chromatography method using flame ionization detection (GC/FID) to analyze derivatized BA.

In analytical procedures using gas chromatography, derivatization is utilized to generate compounds with better volatility and thermal stability. For GC analysis, molecules such as aldehydes, carboxylic acids, esters, and phenols are of concern due to their ability to form hydrogen bonds between compounds, which can lead to low volatility, insufficient thermal stability, or an interaction with the solid column packing [10–13].

The most common reactions used in GC analysis are silylation, acylation, alkylation, and condensation [14]. The derivatization of the  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ , and oxo-functional groups present in bile acid molecules can modify a compound to increase its volatility and improve its thermal stability, but this procedure increases the total time required for the analysis [1, 3, 15–18].

Silylation is the most established derivatization technique, with common reagents including N-methyl-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA), N,O-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA), N-(t-butyltrimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA), trimethylchlorosilane (TMCS), and trimethylsilylimidazole (TMSI) used in the analysis of compounds such as estrogen steroids [19, 20], bile acid in aqueous environments [16, 21], and metabolomics [10, 22].

This derivatization reaction should be performed using controlled temperature and time to prevent the formation of additional unexpected derivatives (artifacts). Imprecise control over the derivatization parameters might significantly enhance the interference of the compound's concentration. Otherwise, hydroxyl groups are likely silylated at room temperature [23]. The strength of donor silyl groups represents another possibility for improving the derivatization using reagents such as TMSI, BSTFA, and MSTFA, the first of which are the strongest donors of a silyl group. Recently, Zhou et al. [20] reported that the addition of 0.5% TMSI in BSTFA or MSTFA effectively prevents the formation of multiple trimethylsilyl derivatives in the derivatization of ethinylestradiol and enhances the derivatization efficiency. The silylation reaction is a nucleophilic substitution on the silicon atom of the silyl donor. The TMSI activates the hydroxyl groups and serves as an acid scavenger by removing the acidic products [20]. In a conventional derivatization, the time is fundamental to reaction completion, but conventional derivatization is not as rapid as microwave heating. As with conventional derivatization, microwave-assisted derivatization requires the power and time to be optimized for complete derivatization and to avoid the formation of artifacts. Kumar et al. [24] used four derivatization mixtures: MSTFA + 1% TMCS, BSTFA + 1% TMCS, MSTFA :  $\text{NH}_4\text{I}$  : DTE, MSTFA : TMSI : TMCS, and BSTFA : pyridine [24].

Various methods for the derivatization of bile acids are described in the literature using gas chromatography with conventional derivatization [7, 16, 21, 25]. The method proposed by Tyagi et al. [25] silylated the bile acids with the addition of BSTFA/pyridine (1 : 1, v/v) at  $60^\circ\text{C}$  for 30 min. In another method proposed by Casas-Catalán et al. [26], the bile acids were identified using a derivatization method that combines the formation of ethyl esters from the carboxylic group using ethyl chloroformate (ECF) with the trimethylsilyl ethers from the hydroxyl group using trimethylsilylimidazole (TMSI) at  $40^\circ\text{C}$  for 20 min. To optimize the sensitivity, many derivatization mixtures were tested by Kumar et al. [24], including MSTFA/ $\text{NH}_4\text{I}$ /DTE (500 : 4 : 2, w/w/w,  $40\ \mu\text{L}$  at  $60^\circ\text{C}$  for 30 min), MSTFA/TMSI/TMCS (100 : 2 : 5, v/v/v,  $40\ \mu\text{L}$  at  $60^\circ\text{C}$  for 30 min), MSTFA/TMCS (100 : 1, v/v,  $40\ \mu\text{L}$  at  $60^\circ\text{C}$  for 30 min), and BSTFA/TMCS (100 : 1, v/v,  $40\ \mu\text{L}$  at  $60^\circ\text{C}$  for 30 min). These authors concluded that the

MSTFA/ $\text{NH}_4\text{I}$ /DTE mixture exhibited improved stability and MS fragment abundance [24, 25]; however, the time required for the derivatization was 10-fold longer than that required for microwave-assisted derivatization. Several reagent mixtures have been tested for the derivatization (silylation) of bile acids and have been found to improve the sensitivity and efficiency without reducing the derivatization time [24]. Recently, Ranz et al. [27] and Kouremenos et al. [10] evaluated the potential of microwave-assisted derivatization for different analytes, such as herbicides and metabolites; however, they did not examine microwave irradiation for the derivatization of the bile acids. Microwave-assisted derivatization (MAD) has the additional advantage of reducing the analysis time [28, 29]. The microwave energy does not directly induce chemical reactions or degradation, but it efficiently heats the reagent mixtures via “microwave dielectric heating.” This reaction is attributed to the rapid transfer of energy and the ability of the material to absorb the microwaves. In addition, this process reduces the energy demand, increases the ease of use, and eliminates the need to heat the reaction vial [30]. Kouremenos et al. [10] studied the derivatization of many classes of compounds (sugars and keto acids) and demonstrated that the amino acids present in a mixture exhibit incomplete derivatization and require additional time to react. The conventional derivatization methods for bile acid analysis may require an extended time (50 to 120 minutes), but the use of microwaves can decrease this time to a few minutes and provide a safer heating method. The present study describes an analytical procedure for determining bile acids via gas chromatography/mass spectrometry using microwave-assisted derivatization.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Bile Acid Standards.** The following bile acids were included in this study: cholic acid (CA; 98%) and ursodesoxycholic acid (UDCA; 99%) purchased from Sigma-Aldrich Vo. (St. Louis, MO, USA). Methanol (reagent grade) and dichloromethane (chromatographic grade) were obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). The 99.9% MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide), BSTFA (N,O-bis (trimethylsilyl)-trifluoroacetamide) + 1% TMCS and 99.8% pyridine (anhydrous-grade solvents) were purchased from Sigma-Aldrich Vo. (St. Louis, MO, USA), and the methoxyamine PA was obtained from Fluka (St. Louis, MO, USA).

The  $1.0\ \text{mg mL}^{-1}$  bile acid standard solutions were prepared in methanol and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . To optimize the MAD, the standard solutions were diluted to generate individual working standards in dichloromethane/methanol (2 : 1, v/v) at a final concentration of  $1.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$  and stored at  $4^\circ\text{C}$ .

**2.2. Instrumentation and GC/MS Analysis.** The GC/MS analysis was conducted using a Thermo Electron Trace gas chromatographic system from Thermo Scientific Inc. (West Palm Beach, FL, USA) coupled with an POLARIS Q model ion trap spectrometer and equipped with a capillary column



(30 m × 0.25 mm id × 0.25 μm film) containing 5% diphenyl and 95% dimethylpolysiloxane HP-5 ms (Agilent Technology Inc.). The initial oven temperature was 120°C, which was maintained for 1 min. The temperature was increased at a rate of 15°C min<sup>-1</sup> to 250°C; then, it was increased to 300°C at 5°C/min and held for 20 min.

The helium flow was 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The injector was operated at 280°C in the splitless mode for 3 min, followed by a 1:20 split ratio (RD). The mass spectrometer was operated in electron impact mode (EI) at 70 eV. The temperature of the ion source was 200°C and that of the GC/MS interface was 250°C. The analysis was performed in full scan mode (range 50–90  $m/z$ ) with quantification in selected-ion monitoring (SIM) mode using the  $m/z$  426 (cholic acid) and 518 (ursodesoxycholic acid).

A domestic microwave from Philco (model P.R.C, power 10–700 Watts) was used for the MAD derivatization. Xcalibur software from Thermo Finnigan Inc. (West Palm Beach, FL, USA) was used to acquire the signal and process the data.

**2.3. Derivatization Procedure.** A 10-μL working standard solution with a concentration of 1.0 μg mL<sup>-1</sup> was transferred to a glass insert (flat bottomed) and dried at room temperature. Then, 10 μL of methoxyamine in pyridine (20 mg mL<sup>-1</sup>) was added, followed by 50 μL of BSTFA with 1% TCMS. The glass insert was introduced into a GC vial, and the mixture was subjected to heating via microwave irradiation. Initially, the power (160, 240, 320, 480, and 640 W) and time (1, 2, 3, 4, and 5 minutes) were varied to evaluate the response, reproducibility, and speed of the analysis using microwave derivatization. The yield of the microwave derivatization was compared with that of conventional derivatization.

### 3. Results and Discussion

**3.1. Fragmentation Patterns of the Bile Acids.** The fragmentation patterns of the bile acids were studied to identify the different compounds. The  $m/z$  of the molecular ion, the molecular ions without methyl or trimethylsilyl groups, and other fragmentation products in the steroid nucleus were found in greater abundances. The experimental results for the bile acid ions ( $m/z$ ) are presented in Table 1.

In the study of cholic acid, the molecular ion without a methyl group produced an  $m/z$  681 fragment, which was used to identify this compound. However, this fragment presented a lower intensity (15.76%), as shown in Table 1. In contrast, the  $m/z$  253 ion (100% abundance) could not be used to identify or quantify the cholic acid because it is an artifact of the derivatization. The quantity of the  $m/z$  516 ion is related to the loss of 2 TMSOHs. The quantity of the  $m/z$  426 ion is dependent on the loss of 3 TMSOHs (47.94% abundance). This ion was used to identify the cholic acid due to its higher relative intensity. The  $m/z$  428 ion, which corresponds to the compound that lost 2 TMSOHs and Si(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, presents a low intensity, and its total ion chromatogram (TIC) presents many artifacts. The chromatogram and mass spectrum found in Figure 1 demonstrate the efficiency of the cholic acid derivatization.

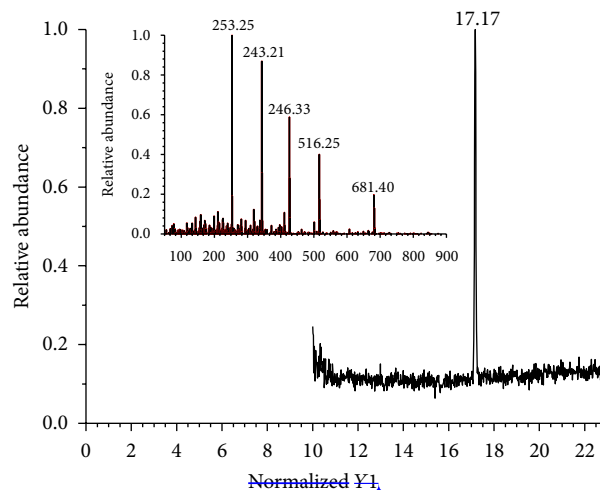


FIGURE 1: Chromatogram and mass spectra of the trimethylsilyl (oxime) ether/ester of cholic acid obtained using microwave radiation for 3 min at 240 W in the positive mode;  $m/z$  426 (1.0 μg mL<sup>-1</sup>).

The conventional derivatization of cholic acid (1 h at 100°C) demonstrated results similar to those obtained using microwave heating (3 min), as shown in Table 1. Furthermore, the same derivative structure was obtained in each step of the procedure using the MAD method to derivatize the bile acids. The trimethylsilyl (oxime) ether/esters of the cholic and ursodesoxycholic acid derivatives were produced at the same power and time as the carboxylic acids and the phenol groups. Therefore, the use of microwaves for heating during the derivatization reduced the reaction time from 60 to 3 minutes. After derivatization, the ursodesoxycholic acid had a molecular ion of  $m/z$  608.5. The  $m/z$  413 ion is produced by the loss of 2 TMSOH + CH<sub>3</sub> and presents a lower intensity (32% abundance). These two ions present more artifacts in the total ion chromatogram (TIC). Another fragment ion is  $m/z$  518, which is formed by the loss of TMSOH (Figure 2).

This fragment has the highest relative intensity (100% abundance) but also corresponds to chenodeoxycholic acid, as demonstrated by Sebok et al. [21]. Thus, the identification and quantification of the ursodesoxycholic after the microwave-assisted derivatization were performed using the  $m/z$  428 ions, as shown in Table 1.

**3.2. Optimization of the Microwave-Assisted Derivatization.** The order by which derivatization was optimized is as follows: the quantity of the methoximation and silylation reagents, followed by the power and time of the microwave irradiation. The silylation was performed on the BSTFA + 1% and TCMS in volumes of 10.0 μL, 20.0 μL, 40.0 μL, 50.0 μL, 60.0 μL, and 100.0 μL. A volume of 40 μL was chosen because it presented the highest peak area. The smaller volumes were insufficient for complete derivatization, and volumes above 40.0 μL resulted in increased artifacts, such as new peaks in the TIC.

TABLE 1: Fragmentation patterns of the bile acid TMS (oximes) derivatives obtained using gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) and the common ions in the fragmentation patterns of cholic acid (conventional and microwave-assisted derivatization) and ursodesoxycholic acid (MAD) presented as relative intensities.

Bile acid	$t_r$ (min)	Selected fragment ions for identification and quantification		Frequent ion in fragmentation			
		$[M]^+$	$[M - 15]^+$	Further abundant fragment ion, $m/z$	$m/z$	Relative intensity (%) microwave	Relative intensity (%) conventional
Cholic	17.19	696.5	681	$[M - 2TMSOH]^+ = 516$	253	100	100
				$[M - (2TMSOH + SiCH_3)]^+ = 428$	426	47.94	56.74
				$[M - 3TMSOH]^+ = 426$	516	32.23	39.61
					681	15.76	14.87
Ursodesoxycholic	17.59	608.5	593	$[M - 2TMSOH]^+ = 428$	413	32	
				$[M - (15 + 2TMSOH)]^+ = 413$	428	56	
					518	100	

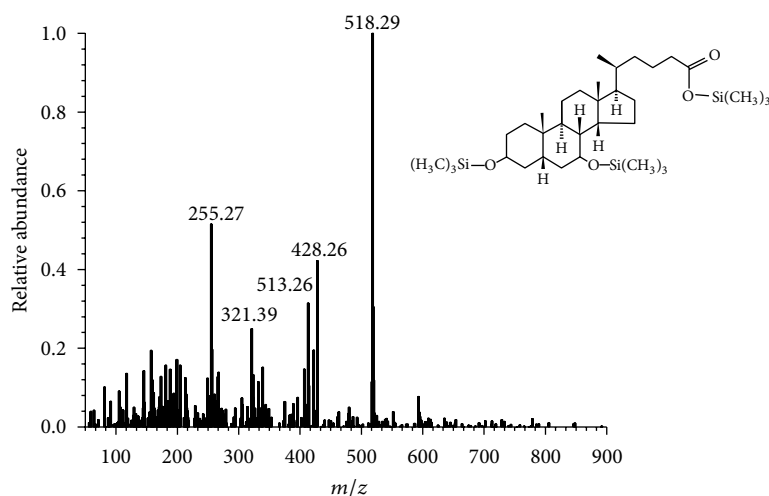


FIGURE 2: Mass spectra of the ursodesoxycholic acid standard trimethylsilyl (oxime) derivative at a concentration of  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  and an  $m/z$  of 518, corresponding to the loss of TMSOH and the presence of a fragmented compound.

The microwave time and power can potentially affect the responses, including the peak area. Therefore, after establishing the reagent quantities, the power (watts) and time (min) were optimized. The analysis held one factor constant while varying the other. The powers studied were 160, 240, 320, 480, and 640 W at a constant time of 1, 2, 3, 4, or 5 minutes. Each condition was tested three times. The optimization results for the derivatization of the bile acids at the various powers and times are presented in Figure 3. Increasing the power and time did not result in improvement in the peak area. Likewise, a higher power at 3 minutes decreased the relative peak areas of the cholic and ursodesoxycholic acids. The same decrease in the peak area can be observed at 1.5 min. The relative responses of the analyte peaks indicate that 240 W at 3 min provided the best sensitivity. In addition, this condition also improved the reproducibility.

The presence of artifacts in the silylation is a common problem with functional groups such as carboxylic acids and

phenols. The bile acids were silylated at these groups. However, optimizing the derivatization reagents can decrease this interference. The formation of artifacts was also observed by Kouremenos et al. [10] and Zhou et al. [20]. The artifacts have not been specifically identified. In addition, the heating and reaction times for conventional derivatization and microwave-assisted derivatization changed as expected.

The highest resolution was achieved with a mixture containing  $10.0 \mu\text{L}$  of bile acid standard,  $20.0 \mu\text{L}$  of methoxyamine, and  $40.0 \mu\text{L}$  of silylation reagent. Figure 4 provides the peak areas obtained using different quantities of silylant. The derivatization results enabled the correct identification and quantification of the bile acids.

Acceptable results were obtained for the derivatization using microwaves as a heating source because the fragmentation patterns are comparable to those obtained by Sebok et al. [21] using conventional derivatization at  $100^\circ\text{C}$  for 60 min to determine bile acids via gas chromatography/mass spectrometry of trimethylsilyl (oxime) ether/ester derivatives.

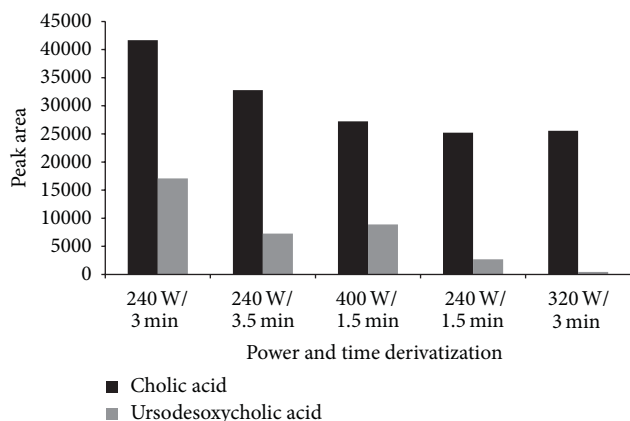


FIGURE 3: Effect of power and time on the yield of the derivatization of bile acids.

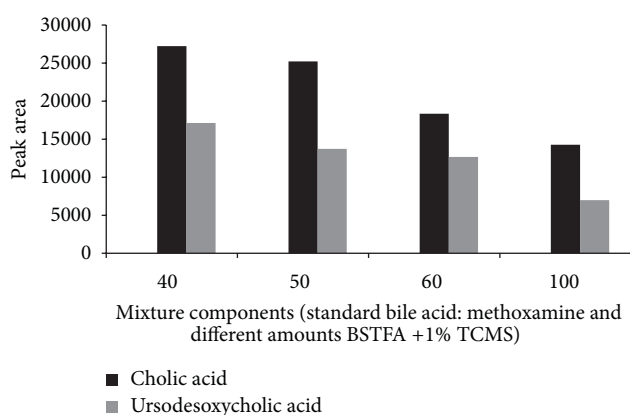


FIGURE 4: Comparison of various derivatization reagent mixtures and bile acids using microwave derivatization.

A 3-fold decrease in the formation of TMS (oxime) ester/ether derivatives was observed when the power was increased from 150 to 300 W, leading to an increase in the irradiation time. The shortest reaction time was 30 min, which was a 10-fold increase in time over that required for microwave derivatization. The MSTFA and BSTFA were used for the silylation of the bile acids; however, neither was required to achieve complete derivatization.

**3.3. Method Validation.** The calibration curve for the cholic and ursodesoxycholic bile acids was constructed at six concentration levels with three replicates for each level. The curve obtained for the cholic acid ( $y = 4849.8x - 764.15$ ) presented good linearity in the range of  $0.78 \pm 0.01$  to  $20.0 \pm 0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$  with  $R^2 = 0.999$  ( $P$  value  $< 0.0001$ ). This range represented 0.129 to 3.30 ng of cholic acid, a quantity smaller than that found by Sebok et al. [21] (0.432 to 3.46 ng). For the ursodesoxycholic acid, the obtained curve ( $y = 4849.8x - 764.15$ ) exhibited good linearity in the range of  $0.44 \pm 0.01$  to  $20.0 \pm 0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$  with  $R^2 = 0.999$  ( $P$  value  $< 0.0001$ ).

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated according to the recommendations of the

EURACHEM Guide [31] through ten consecutive measurements of the blank. The LOD values were  $0.23 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $0.13 \mu\text{g mL}^{-1}$  for cholic acid and ursodesoxycholic acid, respectively. The LOQ values were  $0.78 \mu\text{g mL}^{-1}$  for cholic acid and  $0.44 \mu\text{g mL}^{-1}$  for ursodesoxycholic acid and were lower than those obtained in other studies [21, 24]. To assess the intra-assay precision (repeatability), ten replicates with concentrations of 1.0, 10.0, and  $20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  were analyzed on the same day. For cholic acid, the coefficients of variation were 9.32%, 3.90%, and 1.08%. The ursodesoxycholic acid presented coefficients of variation of 11.71%, 13.02%, and 1.38%. The precisions obtained using this derivatization are similar to those obtained by Damm et al. [28] for the microwave-assisted derivatization of morphine.

## 4. Conclusion

This study presented an alternative method for the gas chromatography/mass spectrometry identification and quantification of bile acids using microwave-assisted derivatization. The fragmentation patterns were evaluated in this study by varying the MAD heating protocol. This procedure was validated and demonstrated precision and linearity. A study of the variables used in the derivatization was performed, and a complete derivatization was obtained only after the addition of methoxyamine. The microwave irradiation did not directly induce the chemical reactions and degradation, but it was an efficient method of heating the reagent mixtures and reduced the sample preparation time required to obtain the derivatized products and properly identify and quantify the bile acids. This derivatization method can be used to analyze bile acids in different matrices, such as urine, serum, or bile. However, the complexity of these biological matrices will require selectivity studies to complement the validation of the proposed method.

## Acknowledgments

Funding for this study was provided by the Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors Helvécio Costa Menezes and Zenilda de Lourdes Cardeal are beneficiaries of financial assistance from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, (CAPES) Brazil.

## References

- [1] I. Burkard, A. von Eckardstein, and K. M. Rentsch, "Differentiated quantification of human bile acids in serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography B*, vol. 826, no. 1-2, pp. 147-159, 2005.
- [2] A. Fini, G. Feroci, and A. Roda, "Acidity in bile acid systems," *Polyhedron*, vol. 21, no. 14-15, pp. 1421-1427, 2002.
- [3] A. K. Batta and G. Salen, "Gas chromatography of bile acids," *Journal of Chromatography B*, vol. 723, no. 1-2, pp. 1-16, 1999.



- [4] A. Roda, F. Piazza, and M. Baraldini, "Separation techniques for bile salts analysis," *Journal of Chromatography B*, vol. 717, no. 1-2, pp. 263-278, 1998.
- [5] A.-M. Montet, L. Oliva, F. Beaugé, and J.-C. Montet, "Bile salts modulate chronic ethanol-induced hepatotoxicity," *Alcohol and Alcoholism*, vol. 37, no. 1, pp. 25-29, 2002.
- [6] M. J. N. de Paiva and M. E. P. B. de Siqueira, "Increased serum bile acids as a possible biomarker of hepatotoxicity in Brazilian workers exposed to solvents in car repainting shops," *Biomarkers*, vol. 10, no. 6, pp. 456-463, 2005.
- [7] T. Iida, S. Ogawa, G. Kakiyama et al., "Capillary gas chromatographic separation of bile acid acyl glycosides without thermal decomposition and isomerization," *Journal of Chromatography A*, vol. 1057, no. 1-2, pp. 171-176, 2004.
- [8] T. Iida, S. Tazawa, T. Tamaru, J. Goto, and T. Nambara, "Gas chromatographic separation of bile acid 3-glucosides and 3-glucuronides without prior deconjugation on a stainless-steel capillary column," *Journal of Chromatography A*, vol. 689, no. 1, pp. 77-84, 1995.
- [9] F. Mashige, N. Tanaka, A. Maki, S. Kamei, and M. Yamanaka, "Direct spectrophotometry of total bile acids in serum," *Clinical Chemistry*, vol. 27, no. 8, pp. 1352-1356, 1981.
- [10] K. A. Kouremenos, J. J. Harynuk, W. L. Winniford, P. D. Morrison, and P. J. Marriott, "One-pot microwave derivatization of target compounds relevant to metabolomics with comprehensive two-dimensional gas chromatography," *Journal of Chromatography B*, vol. 878, no. 21, pp. 1761-1770, 2010.
- [11] C. Schummer, O. Delhomme, B. M. R. Appenzeller, R. Wennig, and M. Millet, "Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis," *Talanta*, vol. 77, no. 4, pp. 1473-1482, 2009.
- [12] A. Shareef, M. J. Angove, and J. D. Wells, "Optimization of silylation using N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tert-butyl dimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1108, no. 1, pp. 121-128, 2006.
- [13] R. J. Wells, "Recent advances in non-silylation derivatization techniques for gas chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 843, no. 1-2, pp. 1-18, 1999.
- [14] J. Drozd, "Chemical derivatization in gas chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 113, no. 3, pp. 303-356, 1975.
- [15] Y. Alnouti, I. L. Csanaky, and C. D. Klaassen, "Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC-MS/MS," *Journal of Chromatography B*, vol. 873, no. 2, pp. 209-217, 2008.
- [16] A. K. Batta, G. Salen, P. Batta, G. S. Tint, D. S. Alberts, and D. L. Earnest, "Simultaneous quantitation of fatty acids, sterols and bile acids in human stool by capillary gas-liquid chromatography," *Journal of Chromatography B*, vol. 775, no. 2, pp. 153-161, 2002.
- [17] I. Bobeldijk, M. Hekman, J. de Vries-van der Weij et al., "Quantitative profiling of bile acids in biofluids and tissues based on accurate mass high resolution LC-FT-MS: compound class targeting in a metabolomics workflow," *Journal of Chromatography B*, vol. 871, no. 2, pp. 306-313, 2008.
- [18] W. J. Griffiths and J. Sjövall, "Analytical strategies for characterization of bile acid and oxysterol metabolomes," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 396, no. 1, pp. 80-84, 2010.
- [19] J. A. Bowden, D. M. Colosi, D. C. Mora-Montero, T. J. Garrett, and R. A. Yost, "Enhancement of chemical derivatization of steroids by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)," *Journal of Chromatography B*, vol. 877, no. 27, pp. 3237-3242, 2009.
- [20] Y.-Q. Zhou, Z.-J. Wang, and N. Jia, "Formation of multiple trimethylsilyl derivatives in the derivatization of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol with BSTFA or MSTFA followed by gas chromatography-mass spectrometry determination," *Journal of Environmental Sciences*, vol. 19, no. 7, pp. 879-884, 2007.
- [21] Á. Sebok, K. Sezer, A. Vasani-Zsigrai, A. Helenkár, G. Záray, and I. Molnár-Perl, "Gas chromatography-mass spectrometry of the trimethylsilyl (oxime) ether/ester derivatives of cholic acids: their presence in the aquatic environment," *Journal of Chromatography A*, vol. 1211, no. 1-2, pp. 104-112, 2008.
- [22] W. J. Griffiths and Y. Wang, "Analysis of neurosteroids by GC-MS and LC-MS/MS," *Journal of Chromatography B*, vol. 877, no. 26, pp. 2778-2805, 2009.
- [23] J. L. Little, "Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them," *Journal of Chromatography A*, vol. 844, no. 1-2, pp. 1-22, 1999.
- [24] B. S. Kumar, B. C. Chung, Y.-J. Lee, H. J. Yi, B.-H. Lee, and B. H. Jung, "Gas chromatography-mass spectrometry-based simultaneous quantitative analytical method for urinary oxysterols and bile acids in rats," *Analytical Biochemistry*, vol. 408, no. 2, pp. 242-252, 2011.
- [25] P. Tyagi, D. R. Edwards, and M. S. Coyne, "Fecal sterol and bile acid biomarkers: Runoff concentrations in animal waste-amended pastures," *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 198, no. 1-4, pp. 45-54, 2009.
- [26] M. J. Casas-Catalán, M. T. Doménech-Carbó, R. Mateo-Castro, J. V. Gimeno-Adelantado, and F. Bosch-Reig, "Characterization of bile acids and fatty acids from ox bile in oil paintings by gas chromatography-mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1025, no. 2, pp. 269-276, 2004.
- [27] A. Ranz, A. Eberl, E. Maier, and E. Lankmayr, "Microwave-assisted derivatization of acidic herbicides for gas chromatography-mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1192, no. 2, pp. 282-288, 2008.
- [28] M. Damm, G. Rechberger, M. Kollroser, and C. O. Kappe, "Microwave-assisted high-throughput derivatization techniques utilizing silicon carbide microtiter platforms," *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, no. 1, pp. 167-170, 2010.
- [29] M. Liebeke, A. Wunder, and M. Lalk, "A rapid microwave-assisted derivatization of bacterial metabolome samples for gas chromatography/mass spectrometry analysis," *Analytical Biochemistry*, vol. 401, no. 2, pp. 312-314, 2010.
- [30] Y. C. Fiamegos, A. Karatapanis, and C. D. Stalikas, "Microwave-assisted phase-transfer catalysis for the rapid one-pot methylation and gas chromatographic determination of phenolics," *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, no. 5, pp. 614-621, 2010.
- [31] EURACHEM, *Guide to Quality in Analytical Chemistry Na AID to Accreditation*, CITAC/EURACHEM, 2002.

## Composition Comments

1. There is a difference between the manuscript and the new electronic version in all figures, and we followed the new electronic version. Please check. [↴](#)
2. We reduced the font size of some labels in Figures 1 and 2. Please check. [↴](#)
3. Should we change the highlighted part into “m/z” for the sake of consistency? [↴](#)
4. We redrew some parts in Figure 2. Please check. [↴](#)
5. Please check the formatting of Table 1. [↴](#)
6. Please check the accuracy of the highlighted part in Table 1. [↴](#)
7. We changed “diferents” to “different” in Figure 4. Please check. [↴](#)

## **Author(s) Name(s)**

It is very important to confirm the author(s) last and first names in order to be displayed correctly on our website as well as in the indexing databases:

### **Author 1**

Given Names: Maria José

Last Name: Nunes de Paiva

### **Author 2**

Given Names: Helvécio Costa

Last Name: Menezes

### **Author 3**

Given Names: Zenilda de Lourdes

Last Name: Cardeal

It is also very important for each author to provide an ORCID (Open Researcher and Contributor ID). ORCID aims to solve the name ambiguity problem in scholarly communications by creating a registry of persistent unique identifiers for individual researchers.

To register an ORCID, please go to the Account Update page (<http://mts.hindawi.com/update/>) in our Manuscript Tracking System and after you have logged in click on the ORCID link at the top of the page. This link will take you to the ORCID website where you will be able to create an account for yourself. Once you have done so, your new ORCID will be saved in our Manuscript Tracking System automatically.

## CRITICAL REVIEW

## Sampling and analysis of metabolomes in biological fluids

Cite this: *Analyst*, 2014, **139**, 3683

Maria José Nunes de Paiva,<sup>ab</sup> Helvécio Costa Menezes<sup>a</sup> and Zenilda de Lourdes Cardeal<sup>\*a</sup>

Metabolome analysis involves the study of small molecules that are involved in the metabolic responses that occur through patho-physiological changes caused by genetic stimuli or chemical agents. Qualitative and quantitative metabolome analyses are used for the diagnosis of various diseases or chemical exposure. This article presents an overview of the different analytical methods available for performing the determination of the metabolome, including sampling, sample preparation and processing and interpretation of data. Critical comments are aimed at emphasizing the extraction methods as well as the biological samples used for metabolome analysis and data processing.

Received 31st March 2014

Accepted 4th June 2014

DOI: 10.1039/c4an00583j

www.rsc.org/analyst

### 1 Introduction

By analogy with other “omes”, the metabolome is defined as the quantitative complement of low-molecular-weight metabolites present in a biological fluid, cell or organism under a given set of physiological conditions. The concept of the metabolome as a global view of metabolites produced by an organism was introduced in the 70s. Thus, the existing methods would be insufficient to analyze the profile of the human metabolome. Even with the advancement of analytical techniques, we still face the problem of low sensitivity analyses.<sup>1</sup> Metabolomics involves the study of small molecules from cells, tissues,

organisms or other biological fluids. These small molecules involve primary and intermediary metabolites as well as exogenous compounds, such as drugs and other chemical compounds.<sup>2,3</sup>

In establishing the metabolic profile of these small molecules with recognition of transcription and expression/protein activity, the different metabolites found can be studied to explain possible causes of diseases or even to identify substances that are beneficial to the body. An example is the discovery of alkaptonuria as a result of an inborn error in metabolism, which accumulates homogentisic acid, causing browning of the urine.<sup>4</sup> The fingerprint of a specific disease can be defined by the interaction of the methods that are used for high-definition genome, proteome and metabolome studies.<sup>5</sup> The use of post-genomic technologies in large-scale molecular epidemiology is important for identifying associations between

<sup>a</sup>Departamento de Química, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627-31270901 Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail: Zenilda@ufmg.br

<sup>b</sup>Universidade Federal de São João Del Rei, Avenida Sebastião Gonçalves, Brazil



Maria José Nunes de Paiva is M.Sc. in Toxicology and Toxicological Analysis from the University of São Paulo-USP (2003) and doctoral in Chemistry from Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG (2013). She is Associate Professor level I of the Federal University of São João Del Rei – UFSJ. Operates on the following topics: extraction methods, chromatographic analysis, and metabolomic study.



Helvécio Costa Menezes has Master degree in Production Engineering from the Federal University of Santa Catarina-UFSC (2001). Ph.D. degree in Chemistry from the Universidade Federal Minas Gerais-UFMG (2011), Posdoctoral in Chemistry from UFMG (2013). Level 1 Assistant Professor in the Department of Chemistry at UFMG. Currently works in the field of analytical chemistry

coupled with mass spectrometry applied gas chromatography to environmental analysis, and studies to assess the environmental and occupational exposure to organic pollutants.

Table 1 Analytical strategies for metabolic research

Criteria	Global metabolomics	Metabolic profiling	Fingerprinting	Target metabolic
Purpose	Analysis of broad range of metabolites	Describe metabolic patterns for a group of metabolites	Screening of samples to provide classification	Analysis of one or few target metabolites
Selectivity of metabolites	No	Yes	No	Yes
Specific metabolic pathway	No	Yes	No	Yes
Biological samples	Cells, body fluids, tissues	Cells, body fluids, tissues	Cells, body fluids, tissues	Cells, body fluids, tissues
Sample preparation	Generic	Selective	Generic	Selective
Analysis	Qualitative and quantitative	Qualitative and quantitative	Qualitative	Qualitative and quantitative
Analytical methods	GC/MS, LC/MS, CE/MS, NMR	GC/MS, LC/MS, CE/MS, NMR	GC/MS, LC/MS, CE/MS, NMR	GC/MS, LC/MS, CE/MS, NMR
Relative time required	Long	Long	Short	Long

molecular markers (genes, proteins, metabolites, *etc.*) and disease.<sup>6</sup> It is increasingly clear that our ability to modify the metabolic profile will help to discover many previously inaccessible areas of biology.<sup>7</sup>

The analysis of small molecules is a problem because the samples are extremely complex and their chemical identification can be difficult.<sup>2</sup> However, the identification and quantification of specific metabolites may indicate normal growth or the presence of cellular changes caused by pollutants present in the workplace, drug use or drug abuse, and exposure to environmental pollutants. Initial metabolomic signatures have already been reported for several disease states, including schizophrenia,<sup>8</sup> neuropsychiatric diseases,<sup>5</sup> Alzheimer's disease,<sup>9,10</sup> cardiovascular and coronary artery disease,<sup>11</sup> hypertension,<sup>12</sup> type 2 diabetes,<sup>13,14</sup> liver cancer,<sup>15</sup> ovarian cancer,<sup>16</sup> breast cancer,<sup>17</sup> and Huntington's disease.<sup>18</sup> Metabolomics technology has been used as a tool for the elucidation of the mechanism of various cardiovascular and neurological diseases,<sup>5,11,19</sup> the toxic effects of drugs, nutrition

and cancer<sup>20–23</sup> and provides additional information beyond the genomic and proteomic evidence.<sup>24</sup> This profile is composed of dozens of metabolites that are altered qualitatively and quantitatively in pathological conditions or in various situations of exposure to chemicals.<sup>3</sup> The existing strategies for metabolomic analysis employ metabolomics, metabolite profiling, metabolite fingerprinting, and metabolite target analysis. Table 1 shows the analytical differences in these strategies based on the particular situation being investigated. The endogenous metabolites include sugars, organic acids, amino acids, steroids and many other intermediary metabolites, which present wide variation in polarity, molecular weight and volatility. Analysis of all metabolites is difficult because of their diversity and their concentrations, which range between pmol to mmol in various biological fluids. The diversity of physicochemical properties shows the complexity (involution) in the choice of analytical method. Thus, in the metabolomics experiment, analytical methods and instrument validation is essential to ensure the applicability, accuracy and precision of the methods. Analytical methods in metabolomics include sample preparation, instrumental analysis, data processing and interpretation of data, all of which are performed in different ways depending on factors such as the nature of the sample and the analytical technique available. One concern in metabolome analysis of microorganisms is the separation of intra- and extracellular metabolites. Extraction methods are used for the extraction of intracellular metabolites and plasma; however, it is important to interrupt metabolism accomplished rapidly with temperature change or pH change in the determination of metabolites from microorganisms or cell cultures. The selection of metabolites to be identified and quantified is performed according to the metabolic pathway to be studied,<sup>25</sup> which is one of the important points for an accurate interpretation of the data obtained.<sup>26</sup> Another relevant issue is the use of animals for the evaluation of metabolome. The majority of studies that are performed to evaluate the effects of chemicals in humans have been conducted in animals, a practice that



Zenilda de Lourdes Cardeal is M.Sc. in Analytical Chemistry from the University of Campinas – UNICAMP (1988), Ph.D. in Sciences – Chemistry (1993) from Université de Paris Sud and Postdoctoral in Separation Science (2005) from Royal Melbourne Institute of Technology University. The main aims of research are: to develop and validate methods for environmental analyses; evaluating the

quality of environmental compartments (inside and outside) with regard to the presence of xenobiotic toxic substances; determination of toxic volatiles in food and to assess human exposure to toxic agents.



Table 2 Methods used to metabolome analysis

Reference	Compounds	Matrix	Sample preparation	Method
Flores-Valverde, 2008	Steroids, glucocorticoids, and progestagens	Ovaries, testes and liver	SPE	UPLC-ToF/MS
Wang D. C. <i>et al.</i> , 2012	Serum fatty	Serum	LLE	GC/MS
Paiva <i>et al.</i> , 2013	Amino acids	CSF	Methanol (−20 °C)	GC/MS
Wu <i>et al.</i> , 2009	Carbohydrates, amino acids, fatty acid	Urine	Methanol	GC/MS
Zheng <i>et al.</i> , 2012	Amino acids	Salive	Acetone (−20 °C)	LC-FTICR-MS
Uhl <i>et al.</i> , 2011	Glycerophospholipid	Plasma	Methanol	LC-MS/MS
Snyder <i>et al.</i> , 2010	L-β-Methylamino-alanine	Human tissue	LLE	GC × GC-ToF/MS
Rocha <i>et al.</i> , 2011	Hydrocarbons, amines, amides, esters, ketones, aldehydes, alcohols, carboxylic acids, ethers, nitriles, thiols, terpenoids, and heterocyclic compounds	Human urine	HS-SPME	GC × GC-ToF/MS
Caldeira <i>et al.</i> , 2012	Cycloalkanes, aromatic aldehyde, ketones	Exhaled breath	HS-SPME	GC × GC-ToF/MS

has been greatly reduced by substituting cultured animal cells.<sup>24</sup> The advantages of using cell cultures include the elimination of the use of animals, a significant decrease in cost and a faster response. Identification and quantification of metabolites is difficult because of their kinetic behavior, which hampers collection protocols, and the various classes of chemical compounds, such as peptides, carbohydrates, lipids, nucleosides and products of the catabolism of exogenous compounds.<sup>27–29</sup> Multiple changes in the structure of the metabolites may occur within hours to fractions of seconds.<sup>28</sup> This variability of metabolites poses challenges for the analytical procedures and confidence in the quality of the data generated, showing that the metabolites can be recovered and quantified. Thus, considering the variety of possible metabolites, the first requirement for the metabolome analysis is that the available techniques should be comprehensive.<sup>7</sup> This variability of metabolites poses challenges for the analytical procedures and confidence in the quality of the data generated, showing that the metabolites can be recovered and quantified. Analytical technologies based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS),<sup>30</sup> gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS),<sup>1,31</sup> capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (EC/MS)<sup>32,33</sup> and nuclear magnetic resonance have been applied in the analysis of the metabolic profiles of organisms and human cells. This review describes the current methods for sampling and analysis of the metabolome in biological fluids (Table 2).

## 2 Sampling

The sampling step is a continuous challenge in metabolomics studies that requires previous knowledge of the biological system and involves the extraction of diverse biological sample types. In human metabolomics studies, any biological fluid or tissue can be used for the qualitative and quantitative measurement of endogenous metabolites. The most frequently

used samples for exploring the modification of the metabolome are urine and blood. However, other matrices, such as cerebrospinal fluid,<sup>34</sup> saliva<sup>35</sup> and erythrocytes<sup>36</sup> are also used to analyze the metabolites. The choice of sample type and method of sample preparation are critical aspects of metabolomics studies. These aspects interfere directly in the data quality and, therefore, the accuracy of the biological interpretation.<sup>37</sup> Other factors that should be considered in sampling design include age, gender, diurnal variation, and diet of subjects. The selection of an appropriate control group must be performed carefully, especially in studies with patients suffering from disease and receiving medical treatment.<sup>38</sup> The vials used to collect biological samples should be chosen and cleaned carefully to minimize the introduction of contaminants, such as surfactants, which can cause interference in the subsequent steps of analysis. Non-specific binding or container surface adsorption of metabolites should be assessed in metabolomic analysis. In the Whole blood, plasma or serum are present at approximately 8% of protein and lipids though urine does not normally contain these compounds. This absence can be associated with the non-specific binding or container surface adsorption of these molecules that can be evaluated often by the low extraction recovery of the analytes of interest. To prevent the loss of analyte due to non-specific binding or container surface adsorption it can be recommended a post-addition of reagents such as bovine serum albumin (BSA) and Tween-80. This is a simple procedure in the trouble shooting non-specific binding or container surface adsorption of quantitative analysis of biological samples.<sup>39</sup> Ideally, sample collection should strive to be non-invasive and representative. Urine, serum and plasma are the bio fluids that are usually employed by incorporating the functions and phenotypes of many different parts of the body. Moreover, the choice of appropriate biological sample is of great significance in the development of protocols suitable for the preparation and storage of samples. The storage step should be included when the immediate analysis of the sample is not

feasible; this procedure is commonly performed with liquid nitrogen ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). To prevent changes in the composition of the samples during storage, the number of cycles of freezing and thawing should be minimized.<sup>40</sup>

## 2.1 Plasma

Blood is composed of two parts: a cellular component (erythrocytes, leukocytes and platelets) and plasma (liquid in which blood cells are suspended), which accounts for approximately 50–55% of the blood volume.<sup>41</sup> Plasma and serum (with and without the addition of anti-coagulants, respectively) are obtained from blood samples by centrifugation, where the supernatant portion is used for the analysis. Blood serum is a primary carrier of small molecules in the body and plays a critical role in transporting nutrients, hormones and metabolites. Interferents present in the whole blood sample can also be found in the membrane and nucleotides, which can interfere with the analysis. Some studies show that the treatment of samples using organic solvent extraction, solid phase extraction and solid phase micro-extraction can decrease or exclude this interference.<sup>42–44</sup> The blood irrigates every tissue and organ in the body, providing a pathway for all the molecules being secreted and excreted by different tissues. Thus, tissue dysfunctions and pathological states can both alter the chemical composition of blood. Plasma and serum contain a range of metabolites, which can be used in the diagnosis of physiological alterations or pathological states.<sup>45</sup> The choice of sample (plasma or serum) is related to the clotting process, which stimulates blood fatty acid biosynthesis where the serum levels of these compounds do not represent physiological concentrations.<sup>46</sup> A variety of substances is present in plasma, including proteins, peptides and electrolytes, and may interfere with the analysis. To reduce the presence of plasma proteins the precipitation with trichloroacetic acid and cold methanol is the most common practice and reduces the interference in instrumental analysis.<sup>47</sup> In order to minimize this interference in the analysis of the blood and plasma the addition of anti-coagulant and a preservative is required. The use of heparin in samples of blood show an absence of interference in polysaccharides analyses.<sup>48</sup> In metabolome analysis of dried blood spots EDTA is also used to maintain the stability of analytes.<sup>49</sup> In the comparison of 4 different blood collection tubes, EDTA and  $\text{Na}^+$ -fluoride show stability of analytes in relation to heparin and serum blood that demonstrate clear patterns of noise signals. Thus, in the metabolome studies test the suitability of the blood collection tubes is necessary. However, the anti-coagulant  $\text{K}^+$ -EDTA plasma is mostly used.<sup>50</sup> The plasma composition directly reflects the catabolic and anabolic processes occurring in the whole organism. However, small metabolic changes from a specific part of the body can dilute the original profiling.<sup>51</sup>

## 2.2 Urine

Urine provides a pattern of polar metabolites discarded from the body as a result of catabolic processes. Urine samples that are collected in large quantities by noninvasive sampling, have lower protein content and lower sample complexity with fewer intermolecular interactions.<sup>52</sup> Urinary metabolomic approaches are

likely to be used to screen for potentially earlier diagnostic and prognostic biomarkers of disease. Metabolites present in blood are filtered at the glomerulus and may remain in the tubular lumen and be excreted through the urine. These metabolites can also be excreted from plasma into urine by passive diffusion through the tubule. Another possibility is excretion into urine by active secretion, which involves the uptake of toxicants from the blood into the cells of the renal proximal tubule. There are numerous transporters, such as specific glucose transporters or nucleotide transporters that play a predominant role in the flux of endogenous substances. The advantages of human urine analysis, compared to blood or cerebrospinal fluid analysis, include noninvasive sample collection and the ease of sampling repetition. Another advantage of urine analysis is its less complex sample preparation because urine contains lower protein and peptide level. In contrast, the number of conjugated compounds can be higher in urine than in serum.<sup>53</sup> Urine samples are generally incubated with urease and glucuronidase because urinary metabolites can be conjugated.<sup>31</sup> The time of urine sample collection appears to play a significant role in clinical studies because dietary, lifestyle and diurnal variation can influence metabolite concentrations. Urine samples are typically collected as random samples, timed samples or 24 h samples. Urine analysis usually presents significant inter-individual variability (representing normal genetic variation) but less pronounced intra-individual variability. The first void urines present more variability and may reflect differences in the lifestyles and diets of the subjects. However, this variability is acceptable and may highlight biomarkers of disease or toxicity.<sup>54,55</sup> Sampling urine day and night shows that the metabolic profile may differ by the presence of given biomarkers.<sup>53</sup> The storage condition is very important in metabolomic studies because it reflects the stability of the urinary metabolites. Studies of stability become necessary when the data of a few analytes are interpreted as the degradation of all the metabolites, which may be greater than a biological response. The integrity of the sample is ensured and the original state of the biological system is maintained when storage conditions are suitable and can be reflected accurately in the metabolomic study. In studies using urine for metabolome analyses, the storage conditions before sample preparation are room temperature, refrigerator ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) or ultra-freezer ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).<sup>55–58</sup> Targeted analysis requires a procedure for sample collection and a container of polypropylene that do not degrade the compounds of interest and are not endowed with special characteristics or additives. When the physicochemical properties of the analytes are known, maintaining them under optimal conditions is simple. However, it is more complicated to prevent deterioration in metabolomics fingerprinting because many compounds are analyzed and, to prevent the deterioration of compounds, the samples are stored at a cold temperature ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and immediately sent to the laboratory for analysis or for proper storage prior to analysis.<sup>59</sup>

## 2.3 Cerebrospinal fluid

Cerebrospinal fluid is the secretion product of the central nervous system that fills the ventricles and the subarachnoid

space of the brain and spinal column. The composition of Cerebrospinal Fluid (CSF) is directly dependent upon metabolite production rates in the brain. Analysis of the CSF metabolome can offer biochemical insights into central nervous system disorders, such as brain injury, Parkinson's disease and multiple sclerosis.<sup>34</sup> However, given the invasiveness of sample collection, the use of CSF in routine diagnostics may be limited. Early diagnostic biomarkers may be useful for neurodegenerative diseases, in which damage to the central nervous system (CNS) may occur long before symptoms develop. Although blood is the most commonly used bio fluid for clinical chemistry diagnoses, cerebrospinal fluid (CSF) may represent a better sample for diseases of the CNS and the neurochemical state. The analysis of cerebrospinal fluid is used in biomarker discovery studies for various neurodegenerative central nervous system (CNS) disorders.<sup>60,61</sup> Cerebrospinal fluid is the secretion product of the central nervous system, where it serves several functions including protection, circulation of nutrients, and transport and excretion of biological substances, which contain lower concentrations of proteins and metabolites than blood.<sup>40</sup> The low protein content of the CSF limits the movement of water-insoluble compounds by cellular transport, which is possible only when such compounds are bound to proteins. Moreover, in most cases, toxicants achieve concentrations in the CSF that are no higher than the concentration of the unbound compounds in the plasma.<sup>62</sup> In a comparative study of bio fluids with similar characteristics, human CSF presented a coefficient of variation (CV) 11% lower than that found in the analysis of plasma.<sup>63</sup> Processing and storage of CSF can affect the results of the amino acid analysis. In untreated CSF samples, compounds were significantly increased after 2 days at temperatures of  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  but decreased progressively after the third day of storage. CSF is easily contaminated by blood during the sampling process and is one of the most important pre-analytical factors in CSF analysis. Because of the high protein concentration in blood, contamination with a small amount of a blood will affect the protein concentration in CSF. In order to decrease the effect of contamination of CSF with protein of blood, centrifugation of the fluid is suggested before freezing in order to remove the highest amount of these proteins.<sup>64</sup> In a sample of CSF that was treated with trichloroacetic acid (TCA), the metabolites presented better results (both qualitative and quantitative) compared to the analysis of untreated aliquots. CSF samples treated with TCA to remove proteins, where the supernatant pH was adjusted to 7.3 and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  or  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , presented no significant difference in their metabolite concentrations during a 30 day period.<sup>65</sup> Another pre-analysis influence is the addition of stabilizing agents (protease inhibitors, deproteinization). However, the addition of these agents alters the samples by introducing additional compounds, which lead to new peaks in the chromatographic analysis.<sup>66</sup>

## 2.4 Saliva

Human saliva is a clear, slightly acidic, oral fluid that is secreted mainly from the salivary glands, including the parotid,

submandibular, sublingual and other minor glands beneath the oral mucosa and is composed of various secretory products such as proteins and metabolites.<sup>67</sup> This complex matrix plays a role in several physiological processes, such as oral digestion, food swallowing and tasting, tissue lubrication, maintenance of tooth integrity, and antibacterial and antiviral protection.<sup>68</sup> Furthermore, saliva is an ideal medium to be explored for health and disease surveillance. Similar to blood, saliva is a complex fluid containing a variety of enzymes, hormones, antibodies, antimicrobial constituents and cytokines that can be influenced by the physiological state of an individual. Therefore, most compounds found in the blood are also present in saliva and, thus, are used for disease diagnosis and prognosis.<sup>69</sup> Many biomarkers of cancer, cardiovascular, and other diseases can potentially be detected in saliva.<sup>70</sup> Compared to other bio fluids, saliva collection is easy, noninvasive, safe and cost-effective. Additionally, collection of saliva samples can be performed privately, in remote sites, or in clinically challenging situations where blood sampling is not possible.<sup>67</sup> Saliva is an easily accessible bio fluid that can be sampled noninvasively without stress or pain. Metabolomic approaches using saliva are emerging as a promising clinical strategy for diagnostics.<sup>70,71</sup>

## 2.5 Exhaled breath, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and epithelial lining fluid (ELF)

The respiratory tract offers a matrix, exhaled breath, which presents high potential for metabolomic analysis. Exhaled breath contains different chemical species, such as small inorganic molecules (nitric oxide, carbon monoxide, carbon dioxide) and volatile organic compounds (VOCs). Exhaled breath can be collected noninvasively, in both the liquid and gaseous phases, and requires minimal sample preparation.<sup>72</sup> Exhaled breath metabolomics is applied to a living matrix in the absence of externally induced perturbations and has been used to differentiate metabolic profiles of patients with asthma, chronic obstructive pulmonary disease, or cystic fibrosis.<sup>73</sup> The advance in the discovery of new lung disease biomarkers by the omics science and metabolomic techniques has allowed further understanding of the pathological processes. Various biological matrices have been used for the analysis and for the biomarker lung disease discovery.<sup>74</sup> The respiratory epithelium is found in the lining of the respiratory tract and has the function moistening it and it also so protects the airways preventing infection and tissue injury functioning as a barrier to pathogens and foreign particles. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and epithelial lining fluid (ELF) are biological matrices used for the study of lung physiology or pathogenesis<sup>75</sup> such as allergic asthma,<sup>76</sup> acute respiratory distress syndrome (ARDS),<sup>77</sup> chronic obstructive pulmonary disease (COPD)<sup>78</sup> and pneumonia.<sup>79</sup> Bronchoalveolar lavage (BAL) is a medical procedure in which a bronchoscope is inserted through the mouth or nose into the lungs and fluid is squirted into a small part of the lung and then collected for examination. The ELF is obtained indirectly by sampling BAL fluid (BALF) or using a bronchoscopic micro-sampling probe, obtaining the direct recovery of the matrix.<sup>80,81</sup> BALF can be obtained also by non-bronchoscopic methods.<sup>82</sup>



The BALF has been the most used technique for clinical and experimental investigation of lung disease because the composition of BALF is considered to represent the ELF.<sup>80</sup> In metabolomics studies the determination of these molecules in BALF may provide access to novel disease biomarkers.<sup>78</sup> Chromium (Cr) and arsenic (As) can potentially disrupt the redox balance and cause respiratory diseases and cancer in humans. Analysis in BALF of samples of animals exposed to these metals showed the combined toxic effects of these metals in the lungs evidenced by an increase in the production of reactive oxygen species and decrease of glutathione content.<sup>83</sup> In the study performed by Evans *et al.* (2014) the 37 different metabolites in the BALF associated with amino acid metabolism, glycolysis and gluconeogenesis, fatty acid biosynthesis, phospholipids, and purine metabolism show that these molecules can be used for prognostic biomarkers in the acute respiratory distress syndrome (ARDS).<sup>77</sup>

## 2.6 Other samples

Biles are of major importance for the maintenance of cholesterol homeostasis. In addition to their functions in lipid absorption, bile acids/bile alcohols are regulatory molecules for a great number of metabolic processes. Their effects are structure-dependent, and numerous metabolic conversions result in a complex mixture of biologically active and inactive forms. Characterization of bile acid metabolome should also increase the understanding of how different bile acid structures might participate in regulatory processes. Advanced methods are required to characterize and quantify individual bile acids in these mixtures.<sup>84</sup> Determination of metabolites in tissues provides novel aspects of pathological conditions that cannot be obtained from target-specific fluid measurements. The measurement of metabolites in tissues is of great importance in metabolomic research. For solid tissues, blood should be removed through rapid rinsing before storage; otherwise, the obtained profile may reflect that of both the blood and the solid tissue of interest. Among the most commonly used tissues is the liver, which is involved in the major biochemical reactions of the organism with a number of important functions, such as glycogen storage, glycogenesis, and decomposition of erythrocytes.<sup>85–88</sup> Metabolites, such as amino acids, fatty acids, organic acids, and carbohydrates, reflect changes in liver metabolism.<sup>89</sup> Other tissues can be used in metabolomics studies, such as kidney homogenates containing products of glycolysis and amino acids, as well as organic osmolytes. Many metabolites revealed changes in their levels, including decreased levels of organic osmolytes and amino acids in the inner medulla.<sup>90</sup> The study of cell cultures is one of the most extensive approaches in metabolomics. The level of metabolites in a cell represents integrative information, which is an important advantage when biological functions are to be assessed or phenotypes are to be defined in response to genetic or environmental changes.<sup>91</sup> Metabolome analysis of cells can usually be performed with extracellular or intracellular liquid, representing the endometabolome and the exometabolome, respectively. Metabolic profiling of feces can also be developed, mainly as a noninvasive

method, for the diagnosis of gastrointestinal diseases. For metabolome analysis of feces, the extraction method should be optimized such that a large number of metabolites may be extracted.<sup>23</sup>

## 3 Sample preparation

The sample preparation method should be simple and fast to prevent metabolite loss during the preparation procedure and to enable high-throughput processing.<sup>92</sup> Furthermore, the preparation method should be reproducible and include a metabolism-quenching step to represent the true metabolome composition at the time of sampling. Significant variations in the concentration and the chemical and physical properties of metabolites must be prevented by evaluating the residual enzyme activity. In metabolomic analysis, the choice of the sample-preparation method is crucial to the success of a given analysis. Focused identification of metabolites improves the efficiency of metabolomics research. Sample preparation is one of the stages of analytical chemistry that requires a significant amount of time and is underestimated in metabolome analysis. In a biological system, the number and variety of chemical classes of compounds can exceed one million substances.<sup>93,94</sup> However, the number of metabolites in simple microorganisms can vary from 240 in simple bacteria, such as *Mycoplasma pneumoniae*, to 800 as in *Escherichia coli*.<sup>95</sup> Because there are still many undiscovered genes in the genomes of many organisms with broad substrate specificity, this number may even be two or three times this amount. In plant species, the number of metabolites is higher because of secondary metabolites, which are presented in greater numbers than the primary metabolites. Even using methods to identify a simple race from 100 to 500 compounds does not guarantee that the complete metabolome will be realized. Many methods are used to extract the metabolites so that all the metabolites are recovered with an adequate sensitivity to be detected. Another concern is the extraction of metabolites from various matrices, including cells, tissues, organisms and biological fluids because the extraction procedures are similar but each has its own peculiarities. The concentration of metabolites is prone to rapid and significant changes with the continued growth of the cells. Because of this feature of biological systems, techniques are needed to promote the mitigation or even termination of metabolic activity. The first step in sample preparation of microorganisms and cell cultures is to freeze the metabolism because the pattern of the metabolites may change prior to analysis, resulting in a different profile *in vivo*. One concern in metabolome analysis of microorganisms is the separation of intra- and extracellular metabolites. It is possible to obtain a rapid analysis of the metabolic pathways of intracellular metabolites.<sup>25</sup> The treatment of samples with methanol cooling has often been used as a simple and rapid method to achieve termination of metabolism and rupturing of cells, promoting leakage of intracellular metabolites. This approach should be avoided during the washing and isolation of cells because the cells are usually separated from the medium prior to extraction of the metabolites.<sup>25,94,96</sup> For cells in the quenching suspension, this treatment

is performed using 0.85% methanol–bicarbonate (6 : 4 v/v) and 0.9% NaCl (0.5 °C). This method prevents leakage of the metabolite, which is not the case when using pure methanol or 60% methanol (−40 °C) and 60% methanol buffer (−40 °C).<sup>97,98</sup> For adherent cells, this step is performed before quenching.<sup>94,97</sup> The metabolites are extracted after quenching; however, the extraction step is very important for evaluating the amount of metabolites and depends on the selectivity of the method. The extraction method should be as similar as possible for all metabolites that have the same physico-chemical properties, especially in the case of metabolic profiling and targeted metabolomics. Following the quenching step, it is necessary to separate the cells from the medium containing the extracellular metabolites. Alternatively, intracellular metabolites can be extracted by permeation through the cell membrane. When the goal is metabolite targeting or profile analysis of solid samples, the addition of an extraction step for the metabolites of interest is required.<sup>99</sup> For solid biological samples, such as feces and tissues, more elaborate protocols are necessary for their preparation. The most common steps include cooling, homogenization and extraction with the addition of solvents of different polarities. As the polarity of the solvent increases, the range of metabolites extracted also increases. Moreover, extractions should be performed under suitable conditions of the pH, which leads to a high recovery of the metabolites and minimal extraction of interfering materials.<sup>100</sup> The effect of pH on the extraction is important, particularly for the ionizable metabolites, as pH does not interfere with neutral molecules, which therefore need to be co-extracted with compounds of acidic or basic character.<sup>101</sup> Solid phase extraction (SPE) is also employed in studies of the metabolome.<sup>57,102,103</sup> This extraction procedure presents many advantages, such as an improved signal response of most metabolites in blood fluids and a quick and simple extraction method, allowing for multi-sample, simultaneous preparation. The SPE pre-concentration technique presents very good recovery and allows for the extraction of low and high levels of amino acids.<sup>57</sup> In SPE, free, conjugated and neutral metabolites of steroids are extracted using different eluents, such as ethyl acetate–methanol, methanol and ammonium hydroxide in methanol, sequentially.<sup>104</sup> Sampling of exhaled breath and exhaled breath condensate (EBC) is creating new opportunities for investigating unknown metabolites and novel biomarkers, which may provide insight into respiratory disease mechanisms.<sup>105,106</sup> In this type of sampling, the proper breath is crucial to obtaining repeatable and reliable results. The extraction methods must be highly efficient, non-selective, reproducible and cause no degradation of the analytes.<sup>107</sup> However, for the analysis of target metabolites or metabolic profiles, a selective method of sample preparation is necessary to decrease other compounds that may interfere with the analysis. A promising alternative for the study of the global metabolome is solid phase microextraction (SPME).<sup>108</sup> This technique involves solvent-free, sampling in which pre-concentration and conjugation occurs in one step. Furthermore, this technique can be used in headspace (HS) mode or direct immersion (DI). In HS mode, it is possible to assess the metabolomic composition of volatile compounds from solid

and liquid samples. SPME direct immersion in biological fluids and direct sampling *in vivo* also offer the possibility of capturing unstable metabolites and the detection of biotransformation intermediates.<sup>109</sup> Recently, *in vivo* SPME was applied in brain studies to measure neurotransmitters in freely moving rats,<sup>110</sup> in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary by-pass,<sup>111</sup> and short-lived metabolites included in energetic pathways.<sup>112</sup> The common approach is to collect exhaled air in Tedlar bags or gas-tight syringes, followed by subsequent extraction with an SPME fiber.<sup>113</sup> After sampling by SPME, metabolites can be thermally desorbed, if the analysis technique is Gas Chromatography (GC), or placed in an appropriate solvent or solvent mixture for liquid chromatography analysis.<sup>114</sup> There is a variety of commercially available fiber coatings, including polyacrylate (PA), polydimethylsiloxane (PDMS), carbowax, polyethylene glycol (PEG), and mixed phases of carboxen (CAR)-PDMS.<sup>115</sup> However, in metabolomic analyses, diverse types of analytes are generally determined, thus a single SPME fiber coating may be insufficient for a comprehensive analysis of the complex mixtures present in biological samples. Additionally, there is the problem of recurrent obstruction of the polymeric coating of the fiber by the biological matrix. New studies for evaluating SPME coatings for untargeted metabolomics profiling were tested for compounds from different classes within a broad polarity range.<sup>116</sup> Mixed-mode coatings, such as [(C18 + benzenesulfonic acid), polar-enhanced polystyrene-divinylbenzene (HRP), and phenylboronic acid (PBA)], were found to be the best sorbents, allowing for simultaneous extraction of hydrophobic and hydrophilic metabolites. Ultrafiltration is a simple procedure of sample preparation and has been indicated mainly for polar metabolites. Small molecules can physically separate macromolecules using a special filter that allows the passage of molecules with a given molecular weight. Ultrafiltration has been recommended for use prior to LC and Nuclear Magnetic Resonance (NMR).<sup>117–119</sup> Ultrafiltration is more efficient for protein precipitation than the use of acids or solvents. In addition to ultrafiltration may improve the stability of the post-collection metabolites.<sup>120</sup> However the efficiency of extraction of hydrophobic metabolites can be significantly reduced in the ultrafiltration. To increase the recovery of non-polar metabolites a step of washing the membrane with suitable solvents has been proposed. Recently they have been used to analyze dried blood spots (DBS) for extracting target metabolites and global metabolomics. This extraction technique consists in placing a small drop of blood on a strip of filter paper and waiting for it to dry.<sup>121</sup> After this step the metabolites are extracted with small amounts of a suitable solvent. Chromatography with off-line or online tandem mass spectrometry<sup>122</sup> and direct mass spectrometry<sup>123</sup> are the main analytical tools that can be used in DBS sampling. Among the main advantages of DBS it is noteworthy to cite the potential for automation, the use of small volumes of sample and solvents, and simplicity of collection and storage.<sup>49</sup> However interference with the role and difficulties in extracting strongly adsorbed metabolites, and high uncertainties in sample volumes are some of the main disadvantages.<sup>124</sup> High uncertainties in the volume of samples originate from the non-uniform distribution

of blood spot and changes in the hematocrit levels. To minimize this problem one can use a performed DBS (PDBS).<sup>125</sup> In PDBS a predetermined (5 to 10  $\mu\text{L}$ ) microsampling volume is achieved by spotting the blood with a micropipette on the precut 0.6 cm filter paper disk. The PDBS is inserted into the well for online extraction, concentration, and subsequent analysis.<sup>126</sup> According to the strategy for the analysis of metabolome, a selected number of pre-defined metabolites, generally related to a specific metabolic pathway(s) in metabolite profiling or analysis of one or a few metabolites related to a specific metabolic reaction in metabolite targeted analysis, are used for analytical separation. Physicochemical differences in metabolites present in organisms, such as molecular weight, polarity and charge, contribute to the chemical heterogeneity of these compounds causing many metabolites to remain undetected. Another factor leading to the failure to recognize these compounds is a very large dynamic of concentration ranges.<sup>98</sup> Therefore, both the strategies for metabolome analysis and the physicochemical properties indicate the appropriate sampling method.

## 4 Data interpretation

Metabolomics studies produce large amounts of data, which require high capacity for analysis and interpretation. Often it is necessary to distinguish the metabolic variability inherent in the biological system of interest, genetic and environmental variability. The handling of data in metabolomics takes place in two stages, processing and analysis. In the processing step the raw data are processed to simplify subsequent analysis. In the analysis stage the processed data are subject to interpretation by the use of multivariate statistical tools.<sup>127</sup> Usually the data processing includes filtering, feature detection, alignment and normalization. The filtering aims to remove the noise. In chromatography data noise random source is attributed mainly to the detection system, while the noise of chemical origin can be related to the mobile and stationary phases.<sup>128</sup> Usually the data processing includes filtering, feature detection, alignment and normalization. The filtering aims to remove the noise. In chromatography data noise random source is attributed mainly to the detection system, while the noise of chemical origin can be related to the mobile and stationary phases. Several algorithms are proposed with the aim of removing noise, among the main ones; filtering with window moving average, median filter in chromatographic direction, Savitzky–Golay type of local polynomial fitting and wavelet transformation.<sup>129</sup> The purpose of the feature detection step of data processing is to identify all signals caused by true ions and avoid detection of false positives. A simple approach is to compare data points in raw data directly. Direct comparison of the raw data is a simple approach, for this purpose of statistical tests that can be used to compare differences between two or multiple datasets to a two-dimensional plot.<sup>130</sup> Deconvolution algorithms are usually used in MS detectors, because different fragments of the same molecule have the same retention time as well as assumption that their profiles in multiple samples are highly correlated as they are subject to the same biological variation and systematic error. In addition several metabolites may be subject to the

same mechanisms in the biological system, therefore their levels are highly correlated.<sup>131</sup> Alignment is required for correcting the retention time differences between runs and combining data from different samples. Correlation optimized warping (COW) and fast Fourier transform have been applied to the alignment of chromatographic data.<sup>132,133</sup> Normalization aims to remove the unwanted systematic bias in ion intensities between measurements, while retaining the interesting biological variation. Statistical models can be used to derive optimal scaling factors for each sample based on a complete dataset, such as normalization by unit norm, median of intensities, or the maximum likelihood method.<sup>134,135</sup> After processing the data should be analyzed to highlight relevant biological information. However, due to the high complexity and large volume of data in metabolomics, data-dimensionality reduction it is necessary to use multivariate statistical analysis.<sup>136</sup> The algorithms used for this purpose can be grouped into unsupervised clustering algorithms, and supervised classifiers.<sup>137</sup> In supervised methods there must be some initial information about the identity of the samples for training classes and the aim is to develop a model based on information contained in the samples. On the other hand, the unsupervised methods, the separation of classes occurs without the need for initial information on the nature of the samples and the goal is to identify natural groupings among the samples.<sup>138</sup> The unsupervised methods commonly used in metabolomics are hierarchical cluster analysis (HCA)<sup>139</sup> and principal components analysis (PCA).<sup>140</sup> These methods are simple and provide the reduction of the dimensionality of data NMR-based or MS-based studies, revealing the inherent data structure. In HCA dataset is clustered into different groups creating representative dendrograms and hierarchical relationships of data points with respect to the predefined distance measure. PCA is an unsupervised method that can project the metabolomic dataset into lower dimensional space or principal components (PC) revealing inherent data structure, and providing a simple visualization of dataset. However, PCA has several shortcomings. Most significantly, PCA does not have an associated probabilistic model, which makes assessing the fit of PCA to the data difficult and limits the potential to extend the scope of application of PCA. Furthermore, PCA can fail to reveal underlying groups of subjects in the data, therefore providing a spurious view of the underlying data structure.<sup>141</sup> To get around the problem of probabilistic model for PCA a probabilistic PCA (PPCA) was proposed.<sup>142</sup> Among the methods supervised discriminant analysis (DA) is the most widely used in metabolomics. In this case, particular care must be taken to ensure an appropriately large number of observations in order to reduce the possibility of generating false positives.<sup>143</sup>

## 5 Conclusion

This review has presented biological samples, and the sampling and analytical methods that are used in different strategies of metabolomics. The objectives of this study were to highlight the several factors that are considered important for achieving analysis of the metabolome. The choice of sample depends on

the analysis goal; for instance, cerebrospinal fluid is used in the diagnosis of CNS pathologies, and the relevance of this phase is fundamental to the quality of the final results. In the general preparation of biological samples of metabolic fingerprinting studies, the solvent dilution of the sample is enough for analysis. Alternatively, when targeted metabolic or metabolic profiling is performed, solid phase extraction or solid phase microextraction is very useful. However, analytical methods, such as GC/MS, LC/MS or GCxGC/MS, that are used in metabolome studies exhibit the sensitivity and precision required for the identification of new biomarkers.

## References

- 1 E. N. Tiziana Pacchiarotta, A. Carrasco-Pancorbo, A. M. Deelder and O. A. Mayboroda, *J. Biomol. Tech.*, 2010, **21**, 205–213.
- 2 T. R. Sana, K. Waddell and S. M. Fischer, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008, **871**, 314–321.
- 3 R. Kaddurah-Daouk, B. S. Kristal and R. M. Weinshilboum, *Annu. Rev. Pharmacol.*, 2008, **48**, 653–683.
- 4 A. E. Garrod, *Inborn errors of metabolism*, Oxford University Press, London, 1923.
- 5 M. P. Quinones and R. Kaddurah-Daouk, *Neurobiol. Dis.*, 2009, **35**, 165–176.
- 6 P. Goldsmith, H. Fenton, G. Morris-Stiff, N. Ahmad, J. Fisher and K. R. Prasad, *J. Surg. Res.*, 2010, **160**, 122–132.
- 7 D. B. Kell, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2004, **7**, 296–307.
- 8 M. Bicikova, M. Hill, D. Ripova, P. Mohr and R. Hampl, *J. Steroid Biochem.*, 2013, **133**, 77–83.
- 9 S. F. Graham, O. P. Chevallier, D. Roberts, C. Hoelscher, C. T. Elliott and B. D. Green, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 1803–1811.
- 10 A. N. Fonteh, R. J. Harrington, A. Tsai, P. Liao and M. G. Harrington, *Amino Acids*, 2007, **32**, 213–224.
- 11 G. D. Lewis, A. Asnani and R. E. Gerszten, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2008, **52**, 117–123.
- 12 Y. Zheng, B. Yu, D. Alexander, T. H. Mosley, G. Heiss, J. A. Nettleton and E. Boerwinkle, *Hypertension*, 2013, **62**, 398–403.
- 13 M. M. Koek, F. M. van der Kloet, R. Kleemann, T. Kooistra, E. R. Verheij and T. Hankemeier, *Metabolomics*, 2011, **7**, 1–14.
- 14 H. Tsutsui, T. Maeda, J. Z. Min, S. Inagaki, T. Higashi, Y. Kagawa and T. Toyo'oka, *Clin. Chim. Acta*, 2011, **412**, 861–872.
- 15 O. Abu Aboud and R. H. Weiss, *Clin. Chem.*, 2013, **59**, 138–146.
- 16 M. Y. Fong, J. McDunn and S. S. Kakar, *PLoS One*, 2011, **6**, e19963.
- 17 C. Yang, A. D. Richardson, A. Osterman and J. W. Smith, *Metabolomics*, 2008, **4**, 13–29.
- 18 P. M. Joyner, R. M. Matheke, L. M. Smith and R. H. Cichewicz, *J. Proteome Res.*, 2010, **9**, 404–412.
- 19 D. C. Wang, C. H. Sun, L. Y. Liu, X. H. Sun, X. W. Jin, W. L. Song, X. Q. Liu and X. L. Wan, *Neurobiol. Aging*, 2012, **33**, 1057–1066.
- 20 C. D. Davis and J. Milner, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 2004, **551**, 51–64.
- 21 M. Oresic, *Nutr., Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2009, **19**, 816–824.
- 22 M. Kato, Y. Onda, M. Sekimoto, M. Degawa and T. Toyo'oka, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 8277–8282.
- 23 D. M. Jacobs, N. Deltimple, E. van Velzen, F. A. van Dorsten, M. Bingham, E. E. Vaughan and J. van Duynhoven, *NMR Biomed.*, 2008, **21**, 615–626.
- 24 Q. Teng, W. L. Huang, T. W. Collette, D. R. Ekman and C. Tan, *Metabolomics*, 2009, **5**, 199–208.
- 25 S. G. Villas-Boas, J. Hojer-Pedersen, M. Akesson, J. Smedsgaard and J. Nielsen, *Yeast*, 2005, **22**, 1155–1169.
- 26 J.-F. Xia, Q.-L. Liang, P. Hu, Y.-M. Wang and G.-A. Luo, *Chin. J. Anal. Chem.*, 2009, **37**, 136–143.
- 27 A. Saghatelian and B. F. Cravatt, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2005, **9**, 62–68.
- 28 M. Stitt and A. R. Fernie, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003, **14**, 136–144.
- 29 D. S. Wishart, M. J. Lewis, J. A. Morrissey, M. D. Flegel, K. Jeroncic, Y. P. Xiong, D. Cheng, R. Eisner, B. Gautam, D. Tzur, S. Sawhney, F. Bamforth, R. Greiner and L. Li, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008, **871**, 164–173.
- 30 P. Kiefer, J.-C. Portais and J. A. Vorholt, *Anal. Biochem.*, 2008, **382**, 94–100.
- 31 K. K. Pasikanti, P. C. Ho and E. C. Y. Chan, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008, **871**, 202–211.
- 32 I. Garcia-Perez, M. Vallejo, A. Garcia, C. Legido-Quigley and C. Barbas, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1204**, 130–139.
- 33 M. R. N. Monton and T. Soga, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1168**, 237–246.
- 34 D. S. Wishart, M. J. Lewis, J. A. Morrissey, M. D. Flegel, K. Jeroncic, Y. Xiong, D. Cheng, R. Eisner, B. Gautam, D. Tzur, S. Sawhney, F. Bamforth, R. Greiner and L. Li, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008, **871**, 164–173.
- 35 E. Neyraud, M. Tremblay-Franco, S. Gregoire, O. Berdeaux and C. Canlet, *Metabolomics*, 2013, **9**, 213–222.
- 36 T. Nishino, A. Yachie-Kinoshita, A. Hirayama, T. Soga, M. Suematsu and M. Tomita, *J. Biotechnol.*, 2009, **144**, 212–223.
- 37 X. Duportet, R. B. M. Aggio, S. Carneiro and S. G. Villas-Boas, *Metabolomics*, 2012, **8**, 410–421.
- 38 G. A. Theodoridis, H. G. Gika, E. J. Want and I. D. Wilson, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **711**, 7–16.
- 39 W. Li, S. Luo, H. T. Smith and F. L. S. Tse, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2010, **878**, 583–589.
- 40 T. Rosenling, M. P. Stoop, A. Smolinska, B. Muilwijk, L. Coulier, S. Shi, A. Dane, C. Christin, F. Suits, P. L. Horvatovich, S. S. Wijmenga, L. M. C. Buydens, R. Vreeken, T. Hankemeier, A. J. van Gool, T. M. Luider and R. Bischoff, *Clin. Chem.*, 2011, **57**, 1703–1711.
- 41 S. Fox, in *Human physiology*, McGraw-Hill, Boston, 1999, pp. 364–367.
- 42 Z. Ying, A. Jiye, G. Wang, H. Qing, Y. Bei, Z. Weibin, G. Shenghua, L. Linsheng, R. Hongcan, R. Meiting and S. Longsheng, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, **877**, 1751–1757.



- 43 J. A. J. Trygg, J. Gullberg, A. I. Johansson, P. Jonsson, H. Antti, S. L. Marklund and T. Moritz, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 8086–8094.
- 44 D. Vuckovic, X. Zhang, E. Cudjoe and J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 4041–4060.
- 45 T. Soga, M. Sugimoto, M. Honma, M. Mori, K. Igarashi, K. Kashikura, S. Ikeda, A. Hirayama, T. Yamamoto, H. Yoshida, M. Otsuka, S. Tsuji, Y. Yatomi, T. Sakuragawa, H. Watanabe, K. Nihei, T. Saito, S. Kawata, H. Suzuki, M. Tomita and M. Suematsu, *J. Hepatol.*, 2011, **55**, 896–905.
- 46 I. Beheshti, L. M. Wessels and J. H. Eckfeldt, *Clin. Chem.*, 1994, **40**, 2088–2092.
- 47 M. J. N. Paiva, H. C. Menezes, P. P. Christo, R. R. Resende and Z. L. Cardeal, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2013, **931**, 97–102.
- 48 J. Pinto, M. R. M. Domingues, E. Galhano, C. Pita, M. D. Almeida, I. M. Carreira and A. M. Gil, *Analyst*, 2014, **139**, 1168–1177.
- 49 P. A. Demirev, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 779–789.
- 50 P. Y. Yin, A. Peter, H. Franken, X. J. Zhao, S. S. Neukamm, L. Rosenbaum, M. Lucio, A. Zell, H. U. Haring, G. W. Xu and R. Lehmann, *Clin. Chem.*, 2013, **59**, 833–845.
- 51 D. B. Kell, M. Brown, H. M. Davey, W. B. Dunn, I. Spasic and S. G. Oliver, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, **3**, 557–565.
- 52 D. Ryan, K. Robards, P. D. Prenzler and M. Kendall, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **684**, 17–29.
- 53 M. A. Fernández-Peralbo and M. D. Luque de Castro, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2012, **41**, 75–85.
- 54 E. M. Lenz, J. Bright, I. D. Wilson, S. R. Morgan and A. F. P. Nash, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, **33**, 1103–1115.
- 55 L. G. Rasmussen, H. Winning, F. Savorani, H. Toft, T. M. Larsen, L. O. Dragsted, A. Astrup and S. B. Engelsen, *Nutrients*, 2012, **4**, 112–131.
- 56 C. Napoli, N. Sperandio, R. T. Lawlor, A. Scarpa, H. Molinari and M. Assfalg, *J. Proteome Res.*, 2012, **11**, 1274–1283.
- 57 L. C. Soliman, Y. Hui, A. K. Hewavitharana and D. D. Y. Chen, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1267**, 162–169.
- 58 Y.-Z. Zhou, X.-Y. Zheng, X.-J. Liu, Z.-Y. Li, X.-X. Gao, H.-F. Sun, L.-Z. Zhang, X.-Q. Guo, G.-H. Du and X.-M. Qin, *Chromatographia*, 2012, **75**, 157–164.
- 59 M. C. Walsh, L. Brennan, E. Pujos-Guillot, J.-L. Sebedio, A. Scalbert, A. Fagan, D. G. Higgins and M. J. Gibney, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2007, **86**, 1687–1693.
- 60 M. P. Stoop, L. Coulier, T. Rosenling, S. Shi, A. M. Smolinska, L. Buydens, K. Ampt, C. Stingl, A. Dane, B. Muilwijk, R. L. Luitwieler, P. Smitt, R. Q. Hintzen, R. Bischoff, S. S. Wijmenga, T. Hankemeier, A. J. van Gool and T. M. Luider, *Mol. Cell. Proteomics*, 2010, **9**, 2063–2075.
- 61 A. Wuolikainen, P. M. Andersen, T. Moritz, S. L. Marklund and H. Antti, *Mol. Genet. Metab.*, 2012, **105**, 472–478.
- 62 B. Toczylowska, M. Chalimoniuk, M. Wodowska and E. Mayzner-Zawadzka, *Brain Res.*, 2006, **1104**, 183–189.
- 63 B. Crews, W. R. Wikoff, G. J. Patti, H.-K. Woo, E. Kalisiak, J. Heideker and G. Siuzdak, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 8538–8544.
- 64 E. Aasebo, J. A. Opsahl, Y. Bjorlykke, K. M. Myhr, A. C. Kroksveen and F. S. Berven, *PLoS One*, 2014, **9**, e90429.
- 65 A. Anesi, M. Rondanelli and G. M. d'Eril, *Clin. Chem.*, 1998, **44**, 2359–2360.
- 66 T. Rosenling, C. L. Slim, C. Christin, L. Coulier, S. Shi, M. P. Stoop, J. Bosman, F. Suits, P. L. Horvatovich, N. Stockhofe-Zurwieden, R. Vreeken, T. Hankemeier, A. J. van Gool, T. M. Luider and R. Bischoff, *J. Proteome Res.*, 2009, **8**, 5511–5522.
- 67 J. Zheng, R. A. Dixon and L. Li, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 10802–10811.
- 68 A. Zhang, H. Sun, P. Wang, Y. Han and X. Wang, *J. Proteomics*, 2012, **75**, 1079–1088.
- 69 N. Spielmann and D. T. Wong, *Oral Dis.*, 2011, **17**, 345–354.
- 70 H. C. Bertram, N. Eggers and N. Eller, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 9188–9193.
- 71 M. Aimetti, S. Cacciatore, A. Graziano and L. Tenori, *Metabolomics*, 2012, **8**, 465–474.
- 72 M. Sofia, M. Maniscalco, G. de Laurentiis, D. Paris, D. Melck and A. Motta, *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, 1–7.
- 73 P. Montuschi, D. Paris, D. Melck, V. Lucidi, G. Ciabattini, V. Raia, C. Calabrese, A. Bush, P. J. Barnes and A. Motta, *Thorax*, 2012, **67**, 222–228.
- 74 U. P. Kodavanti, in *Biomarkers in Toxicology*, ed. R. C. Gupta, Academic Press, Boston, 2014, pp. 217–239.
- 75 M. Drent and J. A. Jacobs, in *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, ed. G. J. Laurent and S. D. Shapiro, Academic Press, Oxford, 2006, pp. 275–284.
- 76 W. E. Ho, Y. J. Xu, F. Xu, C. Cheng, H. Y. Peh, S. R. Tannenbaum, W. S. Wong and C. N. Ong, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2013, **48**, 204–211.
- 77 C. R. Evans, A. Karnovsky, M. A. Kovach, T. J. Standiford, C. F. Burant and K. A. Stringer, *J. Proteome Res.*, 2014, **13**, 640–649.
- 78 B. Barroso and R. Bischoff, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2005, **814**, 21–28.
- 79 L.-C. Fan, H.-W. Lu, K.-B. Cheng, H.-P. Li and J.-F. Xu, *PLoS One*, 2013, **8**, e73099.
- 80 E. Kipnis, K. Hansen, T. Sawa, K. Moriyama, A. Zurawel, A. Ishizaka and J. Wiener-Kronish, *Chest*, 2008, **134**, 338–345.
- 81 A. J. Henderson, *Arch. Dis. Child.*, 1994, **70**, 167–169.
- 82 R. K. Rai, A. Azim, N. Sinha, J. N. Sahoo, C. Singh, A. Ahmed, S. Saigal, A. K. Baronia, D. Gupta, M. Gurjar, B. Poddar and R. K. Singh, *Metabolomics*, 2013, **9**, 667–676.
- 83 H. Tajima, T. Yoshida, A. Ohnuma, T. Fukuyama, K. Hayashi, S. Yamaguchi, R. Ohtsuka, J. Sasaki, M. Tomita, S. Kojima, N. Takahashi, Y. Kashimoto, M. Kuwahara, M. Takeda, T. Kosaka, N. Nakashima and T. Harada, *Toxicology*, 2010, **267**, 118–124.
- 84 W. J. Griffiths and J. Sjoval, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, **396**, 80–84.
- 85 S. R. Hao, J. J. Xin, J. S. Lian, Q. Xie, D. Y. Chen, Y. Z. Guo, Y. F. Lu, G. P. Sheng, W. Xu, J. R. Huang and L. J. Li, *Metabolomics*, 2011, **7**, 400–412.
- 86 C. C. Huang, W. T. Lin, F. L. Hsu, P. W. Tsai and C. C. Hou, *Eur. J. Appl. Physiol.*, 2010, **108**, 557–566.

- 87 S. Hao, J. Xin, J. Lian, Q. Xie, D. Chen, Y. Guo, Y. Lu, G. Sheng, W. Xu, J. Huang and L. Li, *Metabolomics*, 2011, **7**, 400–412.
- 88 C.-C. Huang, W.-T. Lin, F.-L. Hsu, P.-W. Tsai and C.-C. Hou, *Eur. J. Appl. Physiol.*, 2010, **108**, 557–566.
- 89 S. Gu, A. Jiye, G. Wang, W. Zha, B. Yan, Y. Zhang, H. Ren, B. Cao and L. Liu, *Biomed. Chromatogr.*, 2010, **24**, 245–252.
- 90 K. Suhre, S.-Y. Shin, A.-K. Petersen, R. P. Mohney, D. Meredith, B. Waegelé, E. Altmaier, P. Deloukas, J. Erdmann, E. Grundberg, C. J. Hammond, M. Hrabe de Angelis, G. Kastenmueller, A. Koettgen, F. Kronenberg, M. Mangino, C. Meisinger, T. Meitinger, H.-W. Mewes, M. V. Milburn, C. Prehn, J. Raffler, J. S. Ried, W. Roemisch-Margl, N. J. Samani, K. S. Small, H. E. Wichmann, G. Zhai, T. Illig, T. D. Spector, J. Adamski, N. Soranzo and C. Gieger, *Nature*, 2011, **477**, 54–U60.
- 91 V. Mapelli, L. Olsson and J. Nielsen, *Trends Biotechnol.*, 2008, **26**, 490–497.
- 92 G. Theodoridis, H. G. Gika and I. D. Wilson, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2008, **27**, 251–260.
- 93 S. Moco, R. J. Bino, R. C. H. De Vos and J. Vervoort, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2007, **26**, 855–866.
- 94 A. P. H. Danielsson, T. Moritz, H. Mulder and P. Spiegel, *Anal. Biochem.*, 2010, **404**, 30–39.
- 95 M. J. van der Werf, K. M. Overkamp, B. Muilwijk, L. Coulier and T. Hankemeier, *Anal. Biochem.*, 2007, **370**, 17–25.
- 96 S. N. Martin Volmer, S. Scholz, T. Thute, H. Buntmeyer and T. Noll, *Biotechnol. Lett.*, 2010, **33**, 495–502.
- 97 S. Dietmair, N. E. Timmins, P. P. Gray, L. K. Nielsen and J. O. Kromer, *Anal. Biochem.*, 2010, **404**, 155–164.
- 98 C. A. Sellick, R. Hansen, A. R. Maqsood, W. B. Dunn, G. M. Stephens, R. Goodacre and A. J. Dickson, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 174–183.
- 99 M. M. Koek, R. H. Jellema, J. van der Greef, A. C. Tas and T. Hankemeier, *Metabolomics*, 2011, **7**, 307–328.
- 100 N. Ileri and P. Calik, *Biotechnol. Prog.*, 2006, **22**, 411–419.
- 101 K. Sulek, H. L. Frandsen, J. Smedsgaard, T. H. Skov, A. Wilcks and T. R. Licht, *Metabolomics*, 2012, **8**, 244–252.
- 102 S. Tulipani, R. Llorach, M. Urpi-Sarda and C. Andres-Lacueva, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 341–348.
- 103 A. E. Lewis-Stanislaus and L. Li, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2010, **21**, 2105–2116.
- 104 A. M. Flores-Valverde and E. M. Hill, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 8771–8779.
- 105 S. Carraro, S. Rezzi, F. Reniero, K. Heberger, G. Giordano, S. Zanconato, C. Guillou and E. Baraldi, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2007, **175**, 986–990.
- 106 S. Snowden, S. E. Dahlen and C. E. Wheelock, *Bioanalysis*, 2012, **4**, 2265–2290.
- 107 D. Vuckovic, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **403**, 1523–1548.
- 108 D. Vuckovic, *Bioanalysis*, 2011, **3**, 1305–1308.
- 109 D. Vuckovic, S. Risticvic and J. Pawliszyn, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 5618–5628.
- 110 C. Hamani, M. Diwan, C. E. Macedo, M. L. Brandao, J. Shumake, F. Gonzalez-Lima, R. Raymond, A. M. Lozano, P. J. Fletcher and J. N. Nobrega, *Biol. Psychiatry*, 2010, **67**, 117–124.
- 111 V. Sharma, J. Fan, A. Jerath, K. S. Pang, B. Bojko, J. Pawliszyn, J. M. Karski, T. Yau, S. McCluskey and M. Wasowicz, *Anaesthesia*, 2012, **67**, 1242–1250.
- 112 D. Vuckovic, I. de Lannoy, B. Gien, R. E. Shirey, L. M. Sidisky, S. Dutta and J. Pawliszyn, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 5344–5348.
- 113 B. Bojko, E. Cudjoe, M. Wasowicz and J. Pawliszyn, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2011, **30**, 1505–1512.
- 114 W. B. Dunn, D. Broadhurst, P. Begley, E. Zelena, S. Francis-McIntyre, N. Anderson, M. Brown, J. D. Knowles, A. Halsall, J. N. Haselden, A. W. Nicholls, I. D. Wilson, D. B. Kell and R. Goodacre, *Nat. Protocols*, 2011, **6**, 1060–1083.
- 115 E. Dixon, C. Clubb, S. Pittman, L. Ammann, Z. Rasheed, N. Kazmi, A. Keshavarzian, P. Gillevet, H. Rangwala and R. D. Couch, *PLoS One*, 2011, **6**, e18471.
- 116 D. Vuckovic and J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 1944–1954.
- 117 S. Tiziani, A. H. Einwas, A. Lodi, C. Ludwig, C. M. Bunce, M. R. Viant and U. L. Gunther, *Anal. Biochem.*, 2008, **377**, 16–23.
- 118 M. Jupin, P. J. Michiels, F. C. Girard, M. Spraul and S. S. Wijmenga, *J. Magn. Reson.*, 2013, **228**, 81–94.
- 119 S. Stolzenburg, M. B. Lauridsen, H. Toft, P. A. Zalloua and D. Baunsgaard, *Metabolomics*, 2011, **7**, 270–277.
- 120 R. Lee and P. Britz-McKibbin, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 7047–7056.
- 121 R. Guthrie and A. Susi, *Pediatrics*, 1963, **32**, 338–343.
- 122 B. G. Keevil, *Clin. Biochem.*, 2011, **44**, 110–118.
- 123 J. Deglon, A. Thomas, P. Mangin and C. Staub, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **402**, 2485–2498.
- 124 P. Denniff and N. Spooner, *Bioanalysis*, 2010, **2**, 1817–1822.
- 125 F. M. Li, J. Zulkoski, D. Fast and S. Michael, *Bioanalysis*, 2011, **3**, 2321–2333.
- 126 Y. Y. Li, J. Henion, R. Abbott and P. Wang, *Bioanalysis*, 2012, **4**, 1445–1456.
- 127 R. Steuer, *Briefings Bioinf.*, 2006, **7**, 151–158.
- 128 M. Hilario, A. Kalousis, C. Pellegrini and M. Muller, *Mass Spectrom. Rev.*, 2006, **25**, 409–449.
- 129 D. Radulovic, S. Jelveh, S. Ryu, T. G. Hamilton, E. Foss, Y. Y. Mao and A. Emili, *Mol. Cell. Proteomics*, 2004, **3**, 984–997.
- 130 R. Baran, H. Kochi, N. Saito, M. Suematsu, T. Soga, T. Nishioka, M. Robert and M. Tomita, *BMC Bioinf.*, 2006, **7**, 530–539.
- 131 Y. Ni, Y. P. Qiu, W. X. Jiang, K. Suttlemyre, M. M. Su, W. C. Zhang, W. Jia and X. X. Du, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 6619–6629.
- 132 A. M. van Nederkassel, M. Daszykowski, P. H. C. Eilers and Y. V. Heyden, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1118**, 199–210.
- 133 Y. B. Zheng, Z. M. Zhang, Y. Z. Liang, D. J. Zhan, J. H. Huang, Y. H. Yun and H. L. Xie, *J. Chromatogr. A*, 2013, **1286**, 175–182.
- 134 M. Katajamaa and M. Oresic, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1158**, 318–328.
- 135 S. M. Kohl, M. S. Klein, J. Hochrein, P. J. Oefner, R. Spang and W. Gronwald, *Metabolomics*, 2012, **8**, S146–S160.

- 136 C. D. Wijetunge, Z. P. Li, I. Saeed, J. Bowne, A. L. Hsu, U. Roessner, A. Bacic and S. K. Halgamuge, *Metabolomics*, 2013, **9**, 1311–1320.
- 137 K. Dettmer, P. A. Aronov and B. D. Hammock, *Mass Spectrom. Rev.*, 2007, **26**, 51–78.
- 138 A. Krastanov, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 2010, **24**, 1537–1543.
- 139 Y. Sawada, K. Akiyama, A. Sakata, A. Kuwahara, H. Otsuki, T. Sakurai, K. Saito and M. Y. Hirai, *Plant Cell Physiol.*, 2009, **50**, 37–47.
- 140 W. C. Chang, *J. Roy. Stat. Soc. C. Appl. Stat.*, 1983, **32**, 267–275.
- 141 G. Nyamundanda, L. Brennan and I. C. Gormley, *BMC Bioinf.*, 2010, **11**, 571–581.
- 142 M. E. Tipping and C. M. Bishop, *Neural Comput.*, 1999, **11**, 443–482.
- 143 D. Nagrath, C. Caneba, T. Karedath and N. Bellance, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, 2011, **1807**, 650–663.