UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

ANDRÉA TEDESCO FACCIO

**Abordagem metabolômica no estudo da
exposição gestacional à poluição atmosférica**

Versão original da Dissertação corrigida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
01/09/2015

ANDRÉA TEDESCO FACCIO

**Abordagem metabolômica no estudo da
exposição gestacional à poluição atmosférica**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Química)*

Orientadora: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo
2015

*Dedico esta dissertação aos meus pais,
Renato e Marita, por todo apoio, amor e
confiança que sempre depositaram em mim.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer toda minha família, em especial aos meus pais, Renato e Marita, que sempre me ensinaram o valor da educação, da dedicação e do esforço. Não há palavras para expressar a minha profunda gratidão. Ao meu irmão, Christian, que sempre consegue arrancar um sorriso de mim. Aos meus queridos tios, quase avós, Suelly e Roberto (*In memoriam*), por todo o carinho e mimos. À minha vó Lourdes, que torna todas as situações melhores com suas risadas gostosas. Aos meus tios, tias, primos e primas, pelas risadas e carinho.

À Profa. Dra. Marina F. M. Tavares pela orientação, pela confiança depositada em mim para realizar esse projeto e pelas oportunidades de crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. João Pedro Simon Farah, por tornar o ambiente de trabalho sempre mais divertido, especialmente durante os almoços. Agradeço também, pelas discussões de química e estatística que contribuíram para este trabalho.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Paulo Hilário N. Saldiva e da Dra. Mariana M. Veras pela realização da experimentação animal e concessão das amostras de urina.

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto Jr. pela disponibilização do equipamento de LC-MS para a otimização do método analítico. Ao especialista Felipe Augusto Dörr, pela colaboração e pelos ensinamentos no manuseamento do equipamento.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, pela disponibilização do equipamento de LC-MS para as análises metabolômicas. À Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi pelo auxílio no manuseamento do equipamento.

Ao Prof. Dr. Paulo Moreno e ao Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago pelos aprendizados em espectrometria de massas.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório Amanda, Carol, Cíntia, Fábio, Gi, Grazielle, Karina, Loraine, Lucas, Maicon, Maryane, Pedro e Rosinha pelo ambiente agradável de trabalho. Em especial aos amigos Carol, Pedro, Gi e Loraine pelo maior convívio durante o meu mestrado, com conversas, risadas e discussões sobre cromatografia e metabolômica. Aos alunos e ex-alunos de iniciação científica. Ao especialista de laboratório Daniel, por toda ajuda para esse trabalho e em especial, pelos ensinamentos passados e dicas durante a monitoria de Química Analítica. À técnica Simone por manter a organização no laboratório.

À minha amiga e colaboradora Aline Klassen, por sempre estar disposta a me ajudar tanto profissionalmente, quanto pessoalmente. Pelos ensinamentos sobre química analítica e metabolômica.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial aos da seção de pós-graduação.

Aos colegas do Instituto de Química que de alguma forma colaboraram para a concretização deste trabalho, em especial, à Luiza Grecco por sempre estar disposta a me ajudar.

Ao meu namorado e amor da minha vida, Filippe, por todo amor, apoio e pela paciência nos momentos estressantes dessa jornada.

Aos meus amigos, por tornarem essa trajetória menos sinuosa. Em especial aos amigos Nildro, Renato, Filipe, Pedro, Anderson e Carlos pela companhia e risadas. À minha dupla de laboratório durante a graduação, Fernando, pelos conselhos e por sempre escutar meus desabafos.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida. Às agências FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto de Química pela estrutura para realização deste projeto e por ser minha segunda casa desde a graduação.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*
Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Faccio, A.T. **Abordagem metabolômica no estudo da exposição gestacional à poluição atmosférica.** 2015. (141p). Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Há fortes evidências dos efeitos negativos da exposição gestacional a poluentes atmosféricos. No entanto, mecanismos de atuação de poluentes não são bem compreendidos. Alterações fisiológicas anômalas na progenitora, durante o período de gravidez, podem causar mudanças permanentes na prole, que podem desencadear futuras doenças na vida adulta. Portanto, o estudo dessas alterações maternas é importante.

A metabolômica é definida como a análise global do metaboloma de um organismo em experimentos comparativos, com o objetivo de observar mudanças relativas da abundância dos metabólitos, o aparecimento ou desaparecimento de metabólitos, e pode fornecer uma melhor compreensão dos mecanismos de funcionamento celular dos organismos a nível molecular.

Nesse trabalho, um estudo experimental de exposição gestacional materna, ao material particulado fino (MP_{2,5}), foi realizado, para avaliar os efeitos dessa exposição no metabolismo, por meio da análise metabolômica global da urina de camundongos fêmeas progenitoras expostas ao MP_{2,5} (grupo teste) ou a ar filtrado (grupo controle) durante a gestação.

Um método cromatográfico e de preparo de amostra para metabolômica urinária por HILIC-MS foram otimizados. Para a otimização da condição cromatográfica, foram investigados a influência de aditivos, concentração de sal e pH da fase móvel, bem como, a rampa do gradiente. A melhor condição foi escolhida por meio da avaliação do formato de pico, da intensidade relativa e do CV do tempo de retenção para 15 *m/z* selecionados, assim como, pelo número total de *molecular features* e CV da intensidade desses *molecular features*. A melhor condição obtida apresenta 20 mmol/L de formiato de amônio em sua composição do solvente B da fase móvel e 95% acetonitrila e 5% solução aquosa 400 mmol/L de formiato de amônio na composição do solvente A. Para o preparo de amostra, foram examinados diferentes solventes orgânicos e suas misturas, para a precipitação de proteínas da urina. O isopropanol foi o solvente apresentou os melhores resultados para o preparo de amostra.

Dessa forma, com o método analítico otimizado, as amostras de urina de camundongos fêmeas prenhas foram submetidas à análise metabolômica global por HILIC-MS. O metaboloma dos animais foi bastante alterado pela exposição gestacional ao material particulado. Observou-se alteração dos níveis de carnitinas, aminoácidos, peptídeos, entre outros. Há também indícios de que a poluição atmosférica alterou a microbiota intestinal dos animais, devido ao aumento de N-óxido de trimetilamina, um metabólito que também é relacionado ao processo de aterosclerose. Níveis de metabólitos relacionados ao metabolismo da histidina também foram alterados devido a exposição ao MP_{2,5}. Níveis de carnitina e acilcarnitinas foram aumentados no teste, sugerindo alteração da produção de energia na mitocondria.

Palavras-chave: Metabolômica, HILIC, Material Particulado, Gravidez

ABSTRACT

Faccio, A.T. **A Metabolomics Approach to the Study of Gestational Exposure to Air Pollution.** 2015.(141p). Master Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

There are strong evidences regarding negative effects of gestational exposure to air pollution. However, the mechanisms of action of air pollutants are not well established. Maternal anomalous physiological changes during pregnancy may cause permanent changes in offsprings, that might initiate future diseases in adult life. Therefore, the study of those maternal changes during pregnancy is important.

Metabolomics is defined as the global analysis of the metabolome of an organism in comparative studies, for the measurement of relative changes in the metabolite abundance, appearance or disappearance. Metabolomics might provide a better understanding of cellular functioning at the molecular level.

In this work, an experimental study of maternal gestational exposure to fine particulate matter (PM_{2.5}) was accomplished to evaluate the effects of this exposure to the metabolism, by an untargeted metabolomics analysis of urine from pregnant mice exposed to PM_{2.5} or to filtered air during pregnancy.

A chromatographic and sample preparation methods for urinary untargeted metabolomics analysis by HILIC-MS were optimized. For the chromatography optimization, the influence of mobile phase additives, salt concentration and pH, as well as, the gradient ramp were investigated. The best condition was chosen by the evaluation of peak shape, relative intensity and retention time CV of 15 selected *m/z*, as well as, the total number of *molecular features* and the intensity CV of those *molecular features*. The best condition comprises of 20 mmol/L of ammonium formate as solvent B, and 95% acetonitrile and 5% 400 mmol/L of ammonium formate as solvent A, in the composition of the mobile phase. For the sample preparation, different solvents, along with, their mixtures were examined for the urine protein precipitation. Isopropanol was the solvent that presented the best results for sample preparation.

Thus, after the analytical method optimized, urine samples from the progenitors were submitted to untargeted metabolomics analysis by HILIC-MS. The animals' metabolome were significantly changed by the gestational exposure to particulate matter. It was observed changes in the levels of carnitines, amino acids, peptides, among others. There is some indication that the air pollution has altered the gut microbiota, due to the enhancement of trimethylamine N-oxide (TMAO), a metabolite

that is also related to the atherosclerosis process. The level of metabolites related to histidine metabolism were also altered due to PM_{2.5} exposure. Carnitine and acylcarnitine levels were also increased in the test group, suggesting an altered energy production in the mitochondria.

Key-words: Metabolomics, HILIC, Particulate Matter, Pregnancy

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% B	Porcentagem de solvente B da fase móvel
¹H NMR HR-MAS	<i>Proton Nuclear Magnetic Resonance High-Resolution Magic Angle Spinning</i> (Ressonância Magnética Nuclear de Próton de Alta Resolução com Rotação no Ângulo Mágico)
2D	Duas dimensões
Acil-CoA	Acil-Coenzima A
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de Variância
CE-MS	<i>Capillary Electrophoresis coupled to Mass Spectrometry</i> (Eletroforese Capilar acoplada à Espectrometria de Massas)
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CoA	Coenzima A
CV	Coeficiente de Variação
CV-ANOVA	<i>Analysis of Variance of Cross-Validated predictive residuals</i> (Análise de Variância de resíduos preditivos da Validação Cruzada)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
EI	<i>Electron Ionization</i> (Ionização por Elétrons)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionização por Eletrospray)
GC-MS	<i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas)
HILIC-MS	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica acoplada à Espectrometria de Massas)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
iPrOH	Isopropanol
LC-ESI-QTOF	<i>Liquid Chromatography coupled to quadrupole-time of flight-mass spectrometry with electrospray ionization interface</i> (Cromatografia Líquida acoplada a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadupolo-tempo-de-vôo e ionização por eletrospray)
LC-ESI-IT	<i>Liquid Chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization interface</i> (Cromatografia Líquida acoplada a um espectrômetro de massas com analisador do tipo armadilha de íons e ionização por eletrospray)
LC-MS	<i>Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas)
MeOH	Metanol
MP	Material Particulado

MP₁₀	Material Particulado Inalável (diâmetro menor que 10 µm)
MP_{2,5}	Material Particulado Fino (diâmetro menor que 2,5 µm)
mRNAs	<i>Messenger Ribonucleic Acids</i> (Ácidos Ribonucleicos Mensageiros)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas Sequencial)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Ressonância Magnética Nuclear)
OPLS-DA	<i>Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis</i> (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais)
OSC	<i>Orthogonal Signal Correction</i> (Correção de Sinal Ortogonal)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
PLS-DA	<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i> (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais)
QC	<i>Quality Control samples</i> (Amostras de Controle de Qualidade)
RPLC-MS	<i>Reversed Phase Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida de Fase Reversa acoplada à Espectrometria de Massas)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida)
SQR	Soma dos Quadrados dos Resíduos
TMAO	<i>Trimethylamine N-oxide</i> (N-óxido de trimetilamina)
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia líquida de ultra eficiência)
VIP	<i>Variable Importance in the Projection</i> (Importância da Variável na Projeção)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxo de trabalho em metabolômica.	21
Figura 2 - Desenho experimental, dos animais expostos ao material particulado fino (MP _{2,5}) ou a ar filtrado (AF).	41
Figura 3 - Concentrador de partículas ambientais utilizado nesse trabalho (A) e um zoom das câmaras de exposição dos camundongos do grupo controle e teste (B). FONTE: Foto cedida pela Dra. Mariana M. Veras.	42
Figura 4 - Possíveis mecanismos de interação do analito no modo HILIC com uma fase estacionária zwitteriônica do tipo sulfobetaína, baseados em descrições da literatura ^{1,2} .	51
Figura 5 - Gráfico de %B versus tempo para o gradiente exploratório (A) e o gradiente mais lento (B).	54
Figura 6 - Cromatogramas de íon extraído (intensidade x tempo de retenção) com exemplos de picos com formato bom para o <i>m/z</i> 114,07 da condição E G1 (A), razoável para <i>m/z</i> 162,11 da condição F G1 (B) e ruim para o <i>m/z</i> 105,03 da condição C G2 (C), baseados no cálculo de fator de cauda (TF) ou na resolução.	59
Figura 7 - (A) Gráfico de barras das notas individuais de todos os parâmetros, obtida pelo número total de <i>molecular features</i> detectados (N_{mol}), média do CV da intensidade ($N_{CV\ int}$), média do CV do tempo de retenção de <i>m/z</i> selecionados ($N_{CV\ TR}$), media de intensidades de picos selecionados normalizada (N_{int}) e de formato de pico (N_{form}) e (B) gráfico de barras da nota total (N_{total}) de cada condição cromatográfica avaliada em triplicata.	61
Figura 8 - Cromatogramas de íon extraído (intensidade x tempo de retenção) de <i>m/z</i> 144,10, das condições F G1 (A) e B G1 (B), e de <i>m/z</i> 265,12, das condições F G1 (C) e B G1 (D).	62
Figura 9 - Cromatogramas de íon extraído de <i>m/z</i> 114,07 das condições D G5 (A), D G1 (B), D G3 (C) e E G1 (D).	64
Figura 10 - Cromatograma de pico de base (intensidade x tempo de retenção) da condição ótima (E G1).	65
Figura 11 - Curva analítica para determinação de proteínas pelo método de Bradford com $y = 0,0060 \pm 0,0002 x + 0,0817 \pm 0,0086$, $R^2 = 0,9965$, $F = 1138$, $p\text{-valor} = 5.10^{-6}$, erro padrão da regressão = 0,0075.	68
Figura 12 - - Desenho experimental dos solventes e misturas testados para remoção de proteínas em urina com os resultados de estimativa da concentração de proteínas no pellet em µg proteína/ g urina (<i>p</i>) e do número de <i>molecular features</i> com coeficiente de variação da intensidade menor que 25% (<i>mf</i>) são apresentados. *A absorbância das amostras precipitadas com acetonitrila é menor do que a obtida para uma solução de padrão de proteína 10 mg/L.	69
Figura 13 - Cromatogramas de íon extraído (intensidade x tempo de retenção) de <i>m/z</i> 181,07 de uma amostra de urina com as etapas de secagem e ressuspensão da amostra em 50% acetonitrila (A) e de uma amostra em 75% isopropanol e sem a etapa de secagem (B).	71

- Figura 14** - Gráfico de escores do modelo de PCA com as amostras de controle de qualidade (■), do grupo teste (◆) e do grupo controle (●) com $R^2 = 0,649$ (variação explicada pelo modelo) e $Q^2 = 0,100$ (previsibilidade do modelo). 75
- Figura 15** - Modelo de PLS-DA construído com as amostras do grupo controle (■) e teste (◆), com predição da classe das amostras de QC (●), com $R^2 = 0,889$ (variação explicada pelo modelo) e $Q^2 = 0,558$ (previsibilidade do modelo). 76
- Figura 16** - Gráfico de escores do modelo de PCA com as amostras do grupo controle (■) e teste (●) com $R^2 = 0,721$ (variação explicada pelo modelo) e $Q^2 = 0,208$ (previsibilidade do modelo). 77
- Figura 17** - Gráfico de escores do modelo de PLS-DA com as amostras do grupo controle (■) e teste (●) com R^2 de 0,877 e Q^2 de 0,557. 78
- Figura 18** - Gráfico da validação do modelo de PLS-DA pelo teste de permutação (50 permutações) de R^2 (▲) e Q^2 (■). 79
- Figura 19** - Gráfico de escores do modelo de OPLS-DA (1+3+0 componentes) do grupo teste (●) e controle (■) com $R^2 = 0,978$ e $Q^2 = 0,606$. 80
- Figura 20** – (A) Gráfico de S-plot com as variáveis A, B, C e D destacadas. (B) Gráficos das intensidades normalizadas das variáveis A, B, C e D (C). Gráfico de barra da covariância da componente preditiva do modelo OPLS-DA com intervalos de confiança de Jackknife. 82
- Figura 21** - Gráfico de S-plot do modelo de OPLS-DA construído com as amostras do grupo controle e teste. 85
- Figura 22** - Cromatograma dos íons extraídos (intensidade x tempo de retenção) relacionados à carnitina de m/z 85, 102, 103, 162, 163 e 200, e espectro de MS/MS da carnitina do MassBank realizado em LC-ESI-QTOF com rampa de energia de colisão de 5 a 60V (A), e possíveis mecanismos de formação dos fragmentos de carnitina encontrados como discriminantes nas análises metabolômicas (B e C). 116
- Figura 23** - Cromatograma dos íons extraídos (intensidade x tempo de retenção) relacionados ao N-óxido de trimetilamina (TMAO) de m/z 58, 59, 76 e 77 e (A), espectro de MS/MS do TMAO do MassBank realizado em LC-ESI-QTOF com de energia de colisão de 30 V (A) e possíveis mecanismos de formação dos fragmentos do TMAO (B). 117
- Figura 24** - Cromatograma dos íons extraídos (intensidade x tempo de retenção) relacionados à acetilcarnitina de m/z 85, 145 e 204, e espectro de MS/MS da acetilcarnitina do MassBank realizado em LC-ESI-IT com de energia de colisão de 40 V (A), e possíveis mecanismos de formação dos fragmentos da acetilcarnitina (B). 118
- Figura 25** - Classe de metabólitos discriminantes encontrados aumentados (A) ou diminuídos (B) no grupo teste. 120
- Figura 26** - Estrutura das carnitinas aumentadas no grupo teste. 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens das técnicas analíticas mais empregadas em estudos metabolômicos	25
Tabela 2 - Trabalhos de metabolômica global que empregam HILIC-MS em amostras de urina	47
Tabela 3 - Fases móveis avaliadas com mais detalhes em experimentos de triplicata	55
Tabela 4 - Gradientes testados para as fases móveis da Tabela 3	55
Tabela 5 - Número de <i>molecular features</i> com coeficiente de variação da intensidade menor que 25% para as condições investigadas	67
Tabela 6 - CV-ANOVA para o modelo de PLS-DA de duas componentes	80
Tabela 7 - CV-ANOVA para o modelo de OPLS-DA (1+3+0 componentes)	81
Tabela 8 - Identificação de <i>Molecular features</i> discriminantes diminuídos no teste e seu papel biológico	86
Tabela 9 - Identificação de <i>Molecular features</i> discriminantes aumentados no teste e seu papel biológico	98
Tabela 10 - Nível de histamina e número de filhotes gerados por cada camundongo avaliado nesse trabalho	123

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução.....	18
1 – Metabolômica.....	19
1.1 – Problema biológico e desenho experimental.....	21
1.2 – Protocolo Experimental.....	21
1.3 – Análise Química.....	22
1.4 – Processamento dos dados e análise estatística.....	26
1.5 – Identificação dos metabólitos discriminantes e interpretação biológica.....	27
2 – Poluição Atmosférica.....	28
2.1 – Efeitos da poluição atmosférica durante a gestação.....	31
 Capítulo 2 – Objetivos.....	 33
1 – Objetivos gerais.....	34
2 – Objetivos específicos.....	34
 Capítulo 3 – Parte Experimental.....	 35
1 – Materiais.....	36
2 – Instrumentação.....	36
3 – Otimização da condição cromatográfica.....	36
3.1 – Preparo de amostra de urina.....	36
3.2 – Análise por HILIC-MS.....	37
3.3 – Tratamento de dados.....	37
4 – Otimização da precipitação de proteínas.....	39
4.1 – Análise por HILIC-MS.....	39
4.2 – Tratamento de dados.....	39
4.3 – Estimativa da concentração de proteína no <i>pellet</i> de urina.....	39

5 – Metabolômica.....	40
5.1 – Desenho experimental e ensaios biológicos.....	40
5.2 – Análises metabolômicas por HILIC-MS.....	42
5.3 – Tratamento de dados.....	43
 Capítulo 4 – Otimização do método analítico.....	 45
1 – Otimização das condições cromatográficas.....	46
2 – Otimização da precipitação de proteínas.....	65
 Capítulo 5 – Metabolômica.....	 72
1 – Análise metabolômica por HILIC-MS.....	73
2 – Visualização e análise estatística dos dados.....	73
3 – Identificação tentativa dos metabólitos discriminantes.....	85
4 – Interpretação biológica dos resultados.....	118
 Capítulo 6 – Conclusões e perspectivas.....	 126
 Capítulo 7 – Referências.....	 129
 Anexos.....	 A
Lista de Anexos.....	B

Capítulo 1 - Introdução

1 – Metabolômica

Os avanços da genômica promoveram imenso progresso na medicina¹, porém alguns objetivos almejados, como a completa previsão e entendimento do fenótipo de indivíduos pelo simples sequenciamento de seu DNA, não foram alcançados. Assim, para compreender melhor os mecanismos de funcionamento celular dos organismos a nível molecular, as ciências “ômicas”, como proteômica, transcriptômica e metabolômica ganharam força.

Analogamente à definição de genoma (todos os genes de um organismo), em 1998 Oliver *et al.* utilizaram a palavra metaboloma pela primeira vez, como o conjunto de todos os compostos de baixa massa molecular (metabólitos) que são sintetizados por um organismo². O termo metabolômica foi utilizado e definido pela primeira vez como a análise quantitativa abrangente do metaboloma de um sistema biológico, que pode ser utilizada para estudos de efeitos pleiotrópicos^a por Fiehn em 2002, porém ainda há divergências sobre os conceitos e nomenclaturas na área de metabolômica, sendo que o consenso é que o estudo deve ser comparativo, entre grupos alterados e controle, ou entre grupos sujeitos a diferentes alterações³. Dessa forma, conceitos dessa área são descritos a seguir, de acordo com alguns estudiosos da área:

Metabolômica: enquanto que para Fiehn a metabolômica é a análise quantitativa global do metaboloma de um organismo em experimentos comparativos, com o objetivo de observar mudanças relativas da abundância dos metabólitos³, para Villas-Bôas a metabolômica é uma nova área da ciência, responsável por caracterizar o metaboloma em condições definidas (diferentes condições ambientais, de desenvolvimento, de alterações genotípicas, etc.), e associar esse metaboloma ao seu genótipo. Para Villas-Bôas a análise de todo metaboloma não é tecnicamente viável, devido à complexidade das amostras biológicas, como grande diversidade química e de concentrações de diferentes metabólitos⁴.

Metabônômica: o grupo de pesquisa de Nicholson foi um dos pioneiros na área e utilizou o termo metabônômica pela primeira vez em 1999, como a “análise quantitativa da medida da resposta metabólica dinâmica e multiparamétrica de sistemas vivos a estímulos patofisiológicos ou a modificação genética”⁵. Contudo, atualmente a nomenclatura mais utilizada é metabolômica.

^a Efeitos pleiotrópicos: múltiplos efeitos fenotípicos de um único gene.

Perfil metabólico (*metabolic profiling*): para Fiehn, o perfil metabólico é a análise quantitativa de um grupo pré-estabelecido de metabólitos para estudos de alteração de uma via metabólica³. Porém, muitos autores utilizam esse termo como a análise global dos metabólitos detectados por uma determinada técnica analítica^{6,7}.

Metabolômica alvo (*targeted metabolomics*): segundo Fiehn, é definida como a análise quantitativa de um determinado substrato, ou o produto de uma reação metabólica, diretamente ligada a uma proteína codificada por um gene específico, para o estudo primário de seus efeitos³. Entretanto, para outros autores, o conceito de metabolômica *targeted* é mais amplo, e é considerado como a análise quantitativa de metabólitos pré-estabelecidos^{6,8}.

Fingerprinting metabólico: análise de classificação rápida do metaboloma intracelular³.

Footprinting metabólico: análise de classificação rápida do metaboloma extracelular⁹.

Assim, devido as divergências em relação a nomenclatura, nesse trabalho serão considerados essencialmente dois tipos de análises metabolômicas: metabolômica alvo (*targeted metabolomics*), como análise quantitativa de metabólitos pré-estabelecidos e metabolômica global ou não-direcionada (*untargeted metabolomics*), como a análise global dos metabólitos detectados por uma determinada técnica analítica, que abrange os conceitos de *footprinting*⁹, *fingerprinting*³ e perfil metabólico^{6,7}.

Em estudos metabolômicos, compara-se o metaboloma, ou um grupo de metabólitos pré-determinados, de grupo(s) submetido(s) a alguma alteração (alimentar, ambiental, nutricional, genética, etc.) com um grupo controle, ou com um grupo sujeito a outra alteração, para a obtenção de informações relevantes, como biomarcadores de doenças^{10,11}, melhor compreensão de rotas metabólicas^{12,13}, eficácia de fármacos¹⁴, efeitos de mudança de dietas¹⁵, respostas biológicas de organismos a mudanças ambientais^{16,17}, efeitos fenotípicos de mutações genéticas^{18,19}, etc. Para tanto, o fluxo de trabalho em análises metabolômicas envolve as etapas de: problema biológico, desenho experimental, protocolo experimental, análise química das amostras, processamento dos dados, análise estatística dos dados, identificação (ID) dos metabólitos diferenciáveis e interpretação biológica dos dados (Figura 1).

Figura 1 - Fluxo de trabalho em metabolômica.

1.1 – Problema biológico e desenho experimental

Uma vez definido o problema biológico a ser abordado, o próximo passo é o desenho experimental.

No desenho experimental, define-se o planejamento do estudo de acordo com o problema biológico, estabelecendo-se por exemplo, o organismo a ser utilizado, o tipo e tamanho da amostra, as condições experimentais em que o organismo será submetido e a abordagem metabolômica a ser utilizada (alvo ou global).

1.2. – Protocolo Experimental

A partir do desenho experimental, desenvolve-se um protocolo experimental, no qual define-se as condições de coleta, armazenamento e tratamento da amostra e método analítico a ser empregado.

A coleta da amostra deve envolver uma etapa de *quenching* metabólico, como transferência imediata da amostra para baixas temperaturas ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou menor), ou modificações brusca de pH (para extremos meios ácido ou básico), a fim de se parar o metabolismo da amostra biológica²⁰. O armazenamento da amostra normalmente é feito em baixas temperaturas ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$; $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)²¹.

O preparo da amostra depende da técnica analítica e da abordagem metabolômica a serem empregadas. Geralmente para metabolômica global, o preparo de amostra é mínimo e não-seletivo, com apenas a remoção de sais e macromoléculas, como proteínas, enquanto que para experimentos de metabolômica alvo, o preparo de amostra é seletivo e pode envolver a concentração do(s) analito(s) de interesse e limpeza da amostra, com o uso de extrações líquido-líquido, sólido-líquido, de colunas de extração em fase sólida ou de microextração por fase sólida²⁰.

1.3 – Análise química

A metabolômica global representa um maior desafio analítico em contrapartida às outras ciências ômicas, devido à variação de propriedades químicas e físicas dos metabólitos presentes em uma determinada amostra biológica. Os metabólitos podem apresentar diversas funções químicas, variando de compostos extremamente polares a compostos apolares, diferentemente da transcriptômica, em que analisa-se mRNAs (biopolímeros compostos de 4 nucleotídeos) e da proteômica, em que analisa-se proteínas (biopolímeros compostos de 22 aminoácidos). Além disso, diferentes metabólitos de uma amostra biológica podem apresentar variações grandes em suas faixas de concentração, aumentando o desafio analítico da análise metabolômica. Assim, há um grande desafio em encontrar um método analítico capaz de cobrir todo metaboloma em uma única análise²². Dessa forma, para a análise metabolômica, poderosas ferramentas analíticas devem ser empregadas e as mais utilizadas são a ressonância magnética nuclear (NMR) e a espectrometria de massas, pois fornecem informações estruturais e não são seletivas a uma determinada classe de compostos. A espectrometria de massas normalmente é acoplada a técnicas de separação, como cromatografia gasosa (GC-MS), cromatografia líquida (LC-MS) e eletroforese capilar (CE-MS)⁶.

A ressonância magnética nuclear é abrangente, pois o preparo de amostra é simples, é uma técnica robusta, reproduzível, o ensaio é não-destrutivo e rápido para experimentos de ^1H NMR (1 a 15 min)^{23–25}. Além disso, através do uso de um padrão interno, como o sal solúvel em meio aquoso 3-(trimetilsilil)-propionato de sódio, o experimento de ^1H NMR pode ser quantitativo²⁵. Entretanto, a técnica não é tão sensível, quanto a espectrometria de massas e esforços vem sendo feitos para contornar esse problema, como por exemplo, o uso de sondas criogênicas para melhorar a

sensibilidade da técnica²⁵. Além disso, a análise de amostras biológicas complexas, podem gerar sobreposição de sinais em certas regiões do espectro de ressonância, dificultando sua interpretação.

A espectrometria de massas pode ser utilizada diretamente ou acoplada a técnicas de separação como a cromatografia gasosa (GC-MS), a cromatografia líquida (LC-MS) e a eletroforese capilar (CE-MS)⁶. O acoplamento a técnicas de separação é vantajoso, pois minimiza problemas de ionização de amostras biológicas, que são complexas e de composição variável e facilita a interpretação do espectro de massas, que torna-se mais simples, devido a separação dos metabólitos previamente a obtenção do espectro de massas²³. Além disso, as técnicas de separação fornecem uma informação adicional importante: o tempo de retenção/migração do metabólito, que pode ser utilizado também na sua determinação e posterior comprovação estrutural, com o uso de padrões autênticos e similaridade de padrões de fragmentação.

Dentre as técnicas de separação acopladas a MS, GC-MS é muito empregada em estudos metabolômicos, devido a robustez da técnica, alta reprodutibilidade e resolução²³, além da disponibilidade de bibliotecas de metabólitos^{26,27}, que facilitam a etapa de identificação dos compostos. Para a análise de compostos voláteis, GC-MS é a técnica ideal, no entanto, para os demais compostos é necessário ao menos uma etapa de derivatização para promover a volatilização dos analitos²⁸. A etapa de derivatização pode introduzir perdas e variabilidade no preparo de amostras²³. Além disso, essa etapa pode ser tediosa, o que limita o número de amostras analisadas, uma vez que, para metabolômica, o ideal é que as amostras sejam analisadas em uma batelada apenas. Ainda, a derivatização pode não ocorrer completamente para todos os metabólitos da amostra biológica e pode produzir mais de um produto derivatizado do mesmo metabólito, o que pode levar a problemas de identificação dos compostos, que devem ser investigados e minimizados²⁹.

LC-MS é a plataforma analítica mais utilizada²⁸ e versátil das técnicas de separação acopladas a espectrometria de massas. Isso se deve a grande variedade de fases estacionárias disponíveis comercialmente, assim tanto analitos de baixa polaridade, como esteroides e lipídios podem ser analisados no modo reverso (RPLC-MS), quanto analitos de alta polaridade, como aminoácidos e ácidos orgânicos de cadeia curta podem ser analisados no modo de interação hidrofílica (HILIC-MS). Apesar dessa versatilidade, não é possível a análise de todas as classes de metabólitos numa única corrida³⁰. Ademais, avanços tecnológicos também impulsionaram o uso da técnica de

LC-MS em estudos metabolômicos, devido a progressos na tecnologia de colunas, como a comercialização de colunas de menores tamanhos de partícula, e com o advento de equipamentos de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), que se equipara a eficiência obtida por GC-MS²⁸. No entanto, a maior desvantagem de LC-MS frente GC-MS é a etapa de identificação dos metabólitos discriminantes, já que, ao contrário de GC-MS que normalmente emprega a ionização por elétrons, que confere ionização e fragmentação dos metabólitos de forma reprodutível, de modo que bibliotecas de metabólitos possam ser construídas; em LC-MS, o uso de diferentes fases móveis e o emprego geralmente, da ionização por eletrospray (ESI) pode levar à formação de adutos e *clusters*, que não são controláveis e previsíveis, dificultando a construção de bibliotecas para LC-MS³⁰. Assim, para a identificação dos metabólitos discriminantes é necessário *spiking* do padrão analítico à amostra e a comparação de espectros e padrões de fragmentação. A identificação também pode ser realizada na ausência de padrões dos metabólitos, pela comparação de espectros de MS/MS com a literatura.

CE-MS é a técnica ideal para compostos polares e iônicos, sendo complementar à cromatografia líquida de fase reversa, em que tais compostos são pouco retidos e à cromatografia gasosa, devido a não-volatilidade desses compostos. CE-MS é uma técnica que apresenta alta resolução, e eficiência, e necessita de um pequeno volume de amostra para injeção (10 nL), o que é interessante em estudos onde o volume de amostra é limitado e em análises de uma única célula^{28,31,32}. Contudo, é necessário aprimoramento da repetibilidade do tempo de migração e da robustez da técnica^{28,33}. Esses problemas de repetibilidade do tempo de migração ocorrem, pois ao contrário da cromatografia em que o tempo de retenção depende de uma bomba peristáltica ou de um sistema de regulação de pressão, o tempo de migração dos analitos na eletroforese capilar resulta da mobilidade do analito e da velocidade do fluxo eletroosmótico, que depende das propriedades da superfície do capilar e do eletrólito de corrida²⁸. Outra desvantagem da eletroforese capilar é sua sensibilidade, que é prejudicada, devido ao uso de um fluxo auxiliar no acoplamento com a espectrometria de massas, que dilui os analitos antes de sua detecção no espectrômetro de massas^{28,33}. Entretanto, para contornar esse problema de sensibilidade, o acoplamento da eletroforese capilar com a espectrometria de massas, sem o uso de um líquido auxiliar (*Sheathless*), foi desenvolvido e gerou uma melhora de até duas ordens de grandeza na sensibilidade para metabolômica global urinária, em comparação ao acoplamento com o uso de um líquido auxiliar³⁴.

Cada técnica analítica tem suas vantagens e desvantagens, que estão resumidas na Tabela 1, e pode privilegiar a detecção de certos compostos na amostra biológica, assim estudos empregando multiplataformas analíticas podem proporcionar uma maior cobertura dos metabólitos presentes na amostra^{23,35}.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens das técnicas analíticas mais empregadas em estudos metabolômicos

Técnica Analítica	Vantagens	Desvantagens
¹ H NMR (Adequada para inúmeras classes de compostos)	<ul style="list-style-type: none"> - Pouco preparo de amostra - Rapidez - Robustez - Repetibilidade - Não-destrutiva 	<ul style="list-style-type: none"> - Menor sensibilidade - Complexidade espectral
GC-MS (Adequada para compostos voláteis ou derivatizáveis e termicamente estáveis)	<ul style="list-style-type: none"> - Melhor repetibilidade entre as técnicas de separação - Disponibilidade de inúmeros bancos de dados - Alta resolução - Alta sensibilidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Derivatização de compostos não-voláteis - Baixa frequência analítica - Não é adequada para todo metaboloma
CE-MS (Adequada apenas para compostos iônicos ou ionizáveis)	<ul style="list-style-type: none"> - Alta resolução; - Rapidez; - Requer volume pequeno de amostras. 	<ul style="list-style-type: none"> - Menor repetibilidade - Menor sensibilidade - Identificação de compostos depende de padrões e de MS/MS - Não é adequada para todo metaboloma
LC-MS (Adequada para inúmeras classes de compostos)	<ul style="list-style-type: none"> - Versatilidade devido a possível combinação de diferentes fases estacionárias e móveis - Boa resolução - Boa repetibilidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Identificação de compostos depende de padrões e de MS/MS - Necessário uso de mais de uma coluna e modo de ionização para cobrir todas as classes de metabólitos

1.4 – Processamento dos dados e análise estatística

Após a análise química de acordo com o protocolo experimental definido, uma grande quantidade de dados é gerada e deve ser processada de acordo com a técnica analítica empregada. Para experimentos em que técnicas de separação são acopladas à espectroscopia de massas, as etapas de tratamento de dados são: criação do conjunto de dados, agrupamento e alinhamento dos picos, normalização dos dados, transformação dos dados para alcançar a estabilidade da variância e escalonamento. Alguns softwares utilizados nessas etapas são: XCMS³⁶, MPP (Mass Profile Professional; Agilent Technologies), MZmine³⁷, MetAlign³⁸, MassLynx (Waters Corp.), AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System)³⁹, entre outros⁴⁰. Para experimentos de NMR, o processamento de dados envolve as etapas de faseamento (*phasing*), correção da linha de base, alinhamento e normalização. Alguns softwares utilizados nessas etapas são PERCH (PERCH Solutions Ltd.), Chenomx NMR Suite (Chenomx Inc.), MestReNova (Mestrelab Res.) MetaboLab⁴¹, MATLAB (The Math Works Inc.), entre outros.

Os dados processados devem ser avaliados por métodos estatísticos multivariados e univariados para a visualização dos dados e determinação dos metabólitos significativamente discriminantes entre os grupos estudados pela metabolômica.

A análise multivariada é muito importante em estudos metabolômicos, devido a capacidade de inferir a partir de uma matriz de dados complexa, um conjunto de metabólitos responsáveis pela diferenciação dos grupos⁴², ao contrário da análise univariada, que avalia as variáveis separadamente, desprezando assim as relações entre as variáveis.

Para uma primeira visualização dos dados, a análise multivariada não-supervisionada de componentes principais (PCA) é muito utilizada e pode indicar a presença de tendências e de amostras anômalas (*outliers*) nos dados^{43–45}. Nessa análise, as variáveis são reduzidas para componentes principais, que são combinações lineares das variáveis iniciais, e são ortogonais, ou seja, não são correlacionadas entre si. As componentes principais resumem a variação dos dados, sendo que a primeira é a responsável pela maior variância, a segunda pela segunda maior variância, e assim por diante^{43–45}. Uma boa maneira de visualizar os dados de PCA é através de gráfico de escores (*score plotting*) em que as amostras (observações) são plotadas em relação a

duas ou três componentes principais e assim, as relações entre as amostras podem ser mais facilmente visualizadas.

Geralmente, em estudos metabolômicos, os grupos estudados são previamente conhecidos (controle e teste, por exemplo), e assim para aperfeiçoar a separação desses grupos, análises multivariadas supervisionadas são utilizadas, como análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), e análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA)⁴².

Os método de mínimos quadrados parciais e de quadrados parciais ortogonais visam separar os grupos, através de uma relação linear entre uma matriz de variáveis preditoras (matriz de dados experimentais), e uma matriz de variáveis de resposta (grupo controle e teste, por exemplo)⁴⁶. Em comparação com o modelo de PCA, no modelo de PLS-DA, as componentes principais são rotacionadas para maximizar a separação entre as classes conhecidas⁴⁶.

O modelo de OPLS-DA incorpora um filtro de correção de sinal ortogonal (OSC) no modelo de PLS-DA, que separa a variação de matriz de dados preditiva da não-correlacionada com a resposta⁴⁶, facilitando a interpretação das variáveis discriminantes, através do gráfico de dispersão S-plot⁴⁷.

Os modelos de análise multivariada supervisionados devem ser validados devido a problemas de *overfitting* e podem ser utilizados, por exemplo, testes de validação cruzada⁴⁸ e de permutação⁴⁰.

Testes univariados também podem ser aplicados, tanto em estudos metabolômicos globais, quanto de análise alvo, e os mais aplicados são o teste t de Student, e o teste de Mann–Whitney para duas classes, ou ANOVA e Kruskal-Wallis para múltiplas classes⁴⁰.

1.5 – Identificação dos metabólitos discriminantes e interpretação biológica

A identificação de metabólitos discriminantes é feita através de buscas em bancos de dados, como HMDB⁴⁹, KEGG⁵⁰, PubChem⁵¹, Metlin⁵², MassBank⁵³, LIPID MAPS⁵⁴, ChEBI⁵⁵, MMD⁵⁶, BioMagResBank⁵⁷, MetaboID⁵⁸ e Chenomx NMR Suite (Chenomx Inc.). A confirmação da identificação do metabólito é feita através da dopagem da amostra com o padrão analítico (*spiking*) e comparação de espectros de fragmentação do metabólito (MS/MS) para MS⁶, e espectros de experimentos 2D para NMR⁵⁹.

Após a identificação dos metabólitos significativamente alterados, busca-se em bancos de dados de vias metabólicas, como KEGG⁵⁰, MetaCyc⁶⁰, HumanCyc⁶¹, BioCyc⁶⁰ e Reactome⁶², quais vias foram alteradas, para a interpretação biológica dos resultados obtidos.

Dependendo do resultado obtido, um novo desenho experimental com base nos resultados observados no experimento pode ser realizado. Pode-se, por exemplo, após um estudo metabolômico global, realizar estudos de análise alvo para melhor compreender os efeitos dos metabólitos de interesse, ou para confirmar o resultado obtido.

2 - Poluição Atmosférica

A legislação brasileira define poluição como “a degradação da qualidade ambiental resultante de atividades que direta ou indiretamente prejudiquem a saúde, a segurança, e o bem-estar da população, criem condições adversas às atividades sociais e econômicas, afetem desfavoravelmente a biota, afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente, e lancem matérias ou energia, em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos” (Lei nº 6.938/81)⁶³.

Os efeitos da exposição aguda da poluição foram observados em alguns incidentes de *smog*, como o do Vale do Meuse em 1930⁶⁴, o de Donora em 1948⁶⁵, e o de Londres em 1952⁶⁶. Nesses episódios, observou-se um aumento expressivo na taxa de internações e na mortalidade. Assim, a comunidade científica passou a estudar os efeitos da poluição e os governantes passaram a legislar sobre limites seguros de concentrações de poluentes. A relação entre a exposição aguda à poluição atmosférica e os efeitos nocivos à saúde humana foram bem estabelecidos até 1970⁶⁷, enquanto que os efeitos de exposição crônica ainda não haviam sido muito estudados.

Após a constatação de riscos a saúde humana em exposições agudas, estudos sobre o efeito da poluição em menores concentrações e em longo prazo foram realizados no mundo. Em 2002, Pope *et al.* publicaram um estudo realizado por meio de dados da Sociedade Americana de Câncer de 1,2 milhões de adultos voluntários⁶⁷. Desses indivíduos, o estudo selecionou os adultos residentes em áreas metropolitanas norte-americanas, cujos dados de poluição atmosférica estivessem disponíveis. O estudo sugere que a poluição por material particulado fino e dióxido de enxofre aumenta a taxa de mortalidade por câncer de pulmão e por doenças cardiopulmonares.

Em 2011, Olmo *et al.* reuniram uma série de artigos nacionais e internacionais publicados entre 1995 e 2009, sobre o efeito da poluição atmosférica, proveniente essencialmente de emissões veiculares, na saúde humana⁶⁸. A maioria dos artigos selecionados associam efeitos negativos à saúde humana, até em concentrações menores que os padrões de qualidade do ar estabelecidos pela legislação brasileira.

No Brasil, os poluentes que compõem o índice de qualidade do ar são: material particulado (MP₁₀^b e MP_{2,5}^c), fumaça^d, ozônio (O₃), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrogênio (NO₂), e dióxido de enxofre (SO₂) (CETESB)⁶⁹. Dentre esses poluentes, o material particulado é um dos poluentes mais prejudiciais à saúde^{70,71}. O MP é classificado de acordo com o diâmetro de suas partículas, e quanto menor seu tamanho, maior penetração no sistema respiratório e maior o dano à saúde humana⁷¹.

Estima-se que mundialmente cerca de 1,5 milhões de mortes por problemas cardiopulmonares, e 95 mil mortes por câncer de pulmão são atribuídas ao material particulado fino (MP_{2,5})⁷². Além disso, o MP está associado à piora no quadro de pacientes com problemas respiratórios crônicos e cardiovasculares⁷¹.

A composição do material particulado, assim como da poluição atmosférica em geral, é variável, podendo conter sulfatos, nitratos, componentes metálicos, compostos policíclicos aromáticos, compostos orgânicos voláteis, entre outros, dependendo de alguns fatores, como tipos de fontes poluidoras (automóveis, indústrias, etc.), do vento, do clima, etc. Assim, uma forma de se associar os efeitos da poluição a seus componentes específicos é o uso de biomarcadores, que podem ser associados à exposição desses componentes, como é o caso da cotinina, um metabólito da nicotina encontrado na urina, que pode ser associado à exposição de fumo de tabaco^{73,74}. Outro metabólito, encontrado na urina, específico da degradação do benzeno pelo organismo é o ácido trans,trans-mucônico, que é associado a inalação de fumaça de cigarro⁷⁵.

O metabólito 1-hidroxipireno foi utilizado como marcador de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, nos estudos de Pan *et al.* e Iñiguez e colaboradores^{76,77}. No trabalho de Toriba e Hayakawa, os metabólitos 8-hidroxi-N-acetil-1-aminopireno, 6-hidroxi-N-acetil-1-aminopireno, 8-hidroxi-1-nitropireno e 6-hidroxi-1-nitropireno foram

^b MP₁₀: material particulado com diâmetro menor que 10 µm

^c MP_{2,5}: material particulado com diâmetro menor que 2,5 µm

^d Parâmetro auxiliar utilizado somente em situações específicas. Sua determinação é feita através da medida de refletância da luz que incide na poeira coletada em filtros e está relacionada ao teor de fuligem na atmosfera (CETESB)⁶⁹.

associados ao poluente policíclico aromático, 1-nitropireno, liberado no material particulado pela exaustão do diesel⁷⁸.

Os biomarcadores podem também indicar o efeito da poluição no organismo, como é o caso do metabólito 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG), associado a danos oxidativos no DNA^{73,74,79}. Os compostos malondialdeído^{76,80} e 15-F2t-isoprostano (15-Ft2-IsoP)⁷⁴ foram utilizados como marcadores de peroxidação de lipídios, em diferentes estudos de poluição atmosférica.

Scarpa *et al.*⁸¹ e de Oliveira *et al.*⁸² revisaram recentemente o emprego de biomarcadores em estudos de poluição atmosférica. Na revisão de literatura de Scarpa *et al.*, a utilidade de biomarcadores não-invasivos, no estudo de efeitos agudos respiratórios da poluição do ar relativa ao tráfego de veículos, é discutida. Os autores observaram que nos artigos revisados, os biomarcadores identificados não são específicos para um tipo de poluente. Na revisão de literatura de Oliveira *et al.*, foram avaliados trabalhos experimentais da área de poluição atmosférica entre os anos 2009 e 2012, em que 70 biomarcadores de exposição e 164 de efeito foram compilados⁸².

O emprego de biomarcadores específicos é importante para estudos dos efeitos da poluição atmosférica no organismo, porém a abordagem metabolômica global pode fornecer um panorama geral das modificações do metabolismo causadas pela exposição a poluentes, uma vez que, o metaboloma de um biofluido ou de um determinado tecido é comparado com o metaboloma de um grupo controle, possibilitando uma melhor compreensão dos mecanismos de atuação dos poluentes nos organismos. Nesse âmbito, abordagens metabolômicas foram utilizadas para estudar o efeito da fumaça de cigarro em células epiteliais pulmonares humanas⁸³, em tecidos de pulmão de camundongos⁸⁴ e em saliva humana⁸⁵.

No trabalho de Vulimiri *et al.*, células epiteliais alveolares expostas à fumaça total de cigarro, às frações gasosas, e à fração de material particulado do fumo foram submetidas à análise metabolômica global por RPLC-MS e GC-MS⁸³. As células expostas as duas frações do cigarro promoveram um aumento do estresse oxidativo e dano celular e um decréscimo da glicólise.

No trabalho de Izquierdo-García *et al.*, camundongos susceptíveis a contrair doença pulmonar crônica obstrutiva, e camundongos resistentes à doença foram divididos em grupos de exposição ao fumo de cigarro, e grupos controle (sem exposição)⁸⁴. Os pulmões intactos dos animais sacrificados foram submetidos a análise metabolômica global por ¹H NMR HR-MAS (ressonância magnética nuclear de próton

de alta resolução com rotação no ângulo mágico), e seis metabólitos discriminantes foram utilizados para a construção de um modelo de predição da doença pulmonar crônica obstrutiva causada pelo cigarro. Tal modelo foi capaz de prever 100% dos camundongos doentes e 78% dos camundongos saudáveis.

No recente estudo metabolômico de Mueller *et al.*, foram comparadas salivas de fumantes e não-fumantes por GC-MS, e foram encontrados 13 metabólitos significativamente discriminantes entre os grupos⁸⁵. A maioria desses metabólitos encontrados são associados a malefícios conhecidos do fumo, como a presença de adenosina aumentada em fumantes, que pode ser relacionada ao estresse metabólico, dano celular, trauma, isquemia ou hipóxia relacionadas à modulação da homeostase.

Kuo *et al.* compararam o metaboloma urinário por ¹H NMR de soldados, e de homens que trabalham em escritório de um estaleiro em Taiwan, para verificar o impacto da exposição de fumo de solda no metabolismo humano⁸⁶. Nesse trabalho, 10 metabólitos foram identificados como discriminantes entre os dois grupos, sendo que alguns deles foram associados à modulação de processos inflamatórios.

Estudos metabolômicos voltados ao efeito da poluição atmosférica na área da saúde são escassos e envolvem poucos poluentes. Para os demais poluentes, como material particulado, estudos metabolômicos devem ser realizados.

2.1 - Efeitos da poluição atmosférica durante a gestação

Estudos sugerem que a poluição do ar pode promover efeitos adversos à reprodução, como a alteração da qualidade do sêmen de homens⁸⁷, aumento do risco de baixo peso de nascimento⁸⁸, aumento do risco de nascimentos prematuros⁸⁹, alteração da morfologia funcional da placenta de camundongos⁹⁰, decréscimo na relação machos/fêmeas em camundongos e humanos⁹¹, mortes por problemas respiratórios no período pós-neonatal⁹², entre outros.

A exposição gestacional à poluição atmosférica pode alterar a gestação, e assim causar danos ao recém-nascido e a sua vida adulta. A programação fetal é o processo, em que influências desfavoráveis durante períodos críticos de desenvolvimento se relacionam com os efeitos permanentes causados no organismo⁹³. Alguns mecanismos de adaptação fetal às condições intrauterinas podem levar a alterações permanentes no metabolismo do recém-nascido, que configuram em uma má adaptação às condições extra-uterinas, podendo afetar o futuro da criança. Pesquisas na área de programação

fetal podem indicar a predisposição a futuras doenças na vida adulta e assim, estudos sobre a poluição e seus efeitos na programação fetal devem ser realizados.

Apesar de inúmeras evidências sobre os efeitos negativos da poluição durante a gestação, os mecanismos de atuação de poluentes nesse período ainda não estão bem estabelecidos, e requerem maiores estudos.

Estudos propõem que o material particulado pode causar estresse oxidativo por meio de substâncias orgânicas e componentes metálicos presentes no MP, e da produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, pela ativação de células inflamatórias⁹⁴. O estresse oxidativo pode causar danos ao DNA⁹⁵ e prejudicar o transporte placentar de oxigênio e nutrientes⁹⁶.

No recente estudo de Melo *et al.*, um desenho experimental de quatro grupos de camundongos foram definidos, sendo um grupo exposto a ar filtrado, antes e durante a gravidez, um grupo exposto a material particulado antes, e a ar filtrado durante a gravidez, um grupo exposto a ar filtrado antes, e a material particulado durante a gestação, e um grupo exposto a material particulado antes, e durante a gravidez⁹⁷. Níveis elevados da proteína IL-4 (interleucina-4) foram encontrados na porção fetal da placenta do grupo de camundongos expostos ao material particulado antes e durante a gravidez, o que sugere que uma reação inflamatória ocorreu durante a gravidez devido a exposição de MP, e que a IL-4 atuou na sua resolução.

Outras propostas de mecanismos de atuação de poluentes e malefícios ao recém-nascido incluem a maior predisposição a inflamações alérgicas, um possível aumento da pressão sanguínea materna, e função endotelial prejudicada⁹⁴. Estudos metabolômicos podem auxiliar na investigação dos mecanismos de atuação dos poluentes durante a gestação, que é o foco desse trabalho.

Capítulo 2 – Objetivos

1 - Objetivos gerais

Este projeto visa investigar as alterações no metabolismo de camundongos prenhas, expostas ao material particulado fino da cidade de São Paulo, por meio de uma abordagem metabolômica global.

2 - Objetivos específicos

- Otimizar um método cromatográfico de HILIC-MS para análise metabolômica global de urina
- Otimizar o preparo de amostra para análise metabolômica global de urina
- Analisar e comparar o metaboloma de camundongos de dois grupos, analisando urina:
 - a. Camundongos fêmeas prenhas expostas a material particulado fino
 - b. Camundongos fêmeas prenhas expostas a ar filtrado
- Por meio da abordagem metabolômica, encontrar e identificar os metabólitos que diferenciam os grupos utilizando análise estatística multivariada e univariada
- Formular uma interpretação biológica para o resultado obtido.

Capítulo 3 – Parte Experimental

1 – Materiais

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil, exceto NaOH e NaCl, que foram obtidos da Synth. A água utilizada em todos os experimentos foi purificada num sistema deionizador (MilliQ, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Foram empregados solventes grau cromatográfico para a precipitação de proteínas (acetonitrila, metanol e isopropanol) e componentes da fase móvel grau espectrometria de massas (acetonitrila, formiato de amônio, acetato de amônio, ácido fórmico) para os experimentos de HILIC-MS. O padrão de albumina sérica bovina foi adquirido como uma solução de 1 mg/mL em 0,15 mol/L de NaCl e 0,05% de azoteto de sódio em ampolas da Sigma-Aldrich.

2 – Instrumentação

- Sistema de HPLC (Prominence, Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadupolo-tempo-de-vôo e ionização por eletrospray (microQTOF II, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha)
- Centrífuga (Micromax, International Equipment Company, Needham, Estados Unidos)
- Agitador vortex (Q220, QUIMIS, Diadema, Brasil)
- Concentrador centrífugo a vácuo (Savant SpeedVac SPD1010, Thermo Scientific, Estados Unidos)
- Espectrofotômetro (MultiSpec-1510, Shimadzu, Kyoto, Japão)

3 – Otimização da condição cromatográfica

3.1 - Preparo de amostra de urina

Isopropanol gelado foi adicionado a um *pool* de urina de três voluntários saudáveis numa proporção de 3:1 (v:v). Após homogeneização por vortex, as amostras foram deixadas a -20 °C por 1,5 h e então centrifugadas (15000 rpm, 10 min). O sobrenadante foi seco num concentrador centrífugo a vácuo e ressuspenso, no mesmo

volume inicial do sobrenadante coletado, em 80% ACN (v/v). A amostra foi homogeneizada, centrifugada (15000 rpm, 10 min), e então o sobrenadante foi analisado.

3.2- Análise por HILIC-MS

As análises de HILIC-MS foram realizadas no Laboratório do Prof. Dr. Ernani Pinto Jr., de Espectrometria de Massas na FCF-USP (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).

Um volume de 10 µL de urina, previamente tratada com isopropanol e mantida no amostrador a 4 °C, foi injetado numa coluna zwitteriônica Synchronis HILIC (3µm, 150 x 2,1 mm, Thermo Scientific), numa sala climatizada mantida a 22 °C. A fase móvel otimizada contém 95% de acetonitrila e 5% de formiato de amônio a 400 mmol/L (concentração final de HCOONH₄ = 20 mmol/L) como solvente (A) e 20 mmol/L HCOONH₄ aquoso (pH 6) como solvente (B). A vazão da fase móvel foi de 0,2 mL/min. O gradiente foi 0-40% B (0-20 min), 40-95% B (20-35 min), 95% B (35-40 min), 95-0% B (40-45 min), 0% B (45-55 min).

O espectro de massas foi obtido no modo de ionização positivo na faixa de m/z de 50-900, e os parâmetros do espectrômetro de massas foram:

Tensão do capilar: 4500 V

Pressão do nebulizador: 45 psi

Vazão do gás de secagem (N₂): 8,0 mL/min

Temperatura de dessolvatação: 220 °C

3.3 - Tratamento de dados

Os dados obtidos a partir das análises em triplicata de urina humana pelos diferentes métodos cromatográficos foram pré-tratados com o software livre R versão 3.1.0 e pelo pacote XCMS³⁶. Primeiramente, os dados cromatográficos foram exportados no software DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para o formato “.cdf” para serem lidos pelo pacote XCMS. Primeiramente, cada análise cromatográfica foi processada individualmente no software livre R por meio do algoritmo centWave do XCMS⁹⁸ (peakwidth = c(3,60), ppm = 15, snthresh = 5, prefilter = c(3,200) e integrate = 2). Dessa forma, obteve-se uma tabela individual de *molecular*

features^a no formato de arquivo de valores separados por vírgula (.csv), que aparecem entre 1 e 40 minutos.

Após a obtenção da tabela individual de *molecular features* de todas as análises, um novo processamento dos dados no software livre R, por meio do pacote XCMS, foi realizado para a triplicata de cada condição cromatográfica. Então, as análises em triplicata foram analisadas em conjunto pelo XCMS e, os *molecular features* foram extraídos pelo algoritmo centWave (peakwidth = c(3,60), ppm = 15, snthresh = 5, prefilter = c(3,200) e integrate = 2) e agrupados (method = density, bw = 2, mzwid = 0.05). A seguir, o tempo de retenção dos grupos de *molecular features* foram alinhados (method = peakgroups, family = symmetric, missing = 0, extra = 0) e os *molecular features* foram reagrupados numa única tabela (method = density, bw = 2, mzwid = 0.05). A tabela de dados foi obtida no formato de valores separados por tabulação (.tsv), e os dados foram então tratados no programa Excel (Microsoft Office 2010), onde os *molecular features* detectados em todas as amostras da triplicata foram contabilizados e a média do coeficiente de variação (CV) da intensidade de todos os *molecular features* foi calculada.

Para avaliação de formato de pico, coeficiente de variação do tempo de retenção e magnitude da intensidade, foram selecionados 15 *m/z* de alta intensidade e que aparecem em todas as condições cromatográficas avaliadas: *m/z* 105,03, *m/z* 114,07, *m/z* 162,11, *m/z* 130,05, *m/z* 138,05, *m/z* 144,10, *m/z* 147,08, *m/z* 170,09, *m/z* 180,06, *m/z* 184,06, *m/z* 181,07, *m/z* 204,12, *m/z* 232,15, *m/z* 265,12 e *m/z* 302,23. Dados da tabela individual de *molecular features* de cada amostra analisada por HILIC-MS obtida pelo XCMS foram compilados para esses 15 *m/z* e organizados por cada triplicata da condição cromatográfica no Excel. Assim, o coeficiente de variação (CV) do tempo de retenção, para cada condição testada em triplicata, foi calculado no Excel, a partir dos dados de tempo de retenção, em segundos, obtidos pela tabela de *molecular features* extraídos pelo XCMS da análise individual de cada corrida cromatográfica. Da mesma forma, por meio dos dados da tabela individual de *molecular features*, calculou-se a média da intensidade normalizada (pela condição que apresentou os menores valores de intensidade) dos 15 *m/z* selecionados no Excel. O formato de pico para os 15 *m/z* selecionados foi avaliado em cada condição cromatográfica testada pelo fator de

^a Os *molecular features* são caracterizados por um determinado intervalo de *m/z* relacionado a um intervalo de tempo de retenção definido. Quando extraídos de mais de uma amostra ao mesmo tempo, um *molecular feature* é caracterizado por se encontrar agrupado e presente na quase totalidade das amostras.

cauda⁹⁹, que foi calculado manualmente por meio do pico obtido pelo cromatograma do íon extraído pelo software DataAnalysis. Nos casos de coeluição, a resolução dos picos foi estimada para fins de avaliação do formato de pico.

4 – Otimização da precipitação de proteínas

4.1 - Análise por HILIC-MS

Um volume de 400 µL de uma mistura de urina de quatro voluntários saudáveis foi transferido para um tubo eppendorf e, 1200 µL de isopropanol foi adicionado a esse tubo, que foi homogeneizado por vortex e mantido a - 20 °C durante a noite, e em seguida, centrifugado (15000 rpm, 10 min). O sobrenadante foi seco e ressuspense em 700 µL de 50% acetonitrila (v/v). Todas as amostras foram preparadas em triplicata e analisadas na condição cromatográfica otimizada como descrito no item 3.2 desse capítulo.

4.2 - Tratamento de dados

Obteve-se a tabela de todos os *molecular features* da análise em triplicata por HILIC-MS de diferentes condições de precipitação de proteína através do pacote XCMS, como descrito no item 3.3 desse capítulo.

O coeficiente de variação da intensidade de todos os *molecular features* de cada triplicata foi calculado e o número de *molecular features* com CV menor que 25% foi contabilizado no programa Excel.

4.3 - Estimativa da concentração de proteína no *pellet* de urina

Uma mistura de urina de dois voluntários saudáveis foi centrifugada (2500 g, 10 min) para a remoção de células e material particulado. Para a precipitação de proteína, 2 mL de urina foram pesados (aproximadamente 2,065 g) e submetidos, em triplicata, ao mesmo procedimento descrito no item 4.1 desse capítulo. O *pellet* de proteína foi ressuspense em 2 mL de uma solução aquosa a 4 mmol/L de NaOH e centrifugado (5 min, 12000 rpm). Então, 500 µL do sobrenadante foram adicionados a 2 mL do reagente

de Bradford (proporção 4:1 reagente:amostra), a solução foi incubada por 5 min e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 595 nm em um espectrofotômetro.

Para a construção da curva analítica, soluções aquosas de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (Bovine Serum Albumin, BSA) em 0,15 mol/L de NaCl e 4 mmol/L de NaOH foram submetidas ao ensaio de Bradford, em triplicata, da mesma maneira que as amostras de urina. Todas as amostras e soluções padrão foram analisadas de 5 em 5, adicionando-se primeiramente a solução padrão ou amostra a cinco cubetas e, depois, o reagente de Bradford, para minimizar problemas de repetibilidade, devido a diferentes tempos de incubação.

5 – Metabolômica

5.1 – Desenho experimental e ensaios biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Paulo Hilário N. Saldiva e da Dra. Mariana M. Veras, na FM-USP (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo). Os animais utilizados nesse trabalho são do projeto intitulado: “Efeitos da exposição ao material particulado concentrado: estudo dos mecanismos placentários envolvidos no comprometimento do ganho de peso fetal e suas implicações sobre a saúde na vida adulta” de responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Hilário N. Saldiva, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da HC-FMUSP – número 023/12 (em anexo).

Camundongos isogênicos^b BALB/c fêmeas e prenhas foram divididos em dois grupos com 12 camundongos cada. No grupo teste, os camundongos foram submetidos diariamente à exposição de material particulado MP_{2,5} e, no grupo controle foram submetidos, com o mesmo tempo de exposição do grupo teste, a ar filtrado, durante a gestação. A prole (machos) gerada por esses camundongos fêmeas foram ainda divididos em quatro grupos, de acordo com a Figura 2. Nesse trabalho somente a urina dos camundongos fêmeas e prenhas foi analisada.

A concentração do MP_{2,5} durante a exposição foi de 600 µg/m³, o que equivale à média que um indivíduo respira em um dia na cidade de São Paulo, e a uma dose de 0,147 µg de MP_{2,5}/ g peso de camundongo (média 20 g para um camundongo adulto).

^b Organismos geneticamente idênticos

Figura 2 - Desenho experimental, dos animais expostos ao material particulado fino (MP_{2,5}) ou a ar filtrado (AF).

A exposição dos camundongos ao material particulado foi realizada na cidade de São Paulo na FM-USP, por meio de um concentrador de partículas ambientais que se encontra dentro de um container, no cruzamento entre as ruas Teodoro Sampaio e Dr. Arnaldo (Figura 3). Esse concentrador foi desenvolvido em Harvard e emprega a tecnologia de impactadores virtuais a fim de concentrar o MP_{2,5} em até 30 vezes¹⁰⁰. Três impactadores são dispostos em sequência e em cada um, a vazão de ar é acelerada na direção de uma passagem estreita e calibrada, enquanto um vácuo perpendicularmente à direção da passagem é aplicado. Assim, em cada estágio, a porção gasosa do fluxo e parte das partículas ultrafinas com diâmetro menor que 0,1 µm são removidas, e o MP_{2,5} passa pelo equipamento e é concentrado. No final de três estágios, o MP_{2,5} concentrado é direcionado às câmaras de exposição, sem alteração de suas propriedades físico-químicas para exposição dos camundongos (Figura 3B). Simultaneamente, e sob as mesmas condições de vazão, pressão, umidade e temperatura, na câmara ao lado, o grupo controle é submetido ao ar filtrado, durante o mesmo período de tempo que o grupo teste. Nas câmaras, os animais foram acondicionados em gaiolas apropriadas e estavam livres para respirar naturalmente.

Figura 3 - Concentrador de partículas ambientais utilizado nesse trabalho (A) e um zoom das câmaras de exposição dos camundongos do grupo controle e teste (B). FONTE: Foto cedida pela Dra. Mariana M. Veras.

Nos intervalos entre as exposições, os animais foram mantidos em gaiolas, em estantes ventiladas, recebendo ar filtrado, com ração e água disponíveis *ad libitum*^c e sob ciclo luz/escuro de 12h/12h.

Durante o período de gravidez e de exposição, foram coletadas amostras diárias de urina das mães, 2 horas após a exposição, para análise metabolômica. As amostras de diferentes dias de coleta de urina foram agrupadas em uma única amostra por camundongo, para posterior análise metabolômica.

Durante a gestação, as fêmeas foram avaliadas quanto ao ganho de peso, o desenvolvimento fetal e o fluxo sanguíneo placentário pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Paulo Hilário N. Saldiva e da Dra. Mariana M. Veras, na FM-USP (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

5.2 - Análises metabolômicas por HILIC-MS

As amostras de urina de camundongo foram preparadas de acordo com o procedimento otimizado descrito no item 4.1 desse capítulo, porém numa menor escala (80-150 µL de urina de camundongo). As amostras de urina de camundongo foram ressuspensas na proporção de 2:7 de urina: solução 50% de ACN e centrifugadas (15.000 rpm, 20 min) antes da injeção. Uma amostra de controle de qualidade (QC) foi preparada por meio da mistura de 5 µL de todas as amostras processadas de urina de camundongo (controle e teste), para avaliação da performance do sistema analítico. Essas amostras de QC foram analisadas inicialmente cinco vezes antes das amostras dos

^c À vontade

grupos controle e teste, a cada cinco amostras desses grupos, e ao final da sequência. A análise por HILIC-MS foi realizada no laboratório do professor Dr. Massuo Jorge Kato no IQ-USP (Instituto de Química da Universidade de São Paulo), com as condições descritas no item 3.2 desse capítulo, porém o tempo de lavagem da coluna foi de 10 minutos para manter a estabilidade do coluna, e as amostras ficaram sob temperatura ambiente no amostrador, numa sala climatizada (21-22 °C).

Uma solução de 10 mmol/L de formiato de sódio em 50% (v/v) isopropanol foi injetada no final das corridas cromatográficas, durante a etapa de equilíbrio da coluna, para posterior calibração do m/z exato das análises; porém o dispositivo falhou durante algumas análises (11C, QC2, QC3, QC4, QC5). O formiato de sódio forma *clusters* de carga unitária, em uma ampla faixa de m/z , e é adequado para a calibração do instrumento quando a fonte de ionização utiliza eletrospray¹⁰¹.

5.3 - Tratamento de dados

Os dados brutos das amostras dos grupos controle, teste e de controle de qualidade (QC) foram primeiramente exportados para o formato “.cdf”, os quais foram lidos pelo pacote XCMS no software de acesso livre R, para a obtenção da tabela de *molecular features* dos dados das análises metabolômicas.

O processamento dos dados seguiu a seguinte sequência no XCMS:

- Extração dos *molecular features* pelo algoritmo *matchedFilter* com os parâmetros padrão desse algoritmo, como largura do pico a meia altura de 30 segundos (fwhm=30) e limite inferior da razão sinal/ruído igual a 10 (snthresh =10)
- Agrupamento dos *molecular features* pelo algoritmo *density* (bw=30, mzwid = 0,05)
- Alinhamento do tempo de retenção pelo algoritmo *peakgroups* (Family= gaussian)
- Reagrupamento *molecular features* dos pelo algoritmo *density* (bw=10, mzwid = 0,05)
- Preenchimento de valores de intensidade de picos não encontrados em algumas amostras pelo algoritmo *fillPeaks*
- Normalização dos dados pela mediana da intensidade¹⁰²

- Obtenção da tabela de dados

A análise estatística dos dados processados foi realizada no programa SIMCA P+12 (Umetrics, Umea, Suécia), com um escalonamento por pareto e, analisados primeiramente por PCA e depois por PLS-DA.

A seguir, os dados brutos somente das amostras dos grupos controle e teste foram novamente processados pelo XCMS, com os mesmos parâmetros utilizados descritos acima. Então, a tabela de dados foi submetida à análise estatística no programa SIMCA P+12. Os dados foram escalonados por pareto e analisados por PCA, PLS-DA e OPLS-DA. O modelo de PLS-DA foi validado por validação cruzada (Q^2 e CV-ANOVA) e pelo método de permutações e o modelo de OPLS-DA foi validado por validação cruzada. A partir do modelo de OPLS-DA obteve-se um gráfico de S-plot para uma primeira seleção das variáveis discriminantes. Essas variáveis foram avaliadas pelo intervalo de confiança do Jackknife (obtido pelo SIMCA P+12), pelo p -valor do teste t (calculado no programa Excel), pelo valor do coeficiente de variação da intensidade da variável nas amostras do QC (calculado no Excel) e, pelo valor do sinal/ruído (observado no cromatograma do íon extraído, obtido pelo programa DataAnalysis, a partir dos dados brutos). Os *molecular features* com relação sinal/ruído menor que 3 foram descartados.

O valor de m/z exato de cada *molecular feature* foi obtido por meio de uma calibração (com o software DataAnalysis) com o pico do padrão de formiato de sódio, injetado ao final das corridas, para algumas corridas cromatográficas do grupo controle e teste. Os dados obtidos dessas análises cromatográficas foram extraídos no XCMS.

A(s) possível(is) identidade(s) dos *molecular features* discriminantes foram encontradas nos bancos de dados Metlin e HMDB pelo m/z exato. Para alguns compostos fragmentados, tempo de retenção, formato de pico e espectros de MS/MS da literatura (Metlin, HMDB, MassBank) desses compostos foram avaliados para a identificação de *molecular features* que não foram identificados por bases de dados. As informações referentes ao papel biológico dos metabólitos identificados foram buscadas, primeiramente no HMDB e as rotas desses metabólitos foram buscadas no banco de dados KEGG para camundongos (espécie *Mus musculus*). Além disso, para alguns compostos, buscou-se informações na literatura.

Capítulo 4 – Otimização de método analítico

1 – Otimização das condições cromatográficas

Dentre os fluidos biológicos, a urina foi a escolhida, devido à facilidade da coleta e por essa não ser invasiva, à facilidade de obtenção de volumes relativamente grandes de amostra, ao seu menor teor de proteínas em relação a outros biofluidos, como o sangue, e por conter informações biológicas valiosas^{103,104}.

A urina apresenta majoritariamente compostos polares e, o uso de HILIC-MS vem sendo empregado em trabalhos de metabolômica global para a análise de metabólitos polares desse biofluido, como pode-se observar na Tabela 2.

Na cromatografia de interação hidrofílica as fases estacionárias são polares, como a do modo cromatográfico normal, entretanto, o eluente é uma mistura de solventes polares orgânicos com água/tampão, típico de fase reversa (RPLC), porém difere de RPLC, pois o solvente orgânico é o eluente fraco. Assim, pelo fato do solvente orgânico estar presente em uma maior porcentagem, a eficiência dos processos de formação do spray e de dessolvacão na ionização por eletrospray (ESI) é melhor, levando a uma maior sensibilidade em relação à RPLC-MS¹⁰⁵. Além disso, as análises possuem melhor repetibilidade que análises típicas de modo normal¹⁰⁶.

Em HILIC, a fase móvel mais forte é a aquosa e os compostos mais apolares são eluídos primeiramente, enquanto que os polares são mais retidos. Estudos indicam que a retenção em HILIC é na maioria das vezes multimodal, isto é, envolvendo tanto mecanismo de partição, típico do modo reverso, quanto de adsorção, característico do modo normal¹⁰⁵. Geralmente em HILIC, o mecanismo predominante é o de partição hidrofílica, em que uma camada de água da fase móvel é parcialmente imobilizada na fase estacionária e, os analitos interagem com esse ambiente hidrofílico, mas ainda podem ocorrer interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre o analito e a fase estacionária¹⁰⁵. A influência de cada mecanismo na retenção depende do analito e das condições cromatográficas, como a proporção de água presente na fase móvel, e do tipo de fase estacionária, que pode apresentar diferentes materiais susceptíveis a diferentes interações, como aminas, sílica, compostos zwitteriônicos, diol, ciclodextrinas, entre outras¹⁰⁵⁻¹⁰⁹.

Tabela 2 - Trabalhos de metabolômica global que empregam HILIC-MS em amostras de urina

TIPO DE URINA	PREPARO DE AMOSTRA	COLUNA FASE ESTAC.	COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL SOLVENTE (A) E SOLVENTE (B)	REFERÊNCIA
Humana	1 - Adição de ACN a urina (ACN:urina, 4:1) 2 - Centrifugação (15.000 g, 10 min, 4 °C)	Acquity HILIC (Waters) Sílica ^a	A = ACN, B = 0,1% HCOOH, 100 mmol/L HCOONH ₄ (aq)	110, 111
Humana	1 - Adição de ACN a urina (ACN:urina, 1:1) 2 - Centrifugação (13.000 rpm, 5 min)	Aphera NH2 polymer (Astec) Amina (polímero)	A = ACN, B = 13 mmol/L CH ₃ COONH ₄ (aq) (pH 9,1 ajustado com NH ₄ OH)	112
Humana	1- Adição de ACN a urina (ACN:urina, 1:1) 2 - Centrifugação (13.000 rpm, 5 min)	Luna NH2 (Phenomenex) Amina ^a	A = ACN, B = 13 mmol/L CH ₃ COONH ₄ (aq) (pH 9,1 ajustado com NH ₄ OH)	113
Humana	1 - Liofilização 2 – Ressuspensão em D ₂ O (urina: D ₂ O, 5:1) ^c	Supersphere Si (Trentec) Sílica ^a	A = 0,2 % HCOOH em ACN, B = 100 mmol/L NH ₃ (aq)	114
Humana	1 - Centrifugação (13.000 rpm, 10 min, 4 °C) 2 - Liofilização 3 - Ressuspensão em ACN:MeOH:HCOOH, 650:350:2 (urina:solvente, 5:2) 4 - Filtração (0,22 µm)	TSKgel amide-80 (TOSOH) Amida (polímero) ^b	A = 10 mmol/L CH ₃ COONH ₄ em 85% ACN B = 10 mmol/L CH ₃ COO NH ₄ em 60% ACN	115

Humana	1 - Adição de ACN a urina (ACN:urina, 4:1) 2 - Homogeneização por vortex e mistura mantida a 4 °C por 10 min 3 - Centrifugação (13.000 rpm, 10 min, 4 °C) 4 - Filtração (0,22 µm)	Xbridge HILIC (Waters) Sílica híbrida ^a	A = 0,1% HCOOH em ACN, B = 10 mmol/L CH ₃ COONH ₄ (aq)	116
Humana	1 - Adição de ACN a urina (ACN:urina, 4:1) 2 – Mistura mantida a temperatura ambiente por 10 min 3 - Centrifugação (12.000 rpm, 10 min, 4 °C)	Xbridge HILIC (Waters) Sílica híbrida ^a	A = 0,1% HCOOH em ACN, B = 0,1% HCOOH(aq)	117
Humana	1 - Adição de ACN a urina (ACN:urina, 1:1) 2 - Centrifugação (10.186 g, 8 min) 3 - Filtração (0,45 µm)	ZIC-HILIC (Sequant) Sulfobetaína (zwitteriônica) ^a	A = 0,1% HCOOH em ACN, B = 0,1% HCOOH, 5 mmol/L CH ₃ COONH ₄ (aq) (pH 4)	118
Humana	1 - Adição de ACN a urina (ACN:urina, 4:1) 2 - Mistura passa por uma placa de precipitação de proteínas	ZIC-HILIC (HiChrom) Sulfobetaína, ZIC-pHILIC (HiChrom) Sulfobetaína (zwitteriônicas)	ZIC-HILIC - A = 0,1% HCOOH em ACN, B = 0,1% HCOOH (aq) ZIC pHILIC - A = ACN, B = 20 mmol/L (NH ₄) ₂ CO ₃ (pH 9,2 ajustado com 0,1% NH ₄ OH _(aq))	119

Humano	1 - Adição de ACN a urina (ACN:urina, 4:1) 2 - Centrifugação (3.000 rpm, 5 min)	ZIC-pHILIC (HiChrom) Sulfobetaína (zwitteriônica) ^a	A = ACN, B = 20 mmol/L (NH ₄) ₂ CO _{3(aq)} (pH 9,2)	120
Humana	1 – Adição de H ₂ O a urina (H ₂ O:urina, 2:1) 2 – Centrifugação com filtro (corte molecular de 3 kDa, 200,35 g, 30 min) 3 – Ressuspensão no solvente A (solvente:urina, 4:1)	ZIC-HILIC (Sequant) Sulfobetaína (zwitteriônica)	A = 95% ACN, 5% 50 mmol/L CH ₃ COONH ₄ (aq), B = 50% 50 mmol/L CH ₃ COONH ₄ (aq), 45% H ₂ O, 5% ACN	121
Rato	1 - Adição de H ₂ O a urina (H ₂ O:urina, 3:1) 2 - Centrifugação (14.000 rpm, 13 min)	Acquity BEH HILIC (Waters) Sílica híbrida ^a	A = 95% ACN, 5% 10 mmol/L CH ₃ COONH ₄ (aq) (pH 8), B = 50% ACN, 50% 10 mmol/L CH ₃ COO NH ₄ (aq) (pH 6)	122
Rato	1 - Adição de H ₂ O a urina (H ₂ O:urina, 3:1) 2 - Centrifugação (16.089 g, 10 min)	Acquity BEH HILIC (waters) Sílica híbrida	A = 0,1% HCOOH, 10 mmol/L NH ₄ CH ₃ CO ₂ em 95% ACN, B = 0,1% HCOOH, 10 mmol/L CH ₃ COO NH ₄ em 50% ACN	123
Rato	1 – Adição de uma mistura de solventes (ACN:MeOH, 3:1) a urina (solvente:urina, 3:2) 2 - Centrifugação (12.000 rpm, 15 min) 3 - Liofilização 4 - Ressuspensão em ACN:MeOH:HCOOH, 650:350:2 (urina:solvente, 2:1)	Atlantis HILIC (Waters) Sílica ^b	A = 10 mmol/L CH ₃ COO NH ₄ em 90% ACN, B = 10 mmol/L CH ₃ COO NH ₄ em 50% ACN	124

Rato	1 - Centrifugação (800 g, 10 min) 2 - Diluição em água (urina:H ₂ O, 1:1) 3 - Adição de ACN a urina diluída (ACN:urina diluída, 2:3) 4 - Centrifugação (10.000 g, 10 min, 4 °C)	Atlantis HILIC (Waters) Sílica	A= ACN, B = 10 mmol/L HCOONH ₄ (aq) (pH 2,5 ajustado com HCOOH)	125
Rato	1 – Adição de mistura de solventes (ACN:MeOH, 3:1) a urina (solvente:urina, 3:2) 2 - Centrifugação (12.000 rpm, 15 min) 3 – Liofilização 4 - Ressuspensão em ACN:MeOH:HCOOH, 650:350:2 (urina:solvente, 2:1) 5 - Filtração (0,22 µm)	HILIC Si (Waters) Sílica ^b	A = 10 mmol/L CH ₃ COO NH ₄ em 90% ACN, B = 10 mmol/L CH ₃ COO NH ₄ em 50% ACN	126
Rato	1 - Adição de ACN a urina (ACN:urina, 4:1) 2 - Centrifugação (10.000 g, 10 min)	XBridge Amide (Waters) Amida trifuncional	A = 10 mmol/L CH ₃ COO NH ₄ em 90% ACN, B = 10 mmol/L CH ₃ COONH ₄ em 50% ACN	127, 128
Rato	1 – Procedimento de SPE (Oasis HLB, Waters) 2 – Filtração da fração de lavagem (Gelman GHP Acrodiscs, 13mm D.I., 45 µm, Merck)	ZIC-HILIC (Merck) Sulfobetaina (zwitteriônica) ^a	A = 0,025% HCOOH em ACN, B = 5 mmol/L CH ₃ COO NH ₄ (aq) (pH = 4 ajustado com HCOOH)	129

As proporções e porcentagens representadas referem-se à relação volume-volume. ^a A amostra de urina também foi analisada por RPLC-MS; ^b A técnica de cromatografia líquida multidimensional foi empregada; ^c Procedimento para LC-MS e LC-NMR/MS.

Devido à diversidade de fases estacionárias disponíveis comercialmente e, as possibilidades de diferentes interações com os analitos, a escolha da coluna é muito importante no desenvolvimento de método por HILIC^{108,130}.

Um dos recheios comumente utilizados é a coluna zwitteriônica, com grupamentos de sulfobetaina (Figura 4). Esse recheio apresenta cargas negativas e positivas permanentes na faixa de pH de trabalho recomendada (pH entre 3 e 8) e, carga neutra total, devido à proporção de 1:1 dos grupos de amina quartenária e de sulfônico. Assim, a separação dos componentes da amostra pode ocorrer tanto por partição hidrofílica, quanto por interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio, tornando esse tipo de recheio adequado para a separação de compostos polares neutros ou carregados (Figura 4). No trabalho de otimização de métodos cromatográficos de LC-MS para metabolômica urinária de Zhang *et al.*, duas colunas HILIC com grupamentos de sulfobetaina apresentaram resultados superiores ao uso de colunas cromatográficas de fase reversa¹³¹. Portanto, neste trabalho, optou-se pelo uso de uma coluna de recheio zwitteriônico, como o representado na Figura 4.

Figura 4 – Possíveis mecanismos de interação do analito no modo HILIC com uma fase estacionária zwitteriônica do tipo sulfobetaina, baseados em descrições da literatura^{105,132}.

Em HILIC, os solventes orgânicos devem ser miscíveis em água, e podem ser empregados acetonitrila e alguns álcoois e ésteres cíclicos, que obedecem a seguinte ordem de força de eluição: metanol > etanol > isopropanol > tetrahydrofurano > acetonitrila, sendo que o solvente mais utilizado é a acetonitrila, pois outros solventes

podem resultar em baixa retenção dos analitos e em picos alargados e assimétricos^{105,108,130}. Assim, a acetonitrila foi escolhida neste trabalho para compor a fase móvel.

A fase móvel de HILIC normalmente contém sais, que têm um papel importante nesse modo cromatográfico, atuando no controle da força iônica e do pH do meio, e sua ausência pode resultar em tempos de retenção demasiadamente longos ou picos alargados¹⁰⁹. Para o acoplamento com a espectrometria de massas, os sais empregados na fase móvel devem ser solúveis no solvente orgânico de escolha e voláteis, como por exemplo o formiato de amônio e o acetato de amônio¹³³. Juntamente com os sais, ácidos fracos voláteis, como ácido fórmico e ácido acético¹⁰⁵, podem ser utilizados para ajuste do pH, que pode influenciar a retenção e o formato de pico dos analitos^{108,130}. Além disso, alguns trabalhos da literatura utilizam como aditivo da fase móvel apenas ácido fórmico^{117,119}, que é também, comumente aplicado em RPLC-MS^{117,118,122}. Então, neste trabalho, acetato de amônio, formiato de amônio e ácido fórmico foram investigados como aditivos da fase móvel. Assim, as fases móveis testadas preliminarmente para análise de urina foram:

- **(A)** 95% ACN, 5% 100 mmol/L CH₃COONH₄ (aq) como solvente A e 5 mmol/L CH₃COONH₄ (aq) (pH 7) como solvente B
- **(B)** 95% ACN, 5% 100 mmol/L HCOONH₄ (aq) como solvente A e 5 mmol/L HCOONH₄ (aq) (pH 6) como solvente B
- **(C)** 95% ACN, 5% 100 mmol/L HCOONH₄ (aq) e 446 mmol/L HCOOH (aq) como solvente A e 5 mmol/L HCOONH₄ (aq), 22,3 mmol/L HCOOH_(aq) (pH 3) como solvente B
- **(D)** 5% 1915 mmol/L HCOOH(aq): 95% ACN (v/v %) (C_{final} HCOOH = 0,1%, v/v %) como solvente A e 0,1% HCOOH_(aq) (v/v %) como solvente B.

Os aditivos das fases móveis avaliadas (ácido fórmico, formiato de amônio e acetato de amônio) estão na mesma concentração final nos solventes A e B, a fim de se manter as concentrações dos mesmos constantes durante todo gradiente.

Um fator muito importante em separações por HILIC é a porcentagem de água na fase móvel, que além de ser o solvente forte desse modo cromatográfico, alterando a retenção dos compostos pelo mecanismo de partição, também pode influenciar a retenção dos analitos de outra maneira, pois em menor quantidade, a camada de água parcialmente imobilizada na fase estacionária pode ser menos espessa, e assim, o

mecanismo de adsorção pode ser favorecido¹³⁴. No estudo de Guo *et al.* foram avaliados a influência de alguns parâmetros na otimização na separação de seis ácidos orgânicos aromáticos, por um desenho experimental, utilizando diferentes colunas HILIC, e concluiu-se que em geral para esse conjunto de analitos, a porcentagem de água na fase móvel foi o fator de maior impacto na retenção, seguida da concentração de sal (acetato de amônio) e por último, a temperatura da coluna¹³⁴. Nesse sentido, para análises metabolômicas, em que procura-se detectar o maior número possível de compostos, a otimização do gradiente e teor de água na fase móvel é muito importante, pois altera a retenção dos compostos. Além disso, a otimização do gradiente, pode acarretar em uma melhor resolução dos picos, e assim, pode-se minimizar interferências de ionização (supressão ou aumento), devido a coeluição dos compostos. Então, diferentes gradientes foram avaliados neste trabalho.

Primeiramente, testes preliminares foram realizados com um *pool* de amostras de urina humana, para selecionar gradientes a serem testados com mais detalhes. Um gradiente exploratório de 30 minutos de 5 a 95% B (Figura 5A) foi testado para as fases móveis **A**, **B**, **C** e **D**, e por meio dessas corridas, *molecular features*^a foram extraídos pelo software DataAnalysis da Bruker. Então, foi determinada a %B em que a maioria dos compostos foram eluídos, e assim, novos gradientes em que a rampa do gradiente foi variada decrescida, até alcançar essa %B, foram testados.

Para a fase móvel **B**, por exemplo, 96,5% dos *molecular features* obtidos pelo DataAnalysis eluem em até 12 minutos, ou seja, em até 40% B (Figura 5A). Então, optou-se por tornar o gradiente mais lento até atingir 40% B e, depois aumentar a porcentagem de solvente B mais rapidamente até 95% B para garantir a lavagem da coluna (Figura 5B). Esse novo gradiente resultou em cerca de 47% mais *molecular features* (de 316 para 464) e em áreas maiores para picos selecionados presentes em todas as amostras, indicando que o novo gradiente minimiza efeitos de supressão de ionização e assim, mais *molecular features* são extraídos e com maior intensidade.

^a Os *molecular features* são caracterizados por um determinado intervalo de *m/z* relacionado a um intervalo de tempo de retenção definido. Quando extraídos de mais de uma amostra ao mesmo tempo, um *molecular feature* é caracterizado por se encontrar agrupado e presente na quase totalidade das amostras.

Figura 5 - Gráfico de %B versus tempo para o gradiente exploratório (A) e o gradiente mais lento (B).

Então, foi realizada uma análise prévia de corridas em diferentes gradientes para as fases móveis **A**, **B**, **C** e **D**, considerando o número de *molecular features* extraídos, a intensidade normalizada de alguns íons extraídos presentes em todos os gradientes, e a inspeção visual da forma dos picos nos cromatogramas. Assim, as condições que tiveram os melhores desempenhos para cada fase móvel foram avaliadas com mais detalhes, em análises de triplicata de uma mesma amostra de um *pool* de urina. Por meio dessas análises prévias, as corridas de melhor desempenho das fases móveis **A**, **B**, **C** e **D** foram comparadas em relação ao número de *molecular features* obtidos pelo software DataAnalysis e, ao valor do sinal/ruído para íons extraídos intensos e de m/z presentes em todas as análises cromatográficas. A fase móvel **C** apresentou de 32 a 142% mais *molecular features* que as demais fases móveis testadas e, em geral melhores valores de sinal/ruído para os picos selecionados. A concentração de sal pode influenciar as interações eletrostáticas entre a fase estacionária e o analito¹³⁵ e o aumento da força iônica pode levar a uma melhora do formato de pico¹⁰⁸. Assim, para a fase móvel **C**, a concentração de sal final na fase móvel foi aumentada de 5 para 20 mmol/L (Fase móvel **E**, Tabela 3).

Os gradientes testados para a fase móvel **E**, foram selecionados através de testes preliminares, como discutido anteriormente. Também foi avaliado um aumento da concentração de sal da fase móvel **C** (solvente B: formiato de amônio 5 mmol/L, pH 3) de 5 para 20 mmol/L de sal (Fase móvel **F**, Tabela 3), pois essa condição cromatográfica apresentou o maior número de *molecular features* encontrados pelo pacote XCMS do software de acesso livre R, porém apresentou resultados ruins para o formato de pico de alguns m/z selecionados para avaliação, e presentes em todas as condições cromatográficas. Assim, todas as fases móveis testadas, bem como os gradientes avaliados, estão compilados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Fases móveis avaliadas com mais detalhes em experimentos de triplicata

	Solvente A	Solvente B
A	95% ACN: 5% 100 mmol/L CH ₃ COONH ₄ (aq) (v/v) (C _{final} CH ₃ COONH ₄ = 5 mmol/L)	5 mmol/L CH ₃ COONH ₄ (pH 7)
B	95% ACN: 5% 100 mmol/L HCOONH ₄ (aq) (v/v) (C _{final} HCOONH ₄ = 5 mmol/L)	5 mmol/L HCOONH ₄ (pH 6)
C	95% ACN: 5% 100 mmol/L HCOONH ₄ (aq) e 446 mmol/L HCOOH (aq) (v/v) (C _{final} HCOONH ₄ = 5 mmol/L e C _{final} HCOOH = 22,3 mmol/L)	5 mmol/L HCOONH ₄ , 22,3 mmol/L HCOOH (pH 3)
D	5% 1915 mmol/L HCOOH (aq): 95% ACN (v/v) (C _{final} HCOOH = 0,1%, v/v %)	0,1% HCOOH (v/v)
E	95% ACN: 5% 400 mmol/L HCOONH ₄ (aq) (v/v) (C _{final} NH ₄ HCO ₂ = 20 mmol/L)	20 mmol/L HCOONH ₄ (pH 6)
F	95% ACN: 5% 400 mmol/L HCOONH ₄ (aq) e 1786 mmol/L HCOOH (aq) (v/v) (C _{final} HCOONH ₄ = 20 mmol/L e C _{final} HCOOH = 89,3 mmol/L)	20 mmol/L HCOONH ₄ , 89,3 mmol/L HCOOH (pH 3)

Tabela 4 - Gradientes testados para as fases móveis da Tabela 3

	Gradiente	Fases móveis testadas
G1	0-40% B (0-20 min), 40-95% B (20-35 min), 95% B (35-40 min), 95-0% B (40-45 min), 0% B (45-55 min)	A, B, C, D, E e F
G2	0-40% B (0-30 min), 40-95% B (30-45 min), 95% B (45-50 min), 95-0% B (50-55 min), 0% B (55-65 min)	A, B, C
G3	0-20% B (0-20 min), 20-95% B (20-35 min), 95% B (35-40 min), 95-0% B (40-45 min), 0% B (45-55 min)	D
G4	0-50% B (0-20 min), 50-95% B (20-35 min), 95% B (35-40 min), 95-0% B (40-45 min), 0% B (45-55 min)	E
G5	5-95% B (0-30 min), 95% B (30-35 min), 95-5% B (35-40 min), 5%B (40-50 min).	D

Na metabolômica, busca-se detectar a maior quantidade de metabólitos possíveis em uma só análise, que deve ser reprodutível para produzir resultados confiáveis. Dessa forma, para escolher uma condição cromatográfica ótima, avaliou-se auferindo uma nota de 0 a 5 de: número total de *molecular features* detectados (na triplicata), repetibilidade da intensidade (de todos os *molecular features*), repetibilidade do tempo de retenção (de *m/z* selecionados), o formato de pico (de *m/z* selecionados) e a magnitude da intensidade (de *m/z* selecionados). As notas foram obtidas para experimentos realizados em triplicata da mesma amostra de um *pool* de urina humana, para todas as condições examinadas. A avaliação por meio de notas é encontrada em alguns trabalhos de otimização de métodos cromatográficos para metabolômica^{136,137} e facilita a seleção de condições cromatográficas que separem uma grande quantidade de compostos simultaneamente de maneira reprodutível.

Para a metabolômica alvo de 142 metabólitos, que constituem cerca de 25% dos metabólitos conhecidos de *E. coli.*, Bajad *et al.* otimizaram um método de LC-MS/MS, em que foram testadas sete colunas diferentes (de HILIC e de RPLC), em pelo menos dois pHs distintos, com 142 padrões de metabólitos. A performance das condições foi avaliada através de uma nota atribuída para cada condição, tendo sido examinadas a sensibilidade, retenção, altura e simetria do pico, e sendo assim, os picos dos padrões de metabólitos foram classificados como bom, razoável ou ruim¹³⁶. Os autores obtiveram os melhores resultados com o emprego da coluna de fase estacionária amino no pH 9, que resultou na maior quantidade de metabólitos avaliados como bons (77 metabólitos) ou razoáveis (39 compostos).

Para metabolômica global de urina, Kloos *et al.* avaliaram diferentes colunas cromatográficas para RPLC e HILIC, em diferentes fases móveis (variação de pH), empregando-se uma mistura de 54 padrões de compostos encontrados na urina, que foram individualmente examinados, de maneira similar ao trabalho de Bajad *et al.*¹³⁶, pela sensibilidade, retenção, altura e simetria do pico, e uma nota foi auferida para cada condição examinada¹³⁷. As colunas para HILIC testadas resultaram em maior retenção de compostos polares em relação à fase reversa, e a coluna diol obteve o melhor desempenho.

O número de *molecular features* detectados é um parâmetro comumente utilizado no desenvolvimento de métodos cromatográficos para metabolômica^{131,137-139}. Assim, neste trabalho o número de *molecular features* detectados em triplicata foi utilizado na composição da nota das condições cromatográficas, para avaliá-las em

relação a maior quantidade de informações obtidas em apenas uma corrida cromatográfica. Os *molecular features* foram extraídos, agrupados, o tempo de retenção foi alinhado e os *molecular features* foram novamente agrupados pelo pacote XCMS³⁶ do software de acesso livre R. Ao final do processamento dos dados pelo XCMS, uma tabela de dados com colunas contendo o *m/z*, intensidade e tempo de retenção corrigido e agrupado dos *molecular features*, é gerada. O pacote XCMS de acesso livre foi criado para o tratamento de dados de metabolômica gerados por LC-MS³⁶. Esse procedimento foi realizado para contabilizar apenas os *molecular features* detectados nas três réplicas da mesma amostra de urina, a fim de se minimizar a contabilização de ruídos. Ainda, com esta mesma finalidade, foram removidos da tabela de dados, *molecular features* que apareceram na análise de um branco (solução de 80% acetonitrila, v/v %). A nota para o número de *molecular features* é dada pela Equação 1, em que a condição que apresentou o maior número de *molecular features* é considerada ($n_{m\acute{a}x}$).

$$N_{mol} = 5 \times \left(\frac{n}{n_{m\acute{a}x}} \right) \quad [1]$$

onde:

N_{mol} é a nota em relação ao número de *molecular features* detectados

n é o número de *molecular features* detectados na triplicata

$n_{m\acute{a}x}$ é o número de *molecular features* máximo obtido

A repetibilidade dos *molecular features* foi avaliada por meio do cálculo da média do coeficiente de variação (CV) da intensidade de todos os *molecular features* de cada condição, que foi calculado no programa Excel, pelo uso da tabela de dados das corridas em triplicata gerada pelo XCMS (detalhes no item 3.3 do capítulo 3). Esse parâmetro foi avaliado, pois os experimentos metabolômicos são comparativos e a repetibilidade da intensidade é muito importante para se obter resultados confiáveis. O coeficiente de variação da intensidade foi avaliado em alguns trabalhos da literatura de desenvolvimento de métodos de cromatografia líquida para metabolômica^{131,138,140}. A nota do coeficiente de variação é dada na Equação 2 e leva-se em consideração a condição cromatográfica com melhor desempenho nesse parâmetro.

$$N_{CV\ int} = \left(\frac{1}{CV_{int}} \div \frac{1}{CV_{int\ min}} \right) \times 5 \quad [2]$$

onde:

$N_{CV\ int}$ é a nota em relação ao coeficiente de variação da intensidade

CV_{int} é o coeficiente de variação médio da intensidade de todos os *molecular features*

$CV_{int\ min}$ é o coeficiente de variação médio da intensidade mínimo obtido

Para os parâmetros de repetibilidade do tempo de retenção, formato de pico e magnitude da intensidade, 15 m/z presentes em todas as condições cromatográficas e, que apresentam alta intensidade foram selecionados: m/z 105,03, m/z 114,07, m/z 162,11, m/z 130,05, m/z 138,05, m/z 144,10, m/z 147,08, m/z 170,09, m/z 180,06, m/z 184,06, m/z 181,07, m/z 204,12, m/z 232,15, m/z 265,12 e m/z 302,23.

A repetibilidade do tempo de retenção foi examinada através do cálculo da média do coeficiente de variação do tempo de retenção de m/z selecionados, que aparecem em todas as condições cromatográficas. Esse parâmetro foi avaliado em alguns trabalhos de otimização de métodos cromatográficos^{131,140}. No tratamento de dados de metabolômica, os *molecular features* passam por uma etapa de correção de tempo de retenção (alinhamento) e duas etapas de agrupamento, e quando o tempo de retenção varia muito, pode ocorrer um problema nessas etapas do tratamento de dados. Assim, esse parâmetro foi considerado relevante para a avaliação das condições cromatográficas. O cálculo da nota de repetibilidade do tempo de retenção é mostrado na Equação 3, e o menor CV obtido pelas condições avaliadas foi considerado nessa equação ($CV\ TR_{min}$).

$$N_{CV\ TR} = \left(\frac{1}{\sqrt{CV\ TR}} \div \frac{1}{\sqrt{CV\ TR_{min}}} \right) \times 5 \quad [3]$$

onde:

$N_{CV\ TR}$ é a nota em relação ao coeficiente de variação do tempo de retenção

$CV\ TR$ é o coeficiente de variação médio do tempo de retenção de m/z selecionados

$CV\ TR_{min}$ é o coeficiente de variação médio do tempo de retenção mínimo obtido

O formato de pico foi avaliado, pois picos divididos ou muito alargados podem ser extraídos de maneira errônea por algoritmos de extração de *molecular features*¹⁴¹. O formato de pico foi investigado em alguns trabalhos de metabolômica de desenvolvimento de método cromatográfico^{131,136,137}. Neste trabalho esse parâmetro foi avaliado através do cálculo de fator de cauda (TF) dos picos dos m/z selecionados nos

cromatogramas de íon extraído, como mostrado na Figura 6. Picos com fator de cauda entre 0,8 e 1,5 foram considerados bons, picos com fator de cauda entre 0,6 e 0,7 foram considerados razoáveis e picos com demais valores de fator de cauda, ou não-resolvidos, foram considerados ruins (Figura 6).

Figura 6 – Cromatogramas de íon extraído (intensidade x tempo de retenção) com exemplos de picos com formato bom para o m/z 114,07 da condição **E G1**(A), razoável para m/z 162,11 da condição **F G1**(B) e ruim para o m/z 105,03 da condição **C G2** (C), baseados no cálculo de fator de cauda (TF) ou na resolução.

A nota referente ao formato de pico foi dada atribuindo um valor de 3 para picos com bom formato, 2 para picos com formato razoável, e 0 para picos com formato ruim. Esse valor foi somado, dividido por 45, que seria a soma do caso ideal, em que todos os 15 picos foram considerados bons ($3 \times 5 = 45$) e multiplicado por 5 (Equação 4).

$$N_{form} = \left(\frac{3n_{BOM} + 2n_{RAZ}}{45} \right) \times 5 \quad [4]$$

onde:

N_{form} é a nota do formato de pico

n_{BOM} é o número de picos com formato classificado como bom

n_{RAZ} é o número de picos com formato classificado como razoável

A magnitude da intensidade foi avaliada para examinar possíveis efeitos de supressão de ionização ou baixa eficiência de ionização. No trabalho de Zhang *et al.*, a área de picos selecionados foi utilizada para avaliar o uso de ácido acético e ácido fórmico, como aditivos da fase móvel de RPLC-MS, no modo negativo¹⁴². O uso de ácido acético para o modo negativo resultou em um número maior de *molecular features* e em áreas de picos selecionados cerca de cinco vezes maiores do que as

obtidas com o ácido fórmico, devido a maior eficiência de ionização desse aditivo. Para o cálculo da nota desse parâmetro, primeiramente a intensidade de cada m/z foi normalizada em relação à intensidade da condição **A G1**, que apresentou baixas intensidades, e então, a média das intensidades normalizadas foi dividida pela média da melhor condição nesse quesito (**E G1**) e multiplicada por 5 (Equação 5).

$$N_{int} = \left(\frac{I}{I_{máx}} \right) \times 5 \quad [5]$$

onde:

N_{int} é a nota referente a magnitude da intensidade

I é a media das intensidades normalizadas pela condição **A G1**

$I_{máx}$ é a média máxima das intensidades normalizadas (da condição **E G1**)

As condições foram então avaliadas somando as notas de cada parâmetro, mas impondo uma maior importância à nota dos parâmetros de repetibilidade de tempo de retenção e de intensidade (Equação 6), pois são os parâmetros importantes para a repetibilidade do método e, assim para a confiança do resultado final.

$$N_{total} = 1,5 N_{CV RT} + 1,5 N_{CV Int} + N_{Form} + N_{mol} + N_{Int} \quad [6]$$

As notas individuais de cada parâmetro analisado, bem como a nota total de cada condição cromatográfica estão mostradas no Figura 7.

Figura 7 - (A) Gráfico de barras das notas individuais de todos os parâmetros, obtida pelo número total de *molecular features* detectados (N_{mol}), média do CV da intensidade ($N_{CV\ int}$), média do CV do tempo de retenção de m/z selecionados ($N_{CV\ TR}$), media de intensidades de picos selecionados normalizada (N_{int}) e de formato de pico (N_{form}) e (B) gráfico de barras da nota total (N_{total}) de cada condição cromatográfica avaliada em triplicata.

A condição **E G1**, cujo solvente B é composto por 20 mmol/L de formiato de amônio a pH = 6, atingiu a melhor nota total e, portanto foi escolhida como a condição cromatográfica ótima (Figura 7B). Ainda, pode-se observar na Figura 7A que essa condição atingiu boas notas em todos os quesitos avaliados. A fase móvel **B** de mesmo pH que a fase móvel **E**, mas composta por formiato de amônio numa menor concentração, apresentou em todos os quesitos pior desempenho que a condição **E G1**, demonstrando a importância da concentração de sal no desenvolvimento de método de HILIC-MS. Comparando-se, por exemplo, a condição **B G1** com a condição **E G1** em relação ao formato de pico, observa-se que o aumento da concentração de sal, melhorou consideravelmente esse parâmetro, o que foi observado também na literatura¹⁰⁷. O aumento da concentração de sal é associado à diminuição das interações eletrostáticas entre a fase estacionária e o analito¹⁰⁹. Assim, a hipótese para a melhora no formato de pico é que os íons formiato e amônio interagem com os grupos carregados da coluna zwitteriônica, competindo com os analitos e diminuindo as interações eletrostáticas entre os analitos e a fase estacionária, tornando o mecanismo de retenção controlado essencialmente por partição e minimizando a adsorção dos analitos e a presença de caudas, como se pode observar na Figura 8, para os cromatogramas de íon extraído de m/z 144,10 e 265,12.

Figura 8 - Cromatogramas de íon extraído (intensidade x tempo de retenção) de m/z 144,10, das condições **F G1** (A) e **B G1** (B), e de m/z 265,12, das condições **F G1** (C) e **B G1** (D).

As análises de fases móveis contendo acetato (Fase móvel **A**) apresentaram poucos *molecular features* detectados na triplicata e baixa magnitude da intensidade, vide Figura 7. Esse resultado pode indicar que o pH mais alto dessa fase móvel

compromete a ionização no modo positivo, uma vez que, geralmente, os íons na ionização por eletrospray são gerados por protonação. De fato, no trabalho de Zhang *et al.*, o ácido acético se mostrou um aditivo superior ao ácido fórmico para a ionização de metabólitos da urina no modo negativo, e os autores atribuíram essa performance a uma combinação de efeito de pH (redução de hidrônio do meio) e da alta basicidade do acetato na fase gasosa¹⁴². Assim, neste trabalho, além da contribuição do pH do meio, os íons acetato podem suprimir a ionização dos analitos por competição pela protonação devido a sua alta basicidade na fase gasosa.

As condições avaliadas contendo apenas ácido fórmico como aditivo da fase móvel (Fase móvel **D**) resultaram em uma baixa retenção dos compostos, além de formatos de picos ruins (Figura 9). No trabalho de McCalley *et al.*, o uso de uma fase móvel contendo 0,2% de ácido fórmico em 85% acetonitrila resultou em picos alargados e com cauda frontal para analitos carregados, devido a problemas de sobrecarga da coluna Atlantis sílica¹⁴³. Os autores atribuíram esse desempenho inferior da coluna, ao fato de que em altas proporções de acetonitrila, o ácido fórmico está fracamente ionizado, resultando em uma baixa força iônica e na sobrecarga da coluna. Uma possível explicação para a baixa retenção dos analitos nessa condição de fase móvel, seria pela competição de íons hidrônio (H_3O^+) dessa fase móvel com os analitos pelas ligações de hidrogênio com o grupo sulfônico da coluna (mecanismo de adsorção) e pela solvatação do ácido pela água (mecanismo de partição), levando a uma diminuição da retenção dos analitos. Na Figura 9, pode-se observar que para os picos do íon de m/z 114,07, a fase móvel **D** resultou em baixos tempos de retenção e a uma aparente sobrecarga da coluna. O íon de m/z 114,07 é a creatinina, presente em altas concentrações na urina, o que pode corroborar a hipótese de sobrecarga da coluna.

Figura 9 - Cromatogramas de íon extraído de m/z 114,07 das condições **D G5** (A), **D G1** (B), **D G3** (C) e **E G1** (D).

As condições avaliadas para a fase móvel **C** apresentaram bom desempenho em todos os quesitos menos no formato de pico. Assim, tentou-se aprimorar o formato de pico, pelo aumento da concentração de sal e mantendo-se o pH da fase aquosa igual a 3 (Fase móvel **F**). Porém, o aumento de sal não melhorou o formato dos picos e, a alta concentração de sal e ácido fórmico resultou numa menor quantidade de *molecular features* detectados e menor magnitude de intensidade, o que pode ser resultado de um aumento de supressão de ionização. Assim, para obter-se o máximo de informações (maior número de *molecular features*), da maneira mais confiável e reprodutível, a condição de maior nota, **E G1** foi obtida como condição ótima e o cromatograma de pico de base dessa condição é mostrado na Figura 10.

Figura 10 - Cromatograma de pico de base (intensidade x tempo de retenção) da condição ótima (E G1).

2 – Otimização da precipitação de proteínas

As análises metabolômicas podem ser comprometidas devido às proteínas presentes na urina, pois as mesmas podem promover a supressão de ionização comprometendo a repetibilidade do método. Além disso, as proteínas podem ser adsorvidas na coluna, por meio de interações eletrostáticas e de ligação de hidrogênio com os grupamentos sulfônicos presentes na coluna zwitteriônica (Figura 4), diminuindo a repetibilidade do método cromatográfico e a vida útil da coluna.

O preparo das amostras de urina, para uso em colunas para HILIC, é relativamente simples, com a precipitação de proteínas por meio da adição de um solvente orgânico, seguida de centrifugação da amostra previamente à injeção da urina, por exemplo, vide trabalhos relatados apresentados na Tabela 2.

Em se tratando de otimização de método envolvendo análise metabolômica de urina por HILIC-MS, poucos trabalhos são encontrados na literatura, bem como, a

otimização do preparo da amostra é pouco detalhada. No trabalho apresentado por Chen *et al.*¹⁴⁴, os autores mencionam a otimização do preparo da amostra com diferentes solventes, metanol, acetonitrila, acetona e misturas desses solventes, sendo que, a acetonitrila foi a melhor condição obtida. Entretanto, a otimização detalhada desse estudo não foi apresentada, apenas o resultado final obtido.

Portanto, um procedimento de precipitação de proteínas da urina com adição de solvente orgânico, previamente à injeção da amostra no cromatógrafo, foi estudado. Os solventes acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e isopropanol (iPrOH), e misturas desses solventes (1:1 MeOH:ACN, 1:1 ACN:iPrOH, 1:1 iPrOH:MeOH e 1:1:1 iPrOH:MeOH:ACN (v/v)) foram empregados neste estudo.

A acetonitrila foi utilizada, pois é o solvente mais empregado em estudos de metabolômica urinária por HILIC-MS, como pode-se observar na Tabela 2. Por outro lado, a literatura menciona o uso do metanol para precipitar proteínas de plasma¹⁴⁵, soro¹⁴⁶ e fluído cefalorraquidiano¹⁴⁷, fluidos biológicos que contêm maior teor de proteína que a urina. Também, a mistura de metanol e acetonitrila foi empregada para esta mesma finalidade, em estudos de metabolômica em urina por HILIC-MS^{115,124,126}. Ainda, em análise lipidômica, o isopropanol apresentou-se eficiente na remoção de proteínas de plasma, tanto quanto o emprego de acetonitrila e metanol¹⁴⁸. Entretanto, para a análise metabolômica de urina, o efeito do isopropanol na precipitação de proteínas, ainda não foi investigado.

Neste trabalho, os solventes ACN, MeOH e iPrOH, bem como suas misturas, foram investigados, como procedimento de precipitação de proteínas de um *pool* de urina humana (em triplicata), para análise metabolômica por HILIC-MS. O procedimento experimental adotado foi o mesmo para cada condição de solvente avaliada. Os detalhes estão descritos no item 4.1 do capítulo 3 considerando a melhor condição.

Para a otimização da precipitação de proteínas, dois critérios foram adotados, sendo que, o primeiro deles foi a quantidade de informação confiável, obtida em uma única corrida cromatográfica, por meio do número de *molecular features*, detectados em todas as amostras da triplicata, que apresentaram o coeficiente de variação da intensidade menor que 25% (Tabela 5).

Tabela 5 - Número de *molecular features* com coeficiente de variação da intensidade menor que 25% para as condições investigadas

Condição	Nº de <i>molecular features</i>
ACN	583
iPrOH	1138
MeOH	945
1:1 ACN:iPrOH	1043
1:1 ACN:MeOH	797
1:1 MeOH:iPrOH	746
1:1:1 ACN:iPrOH:MeOH	853

O outro critério adotado foi a eficiência do solvente na precipitação de proteínas, que foi avaliada pela estimativa de proteínas totais, precipitadas por cada solvente estudado, por meio do método de Bradford. O princípio desse método envolve a reação entre o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 e proteínas, o que altera o máximo de absorção do corante de 465 para 595 nm. Por meio da construção de uma curva analítica com soluções padrão de proteína, a medida de absorção da mistura reacional após um curto período de incubação, de alguns minutos em 595 nm, é relacionada à concentração de proteínas na amostra¹⁴⁹. O método de Bradford foi utilizado em trabalhos de otimização de método de preparo de amostra de urina para proteômica para determinar a eficiência desses métodos na extração de proteínas^{150–152}. Want *et al.*, em estudos de metabolômica, também avaliaram a eficiência da remoção de proteínas de soro, por meio de ensaios de Bradford, após o emprego de diferentes métodos de precipitação¹⁵³.

Neste trabalho, o método de Bradford foi empregado para as medidas de proteínas totais precipitadas, em cada condição de estudo (solvente e misturas), como previamente descrito, a fim de avaliar o melhor solvente para a precipitação de proteína. Entretanto, para o método de Bradford, fez-se necessário o uso de um maior volume de amostra, devido a baixa quantidade de proteína nas amostras de urina, bem como a remoção das células e materiais particulados¹⁵⁰, pois estas, podem prejudicar a solubilização das proteínas. Assim, uma centrifugação branda, prévia à precipitação de

proteínas da amostra de urina foi realizada (detalhes do procedimento no item 4.3 do capítulo 3).

A solubilização das proteínas sedimentadas (*pellet*), geradas após os procedimentos de precipitação, foi investigada. Dentre as soluções tipicamente utilizadas para dissolução de proteína, e que não interferem no teste de Bradford, estão: 4 mmol/L de NaOH, 40 mmol/L de Tris (tris(hidroximetil)aminometano), 10% (v/v) etanol, 0,15 mol/L de NaCl, 4 mmol/L de HCl, entre outros; o 4 mmol/L de NaOH foi o que apresentou melhor solubilização do *pellet*.

Dessa forma a quantidade de proteínas precipitadas em cada solvente, e suas misturas, foi realizada por meio da construção de uma curva de analítica com padrões de albumina sérica bovina, em 0,15 mol/L de NaCl e 4 mmol/L de NaOH, vide Figura 11. A concentração de proteína na urina foi determinada por interpolação da equação da reta da curva analítica, e foi corrigida pela massa de urina pesada para cada alíquota de amostra.

Figura 11 - Curva analítica para determinação de proteínas pelo método de Bradford com $y = 0,0060 \pm 0,0002 x + 0,0817 \pm 0,0086$, $R^2 = 0,9965$, $F = 1138$, $p\text{-valor} = 5 \cdot 10^{-6}$, erro padrão da regressão = 0,0075.

Portanto, os resultados obtidos em relação à estimativa da concentração de proteínas precipitadas e, ao número de *molecular features*, com coeficiente de variação da intensidade menor que 25%, para cada condição de solvente investigada estão resumidos na Figura 12.

Figura 12 - Desenho experimental dos solventes e misturas testados para remoção de proteínas em urina com os resultados de estimativa da concentração de proteínas no pellet em μg proteína/g urina (p) e do número de *molecular features* com coeficiente de variação da intensidade menor que 25% (mf) são apresentados. *A absorvância das amostras precipitadas com acetonitrila é menor do que a obtida para uma solução de padrão de proteína 10 mg/L.

Como mencionado anteriormente, a acetonitrila é o solvente mais utilizado no preparo de amostras de urina, para análise por HILIC-MS (Tabela 2), pois é usualmente empregada como solvente A da fase móvel. Portanto, ao utilizar acetonitrila para precipitar a proteína, as etapas de secagem e ressuspensão da amostra são desnecessárias, o que torna esse método simples para metabolômica por HILIC-MS. Entretanto, o uso de acetonitrila acarreta em menos *molecular features* detectados, e é ineficiente para a remoção de proteínas, vide Figura 12 (ACN, $p:0$; $mf:583$). Ainda, a repetibilidade desse método, avaliada pela média do coeficiente de variação da intensidade de todos os *molecular features* detectados na urina (triplicata), foi a pior observada para as condições testadas ($CV = 22\%$). Esses resultados eram esperados, uma vez que durante o preparo da amostra, especificamente após a etapa da centrifugação, não foi visualizada uma clara sedimentação das proteínas, o que compromete uma remoção eficiente de todo o sobrenadante, e consequentemente, uma perda de metabólitos e baixa repetibilidade do método são constatadas. Esses resultados

estão de acordo com os apresentados por Want *et al.*, ou seja, uma menor remoção de proteínas, baixa repetibilidade e moderado número de *molecular features* foram obtidos quando ACN foi empregada para remoção de proteínas de soro, em análise metabolômica global¹⁵³. Ainda, os resultados obtidos por Afkarian *et al.*, para análise de proteômica, também corroboram com os resultados aqui apresentados, isto é, a acetonitrila foi ineficaz, em comparação com outros solventes orgânicos, na extração de proteínas da urina¹⁵¹.

Os demais solventes e misturas investigados foram eficientes na remoção de proteínas em comparação a ACN pura, sendo que o mais eficiente foi a mistura de 1:1 isopropanol:acetonitrila (v/v). Porém, em relação ao número de *molecular features*, o melhor solvente foi o isopropanol. Portanto, um comprometimento entre a remoção efetiva de proteínas (aumentando assim a vida útil da coluna cromatográfica) e a obtenção do maior número de *molecular features* (maior quantidade de informações confiáveis em uma única corrida cromatográfica, minimizando a perda de metabólitos) foi considerado para obtenção da melhor condição. Dessa forma, o método de precipitação de proteínas com isopropanol foi selecionado como ótimo.

Na busca de um aumento da frequência analítica e mínima manipulação da amostra (evitando perdas de metabólitos), a influência do *plug* de injeção do sobrenadante, sem as etapas de secagem e ressuspensão da amostra, foi avaliada. Dessa forma, dois procedimentos de preparo de amostra foram testados em triplicata: um procedimento completo, que incluiu, além da centrifugação, as etapas de secagem e ressuspensão da amostra (50% acetonitrila, v/v) após a precipitação de proteína com isopropanol, e um procedimento sem as etapas de secagem e ressuspensão.

Os resultados obtidos mostraram a presença de picos alargados e distorcidos para alguns compostos, no início da corrida cromatográfica, vide Figura 13, quando o procedimento sem as etapas de secagem e ressuspensão da amostra (*plug* de injeção contendo 75% de isopropanol, v/v) foi empregado. Por outro lado, com o procedimento completo, ou seja, centrifugação, secagem e ressuspensão (50 % ACN, v/v), o alargamento de pico é aceitável e não há distorção na forma do pico. Além disso, 567 *molecular features* presentes em todas as amostras da triplicata e com coeficiente de variação da intensidade menor que 25% para as amostras injetadas em 75% isopropanol foram detectados, enquanto que para a mesma amostra de urina precipitada com isopropanol, seca e ressuspensa em 50% acetonitrila obteve-se 733 *molecular features*.

Analogamente à cromatografia em modo reverso, quando o solvente utilizado para dissolução da amostra é muito forte, após a injeção da amostra, o solvente entra em contato com a fase móvel e não é prontamente diluído, então parte da amostra irá eluir mais rapidamente até que o solvente e o analito sejam completamente diluídos na fase móvel, o que causa distorção de picos, principalmente no início da corrida, quando a diferença da força dos solventes é maior e não há tempo hábil para a diluição do solvente na fase móvel^{99,154}. Em HILIC, a força do solvente aumenta de acordo com a sua polaridade e capacidade de doar ou receber prótons, assim o isopropanol é um solvente mais forte que a acetonitrila¹⁰⁸, pois apesar de sua menor polaridade, possui tanto a capacidade de receber prótons, devido aos pares de elétrons livres no oxigênio, quanto a capacidade de doar prótons devido ao grupamento OH da molécula, ao contrário da acetonitrila que pode apenas receber prótons. Assim, provavelmente a solução de 75% isopropanol é mais forte que a solução de 50% acetonitrila, o que acarreta num maior efeito de distorção de picos no início da corrida cromatográfica. Então, as etapas de secagem e ressuspensão da amostra em 50% acetonitrila foram mantidas no método de preparo de amostra.

Figura 13 - Cromatogramas de íon extraído (intensidade x tempo de retenção) de m/z 181,07 de uma amostra de urina com as etapas de secagem e ressuspensão da amostra em 50% acetonitrila (A) e de uma amostra em 75% isopropanol e sem a etapa de secagem (B).

Capítulo 5 – Metabolômica

1 – Análise metabolômica por HILIC-MS

A exposição gestacional do material particulado fino (MP_{2,5}) pode proporcionar malefícios ao feto, como retardação do crescimento fetal¹⁵⁵, aumento do risco de desenvolvimento de autismo na criança¹⁵⁶, e do risco de recém-nascidos com baixo peso¹⁵⁷, entre outros. Dessa forma, nesse trabalho a investigação dos efeitos da poluição no metabolismo, durante a gravidez, foi estudado por meio de um desenho experimental descrito com detalhes no item 5.1 do Capítulo 3. Resumidamente, um grupo de camundongos fêmeas prenhas foi submetido à exposição a MP_{2,5} diariamente e um grupo controle foi submetido à exposição a ar filtrado, sob as mesmas condições. Durante o período de exposição, amostras de urina desses camundongos foram coletadas, e então, o metaboloma dos dois grupos foi comparado, por meio da análise metabolômica global da urina por HILIC-MS.

O método de preparo de amostra e o cromatográfico, otimizados no capítulo 4 com urina humana, foram utilizados com algumas adaptações, para análise metabolômica da urina dos camundongos. Para a amostra de urina de camundongo utilizou-se um fator de diluição maior, previamente à injeção da amostra no sistema de cromatografia líquida, e a etapa de lavagem da coluna foi aumentada, para garantir a estabilidade do sistema analítico durante toda a análise das amostras.

2 – Visualização e análise estatística dos dados

A primeira visualização dos dados foi feita pelo gráfico de escores (*score plot*) da análise multivariada não supervisionada de componentes principais (PCA). A análise por PCA indica a variabilidade dos dados adquiridos e é uma boa maneira de se verificar a estabilidade analítica durante as análises por HILIC-MS. Os pontos mais próximos no gráfico de escores indicam similaridade e os afastados, disparidade. Assim, para avaliação da estabilidade analítica, uma amostra de controle de qualidade, formada pela mistura de 5 µL de cada amostra preparada de urina de camundongos dos grupo teste e controle, foi analisada antes, durante (a cada cinco amostras) e no final das corridas de HILIC-MS. Essas amostras devem aparecer no PCA próximas entre si, indicando que a variabilidade analítica é muito menor do que a biológica¹⁵⁸. A análise por PCA foi realizada no software SIMCA P+12, após obtenção da tabela de dados pelo software livre XCMS, em que as amostras passaram pelas etapas de extração dos

molecular features, agrupamento, correção do tempo de retenção (alinhamento), reagrupamento, preenchimento de valores ausentes e normalização pela mediana, para corrigir efeitos de diluição da urina¹⁰². A tabela de dados foi então inserida no software SIMCA P+12, os dados foram escalonados por pareto (Equação 7) e analisados por PCA. O escalonamento foi realizado, pois os metabólitos na urina possuem uma larga faixa de concentrações e podem apresentar diferenças na variância. O escalonamento por pareto, reduz a importância de variáveis de alta magnitude, e preserva parcialmente a estrutura dos dados⁴⁶.

$$\tilde{x} = \frac{x - \bar{x}}{\sqrt{s}} \quad [7]$$

onde:

$\tilde{x}$ é o valor da intensidade escalonado para a variável

x é o valor da intensidade da variável antes do escalonamento

$\bar{x}$ é o valor médio da intensidade da variável

s é o desvio padrão da intensidade da variável

Na figura 14 pode-se observar que a variabilidade de dez amostras de controle de qualidade (QC) é muito menor que a das amostras controle e teste, comprovando a estabilidade analítica durante as análises de HILIC-MS. Além disso, as amostras de QC aparecem no centro do gráfico de escores do PCA, já que não possuem informações de todas as amostras (tanto de grupo controle, como do grupo teste) e o número de amostras do grupo controle e teste é o mesmo, o que torna a amostra de QC composta por 50% de urina de cada grupo aqui estudado.

R2X[1] = 0.204507 R2X[2] = 0.13597
 Ellipse: Hotelling T2 (0.95)

SIMCA-P+ 12.0.1 - 2015-07-06 17:41:21 (UTC-3)

Figura 14 - Gráfico de escores do modelo de PCA com as amostras de controle de qualidade (■), do grupo teste (◆) e do grupo controle (●) com $R^2 = 0,649$ (variação explicada pelo modelo) e $Q^2 = 0,100$ (previsibilidade do modelo).

Outra maneira de avaliar as amostras de controle de qualidade é por meio da construção de um modelo de PLS-DA, somente com as amostras do grupo controle e teste, com a predição da classe das amostras do grupo QC. As amostras do grupo QC novamente se encontram no centro e juntas, demonstrando a estabilidade do sistema analítico durante as análises metabolômicas, vide Figura 15.

Figura 15 - Modelo de PLS-DA construído com as amostras do grupo controle (■) e teste (◆), com predição da classe das amostras de QC (●), com $R^2 = 0,889$ (variação explicada pelo modelo) e $Q^2 = 0,558$ (previsibilidade do modelo).

Após verificar a estabilidade do sistema analítico, os dados foram novamente processados no XCMS, sem incluir as amostras de QC, porém mantendo os parâmetros utilizados na extração da matriz de dados com as amostras de QC. A matriz de dados foi normalizada pela mediana, e escalonada por pareto e então, analisada novamente por PCA.

O segundo modelo de PCA foi construído a fim de se verificar a presença de tendências e de amostras anômalas (*outliers*). A ausência de amostras fora da elipse de Hotelling T2, que representa um intervalo de confiança de 95%, indica que não há *outliers* nesse conjunto de dados¹⁵⁹ (Figura 16). Além disso, observa-se na Figura 16 uma tendência de separação do grupo controle e teste, com a maioria das amostras do

grupo teste nos quadrantes da esquerda e as amostras do grupo controle nos quadrantes da direita.

R2X[1] = 0.227377 R2X[2] = 0.149994
 Ellipse: Hotelling T2 (0.95)
SIMCA-P+ 12.0.1 - 2015-07-06 17:43:19 (UTC-3)

Figura 16 - Gráfico de escores do modelo de PCA com as amostras do grupo controle (■) e teste (●) com $R^2 = 0,721$ (variação explicada pelo modelo) e $Q^2 = 0,208$ (previsibilidade do modelo).

A seguir os dados foram analisados pelo método multivariado supervisionado de análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA).

O gráfico de escores do PLS-DA mostra uma nítida separação entre o grupo de camundongos prenhas exposto a material particulado e o grupo controle (exposto a ar filtrado), com um Q^2 de 0,557 e um R^2 de 0,877 (Figura 17). Os modelos de PLS-DA podem apresentar um problema de *overfitting*, e por isso deve-se analisar os dados com cautela, assim alguns testes de validação foram realizados^{40,48}.

O R^2 é o ajuste do modelo e indica a variação explicada pelo modelo e o Q^2 indica a previsibilidade do modelo¹⁶⁰. O Q^2 deriva de uma validação cruzada em que um

sétimo das amostras é retirado do conjunto de dados (parâmetro padrão do SIMCA P+12), a seguir, um novo modelo é construído com o restante das amostras e a classe das amostras retiradas do modelo é prevista. Esse procedimento se repete, até que todas as amostras tenham sido previstas somente uma vez. Os valores de Q^2 e R^2 obtidos são usuais para experimentos biológicos ($Q^2 > 0,4$ e $R^2 > 0,7$)¹⁶⁰.

R2X[1] = 0.218266 R2X[2] = 0.101646
 Ellipse: Hotelling T2 (0.95)
SIMCA-P+ 12.0.1 - 2015-07-08 18:18:25 (UTC-3)

Figura 17 - Gráfico de escores do modelo de PLS-DA com as amostras do grupo controle (■) e teste (●) com R^2 de 0,877 e Q^2 de 0,557.

O modelo também foi validado por um teste de permutação, em que primeiramente o valor de R^2 e Q^2 do modelo é estimado com a matriz de dados sem modificações, então, mantendo-se a matriz de dados fixa (X), a matriz de resposta (Y) é aleatoriamente permutada um certo número de vezes, e para cada permutação um novo

valor de R^2 e Q^2 são calculados. Um gráfico dos valores de R^2 e Q^2 são plotados em relação ao coeficiente de correlação entre a resposta real e a resposta da permutação⁴⁸. Por meio desse gráfico, podemos determinar se o R^2 e o Q^2 dos modelos, calculados a partir da permutação, fornecem valores maiores que o valor de R^2 e Q^2 , invalidando o modelo, ou menores, validando o modelo⁴⁸. O teste de 50 permutações com duas componentes do modelo de PLS-DA foi realizado e pode-se observar que os valores calculados de R^2 e Q^2 são menores que o valor real, validando assim o modelo (Figura 18).

Figura 18 - Gráfico da validação do modelo de PLS-DA pelo teste de permutação (50 permutações) de R^2 (▲) e Q^2 (■).

Outro teste para validação do modelo é o CV-ANOVA, que utiliza-se de um teste F de significância, para observar se o modelo de PLS ou OPLS possui resíduos preditivos da validação cruzada significativamente menores do que a variação global em torno da média da resposta⁴⁸. O p-valor indica a probabilidade de que um modelo com esse valor de F é resultado de um acaso, e o valor obtido para esse modelo é de 0,003 (Tabela 6), sendo mais um indicativo de que o modelo de PLS-DA é válido.

Tabela 6 - CV-ANOVA para o modelo de PLS-DA de duas componentes

	SQR*	Graus de liberdade**	Variância	F	p	Desvio padrão
Total	23	23	1			1
Regressão	12,55	4	3,14	5,71	0,003	1,77
Residual	10,45	19	0,55			0,74

*SQR: soma dos quadrados dos resíduos

** Valor aproximado

Posteriormente um modelo de análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) foi construído, devido a facilidade de interpretação em relação às variáveis de maior influência na separação dos grupos.

R2X[1] = 0.152372

R2X[XSide Comp. 1] = 0.145106

Ellipse: Hotelling T2 (0.95)

SIMCA-P+ 12.0.1 - 2015-07-06 18:20:08 (UTC-3)

Figura 19 - Gráfico de escores do modelo de OPLS-DA (1+3+0 componentes) do grupo teste (●) e controle (■) com $R^2 = 0,978$ e $Q^2 = 0,606$.

No gráfico de escores observa-se uma clara separação entre o grupo controle e teste (Figura 19). Nesse gráfico, a distância horizontal dos pontos representa a variação inter-grupos e a distância vertical dos pontos, representa a variabilidade das amostras intra-grupo. Os valores de R^2 e Q^2 obtidos são usuais para experimentos biológicos¹⁶⁰.

Analogamente ao modelo de PLS-DA, aplicou-se o teste de CV-ANOVA para o modelo de OPLS-DA (Tabela 7). O p-valor para esse modelo foi de 0,036, o que valida o modelo de OPLS-DA.

Tabela 7 - CV-ANOVA para o modelo de OPLS-DA (1+3+0 componentes)

	SQR*	Graus de liberdade**	Variância	F	p	Desvio padrão
Total	23	23	1			1
Regressão	13,95	8	1,74	2,89	0,036	1,32
Residual	9,05	15	0,60			0,78

*SQR: soma dos quadrados dos resíduos

** Valor aproximado

Para inferir quais *molecular features* possuem maior influência sob o modelo de separação da análise multivariada por OPLS-DA, um gráfico de S-plot foi construído através do software SIMCA P+12. O S-plot é um diagrama de dispersão entre correlação (eixo y) e covariância (eixo x) da componente preditiva do modelo das variáveis (*molecular features*). A covariância indica a contribuição ou magnitude da variável no modelo, enquanto que a correlação indica seu efeito e confiabilidade⁴⁷. Assim, os *molecular features* que mais afetam o modelo possuem alta covariância e alta correlação (em módulo). A área assinalada no círculo da Figura 20A indica os *molecular features* que mais afetam o modelo, pois possuem os maiores valores de covariância e correlação.

Figura 20 – (A) Gráfico de S-plot com as variáveis A, B, C e D destacadas. (B) Gráficos das intensidades normalizadas das variáveis A, B, C e D (C). Gráfico de barra da covariância da componente preditiva do modelo OPLS-DA com intervalos de confiança de Jackknife.

Para demonstrar o efeito da correlação e da covariância na metabolômica, quatro pontos (A, B, C e D – Figura 20) com diferentes características foram selecionados no gráfico de S-plot. A variável “A” no gráfico de S-plot apresenta alta correlação e covariância, pertencendo à região que tem maior influência no modelo de separação do OPLS-DA (Figura 20A). No gráfico de linhas dos dados de intensidade normalizada pela mediana (Figura 20B), pode-se observar que os valores dessa variável para os grupos controle e teste são distintos e não há sobreposição dos valores para nenhuma amostra (réplica), o que pode ser confirmado pelo teste-t dessa variável que resulta num p-valor de 6×10^{-7} , indicando uma diferença significativa entre as médias do grupo controle e teste para esse metabólito. Além disso, no gráfico de barras da covariância da componente preditiva do modelo com os correspondentes intervalos de confiança gerados pela técnica de reamostragem Jackknife¹⁶¹, pode-se observar que a variável A apresenta uma grande covariância e um intervalo de confiança relativamente pequeno (Figura 20C).

O *molecular feature* “B” apresenta baixa covariância e correlação no gráfico de S-plot, assim essa variável não é responsável pela separação dos grupos controle e teste (Figura 20A). O gráfico das intensidades normalizadas para essa variável (Figura 20B) demonstra claramente que para essa variável não há diferença entre o grupo controle e teste, o que pode ser comprovado pelo alto p-valor do teste-t (0,74). Ademais, o intervalo de confiança da covariância é muito grande e passa no eixo zero, indicando que os valores da variável são dispersos e não podem ser diferenciados (Figura 20C).

A variável “C” apresenta uma alta correlação e uma baixa covariância no S-plot, assim deve-se analisá-la com cuidado (Figura 20A). Ao observarmos o gráfico das intensidades normalizadas para esse metabólito, notamos que uma amostra do grupo controle apresenta o mesmo valor que muitas amostras do grupo teste (Figura 20B), porém os demais pontos do grupo controle estão separados e o p-valor do teste-t para esse metabólito é de 9×10^{-6} , o que indica que as médias da intensidade são significativamente diferentes para os grupos teste e controle, e que provavelmente houve algum problema na medida da intensidade para esse *molecular feature* em uma amostra do grupo teste. No gráfico de covariância com o intervalo de confiança de Jackknife, pode-se observar que apesar de ter uma baixa covariância, o intervalo de confiança é muito pequeno, assim essa variável influencia na separação dos grupos (Figura 20C).

O metabólito D apresenta alta covariância e uma baixa correlação no S-plot, assim deve-se realizar uma análise cuidadosa dessa variável (Figura 20A). O gráfico que apresenta as medidas de intensidade dessa variável (Figura 20B) mostra que esse metabólito apresenta intensidades parecidas para os dois grupos, o que pode ser verificado pelo p-valor do teste-t (0,10). Além disso, o grande intervalo de confiança da covariância para essa variável corrobora o fato de que esse *molecular feature* não é responsável pela separação dos grupos (Figura 20C).

Assim, para melhor avaliação dos *molecular features* discriminantes, primeiramente as variáveis foram escolhidas através do gráfico de S-plot, conforme destacado na Figura 21. As variáveis destacadas no quadrante superior direito estão aumentadas no teste, enquanto que as destacadas no quadrante inferior esquerdo estão diminuídas.

Posteriormente, os candidatos a *molecular features* discriminantes foram avaliados pelo intervalo de confiança de Jackknife da covariância da componente preditiva, pelo p-valor do teste-t, pelo sinal/ruído dos picos no cromatograma do íon extraído e pelo coeficiente de variação (CV) da intensidade desses *molecular features* das análises da amostra de controle de qualidade (QC). Os *molecular features* que apresentam o intervalo de confiança que não toca o eixo x (Jackknife), que possuem p-valor do teste-t menor que 0,05, relação sinal/ruído maior que 3 no cromatograma do íon extraído, e CV da intensidade das análises de QC menor que 30%³³ foram considerados possíveis candidatos a metabólitos discriminantes.

Figura 21 - Gráfico de S-plot do modelo de OPLS-DA construído com as amostras do grupo controle e teste.

4 – Identificação tentativa dos metabólitos discriminantes

A identificação tentativa desses metabólitos foi realizada através de busca da relação m/z exata nos bancos de dados HMDB⁴⁹ e Metlin⁵². Os dados dessa avaliação e da possível identificação foram compilados em duas tabelas, sendo uma para os metabólitos diminuídos no teste e outra para os aumentados (Tabelas 8 e 9). Os metabólitos foram ordenados de acordo com o valor da importância da variável na projeção (VIP)^a. As Tabelas 8 e 9 apresentam a caracterização do *molecular feature* pelo m/z e tempo de retenção em segundos, valores de VIP, de correlação (Cor.) e covariância (Cov.) (do gráfico de S-plot do modelo de OPLS-DA), o p-valor do teste-t (realizado com as intensidades normalizadas pela mediana), o *fold-change* (calculado pela razão da média das intensidades normalizadas dos *molecular features* do grupo controle e teste), o coeficiente de variação das análises das amostras de controle de qualidade (QC), o aduto para cada identificação, o erro de m/z em ppm, a possível identificação e o papel biológico dos metabólitos.

^a O cálculo de VIP (Importância da Variável na Projeção) é realizado pelo software SIMCA P+12 e indica a influência da variável (*molecular feature*) na classificação do modelo de separação de OPLS-DA¹⁹³.

Tabela 8 - Identificação de *Molecular features* discriminantes diminuídos no teste e seu papel biológico

Molecular feature and <i>m/z</i>	VIP	Cor.	Cov.	<i>p</i> -value	Fold change (C/T)	% CV QC	Adduct	<i>m/z</i> error (ppm)	Name	Biological role
138.1/1071 138.0549	7.2	-0.49	-0.22	2.10^{-2}	1.2	8	$[M+H]^+$	0	Trigonelline ^a	Nicotinate and nicotinamide metabolism
									p-Aminobenzoic acid ^a	Folate biosynthesis
									2-aminobenzoic acid (Anthranilic acid) ^a	Tryptophan metabolism; degradation of aromatic compounds
160.1/939 160.1327	4.3	-0.75	-0.13	4.10^{-5}	1.6	3	$[M+H]^+$	3	2-Aminooctanoic acid ^a	Modified after exercise training in diabetic mice (plasma) ¹⁶²
							$[M+NH_4]^+$	3	2-Octenoic acid ^{a,b}	Produced by hepatic microsomal oxidation of aliphatic aldehydes
156.1/191 156.1017	4.0	-0.61	-0.12	3.10^{-3}	1.6	8	$[M+NH_4]^+$	1	Tyrosol ^{a,b}	Tyrosine metabolism, phenol consumption
130.1/678 130.0646	3.3	-0.65	-0.10	1.10^{-3}	1.3	3	?	?	?	?
100.1/702 100.0892	3.2	-0.66	-0.10	1.10^{-3}	1.5	11	?	?	?	?
160.1/1176 160.1072	3.0	-0.56	-0.09	6.10^{-3}	1.8	5	$[M+NH_4]^+$	5	Ectoine	Glycine, serine and threonine metabolism

190.1/1086 190.1186	2.9	-0.59	-0.09	3.10^{-3}	1.7	6	$[M+H]^+$	0	Homocitrulline ^a	In the mitochondria lysine and carbamylphosphate are converted to homocitrulline ¹⁶³
							M+NH ₄	0	Dipeptide (glycine and proline) ^a	
127/980 127.0387	2.8	-0.48	-0.08	2.10^{-2}	1.3	4	$[M+H]^+$	2	Maltol ^b	Animal food
							$[M+H]^+$	2	1-Methylhistidine ^a	Histidine Metabolism
170.1/595 170.0920	2.7	-0.57	-0.08	4.10^{-3}	1.9	13	$[M+H]^+$	2	3-Methylhistidine ^a	Degradation of skeletal muscle proteins ¹⁶⁴
							$[M+NH_4]^+$	2	N-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide ^a	Nicotinate and nicotinamide metabolism
							$[M+NH_4]^+$	2	N-Methyl-4-pyridone-3-carboxamide ^a	Nicotinate and nicotinamide metabolism
94.1/1069 94.0646	2.3	-0.61	-0.07	2.10^{-3}	1.3	4	$[(M+H)-CO_2]^+$	6	Fragment of Trigonelline or p-aminobenzoic acid ^a	<i>Vide</i> Trigonelline; p-aminobenzoic acid

112.1/893 112.0869	2.2	-0.62	-0.07	4.10^{-3}	1.6	8	$[M+H]^+$	0	Histamine	Synaptic vesicle cycle, Histidine metabolism, Neuroactive ligand-receptor interaction, Fc epsilon RI signaling pathway, Inflammatory mediator regulation of TRP channels, Gastric acid secretion, Protein digestion and absorption, Asthma
174.2/857 174.1473	2.2	-0.74	-0.07	1.10^{-4}	1.7	5	$[M+NH_4]^+$	8	4-Hydroxynonenal ^{a,b}	End product of lipid peroxidation
									4-Oxononanal ^b	Animal food
157.1/203 157.0971	2.2	-0.47	-0.07	2.10^{-2}	1.3	9	?	?	?	?
95.1/879 95.0599	2.2	-0.51	-0.07	2.10^{-2}	1.5	5	?	?	?	?
107.1/469 107.0852	2.1	-0.63	-0.07	2.10^{-3}	1.2	3	?	?	?	?
165.1/543 165.0550	2.1	-0.56	-0.07	6.10^{-3}	1.3	10	$[M+H]^+$	2	Phenylpyruvic acid ^{a,b}	Phenylalanine metabolism, 2-Oxocarboxylic acid metabolism
									3-Hydroxycinnamic acid ^{a,b}	Phenylalanine metabolism, degradation of aromatic compounds

									2 -Hydroxycinnamic acid ^b	Phenylalanine metabolism
									Enol-phenylpyruvate ^b	Phenylalanine metabolism
149.1/469 149.0961	2.1	-0.59	-0.07	5.10 ⁻³	1.2	5	?	?	?	?
139.1/1071 139.0577	2.0	-0.48	-0.06	2.10 ⁻²	1.2	8	[M+H] ⁺	5	Isotope peak of <i>m/z</i> 138.0549	<i>Vide m/z</i> 138.0549
84.1/986 84.0797	1.9	-0.67	-0.06	8.10 ⁻⁴	1.2	7	[M+H] ⁺	12	Piperidine	Lysine degradation
150.1/190 150.0900	1.9	-0.58	-0.06	8.10 ⁻³	2.2	6	?	?	?	?
150.1/835 150.0773	1.9	-0.61	-0.06	3.10 ⁻³	1.4	6	[M+H] ⁺	1	1-Methyladenine ^a	Product of alkylation damage in DNA
							[M+H] ⁺	1	3-Methyladenine ^a	Purines damaged by alkylation and oxidation, Autophagy modulator ¹⁶⁵
							[M+H] ⁺	1	6-Methyladenine ^a	Internal adenine methylation in eucaryotic mRNA, Base excision repair pathway
							[M+H] ⁺	1	7-Methyladenine	Base excision repair pathway
							[M+NH ₄] ⁺	7	Ethylmalonic acid ^{a,b}	Patients affected by fatty acid metabolism disorder (urine)
							[M+NH ₄] ⁺	7	2-Acetolactate ^b	Pantothenate and CoA biosynthesis

							[M+NH ₄] ⁺	7	Monoethyl malonic acid ^{a,b}	Healthy pediatric population urine
							[M+NH ₄] ⁺	7	Methylsuccinic acid ^{a,b}	Increased levels in ethylmalonic encephalopathy (urine)
							[M+NH ₄] ⁺	7	Glutaric acid ^{a,b}	Fatty acid degradation, Lysine degradation
							[M+NH ₄] ⁺	7	2-(Hydroxymethyl)-4-oxobutanoate ^b	Vitamin B6 metabolism
							[M+NH ₄] ⁺	7	4-Hydroxy-2-oxopentanoate ^b	Phenylalanine metabolism, degradation of aromatic compounds
							[M+NH ₄] ⁺	7	3-Hydroxy-3-methyl-2-oxobutanoic acid ^b	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis, 2-Oxocarboxylic acid metabolism
100.1/194 100.0752	1.8	-0.61	-0.06	5.10 ⁻³	2.1	4	[M+H] ⁺	4	2-Hydroxy-2-methylbutanenitrile	Cyanoamino acid metabolism
121.1/469 121.0996	1.6	-0.61	-0.05	3.10 ⁻³	1.2	5	?	?	?	?
101.1/1175 101.0605	1.6	-0.54	-0.05	1.10 ⁻²	1.7	4	[M+H] ⁺	7	Senecioic acid ^{a,b}	Patients with 3-Methylcrotonic aciduria (urine)
									3-Methylbutyrolactone ^{a,b}	Isovaleric academia (urine)

									2-Ethylacrylic acid ^b	Intermediate metabolite in the conversion of R-2-methylbutyrate into 2-ethylhydracrylic acid
112.1/985 112.0758	1.6	-0.58	-0.05	5.10^{-3}	1.2	6	$[M+NH_4]^+$	1	Phenol ^{a,b}	Tyrosine metabolism
							$[M+H]^+$	10	Ornithine ^a	ABC Transporters, Arginine biosynthesis, Arginine and proline metabolism, D-Arginine and D-ornithine metabolism, Glutathione metabolism, 2-Oxocarboxylic acid metabolism
133.1/472 133.0985	1.6	-0.53	-0.05	2.10^{-2}	1.3	15	$[M+H]^+$	10	2,4-Diaminopentanoate	D-Arginine and D-ornithine metabolism
							$[M+NH_4]^+$	10	Acetamidopropanal	Polyamine backconversion pathway ¹⁶⁶
							$[M+NH_4]^+$	10	Proline ^a	Protein digestion and absorption, ABC transporters, Arginine and proline metabolism, Aminoacyl-tRNA biosynthesis, Mineral absorption, Central carbon metabolism in cancer

167.1/469 167.1060	1.6	-0.54	-0.05	1.10^{-2}	1.2	3	$[M+Na]^+$	10	Caprylic acid ^b	Fatty acid biosynthesis, Mitochondrial β -Oxidation of Short Chain
							$[M+NH_4]^+$	12	1 -Methyladenine ^a	Alkylation damage in DNA
							$[M+NH_4]^+$	12	3 -Methyladenine ^a	Alkylation damage in DNA
							$[M+NH_4]^+$	12	6 -Methyladenine ^a	Internal adenine methylation in eucaryotic mRNA (might be required for mRNA transport to the cytoplasm, the selection of splice sites or other RNA processing reactions)
169.1/253 169.0788	1.5	-0.51	-0.05	1.10^{-2}	1.5	6	?	?	?	?
155.1/353 155.1051	1.5	-0.48	-0.04	2.10^{-2}	1.6	12	$[M+NH_4]^+$	1	1-Methylnicotinamide ^a	Nicotinate and nicotinamide metabolism, Bile secretion
193.1/837 193.1165	1.5	-0.81	-0.05	5.10^{-5}	2.2	6	$[M+2H]^{2+}$	9	20-Trihydroxy-leukotriene-B4 ^b	Catabolism of leukotriene B4 in human polymorphonuclear leukocytes
192.1/190 192.1007	1.4	-0.82	-0.04	1.10^{-5}	1.8	3	$[M+ACN+H]^+$	6	Hydrocinnamic acid ^{a,b}	Phenylalanine metabolism
							$[M+ACN+H]^+$	6	2-Phenylpropionate ^{a,b}	Intermediate in alpha- Methylstyrene metabolism
							$[M+ACN+Na]^+$	6	1,3-Diacetylpropane ^{a,b}	Acetylated polyamine

210.2/657 210.1594	1.4	-0.53	-0.04	1.10^{-2}	2.8	11	$[M+Na]^+$	8	N1-Acetylspermidine ^a	Stabilization of cell membranes, biosynthesis of informing molecules, cell growth and differentiation, as well as adaptation to osmotic, ionic, pH and thermal stress.
									N8-Acetylspermidine ^a	Might play a role in cell growth and differentiation
132.1/905 132.0999	1.4	-0.78	-0.04	6.10^{-6}	1.7	7	?	?	?	?
132.1/795 132.1087	1.3	-0.72	-0.04	2.10^{-4}	1.5	5	?	?	?	?
161.1/939 161.1348	1.3	-0.75	-0.13	3.10^{-5}	1.6	4	$[M+H]^+$ or $[M+NH_4]^+$	11	Isotope peak of m/z 160.1327	<i>Vide</i> m/z 160.1327
120.1/973 120.0755	1.3	-0.82	-0.04	3.10^{-5}	1.7	6	$[M+NH_4]^+$	10	N-Formiminoglycine	Purine metabolism
181.1/651 181.0869	1.3	-0.61	-0.04	2.10^{-3}	1.8	12	$[M+H]^+$	5	3-Methoxybenzenepropanoic acid ^{a,b}	Naturally occurring human metabolite
92.1/1070 92.0490	1.2	-0.50	-0.04	1.10^{-2}	1.2	5	$[(M+H)-46]^+$	?	Fragment of Trigonelline or p-aminobenzoic acid	<i>Vide</i> Trigonelline or p-aminobenzoic acid
140.1/887 140.1052	1.2	-0.58	-0.04	6.10^{-3}	1.6	4	$[M+ACN+H]^+$	13	3-Hexenal ^b	α -Linolenic acid metabolism

254.2/869 254.1610	1.2	-0.78	-0.04	9.10^{-5}	1.9	6	$[2M+NH_4]^+$	5	2-Hydroxy-3-methylbutyric acid ^{a,b}	Originates mainly from ketogenesis and from the metabolism of valine, leucine and isoleucine
									Erythronilic acid ^{a,b}	Isoleucine catabolism, β -oxidation of fatty acids and ketogenesis
									3-Hydroxyvaleric acid ^{a,b}	Condensation of propionyl-CoA with acetyl-CoA catalyzed by 3-oxoacyl-CoA thiolases
									2-Methyl-3-hydroxybutyric acid ^{a,b}	Isoleucine catabolism, β -oxidation of fatty acids and ketogenesis
									3-Hydroxyisovaleric acid ^{a,b}	Elevated levels in several inherited disorders. Found in smokers. (urine)
									2-Hydroxyvaleric acid ^{a,b}	Associated with lactic acidosis (urine)
									3-Hydroxy-2-methylbutanoic acid ^{a,b}	Isoleucine catabolism, β -oxidation of fatty acids and ketogenesis
									2-Hydroxy-2-methylbutyric acid ^{a,b}	2-Hydroxyglutaric aciduria and maple syrup urine disease (urine)
116.1/860 116.1034	1.2	-0.62	-0.03	1.10^{-3}	1.4	8	?	?	?	?

93.1/469 93.0694	1.1	-0.57	-0.03	8.10^{-3}	1.2	4	?	?	?	?
105.1/469 105.0692	1.1	-0.57	-0.03	8.10^{-3}	1.2	7	?	?	?	?
145.1/560 145.0498	1.0	-0.52	-0.03	2.10^{-2}	1.4	4	$[M+H]^+$	1	trans-2-Hexenedioic acid ^{a,b}	Derived from dehydrogenation of adipic acid
							$[M+H]^+$	1	trans-3-Hexenedioic acid ^{a,b}	Fatty acid metabolism
							$[M+H]^+$	1	3-Hydroxyadipic acid 3,6-lactone ^{a,b}	Increased levels during fasting and in some forms of dicarboxylic aciduria (urine)
							$[M+H]^+$	1	3-Methylglutaconic acid ^{a,b}	Intermediate (as the CoA thioester) in the leucine degradative pathway and in the mevalonate shunt
							$[M+H]^+$	1	2-Methylglutaconic acid ^{a,b}	Patients with organic aciduria (urine)
							$[M+H]^+$	1	2,3-Dimethylmaleate ^b	Nicotinate and nicotinamide metabolism
							$[M+H]^+$	1	2-Methyleneglutarate ^b	Nicotinate and nicotinamide metabolism
							$[2M+H]^+$	2	Pyruvaldehyde ^{a,b}	Glycine, serine and threonine metabolism, Pyruvate metabolism, Propanoate metabolism

101.1/979 101.0630	1.0	-0.70	-0.03	6.10^{-4}	1.6	6	?	?	?	?
252.2/508 252.1591	1.0	-0.80	-0.03	5.10^{-5}	2.2	8	[M+Na] ⁺	8	N-Decanoylglycine	Metabolite of fatty acids
321.2/271 321.2059	1.0	-0.70	-0.03	1.10^{-4}	1.9	6	[2M+H] ⁺	5	Tryptamine ^a	Tryptophan metabolism, Neuroactive ligand- receptor interaction
243.1/445 243.1012	1.0	-0.84	-0.03	9.10^{-6}	2.0	9	[2M+K] ⁺	8	1-Hydroxy2-pentanone ^{a,b}	Found in human urine
									Ethylmethylacetic acid ^{a,b}	Low amounts in normal humans
160.1/709 160.0925	0.9	-0.58	-0.03	2.10^{-3}	1.3	4	[M+NH ₄] ⁺	12	Pimelylcarnitine ^a	?
79.1/469 79.0540	0.8	-0.57	-0.03	6.10^{-3}	1.2	5	?	?	?	?
191.1/1083 191.1203	0.8	-0.58	-0.03	3.10^{-3}	1.5	6	[M+H] ⁺	9	Isotope peak of <i>m/z</i> 190.1186	<i>Vide m/z</i> 190.1186
							[M+H] ⁺	12	N-Methylserotonin ^a	Tryptophan metabolism
							[M+H] ⁺	12	5-Methoxytryptamine ^a	Tryptophan metabolism
152.1/927 152.0816	0.8	-0.58	-0.02	5.10^{-3}	1.5	19	[M+Na] ⁺	14	4-Guanidinobutanal	Arginine and proline metabolism
306.2/940 306.2255	0.7	-0.65	-0.01	7.10^{-4}	1.5	23	?	?	?	?
85/983 85.0306	0.7	-0.62	-0.02	2.10^{-3}	1.2	6	?	?	?	?
98.1/192 98.0605	0.6	-0.63	-0.02	1.10^{-3}	1.3	7	[M+H] ⁺	4	4,5-Dimethyloxazole	Animal food

233.1/679 233.0911	0.6	-0.65	-0.02	9.10 ⁻⁴	1.3	5	[M+Na] ⁺	6	2,6-Dihydroxypseudooxynicotine	Nicotinate and nicotinamide metabolism
							[M+NH ₄] ⁺	6	Glycerolphosphorylethanolamine	Glycerophospholipid metabolism, Ether lipid metabolism
322.2/270 322.2056	0.5	-0.67	-0.01	3.10 ⁻⁴	1.9	15	[M+NH ₄] ⁺	8	Tripeptide	Might be endogenous or derived from protein digestion. Some peptides play important physiological roles ¹⁶⁷
								13	3-Polyprenyl-4-hydroxy-5-methoxybenzoate ^b	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis
								13	2-Polyprenyl-3-methyl-5-hydroxy-6-methoxy-1,4-benzoquinone ^b	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis
290.2/1239 290.1472	0.4	-0.64	-0.01	1.10 ⁻³	1.3	9	[M+H] ⁺	4	Dipeptide (arginine and aspartate)	Product of protein digestion or catabolism. Some dipeptides are known to have physiological or cell-signaling effects.
292.1/550 292.1290	0.3	-0.68	-0.01	3.10 ⁻⁴	1.4	12	[M+H] ⁺	0	Dipeptide (serine and tryptophan)	<i>Vide</i> dipeptide
							[M+Na] ⁺	7	Tripeptide	<i>Vide</i> tripeptide
							[M+H] ⁺	12	Tripeptide	<i>Vide</i> tripeptide

^aCompounds found in human or mouse urine. ^bCompounds poorly ionized in ESI-MS positive mode.

Tabela 9 - Identificação de *Molecular features* discriminantes aumentados no teste e seu papel biológico

Molecular feature and <i>m/z</i>	VIP	Cor.	Cov.	<i>p</i>-value	Fold change (T/C)	% CV QC	Adduct	<i>m/z</i> error (ppm)	Name	Biological role
114.1/671 114.0662	9.5	0.71	0.29	2.10^{-4}	1.2	2	[M+H] ⁺	0	Creatinine ^a	Arginine and proline metabolism
							[M+H] ⁺	5	Betaine ^a	ABC transporters, Glycine, serine and threonine metabolism
							[M+H] ⁺	5	5-Aminopentanoic acid ^a	Lysine degradation, Arginine and proline metabolism
118.1/1073 118.0856	8.8	0.84	0.26	6.10^{-7}	1.5	6	[M+H] ⁺	5	Valine ^a	Protein digestion and absorption, Valine, leucine and isoleucine metabolism, Cyanoamino acid metabolism, Pantothenate and CoA biosynthesis, Aminoacyl-tRNA biosynthesis, 2-Oxocarboxylic acid metabolism, ABC transporters, Mineral absorption, Central carbon metabolism in cancer
							[M+H] ⁺	5	4-Methylaminobutyrate	Nicotinate and nicotinamide metabolism
							[M+H] ⁺	5		

							[M+NH ₄] ⁺	5	2-Ethylacrylic acid ^{a,b}	Intermediate metabolite in the conversion of R-2-methylbutyrate into 2-ethylhydracrylic acid. Increased in defects of isoleucine oxidation at distal steps in the catabolic pathway
							[M+NH ₄] ⁺	5	Senecioic acid ^{a,b}	Patients with 3-Methylcrotonic aciduria (urine)
							[M+NH ₄] ⁺	5	3-Methylbutyrolactone ^{a,b}	Patients with isovaleric acidemia (urine)
162.1/1339 162.1114	7.1	0.72	0.23	3.10 ⁻⁴	2.1	6	[M+H] ⁺	6	Carnitine ^a	Bile secretion, fatty acid β-oxidation in the mitochondria
76.1/1421 76.0756	5.0	0.76	0.15	3.10 ⁻⁵	1.8	4	[M+H] ⁺	1	Trimethylamine N-oxide (TMAO) ^a	Product of the oxidation of trimethylamine (produced by the gut microbiota)
							[M+NH ₄] ⁺	1	Acetone ^b	Produced during ketoacidosis
							[M+NH ₄] ⁺	1	Propanal ^b	Propanoate metabolism, Degradation of aromatic compounds
134.1/115 134.0595	4.4	0.61	0.14	2.10 ⁻³	1.3	4	[M+H] ⁺	4	Mandelonitrile	Cyanoamino acid metabolism
							[M+H] ⁺	4	Indoxyl	Tryptophan metabolism
179.1/236 179.0708	3.9	0.49	0.11	2.10 ⁻²	4.4	4	[M+3H] ³⁺	6	5"-Phosphoribostamycin	Butirosin and neomycin biosynthesis
140.1/1069 140.0666	3.7	0.74	0.11	2.10 ⁻⁴	1.7	9	[M+Na] ⁺	11	Betaine ^a , 5-Aminopentanoic acid ^a , Valine ^a or 4-Methylaminobutyrate	<i>Vide m/z 118.0856</i>

160.1/1644 160.1321	3.5	0.60	0.11	4.10^{-3}	2.4	3	[M+H] ⁺	6	2-Aminooctanoic acid ^a	Modified after exercise training in diabetic mice (plasma) ¹⁶²
							[M+NH ₄] ⁺	6	2-Octenoic acid ^{a,b}	Produced by hepatic microsomal oxidation of aliphatic aldehydes ¹⁶⁸
150.1/548 150.0548	3.5	0.56	0.11	6.10^{-3}	1.9	13	[M+H] ⁺	1	5,6-Dihydroxyindole	Tyrosine metabolism
									2-Formylaminobenzaldehyde	Tryptophan metabolism
							[(M+H)-N(CH ₃) ₃] ⁺	6	Carnitine Fragment	<i>Vide</i> Carnitine
							[M+H] ⁺	5	Methylmalonic acid semialdehyde ^b	Valine, leucine and isoleucine degradation, Propanoate metabolism
							[M+H] ⁺	5	Succinic acid semialdehyde ^{a,b}	Alanine, aspartate and glutamate metabolism, Tyrosine metabolism, Butanoate metabolism, Vitamin B6 metabolism, Nicotinate and nicotinamide, Carbon metabolism
										Synthesis and degradation of ketone bodies, Valine, leucine and isoleucine degradation, Lysine degradation, Tyrosine metabolism, Propanoate metabolism, Butanoate metabolism
103/1339 103.0384	3.0	0.71	0.09	4.10^{-4}	2.1	3				
							[M+H] ⁺	5	Acetoacetic acid ^{a,b}	

							[M+H] ⁺	5	2-Ketobutyric acid ^{a,b}	Glycine, serine and threonine metabolism, Cysteine and methionine metabolism, Valine, leucine and isoleucine biosynthesis, Propanoate metabolism, 2-Oxocarboxylic acid metabolism
139.1/565 139.0497	2.8	0.48	0.09	3.10 ⁻²	1.3	4	[M+H] ⁺	3	Urocanic acid ^a	Histidine metabolism
121.1/221 121.0665	2.7	0.68	0.08	3.10 ⁻⁴	1.8	11	?	?	?	?
204.1/1240 204.1226	2.6	0.73	0.08	4.10 ⁻⁴	2.2	3%	[M+H] ⁺	2	Acetylcarnitine ^a	Mitochondrial β-oxidation of fatty acids. Neuroprotective, neuromodulatory, and neurotrophic properties
90.1/1074 90.0541	2.3	0.63	0.07	1.10 ⁻³	1.6	3	[M+H] ⁺	9	Alanine ^a	Protein digestion and absorption, Sulfur relay system, Alanine, aspartate and glutamate metabolism, Cysteine and methionine metabolism, Taurine and hypotaurine metabolism, Selenocompound metabolism, Aminoacyl-tRNA biosynthesis, Carbon metabolism, ABC transporters, Mineral absorption, Central carbon metabolism in cancer

							[M+H] ⁺	9	Beta alanine ^a	Pyrimidine metabolism, beta-Alanine metabolism, Propanoate metabolism, Pantothenate and CoA biosynthesis, Neuroactive ligand-receptor interaction, Protein digestion and absorption
							[M+H] ⁺	9	Sarcosine ^a	Glycine, serine and threonine metabolism, Arginine and proline metabolism
							[M+NH ₄] ⁺	9	Pyruvaldehyde ^{a,b}	Glycine, serine and threonine metabolism, Pyruvate metabolism, Propanoate metabolism
							[M+NH ₄] ⁺	9	Malondialdehyde ^{a,b}	Biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking
							[M+NH ₄] ⁺	9	Acrylic acid ^b	Degradation of aromatic compounds
161.1/234 161.0604	2.2	0.45	0.06	3.10 ⁻²	4.0	6	[M+H] ⁺	4	Dihydroxynaphthalenes ^a	Biomarkers for exposure to naphthalene. 1,2-dihydroxynaphthalene showed the highest concentration (urine) ¹⁶⁹
85/1240 85.0280	2.2	0.73	0.07	4.10 ⁻⁴	2.3	3	[(M+H)- (N(CH ₃) ₃)- CH ₃ COOH] ⁺	6	Acetylcarnitine fragment	<i>Vide</i> Acetylcarnitine
							[M+H] ⁺	4	3-Butynoate ^b	Butanoate metabolism

119.1/1073 119.0881	2.1	0.82	0.06	2.10^{-6}	1.5	7	$[M+H]^+$	13	Isotope peak of m/z 118.0856	<i>Vide</i> m/z 118.0856
163.1/1339 163.1146	2.1	0.72	0.07	3.10^{-4}	2.1	4	$[M+H]^+$	8	Isotope peak of Carnitine	<i>Vide</i> Carnitine
115.1/671 115.0680	2.0	0.66	0.06	8.10^{-4}	1.1	3	$[M+H]^+$	14	Isotope peak of Creatinine	<i>Vide</i> Creatinine
102.1/1339 102.0906	1.9	0.73	0.06	2.10^{-4}		2	$[(M+H)-CH_2C(OH)_2]^+$	8	Carnitine Fragment	<i>Vide</i> Carnitine
							$[M+H]^+$	7	5-Aminopentanal	Derived from the oxidation of the diamines putrescine and cadaverine
							$[M+H]^+$	7	2-methylbutanal oxime	Cyanoamino acid metabolism, 2-Oxocarboxylic acid metabolism
							$[M+H]^+$	7	Betaine aldehyde	Glycine, serine and threonine
							$[M+H]^+$	7	3-Methylbutyraldehyde oxime	2-Oxocarboxylic acid metabolism
							$[M+NH_4]^+$	7	3-Methyl-2-butenal ^b	Formed endogenously during lipid peroxidation or after oxidative stress
154.1/1073 154.0598	1.9	0.58	0.06	3.10^{-3}	1.8	5	$[M+Na]^+$	7	Creatine ^a	Glycine, serine and threonine metabolism, Arginine and proline metabolism
180.1/221 180.0847	1.9	0.61	0.06	2.10^{-3}	1.7	6	$[M+NH_4]^+$	11	2-Hydroxyadipic acid ^{a,b}	Product of the reduction of 2-ketoacidipic acid. Found in patients with 2-ketoacidipic acidemia (urine).

							[M+NH ₄] ⁺	11	3-Hydroxyadipic acid ^{a,b}	Derived from the omega-oxidation of 3-hydroxy fatty acids
							[M+NH ₄] ⁺	11	3-Hydroxymethylglutaric acid ^{a,b}	Patients affected by 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria (urine)
							[M+H] ⁺	11	Glucosamine ^a	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
							[M+H] ⁺	11	Fructosamine	Increased in diabetes mellitus (serum)
136.1/1072 136.0466	1.9	0.58	0.06	3.10 ⁻³	1.7	6	?	?	?	?
106.1/115 106.0648	1.9	0.65	0.06	1.10 ⁻³	1.3	4	[(M+H)-CO] ⁺	4	Might be an Indoxyl fragment	Vide Indoxyl
101.1/1644 101.0592	1.8	0.60	0.06	4.10 ⁻³	2.3	5	[M+H] ⁺	5	2-Ethylacrylic acid ^b	Intermediate metabolite in the conversion of R-2-methylbutyrate into 2-ethylhydracrylic acid. Increased in defects of isoleucine oxidation
									Senecioic acid ^{a,b}	Patients with 3-Methylcrotonic aciduria (urine)
118.1/157 118.0649	1.7	0.64	0.05	1.10 ⁻³	1.4	5	[M+H] ⁺	1	Indole ^a	Tryptophan metabolism, Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, Protein digestion and absorption
									Phenylacetoneitrile	Cyanoamino acid metabolism

126.1/876 126.0655	1.6	0.45	0.05	3.10^{-2}	1.1	5	$[M+H]^+$	5	3-Methylcytosine ^a	Cytotoxic and mutagenic methylated base in DNA
									5-Methylcytosine ^a	Pyrimidine metabolism
135.1/114 135.0618	1.4	0.67	0.05	7.10^{-4}	1.3	5	$[M+H]^+$	12	Isotope peak of m/z 134.0595	<i>Vide</i> m/z 134.0595
159.1/425 159.0515	1.4	0.53	0.04	6.10^{-3}	1.2	15	$[M+H]^+$	1	Allantoin ^a	Major end product of purine metabolism in mouse ¹⁷⁰
							$[M+Na]^+$	9	1-Methylnicotinamide ^a	Nicotinate and nicotinamide metabolism, Bile secretion
							$[M+NH_4]^+$	8	O-Phosphoethanolamine ^a	Glycerophospholipid metabolism, Sphingolipid metabolism, Sphingolipid signaling pathway
126.1/301 126.0883	1.4	0.50	0.04	2.10^{-2}	1.4	7	$[M+Na]^+$	4	Choline	Cholinergic synapse , ABC transporters, Choline metabolism in cancer, Glycine, serine and threonine metabolism, Glycerophospholipid metabolism, Bile secretion
145.1/1239 145.0485	1.3	0.71	0.04	7.10^{-4}	2.1	3	$[(M+H)-N(CH_3)_3]^+$	8	Fragment of acetylcarnitine	<i>Vide</i> Acetylcarnitine
							$[M+H]^+$	7	trans-2-Hexenedioic acid ^{a,b}	Probably derived from dehydrogenation of adipic acid
							$[M+H]^+$	7	trans-3-Hexenedioic acid ^{a,b}	Increased in fatty acid metabolism disorders (urine)

							[M+H] ⁺	7	3-Hydroxyadipic acid 3,6-lactone ^{a,b}	Increased during fasting and in some forms of dicarboxylic aciduria (urine)
							[M+H] ⁺	7	3-Methylglutaconic acid ^{a,b}	Intermediate (as the CoA thioester) in the leucine degradative pathway and in the mevalonate shunt
							[M+H] ⁺	7	2-Methylglutaconic acid ^{a,b}	Patients with organic aciduria (urine)
							[M+H] ⁺	7	2,3-Dimethylmaleate ^b	Nicotinate and nicotinamide metabolism
							[M+H] ⁺	7	2-Methyleneglutarate ^b	Nicotinate and nicotinamide metabolism
							[M+Na] ⁺	9	Erythritol ^{a,b}	ABC transporters
							[M+Na] ⁺	9	Threitol ^{a,b}	Main end product of D-xylose metabolism in man
223.1/192 223.1014	1.2	0.52	0.04	1.10 ⁻²	1.5	5	[M+2H] ²⁺	5	Peptide (4 aa)	Might be endogenous or derived from protein digestion. Some peptides play important physiological roles
								0	Formylkynurenine	Tryptophan metabolism
138/599 138.0251	1.2	0.54	0.03	4.10 ⁻³	2.2	11	[M+H+K] ²⁺	0	Dipeptide (serine and methionine)	Product of protein digestion or catabolism. Some dipeptides are known to have physiological or cell-signaling effects.

77.1/1421 77.0782	1.1	0.73	0.03	5.10^{-5}	1.8	17	$[M+H]^+$	12	Isotope peak of TMAO	<i>Vide</i> TMAO
85/220 85.0289	1.0	0.68	0.03	3.10^{-4}	1.4	8	$[M+2H]^{2+}$	6	3,4-Dihydroxybenzeneacetic acid ^{a,b}	Tyrosine metabolism, Degradation of aromatic compounds, Dopaminergic synapse
							$[M+2H]^{2+}$	6	p-Hydroxymandelic acid ^{a,b}	Metabolite of tyramine
							$[M+2H]^{2+}$	6	Homogentisic acid ^{a,b}	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis, Tyrosine metabolism
							$[M+2H]^{2+}$	6	3-Hydroxymandelic acid ^{a,b}	Catecholamine metabolite
267.2/445 267.1747	1.0	0.57	0.03	4.10^{-3}	1.7	7	$[M+K]^+$	9	Myristic acid ^{a,b}	Fatty acid biosynthesis
85/1339 85.0280	1.0	0.69	0.03	6.10^{-4}	2.0	3	$[(M+H)-N(CH_3)_3-H_2O]^+$	5	Carnitine fragment	<i>Vide</i> Carnitine
							$[M+H]^+$	4	3-Butynoate ^b	Butanoate metabolism
255.1/248 255.0671	0.9	0.77	0.03	3.10^{-5}	1.7	9	$[M+H]^+$	10	5-Glutamyl-aurine	Taurine and hypotaurine metabolism
238.1/737 238.1055	0.9	0.58	0.03	8.10^{-3}	1.7	13	$[M+Na]^+$	2	Propenoylcarnitine ^a	Fatty acids mitochondrial β -oxidation ¹⁷¹
							$[M+NH_4]^+$	8	Dipeptide (Serine, Asparatate)	<i>Vide</i> dipeptide
							$[2M+NH_4]^+$	8	Pyrocatechol ^{a,b}	Degradation of aromatic compounds
							$[2M+NH_4]^+$	8	Hydroquinone ^{a,b}	Tyrosine metabolism, Riboflavin metabolism

120.1/792 120.0798	0.9	0.55	0.03	$5 \cdot 10^{-3}$	1.3	5	$[M+ACN+H]^+$	8	Benzene ^{a,b}	Pollutant from vehicle emissions and cigarette smoke ¹⁷²
96.1/1068 96.0756	0.9	0.75	0.03	$8 \cdot 10^{-5}$	1.6	5	?	?	?	?
255.1/163 255.0659	0.9	0.44	0.03	$4 \cdot 10^{-2}$	1.3	5	$[M+H]^+$	5	5-Glutamyl-aurine	Taurine and hypotaurine metabolism
200.1/1339 200.0673	0.9	0.70	0.03	$5 \cdot 10^{-4}$	1.9	5	$[M+K]^+$	5	Carnitine ^a	<i>Vide</i> Carnitine
							$[M+Na]^+$	5	5-Hydroxytryptophol ^a	Minor metabolite of serotonin
205.1/1239 205.1261	0.9	0.68	0.03	$9 \cdot 10^{-4}$	2.5	10	$[M+H]^+$	2	Isotope peak of acetylcarnitine	<i>Vide</i> Acetylcarnitine
285.1/168 285.0777	0.8	0.49	0.03	$3 \cdot 10^{-2}$	1.4	5	$[M+Na]^+$	1	Thiamine aldehyde	Thiamine metabolism
145/696 145.0306	0.8	0.59	0.03	$6 \cdot 10^{-3}$	2.0	13	?	?	?	?
182.1/197 182.1233	0.8	0.59	0.02	$3 \cdot 10^{-3}$	1.5	3	?	?	?	?
331.2/447 331.1903	0.8	0.52	0.02	$1 \cdot 10^{-2}$	1.7	15	?	?	?	?
257.1/1069 257.1454	0.8	0.76	0.02	$3 \cdot 10^{-5}$	2.0	14	$[2M+Na]^+$	7	Betaine ^a , Valine ^a , 5-Aminopentanoic acid ^a or 4-Methylaminobutyrate	<i>Vide m/z</i> 118.0856
230.1/847 230.1248	0.7	0.44	0.02	$3 \cdot 10^{-2}$	1.1	6	$[M+NH_4]^+$	0	Dipeptide (histidine and glycine)	<i>Vide</i> Dipeptide
249.2/195 249.1549	0.7	0.75	0.02	$7 \cdot 10^{-5}$	1.3	6	$[M+NH_4]^+$	3	Peptide (2 or 3 aa)	<i>Vide</i> Peptide

152.1/563 152.0571	0.7	0.43	0.02	4.10^{-2}	1.2	6	$[M+H]^+$	2	Guanine ^a	Purine metabolism
							$[M+H]^+$	2	8-Hydroxyadenine ^a	Marker of DNA damage
							$[M+H]^+$	2	2-Hydroxyadenine ^a	Formed by hydroxyl radical attack on DNA bases
							$[M+NH_4]^+$	11	Malate ^{a,b}	Butanoate metabolism
201.1/990 201.0788	0.7	0.47	0.02	2.10^{-2}	1.4	8	$[M+K]^+$	0	Nicotine ^a	Presence in tobacco smoke
									Anabesine ^a	Metabolite of nicotine (exposure to tobacco smoke)
188.1/846 188.1019	0.7	0.45	0.02	3.10^{-2}	1.1	4	$[M+Na]^+$	14	Hordenine	Tyrosine metabolism
141/1339 140.9937	0.7	0.70	0.02	5.10^{-4}	1.7	10	$[M+H]^+$	7	Acetyl phosphate ^b	Taurine and hypotaurine metabolism, Pyruvate metabolism, Carbon metabolism
							$[M+K]^+$	8	Methylmalonic acid semialdehyde ^b	Valine, leucine and isoleucine degradation, Propanoate metabolism
							$[M+K]^+$	8	Succinic acid semialdehyde ^{a,b}	Alanine, aspartate and glutamate metabolism, Tyrosine metabolism, Butanoate metabolism, Vitamin B6 metabolism, Nicotinate and nicotinamide metabolism, Carbon metabolism

							[M+K] ⁺	8	Acetoacetic acid ^{a,b}	Synthesis and degradation of ketone bodies, Valine, leucine and isoleucine degradation, Lysine degradation, Tyrosine metabolism, Propanoate metabolism, Butanoate metabolism
							[M+K] ⁺	8	2-Ketobutyric acid ^{a,b}	Glycine, serine and threonine metabolism, Cysteine and methionine metabolism, Valine, leucine and isoleucine biosynthesis, Propanoate metabolism, 2-Oxocarboxylic acid metabolism
344.2/187 344.1519	0.7	0.67	0.02	1.10 ⁻³	1.5	5	[M+NH ₄] ⁺	13	6,7-Dimethyl-8-(1-D-ribityl)lumazine	Riboflavin metabolism
							[M+H] ⁺	13	Peptide (3 or 4 aa)	<i>Vide</i> Peptide
205.1/924 205.0692	0.6	0.46	0.02	3.10 ⁻²	1.5	9	[M+Na] ⁺	4	Mannitol ^{a,b}	Fructose and mannose metabolism, ABC transporters
									Galactitol ^{a,b}	Galactose metabolism
									Sorbitol ^{a,b}	Fructose and mannose metabolism, Galactose metabolism, ABC trasnporters
265.1/431 265.1446	0.6	0.58	0.02	6.10 ⁻³	1.7	28	?	?	?	?

351.1/219 351.1058	0.5	0.54	0.02	1.10^{-2}	2.0	8	$[M+K]^+$	13	Dipeptide (phenylalanine)	<i>Vide</i> Dipeptide
310.2/704 310.1605	0.5	0.61	0.02	7.10^{-3}	1.8	6	$[M+NH_4]^+$	5	Dipeptide (histidine)	<i>Vide</i> Dipeptide
106/566 106.02977	0.5	0.47	0.02	4.10^{-2}	1.3	4	?	?	?	?
58.1/1422 58.0665	0.5	0.59	0.01	3.10^{-3}	1.7	13	$[(M+H)-H_2O]^+$	24	TMAO fragment	<i>Vide</i> TMAO
108/572 108.0445	0.4	0.49	0.01	2.10^{-2}	1.3	7	?	?	?	?
59.1/1422 59.0720	0.4	0.58	0.01	4.10^{-3}	1.5	10	$[(M+H)-OH]^+$	17	TMAO fragment	<i>Vide</i> TMAO
329.1/1073 329.0854	0.4	0.48	0.01	2.10^{-2}	2.1	8	$[M+K]^+$	1	Argininosuccinic acid ^a	Arginine biosynthesis, Alanine, aspartate and glutamate metabolism
							$[M+K]^+$	1	Peptide (3 or 4 aa)	<i>Vide</i> Peptide
							$[M+H]^+$	3	2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate ^b	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis
							$[M+Na]^+$	10	Peptide (3 or 4 aa)	<i>Vide</i> Peptide
248.2/1231 248.1475	0.4	0.50	0.01	1.10^{-2}	1.6	8	$[M+H]^+$	7	Hydroxybutyrylcarnitine	Associated with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. Fatty acids β -oxidation ¹⁷³

262.2/1207 262.1640	0.4	0.60	0.01	4.10^{-3}	1.9	22	[M+H] ⁺	3	3-Hydroxyisovalerylcarnitine	Associated with organic acidemias in newborns. Fatty acids β -oxidation ¹⁷⁴
188.1/773 188.0694	0.4	0.44	0.01	3.10^{-2}	1.2	6	[M+Na] ⁺	6	Phenylalanine	Protein digestion and absorption, Phenylalanine metabolism, Cyanoamino acid metabolism, Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, Aminoacyl-tRNA biosynthesis, 2-Oxocarboxylic acid metabolism, ABC transporters, Mineral absorption, Central carbon metabolism in cancer
269.2/194 269.1710	0.4	0.66	0.01	8.10^{-4}	1.2	16	[M+2H] ²⁺	8	Peptide (4 aa)	<i>Vide</i> peptide
213.1/847 213.0978	0.4	0.49	0.01	2.10^{-2}	1.1	7	[M+H] ⁺	1	Dipeptide (histidine and glycine)	<i>Vide</i> dipeptide
							[M+Na] ⁺	9	N-Methylserotonin ^a	Tryptophan metabolism
							[M+Na] ⁺	9	5-Methoxytryptamine ^a	Tryptophan metabolism
							[M+K] ⁺	10	Ne,Ne dimethyllysine	Lysine degradation
256.1/162 256.0689	0.4	0.49	0.01	2.10^{-2}	1.3	6	[M+K] ⁺	2	Dipeptide (glutamine or gamma-glutamate and alanine)	<i>Vide</i> dipeptide
							[M+K] ⁺	2	Tripeptide	<i>Vide</i> peptide
							[M+K] ⁺	2	N- α -Acetylcitrulline	Arginine biosynthesis

							[M+NH ₄] ⁺	1	Erythro-imidazole-glycerol-phosphate	Histidine metabolism
							[M+Na] ⁺	9	Dipeptide (glutamate and serine)	<i>Vide</i> dipeptide
382.3/785 382.2576	0.4	0.62	0.01	1.10 ⁻³	1.4	5	[M+NH ₄] ⁺	3	18-Hydroxy-11-dehydrotetrahydrocorticosterone ^{a,b}	Major urinary metabolite of 18-hydroxycorticosterone (Steroid hormone biosynthesis)
									3a,11β,21-Trihydroxy-20-oxo-5β-pregnan-18-al ^b	Steroid hormone biosynthesis
									11β,21-Dihydroxy-3,20-oxo-5β-pregnan-18-al ^b	Steroid hormone biosynthesis
									11β,17a,21-Trihydroxypregnenolone ^b	Steroid hormone biosynthesis
									Tetrahydrocortisone ^{a,b}	Cortisol metabolism
									Dihydrocortisol ^b	Steroid hormone biosynthesis
74.1/1067 74.0931	0.4	0.72	0.01	2.10 ⁻⁴	1.5	11	?	?	?	?
357.2/199 357.1578	0.4	0.51	0.01	1.10 ⁻²	1.4	23	[M+NH ₄] ⁺	3	Tripeptide	<i>Vide</i> Peptide
							[M+Na] ⁺	2	Tripeptide	<i>Vide</i> Peptide
							[M+K] ⁺	11	Tripeptide	<i>Vide</i> Peptide
345.2/188 345.1618	0.3	0.81	0.01	4.10 ⁻⁶	1.4	8	?	?	?	?
407.1/194 407.1402	0.3	0.62	0.01	410 ⁻³	1.5	13	[M+H] ⁺	1 or 3	Peptide (4 aa)	<i>Vide</i> Peptide

								[M+K] ⁺	9	Peptide (4 or 3 aa)	<i>Vide</i> Peptide
348.2/186	0.2	0.52	0.01	1.10 ⁻²	1.2	13		[M+H] ⁺	0	Tripeptide	<i>Vide</i> Peptide
348.1767											
390.1/189	0.2	0.59	0.01	5.10 ⁻³	1.4	11		[M+H] ⁺	2	Peptide (3 or 4 aa)	<i>Vide</i> Peptide
390.1630								[M+Na] ⁺	1	Tripeptide	<i>Vide</i> Peptide

^aCompounds found in human or mouse urine. ^bCompounds poorly ionized in ESI-MS positive mode due to chemical structure.

Durante a busca dos compostos significativamente alterados no estudo no banco de dados, observou-se que alguns m/z não puderam ser identificados e assim, buscou-se na lista de metabólitos discriminantes, compostos com tempo de retenção similares, e verificou-se a possibilidade dos m/z não identificados estarem relacionados aos metabólitos identificados com tempo de retenção similar. Primeiramente, foi observado se o formato de pico nos cromatogramas do íon extraído desses *molecular features* eram compatíveis, então, investigou-se a possibilidade desses compostos serem fragmentos dos metabólitos identificados, íons isotópicos ou adutos desses metabólitos. Para averiguar se houve fragmentação dos metabólitos, buscou-se em bancos de dados (HMDB⁴⁹, Metlin⁵², e MassBank⁵³), espectros de MS/MS com ionização por eletrospray no modo positivo dos metabólitos relacionados aos m/z não identificados. Assim, verificou-se que a carnitina, o N-óxido de trimetilamina (TMAO), a acetilcarnitina, a trigonolína ou o ácido p-benzóico (m/z 138,0549) foram fragmentados durante a análise. Outro metabólito que pode ter sofrido fragmentação foi o indoxil, que pode ter perdido uma molécula neutra de CO. Porém, para esse metabólito não foi encontrado nenhum espectro de MS/MS por ESI no modo positivo.

Observou-se também, a presença de íons isotópicos de compostos abundantes na lista de *molecular features* discriminantes como creatinina, carnitina, N-óxido de trimetilamina, ácido urocânico, entre outros. Também, para alguns compostos observou-se a presença de outros adutos, além do $[M+H]^+$, como para a carnitina ($[M+K]^+$) e para o m/z 118,0863 ($[M+Na]^+$ e $[2M+Na]^+$ para betaina, ácido 5-aminopentanóico ou valina).

A carnitina apresentou três picos referentes à fragmentação, com um fragmento formado possivelmente a partir da saída de trimetilamina (m/z 103,0390), e outro pela subsequente desidratação, formando um fragmento estabilizado por ressonância, pela presença de duas duplas ligações conjugadas, que espalham a carga positiva do fragmento (m/z 85,0285, Figura 22B). Um outro fragmento foi formado provavelmente pela saída de 1,1-etenodiol e formação de uma ligação dupla C=O (Figura 22C). Esses fragmentos foram também encontrados na literatura para a ionização por eletrospray de um padrão de carnitina, como pode-se observar na Figura 22A. Os *molecular features* associados à carnitina (fragmentos, íon isotópico e aduto) apresentaram *fold-change* similares ao do íon majoritário da carnitina $[M+H]^+$ (*fold-change* de 1,9 a 2,1), o que representa mais um indicativo de que a identificação desses adutos e fragmentos são realmente da carnitina, e corrobora sua identificação.

Figura 22 - Cromatograma dos íons extraídos (intensidade x tempo de retenção) relacionados à carnitina de m/z 85, 102, 103, 162, 163 e 200, e espectro de MS/MS da carnitina do MassBank realizado em LC-ESI-QTOF com rampa de energia de colisão de 5 a 60V (A), e possíveis mecanismos de formação dos fragmentos de carnitina encontrados como discriminantes nas análises metabolômicas (B e C).

O N-óxido de trimetilamina (TMAO) apresentou dois picos referentes à fragmentação da molécula e um íon isotópico (Figura 23). O fragmento de m/z 59 foi formado possivelmente pela saída de um radical hidroxila, e o fragmento de m/z 58 foi provavelmente formado pela desidratação da molécula (Figura 23B). Esses fragmentos foram encontrados na análise de MS/MS desse composto por ionização por electrospray e detecção no modo positivo na literatura, como pode-se observar na Figura 23A. Os fragmentos de m/z 58 e 59 apresentam um erro alto de m/z , provavelmente devido a sua baixa massa e a calibração de massas. Essa calibração foi realizada com o padrão de formiato de sódio, que apresenta diversos *clusters* para a calibração de uma ampla faixa de m/z , porém o primeiro ponto possui m/z 90,9766, e assim, esses m/z estão fora da faixa de calibração. Na busca pelos bancos de dados, nenhum resultado foi encontrado para esses m/z . Além disso, o *fold-change* para esses m/z são similares ao obtido para o

TMAO (1,8 para TMAO, 1,5 para o m/z 59 e 1,7 para o m/z 58), o que sugere que esses m/z são provenientes da fragmentação do TMAO.

Figura 23 - Cromatograma dos íons extraídos (intensidade x tempo de retenção) relacionados ao N-óxido de trimetilamina (TMAO) de m/z 58, 59, 76 e 77 e (A), espectro de MS/MS do TMAO do MassBank realizado em LC-ESI-QTOF com de energia de colisão de 30 V (A) e possíveis mecanismos de formação dos fragmentos do TMAO (B).

Foram observados dois picos referentes à fragmentação da acetilcarnitina e um pico referente ao íon isotópico com um ^{13}C dessa molécula (Figura 24). Analogamente a carnitina (Figura 24B), provavelmente houve a saída de uma molécula de trimetilamina e formação do fragmento de m/z 85, que é estabilizado por ressonância (Figura 24B). Os *molecular features* associados à acetilcarnitina apresentam *fold-change* semelhantes ao *molecular feature* principal da acetilcarnitina (aduto $[M+H]^+$), variando de 2,1 a 2,5.

Figura 24 - Cromatograma dos íons extraídos (intensidade x tempo de retenção) relacionados à acetilcarnitina de m/z 85, 145 e 204, e espectro de MS/MS da acetilcarnitina do MassBank realizado em LC-ESI-IT com de energia de colisão de 40 V (A), e possíveis mecanismos de formação dos fragmentos da acetilcarnitina (B).

4 – Interpretação biológica dos resultados

O papel biológico dos metabólitos identificados nas Tabelas 8 e 9 são referentes às informações fornecidas no registro do HMDB dos metabólitos e as rotas metabólicas apresentadas foram obtidas no banco de dados KEGG para camundongos (*Mus musculus*). Para alguns metabólitos, buscou-se referências na literatura sobre seu papel biológico.

Por meio dos resultados apresentados nas Tabelas 8 e 9, pode-se observar que o metabolismo dos camundongos foi alterado devido à exposição dos mesmos ao material particulado, com 59 *molecular features* diminuídos e 78 aumentados no teste.

Diversas classes de metabólitos foram alteradas, como se pode observar na Figura 25. Essa figura foi construída a partir da classificação dos metabólitos em amidas

e derivados, aminoácidos, aromáticos, compostos fosfatados, ácidos orgânicos/graxos, peptídeos, cetonas/aldeídos/lactonas, indol/imidazol e derivados, açúcar e derivados, piridina e derivados, pirimidina/purina e derivados, nitrilas, aminas e derivados, carnitina/acilcarnitinas e outros. *Molecular features* que apresentam como possíveis identidades mais de um composto da mesma classe, a classe do metabólito foi considerada apenas uma vez. Para compostos relacionados a mais de um *molecular feature* (aduto, fragmento, íon isotópico), por tempo de retenção e formato de pico, como discutido no item anterior, a classe do composto foi contabilizada somente uma vez, como por exemplo, para a carnitina, relacionada a seis *molecular features*, mas contabilizada apenas uma vez para a construção da Figura 25.

A ionização de algumas classes de compostos, como ácidos orgânicos, ácidos graxos, cetonas, aldeídos e lactonas, não é favorecida no modo positivo, devido à estrutura química desses compostos. Assim essas classes estão provavelmente superestimadas na Figura 25.

Devido a grande quantidade de metabólitos encontrados como discriminantes neste trabalho, serão discutidas interpretações biológicas de metabólitos discriminantes que possuem fundamentação na literatura relacionada ao problema biológico aqui estudado.

O metabólito TMAO foi encontrado aumentado no grupo teste com um *fold-change* de 1,8. Segundo a literatura, TMAO está diretamente ligado à microflora intestinal, portanto, esse resultado sugere que a microflora intestinal foi alterada devido à exposição ao material particulado. O TMAO é o produto da oxidação da trimetilamina, produzida pelas bactérias do intestino por fermentação da colina¹⁷⁵. A ingestão de carnitina também pode levar a formação de trimetilamina e consequentemente a formação de TMAO¹⁷⁶.

Neste trabalho, a colina e a carnitina foram encontradas em níveis elevados na urina dos camundongos prenhas expostos ao material particulado. Os animais do grupo controle e teste foram mantidos com mesma ração (contendo colina) disponível *ad libitum*^a. No entanto, não foi observado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Paulo Hilário Saldiva e da Dra. Mariana Veras, responsável pela experimentação animal, diferenças nos hábitos alimentares dos dois grupos. Portanto, esses resultados sugerem

^a à vontade

que a alteração do metabólito TMAO no grupo teste foi por efeito do material particulado e não pela dieta.

Figura 25 - Classe de metabólitos discriminantes encontrados aumentados (A) ou diminuídos (B) no grupo teste.

Trabalhos na literatura demonstram que a ingestão de material particulado pode alterar a microbiota e a permeabilidade do intestino^{177,178}. O material particulado pode ser ingerido durante o processo de respiração. Esse processo ocorre devido a uma deposição do material particulado na região da nasofaringe, na qual, secreções e muco são produzidos e podem levar à deglutição do material particulado¹⁷⁹. No trabalho de Kish *et al.*, a ingestão de material particulado (MP₁₀) provocou um aumento na porcentagem de bactérias intestinais do filo Firmicutes, após 45 dias de exposição, em camundongos¹⁷⁷. A bactéria *Foecalibacterium prausnitzii* é pertencente a esse filo, e é um dos microorganismos, do intestino, que produz trimetilamina¹⁸⁰.

A exposição ao material particulado também é relacionada ao progresso¹⁸¹ e potencialização¹⁸² da aterosclerose. No estudo metabólico realizado por Wang *et al.*, o nível alterado de alguns metabólitos, entre eles TMAO, betaína e colina (elevados) foram associados ao risco de desenvolver doenças cardiovasculares¹⁸³. Assim, para melhor compreender os resultados obtidos, Wang *et al.*, estudaram o efeito da dieta de betaína, TMAO e colina em um modelo animal. Nesse estudo, níveis elevados de TMAO no plasma de camundongos, devido a uma alta dieta de colina, TMAO ou betaína, foram relacionados ao aumento dos níveis dos receptores das superfícies de macrófagos, CD36 e SR-A1, que são associados ao processo de aterosclerose. Assim, a hipótese é de que a poluição pode alterar a microbiota do intestino, aumentando a produção e excreção de TMAO, que potencializa a aterosclerose.

Assim como o TMAO, outros metabólitos relacionados à colina, por meio da via metabólica da glicina, serina e treonina (em anexo) foram encontrados aumentados no grupo teste, como a colina, creatina e betaína. Além disso, o nível de creatinina, um metabólito relacionado à creatina, foi encontrado elevado na urina do grupo teste. A creatina dentro da célula é fosforilada para fins de armazenamento de energia, então, a creatina fosforilada pode ser convertida a creatinina, num processo espontâneo e não-enzimático e, excretada na urina.

No trabalho de Kuo *et al.*, o metaboloma da urina de trabalhadores expostos a fumo de solda e um grupo controle não exposto foram comparados⁸⁶. Nesse trabalho, os autores também encontraram betaína, TMAO e creatinina aumentados no grupo teste, mas a creatina foi encontrada diminuída nesse caso. O aumento de betaína no grupo teste foi atribuído a um mecanismo de autoproteção do organismo em resposta ao estresse oxidativo causado pela exposição ao fumo de solda. A betaína possui

propriedades antioxidantes que auxilia no combate de processos de estresse oxidativo relacionados aos mecanismos de atuação da poluição atmosférica.

Outro metabólito discriminante foi a histamina, cujo nível reduzido no grupo teste foi observado. Durante a gravidez o nível de histamina na urina de ratos aumenta, especialmente no último terço da gestação, devido a um aumento da atividade da histidina descarboxilase¹⁸⁴. No trabalho de Kahlson *et al.*, observou-se que a remoção de fetos da placenta, diminuiu a excreção de histamina para níveis pré-gestacionais, mesmo sem a expulsão da placenta (ou seja, os ratos permanecem fisiologicamente gestantes)¹⁸⁴. Neste trabalho, no grupo teste, quatro camundongos perderam a gestação (Camundongos 3,4,7 e 8 Teste da Tabela 10). Dentre esses camundongos, três apresentaram um nível de histamina cerca de três vezes menor, em relação aos demais camundongos, que não perderam a gestação, no grupo teste. Porém, um dos camundongos que perdeu a gestação (8 Teste), apresentou um nível de histamina similar ao dos demais camundongos do grupo teste. Assim, o resultado não é conclusivo, e experimentos com um número maior de camundongos deve ser realizado. Ainda, se removermos os camundongos que perderam a gestação do grupo teste e compararmos com o grupo controle, há uma diferença significativa na média de histamina excretada na urina dos dois grupos (p-valor = 0,003). Assim, provavelmente o metabolismo da histamina foi alterado devido à exposição ao material particulado, mas mais estudos devem ser realizados para compreender essa alteração. Outros metabólitos relacionados à histamina pelo metabolismo da histidina (em anexo) também foram encontrados alterados neste trabalho, com o aumento do eritro-imidazol-glicerol-fosfato e do ácido urocânico e diminuição da 1-metil-histidina no grupo teste.

Tabela 10 - Nível de histamina e número de filhotes gerados por cada camundongo avaliado nesse trabalho

Identificação	Intensidade normalizada histamina na urina (10^5)	Número de filhotes	Macho	Fêmea
1 Controle	4,27	6	3	3
2 Controle	3,61	6	3	3
3 Controle	3,61	5	3	2
4 Controle	3,25	6	2	4
5 Controle	3,56	4	2	2
6 Controle	4,21	10	4	6
7 Controle	3,36	6	1	0
8 Controle	4,05	7	2	5
9 Controle	3,71	6	2	4
10 Controle	4,14	9	2	7
11 Controle	4,76	7	2	5
12 Controle	3,80	4	1	3
1 Teste	2,73	5	4	1
2 Teste	0,520	4	2	2
3 Teste	0,746	perdeu a gestação		
4 Teste	0,853	perdeu a gestação		
5 Teste	2,87	6	2	4
6 Teste	2,90	6	2	4
7 Teste	1,02	perdeu a gestação		
8 Teste	4,49	perdeu a gestação		
9 Teste	3,84	5	3	2
10 Teste	2,99	6	3	3
11 Teste	3,19	6	2	4
12 Teste	3,28	6	2	4

Outros metabólitos que estão relacionados entre si e foram encontrados aumentados no grupo teste neste trabalho são a carnitina e três acilcarnitinas de cadeia curta (C1-C4) e uma de cadeia média (C5-C12) (Figura 26). Uma acilcarnitina foi encontrada diminuída no teste (pimelilcarnitina), porém o erro de m/z para sua

identificação é relativamente alto (12 ppm) e ela não foi considerada nessa discussão. A carnitina^{185,186} e acilcarnitinas de cadeia curta, como a acetilcarnitina^{186,187} e propionilcarnitina^{186,188}, podem apresentar propriedades antioxidantes. No estudo de Calò *et al.*, carnitina, acetilcarnitina e propionilcarnitina afetaram a expressão gênica e proteica das enzimas heme-oxigenase-1, com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, e da óxido nítrico-sintase endotelial constitutiva, cujo produto NO possui propriedades antioxidantes¹⁸⁶.

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes no organismo, e é um dos mecanismos de atuação do material particulado, que leva a efeitos adversos na saúde, como desencadeamento de processos inflamatórios, peroxidação de lipídios, e danos ao DNA^{73,189,190}. O aumento de carnitina e acilcarnitinas de cadeia curta pode estar relacionado com um mecanismo de autoproteção do organismo frente ao estresse oxidativo provocado pela exposição ao material particulado.

Outra função da carnitina, relacionada às acilcarnitinas, é a modulação da razão acil-CoA/CoA^b de cadeia curta¹⁹¹. Por meio da ação de acilcarnitinas transferases, um grupo acil da acil-CoA pode ser transferido para a carnitina, gerando acilcarnitina e CoA. A falta de CoA livre pode limitar a capacidade de produção de energia pela mitocôndria¹⁹². Assim, outra possibilidade é que o aumento de carnitinas está envolvido com a modulação de acil-CoA/CoA no organismo e, assim, com a produção de energia na mitocôndria.

^b Acil-coenzima A/coenzima A

Figura 26 - Estrutura das carnitinas aumentadas no grupo teste.

Capítulo 6 – Conclusões e Perspectivas

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Para se obter dados confiáveis por meio da metabolômica, todo o processo desde o desenho experimental de coleta de amostras, desenvolvimento de método analítico, o preparo da amostra, a análise química, até a análise estatística e interpretação biológica dos dados, deve ser realizado de maneira apropriada. A otimização das condições cromatográficas, levando-se em consideração diversos parâmetros, resultou num método em que a maior quantidade de informação é obtida, em apenas uma corrida cromatográfica, de maneira confiável. Por meio dos resultados aqui apresentados na otimização do preparo de amostra, pode-se concluir que o solvente mais empregado para metabolômica urinária por HILIC-MS (a acetonitrila), se mostrou o pior dos solventes aqui avaliados, evidenciando a necessidade de otimização de métodos de preparo de amostra, para obtenção de dados com informações confiáveis.

Neste trabalho, a metabolômica se mostrou eficiente para a diferenciação do grupo de camundongos fêmeas prenhas expostas ao material particulado, do grupo controle. Apesar deste estudo ter caráter preliminar, muitos metabólitos foram encontrados alterados no grupo teste, evidenciando uma mudança considerável do metabolismo dos camundongos devido à exposição gestacional ao material particulado. Para tanto, a análise estatística multivariada foi essencial e se mostrou uma ferramenta poderosa para discriminar os grupos e encontrar as variáveis (metabólitos) discriminantes. Porém, mais estudos devem ser conduzidos para uma confirmação da identidade desses metabólitos. Os resultados aqui apresentados indicam que estudos proteômicos podem fornecer relevantes informações biológicas sobre a exposição gestacional ao material particulado, uma vez que peptídeos, que são constituintes de proteínas, foram encontrados significativamente alterados neste trabalho. Ademais, mais experimentos são necessários, com um novo conjunto amostral, para validar biologicamente o resultado aqui obtido.

A metabolômica global é uma importante ferramenta, pois devido ao seu caráter abrangente de inspeção do metaboloma, é capaz de gerar hipóteses sobre o problema biológico avaliado. Neste trabalho, por exemplo, algumas vias metabólicas podem ter sido alteradas, como o metabolismo da histidina, o metabolismo da glicina, serina e treonina e o metabolismo energético da mitocôndria, que podem ser estudadas com mais

detalhes por meio do uso de marcadores isotópicos, por exemplo, para contribuir com o conhecimento dos mecanismos de atuação dos poluentes.

Neste trabalho, avaliou-se o efeito da poluição no metabolismo de camundongos fêmeas prenhas durante a gestação. A poluição atmosférica é um problema de saúde global e o conhecimento dos mecanismos de atuação dos poluentes no organismo, pode levar a novos tratamentos, a uma nova legislação para diminuir os níveis de poluentes, ou a busca de novas tecnologias mais limpas.

Capítulo 7 – Referências

REFERÊNCIAS

1. Collins, F. S.; Green, E. D.; Guttmacher, A. E.; Mark, S. *Nature* **2003**, *422*, 15–17.
2. Oliver, S. G.; Winson, M. K.; Kell, D. B.; Baganz, F. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 373–378.
3. Fiehn, O. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *48*, 155–171.
4. Villas-Bôas, S. G.; Rasmussen, S.; Lane, G. a. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 385–386.
5. Nicholson, J. K.; Lindon, J. C.; Holmes, E. *Xenobiotica*. **1999**, *29*, 1181–1189.
6. Villas-Bôas, S. G.; Mas, S.; Akesson, M.; Smedsgaard, J.; Nielsen, J. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 613–646.
7. Clarke, C. J.; Haselden, J. N. *Toxicol. Pathol.* **2008**, *36*, 140–147.
8. Lu, W.; Bennett, B. D.; Rabinowitz, J. D. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *871*, 236–242.
9. Villas-Bôas, S. G.; Gombert, A. K. *Biotechnol. Ciência e Desenvolv.* **2006**, *36*, 58–69.
10. Boudonck, K. J.; Mitchell, M. W.; Német, L.; Keresztes, L.; Nyska, A.; Shinar, D.; Rosenstock, M. *Toxicol. Pathol.* **2009**, *37*, 280–292.
11. Spratlin, J. L.; Serkova, N. J.; Eckhardt, S. G. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 431–440.
12. Creek, D. J.; Chokkathukalam, A.; Jankevics, A.; Burgess, K. E. V; Breitling, R.; Barrett, M. P. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 8442–8447.
13. Martins, T. M.; Núñez, O.; Gallart-Ayala, H.; Leitão, M. C.; Galceran, M. T.; Silva Pereira, C. *J. Hazard. Mater.* **2014**, *268*, 264–272.
14. Morvan, D.; Demidem, A. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 2150–2159.
15. Deng, P.; Jones, J. C.; Swanson, K. S. *Metabolomics* **2013**, *10*, 638–650.
16. Bundy, J. G.; Davey, M. P.; Viant, M. R. *Metabolomics* **2008**, *5*, 3–21.
17. Ellis, J. K.; Athersuch, T. J.; Thomas, L. D. K.; Teichert, F.; Pérez-Trujillo, M.; Svendsen, C.; Spurgeon, D. J.; Singh, R.; Järup, L.; Bundy, J. G.; Keun, H. C. *BMC Med.* **2012**, *10*, 61.

18. Raamsdonk, L. M.; Teusink, B.; Broadhurst, D.; Zhang, N.; Hayes, A.; Walsh, M. C.; Berden, J. A.; Brindle, K. M.; Kell, D. B.; Rowland, J. J.; Westerhoff, H. V.; Dam, K. Van; Oliver, S. G. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 45–50.
19. Fukushima, A.; Kusano, M.; Mejia, R. F.; Iwasa, M.; Kobayashi, M.; Hayashi, N.; Watanabe-Takahashi, A.; Narisawa, T.; Tohge, T.; Hur, M.; Wurtele, E. S.; Nikolau, B. J.; Saito, K. *Plant Physiol.* **2014**, *165*, 948–961.
20. Álvarez-Sánchez, B.; Priego-Capote, F.; Castro, M. D. L. De. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 120–127.
21. Beckonert, O.; Keun, H. C.; Ebbels, T. M. D.; Bundy, J.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2692–2703.
22. Villas-Bôas, S. G.; Bruheim, P. *OMICS* **2007**, *11*, 305–313.
23. Lenz, E. M.; Wilson, I. D. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 443–458.
24. Smolinska, A.; Blanchet, L.; Buydens, L. M. C.; Wijmenga, S. S. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *750*, 82–97.
25. Zhang, S.; Nagana Gowda, G. a; Ye, T.; Raftery, D. *Analyst* **2010**, *135*, 1490–1498.
26. Kopka, J.; Schauer, N.; Krueger, S.; Birkemeyer, C.; Usadel, B.; Bergmüller, E.; Dörmann, P.; Weckwerth, W.; Gibon, Y.; Stitt, M.; Willmitzer, L.; Fernie, A. R.; Steinhauser, D. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 1635–1638.
27. Kind, T.; Wohlgemuth, G.; Lee, D. Y.; Lu, Y.; Palazoglu, M.; Shahbaz, S.; Fiehn, O. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 10038–10048.
28. Kuehnbaum, N. L.; Britz-McKibbin, P. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2437–2468.
29. Kanani, H.; Chrysanthopoulos, P. K.; Klapa, M. I. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *871*, 191–201.
30. Gika, H. G.; Wilson, I. D.; Theodoridis, G. a. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2014**, *966*, 1–6.
31. Aerts, J. T.; Louis, K. R.; Crandall, S. R.; Govindaiah, G.; Cox, C. L.; Sweedler, J. V. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 3203–3208.
32. Lapainis, T.; Rubakhin, S. S.; Sweedler, J. V. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5858–5864.
33. Theodoridis, G. a; Gika, H. G.; Want, E. J.; Wilson, I. D. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *711*, 7–16.
34. Ramautar, R.; Busnel, J. M.; Deelder, A. M.; Mayboroda, O. a. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 885–892.

35. Canuto, G. a B.; Castilho-Martins, E. a; Tavares, M. F. M.; Rivas, L.; Barbas, C.; López-Gonzálvez, Á. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 3459–3476.
36. Smith, C. a; Want, E. J.; O'Maille, G.; Abagyan, R.; Siuzdak, G. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 779–787.
37. Katajamaa, M.; Miettinen, J.; Oresic, M. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 634–636.
38. Lommen, A. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3079–3086.
39. Davies, T. *Spectrosc. Eur.* **1998**, *3*, 24–27.
40. Sugimoto, M.; Kawakami, M.; Robert, M.; Soga, T.; Tomita, M. *Curr. Bioinform.* **2012**, *7*, 96–108.
41. Ludwig, C.; Günther, U. L. *BMC Bioinformatics* **2011**, *12*, 366.
42. Cook, D. W.; Rutan, S. C. *J. Chemom.* **2014**, *2014*, n/a – n/a.
43. De Souza, A. M.; Poppi, R. J. *Quim. Nova* **2012**, *35*, 223–229.
44. De Sena, M. M.; Poppi, R. J.; Frighetto, R. T. S.; Valarini, P. J. *Quim. Nova* **2000**, *23*, 547–556.
45. Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1987**, *2*, 37–52.
46. Worley, B.; Powers, R. *Curr. Metabolomics* **2013**, *1*, 92–107.
47. Wiklund, S.; Johansson, E.; Sjöström, L.; Mellerowicz, E. J.; Edlund, U.; Shockcor, J. P.; Gottfries, J.; Moritz, T.; Trygg, J. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 115–122.
48. Eriksson, L.; Trygg, J.; Wold, S. *J. Chemom.* **2008**, *22*, 594–600.
49. Wishart, D. S.; Tzur, D.; Knox, C.; Eisner, R.; Guo, A. C.; Young, N.; Cheng, D.; Jewell, K.; Arndt, D.; Sawhney, S.; Fung, C.; Nikolai, L.; Lewis, M.; Coutouly, M. A.; Forsythe, I.; Tang, P.; Shrivastava, S.; Jeroncic, K.; Stothard, P.; Amegbey, G.; Block, D.; Hau, D. D.; Wagner, J.; Miniaci, J.; Clements, M.; Gebremedhin, M.; Guo, N.; Zhang, Y.; Duggan, G. E.; MacInnis, G. D.; Weljie, A. M.; Dowlatabadi, R.; Bamforth, F.; Clive, D.; Greiner, R.; Li, L.; Marrie, T.; Sykes, B. D.; Vogel, H. J.; Querengesser, L. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 521–526.
50. Kanehisa, M.; Goto, S.; Hattori, M.; Aoki-Kinoshita, K. F.; Itoh, M.; Kawashima, S.; Katayama, T.; Araki, M.; Hirakawa, M. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, D354–D357.
51. Wang, Y.; Xiao, J.; Suzek, T. O.; Zhang, J.; Wang, J.; Bryant, S. H. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 623–633.

52. Tautenhahn, R.; Cho, K.; Uritboonthai, W.; Zhu, Z.; Patti, G. J.; Siuzdak, G. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 826–828.
53. Horai, H.; Arita, M.; Kanaya, S.; Nihei, Y.; Ikeda, T.; Suwa, K.; Ojima, Y.; Tanaka, K.; Tanaka, S.; Aoshima, K.; Oda, Y.; Kakazu, Y.; Kusano, M.; Tohge, T.; Matsuda, F.; Sawada, Y.; Hirai, M. Y.; Nakanishi, H.; Ikeda, K.; Akimoto, N.; Maoka, T.; Takahashi, H.; Ara, T.; Sakurai, N.; Suzuki, H.; Shibata, D.; Neumann, S.; Iida, T.; Tanaka, K.; Funatsu, K.; Matsuura, F.; Soga, T.; Taguchi, R.; Saito, K.; Nishioka, T. *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45*, 703–714.
54. Fahy, E.; Sud, M.; Cotter, D.; Subramaniam, S. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 606–612.
55. Degtyarenko, K.; De matos, P.; Ennis, M.; Hastings, J.; Zbinden, M.; Mcnaught, A.; Alcántara, R.; Darsow, M.; Guedj, M.; Ashburner, M. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 344–350.
56. Brown, M.; Dunn, W. B.; Dobson, P.; Patel, Y.; Winder, C. L.; Francis-McIntyre, S.; Begley, P.; Carroll, K.; Broadhurst, D.; Tseng, a; Swainston, N.; Spasic, I.; Goodacre, R.; Kell, D. B. *Analyst* **2009**, *134*, 1322–1332.
57. Ulrich, E. L.; Akutsu, H.; Doreleijers, J. F.; Harano, Y.; Ioannidis, Y. E.; Lin, J.; Livny, M.; Mading, S.; Maziuk, D.; Miller, Z.; Nakatani, E.; Schulte, C. F.; Tolmie, D. E.; Kent Wenger, R.; Yao, H.; Markley, J. L. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, D402–D408.
58. Mackinnon, N.; Somashekar, B. S.; Tripathi, P.; Ge, W.; Rajendiran, T. M.; Chinnaiyan, A. M.; Ramamoorthy, A. *J. Magn. Reson.* **2013**, *226*, 93–99.
59. Le Gall, G.; Colquhoun, I. J.; Davis, a L.; Collins, G. J.; Verhoeven, M. E. *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 2447–2456.
60. Caspi, R.; Altman, T.; Dreher, K.; Fulcher, C. a; Subhraveti, P.; Keseler, I. M.; Kothari, A.; Krummenacker, M.; Latendresse, M.; Mueller, L. a; Ong, Q.; Paley, S.; Pujar, A.; Shearer, A. G.; Travers, M.; Weerasinghe, D.; Zhang, P.; Karp, P. D. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, D742–D753.
61. Romero, P.; Wagg, J.; Green, M. L.; Kaiser, D.; Krummenacker, M.; Karp, P. D. *Genome Biol.* **2005**, *6*, R2.
62. Haw, R.; Stein, L. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **2012**, 1–23.
63. Brasil *Lei no. 6.938/81*, de 31 de agosto de **1981**.
64. Nemery, B.; Hoet, P. H. M.; Nemmar, A. *Lancet* **2001**, *357*, 704–708.
65. Helfand, W. H.; Lazarus, J.; Theerman, P. *Am. J. Public Health* **2001**, *91*, 553.
66. Davis, D. L.; Bell, M. L.; Bates, D. *Environ. Health Perspect.* **2002**, *110*, 734–735.

67. Pope III, C. A.; Burnett, R. T.; Thun, M. J.; Calle, E. E.; Krewski, D.; Thurston, G. D. *J. Am. Med. Assoc.* **2002**, 287, 1133–1141.
68. Olmo, N. R. S.; Saldiva, P. H. D. N.; Braga, A. L. F.; Lin, C. A.; Santos, U. D. P.; Pereira, L. A. A. *Clinics* **2011**, 66, 681–690.
69. CETESB. http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/Ar/ar_saude.asp (acessado em 20 agosto de 2015).
70. Pascal, M.; Falq, G.; Wagner, V.; Chatignoux, E.; Corso, M.; Blanchard, M.; Host, S.; Pascal, L.; Larrieu, S. *Atmos. Environ.* **2014**, 95, 175–184.
71. Kim, K.; Kabir, E.; Kabir, S. *Environ. Int.* **2015**, 74, 136–143.
72. Fang, Y.; Naik, V.; Horowitz, L. W.; Mauzerall, D. L. *Atmos. Chem. Phys.* **2013**, 13, 1377–1394.
73. Svecova, V.; Rossner, P.; Dostal, M.; Topinka, J.; Solansky, I.; Sram, R. J. *Mutat. Res.* **2009**, 662, 37–43.
74. Rossner, P.; Svecova, V.; Milcova, A.; Lnenickova, Z.; Solansky, I.; Santella, R. M.; Sram, R. J. *Mutat. Res.* **2007**, 617, 23–32.
75. Coutrim, M. X.; Jager, A. V.; de Carvalho, L. R.; Tavares, M. F. *J Capill. Electrophor* **1997**, 4, 39–45.
76. Pan, C.-H.; Chan, C.-C.; Huang, Y.-L.; Wu, K.-Y. *Occup. Environ. Med.* **2008**, 65, 732–735.
77. Llop, S.; Ballester, F.; Estarlich, M.; Ibarluzea, J.; Manrique, A.; Rebagliato, M.; Esplugues, A.; Iñiguez, C. *Sci. Total Environ.* **2008**, 407, 97–104.
78. Toriba, A.; Hayakawa, K. *J. Heal. Sci.* **2007**, 53, 631–638.
79. Lee, K.; Chung, W.; Benzie, I. F. F. *Clin. Chim. Acta.* **2010**, 411, 416–422.
80. Gong, J.; Zhu, T.; Kipen, H.; Wang, G.; Hu, M.; Ohman, P.; Lu, S.; Zhang, L.; Wang, Y.; Zhu, P.; Rich, D. Q.; Diehl, R.; Huang, W.; Zhang, J. J. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **2013**, 23, 322–327.
81. Scarpa, M. C.; Kulkarni, N.; Maestrelli, P. *Clin. Exp. Allergy* **2014**, 10, 1100–1118.
82. De Oliveira, B. F. A.; Chacra, A. P. M.; Frauches, T. S.; Vallochi, A.; Hacon, S. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B* **2014**, 17, 369–410.
83. Vulimiri, S. V.; Misra, M.; Hamm, J. T.; Mitchell, M.; Berger, A. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, 22, 492–503.

84. Izquierdo-García, J. L.; Puerto-Nevado, L.; Peces-Barba, G.; Pérez-Rial, S.; Heili, S.; Villa, P.; Castejón, D.; González-Mangado, N.; Ruiz-Cabello, J. *Metabolomics* **2010**, *6*, 564–573.
85. Mueller, D. C.; Piller, M.; Niessner, R.; Scherer, M.; Scherer, G. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 1602–1613.
86. Kuo, C. H.; Wang, K. C.; Tian, T. F.; Tsai, M. H.; Chiung, Y. M.; Hsieh, C. M.; Tsai, S. J.; Wang, S. Y.; Tsai, D. M.; Huang, C. C.; Tseng, Y. J. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 676–686.
87. Rubes, J.; Selevan, S. G.; Sram, R. J.; Evenson, D. P.; Perreault, S. D. *Mutat. Res.* **2007**, *625*, 20–28.
88. Ebisu, K.; Bell, M. L. *Environ. Health Perspect.* **2012**, *120*, 1746–1752.
89. Zhao, Q.; Liang, Z.; Tao, S.; Zhu, J.; Du, Y. *Environ. Health* **2011**, *10*, 2.
90. Veras, M. M.; Damaceno-Rodrigues, N. R.; Caldini, E. G.; Maciel Ribeiro, A. a C.; Mayhew, T. M.; Saldiva, P. H. N.; Dolhnikoff, M. *Biol. Reprod.* **2008**, *79*, 578–584.
91. Lichtenfels, A. F.; Sr, J. B. G.; Miraglia, S. G.; Pieri, P. C.; Hallak, J. *Fertil. Steril.* **2005**, *84*, S13.
92. WHO. *EFFECTS OF AIR POLLUTION ON CHILDREN ' S HEALTH AND DEVELOPMENT*; **2005**.
93. Lucas, a. *Arch. Dis. Child.* **1994**, *71*, 288–290.
94. Kannan, S.; Misra, D. P.; Dvonch, J. T.; Krishnakumar, A. *Environ. Health Perspect.* **2006**, *1636*, 1636–1642.
95. Sørensen, M.; Autrup, H.; Hertel, O.; Wallin, H.; Knudsen, L. E.; Loft, S. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2003**, *12*, 191–196.
96. Proietti, E.; Röösl, M.; Frey, U.; Latzin, P. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **2013**, *26*, 9–23.
97. De Melo, J. O.; Soto, S. F.; Katayama, I. A.; Wenceslau, C. F.; Pires, A. G.; Veras, M. M.; Furukawa, L. N. S.; de Castro, I.; Saldiva, P. H. N.; Heimann, J. C. *Toxicol. Lett.* **2015**, *232*, 475–480.
98. Tautenhahn, R.; Böttcher, C.; Neumann, S. *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*, 504.
99. Snyder, L.; Kirkland, J.; Dolan, J. W. *Introduction to modern liquid chromatography*; 3^a ed., Hoboken; John Wiley & Sons; **2009**.
100. Sioutas, C.; Koutrakis, P.; Ferguson, S. T.; Burgon, R. M. *Inhal. Toxicol.* **1995**, *7*, 633–644.

101. Juo, C.-G.; Chen, C.-L.; Lin, S.-T.; Fu, S.-H.; Chen, Y.-T.; Chang, Y.-S.; Yu, J.-S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2014**, 28, 1813–1820.
102. Veselkov, K. a.; Vingara, L. K.; Masson, P.; Robinette, S. L.; Want, E.; Li, J. V.; Barton, R. H.; Boursier-Neyret, C.; Walther, B.; Ebbels, T. M.; Pelczer, I.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 5864–5872.
103. Zhang, A.; Sun, H.; Wu, X.; Wang, X. *Clin. Chim. Acta.* **2012**, 414, 65–69.
104. Bouatra, S.; Aziat, F.; Mandal, R.; Guo, A. C.; Wilson, M. R.; Knox, C.; Bjorn Dahl, T. C.; Krishnamurthy, R.; Saleem, F.; Liu, P.; Dame, Z. T.; Poelzer, J.; Huynh, J.; Yallou, F. S.; Psychogios, N.; Dong, E.; Bogumil, R.; Roehring, C.; Wishart, D. S. *PLoS One* **2013**, 8, e73076.
105. Greco, G.; Letzel, T. *J. Chromatogr. Sci.* **2013**, 51, 684–693.
106. Hemström, P.; Irgum, K. *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 1784–1821.
107. Buszewski, B.; Noga, S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 231–247.
108. Jandera, P. *Anal. Chim. Acta* **2011**, 692, 1–25.
109. Guo, Y.; Gaiki, S. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 5920–5938.
110. Chen, J.; Wang, W.; Lv, S.; Yin, P.; Zhao, X.; Lu, X.; Zhang, F.; Xu, G. *Anal. Chim. Acta* **2009**, 650, 3–9.
111. Chen, J.; Zhou, L.; Zhang, X.; Lu, X.; Cao, R.; Xu, C.; Xu, G. *Electrophoresis* **2012**, 33, 3361–3369.
112. Kim, K.; Aronov, P.; Zakharkin, S. O.; Anderson, D.; Perroud, B.; Thompson, I. M.; Weiss, R. H. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, 8, 558–570.
113. Kind, T.; Tolstikov, V.; Fiehn, O.; Weiss, R. H. *Anal. Biochem.* **2007**, 363, 185–195.
114. Godejohann, M. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1156, 87–93.
115. Yang, Q.; Shi, X.; Wang, Y.; Wang, W.; He, H.; Lu, X.; Xu, G. *J. Sep. Sci.* **2010**, 33, 1495–1503.
116. Huang, Z.; Chen, Y.; Hang, W.; Gao, Y.; Lin, L.; Li, D. Y.; Xing, J.; Yan, X. *Metabolomics* **2013**, 9, 119–129.
117. Sun, M.; Miao, Y.; Wang, P.; Miao, L.; Liu, L.; Liu, J. *Chromatographia* **2014**, 77, 249–255.
118. Cubbon, S.; Bradbury, T.; Wilson, J.; Thomas-Oates, J. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 8911–8918.

119. Peretz, H.; Watson, D. G.; Blackburn, G.; Zhang, T.; Lagziel, A.; Shtauber-Naamati, M.; Morad, T.; Keren-Tardai, E.; Greenshpun, V.; Usher, S.; Shalev, H.; Landau, D.; Levartovsky, D. *Metabolomics* **2012**, *8*, 951–959.
120. Zhang, T.; Watson, D. G.; Wang, L.; Abbas, M.; Murdoch, L.; Bashford, L.; Ahmad, I.; Lam, N.-Y.; Ng, A. C. F.; Leung, H. Y. *PLoS One* **2013**, *8*, e65880.
121. Trivedi, D. K.; Iles, R. K. *Biomed. Chromatogr.* **2015**, *29*, 240–245.
122. Gika, H. G.; Theodoridis, G. a; Wilson, I. D. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1598–1608.
123. Spagou, K.; Wilson, I. D.; Masson, P.; Theodoridis, G.; Raikos, N.; Coen, M.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Plumb, R. S.; Nicholson, J. K.; Want, E. J. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 382–390.
124. Wang, Y.; Lehmann, R.; Lu, X.; Zhao, X.; Xu, G. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1204*, 28–34.
125. Lin, Y.; Si, D.; Zhang, Z.; Liu, C. *Toxicology* **2009**, *256*, 191–200.
126. Wang, Y.; Wang, J.; Yao, M.; Zhao, X.; Fritsche, J.; Schmitt-Kopplin, P.; Cai, Z.; Wan, D.; Lu, X.; Yang, S.; Gu, J.; Häring, H. U.; Schleicher, E. D.; Lehmann, R.; Xu, G. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4680–4688.
127. Kok, M. G. M.; Swann, J. R.; Wilson, I. D.; Somsen, G. W.; de Jong, G. J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *92*, 98–104.
128. Kok, M. G. M.; Somsen, G. W.; de Jong, G. J. *Talanta* **2015**, *132*, 1–7.
129. Idborg, H.; Zamani, L.; Edlund, P.-O.; Schuppe-Koistinen, I.; Jacobsson, S. P. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *828*, 9–13.
130. Periat, A.; Debrus, B.; Rudaz, S.; Guillarme, D. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1282*, 72–83.
131. Zhang, T.; Creek, D. J.; Barrett, M. P.; Blackburn, G.; Watson, D. G. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1994–2001.
132. Greco, G.; Grosse, S.; Letzel, T. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1235*, 60–67.
133. Cubbon, S.; Antonio, C.; Wilson, J.; Thomas-oates, J. *Mass Spectrom. Rev.* **2010**, *29*, 671–684.
134. Guo, Y.; Srinivasan, S.; Gaiki, S. *Chromatographia* **2007**, *66*, 223–229.
135. Nguyen, H. P.; Schug, K. a. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1465–1480.
136. Bajad, S. U.; Lu, W.; Kimball, E. H.; Yuan, J.; Peterson, C.; Rabinowitz, J. D. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1125*, 76–88.

137. Kloos, D.-P.; Lingeman, H.; Niessen, W. M. a; Deelder, A. M.; Giera, M.; Mayboroda, O. a. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2013**, 927, 90–96.
138. Wong, M. C. Y.; Lee, W. T. K.; Wong, J. S. Y.; Frost, G.; Lodge, J. J. *Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, 871, 341–348.
139. Bi, H.; Krausz, K. W.; Manna, S. K.; Li, F.; Johnson, C. H.; Gonzalez, F. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405, 5279–5289.
140. T'kindt, R.; Storme, M.; Deforce, D.; Van Bocxlaer, J. *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, 1609–1614.
141. Zhang, R.; Watson, D. G.; Wang, L.; Westrop, G. D.; Coombs, G. H.; Zhang, T. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1362, 168–179.
142. Zhang, X.; Clausen, M. R.; Zhao, X.; Zheng, H.; Bertram, H. C. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 7785–7792.
143. McCalley, D. V. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1171, 46–55.
144. Chen, J.; Zhou, L.; Zhang, X.; Lu, X.; Cao, R.; Xu, C.; Xu, G. *Electrophoresis* **2012**, 33, 3361–3369.
145. Luan, H.; Meng, N.; Liu, P.; Fu, J.; Chen, X.; Rao, W.; Jiang, H.; Xu, X.; Cai, Z.; Wang, J. *Gigascience* **2015**, 4, 16–19.
146. Zelena, E.; Dunn, W. B.; Broadhurst, D.; Francis-McIntyre, S.; Carroll, K. M.; Begley, P.; O'Hagan, S.; Knowles, J. D.; Halsall, A.; Wilson, I. D.; Kell, D. B. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 1357–1364.
147. Locasale, J. W.; Melman, T.; Song, S.; Yang, X.; Swanson, K. D.; Cantley, L. C.; Wong, E. T.; Asara, J. M. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, 11, M111.014688–M111.014688.
148. Sarafian, M. H.; Gaudin, M.; Lewis, M. R.; Martin, F. P.; Holmes, E.; Nicholson, J. K.; Dumas, M. E. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 5766–5774.
149. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.
150. Lee, R. S.; Monigatti, F.; Briscoe, A. C.; Waldon, Z.; Freeman, M. R.; Steen, H. *J. Proteome Res.* **2008**, 7, 4022–4030.
151. Afkarian, M.; Bhasin, M.; Dillon, S. T.; Guerrero, M. C.; Nelson, R. G.; Knowler, W. C.; Thadhani, R.; Libermann, T. a. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, 9, 2195–2204.
152. Khan, A.; Packer, N. H. *J. Proteome Res.* **2006**, 5, 2824–2838.

153. Want, E. J.; O'Maille, G.; Smith, C. a.; Brandon, T. R.; Uritboonthai, W.; Qin, C.; Trauger, S. a.; Siuzdak, G. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 743–752.
154. Karatapanis, A. E.; Fiamegos, Y. C.; Stalikas, C. D. *J. Sep. Sci.* **2009**, 32, 909–917.
155. Dejmek, J.; Solanský, I.; Benes, I.; Lenícek, J.; Srám, R. J. *Environ. Health Perspect.* **2000**, 108, 1159–1164.
156. Talbott, E. O.; Arena, V. C.; Rager, J. R.; Clougherty, J. E.; Michanowicz, D. R.; Sharma, R. K.; Stacy, S. L. *Environ. Res.* **2015**, 140, 414–420.
157. Zhu, X.; Liu, Y.; Chen, Y.; Yao, C.; Che, Z.; Cao, J. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, 22, 3383–3396.
158. Dunn, W. B.; Wilson, I. D.; Nicholls, A. W.; Broadhurst, D. *Bioanalysis* **2012**, 4, 2249–2264.
159. Beyoğlu, D.; Idle, J. R. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, 85, 12–20.
160. Godzien, J.; Ciborowski, M.; Angulo, S.; Barbas, C. *Electrophoresis* **2013**, 34, 2812–2826.
161. Anderssen, E.; Dyrstad, K.; Westad, F.; Martens, H. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2006**, 84, 69–74.
162. Xiang, L.; Cheang, W. S.; Lin, S. H.; Wang, L.; Li, Y. L.; Huang, Y.; Cai, Z. W. *Mol. BioSyst.* **2015**, 11, 2588–2596.
163. Hommes, F. A.; Eller, A. G.; Scott, D. F.; Carter, A. L. *Enzyme* **1983**, 29, 271–277.
164. Tůma, P.; Samcová, E.; Balínová, P. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, 821, 53–59.
165. Wu, Y. T.; Tan, H. L.; Shui, G.; Bauvy, C.; Huang, Q.; Wenk, M. R.; Ong, C. N.; Codogno, P.; Shen, H. M. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 10850–10861.
166. Vujcic, S.; Liang, P.; Diegelman, P.; Kramer, D. L.; Porter, C. W. *Biochem. J.* **2003**, 370, 19–28.
167. Wang, W.; Gonzalez De Mejia, E. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2005**, 4, 63–78.
168. Watanabe, K.; Matsunaga, T.; Narimatsu, S.; Yamamoto, H.; Yoshimura, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 188, 114–119.
169. Klotz, K.; Schindler, B. K.; Angerer, J. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2011**, 214, 110–114.

170. Wu, X.; Wakamiya, M.; Vaishnav, S.; Geske, R.; Montgomery, C.; Jones, P.; Bradley, a; Caskey, C. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 742–746.
171. Schooneman, M. G.; Vaz, F. M.; Houten, S. M.; Soeters, M. R. *Diabetes* **2013**, *62*, 1–8.
172. Waidyanatha, S.; Rothman, N.; Fustinoni, S.; Smith, M. T.; Hayes, R. B.; Bechtold, W.; Dosemeci, M.; Guilan, L.; Yin, S.; Rappaport, S. M. *Carcinogenesis* **2001**, *22*, 279–286.
173. Soeters, M. R.; Serlie, M. J.; Sauerwein, H. P.; Duran, M.; Ruiter, J. P.; Kulik, W.; Ackermans, M. T.; Minkler, P. E.; Hoppel, C. L.; Wanders, R. J. a; Houten, S. M. *Metabolism*. **2012**, *61*, 966–973.
174. Obianyo, O.; Liang, Y.; Burnham, E. L.; Mehta, A.; Park, Y.; Uppal, K.; Harris, F. L.; Jones, D. P.; Brown, L. A. S. *PLoS One* **2015**, *10*, e0129570.
175. Russell, W. R.; Hoyles, L.; Flint, H. J.; Dumas, M. E. *Curr. Opin. Microbiol.* **2013**, *16*, 246–254.
176. Koeth, R. a; Wang, Z.; Levison, B. S.; Buffa, J. a; Org, E.; Sheehy, B. T.; Britt, E. B.; Fu, X.; Wu, Y.; Li, L.; Smith, J. D.; DiDonato, J. a; Chen, J.; Li, H.; Wu, G. D.; Lewis, J. D.; Warrier, M.; Brown, J. M.; Krauss, R. M.; Tang, W. H. W.; Bushman, F. D.; Lusis, A. J.; Hazen, S. L. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 576–585.
177. Kish, L.; Hotte, N.; Kaplan, G. G.; Vincent, R.; Tso, R.; Gänzle, M.; Rioux, K. P.; Thiesen, A.; Barkema, H. W.; Wine, E.; Madsen, K. L. *PLoS One* **2013**, *8*.
178. Salim, S. Y.; Kaplan, G. G.; Madsen, K. L. *Gut Microbes* **2013**, *5*, 215–219.
179. Gehr, P.; Muhlfeld, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Blanc, F. *Particle-lung interactions*; Segunda edição; Nova York; Informe HealthCare; **1999**.
180. Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Kinross, J.; Burcelin, R.; Gibson, G.; Jia, W.; Pettersson, S. *Science* **2012**, *336*, 1262–1268.
181. Suwa, T.; Hogg, J. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2002**, *39*, 935–942.
182. Sun, Q.; Wang, A.; Jin, X.; Natanzon, A.; Duquaine, D.; Brook, R. D. *Jama* **2005**, *294*, 3003–3010.
183. Wang, Z.; Klipfell, E.; Bennett, B. J.; Koeth, R.; Levison, B. S.; Dugar, B.; Feldstein, A. E.; Britt, E. B.; Fu, X.; Chung, Y.-M.; Wu, Y.; Schauer, P.; Smith, J. D.; Allayee, H.; Tang, W. H. W.; DiDonato, J. a; Lusis, A. J.; Hazen, S. L. *Nature* **2011**, *472*, 57–63.
184. Kahlson, G.; Rosengren, E.; Westling, H.; White, T. *J. Physiol.* **1958**, *144*, 337–348.
185. Ribas, G. S.; Vargas, C. R.; Wajner, M. *Gene* **2014**, *533*, 469–476.

186. Calò, L. a.; Pagnin, E.; Davis, P. a.; Semplicini, A.; Nicolai, R.; Calvani, M.; Pessina, A. C. *Int. J. Cardiol.* **2006**, *107*, 54–60.
187. Calabrese, V.; Colombrita, C.; Sultana, R.; Scapagnini, G.; Calvani, M.; Butterfield, D. a; Stella, a M. G. *Antioxid. Redox Signal.* **2006**, *8*, 404–416.
188. Vanella, A.; Russo, a.; Acquaviva, R.; Campisi, a.; Di Giacomo, C.; Sorrenti, V.; Barcellona, M. L. *Cell Biol. Toxicol.* **2000**, *16*, 99–104.
189. Mazzoli-Rocha, F.; Fernandes, S.; Einicker-Lamas, M.; Zin, W. A. *Cell Biol. Toxicol.* **2010**, *26*, 481–498.
190. Pereira, C. E. L.; Heck, T. G.; Saldiva, P. H. N.; Rhoden, C. R. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2007**, *40*, 1353–1359.
191. Hoppel, C. *Am. J. Kidney Dis.* **2003**, *41*, S4–S12.
192. Ramsay, R. R.; Arduini, A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *302*, 307–314.
193. Li, Y.; Wang, Y.; Su, L.; Li, L.; Zhang, Y. *Chem. Cent. J.* **2013**, *7*, 36.

Anexos

LISTA DE ANEXOS

Metabolismo da glicina, serina e treonina.....	C
Metabolismo da arginina e prolina.....	D
Metabolismo da Histidina.....	E
Comite de Ética (Protocolo de Pesquisa nº 023/12).....	F
Súmula Curricular.....	G

Metabolismo da glicina, serina e treonina. FONTE: KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)^a

^a Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., and Tanabe, M.; Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. Nucleic Acids Res. 42, D199–D205 (2014).

Metabolismo da arginina e prolina. FONTE: KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)^b

^b Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., and Tanabe, M.; Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. Nucleic Acids Res. 42, D199–D205 (2014).

Metabolismo da Histidina. FONTE: KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)^c

00340 11/2/15
(c) Kanehisa Laboratories

^c Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., and Tanabe, M.; Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 42, D199–D205 (2014).

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **11/04/2012**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **023/12** intitulado: **“EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MATERIAL PARTICULADO CONCENTRADO: ESTUDO DOS MECANISMOS PLACENTÁRIOS ENVOLVIDOS NO COMPROMETIMENTO DO GANHO DE PESO FETAL E SUAS IMPLICAÇÕES SOBRE A SAÚDE NA VIDA ADULTA.”** que utilizará **70** animais da espécie **Balb C**, apresentado pelo **Departamento de PATOLOGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Paulo Hilário Nascimento Saldiva

Pesquisador (a) Executante: Mariana Matera Veras

CEP-FMUSP, 12 de Abril de 2012.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

SÚMULA CURRICULAR
ANDRÉA TEDESCO FACCIO

Informação para contato

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes 748, sala 1170, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 05508-900

Email: andrea.faccio@uol.com.br

Telefone: +55 11 3091-1143

Educação

- Mestre em Química (Química Analítica) *Em andamento*
Universidade de São Paulo – Instituto de Química
“Abordagem metabolômica no estudo da exposição gestacional à poluição atmosférica”
Orientadora: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares
- Bacharelado em Química *2011*
Universidade de São Paulo

Bolsas de Estudo

- Mestrado em Química *2013-2015*
Agência de fomento: CNPq
- Iniciação Científica *2008-2010*
Agência de fomento: FAPESP
Projeto de Pesquisa: “Reações de contração de anel de 1,2-di-hidronaftalenos com HTIB em solventes fluorados”

Emprego

- Estágio *2011-2012*
Empresa: Braskem Área: Controle de Qualidade

Publicações

- Siqueira, F. A., Ishikawa, E. E., Fogaça, A., Faccio, A. T., Carneiro, V. M. T., Soares, R. R. S., Utaka, A., Tébéka, I. R. M., Bielawski, M., Olofsson, B., Silva Jr, L. F. (2011) “Metal-free synthesis of indanes by iodine(III)-mediated ring contraction of 1,2-dihydronaphthalenes” **J. Braz. Chem. Soc.**, 22(9), 1795-1807.
- Publicação aceita: Canuto, G.A., da Cruz, P.L.R., Faccio, A. T., Klassen, A., Tavares, M.F.M. (2015) “Neglected diseases prioritized in brazil under the

perspective of metabolomics. A Review” **Electrophoresis** DOI:
10.1002/elps.201500102

Participação em eventos científicos

- Apresentação de pôster: ITP & LACE 2014 (2014)
Faccio, A. T., Klassen, A., Dörr, F. A., Pinto Jr, E., Tavares, M. F. M.
“HILIC-MS method optimization for untargeted urinary metabolomics”
- Apresentação de pôster: 33ª Reunião Anual - Sociedade Brasileira de Química (2010)
Faccio, A. T., Carneiro, V. M. T., Silva Jr, L.F.
“Oxidação de 1,2-di-hidronaftalenos com I(III) em alcoóis fluorados”
- Membro do comitê organizador: ITP & LACE 2014, Outubro, 2014, Natal, RN, Brasil.