

Avaliação de preparo de amostras de urina para análise de compostos orgânicos voláteis por GC-MS para estudo de perfil metabolômico: estudos iniciais.

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

Resumo

Para que uma análise cromatográfica do perfil metabolômico de um fluido biológico seja abrangente, é necessário otimizar as diversas variáveis envolvidas, de forma que seja possível detectar a maior quantidade de picos possíveis. Este trabalho apresenta as etapas iniciais de otimização da extração de compostos orgânicos voláteis (VOCs) de urina por microextração em fase sólida-headspace (SPME-HS) seguida por análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS).

Palavras-chave

Metabolômica, compostos orgânicos voláteis, GC-MS.

Introdução

Uma das abordagens metabolômicas mais promissoras é a análise de compostos orgânicos voláteis (chamados de VOCs, sigla em inglês), que podem servir como potenciais biomarcadores usados em testes seguros, não invasivos e específicos, para a detecção precoce de diferentes tipos de doenças, como o câncer. Tais VOCs podem ser extraídos de fluidos biológicos como a urina, entretanto, para que se obtenha um resultado que seja o mais coerente possível com a real composição da amostra, é preciso que seja realizada uma otimização de diversos componentes do procedimento experimental, visando a obtenção da maior quantidade de picos bem resolvidos no cromatograma alvo. A otimização consiste, também, na escolha do método, sendo que, idealmente, um método de preparo de amostras deve ser simples, apresentar alta capacidade e seletividade de extração, ser eficiente, rápido, potencialmente automatizado e compatível com o método de análise, seguro para o operador e para o meio ambiente. A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica que integra a extração, a concentração e a introdução da amostra no cromatógrafo a gás em apenas uma etapa e seu uso resulta na redução do tempo de preparo da amostra e aumento da sensibilidade, em relação a outros métodos de extração, sendo um método eficiente para amostragem de VOCs, devido às complicadas características biológicas destes compostos.

Resultados e Discussão

As amostragens foram realizadas por SPME-HS com fibra 80/30µm DVB/CARP/PDMS Stableflex seguido de análise por GC-MS em um equipamento Agilent Technologies 5975C com coluna HP – 5MS de 30 m x 0,250 mm x 0,25µm. Para a otimização do preparo de amostra foi realizado um planejamento com as 3 variáveis em questão, de forma a otimizá-las concomitantemente (Tabela 1), visando a obtenção do maior número de picos cromatográficos. As condições que apresentaram os melhores resultados são destacadas na Tabela 1 e resultaram em um cromatogramas com 83 picos (Figura 1).

Tabela 1. Planejamento experimental ²³ do preparo de amostra de urina por SPME-HS (n=3). Parâmetros avaliados: [NaCl] (% m/v): (+) = 40, (-) = 30; tempo de

exposição da fibra no vial: (+) = 30, (-) = 15; temperatura de incubação do vial (°C): (+) = 40, (-) = 30.

Ensaio	[NaCl] (% m/v)	t _{exposição} (min)	T _{incubação} (°C)
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	+	+
6	+	+	+
7	-	-	+
8	+	-	+

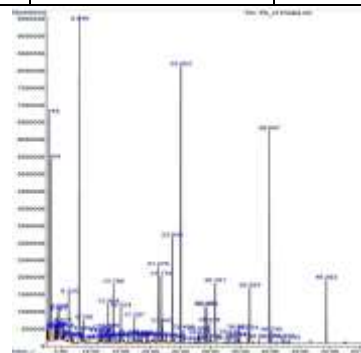


Figura 1. Cromatograma obtido na condição otimizada. Segundo o Human Metabolome Database², alguns metabólitos foram identificados, como a 4-Heptanona (8.049 min) e Manitol (40.230 min).

Conclusões

As condições de extração que propiciaram o maior número de picos cromatográficos são adição de 40% NaCl à amostra e 30 min de exposição da fibra ao headspace à 40 °C (+,+,+). Esses resultados indicam que maiores valores de cada variável deverão ser avaliados em uma nova otimização para verificar se maior número de compostos pode ser detectado. Pretende-se futuramente aplicar o método otimizado para comparar o perfil metabolômico de VOCs de indivíduos saudáveis com o de indivíduos com linfoma não-Hodgkin.

Agradecimentos

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

¹ Zhang, Z., Microchemical J., 2010, 95, 127-139.

² <http://www.hmdb.ca/> (acesso em 14/07/16 às 16:00)