Determinação do Perfil Metabolômico de Urina por GC-MS: Estudos Iniciais

Felipe M. Aggio*, Natália A. M. Paulo, José Luiz P. Jara, Marcos N. Eberlin, Ana Valéria C. Simionato.

Resumo

A urina é uma matriz biológica complexa e composta por diversos metabólitos. A identificação de tais compostos por GC-MS pode ser dificultada, se a amostra não receber tratamento adequado. Neste trabalho usou-se a derivatização química dos metabólitos afim de iniciar a caracterização do perfil metabolômico de amostras de urina.

Palavras-chave:

Perfil metabolômico, Derivatização, GC-MS

Introdução

Durante os processos metabólicos, as células produzem metabólitos que fluem através da corrente sanguínea, são pré-concentrados pelos rins e excretados pela urina. Assim, a urina é um fluido biológico que tem sido bastante usado para estudos metabolômicos, devido a sua representatividade do metabolismo de um organismo e obtenção pouco invasiva. Uma das formas de obter o perfil metabolômico é através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), onde metabólitos intrinsecamente voláteis, ou as espécies derivatizadas, são separados com alta resolução e identificados inequivocamente pela retenção cromatográfica, massa molecular e estrutura, com auxílio de bibliotecas de dados completas e confiáveis, tais como a *Agilent Fiehn Metabolomics Library*¹. Neste trabalho, são apresentados os estudos iniciais de preparo de amostras de urina de indivíduos saudáveis a serem analisadas por GC-MS, visando a identificação de espécies relacionadas ao metabolismo humano.

Resultados e Discussão

Foram coletadas 51 amostras de urina de indivíduos saudáveis no Hemocentro da Unicamp. Foi então preparado um *pool* das amostras que foi armazenado à -80 °C. Utilizou-se urease para catalisar a decomposição da ureia, que, junto com proteínas presentes na amostra, são precipitadas com metanol, pois podem prejudicar a detecção de metabólitos. Aliquotas do sobrenadante foram derivatizadas quimicamente, de forma convencional, utilizando os processos de metoximação e sililação, tornando grupos funcionais muito reativos em derivados voláteis e termicamente mais estáveis. Os sobrenadantes foram secos em fluxo de nitrogênio e reagiram por 16 h sob incubação com cloridrato de O-metoxiamina em ausência de luz. A sililação se deu a partir da adição de 30 µL de MSTFA com 1% de TMCS à 70 °C durante 1 h. O ácido pentadecanóico foi usado como padrão interno. As condições de análise por GC-MS foram as descritas por Barbas *et al.*² Resumidamente: Volume de injeção: 1 µL (*splitless*); Fluxo de gás de arraste (He): 1 mL/min; Temperatura do injetor: 250 °C, *hold time* por 1 min; taxa de aquecimento: 3,3 °C/min; temperatura final: 340 °C; *Transfer line*: 280 °C; fonte de ionização por feixe de elétrons: -70 eV; faixa de relação *m/z* investigada: 50 – 650 Da à 5 espectros/s. As análises foram feitas em um GC-MS Agilent 5975C com coluna HP5MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25µm. A análise por GC-MS foi feita em

quadruplicata e o melhor cromatograma foi escolhido com base no número de picos detectados e melhor

resolução.

Figura 1. Cromatograma do *pool* de urina derivatizada.

A separação gerou 162 picos em aproximadamente 25 min de análise. Alguns dos metabólitos identificados são acreditados pelo HMDB (*Human Metabolome Database*³), sendo: ácido propanóico (6,425 min), ácido acético (6,631 min), glicina (10,003 min), ácido L-treonico (13,156 min), xilitol (15,232 min), e D-manose (17,146 min).

Conclusões

Os procedimentos de derivatização química se mostraram bastante eficazes em melhorar a resposta cromatográfica na análise das amostras de urina, apresentando maior número de picos e com maior intensidade, em relação aos estudos iniciais. Desta forma, pretende-se continuar otimizando a metodologia de análise, visando obter o maior número de picos possíveis para que, na próxima etapa, o método seja aplicado ao estudo comparativo do perfil metabolômico de indivíduos saudáveis e com linfoma não-Hodgkin.

Agradecimentos

Ao Hemocentro da Unicamp e ao Laboratório de Bioquímica do Exercício. À FAPESP, CAPES e CNPq.

¹Agilent Technologies, Inc. *Agilent G1676AA Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library*. Santa Clara, CA. 2013.

²Garcia, A., Barbas, C., *Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics in Metabolic Profiling: Methods and Protocols*, Ed. Metz, T. O., Humana Press, Totowa, NJ, 2011.

³Wishart DS, Tzur D, Knox C, *et al.*, *HMDB: the Human Metabolome Database*. *Nucleic Acids Res.* 2007.