Bruno Rafael Araújo

**Metabolômica *untargeted* em urina de portadores de *Cri Du Chat* utilizando
Cromatografia a Gás e Espectrometria de Massas (GC-MS)**

São Carlos

2020

Bruno Rafael Araújo

Metabolômica *untargeted* em urina de portadores de *Cri Du Chat* utilizando
Cromatografia a Gás e Espectrometria de Massas (GC-MS)

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Química Analítica e
Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas mães, Lalinha e Zu, pelo apoio e incentivo ao longo de toda jornada da vida e acadêmica;

Aos meus irmãos e irmãs que sempre acreditaram em mim;

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro essencial para o desenvolvimento desta tese;

Ao Instituto de Química de São Carlos (ISQC) e ao Grupo de Bioanalítica, Microfluídica e Separação (BioMicS) pela estrutura e serviços fornecidos que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho;

Agradeço ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho pela oportunidade, apoio, orientação e contribuição científica. Tenho imensa satisfação em ter feito parte do Grupo de Bioanalítica, Microfluídica e Separação (BioMicS);

Agradeço ao Prof. Dr. Nilson Antônio de Assunção pelas amostras gentilmente cedidas;

Aos amigos, Darlisson, Vanessa e Gian, que me acolheram na chegada a São Carlos. Meu muito obrigado!

Agradeço a todos os meus amigos por compreenderem minha ausência nos bons e tristes momentos;

Aos colegas e amigos do BioMicS pela adorável companhia, experiências vividas, conhecimentos compartilhados e boas risadas;

Agradeço a todos que contribuíram para minha ida e permanência pelo período de tempo de 4 meses na *Universidad de San Pablo CEU*, Madrid, Espanha, especialmente à Profa. Dra. Marina Tavares – IQ/USP pela indicação.

Por fim, a todos que me apoiaram de todas as formas, direta e indiretamente, para que essa etapa da minha vida acadêmica fosse cumprida. MUITO OBRIGADO!

RESUMO

No primeiro e segundo capítulos desta tese, duas abordagens metabolômicas *untargeted fingerprinting* e perfil metabólico de ácidos orgânicos utilizando urina de portadores e não-portadores da síndrome *Cri Du Chat* (CDC) foram aplicadas para avaliar possíveis alterações nas vias bioquímicas devido à condição genética. Inicialmente, o melhor solvente para precipitação de proteínas/extração de metabólitos foi avaliado, seguido por planejamento fatorial 2^3 para triagem das variáveis de derivação das amostras. Adicionalmente, três diferentes sistemas de extração líquido-líquido de ácidos orgânicos foram avaliados. Os metabólitos derivados foram analisados por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) nas condições: temperatura do injetor, da interface do espectrômetro de massas e da fonte de íons em 250, 290 e 250 °C, respectivamente; modo *scan* (45-600 m/z). Métodos univariados e multivariados como análise de componentes principais (PCA), análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e teste-*t* foram aplicados para discriminação dos grupos controle e teste, e os metabólitos com valores de importância variável na projeção (VIP) maiores que 1,0 e $p < 0,05$ foram selecionados como os responsáveis pela separação entre os grupos. Deste modo, metanol e um método adaptado de extração líquido-líquido foram selecionados como o melhor solvente e melhor método de extração de ácidos orgânicos, respectivamente, por obterem maiores números de metabólitos identificados com altas intensidades e com boa reprodutibilidade entre as medidas. Temperatura e tempo de derivação (60 °C e 120 min, respectivamente), e 400 µL de urina foram as melhores condições selecionadas devido ao número de múltiplas respostas obtidas. Porém, volumes de urina e reagentes de derivação foram reduzidos à metade (urina: 200 µL; cloridrato de metoxiamina em piridina (MeOx) e N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA): ambos 25 µL) devido à redução de custos, mas sem interferir na qualidade dos dados cromatográficos. Diferentes vias bioquímicas foram alteradas devido à condição genética: para o *fingerprinting* metabólico, o metabolismo da glicólise/gliconeogênese, da fenilalanina, da tirosina e da sacarose e amido foram as vias mais impactadas devido à síndrome CDC; e para o perfil metabólico, o metabolismo do triptofano, da tirosina/fenilalanina, e de polifenóis produzidos pela ação da microflora intestinal. Esses resultados correlacionam as alterações bioquímicas e moleculares com as características fenotípicas associadas à síndrome CDC.

No terceiro capítulo, amostras de urina foram depositadas e secas em papel filtro Whatman® 903 (1,4 cm × 2,5 cm) para avaliação da conservação do perfil metabólico urinário

conforme o tempo de armazenamento (1, 5, 10 e 30 dias) e sob o efeito da temperatura (-20°C e 25°C). Após os tempos previamente estabelecidos, a urina foi dessorvida do papel utilizando água deionizada e os metabólitos recuperados foram derivados com MeOx e MSTFA e analisados por GC-MS. O método de análise univariada teste- t foi utilizado para avaliação estatística dos dados. Desse modo, os perfis cromatográficos das amostras de urina depositadas em papel foram similares sob as diferentes condições de armazenamento, bem como perfis semelhantes entre amostras depositadas e secas em papel com a amostra de urina analisada diretamente foram observados, mostrando que os perfis metabólicos são conservados ao longo do tempo, sob diferentes temperaturas, e utilizando a técnica de deposição e secagem da urina em papel filtro. Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as intensidades dos metabólitos identificados em relação ao tempo e temperatura de armazenamento, o que mostra não serem necessárias baixas temperaturas para garantir a estabilidade química dos metabólitos ao longo do tempo de armazenamento quando a urina é depositada em papel filtro. Portanto, a partir desse comportamento tem-se que o papel filtro pode ser utilizado para a coleta e o armazenamento de urina em modo simples para posterior determinação de biomarcadores para diversas doenças.

PALAVRAS-CHAVE: Síndrome do *Cri Du Chat*; metabolômica *untargeted*; *fingerprinting* metabólico; ácidos orgânicos; urina seca em papel.

ABSTRACT

In the first and second chapters of this thesis, two untargeted metabolomics approaches (fingerprinting and metabolic profiling of organic acids) using urine of *Cri Du Chat* (CDC) syndrome individuals and control volunteers without the syndrome were applied to study possible biochemical pathways altered due to this genetic condition. Firstly, the best solvent for precipitation of proteins/extraction of metabolites was assessed, followed by full-factorial design (2^3) for optimization of the conditions of sample derivatization. Also, three different systems of liquid-liquid extraction of organic acids were assessed. The derivatized metabolites were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) in the conditions: injector, mass spectrometer interface, and ion source temperatures were 250, 290, and 250 °C, respectively; scan mode (45-600 m/z). Multivariate and univariate methods as principal component analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), and t -test were applied to distinguish groups, and metabolites with values of variable importance in projection (VIP) higher than 1.0 and $p < 0.05$ were responsible for discrimination between groups. In this way, methanol and an adapted liquid-liquid extraction method were selected as the best solvent for obtaining a greater number of metabolites identified with higher intensities and with good reproducibility between measurements. Temperature and time of derivatization (60 °C and 120 min, respectively), and 400 μ L of urine sample were the selected conditions because of the number of multiple responses obtained. However, volumes of the urine and derivatization reagents were halved (urine: 200 μ L; methoxyamine hydrochloride in pyridine and N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide: both 25 μ L) due to the reduction of costs, and that resulted in no changes in data quality. Different biochemical pathways were altered due to the genetic condition (fingerprinting: glycolysis/gluconeogenesis, phenylalanine, tyrosine, and sucrose and starch metabolisms; metabolic profiling: tryptophan, tyrosine/phenylalanine metabolisms, and polyphenol metabolism, produced by the action of the microflora). These findings correlate the molecular biochemical alterations with phenotypical characteristics associated to the CDC syndrome.

In the third chapter, urine samples were deposited and dried on a Whatman® 903 (1.4 cm $\times$ 2.5 cm) filter paper to evaluate the conservation of the urinary metabolic profile according to storage time (1, 5, 10 and 30 days) and temperature (–20 °C and 25 °C). After the established times, the urine was desorbed from the paper using deionized water and the recovered metabolites were derivatized with MeOx and MSTFA and analyzed by GC-MS. The univariate

analysis *t*-test method was used for statistical evaluation of the data. Thus, the chromatographic profiles of the urine samples deposited on paper were similar under different storage conditions, as well as similar profiles between deposited samples and paper dried with the urine sample directly analyzed were observed, showing that the metabolic profiles are preserved over time, under different temperatures, and using the technique of deposition and drying of urine on filter paper. There was no statistically significant difference ($p > 0.05$) between the intensities of the metabolites identified in relation to storage time and temperature, which shows no need for low temperatures to ensure the chemical stability of the metabolites over the storage time when urine is deposited on filter paper. Therefore, from this behavior we learned that the filter paper can be used for the collection and storage of urine in a simple mode for further determination of biomarkers for several diseases.

KEYWORDS: *Cri Du Chat* syndrome; untargeted metabolomics; metabolic fingerprinting; organic acids; dried urine on paper.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Fingerprinting metabólico em urina de portadores e não portadores da síndrome *Cri Du Chat*

Figura 1.1	Ilustração geral das ciências ômicas: genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, simbolizando o dogma central da biologia e a sequência evolutiva em complexidade frente a um organismo superior.	16
Figura 1.2	Classificação das abordagens em metabolômica: ilustração das estratégias e seus objetivos típicos.....	17
Figura 1.3	Fluxo de trabalho de uma típica abordagem metabolômica.....	19
Figura 1.4	Evolução no número de publicações descritas por [NMR AND Metabolomics] e [Mass spectrometry AND Metabolomics] no <i>Web of Knowledge</i> . Acesso em 21/09/2019.....	21
Figura 1.5	Esquema das reações de metoximação e sililação da glicose: a) abertura do anel e proteção da carbonila; b) substituição dos hidrogênios do grupo OH por trimetilsilil -Si(CH ₃) ₃	24
Figura 1.6	Breve representação sobre a utilização de testes estatísticos univariados.	29
Figura 1.7	Construção do gráfico de análise de componentes principais: disposição dos dados quantitativos em uma planilha (dados de alta dimensão) e redução da alta dimensão a componentes principais.	30
Figura 1.8	Construção do modelo de regressão PLS-DA para predições de amostras (X) em relação aos grupos definidos (Y).....	31
Figura 1.9	Representação do cariótipo humano e deleção do cromossomo 5 p.	32
Figura 1.10	Perfis cromatográficos dos diferentes solventes de extração dos metabólitos em urina: a) Acetona; b) Acetonitrila; c) Isopropanol; d) Metanol; e) Acetato de etila.	43
Figura 1.11	<i>Box plot</i> dos coeficientes de variação das intensidades dos picos dos metabólitos presentes em urina extraídos por cinco diferentes solventes.....	44
Figura 1.12	(a) Gráfico de <i>scores</i> PC1 × PC2 e (b) gráfico de <i>loadings</i> PC1 × PC2: Efeito do solvente na extração de metabólitos em urina. (AcEt: acetato de etila; MET: metanol; ISO: isopropanol; ACE: acetona; ACN: acetonitrila).	45
Figura 1.13	Dendrograma para avaliação do efeito dos solventes de extração de metabólitos em urina. (AcEt: acetato de etila; MET: metanol; ISO: isopropanol; ACE: acetona; ACN: acetonitrila).	51
Figura 1.14	Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2 ³ com três pontos centrais para temperatura de derivação, tempo de derivação e volume de amostra.	53

Figura 1.15	Gráfico de correlação entre valores preditos e observados da múltipla resposta (MR).	56
Figura 1.16	Cromatogramas de íons totais (TIC) do <i>pool</i> de amostras de urina sem tratamento (UN) e após tratamento com urease (UT).	58
Figura 1.17	Gráfico de escores da análise de componentes principais (PCA) do <i>fingerprinting</i> metabólico da urina de portadores de <i>Cri Du Chat</i> (CDC) e controles/não portadores (CTL) após normalização pelo padrão interno e transformação logarítmica na base 10: pontos em vermelho são referentes aos <i>quality controls</i> (QCs).	59
Figura 1.18	Gráfico de scores da PLS-DA indicando efetiva discriminação entre os grupos portadores de <i>Cri Du Chat</i> (CDC) e não portadores de <i>Cri Du Chat</i> (CTL).	60
Figura 1.19	<i>Box plots</i> da variação das intensidades normalizadas dos metabólitos em urina de portadores de <i>Cri Du Chat</i> (CDC) e dos controles (CTL) com seus respectivos <i>p</i> -valores: + representa a média aritmética do conjunto de dados; ○ representa <i>outlier</i>	66
Figura 1.20	Gráfico de impacto das vias metabólicas identificadas a partir da alteração significativa dos 15 metabólitos entre os grupos de portadores e não portadores de <i>Cri Du Chat</i> . Círculos de cor laranja representam maiores impactos nos metabolismos mencionados ($p \leq 0,05$). Apenas as 4 vias metabólicas com $p \leq 0,05$ foram destacadas.	68
Figura 1.21	Reações das vias metabólicas alteradas nas amostras de urina de portadores e não portadores de <i>Cri Du Chat</i> . Quadrados em azul são referentes aos metabólitos envolvidos nas vias bioquímicas. Quadrados em vermelho são referentes aos metabólitos significativamente alterados devido à síndrome.	69
Figura 1.22	Reação enzimática de conversão do aminoácido tirosina a fenol.	68
Figura 1.23	Modelo de degradação de amido para formação de glicose no organismo pelo metabolismo do amido e sacarose.	70

CAPÍTULO 2

Perfil metabólico de ácidos orgânicos em urina de portadores e não portadores da síndrome *Cri Du Chat*

Figura 2.1	Procedimento geral dos métodos de extração e análise de ácidos orgânicos em urina visando análise metabolômica da síndrome CDC.	100
Figura 2.2	a) Cromatogramas de íons totais (TIC) das replicatas de análise de ácidos orgânicos em urina utilizando 3 métodos de extração; b) diagrama de Venn com o número de metabólitos ácidos orgânicos identificados utilizando os diferentes métodos de extração. MÉT1 (método 1 - adaptação do proposto por Bouatra et al. 2013); MÉT2 (método 2 - adotado por Bouatra et al. 2013); MÉT3 (método 3 - adotado por Tordiffo et al. 2017).	103

Figura 2.3	Gráficos de escores (a) e de <i>loadings</i> (b) para a avaliação de três métodos de extração de ácidos orgânicos em urina: MÉT1 (método 1- adaptação do proposto por Bouatra et al. 2013); MÉT2 (método 2- adotado por Bouatra et al. 2013); e MÉT3 (método 3- adotado por Tordiffe et al. 2017).	105
Figura 2.4	Dendrograma agrupando os diferentes métodos de extração de ácidos orgânicos em urina. (MÉT1-1, MÉT1-2, MÉT1-3, MÉT1-4, MÉT1-5: Replicatas do método 1; MÉT2-1, MÉT2-2, MÉT2-3, MÉT2-4, MÉT2-5: Replicatas do método 2; MÉT3-1, MÉT3-2, MÉT3-3, MÉT3-4, MÉT3-5: Replicatas do método 3).	93
Figura 2.5	<i>Box plot</i> dos coeficientes de variação das intensidades dos metabólitos ácidos orgânicos extraídos da urina utilizando os três métodos adaptados: + representa a média aritmética do conjunto de dados; ○ representa <i>outlier</i>	95
Figura 2.6	Gráfico de <i>scores</i> da análise de componentes principais (PCA) para os ácidos orgânicos das amostras de urina de indivíduos portadores de <i>Cri Du Chat</i> (CDC) e controles/não portadores (CTL), sem normalização pelo padrão interno: pontos em vermelho são referentes aos <i>quality controls</i> (QCs).	97
Figura 2.7	Intensidade do íon <i>m/z</i> 57, referente ao padrão interno hexadecano.	98
Figura 2.8	Gráfico de <i>scores</i> da análise de componentes principais (PCA) para os ácidos orgânicos das amostras de urina de indivíduos portadores de <i>Cri Du Chat</i> (CDC) e controles/não portadores (CTL) após normalização pelo padrão interno: pontos em vermelho são referentes aos <i>quality controls</i> (QCs).	99
Figura 2.9	Gráfico de PLS-DA das amostras de urina de portadores (CDC) e não-portadores da síndrome (CTL) <i>Cri Du Chat</i>	100
Figura 2.10	<i>Box plots</i> da variação das intensidades dos ácidos orgânicos em urina de portadores de <i>Cri Du Chat</i> (CDC) e controles (CTL) com seus respectivos <i>p</i> -valores: + representa a média aritmética do conjunto de dados; ○ representa <i>outlier</i>	102
Figura 2. 11	Gráfico de impacto das vias metabólicas identificadas a partir da alteração estatisticamente significativa de ácidos orgânicos urinários entre os grupos de portadores e não portadores de <i>Cri Du Chat</i> . Círculos de cor laranja representam maiores impactos nos metabolismos mencionados ($p \leq 0,05$); Apenas as 3 vias metabólicas com $p \leq 0,05$ foram destacadas.	104
Figura 2. 12	Reações das vias metabólicas alteradas nos portadores e não portadores de <i>Cri Du Chat</i> . Quadrados em azul são referentes aos ácidos orgânicos envolvidos nas vias bioquímicas. Quadrados em vermelho são referentes aos ácidos orgânicos alterados significativamente devido à síndrome.	105

CAPÍTULO 3

Avaliação do *fingerprinting* metabólico de urina depositada em papel filtro

Figura 3.1	Modos convencionais de coleta e armazenamento de fluidos biológicos: a) sangue; b) urina.	111
------------	--	-----

Figura 3.2	Coleta de fluidos biológicos a) sangue e b) urina em papel filtro.....	111
Figura 3.3	Estrutura monomérica do polímero celulose.....	114
Figura 3.4	Mecanismos de interação de metabólitos em papel. a) Estrutura química da celulose seca (sem a presença de metabólitos); b) interação de metabólitos com grupos funcionais da celulose; c) estrutura da celulose com metabólitos impregnados e após evaporação da água.....	115
Figura 3.5	Procedimento geral de deposição e secagem de urina em papel com posterior eluição: (a) Papel Whatman® 903 (dimensões: 1,4 cm × 2,5 cm); (b) adição de 200 µL de urina no papel; (c) armazenamento em sacos plásticos em condições específicas; d) eluição dos componentes da urina solúveis em água; e) coleta do eluato.	117
Figura 3.6	Cromatogramas de íons totais (TIC) das amostras de urina depositadas em papel filtro sob diferentes condições de armazenamento: D = Dia(s); REF = Amostra referência – urina líquida sem contato com papel; Branco = todos os reagentes e solventes utilizados no procedimento da seção 3.1, capítulo 3, incluindo o papel filtro Whatman® 903, exceto a urina depositada e seca.	120

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Fingerprinting* metabólico em urina de portadores e não portadores da síndrome *Cri Du Chat

Tabela 1.1	Matriz dos <i>loadings</i> da análise de componentes principais: Efeito do solvente na extração de metabólitos em urina.....	47
Tabela 1.2	Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com os valores reais das variáveis estudadas com três pontos centrais e múltipla resposta dos metabólitos.	52
Tabela 1.3	Estimativa dos efeitos e seus coeficientes para a múltipla resposta (MR).....	54
Tabela 1.4	Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central.	55
Tabela 1.5	Testes de normalidade dos dados pertencentes aos grupos CDC e CTL.	61
Tabela 1.6	Metabólitos identificados putativamente, em suas formas trimetilsililadas e/ou metoximadas, responsáveis pela discriminação entre os grupos CDC e CTL: íons <i>m/z</i> em negrito correspondem ao pico base; t_R (min) é o tempo de retenção do metabólito; $LTPRI_{(calc.)}$ e $LTPRI_{(lit.)}$ são as siglas em inglês para índice de retenção com programação linear de temperatura (<i>Linear Temperature Programmed Retention Indexes</i>) calculado e da literatura, respectivamente; $VIP \geq 1,0$, <i>p</i> -valores $\leq 0,05$, % <i>fold change</i> e coeficientes de variação baseados em <i>quality control</i> (%CV-QC).....	64

CAPÍTULO 2

Perfil metabólico de ácidos orgânicos em urina de portadores e não portadores da síndrome *Cri Du Chat*

Tabela 2.1	Matriz de <i>loadings</i> da análise de componentes principais ($PC1 \times PC2$): Efeito das variáveis na seleção do método de extração de ácidos orgânicos em urina. Valores em negrito correspondem aos pesos em módulo maiores que 0,70.	90
Tabela 2.2	Ácidos orgânicos identificados putativamente, em suas formas trimetilsililadas e/ou metoximadas, responsáveis pela discriminação entre os grupos CDC e CTL: íons <i>m/z</i> em negrito correspondem ao pico base; t_R é o tempo de retenção do metabólito; $LTPRI_{(calc.)}$ e $LTPRI_{(lit.)}$ são as siglas em inglês para índice de retenção com programação linear de temperatura (<i>Linear Temperature Programmed Retention Indexes</i>) calculado e da literatura, respectivamente; código HMDB; $VIP \geq 1,0$, <i>p</i> -valores $\leq 0,05$, % <i>fold change</i> e coeficientes de variação baseados em <i>quality control</i> (%CV-QC).....	101

CAPÍTULO 3

Avaliação do *fingerprinting* metabólico de urina depositada em papel filtro

Tabela 3.1	Metabólitos identificados em todas as condições experimentais estudadas: t_R (min): tempo de retenção do composto eluído; HMDB: <i>Human Metabolome Database</i> . O asterisco (*) indica que o metabólito foi identificado em todas as condições experimentais.	120
------------	---	-----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACE – Acetona

AcEt – Acetato de etila

ACN – Acetonitrila

AMDIS – *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*

ANOVA – Análise de variância

BCAA – aminoácidos de cadeia ramificada (do inglês, *branched-chain amino acids*)

BCAT – *branched-chain amino acid aminotransferase*

BSTFA – N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (do inglês, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)

C₁(fase aquosa) – concentração no equilíbrio do soluto na fase aquosa

C18 – Octadecilsilano

C₂(fase orgânica) – concentração no equilíbrio do soluto na fase orgânica

CDC – *Cri Du Chat*

CE – Eletroforese Capilar (do inglês, *Capillary Electrophoresis*)

CE–TOF–MS/MS – Eletroforese capilar- tempo de voo- espectrometria de massas *tandem* (do inglês, *Capillary Electrophoresis-Time of Flight – tandem Mass Spectrometry*)

CTL – Controle não portadores de *Cri Du Chat*

CV – Coeficiente de variação

DBS – *dried blood spot*

DCR – deficiência na cadeia respiratória

DIMS – Espectrometria de Massas por Infusão/Injeção Direta (do inglês, *direct infusion/injection mass spectrometry*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)

DUS – *dried urine strips*

Eq. – Equação

eV – eletrôn-volt

G – Força centrífuga relativa

GC – Cromatografia a gás (do inglês, *Gas Chromatography*)

GC-MS – Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (do inglês, *Gas Chromatography - Mass Spectrometry*)

GL – Graus de liberdade

GMD – *Golm Metabolome Database*

H₀ – Hipótese nula

H_a – Hipótese alternativa

HCA – análise de agrupamento hierárquico (do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*)

HILIC – Cromatografia líquida de interação hidrofílica (do inglês, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*)

HIV – vírus da imunodeficiência humana – (do inglês, *human immuno deficiency vírus*)

HMDB – *Human Metabolome Database*

HPV – papilomavirus humano (do inglês, *Human papillomavirus*)

HR-MAS NMR – Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução – Rotação em torno do Ângulo Mágico (do inglês, *high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance*)

$I_{\text{máx.metabólito}}$ – Intensidade máxima do metabólito

$I_{\text{metabólito}}$ – Intensidade do metabólito

IR – índice de retenção

ISO – Isopropanol

KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

KNN – *k*-vizinho mais próximo (do inglês, *k-nearest neighbor*)

LC – Cromatografia líquida (do inglês, *Liquid Chromatography*)

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês, *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*)

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas *tandem* (do inglês, *Liquid Chromatography coupled to tandem mass spectrometry*)

$\log_{10}$ – forma logarítmica na base 10

LTPRI – índice de retenção com programação linear de temperatura (do inglês, *Linear Temperature Programmed Retention Indexes*)

m/z – Relação massa/carga

MAO – Enzima monoamina oxidase

MeOx – Cloridrato de metoxiamina

MET – Metanol

MÉT – Método

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

MQ – Média dos quadrados

MR – Múltipla Resposta

MS – Espectrometria de massas (do inglês, *Mass Spectrometry*)

MSTFA – N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (do inglês, *N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*)

NIST – *National Institute of Standards and Technology*

NMR – Ressonância Magnética Nuclear (do inglês, *Nuclear Magnetic Resonance*)

NPCDC – Núcleo de Aconselhamento e Pesquisa *Cri Du Chat*

p – probabilidade de significância

PC1 – componente principal 1 (do inglês, *Principal Component 1*)

PC2 – componente principal 2 (do inglês, *Principal Component 2*)

PCA – análise de componentes principais (do inglês, *Principal Component Analysis*)

PI – Padrão interno

pK_a – Constante de ionização ácida

PLS–DA – análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (do inglês, *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*)

Q^2 – Variância predita do ajuste do modelo

QCs – Controles de qualidade (do inglês, *quality controls*)

r – coeficiente de correlação

r^2 – coeficiente de determinação

R^2 – Variância explicada do ajuste do modelo

REF – Amostra referência – urina líquida sem contato com papel

RP–LC – Cromatografia líquida em modo de fase reversa (do inglês, *Reverse Phase Liquid Chromatography*)

RPM – Rotação por minuto (do inglês, *revolutions per minute*)

s – segundo

SQ – Soma dos quadrados

T – temperatura

t – tempo

TIC – Cromatograma de íons totais (do inglês, *Total Ion Chromatogram*)

TMCS – Trimetilclorosilano (do inglês, *trimethylchlorosilane*)

TMS – Trimetilsilil

t_R – tempo de retenção

U – atividade enzimática

UHPLC–TOF – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas por Tempo de Voo (do inglês, *ultra-high performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry*)

UN – Urina antes do tratamento com urease

UT – Urina após tratamento com urease

V – Volume

VIP – *Variable Importance in Projection*

α – probabilidade máxima de significância

μL – microlitro

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

Fingerprinting metabólico em urina de portadores e não portadores da síndrome *Cri Du Chat*

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Metabolômica	16
1.2 Fluxo de trabalho em metabolômica	18
1.3 Técnicas de análise do metaboloma em sistemas biológicos	20
1.4 Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em estudos metabolômicos	23
1.5 Utilização de urina em análise metabolômica	24
1.6 Planejamento fatorial.....	26
1.7 Análise estatística dos dados em metabolômica.....	28
1.8 Síndrome do <i>Cri Du Chat</i>	31
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Padrões e reagentes.....	36
3.2 Coleta das amostras de urina e estocagem.....	36
3.2 Avaliação do solvente de extração e derivação dos metabólitos em urina.....	36
3.3 Condições cromatográficas de análise.....	37
3.4 Adequação das condições de derivação.....	37
3.5 Experimentos para abordagem metabolômica <i>fingerprinting</i>	38
3.6 Pré-processamento dos dados e identificação de metabólitos	39
3.7 Tratamento dos dados e análise estatística	40
3.8 Análise das vias metabólicas	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Seleção do solvente para extração dos metabólitos.....	42
4.1.1 Análise multivariada dos dados	44

4.2 Triagem das condições de derivação	51
4.3 Avaliação do tratamento da amostra com urease	57
4.4 Abordagem metabolômica <i>fingerprinting</i> da urina de portadores e não portadores de <i>Cri Du Chat</i>	58
5 CONCLUSÕES.....	72

CAPÍTULO 2

Perfil metabólico de ácidos orgânicos em urina de portadores e não portadores da síndrome *Cri Du Chat*

1 INTRODUÇÃO	90
1.1 Ácidos orgânicos e metabolismo	90
1.2 Abordagens em metabolômica utilizando ácidos orgânicos	91
1.3 Preparo de amostra para determinação de ácidos orgânicos por GC-MS	92
1.3.1 Ácidos orgânicos em biofluidos e extração líquido-líquido	94
2 OBJETIVOS	97
2.1 Objetivo geral	97
2.2 Objetivos específicos	97
3 MATERIAIS E MÉTODOS	98
3.1 Reagentes e solventes	98
3.2 Coleta da amostra e estocagem.....	98
3.3 Preparo da amostra e reações de derivação	98
3.4 Preparo da amostra para análise do perfil metabólico de ácidos orgânicos	100
3.5 Condições de análise por GC-MS	101
3.6 Pré-processamento dos dados e identificação dos metabólitos	101
3.7 Tratamento dos dados e análise estatística	101
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
4.1 Adequação do método de extração de ácidos orgânicos em urina	103
4.1.1 Análise de componentes principais (PCA)	104
4.1.2 Análise de agrupamento hierárquico (HCA)	93
4.1.3 Avaliação da reprodutibilidade dos métodos de extração	94

3.2 Perfil metabólico de ácidos orgânicos em urina de portadores e não portadores de <i>Cri Du Chat</i>	96
4.2 Análise das vias metabólicas afetadas pela síndrome CDC	103
5 CONCLUSÕES.....	109

CAPÍTULO 3

Avaliação do *fingerprinting* metabólico de urina depositada em papel filtro

1 INTRODUÇÃO	110
1.1 Uso de papel filtro para coleta de biofluidos	110
1.2 Urina seca em papel filtro.....	112
1.3 Papel filtro e interação com biomoléculas.....	113
2 OBJETIVOS	116
2.1 Objetivo geral	116
2.2 Objetivos específicos.....	116
3 MATERIAIS E MÉTODOS	117
3.1 Preparo da amostra e extração dos metabólitos da urina impregnada em papel Whatman 903®	117
3.2 Condições de análise por GC-MS	118
3.3 Pré-processamento dos dados.....	118
3.4. Processamento dos dados e identificação dos metabólitos.....	119
3.5 Análise estatística dos dados	119
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
5 CONCLUSÕES.....	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

CAPÍTULO 1

Fingerprinting* metabólico em urina de portadores e não portadores da síndrome *Cri Du Chat

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metabolômica

Conforme a *Metabolomics Society*, metabolômica é um campo emergente das pesquisas “ômicas” cujo objetivo é a caracterização abrangente de pequenas moléculas (< 1500 Da) em sistemas biológicos, denominadas metabólitos, que podem fornecer uma visão geral do estado metabólico e eventos bioquímicos relacionados com um sistema celular ou biológico (METABOLOMICS SOCIETY, 2018).

Como complemento das tecnologias “ômicas” (genômica, transcriptômica e proteômica) (Figura 1.1), a metabolômica é definida como uma ferramenta apropriada para dar informações acerca das interações entre o genoma, o transcriptoma e o proteoma com o ambiente externo, o que possibilita o entendimento abrangente do funcionamento celular como absorção e distribuição de nutrientes, desintoxicação, transdução e regulação de sinal, bem como informações sobre processos metabólicos, destacando o anabolismo e o catabolismo (KUMAR et al., 2014).

Figura 1.1 Ilustração geral das ciências ômicas: genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, simbolizando o dogma central da biologia e a sequência evolutiva em complexidade frente a um organismo superior.

FONTE: Autoria própria

A coleção qualitativa dos metabólitos presentes em fluidos biológicos, células, órgãos e tecidos é denominada metaboloma e inclui compostos de natureza química diversificada como carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleotídeos, hormônios e lipídios, que estão diretamente envolvidos em etapas bioquímicas mediadas por enzimas como reagentes, intermediários e produtos de reações; são blocos de construção de macromoléculas como ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico e proteínas; e fazem parte de componentes estruturais de células (DUNN et al., 2011).

Devido à diversidade das propriedades físico-químicas, ao modo dinâmico de ação e à ampla faixa de concentração dos metabólitos que varia de 10^{-12} mol L⁻¹ (pmol L⁻¹) a 10^{-3} mol L⁻¹ (mmol L⁻¹), e a análise qualitativa e quantitativa do metaboloma em um sistema biológico é uma tarefa bastante complexa e desafiadora, o que requer o emprego de múltiplas técnicas de análise para a cobertura do metaboloma (DUNN et al., 2011; CANUTO et al., 2018).

As estratégias metabolômicas estão classificadas em duas abordagens distintas: metabolômica global (*untargeted*) e metabolômica alvo (*targeted*) (Figura 1.2).

Figura 1.2 Classificação das abordagens em metabolômica: ilustração das estratégias e seus objetivos típicos.

FONTE: Adaptado de WIEDMER; HYOTYLAINEN (2013)

A abordagem metabolômica global está relacionada com a detecção abrangente de todos ou grande parte dos metabólitos mensuráveis em uma amostra pela técnica utilizada, incluindo compostos químicos desconhecidos, geralmente realizada através de análise semiquantitativa. Por outro lado, a abordagem metabolômica alvo está relacionada com a

detecção de um menor número de metabólitos com estruturas químicas definidas e que estão envolvidos em determinadas vias metabólicas e com funções biológicas previamente conhecidas. Geralmente é uma abordagem utilizada para fins quantitativos (WIEDMER; HYOTYLAINEN, 2013; CANUTO et al., 2018). No entanto, a estratégia metabolômica deve ser antecipadamente definida com base no objetivo proposto, embora os procedimentos analíticos para a análise global e alvo de metabólitos sejam similares.

1.2 Fluxo de trabalho em metabolômica

Em contraste à genômica, transcriptômica e proteômica, as pesquisas em metabolômica não dispõem de métodos únicos e padronizados—principalmente para completa cobertura do metaboloma em sistemas biológicos—consistindo em um dos maiores problemas da abordagem ômica (CANUTO et al., 2018). Todavia, alguns trabalhos têm sido realizados com o objetivo de padronizar metodologias em metabolômica aplicáveis a diferentes tipos de amostras biológicas (CHAN et al., 2015; MASTRANGELO et al., 2015).

Geralmente, o fluxo de trabalho em metabolômica consiste em (MASTRANGELO et al., 2015; WANG et al., 2015; CANUTO et al., 2018):

- i) Definição da questão biológica – levantamento de perguntas a serem respondidas com o estudo, que envolve a seleção da amostra biológica a ser estudada (sangue, urina, saliva, células e tecidos) e que melhor forneça informações sobre as alterações metabólicas associadas à condição biológica selecionada e, a aprovação do comitê de ética;
- ii) Planejamento dos experimentos – controlar a variabilidade analítica comumente presente nas etapas de coleta e preparo de amostras, incluindo definição do número de amostras coletadas que represente bem os grupos estudados (teste *versus* controle), redução ao máximo da variabilidade biológica intrínseca ao estudo com humanos devido a diferenças de fatores genéticos, estilo de vida e ambientais; descontinuação de reações enzimáticas (*quenching*) para representar a condição biológica no tempo de coleta, precipitação de proteínas e técnicas de extração para *clean-up* e melhoria na detecção dos metabólitos, avaliação da necessidade de reações de derivação anterior à análise;
- iii) Seleção da técnica de análise – utilização de métodos abrangentes de análise para a maior cobertura do metaboloma (quando se faz uso da abordagem metabolômica global/*untargeted*), ou uma instrumentação que permita seletividade para a análise dos metabólitos de interesse (abordagem metabolômica alvo/*targeted*);

- iv) Pré-processamento e análise de dados – etapa empregada para extrair dados úteis adquiridos pela instrumentação selecionada de análise. Na abordagem global/ *untargeted*, geralmente, uma sequência de pré-processamentos é aplicada, composta por desconvolução, normalização e alinhamento dos sinais analíticos para posteriormente aplicar técnicas estatísticas de análises univariadas e multivariadas; a identificação química dos metabólitos pode ser realizada fazendo uso de bibliotecas privadas (*in house*), comerciais como a *National Institute of Standards and Technology* – NIST, e *online* como a *Golm Metabolome Database* – GMD e a *Human Metabolome Database* – HMDB;
- v) Interpretação biológica – discriminação das mudanças metabólicas que caracterizam uma condição específica. Comumente, buscam-se as vias bioquímicas em que os metabólitos identificados e responsáveis pela separação dos grupos estão envolvidos, o que possibilita também avaliar as correlações e interações entre eles. Geralmente, as buscas são realizadas no *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) ou HMDB.

O fluxo de trabalho em estudos metabolômicos pode ser resumido como apresentado na Figura 1.3.

Figura 1.3 Fluxo de trabalho de uma típica abordagem metabolômica.

FONTE: Adaptado de MASTRANGELO et al., (2015)

1.3 Técnicas de análise do metaboloma em sistemas biológicos

O desenvolvimento de instrumentação robusta agregou o maior interesse em pesquisas em sistemas biológicos visando elucidar mudanças no metabolismo de indivíduos dispostos em determinadas condições fisiológicas, possibilitando a identificação de grupos de metabólitos frente à diversidade de espécies endógenas e exógenas. Todavia, não existe uma instrumentação única que possa atingir uma cobertura completa do metaboloma.

A seleção da técnica para análise do metaboloma depende de diversos parâmetros, tais como a abordagem metabolômica adotada (*targeted* ou *untargeted*), o tipo de analito ou o conjunto de analitos que se quer analisar em determinada matriz biológica, a quantidade da amostra disponível para o estudo, e a concentração dos analitos presentes (WIEDMER; HYOTYLAINEN, 2013).

Dentre as principais técnicas utilizadas para identificação e caracterização do metaboloma destacam-se a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) e a espectrometria de massas (MS) (KUMAR et al., 2014).

A espectroscopia NMR é uma técnica robusta, abrangente e não requer separação ou derivação das amostras para análise, concedendo à técnica mínimo preparo de amostra para experimentos em metabolômica. Adicionalmente, a NMR dispõe de vantagem analítica relacionada à sensibilidade, que é independente da natureza química dos compostos sujeitos a análise, como hidrofobicidade ou pK_a (DUNN et al., 2011).

Embora a maioria das amostras utilizadas nos experimentos em metabolômica empregando NMR como técnica de análise estejam em solução, tais como urina e plasma, amostras biológicas no estado sólido e intactas (células e tecidos) podem ser analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear em estado sólido com espectros adquiridos através da rotação no ângulo mágico de alta resolução (HR-MAS NMR, do inglês *high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance*) (SITTER et al., 2009; AUSTDAL et al., 2015).

Devido à pequena diferença de energia entre os níveis excitado e fundamental relativos à energia térmica, a ressonância magnética nuclear apresenta a desvantagem da baixa sensibilidade quando comparada à espectrometria de massas, resultando na baixa detectabilidade e identificação de metabólitos em baixas concentrações nos sistemas biológicos ($\geq 1 \mu\text{mol L}^{-1}$) (DUNN et al., 2005).

Entretanto, a espectrometria de massas (MS) é uma técnica de análise frequentemente utilizada em metabolômica devido à alta sensibilidade ($< 1 \text{ pmol L}^{-1}$), útil para identificação e quantificação de moléculas através da determinação da massa molecular e padrões de fragmentação (DUNN et al. 2005; WEI et al., 2011; BUJAK et al., 2015).

O desenvolvimento de espectrômetros de massas modernos implicou no surgimento de um conjunto de plataformas de alta especificidade para estudos em metabolômica e, atualmente, a espectrometria de massas consiste em uma das técnicas mais importantes para análise de sistemas biológicos (VILLAS-BÔAS et al., 2007). Além da vantagem da alta sensibilidade fornecida pelos variados instrumentos, destacam-se também a alta velocidade para aquisição de dados (imprescindível na detecção de picos cromatográficos estreitos), habilidade em fornecer alta resolução e precisão de massa, e possibilidade de identificação química de metabólitos (DUNN et al., 2011).

Devido às vantagens descritas, é crescente a utilização da espectrometria de massas como ferramenta de análise em estudos metabolômicos, independentemente da abordagem utilizada (*targeted* ou *untargeted*), como mostra a Figura 1.4.

Figura 1.4 Evolução no número de publicações descritas por [NMR AND Metabolomics] e [Mass spectrometry AND Metabolomics] no *Web of Knowledge*. Acesso em 31/08/2020.

FONTE: Adaptado do *Web of Knowledge*.

Além disso, observa-se uma superioridade ao longo dos anos na utilização da espectrometria de massas nas diferentes estratégias metabolômicas frente à ressonância

magnética nuclear, o que contribui para a popularização da instrumentação como plataforma para identificação e quantificação de metabólitos em diferentes sistemas biológicos.

A espectrometria de massas pode ser aplicada para determinação de metabólitos sem separação, como na espectrometria de massas por infusão/injeção direta (DIMS, do inglês *direct infusion/injection mass spectrometry*), ou após separação dos metabólitos através de técnicas cromatográficas ou eletroforéticas. Dentre as técnicas de separação mais utilizadas em abordagens metabolômicas destacam-se a cromatografia líquida (LC), eletroforese capilar (CE) e cromatografia a gás (GC) que, acopladas ao espectrômetro de massas, resultam em instrumentações analíticas eficientes para identificação e quantificação de metabólitos com aumento considerável na sensibilidade.

A escolha da técnica de separação é dependente das propriedades físico-químicas e da concentração dos analitos a serem analisados. Assim, a cromatografia líquida é a técnica mais adequada para análise de compostos polares e não voláteis. Compostos hidrofóbicos podem ser separados utilizando o modo em fase reversa, em que colunas de C18 e fase móvel constituída por solventes mais polares são comumente empregadas para separar uma maior faixa de metabólitos em uma única corrida cromatográfica (WILSON, 2007). Outra abordagem complementar ao modo em fase reversa e que permite a separação de compostos mais polares e iônicos é a cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), a qual utiliza uma coluna de sílica hidratada (ou outra fase polar) e um gradiente de eluição que inicia com fase móvel altamente orgânica e finaliza com fase móvel altamente aquosa (GIKA et al., 2008; DUNN et al., 2011).

A eletroforese capilar vem sendo bastante utilizada na análise de uma grande variedade de compostos por possuir alta resolução e eficiência de separação vasta gama de compostos polares e carregados. Além disso, possui vantagens econômicas como baixo custo operacional por utilizar pouco volume de solventes ou eletrólitos, e vantagens de gestão como o mínimo tratamento da amostra, a utilização de pouco volume de amostra para análise e habilidade em separar compostos em meio aquoso, requisito importante para análise do metaboloma e características comumente encontradas em biofluidos, respectivamente (ASSUNÇÃO et al., 2008; BUJAK et al., 2015).

A combinação da alta resolução e eficiência da eletroforese capilar com a universalidade e sensibilidade da espectrometria de massas resultou em uma ferramenta promissora e viável para a maior cobertura possível de metabólitos em estudos metabolômicos (WIEDMER; HYOTYLAINEN, 2013).

A cromatografia a gás é a técnica mais apropriada para separação de compostos voláteis e semivoláteis. Como a cromatografia a gás e espectrometria de massas (GC-MS) são as técnicas de separação e análise, respectivamente, utilizadas nesse trabalho, suas aplicações e vantagens serão abordadas na seção 1.4.

1.4 Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em estudos metabolômicos

A cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) tornou-se uma ferramenta poderosa em estudos metabolômicos por fornecer alta resolução na separação, apresentar padrões de fragmentação de massa confiáveis e reprodutíveis para uma extensa faixa dinâmica de metabólitos, bem como dispor de alta capacidade para a identificação de compostos desconhecidos pertencentes a um metaboloma (KOEK et al., 2011).

Uma grande vantagem da utilização da hifenização da cromatografia a gás com a espectrometria de massas usando a ionização por elétrons com energia de 70 eV é a facilidade para identificação dos compostos separados e ionizados, em ordem, através da comparação dos seus espectros de massas com os disponíveis em bibliotecas comerciais ou em bancos de dados de acesso *online*. Porém, como a GC-MS é limitada a compostos voláteis, térmica e energeticamente estáveis, etapas no preparo da amostra como reações de modificação química (derivação) nas estruturas dos metabólitos prévias à determinação devem ser aplicadas com vistas à melhoria da volatilidade, estabilidade térmica e detectabilidade de compostos altamente polares (YI et al., 2014).

Dentre os agentes derivantes mais utilizados para posterior determinação cromatográfica, destacam-se o BSTFA (*N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*) e o MSTFA (*N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide*) com 1% de *trimethylchlorosilane* (TMCS), em uma reação denominada sililação. Essa reação consiste na substituição dos átomos de hidrogênio em metabólitos com grupos funcionais OH, NH e SH presentes em ácidos carboxílicos, aminoácidos, álcoois, aminas, amidas, tióis e sulfoácidos, pelo grupo trimetilsil $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ (DUNN et al., 2005).

É bastante útil e comum a realização de uma reação anterior a sililação, denominada metoximação. Essa reação faz uso do reagente cloridrato de metoxiamina (*methoxyamine hydrochloride*) dissolvido em piridina, aplicado com o objetivo de proteger a carbonila em unidades de aldoses e cetoses, o que inibe a formação de anéis de açúcares redutores ou favorece sua abertura, resultando em dois estereoisômeros que serão separados por GC-MS. Como

Conforme Bouatra et al. (2013), os metabólitos orgânicos mais abundantes encontrados na urina são ureia ($22,5 \pm 4,4 \text{ mmol L}^{-1}/\text{mmol L}^{-1}$ de creatinina), creatinina ($10,4 \pm 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$), ácido hipúrico ($298,5 \pm 276,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}/\text{mmol L}^{-1}$ de creatinina) e ácido cítrico ($280,6 \pm 115,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}/\text{mmol L}^{-1}$ de creatinina). Em contrapartida, os menos abundantes são ácido trans-ferúlico ($1,2 \text{ nmol L}^{-1}/\text{mmol L}^{-1}$ de creatinina), fosforilcolina ($1,1 \pm 0,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}/\text{mmol L}^{-1}$ de creatinina), 4-etilfenol ($0,9 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}/\text{mmol L}^{-1}$ de creatinina) e o ácido 2-metilglutárico ($0,8 \pm 0,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}/\text{mmol L}^{-1}$ de creatinina). Entre esses compostos estão inclusos aqueles presentes em variadas concentrações que abrangem produtos de vias metabólicas relacionadas à alimentação, ingestão de bebidas, drogas, contaminantes ambientais, metabólitos endógenos e subprodutos de origem bacteriana.

Várias técnicas de análise têm sido aplicadas, individualmente ou em combinação, para a determinação do perfil metabolômico global ou obtenção do perfil metabólico da urina de indivíduos diagnosticados com diferentes casos clínicos, destacando-se a ressonância magnética nuclear (NMR) (CARTA et al., 2017), a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas quadrupolo-*time of flight* (UHPLC-QTOF) (GAGNEBIN et al., 2017) e quadrupolo linear-*ion trap*-Orbitrap (UHPLC-LTQ-Orbitrap) (ROUX et al., 2015), eletroforese capilar acoplada ao espectrômetro de massas quadrupolo-*time of flight* (CE-QTOF) (ALBERICE et al., 2013), injeção/inserção direta no espectrômetro de massas quadrupolo-*time of flight* (GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2014) e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas quadrupolo-*time of flight* (GC-QTOF) (CAUCHI et al., 2016) e triplo quadrupolo (STRUCK-LEWICKA et al., 2015).

Ainda nesse contexto, BOUATRA et al. (2013) realizaram a caracterização abrangente e quantitativa do metaboloma da urina humana utilizando multiplataformas metabolômicas (RMN, GC-MS, DIMS/LC-MS/MS, HPLC-UV, HPLC-FD e ICP-MS), resultando na identificação de 2651 metabólitos que foram, consequentemente, atualizados na biblioteca livre *online Urine Metabolome Database* (UMDB). Esse quantitativo representa o maior número de metabólitos em urina identificados e quantificados.

Portanto, as informações apresentadas mostram a importância e viabilidade de utilização da urina como uma matriz biológica para busca de potenciais biomarcadores de doenças e distúrbios metabólicos, bem como a quantificação de moléculas-alvo a partir de abordagens metabolômicas.

1.6 Planejamento fatorial

Considerando as diversas etapas nos estudos metabolômicos, deve-se executar um procedimento adequado que vise obter um método aplicado à determinação de compostos em sistemas biológicos. O planejamento experimental é um dos métodos cruciais para a triagem das condições experimentais e o entendimento da relevância das variáveis envolvidas. A seleção das variáveis que podem afetar a resposta analítica, o esboço do experimento de modo que os efeitos das variáveis não controladas sejam minimizados, e a análise e tratamento estatísticos para separar e avaliar os efeitos das variáveis envolvidas consistem das etapas de um planejamento experimental (MILLER; MILLER, 2005).

Atualmente, o monitoramento de fatores que possam influenciar a resposta analítica tem sido mais realizado através de ferramentas quimiométricas multivariadas em substituição ao método univariado de otimização. Como o próprio nome do último sugere, nesse método, enquanto um nível de um fator é alterado, os demais níveis são mantidos constantes (NOVAES et al., 2017).

Ferramentas quimiométricas multivariadas possuem vantagens em relação ao método univariado por permitir a avaliação dos efeitos de interação entre os fatores estudados, a significância estatística dos fatores individuais e das interações entre si, bem como a realização de um menor número de experimentos (MONTGOMERY, 2012; NOVAES et al., 2017).

Dentre as várias ferramentas multivariadas, destaca-se o planejamento fatorial completo 2^k , um planejamento com k fatores em 2 níveis. Nesse planejamento fatorial 2^k , o modelo estatístico completo terá $2^k - 1$ efeitos, incluindo efeitos principais e interações entre fatores (MONTGOMERY, 2012).

As etapas para realização da análise estatística do planejamento fatorial completo 2^k consiste em (MONTGOMERY, 2012):

- i) Estimativa dos efeitos dos fatores – consiste em estimar os efeitos dos fatores e examinar seus sinais e magnitude, dando informações preliminares sobre quais fatores e interações podem ser importantes, e em quais direções esses fatores devem ser ajustados para melhorar as respostas;
- ii) Formação do modelo inicial – escolha do modelo completo para sua formação inicial; isto é, seleção de todos os efeitos principais e de interações dos fatores;
- iii) Realização de testes estatísticos – uso da análise de variância para testar a significância dos efeitos principais e de interação;

- iv) Refinação do modelo – consiste na remoção de qualquer variável ou fator não significativo do modelo completo;
- v) Análise dos resíduos – etapa comumente aplicada para verificar a adequação e suposições do modelo;
- vi) Interpretação dos resultados – etapa final do planejamento fatorial completo 2^k . Consiste da análise gráfica do resultado, geralmente através de gráficos de efeitos principais e de interação, ou com superfície de resposta e gráficos de contorno.

O uso de planejamento fatorial em metabolômica ainda é limitado quando comparado a outras áreas científicas, embora sua aplicação resulte não apenas na obtenção de dados de alta qualidade nas pesquisas ômicas, mas também na redução de custos de análise e tempo de experimentos (JACYNA; KORDALEWSKA; MARKUSZEWSKI, 2019).

Neste contexto, Danielsson et al. (2012) utilizaram planejamento fatorial em abordagem metabolômica para triagem e otimização do procedimento de derivação dos metabólitos presentes no plasma sanguíneo, e no desenvolvimento e otimização do método de análise por cromatografia a gás e espectrometria de massas (GC-MS). Deste modo, a influência dos parâmetros principais em metabolômica pode ser avaliada, obtendo-se condições adequadas para metoximação e sililação dos metabólitos (20 °C por 240 min; 100 °C por 170 min, respectivamente) e para as condições cromatográficas de análise (temperatura de injetor = 270 °C; tempo de ventilação da purga do injetor = 115 s; temperatura da fonte de íons = 250 °C; velocidade de aquisição de dados do MS = 20 Hz) (DANIELSSON et al., 2012).

Utilizando abordagem metabolômica *untargeted*, fatores como centrifugação, pH e tipos de solventes orgânicos foram avaliados por planejamento fatorial para extrair um maior número de metabólitos em urina. Como resultado, dos solventes orgânicos avaliados, a mistura de metanol/água foi a que proporcionou melhor extração de metabólitos em urina e que os fatores pH e centrifugação da amostra não influencia significativamente na cobertura do metaboloma urinário (JIYA et al., 2008).

Portanto, o planejamento fatorial mostra ser uma ferramenta estatística indispensável quando se deseja avaliar fatores que podem influenciar na resposta analítica de experimentos em metabolômica, principalmente por auxiliar na identificação de condições que podem levar a rendimentos experimentais insatisfatórios indesejáveis, bem como auxiliar na condução de um estudo com dados de alta qualidade em metabolômica.

1.7 Análise estatística dos dados em metabolômica

Após obtenção e pré-processamento dos dados experimentais, ferramentas estatísticas são aplicadas em estudos metabolômicos com a finalidade de encontrar características discriminatórias de metabólitos presentes em amostras sob diferentes condições fisiológicas. Análises estatísticas univariadas e multivariadas são as mais utilizadas em estudos metabolômicos para extrair informações biológicas relevantes do problema estudado (MISRA; VAN DER HOOFT, 2016).

As técnicas de análises univariadas são aplicadas em dados metabolômicos para determinar se os valores medidos para uma variável específica diferem significativamente entre os grupos de amostras. Dessa forma, as análises univariadas são aplicadas a uma variável (metabólito) de cada vez entre os grupos, assumindo que os metabólitos são independentes uns dos outros, concentrando-se apenas na média e na variância de uma única variável (SACCENTI et al., 2014).

Antes de aplicar testes univariados de análise, é necessário avaliar a normalidade dos dados metabolômicos, isto é, certificar se os dados seguem uma distribuição normal. Os testes usualmente utilizados são *Shapiro-Wilks* – quando se tem grupos pequenos de amostras – e *Lilliefors* (modificação do teste *Kolmogorov-Smirnov*) – quando se tem grupos maiores de amostras para ser analisados (HENDERSON, 2006; MASTRANGELO et al., 2015).

À medida que os dados seguem uma distribuição normal, os testes paramétricos como teste-*t* (comparação de 2 grupos de amostras) e ANOVA (comparação de mais de 2 grupos de amostras) são aplicados. Por outro lado, quando os dados não seguem uma distribuição normal, testes não-paramétricos são utilizados: *Mann-Whitney U* (comparação de 2 grupos de amostras) e *Kruskal-Wallis* (comparação de mais de 2 grupos de amostras) (MASTRANGELO et al., 2015) (Figura 1.6).

Figura 1.6 Breve representação sobre a utilização de testes estatísticos univariados.

FONTE: Adaptado de HENDERSON, 2006; MASTRANGELO et al., 2015

Em contrapartida, as técnicas de análises multivariadas são comumente aplicadas aos dados analíticos para interpretar grandes quantidades de dados, sendo utilizadas na discriminação da origem de determinado evento bem como na classificação de um problema conforme observadas suas respostas (MILLER; MILLER, 2005). Em estudos metabolômicos, as técnicas de análises multivariadas são ferramentas bastante úteis para correlacionar as alterações nos níveis dos metabólitos a vias biológicas complexas.

Dentre as técnicas de análises multivariadas, a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e a análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) são as mais comumente aplicadas em metabolômica (SACCENTI et al., 2014).

A análise de componentes principais (PCA) é método utilizado para projetar dados multivariados em um espaço de dimensão menor. Desse modo, a dimensionalidade original dos dados é reduzida sem afetar as relações existentes entre as amostras (FERREIRA, 2015).

É a primeira análise multivariada aplicada em metabolômica, em que os dados obtidos são dispostos em uma planilha onde as colunas representam os metabólitos identificados na amostra e suas respectivas áreas ou intensidades, e as linhas representam as amostras dos grupos controle e teste.

Após construção dos gráficos de PCA, e uma vez que um ou mais grupos tenham sido formados por agrupamento das amostras, é possível explicar diferença entre esses grupos em termos da problemática estudada, bem como obter interpretação física para os componentes principais (Figura 1.7).

Figura 1.7 Construção do gráfico de análise de componentes principais: disposição dos dados quantitativos em uma planilha (dados de alta dimensão) e redução da alta dimensão a componentes principais.

1000 metabólitos = 1000 dimensões

m/z	RT	Height
38.0	20.30	873.00
39.0	20.29	3831.00
41.0	33.44	18094.00
50.0	20.29	14948.00
51.0	20.29	75113.00
54.0	19.55	4858.00
55.0	33.44	32882.00
68.0	26.10	7870.00
77.0	20.29	347444.00
78.0	20.29	26163.00
81.1	33.44	17695.00
82.1	20.19	18731.00
83.1	33.44	25289.00
86.1	10.12	66094.00
89.0	33.44	4166.00
89.0	6.65	11390.00
95.1	19.55	49270.00
96.1	19.55	155207.00
98.0	9.03	25722.00
102.1	6.21	263166.00
104.1	20.29	30677.00

Redução de dimensão

FONTE: Autoria própria

Por outro lado, a análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA) é um método supervisionado de análise baseado no modelo dos quadrados mínimos parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*) que visa maximizar a variância entre as variáveis independentes da matriz **X** (medidas analítica; dados brutos de metabolômica) e a correspondente variável dependente **Y** (classes/grupos das amostras: doente vs controle não doente; portadores vs não portadores de condição genética, etc.) (GROMSKI et al., 2015).

O método PLS-DA, como o método da PCA, visa descrever um conjunto de variáveis medidas em um conjunto de amostras de um modo mais condensado. Porém, contrário ao método não supervisionado PCA, na PLS-DA informações adicionais entre as variáveis independentes (X) e as variáveis dependentes (Y) são incluídas na análise, o que realiza tanto predições de amostras em relação aos grupos previamente definidos como avalia se o conjunto

de dados adquiridos contém informação suficiente para discriminar as classificações existentes (SACCENTI et al., 2014; GROOTVELD, 2014) (Figura 1.8).

Figura 1.8 Construção do modelo de regressão PLS-DA para predições de amostras (X) em relação aos grupos definidos (Y).

FONTE: Adaptado de GROMSKI et al. (2015)

Em suma, temos que diferentes métodos estatísticos de análise podem ser aplicados aos dados obtidos através de estudos metabolômicos, e consistem em ferramentas estatísticas úteis para elucidação de biomarcadores relacionados a eventos metabólicos; e a combinação de métodos univariados e multivariados de análise em estudos metabolômicos fornece informações complementares na seleção de potenciais biomarcadores da condição biológica estudada.

1.8 Síndrome do *Cri Du Chat*

A síndrome do *Cri Du Chat* (CDC) (traduzida do francês como choro do gato) ou síndrome 5p- é uma condição genética causada pela deleção no braço pequeno (o braço p) do cromossomo 5 (Figura 1.9). Foi inicialmente descrita por Lejeune e colaboradores, em 1963, os quais descreveram um dismorfismo crânio-facial com uma peculiaridade fonética que lembra o choro do gato em nascidos vivos afetados pela síndrome (LEJEUNE et al., 1963). É classificada como uma condição genética rara por sua incidência ser de 1 a cada 20 000 ou 1 a cada 50 000 (1:20 000 ou 1:50 000) nascidos vivos (GENETICS HOME REFERENCE, 2019).

Figura 1.9 Representação do cariótipo humano e deleção do cromossomo 5 p.

FONTE: Adaptado de Brasil Escola. (Disponível em <https://brasilecola.uol.com.br/o-que-e/biologia/o-que-e-cariotipo.htm>).

Características clínicas como choro muito agudo que parece com o de um gato, deficiência intelectual e desenvolvimento tardio, anormalidades na região da cabeça como microcefalia, rosto redondo e hipertelorismo, o baixo peso ao nascer e o tônus muscular fraco (hipotonia) são frequentemente observadas em portadores da síndrome do *Cri Du Chat* e que auxiliam no diagnóstico. Todavia, métodos citogenéticos moleculares devem ser aplicados para o diagnóstico mais preciso da síndrome (MAINARDI et al., 2001; CORNISH; BRAMBLE, 2002).

Tratando-se de diagnóstico molecular, uma análise citogenética foi realizada para estudos de correlação de genótipo-fenótipo em 80 portadores da síndrome *Cri Du Chat*. Com isso, foi mostrado que o choro similar ao de um gato relatado em 7 crianças portadoras da síndrome do *Cri Du Chat* está correlacionado com a deleção específica na região 5p15.3 do cromossomo; já o dismorfismo, a microcefalia e o retardo mental estão correlacionados com a deleção na região 5p15.2 (MAINARDI et al., 2001).

Leite et al. (2018) estudaram os genes relacionados à síndrome *Cri Du Chat* para entender as funções biológicas e as vias afetadas pela deleção do cromossomo 5p e elaborar relações genóticas-fenóticas da referida síndrome. Através da ligação entre *network* e fenótipo foram identificadas funções que podem estar relacionadas aos sintomas clínicos comuns aos portadores do *Cri Du Chat*, e que também podem envolver proteínas codificadas

por outros cromossomos, como o cromossomo 1 e o cromossomo 2 – deleções com modificações fenotípicas e fisiopatológicas semelhantes às da síndrome CDC. Em adição, genes localizados no cromossomo 5p- foram correlacionados a funções do metabolismo, do ciclo celular, do desenvolvimento de tecidos e do sistema imune, levando os autores a sugerirem estudos ômicos para confirmar a hipótese levantada no referido trabalho (LEITE et al., 2018).

Em razão da restrição de diagnósticos exclusivamente genéticos e fenotípicos da síndrome do *Cri Du Chat*, outros métodos de análise devem ser investigados para que venham a ser adotados como auxiliares no diagnóstico e progressão da condição genética, bem como buscar entender as mudanças bioquímicas intrínsecas a determinadas translocações e deleções no gene e às suas respostas metabólicas, em nível molecular.

Pouco se sabe sobre as consequências metabólicas da deleção na região cromossômica 5p, porém, alguns estudos dessa natureza foram desenvolvidos, destacando-se o trabalho de Lejeune et al. (1990), os quais os autores encontraram um aumento relativo nos níveis dos aminoácidos asparagina e aspartato no plasma e na urina de portadores de *Cri Du Chat*, bem como altos níveis de histidina na urina, mas não no plasma. Dessa forma, relacionaram as altas quantidades de asparagina e aspartato com distúrbios no metabolismo de purinas, e o excesso urinário de histidina com distúrbios no catabolismo de aminoácidos (LEJEUNE et al., 1990).

Peeters et al. (1991) avaliaram a anormalidade no metabolismo de purinas em portadores de *Cri Du Chat*, correlacionando as causas e consequências dessa alteração metabólica com a deficiência mental característica nos portadores da síndrome. Sugeriram que a atividade de enzimas como *phosphoribosyl-amino-imidazole-succino-carboxamide synthetase*, *phosphoribosyl-amino-imidazole-carboxamide formyltransferase*, e ou *phosphoribosyl-adenylo-succinate-synthase* são reduzidas devido à deleção na região 5p14 – 5p15 do cromossomo, o que justificaria os níveis alterados de aminoácidos previamente descritos por Lejeune et al. (1990) e a alteração na via metabólica da síntese *de novo* de purina (PEETERS et al., 1991).

O perfil plasmático de aminoácidos e aminas biogênicas de não portadores e portadores da síndrome *Cri Du Chat* foi analisado por Furtado et al. (2017), através de abordagem metabolômica alvo, com o intuito de obter informações bioquímicas que correlacionassem a alteração metabólica com sintomas físicos e mentais característicos da síndrome. Foi mostrado que o aumento nos níveis de metabólitos no plasma de portadores de CDC, como metionina sulfóxido, aspartato, ácido glutâmico e serotonina podem causar alterações em vias metabólicas específicas, como estresse oxidativo, biossíntese de purinas, ciclo do ácido cítrico e biossíntese

serotoninérgica. Em contrapartida, a diminuição nos níveis de asparagina, citrulina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, ornitina, fenilalanina, treonina, triptofano, tirosina, valina e creatinina pode refletir a distúrbios no ciclo da ureia, no ciclo do ácido cítrico, na síntese de aminoácidos de cadeia ramificada, no metabolismo da tirosina e na biossíntese de aminoácidos (FURTADO et al., 2017).

Portanto, diante do exposto, tem-se que a combinação de informações genéticas e metabólicas pode ajudar no melhor entendimento das mudanças moleculares dinâmicas decorrentes dos diferenciados perfis genéticos dos indivíduos – como a deleção no cromossomo 5p, que resulta na síndrome do *Cri Du Chat*, com o perfil genético de não portadores da síndrome – bem como ampliar o conhecimento do funcionamento das diversas vias metabólicas que são alteradas devido a deleções cromossômicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações metabólicas em portadores da síndrome genética *Cri Du Chat* utilizando urina, através da abordagem metabolômica *fingerprinting* metabólico, por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

2.2 Objetivos específicos

- Determinar os metabólitos endógenos e exógenos diretamente em amostras de urina utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC-MS);
- Avaliar o melhor solvente para precipitação de proteínas e extração dos metabólitos presentes na urina;
- Adequar as condições de derivação da amostra de urina anterior à análise cromatográfica utilizando planejamento fatorial 2³;
- Obter os cromatogramas de íons totais (TIC) das amostras de urina após degradação da ureia pela enzima urease;
- Utilizar a abordagem metabolômica *fingerprinting* metabólico para avaliar possíveis alterações das vias metabólicas em portadores de *Cri Du Chat*, comparados com não portadores de síndrome.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Padrões e reagentes

Os padrões dos reagentes de derivação cloridrato de metoxiamina e MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. O cloridrato de metoxiamina foi preparado na concentração de 20 mg mL⁻¹ em piridina (Panreac). A urease foi adquirida da Sigma-Aldrich, e o padrão de n-alcanos (C7-C40) foi obtido da Supelco®, EUA. Os solventes utilizados para a desproteinização e extração dos metabólitos foram metanol (Panreac), acetonitrila (Panreac), isopropanol (Qhemis), acetona (Panreac) e acetato de etila (Synth).

3.2 Coleta das amostras de urina e estocagem

As amostras de urina dos portadores de *Cri Du Chat* (CDC) (ambos os gêneros, média de idade do grupo = 18,4 ± 5,6 anos) foram coletadas pelo Núcleo de Aconselhamento e Pesquisa Cri Du Chat (NPCDC) localizado no Estado de São Paulo, Brasil, e as amostras de urina dos controles não portadores (CTL) foram obtidas de voluntários de ambos os gêneros e com média de idade de 20,2 ± 6,9 anos. O diagnóstico de CDC foi realizado por cariotipagem de cromossomos ou por características clínicas.

As amostras foram aliquotadas e armazenadas em *freezers* em -20 °C, sem a adição de conservantes químicos, até o momento das análises. Os procedimentos de coleta e armazenamento foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (número: 1.242.771). As amostras de urina utilizadas nesse trabalho são referentes ao projeto intitulado: Uma abordagem bioanalítica envolvendo portadores de *Cri Du Chat* e a implementação de um sistema CE-TOF-MS/MS, de responsabilidade dos pesquisadores Dr. Danilo Santos Souza, Prof. Dr. Nilson Antônio de Assunção e Profa. Dra. Chong Ae Kim.

3.2 Avaliação do solvente de extração e derivação dos metabólitos em urina

Metanol, acetonitrila, isopropanol, acetona e acetato de etila foram avaliados como solventes de extração dos metabólitos presentes na urina. O procedimento de extração e derivação das amostras foi adaptado do proposto por Bouatra et al. (2013), em que uma alíquota de 800 µL de cada um dos solventes, separadamente, foi adicionada, a 200 µL de um *pool* de

urina (mistura de igual volume de cada amostra) coletada de voluntários não portadores de *Cri Du Chat* (3 mulheres e 4 homens – $27,3 \pm 2,81$ anos), agitada em vórtex por 30 s, mantida em temperatura de 4 °C por 20 min e centrifugada a 8000 rpm (aprox. 5333 G) por 8 min. Após a centrifugação, 200 µL do sobrenadante foi evaporado à secura usando fluxo de nitrogênio.

O resíduo da evaporação foi reconstituído em 50 µL da solução de cloridrato de metoxiamina em piridina, na concentração de 20 mg mL⁻¹, e mantido sob agitação mecânica por *shaker*, por 90 min, na temperatura de 37 °C. Após agitação, 50 µL de MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano) foram adicionados para derivação por mais 60 min de agitação e temperatura de 37 °C (LI et al., 2013).

O procedimento foi realizado em quadruplicata ($n = 4$) para cada solvente de extração avaliado, e as amostras foram injetadas imediatamente no cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas. O solvente que possibilitou a extração do maior número de metabólitos, com maiores intensidades e com alta reprodutibilidade entre as análises foi selecionado para uso nas etapas posteriores de preparado de amostra.

3.3 Condições cromatográficas de análise

As amostras derivadas foram analisadas utilizando-se um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas, série GCMS-QP2010 Ultra da Shimadzu, com auto injetor AOC-20i. Uma alíquota de 1 µL foi injetada em temperatura de 250 °C no modo *split* de 1:25. A coluna cromatográfica capilar utilizada foi a Rtx-5MS com 5% difenil-95% dimetilpolisiloxano (30 m × 250 µm d.i. × 0,25 µm de espessura do filme) da Restek. A temperatura inicial do forno foi de 80 °C mantida por 1 min, seguida pela rampa linear de 6 °C min⁻¹ até 290 °C, então mantida por 5 min. Hélio (99,999% pureza) foi usado como gás de arraste em uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. O espectrômetro de massas foi operado utilizando-se ionização por elétrons (70 eV), varredura no modo *scan* (30 – 600 m/z), temperatura da fonte de íons e da interface de 250 °C e 290 °C, respectivamente.

3.4 Adequação das condições de derivação

Após definição do melhor solvente de extração dos metabólitos em urina, a eficiência da reação de derivação com cloridrato de metoxiamina e MSTFA foi avaliada através de um planejamento fatorial completo 2³, com triplicata no ponto central, sendo a temperatura (°C), o

tempo de derivação (min) e o volume de urina (µL) os fatores (variáveis) investigados que influenciam na reação de derivação. O conceito de múltipla resposta (MR) foi adaptado de Da Costa et al. (2013) e empregado às intensidades dos metabólitos identificados nos 11 experimentos realizados, conforme Eq.1:

$$MR = \frac{I_{metabólito\ x}}{I_{máx.\ metabólito\ x}} + \dots + \frac{I_{metabólito\ n}}{I_{máx.\ metabólito\ n}} \quad (Eq.1)$$

Em que $I_{metabólito\ x}$, $I_{máx.\ metabólito\ n}$, $I_{máx.\ metabólito\ x}$, $I_{metabólito\ n}$ são as intensidades dos metabólitos x e n em uma dada condição experimental, e as intensidades máximas dos metabólitos x e n entre as diferentes condições experimentais, respectivamente. Os dados experimentais foram analisados utilizando-se o *software* Statistica 7.0 para determinação dos fatores (variáveis) significativos.

As condições experimentais de maior valor de múltipla resposta foram selecionadas para as etapas de derivação das amostras.

3.5 Experimentos para abordagem metabolômica *fingerprinting*

Após definidas as melhores condições para extração dos metabólitos e reações de derivação, 36 amostras de urina foram utilizadas no experimento de metabolômica, das quais 19 foram de portadores da síndrome *Cri Du Chat* (CDC) e 17 de controles não portadores (CTL). *Quality controls* (QCs) foram preparados pela mistura de volumes iguais das 36 amostras e foram injetados após cada 5 amostras analisadas, resultando em 7 QCs, com o objetivo de avaliar a variabilidade analítica e expressar o coeficiente de variação (CV) dos *features* entre as corridas cromatográficas.

Oitocentos microlitros de metanol (800 µL) foram adicionados a 200 µL das amostras de urina, e então submetida à agitação em vórtex por 30 s, mantida em temperatura de 4 °C por 20 min e centrifugada a 8000 rpm (aprox. 7200 G) por 8 min. Após a centrifugação, 200 µL do sobrenadante foi evaporado à secura usando fluxo de nitrogênio. O resíduo da evaporação foi então reconstituído em 25 µL de cloridrato de metoxiamina em piridina (20 mg mL⁻¹) e submetido a agitação de 300 rpm (aprox. 12 G), em *shaker*, por 60 min a 60 °C. Após metoxiamação, 25 µL de MSTFA com 1% de TMCS foram adicionados às amostras e submetidos agitação por mais 60 min, sob mesma velocidade, e em 60 °C. Depois das etapas de reação, as amostras derivadas foram resfriadas à temperatura ambiente (25 °C ± 1) e 10 µL

de hexadecano ($C_{16}H_{34}$) em hexano (100 mg L^{-1}) foram adicionados antes das análises cromatográficas como padrão interno (PI) para avaliar o desempenho da injeção automática.

As amostras derivadas foram analisadas por cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas conforme seção 3.3.

3.6 Pré-processamento dos dados e identificação de metabólitos

Os cromatogramas de íons totais (TIC) dos arquivos de dados gerados do GC-MS foram convertidos ao formato .mzXML utilizando-se o *software Real Analysis* (Shimadzu Co., Japão). Os arquivos convertidos foram processados usando eRah, um script do R, realizando desconvolução espectral (setDecPar (min.peak.width = 2, min.peak.height = 1000, noise.threshold = 500, avoid.processing.mz = c(32, 73:75, 147:149), alinhamento espectral (setAlPar (min.spectra.cor = 0.90, max.time.dist = 3, mz.range = 30:600), e recuperação de dados faltantes de 50 % entre os grupos das amostras (DOMINGO-ALMENARA et al., 2016).

As planilhas de dados foram obtidas no formato .csv, em que constam os tempos de retenção dos *features* de maior intensidade do íon m/z no espectro de massa. Os dados foram exportados ao Excel (Microsoft Office 2013®) para processamento dos dados.

Os metabólitos foram identificados por comparação dos fragmentos de massas dos compostos registrados nas bibliotecas do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e do *Golm Metabolome Database* (GMD) com 80% de similaridade entre os espectros, e com auxílio dos programas AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*) e *NIST Mass Spectral Search* (versão 2.0). Os parâmetros de pré-processamento de dados utilizando o *software* AMDIS foram adaptados conforme Mastrangelo et al. (2015), consistindo de desconvolução (*component width: 15; adjacent peak subtraction: two; resolution e sensitivity: high; shape requirements: low*) e identificação de *features* (*minimum match factor: 80; type of analysis: simple*).

Os índices de retenção com programação linear de temperatura (do inglês, *Linear Temperature Programmed Retention Indexes* – LTPRI) foram calculados conforme Eq. 2, obtidos a partir da injeção de um padrão de n-alcenos (C_7 - C_{40}).

$$\text{LTPRI} = 100n + 100 \frac{t_{R(i)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}} \quad \text{Eq. (2)}$$

Em que t_R corresponde ao tempo de retenção do pico, i corresponde ao analito, n ao número de carbonos do padrão de n -alcanos adjacente menos retido, e $n+1$ é ao número de carbonos do padrão de n -alcanos adjacente mais retido (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963).

Os valores de LTPRI foram comparados aos índices de retenção (IR) contidos na NIST e GMD para reforçar a identificação dos metabólitos, sendo permitido apenas 5% de variação entre eles.

3.7 Tratamento dos dados e análise estatística

Apenas picos cromatográficos verdadeiros (não relacionados a ruídos) e identificados putativamente pelas bibliotecas NIST e/ou GMD, cujas intensidades dos *features* dos metabólitos presentes em 100% das replicatas ($n = 4$) na etapa de avaliação do solvente de extração foram considerados. As intensidades dos metabólitos foram expressas como média e desvio padrão e os coeficientes de variação foram calculados. As medianas dos coeficientes de variação foram obtidas e os gráficos de *box plot* foram construídos com auxílio do *software* XLSTAT® 2013.

A matriz de dados com os metabólitos identificados e suas respectivas intensidades foram transformadas para a forma logarítmica na base 10 ($\log_{10}$) para reduzir a heterocedasticidade dos dados e detecção de *outliers* (FERREIRA, 2015), e os gráficos de análise dos componentes principais (PCA) e agrupamento hierárquico (HCA) foram construídos utilizando o *software* XLSTAT®.

Para os experimentos da abordagem metabolômica *fingerprinting*, as intensidades dos *features* foram normalizados pela intensidade do padrão interno hexadecano, e os *features* detectados em mais de 50% dos QCs e com $CV < 30\%$ foram selecionados e dispostos na matriz de dados. Os dados faltantes em cada grupo CDC e CTL foram preenchidos utilizando o método do K -vizinho mais próximo (KNN, do inglês *k-nearest neighbor*).

Após esse tratamento, os dados foram escalados utilizando o método de escalamento de Pareto, apropriado por reduzir a importância de picos mais intensos em relação aos menos intensos, os mais suscetíveis a ruídos (FERREIRA, 2015).

Posteriormente, a discriminação entre os grupos CDC e CLT foi avaliada pelos métodos não-supervisionado (PCA) e supervisionado (PLS-DA) de análise estatística multivariada, utilizando o *software* XLSTAT®. Para evitar erro de superajuste do modelo de PLS-DA, o método de validação cruzada *k-fold* (*5-fold cross-validation*) foi aplicado. *Features* com valores

de VIP (*Variable Importance Projection*) maiores ou iguais a 1,0 ($VIP \geq 1,0$) obtidos pela PLS-DA foram considerados significativos e responsáveis pela discriminação entre os grupos.

A normalidade de distribuição dos dados foi verificada utilizando os testes de *Shapiro-Wilk* e *Lillefors*. Teste estatístico univariado não-paramétrico *Mann-Whitney* foi realizado para obter os p-valores dos *features*, sendo considerados significativos os que possuem $p < 0,05$.

Em resumo, apenas *features* com $VIP \geq 1,0$ e $p\text{-valor} < 0,05$ foram considerados relevantes para a separação dos grupos CDC e CTL e foram finalmente identificados putativamente, conforme demonstrado na seção 3.6.

3.8 Análise das vias metabólicas

A análise das vias metabólicas (*metabolic pathways*) foi conduzida a partir dos metabólitos estatisticamente significativos (valor de $VIP \geq 1,0$ e $p\text{-valor} \leq 0,05$) e identificados putativamente com o auxílio do *software online MetaboAnalyst 3.0*, e as plataformas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e HMDB (*Human Metabolome Database*), os quais possibilitaram determinar as vias metabólicas em que os metabólitos alterados devido à condição biológica estudada estão envolvidos, correlacionando-os.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção do solvente para extração dos metabólitos

Algumas estratégias de análise vêm sendo realizadas com o objetivo de padronizar as metodologias em metabolômica, destacando o controle da variabilidade analítica provocada pelo preparo de amostra – que deve garantir que qualquer variação no sinal analítico seja devido às diferenças na condição biológica estudada, e não a erros sistemáticos – bem como a extração de um maior número de metabólitos com alta intensidade e boa reprodutibilidade (MUDIAM et al., 2013; MASTRANGELO et al., 2015). Desta forma, a seleção do melhor método de extração foi baseada nos critérios de: a) obtenção do maior número de metabólitos identificados pelas bibliotecas comerciais NIST e GMD; b) obtenção de sinais m/z em maiores intensidades dos metabólitos, avaliados através de análise multivariada de dados, e c) boa reprodutibilidade entre as medidas dos metabólitos.

Precipitação de proteínas foi o tipo de extração aplicado e diferentes solventes foram avaliados para atingir os critérios estabelecidos. O mecanismo baseia-se no fato de que proteínas em meio aquoso adotam uma estrutura que expõe regiões hidrofílicas para a solução aquosa circundante, permitindo assim a formação de uma camada de hidratação que protege as interações proteína-proteína; tem-se aí um ambiente comum no fluido biológico urina. A interrupção dessa camada de hidratação geralmente causa a precipitação da proteína, e um dos modos que isso ocorre é pela adição de solventes orgânicos ao meio (SCOPES, 1982).

O poder de solvatação da água em uma molécula hidrofílica carregada é reduzido conforme a concentração de solvente orgânico aumenta devido à redução da constante dielétrica do solvente. Deste modo, a interação proteína-proteína prevalece sobre o poder de solvatação da água, ocorrendo assim a precipitação das proteínas. Tem-se, ainda, que as principais causas de agregação estão comumente associadas às atrações eletrostáticas e às forças de van der Waals (SCOPES, 1982).

Assim sendo, no geral, 261 picos foram detectados por GC-MS, dentre os quais 20 a 105 foram identificados para os cinco solventes individualmente testados (acetona, acetonitrila, isopropanol, metanol e acetato de etila), com auxílio das bibliotecas NIST e GMD em similaridade maior que 80% entre os espectros, correspondendo a metabólitos de diferentes classes químicas que incluem ácidos carboxílicos, ácidos graxos, aminoácidos, carboidratos, fosfatos, polióis e compostos nitrogenados. Os perfis cromatográficos dos íons totais (TICs)

obtidos com os solventes avaliados para a extração de metabólitos em urina são mostrados na Figura 1.10.

Figura 1.10 Perfis cromatográficos dos diferentes solventes de extração dos metabólitos em urina: a) Acetona; b) Acetonitrila; c) Isopropanol; d) Metanol; e) Acetato de etila.

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software GCMS Postrun Analysis - Shimadzu*

Dentre os solventes utilizados, isopropanol e metanol foram os que obtiveram maior número de picos identificados, consistindo em 105 e 104 compostos, respectivamente. Utilizando-se acetona e acetonitrila como solventes de extração, 101 e 98 picos foram identificados, respectivamente. O menor número de picos identificados foi obtido utilizando-se acetato de etila (20 compostos) possivelmente devido à formação de um sistema bifásico, o que possibilitou a extração principalmente de ácidos carboxílicos e ácidos graxos.

O coeficiente de variação (CV) foi outro parâmetro avaliado na seleção do solvente mais apropriado para a extração dos metabólitos presentes nas amostras de urina. Uma vez empregado nos dados quantitativos, a precisão entre os experimentos é estimada, pois o coeficiente de variação fornece a variabilidade na repetição dos dados em relação à média (RIBANI et al., 2004).

Uma maneira de representação visual dos dados é realizada através da construção de um *box plot*, em que informações relacionadas à faixa de distribuição entre os dados (caracterizada pelos *whiskers*), a dispersão dos dados (caracterizada pelo comprimento do *box*) e à distribuição das observações (caracterizada pela posição da mediana e do *box*) são graficamente apresentadas (VANDEGINSTE et al., 1997). A Figura 1.11 mostra o *box plot* da distribuição

dos coeficientes de variação referentes às intensidades dos picos dos metabólitos identificados em urina extraídos por cinco solventes.

Figura 1.11 *Box plot dos coeficientes de variação das intensidades dos picos dos metabólitos presentes em urina extraídos por cinco diferentes solventes.*

FONTE: Autoria própria, utilizando *Microsoft Excel*.

Como pode ser observado, o valor médio do conjunto de dados (medianas) dos coeficientes de variação para os solventes metanol, isopropanol, acetonitrila, acetona e acetato de etila foram 5,98%, 10,65%, 21,90%, 5,94% e 10,55%, respectivamente. Considerando-se que dados quantitativos obtidos pela repetição de experimentos em uma mesma amostra devem ter um valor aceitável de 20% de dispersão representado como coeficiente de variação (CV) (SILVA; COLLINS, 2011), a acetona e o metanol foram os solventes que apresentaram menores medianas para o conjunto de metabólitos identificados. Em contrapartida, a acetona apresentou maior faixa de distribuição entre os coeficientes de variação em relação ao metanol, o que confere maior tendência em apresentar baixa reprodutibilidade na intensidade dos picos dos metabólitos entre as replicatas.

4.1.1 Análise multivariada dos dados

Análise de componentes principais (PCA) foi usada por possibilitar a visualização reduzida do número de picos cromatográficos referentes aos metabólitos identificados (redução

da dimensão), e visualizar a o efeito dos diferentes solventes no perfil metabólico de urina (MUDIAM et al., 2013).

As intensidades dos íons m/z de 108 metabólitos identificados pelas bibliotecas, incluindo estereoisômeros e múltiplos picos de carboidratos em suas formas metoxiaminadas e sililadas, foram transformadas em logaritmo na base 10 ($\log_{10}$) antes da análise de componentes principais. Assim, considerando-se as duas primeiras componentes principais PC1 e PC2, 88,07% da variância total dos dados foi explicada. A primeira componente (PC1) descreveu 77,60% da variância total, enquanto 10,47% da variância total dos dados foi descrita pela segunda componente (PC2), como mostrado pelo gráfico de *scores* e *loadings* (Figura 1.12.a-b).

Figura 1.12 (a) Gráfico de *scores* PC1 $\times$ PC2 e (b) gráfico de *loadings* PC1 $\times$ PC2: Efeito do solvente na extração de metabólitos em urina. (AcEt: acetato de etila; MET: metanol; ISO: isopropanol; ACE: acetona; ACN: acetonitrila).

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software* XLSTAT.

O gráfico de *scores* mostrou claramente a separação referente aos solventes utilizados para extração dos metabólitos da urina em dois grupos ao longo do eixo da PC1 (Figura 1.12.a). O grupo 1 foi formado pelas replicatas das amostras extraídas com acetato de etila e estão localizadas no eixo negativo da PC1, e o grupo 2 pelas replicatas das amostras extraídas com o metanol, acetonitrila, acetona e isopropanol, e foram agrupadas no eixo positivo da PC1.

Adicionalmente, foi observada a formação de quatros grupos ao longo do eixo da segunda componente principal (PC2); dois grupos são compostos pelas replicatas das amostras extraídas com acetonitrila e acetona, as quais foram agrupadas no eixo positivo, e mais dois outros grupos são correspondentes às replicatas das amostras extraídas com isopropanol e metanol, agrupadas no eixo negativo (Figura 1.12.a).

A interpretação dos dados multivariados é facilitada quando as correlações entre a componente principal (PC) e a variável são próximas de mais ou menos um ($\pm 1,0$), indicando associação positiva ou negativa entre a variável e a PC (FERREIRA, 2015). Desse modo, as variáveis (metabólitos) com maior importância e que mais contribuem para o agrupamento de uma dada componente principal foram as que apresentaram pesos em módulo maiores que 0,700 na matriz de *loadings* da PC1 e da PC2 (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Matriz dos *loadings* da análise de componentes principais: Efeito do solvente na extração de metabólitos em urina.

METABÓLITOS	PC1	PC2	METABÓLITOS	PC1	PC2
3-Aminoisobutírico (3TMS)	0,431	-0,897	Furanose 5 (Arabitol Xilitol/Ribitol)	0,970	0,242
Ácido Pirúvico (2TMS)	0,440	-0,045	Ácido cis-aconítico (3TMS)	1,000	0,001
Ácido Lático (2TMS)	0,982	0,085	Ácido Homovalínico (2TMS)	0,158	0,330
Ácido 2-Hidroxiisobutírico (2TMS)	0,999	0,017	Glicerol 3-fosfato (4TMS)	0,285	-0,617
Ácido Glicólico (2TMS)	0,999	0,009	Ácido Ribônico/Lixônico (5TMS)	0,998	0,036
Alanina (2TMS)	0,999	-0,003	Ácido Hipúrico (2TMS)	0,621	0,411
Ácido 2-Hidróxi-2-metilbutírico (2TMS)	0,999	0,013	Hipoxantina	0,996	0,074
Ácido Oxálico (2TMS)	0,275	-0,592	Ácido Cítrico (4TMS)	0,971	-0,123
p-Cresol (1TMS)	0,997	0,052	Ácido 3-(3-hidroxifenil)-3-hidroxipropiônico (3TMS)	0,991	0,067
Ácido 3-Hidroxiisobutírico (2TMS)	0,990	-0,076	3-Metilhistidina (2TMS)	0,989	-0,105
Ácido 2-Metil-3-hidroxibutírico (2TMS)	0,383	0,915	Ácido Quínico (5TMS)	0,996	-0,061
Ácido 3-Hidroxiisovalérico (2TMS)	0,973	0,016	Tirosina (2TMS)	0,998	0,055
Valina (2TMS)	0,992	0,061	Furanose 6 (Frutose/Sorbose)	0,999	-0,005
Ácido 2-Etilhidracrílico (2TMS)	0,999	0,029	Piranose 1 (Lactose/Maltose)	0,977	-0,142
Etanolamina	0,894	-0,362	Ácido 3-Indolacético (2TMS)	0,637	0,702
Ácido Fosfórico (3TMS)	0,578	-0,420	Piranose 2 (Glicose/Galactose/Manose)	0,999	0,023
Treonina	0,996	0,027	Lisina (4TMS)	0,651	-0,527
Glicina	0,998	0,025	Histidina (3TMS)	0,271	0,514
Ácido Succínico (2TMS)	0,999	0,019	Piranose 3 (Glicose/Galactose/Manose)	0,990	0,009
Ácido Metilsuccínico (2TMS)	0,654	-0,474	Furanose 7 (Sorbitol/Manitol)	0,999	0,017
Ácido Glicérico (3TMS)	0,983	-0,075	Ácido Glucurônico (MeOx, 5TMS)	0,987	-0,019
Uracil (2TMS)	0,993	0,051	Ácido Galacturônico (MeOx, 5TMS)	0,971	-0,067
Ácido Eritro-4-Deoxytetrônico (3TMS)	0,996	-0,085	Ácido Glucônico/Galactônico (6TMS)* ¹	0,590	-0,349

METABÓLITOS	PC1	PC2	METABÓLITOS	PC1	PC2
Ácido 5-hidroxihexanoico (2TMS)	0,432	-0,892	Ácido Glucônico/Galactônico (6TMS) ^{*2}	0,998	0,012
Ácido Treo-4-Deoxytetrônico (3TMS)	0,997	0,017	Ácido Pantotênico (3TMS)	0,884	-0,114
Serina (3TMS)	0,970	0,124	4-Hidróxi-3-metoxifenilglicol (3TMS)	0,998	0,042
Ácido treonico-1,4-lactona (2TMS)	0,261	-0,469	Ononitol (5TMS)	0,654	-0,456
Ácido Glutário (2TMS)	0,432	-0,890	Ácido Glucônico/Galactônico (6TMS) ^{*3}	0,995	-0,042
Ácido 3-Deoxitetrônico (3TMS)	1,000	0,005	Ácido Glucônico/Galactônico (6TMS) ^{*4}	0,995	-0,042
Ácido 2-Deoxitetrônico (3TMS)	0,964	0,142	Xantina (3TMS)	0,987	0,084
Ácido 3-aminoisobutírico (3TMS)	0,970	0,064	Ácido Hexadecanoico (1TMS)	0,396	0,287
Ácido Aminomalônico (3TS)	0,432	-0,895	Scyllo-Inositol (6TMS)	0,999	-0,045
Asparagina (-H ₂ O) (2TMS)	0,997	0,062	1H-Indol-2,5-diol (3TMS)	0,993	0,108
Ácido Adípico (2TMS)	0,998	-0,002	N-Acetil-D-Glucosamina (MeOx,4TMS)	1,000	-0,015
Treitol	0,992	0,087	Myo-Inositol (6TMS)	0,991	-0,108
Ácido Piroglutâmico (2TMS)	0,578	0,682	Ácido Úrico	0,998	0,005
Ribitol (4TMS)	0,991	0,084	Piranose 4 (Glicose/Galactose/Manose)	0,999	0,031
Ácido Treônico	0,999	0,008	Ácido 3-Hidroxihipúrico (3TMS)	0,998	0,058
Creatinina (3TMS)	0,980	-0,033	Piranose 5 (Glicose/Galactose/Manose)	1,000	0,015
Ácido 2-hidroxi-glutárico (3TMS)	1,000	-0,016	1-Metilguanina (2TMS)	0,997	0,173
Ácido α -Cetoglutárico (MeOx-2TMS)	0,986	0,078	Ácido 5-Hidroxiindolacético (2TMS)	0,961	0,163
Glicerol (3TMS)	0,999	0,032	Triptofano (3TMS)	0,380	0,919
L-Asparagina (2TMS)	0,376	0,090	Ácido Esteárico (1TMS)	0,339	0,514
Ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (3TMS)	0,047	0,965	2-O-Glicerol- α -D-galactopiranoside (6TMS)	1,000	0,008
Ácido 4-hidroxibenzoico (2TMS)	0,999	0,022	Pseudouridina (5TMS)	0,997	0,058
Fenilalanina (2TMS)	0,920	-0,059	Arabinofuranose	0,998	0,038

Continuação

METABÓLITOS	PC1	PC2	METABÓLITOS	PC1	PC2
Ácido 4-Hidroxibenzenoacético (2TMS)	0,463	-0,498	Furanose 8 (Galactitol/Dulcitol)	0,997	0,028
Furanose 1 (Xylose/Ribose/Arabinose)	0,998	0,037	Uridina (3TMS)	0,999	0,032
Ácido 2-deoxiribônico (4TMS)	0,987	-0,114	α -Gliceril palmitato (2TMS)	-0,406	-0,168
Furanose 2(Sorbose/Fructose)	0,999	0,029	Sucrose (8TMS)	1,000	0,002
3-Hidroxiindol (2TMS)	0,993	0,090	Cellobiose (MeOx, 8TMS)	0,999	-0,042
Levoglucozan	0,996	0,063	Sophorose (MeOx, 8TMS)	0,999	-0,014
Furanose 3 (Sorbose/Furtose)	0,992	0,087	Behenamida	-0,316	-0,927
Furanose 4 (Arabitol/Xilitol/Ribitol)	0,999	0,021	α -Gliceril esterárico (2TMS)	-0,465	-0,173

*estereoisômeros; número TMS = quantidade de grupos trimetilsil substituídos

FONTE: Autoria própria

Todas as variáveis de diferentes classes químicas e de maiores pesos foram altamente correlacionadas positivamente no eixo da PC1. Esse comportamento é um indicativo de que as amostras extraídas com metanol, isopropanol, acetona e acetonitrila apresentam as maiores intensidades dos íons de m/z referentes aos metabólitos identificados, uma vez que essas amostras foram agrupadas no eixo positivo da PC1 nos gráficos de *scores* e *loadings* (Figura 1.12.a-b).

A segunda componente principal destacou poucas variáveis de maior importância com pesos positivos e negativos. As variáveis com pesos positivos ácido 2-metil-3-hidroxi-3-metilglutárico, ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico, ácido 3-indoleacético e triptofano indicam que maiores intensidades dos picos são obtidas para esses compostos fazendo uso dos solventes acetonitrila e acetona. Entretanto, apesar das variáveis ácido 3-aminoisobutírico, ácido 5-hidroxi-hexanóico, ácido glutárico, ácido aminomalônico, e behenamida possuem pesos negativos, maiores intensidades dos seus picos são obtidas fazendo uso dos solventes isopropanol e metanol, uma vez que essas duas amostras foram agrupadas no eixo positivo da PC1 como mostrado no gráfico de *scores* da Figura 1.12.a.

Esse comportamento sugere a contribuição da natureza prótica do solvente utilizado para precipitação de proteínas e extração dos metabólitos da urina, como o isopropanol e o metanol. Pode-se inferir que na interrupção da interação proteína-água e posterior precipitação de proteínas, solventes próticos interagem mais facilmente com metabólitos polares por ligação de hidrogênio, contribuindo com o maior número de metabólitos com maior intensidade na fase orgânica líquida e sua menor oclusão na proteína precipitada.

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) foi aplicada aos dados transformados em logaritmos usando o método de Ward e aplicando a distância Euclidiana. Conforme mostra o dendrograma representado pela Figura 1.13, houve a formação de quatro grupos distintos.

Figura 1.13 Dendrograma para avaliação do efeito dos solventes de extração de metabólitos em urina. (AcEt: acetato de etila; MET: metanol; ISO: isopropanol; ACE: acetona; ACN: acetonitrila).

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software* XLSTAT

O primeiro grupo foi composto pelas replicatas das amostras de metanol e isopropanol, indicando a formação de apenas um grupo entre os diferentes solventes, não sendo bem definido no gráfico da PCA. Também, pode-se reforçar a contribuição do efeito de solventes orgânicos próticos na extração de metabólitos em maiores intensidades. Os grupos 2 e 3 são compostos pelas replicatas das amostras de acetonitrila e acetona, respectivamente, e o quarto grupo foi composto pelas amostras de acetato de etila, em que se mostraram bastante dissimilares aos outros grupos, como apresentados pela PCA.

Dessa forma, a análise multivariada dos dados permitiu a melhor visualização de distribuição da intensidade do pico dos metabólitos identificados e a influência dos solventes frente à extração.

4.2 Triagem das condições de derivação

A utilização da cromatografia a gás como ferramenta analítica aplicada em estudos metabolômicos requer uma etapa anterior de reação dos metabólitos denominada derivação,

uma vez que apenas compostos voláteis e termicamente estáveis podem ser analisados pela referida técnica cromatográfica (KANANI et al. 2008). Dessa forma, torna-se necessária a avaliação de parâmetros que afetam a reação dos metabólitos em um sistema biológico.

Com o objetivo de se obter um perfil metabólico abrangente e garantir a formação de metabólitos derivados estáveis e com alta intensidade dos fragmentos dos íons nos espectros de massas um planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata no ponto central foi realizado, o que resultou um total de 11 experimentos.

Nesse trabalho, a temperatura e o tempo de reação foram os fatores selecionados, uma vez que seus níveis avaliados podem influenciar nos equilíbrios termodinâmico e cinético de formação dos derivados, respectivamente, juntamente com o volume de urina utilizado para extração (solvente de extração:amostra) que pode ser um fator crítico para o aumento da sensibilidade na determinação dos metabólitos e melhora da precisão entre as medidas (KANANI et al., 2008).

A Tabela 1.2 apresenta a matriz de planejamento utilizada no estudo, em que os experimentos foram realizados de modo aleatório para evitar erros sistemáticos, e os pontos centrais foram utilizados para a estimativa do erro experimental do planejamento fatorial.

Tabela 1.2 Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com os valores reais das variáveis estudadas com três pontos centrais e múltipla resposta dos metabólitos.

Experimentos	Valores Reais/Valores Codificados			Múltipla Resposta (MR)
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Volume de urina (µL)	
1	37 / (-1)	60 / (-1)	200 / (-1)	20,52
2	37 / (-1)	60 / (-1)	400 / (+1)	37,21
3	37 / (-1)	120 / (+1)	200 / (-1)	18,87
4	37 / (-1)	120 / (+1)	400 / (+1)	37,32
5	60 / (+1)	60 / (-1)	200 / (-1)	19,47
6	60 / (+1)	60 / (-1)	400 / (+1)	38,73
7	60 / (+1)	120 / (+1)	200 / (-1)	19,13
8	60 / (+1)	120 / (+1)	400 / (+1)	44,97
9	48,5 / (0)	90 / (0)	300 / (0)	32,76
10	48,5 / (0)	90 / (0)	300 / (0)	28,95
11	48,5 / (0)	90 / (0)	300 / (0)	28,48

Fonte: Autoria própria

No geral, 47 metabólitos de diferentes classes químicas como ácidos orgânicos, fosfatos, carboidratos e aminoácidos foram identificados em todas as condições experimentais do planejamento fatorial e suas múltiplas respostas foram calculadas e utilizadas para verificar quais os fatores ou variáveis apresentavam efeitos significativos.

Entretanto, para se determinar quais variáveis e suas interações são significativas no intervalo de confiança de 95% ($p = 0,05$) e influenciam na resposta total dos experimentos, o gráfico de Pareto foi construído e está representado na Figura 1.14. A magnitude dos efeitos principais e das interações é representada pelas colunas dispostas na horizontal, enquanto a linha pontilhada posicionada vertical e ortogonalmente às colunas representa os efeitos e interações estatisticamente significativos no intervalo de confiança de 95% ($p = 0,05$).

Figura 1.14 Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2^3 com três pontos centrais para temperatura de derivação, tempo de derivação e volume de amostra.

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software* STATISTICA 7.0

A representação do gráfico de Pareto mostrou que o fator principal volume de urina foi significativo com $p < 0,05$, influenciando positivamente nas múltiplas respostas dos metabólitos derivados. Isto é, o aumento do volume de urina na etapa de extração, dentro do intervalo de níveis testado, proporcionou maiores valores nas múltiplas respostas (MR). Esse comportamento é esperado, uma vez que o uso de maiores volumes de urina proporciona o aumento da concentração dos metabólitos presentes, e esses metabólitos uma vez derivados, resulta tanto no aumento da altura dos seus picos cromatográficos quanto na intensidade dos íons fragmentos no espectro de massas.

Dentre os fatores principais testados, temperatura e tempo de reação não influenciaram significativamente nas múltiplas respostas, dentro do intervalo de níveis testado, todavia apresentaram tendência para os maiores níveis estudados (60 °C e 120 min, respectivamente). Os efeitos de interação entre os fatores (segunda e terceira ordem) também não foram significativos no intervalo de confiança de 95%. A estimativa da curvatura também não apresentou efeito significativo, indicando ausência de curvatura para o modelo linear.

Para avaliar se o modelo linear obtido pode ser usado para descrever o sistema de maneira adequada e assim estimar os seus efeitos, foi utilizada uma análise de variância (ANOVA). A Tabela 1.3 mostra os efeitos das interações, os coeficientes do modelo, o erro para cada coeficiente e os p -valores do planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata no ponto central.

Tabela 1.3 Estimativa dos efeitos e seus coeficientes para a múltipla resposta (MR).

Parâmetros	Efeitos	Coeficiente	Erro	t (3)	p
Média	29,53	29,53	0,83	35,58	0,001
Curvatura	1,07	0,54	1,59	0,34	0,768
(1) T (°C)	2,10	1,05	0,83	1,26	0,334
(2) t (min)	1,09	0,55	0,83	0,66	0,579
(3) V (µL)	20,06	10,03	0,83	12,09	0,007
1 by 2	1,86	0,93	0,83	1,12	0,379
1 by 3	2,49	1,25	0,83	1,50	0,272
2 by 3	2,09	1,04	0,83	1,26	0,336
1*2*3	1,21	0,60	0,83	0,73	0,543

FONTE: Autoria própria

O modelo linear apresentou resposta adequada para as variáveis selecionadas, com coeficiente de determinação igual a (r^2) de 0,987, e 98,7% da variabilidade total da múltipla resposta (MR). A magnitude dos erros indica que este modelo é significativo para um tratamento quantitativo (BARROS NETO et al., 2010).

Dessa forma, a Eq. 3 descreve como o efeito principal (volume de urina) influencia na múltipla resposta no intervalo de confiança de 95%.

$$MR = 29,53 + 10,03 [V(\mu L)] \quad \text{Eq. 3}$$

A análise de variância (ANOVA) pode ser usada para confirmar a magnitude desse efeito. A Tabela 1.4 mostra os valores da soma dos quadrados (SQ) usados para avaliar os efeitos principais de cada fator; os F-valores, que corresponde a razão das respectivas médias quadráticas (MQ) dos efeitos e a média quadrática do erro puro; e os p -valores, que indicam quando o efeito de cada fator é estatisticamente significativo ($p > 0,05$) (ARAMBARRI; GARCIA; MILLÁN, 2000).

Tabela 1.4 Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central.

Parâmetros	SQ	GL	MQ	F	p
Curvatura	0,63	1	0,63	0,11	0,768
(1) T (°C)	8,78	1	8,78	1,59	0,334
(2) t (min)	2,38	1	2,38	0,43	0,579
(3) V (μL)	804,8	1	804,8	146,1	0,007
1 by 2	6,92	1	6,92	1,26	0,379
1 by 3	12,4	1	12,4	2,25	0,272
2 by 3	8,69	1	8,69	1,58	0,336
1*2*3	2,90	1	2,90	0,53	0,543
Falta de ajuste	0,63	1	0,63	0,11	0,800
Erro Puro	11,02	2	5,51		
Somatório Total	859,2	11			

SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; MQ = média dos quadrados; F = F-valor; p = p -valor.

FONTE: Autoria própria

Baseado nos p -valores apresentados na Tabela 1.4, infere-se que o volume de urina utilizado na derivação é o único efeito estatisticamente significativo. Ademais, o p -valor para a falta de ajuste na tabela da ANOVA foi maior que 0,05, mostrando que o modelo é adequado a um nível de confiança de 95%.

O modelo também foi avaliado através da correlação dos valores preditos com os valores observados da múltipla resposta, e obteve-se coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,987 (Figura 1.15). Esse resultado mostra que os valores experimentais se correlacionam satisfatoriamente aos valores preditos pelo modelo (COELHO et al., 2019).

Figura 1.15 Gráfico de correlação entre valores preditos e observados da múltipla resposta (MR).

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software* STATISTICA 7.0

Após análise simultânea dos resultados, observou-se que o experimento 8 foi o que obteve a melhor múltipla resposta de todas as outras condições para derivação da amostra (MR = 44,97), tendo todos os fatores localizados no maior nível experimental: temperatura de metoximação e sililação de 60 °C, o tempo de derivação de 120 min e o volume de urina de 400 µL.

Embora a condição experimental que obteve maior valor de múltipla resposta esteja localizada em maiores níveis (120 min e 60 °C) e isso proporcione maior tempo de reação e empregue maior energia devido ao uso de temperaturas mais altas, há de se considerar que dentre os 47 metabólitos identificados e comuns entre as condições experimentais, o experimento 8 listou 33 de maior intensidade entre as outras condições experimentais. Isto é, com essa condição obteve-se o maior número de metabólitos derivados estáveis e de alta intensidade, fatos que justificam a escolha desses níveis no presente trabalho.

Sendo o volume de urina o único fator significativo no planejamento fatorial 2^3 em que maiores múltiplas respostas foram obtidas com o aumento da quantidade de urina, sugere-se que existe um excesso dos reagentes de derivação, o que permitiu maior capacidade de metoximação e sililação dos metabólitos.

Em reações de derivação é recomendado que exista excesso do derivante, o que garante a completa conversão dos compostos em derivados metoxiaminados e sililados (KANANI et al., 2008). Todavia, a adição de grandes volumes dos derivantes pode causar tanto a diluição dos metabólitos presentes nas amostras, o que ocasiona a diminuição da intensidade dos picos cromatográficos, quanto o aumento do custo da análise devido ao uso desnecessário de grandes quantidades dos reagentes.

No entanto, os volumes de amostra de urina e dos reagentes de derivação foram reduzidos nas mesmas proporções (200 µL urina, 25 µL de cloridrato de metoxiamina e 25 µL de N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorosilano) e adotados para serem utilizados na abordagem metabolômica aqui descrita, atendendo à melhor condição definida pelo planejamento fatorial e reduzindo o custo das medidas pelo uso de menores quantidades de reagentes.

4.3 Avaliação do tratamento da amostra com urease

Após definição das quantidades dos reagentes utilizadas nas reações de derivação, um volume de urease correspondente à concentração final de 200 U mL⁻¹ foi adicionado às amostras e posteriormente incubadas para remover o excesso de ureia presente na urina, uma vez que a elevada intensidade do sinal analítico referente a esse metabólito pode impedir a identificação de metabólitos presentes na urina em baixa concentração.

Para avaliar o efeito do tratamento com urease, os perfis cromatográficos do *pool* de urina antes (UN) e após tratamento (UT) foram comparados (Figura 1.17).

Figura 1.16 Cromatogramas de íons totais (TIC) do *pool* de amostras de urina sem tratamento (UN) e após tratamento com urease (UT).

FONTE: Autoria própria, utilizando o software GCMS *Postrun Analysis* – Shimadzu.

Como esperado, com a adição de urease ocorreu a depleção do sinal da ureia presente em alta concentração na urina (tempo de retenção = 9,0 – 10,5 min) e possibilitou verificar alguns picos cromatográficos em baixa intensidade anteriormente sobrepostos no tempo de retenção entre 7,5 a 8,5 min em UN.

Não foram observadas muitas diferenças nas intensidades e quantidade dos picos dos metabólitos entre os cromatogramas das amostras UN e UT, apenas o desaparecimento de um composto não identificado em aproximadamente 28,3 min e aumento da intensidade na região entre 32,0 a 33,5 min referentes a compostos oriundos da urease. Desse modo, sugere-se que o tratamento com urease não afeta negativamente a cobertura do metaboloma urinário, e que não compromete o estudo para a abordagem metabolômica.

4.4 Abordagem metabolômica *fingerprinting* da urina de portadores e não portadores de *Cri Du Chat*

Após a triagem das metodologias de extração de metabólitos/precipitação de proteína e derivação das amostras de urina, a abordagem metabolômica *fingerprinting* metabólico foi aplicada para obter uma visão abrangente das alterações bioquímicas decorrentes da perda de material genético no cromossomo 5p, característica da condição genética *Cri Du Chat*, em comparação à urina dos não portadores da síndrome.

Após etapa de pré-processamento dos dados (desconvolução, alinhamento e imputação de *missing values*) e geração da matriz, os dados foram normalizados pelo padrão interno,

transformados logaritmicamente ($\log_{10}$) e escalados por Pareto, antes de serem submetidos às técnicas de análises multivariadas.

Inicialmente, a análise de componentes principais (PCA) foi aplicada a todas as amostras, incluindo os QCs (*quality controls*), para avaliar uma possível separação entre as duas classes (CDC e CTL) e adequado agrupamento dos QCs, o que nos dá informação sobre a reprodutibilidade analítica, uma vez que *quality controls* são as mesmas amostras injetadas periodicamente ao longo da análise (Figura 1.18).

Figura 1.17 Gráfico de escores da análise de componentes principais (PCA) do *fingerprinting* metabólico da urina de portadores de *Cri Du Chat* (CDC) e controles/não portadores (CTL) após normalização pelo padrão interno e transformação logarítmica na base 10: pontos em vermelho são referentes aos *quality controls* (QCs).

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software* XLSTAT.

Como pode ser observado, não houve separação efetiva entre os grupos CDC e CTL usando o método não supervisionado PCA. A variância explicada total para duas primeiras componentes (PC1 e PC2) foi de 54,3%, sendo 48,3% da variância total explicada pela primeira componente (PC1) e 6,0% da variância total explicada pela segunda componente (PC2). Em contrapartida, observou-se uma tendência ao agrupamento dos QCs, o que sugere reprodutibilidade e bom desempenho do sistema cromatográfico para análise do metaboloma da urina de portadores de portadores e não portadores da síndrome *Cri Du Chat*.

O método supervisionado de regressão baseado na análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*) foi usado para modelar as diferenças entre os metabólitos responsáveis pela separação dos grupos não portadores e portadores de *Cri Du Chat*. A Figura 1.19 mostra a separação efetiva entre os dois grupos quando o modelo PLS-DA foi aplicado, sugerindo alteração bioquímica entre portadores e não portadores da síndrome.

Figura 1.18 Gráfico de scores da PLS-DA indicando efetiva discriminação entre os grupos portadores de *Cri Du Chat* (CDC) e não portadores de *Cri Du Chat* (CTL).

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software* XLSTAT.

O ajuste do modelo foi verificado pelos valores de variância explicada, R^2 , e variância predita, Q^2 . Conforme Lundstedt et al. (1998), os valores de R^2 e Q^2 dependem do tipo de amostra analisada e, para amostras biológicas, $R^2 > 0,7$ e $Q^2 > 0,4$ são aceitáveis (LUNDSTEDT et al., 1998). Os valores acumulados do modelo PLS-DA com 2 variáveis latentes das variâncias explicadas foram $R^2X = 0,518$ e $R^2Y = 0,837$, e para variância predita $Q^2Y = 0,714$, o que mostra o adequado ajuste dos dados ao modelo.

Entretanto, os dados metabolômicos podem sofrer superajustes (*overfitting*) pelo modelo supervisionado PLS-DA, fazendo com que a separação entre as classes seja referente apenas à ruído e não às variações biológicas entre os grupos de indivíduos. Este problema é

frequentemente relacionado a dados multivariados ou de altas dimensões, em que o número de variáveis é muito maior que número de amostras (WESTERHUIS et al., 2010).

Sendo assim, o modelo PLS-DA foi validado utilizando o método de validação cruzada *k-fold* (*5-fold cross-validation*), em que o conjunto total de amostras foi dividida em 5 grupos de validação e de teste, e o modelo foi predito por repetição até que todas as amostras estivessem no grupo de teste apenas uma vez (WESTERHUIS et al., 2008). Com esse modelo, 80,7% ($\pm 12,3\%$) das amostras foram preditas corretamente, sugerindo a ausência de *overfitting* do modelo supervisionado.

Os *features* com pesos de VIP (do inglês, *Variable Importance in Projection*) maiores ou iguais 1,0 foram selecionados e classificados como os responsáveis pela separação e discriminação dos dois grupos formados no gráfico de PLS-DA e, baseado nesse critério, um total de 100 *features* apresentaram pesos de $VIP \geq 1,0$. Após a seleção dos *features*, a matriz de dados foi submetida à análise estatística univariada que, em conjunto com pesos de VIP, reforçaria na seleção e identificação de metabólitos de diversas classes químicas envolvidos na alteração de vias biológicas devido à síndrome do *Cri Du Chat*.

Anterior à análise estatística univariada, a normalidade dos dados foi avaliada utilizando os testes para normalidade de dados *Shapiro-Wilk* e *Lilliefors* em que, normalmente, duas hipóteses são geradas:

H₀: A variável da qual a amostra foi extraída segue uma distribuição normal ($\alpha > 0,05$);

H_a: A variável da qual a amostra foi extraída não segue uma distribuição normal ($\alpha < 0,05$).

A Tabela 1.5 mostra os *p*-valores obtidos utilizando os dois testes de normalidade dos dados.

Tabela 1.5 Testes de normalidade dos dados pertencentes aos grupos CDC e CTL.

Grupo/Teste	Shapiro-Wilk	Lilliefors
CDC	< 0,0001	< 0,0001
CLT	< 0,0001	< 0,0001

FONTE: Autoria própria

Como o p -valor computado foi menor que o nível de significância $\alpha = 0,05$, deve-se rejeitar a hipótese nula H_0 e considerar a hipótese alternativa H_a . Desse modo, o teste estatístico univariado não-paramétrico *Mann-Whitney U* foi aplicado.

Por conseguinte, 26 *features* apresentaram pesos de $VIP \geq 1,0$ e p -valores $\leq 0,05$, dentre os quais 15 foram identificados putativamente, por comparação entre os espectros de massas disponíveis nas duas bibliotecas, NIST e GMD, conforme mostra a Tabela 1.6.

Padrões de n-alcanos C_7 a C_{40} foram injetados para calcular o índice de retenção dos compostos identificados, o que resultou apenas na detecção de n-alcanos a partir de C_{10} até C_{32} com o método cromatográfico utilizado. Padrões C_4 a C_9 não foram detectados devido à temperatura inicial da coluna cromatográfica ser alta suficiente para registrar n-alcanos inferiores e, também devido à aquisição dos dados iniciar a partir de 4,0 min.

A partir dos metabólitos identificados pelas bibliotecas, os valores LTPRI calculados utilizando a Eq. (2) foram comparados aos IR contidos na NIST e na GMD, e os metabólitos com erros menores que 5% entre os índices de retenção foram considerados putativamente identificados e anotados na Tabela 1.6.

Tabela 1.6 Metabólitos identificados putativamente, em suas formas trimetilsililadas e/ou metoximadas, responsáveis pela discriminação entre os grupos CDC e CTL: íons m/z em negrito correspondem ao pico base; t_R (min) é o tempo de retenção do metabólito; $LTPRI_{(calc.)}$ e $LTPRI_{(lit.)}$ são as siglas em inglês para índice de retenção com programação linear de temperatura (*Linear Temperature Programmed Retention Indexes*) calculado e da literatura, respectivamente; $VIP \geq 1,0$, p -valores $\leq 0,05$, % *fold change* e coeficientes de variação baseados em *quality control* (%CV-QC)

Metabólito	Código HMDB	m/z	t_R (min)	LTPRI (calc.)	LTPRI (lit.)	% Erro LTPRI	VIP	p -valor	% <i>fold change</i>	%CV-QC
Fenol	HMDB0000228	151 , 166, 95	5,55	1059	1055	0,38	1,2	0,009	74,9	9,0
Ácido Lático	HMDB0000190	117 , 191, 45	5,67	1066	1061	0,46	1,2	0,017	53,6	27,5
p-Cresol	HMDB0001858	165 , 180, 91	7,41	1158	1154	0,33	1,6	0,000	62,0	6,2
Ácido 5-hidroxihexanóico	HMDB0000525	117 , 171, 204	11,79	1368	1366	0,14	1,3	0,003	62,6	7,7
Ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico	HMDB0000355	247 , 199, 231	16,87	1623	1618	0,28	1,1	0,017	33,7	9,1
Ácido 4-hidroxibenzóico	HMDB0000500	267 , 223, 193	17,22	1642	1637	0,28	1,1	0,009	48,9	10,0
Ácido 4-hidroxifenilacético	HMDB0000020	179 , 252, 164	17,46	1654	1650	0,26	1,1	0,021	55,5	7,9
Furoilglicina	HMDB0000439	95 , 226, 169	17,83	1675	1664	0,63	1,9	0,011	-81,0	6,1
Ácido 3-hidroxihexanodióico	HMDB0000345	129 , 247, 363	18,36	1703	1699	0,24	1,0	0,034	35,9	8,1
5-hidroxiindol	HMDB0059805	277 , 262, 163	18,84	1730	1726	0,25	1,2	0,007	59,4	21,3
Levoglucosan	HMDB0000640	204 , 217, 189	18,92	1735	1701	1,94	1,4	0,024	-402	7,5
Glicerol-3-fosfato	HMDB0000126	299 , 357, 315	19,99	1795	1780	0,83	2,0	0,006	-87,4	10,3
Glicose	HMDB0000122	217 , 129, 204	22,32	1876	1880	-0,21	1,4	0,005	74,2	6,2
Sedoheptulose	HMDB0003219	319 , 205, 217	25,88	2165	2123	1,94	1,0	0,039	36,0	9,5
Maltose	HMDB0000163	204 , 191, 217	34,34	2819	2745	2,61	1,1	0,023	69,6	19,2

FONTE: Autoria própria.

Dentre os metabólitos alterados significativamente, seis ácidos carboxílicos foram aumentados (*fold changes* 33,7% – 74,2%; $p \leq 0,034$). Metabólitos como furoilglicina, levoglucosan e glicerol-3-fosfato apresentaram diminuição nas amostras de urina de portadores de CDC (furoilglicina: *fold change* = –81,0%, $p = 0,011$; levoglucosan: *fold change* = –402,1%, $p = 0,024$; ácido glicerol-3-fosfato: *fold change* = –87,4%, $p = 0,006$). Alterações significativas foram também observadas em carboidratos.

A Figura 1.20 mostra os *boxes plots* das intensidades normalizadas dos metabólitos alterados significativamente entre os grupos CDC e CTL, com seus respectivos p -valores, corroborando aos dados de *fold changes*, em que apenas furoilglicina, levoglucosan e glicerol-3-fosfato apresentaram aumento nos grupos CTL.

Figura 1. 19 *Box plots* da variação das intensidades normalizadas dos metabólitos em urina de portadores de *Cri Du Chat* (CDC) e dos controles (CTL) com seus respectivos *p*-valores: + representa a média aritmética do conjunto de dados; ○ representa *outlier*.

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software* XLSTAT.

Após o uso das estratégias metabolômicas na abordagem *fingerprinting* metabólico, a visualização das conexões bioquímicas dos 15 metabólitos identificados e alterados significativamente foram submetidos à análise de vias metabólicas (*Pathway Analysis*) utilizando o *software online Metaboanalyst 4.0* (disponível em: <https://www.metaboanalyst.ca>). Para aumentar a especificidade dos resultados das vias metabólicas, o organismo selecionado no banco de dados da KEGG foi o *Homo sapiens*.

O gráfico de impacto representado pela Figura 1.20 mostra que os 15 metabólitos alterados devido a condição genética estão envolvidos em 12 vias metabólicas que consistem no metabolismo do amido e sacarose, metabolismo da fenilalanina, metabolismo da tirosina, glicólise/gliconeogênese, via das pentoses-fosfato, metabolismo glicerolípídico, metabolismo do piruvato, metabolismo do propanoato, biossíntese da ubiquinona e outros terpenoide-quinonas, metabolismo dos glicerofosfolipídios, metabolismo da galactose e metabolismo de amino-açúcares e nucleotídeos. Porém, apenas quatro vias metabólicas obtiveram p -valor $\leq 0,05$, considerando dois metabólitos por cada via, sendo elas: glicólise/gliconeogênese ($p = 0,007$), metabolismo da fenilalanina ($p = 0,014$), metabolismo do amido e sacarose ($p = 0,017$) e o metabolismo da tirosina ($p = 0,038$).

Figura 1.20

Gráfico de impacto das vias metabólicas identificadas a partir da alteração significativa dos 15 metabólitos entre os grupos de portadores e não portadores de *Cri Du Chat*. Círculos de cor laranja representam maiores impactos nos metabolismos mencionados ($p \leq 0,05$). Apenas as 4 vias metabólicas com $p \leq 0,05$ foram destacadas.

FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma online *Metaboanalyst* 4.0 (disponível em: <https://www.metaboanalyst.ca>).

Das quatro vias metabólicas alteradas significativamente, apenas seis metabólitos foram responsáveis pela alteração no metabolismo de portadores e não portadores da síndrome *Cri Du Chat*, sendo eles a glicose e o ácido láctico, envolvidos na via da glicólise/gliconeogênese; os ácidos 4-hidroxibenzoico e 4-hidroxifenilacético, envolvidos no metabolismo da fenilalanina; a maltose e a glicose, envolvidas no metabolismo do amido e sacarose; o fenol e o ácido 4-hidroxifenilacético, envolvidos no metabolismo da tirosina. A Figura 1.21 mostra o envolvimento dos metabólitos mencionados e suas respectivas reações bioquímicas dentro das vias metabólicas alteradas em portadores e não portadores da síndrome.

Figura 1.21 Reações das vias metabólicas alteradas nas amostras de urina de portadores e não portadores de *Cri Du Chat*. Quadrados em azul são referentes aos metabólitos envolvidos nas vias bioquímicas. Quadrados em vermelho são referentes aos metabólitos significativamente alterados devido à síndrome.

FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma *online Metaboanalyst* 4.0 (disponível em: <https://www.metaboanalyst.ca>).

Dentre as vias metabólicas alteradas devido à condição genética CDC destacam-se o metabolismo da tirosina e o metabolismo da fenilalanina, uma vez que são rotas bioquímicas para a síntese de neurotransmissores de monoaminas (dopamina e serotonina, respectivamente). Sendo assim, o metabolismo alterado de neurotransmissores de monoaminas pode estar relacionado à ocorrência de sintomas neurodegenerativos e neuropsicológicos, como mudanças na atividade motora e no humor, déficit de atenção e hiperatividade (KOBAYASHI, 2001). A abordagem metabolômica indicou aumento estatisticamente significativo na intensidade dos metabólitos envolvidos no metabolismo da tirosina (fenol, 74,9%; ácido 4-hidroxifenilacético, 55,5%) e no metabolismo da fenilalanina (ácido 4-hidroxibenzoico, 48,9%; ácido 4-hidroxifenilacético, 55,5%).

O ácido 4-hidroxifenilacético pode ser formado endogenamente a partir da tiramina, sintetizado via ação da enzima monoamina oxidase (MAO), no fígado (KOBAYASHI, 2001). Entretanto, há que considerar sua formação exógena pelas bactérias do trato gastrointestinal a partir da má absorção do aminoácido tirosina. Um válido argumento para essa última afirmativa é pelo aumento significativo dos níveis de fenol na urina de portadores de *Cri Du Chat*, um metabólito oriundo da degradação do aminoácido tirosina não absorvido pelo organismo e sintetizado via ação enzima tirosina fenol-liase (HMDB, EC:4.1.99.2) (Figura 1.22).

Figura 1.22 Reação enzimática de conversão do aminoácido tirosina a fenol.

FONTE: Adaptado do KEGG (Reaction: R 00728). (Disponível em: <https://www.genome.jp/kegg/>).

Não foi observada diferença significativa nos níveis do aminoácido tirosina na urina dos dois grupos estudados ($p = 0,608$). Entretanto, conforme Furtado et al. (2017), baixas

concentrações do aminoácido tirosina foram encontradas no plasma de portadores de CDC quando comparado ao plasma dos controles (CTL), e inferiram que a baixa concentração do aminoácido pode prejudicar a produção de catecolaminas como adrenalina, noradrenalina e dopamina (FURTADO et al., 2017).

Assim, relacionando o baixo nível de tirosina no plasma de portadores de CDC, conforme relatado por Furtado et al. (2017), e o aumento significativo nos níveis de fenol e ácido 4-hidroxifenilacético encontrados na urina dos portadores de CDC quando comparados aos não portadores, pode-se inferir que o metabolismo da tirosina é alterado devido à biodisponibilidade de absorção e conversão do aminoácido no trato intestinal, e que a enzima tirosina fenol-liase metaboliza-o preferencialmente a fenol e a ácido 4-hidroxifenilacético, prejudicando a síntese de neurotransmissores de monoaminas como a dopamina.

A ocorrência de níveis elevados do ácido 4-hidroxibenzoico na urina de portadores de CDC mostra alteração no metabolismo da fenilalanina. Ainda conforme Furtado et al (2017), a baixa concentração de fenilalanina no plasma pode justificar a baixa concentração de tirosina no plasma de portadores de CDC, uma vez a fenilalanina é convertida pela ação da enzima fenilalanina hidroxilase (BLAU et al., 2010). Sendo assim, as baixas concentrações dos referidos aminoácidos podem ser a consequência da formação preferencial dos metabólitos ácido 4-hidroxifenilacético e ácido 4-hidroxibenzoico encontrados em altos níveis na urina dos portadores de CDC, o que prejudica a biossíntese de neurotransmissores.

A gliconeogênese é um importante processo regulatório que ocorre no fígado e nos rins, pelo qual não-carboidratos como, por exemplo, lactato, piruvato e aminoácidos são convertidos à glicose, fornecendo-a quando a ingestão dietética é insuficiente ou ausente (BHAGAVAN; HA, 2015; ENGELKING, 2015). Neste trabalho, elevados níveis de ácido láctico e glicose foram encontrados na urina de portadores de CDC quando comparada à urina de não portadores da síndrome. Uma vez que a produção de glicose é um processo contínuo, os altos níveis encontrados podem ser resultados da reação bioquímica em que o ácido láctico é convertido a alanina e então levado para o fígado. A alanina no fígado, por sua vez, é convertida de volta a ácido láctico e sintetizada em glicose pelo processo da gliconeogênese (KOMODA; MATSUNAGA, 2015).

Uma vez que o cérebro, tecidos nervosos e músculos são as partes que mais consomem glicose como substrato energético (ENGELKING, 2015), a alteração nos níveis de ácido láctico e da glicose mostra que a gliconeogênese é um processo contínuo importante para a demanda energética e funcionamento de órgãos e tecidos dos portadores de *Cri Du Chat*.

A alteração no metabolismo do amido e sacarose pode estar relacionada à ingestão de alimentos e degradação de compostos de elevada massa molecular, como os carboidratos polissacarídeos, a unidades menores de açúcares. O amido é a principal fonte de carboidrato presente em alimentos e que fazem parte da dieta humana. Composto por duas unidades de polímeros de glicose denominadas amilose e amilopectina, é consumido por humanos através de diversos alimentos que têm o amido em sua composição (NELSON;COX, 2002).

Após sua ingestão, o amido é absorvido predominantemente no intestino delgado, o qual será usado como substrato por enzimas digestivas que o degradarão a unidades menores de dissacarídeos e/ou oligossacarídeos, bem como a moléculas de glicose (Figura 1.23), que por sua vez é usada para produção de energia (KOMODA;MATSUNAGA, 2015).

Figura 1.23 Modelo de degradação de amido para formação de glicose no organismo pelo metabolismo do amido e sacarose.

FONTE: Adaptado de KOMODA; MATSUNAGA (2015).

Os altos níveis de maltose e glicose na urina de portadores de *Cri Du Chat* em relação aos não portadores são indicativos da contribuição de processos exógenos devido ao hábito alimentar natural dos indivíduos, bem como a atividade de bactérias que atuam no trato

intestinal degradando as estruturas poliméricas do amido absorvido a moléculas de glicose, sendo estas últimas transportadas para urina e eliminadas.

5 CONCLUSÕES

Neste capítulo, adequações e escolhas das melhores variáveis através de aplicações multivariadas foram essenciais para a obtenção do *fingerprinting* metabólico da urina de portadores e não portadores de *Cri Du Chat* com confiabilidade analítica.

Deste modo, na primeira etapa experimental, o metanol mostrou ser o solvente mais indicado no processo de precipitação de proteínas e extração de metabólitos em urina por proporcionar, devido à sua natureza prótica, maior número de compostos metabólitos identificados com variada classe química, e com menores valores de coeficiente de variação entre as replicatas.

Os métodos não supervisionados de análise de componentes principais (PCA) e análise agrupamento hierárquico (HCA) foram ferramentas úteis para observação da distribuição das variáveis (metabólitos) e suas correlações, e da formação de grupos de solventes baseados na natureza de solvatação prótica ou aprótica, reforçando a afirmativa de que o metanol é o melhor solvente para ser utilizado na abordagem metabolômica.

Com a estratégia quimiométrica de planejamento fatorial completo 2^3 foi possível selecionar as melhores condições experimentais de derivação com o conceito de múltipla resposta aplicado aos metabólitos identificados. Deste modo, a quimiometria mostrou ser uma ferramenta eficaz na realização e na seleção de experimentos em que muitos metabólitos de diferentes classes químicas devem ser avaliados como respostas.

A adição de urease nas amostras de urina visando a degradação da ureia presente em excesso não provocou alterações significativas nas intensidades e na quantidade dos picos cromatográficos nos cromatogramas obtidos, mostrando que uma etapa adicional de reação não prejudica a cobertura do metaboloma urinário.

Portanto, a avaliação de diferentes solventes de precipitação e extração de metabólitos, bem como a triagem das condições reacionais de derivação são etapas relevantes para obtenção da maior cobertura do metaboloma urinário analisado por GC-MS.

Análises estatísticas univariada e multivariada possibilitaram a discriminação de grupos de amostras de urina de portadores e não portadores da síndrome genética *Cri Du Chat*, e alterações bioquímicas em 4 vias metabólicas foram identificadas, sendo elas: glicólise/gliconeogênese, metabolismo da fenilalanina, metabolismo do amido e sacarose e o metabolismo da tirosina. Desse modo, inferiu-se que as alterações nos níveis dos metabólitos envolvidos nas referidas vias metabólicas prejudicam a biossíntese de neurotransmissores de

monoaminas como a dopamina, influencia na demanda energética e no funcionamento de órgãos e tecidos dos portadores de *Cri Du Chat*; mostra a contribuição de processos exógenos relacionados ao hábito alimentar natural dos indivíduos, bem como a alteração na atividade de bactérias que atuam no trato intestinal.

Capítulo 2

Perfil metabólico de ácidos orgânicos em urina de portadores e não portadores da síndrome *Cri Du Chat*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ácidos orgânicos e metabolismo

Os ácidos orgânicos são metabólitos naturais de organismos vivos pertencentes à classe de compostos químicos de natureza ácida e altamente solúveis em água. São intermediários e produtos em diversas vias metabólicas, como no metabolismo de aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos, cetonas e aminas biogênicas (TORDIFFE et al., 2017).

São compostos que possuem grande interesse bioquímico e clínico uma vez que são alvos para o monitoramento bioquímico e posterior diagnóstico clínico de doenças metabólicas hereditárias (IMD, do inglês *inherited metabolic disorders*). Ademais, são metabólitos com potencial para a indicação de disfunções e insuficiências na atividade de diversas enzimas, má absorção de nutrientes, estresse oxidativo, desintoxicação e o *status* da microbiota intestinal (PAPAMICHAEL et al., 2019).

Ácidos orgânicos têm relação muito próxima com os primeiros estágios do catabolismo de aminoácidos. Nessas etapas, após remoção do α -nitrogênio por atividade enzimática, a estrutura do aminoácido passa por diversas etapas de degradação gerando, em sua maioria, intermediários ácidos orgânicos que contêm outros grupos funcionais em sua estrutura tais como hidroxilas e oxo-substituições, bem como insaturações, para que sejam introduzidos no ciclo de Krebs (CHALMERS; LAWSON, 1982). Consequentemente, o nível anormal de ácidos orgânicos em fluidos biológicos como no sangue e na urina podem indicar a deficiência na atividade de certas enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos.

O interesse em diagnosticar doenças metabólicas hereditárias pela quantificação de ácidos orgânicos estava associado com as decorrentes alterações genéticas que refletiam de imediato na qualidade ou quantidade de uma proteína específica, e que por sua vez interferia na síntese e funcionamento de enzimas (CHALMERS; LAWSON, 1982; TSOUKALAS et al., 2017), gerando um acúmulo na via metabólica relacionada. Desse modo, Tanaka e Isselbacher (1970) determinaram ácidos orgânicos em urina, o que resultou no registro do primeiro caso de acidúria orgânica. Nesse trabalho, os autores evidenciaram que a excreção do ácido *ss*-hidroxiiisovalérico por humanos era devido ao defeito da enzima *ss*-metilcrotonilCoA carboxilase (TANAKA; ISSELBACHER, 1970).

Embora inicialmente estudado no sangue ou urina de indivíduos com alguma condição fisiológica anormal, tal como em portadores de erros inatos do metabolismo, é importante

destacar que ácidos orgânicos também estão presentes em fluidos biológicos de indivíduos em condições fisiológicas normais, ocorrência favorável para estudos comparativos utilizando-se de abordagens metabolômicas.

1.2 Abordagens em metabolômica utilizando ácidos orgânicos

Tratando-se de abordagens metabolômicas, os ácidos orgânicos são alvos analíticos em diferentes biofluidos com o intuito de entender o mecanismo de funcionamento das vias metabólicas alteradas devido a determinadas condições biológicas, predizer a atividade de diversas enzimas em diferentes reações bioquímicas, revelar potenciais biomarcadores para diagnóstico de doenças, contribuir para a melhoria da qualidade de vida dos indivíduos pelo aproveitamento de nutrientes nos diferenciados hábitos alimentares e conceber intervenções farmacológicas e terapias alternativas para redução de sintomas referentes à condição biológica.

Por serem biomarcadores bem estabelecidos para o diagnóstico de disfunções mitocondriais, os ácidos orgânicos foram utilizados como alvos para monitorar a ruptura progressiva da estrutura e da função mitocondrial durante infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, sigla do inglês *human immuno deficiency virus*), no soro sanguíneo de 18 indivíduos infectados e comparados a 21 controles de indivíduos não infectados pelo vírus (WILLIAMS et al., 2012). Utilizando estratégias em metabolômica, identificaram biomarcadores ácidos orgânicos de disfunção mitocondrial/metabólica (ácido succínico, ácido fumárico, ácido adípico e ácido subérico) e de estresse oxidativo (ácido piroglutâmico), bem como ácidos graxos envolvidos no metabolismo de lipídios (ácido cáprico, ácido azelaico, ácido esteárico).

Foi evidenciado através de abordagem metabolômica que os ácidos 2-hidroxi-butírico e 3-hidroxi-butírico podem ser considerados biomarcadores prognósticos para predizer complicações em mulheres com diabetes mellitus gestacional após o parto, sendo proposto que um desequilíbrio redox na síntese da glutatona, em conjunto com a oxidação de ácidos graxos, podem contribuir nas alterações metabólicas em mulheres com diabetes mellitus gestacional (DUDZIK et al., 2017).

Análise metabolômica de ácidos orgânicos urinários de 39 crianças foi realizada na tentativa de identificar potenciais biomarcadores da deficiência da cadeia respiratória, baseado no fato de que a cadeia respiratória suporta o transporte primário de elétrons dos cofatores redutores (NADH_2 e FADH_2), e uma deficiência metabólica nessa via resulta em concentrações

aumentadas de ácidos orgânicos. Entretanto, nenhum ácido orgânico pôde ser definido como biomarcador para a deficiência da cadeia respiratória, mas foi demonstrado que vários desses metabólitos ocorrem em doenças metabólicas hereditárias relacionadas a disfunções enzimáticas e não a perturbações metabólicas devido à deficiência da cadeia respiratória (REINECKE et al., 2011).

Em pesquisas nutricionais, os estudos em metabolômica estão tanto relacionados à investigação dos efeitos metabólicos de compostos endógenos devido a ingestão de nutrientes ou a seguimentos de padrões alimentares, quanto a alterações no metabolismo devido aos diferentes hábitos alimentares. A contribuição da microbiota intestinal no metabolismo devido à alimentação também é tema de pesquisa. (REZZI et al., 2013; SUÁREZ et al., 2017).

Estudos de intervenção nutricional com vinho foram realizados utilizando abordagem metabolômica para identificar diferenças metabólicas em urina de voluntários com alto fator de risco cardiovascular. O ácido 3-metil-2-oxovalérico em alta concentração na urina dos voluntários foi resultado da primeira etapa do catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA, do inglês *branched-chain amino acids*), sugerindo desregulação dessa via devido à enzima BCAT após a ingestão de vinho. Em adição, no mesmo trabalho, os autores classificaram os ácidos hipúrico e 4-hidroxifenilacético como biomarcadores devido à ingestão de compostos polifenólicos do vinho e referentes ao catabolismo de polifenóis pela microbiota intestinal (VÁZQUEZ-FRESNO et al., 2012).

Neste capítulo da tese, ácidos orgânicos foram analisados em amostras de urina de portadores e não portadores da condição genética *Cri Du Chat*, através de abordagem metabolômica, com o intuito de ampliar o conhecimento sobre as vias metabólicas alteradas resultantes da síndrome, o que pode contribuir com informações para o estímulo do desenvolvimento cognitivo e comportamental dos portadores, intervenções médicas e farmacológicas apropriadas, ou terapias alternativas para redução dos sintomas da síndrome.

1.3 Preparo de amostra para determinação de ácidos orgânicos por GC-MS

A cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) têm se tornado ferramentas em potencial em estudos metabolômicos porque fornecem alta resolução em separação, apresentam padrões de fragmentação de massas confiáveis e reprodutíveis para uma extensiva faixa dinâmica de metabólitos, bem como alta capacidade para identificação de

compostos desconhecidos pertencentes ao metaboloma e que participam como intermediários em diversas vias metabólicas (KOEK et al., 2011).

Uma das aplicações mais comuns de GC-MS é no monitoramento e diagnóstico de erros inatos ao metabolismo resultantes de deficiência de enzimas, em que ácidos orgânicos são comumente os alvos na análise (KUHARA, 2001; YANG et al., 2017). O interesse nesse grupo de compostos está em sua quantificação, já que alterações na atividade e na quantidade de proteínas específicas que, por sua vez, inferiam na síntese e funcionamento de enzimas, resultariam nas doenças metabólicas hereditárias ou erros inatos do metabolismo (CHALMERS; LAWSON, 1982).

Consequentemente, o padrão anormal de ácidos orgânicos em urina poderia estar relacionado à deficiência na atividade de certas enzimas que afetam o catabolismo de aminoácidos, uma vez que a remoção do alfa-nitrogênio na estrutura do aminoácido, por atividade enzimática, passa por diversas etapas de degradação gerando, em sua maioria, intermediários ácidos orgânicos que contêm outros grupos funcionais em sua estrutura tais como hidroxilas, grupos oxo e insaturações, para que sejam introduzidos no ciclo de Krebs (CHALMERS; LAWSON, 1982).

Para obter perfis de metabólitos de ácidos orgânicos separados cromatograficamente e identificados a partir do padrão de fragmentação das estruturas químicas é necessário produzir extratos dos fluidos biológicos, anteriormente à análise, uma vez que amostras biológicas não podem ser introduzidas diretamente em um sistema de GC-MS.

Diante disso, tem-se que o preparo de amostra é uma etapa crítica em química analítica, principalmente quando se deseja isolar biomoléculas em matrizes complexas como plasma, soro, sangue, urina, fluido cerebrospinal e tecidos, onde a maioria desses analitos se encontram em baixas concentrações.

Neste caso, um método de extração baseado na transferência de um analito a partir de solução inicial (denominada fase doadora) para uma segunda fase (denominada fase aceptora ou fase de extração) deve ser utilizado para seu isolamento, e que o extrato deve ser compatível com a instrumentação analítica a ser usada (RUTKOWSKA et al., 2019). Sendo assim, o maior desafio no preparo desse tipo de amostra é a recuperação dos analitos isolados de forma adequada à uma determinação com alta sensibilidade e especificidade (ATAPATTU; ROSENFELD, 2018).

1.3.1 Ácidos orgânicos em biofluidos e extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido é um processo de separação baseado no mecanismo de partição, que consiste na transferência do soluto de um solvente para outro, sendo esses dois solventes imiscíveis ou parcialmente miscíveis um ao outro. No modo comum, um dos solventes é a água ou uma mistura aquosa, e o outro é um líquido orgânico apolar (BERK, 2013).

Iniciando o processo de extração, a mistura de substâncias em um líquido é colocada em contato com um segundo líquido, que é imiscível com o primeiro; durante o período de contato os componentes desejados (ou indesejados) da mistura serão preferencialmente distribuídos no segundo líquido, e assim, as duas fases líquidas serão separadas mecanicamente estando prontas para as etapas subsequentes.

Quando o potencial químico do soluto a ser extraído é o mesmo nas duas fases, diz-se que o equilíbrio foi atingido, o que leva à definição do coeficiente de distribuição ou coeficiente de partição, K , conforme mostra a Eq. 2.

$$K = \frac{C_{2(\text{fase orgânica})}}{C_{1(\text{fase aquosa})}} \quad \text{Eq. 2}$$

Em que C_1 e C_2 são as concentrações no equilíbrio do soluto nas fases aquosa e orgânica, respectivamente. O coeficiente de distribuição pode ser definido como a preferência relativa do soluto pelos solventes (BERK, 2013).

Este método barato e fácil de implementar ainda é amplamente utilizado, embora existam alguns inconvenientes como dificuldade para automatizá-lo – embora nenhum aparato especial seja exigido – e maior consumo de solventes orgânicos frequentemente apolares – que também o torna menos eficiente para extrair compostos altamente polares (HUMBERT; HOIZEY; LHERMITTE, 2014). Este último pode ser resolvido pela diminuição da quantidade de solvente através de procedimentos miniaturizados, e a eficiência do processo de extração líquido-líquido melhorada pela modificação do coeficiente de distribuição.

Solventes orgânicos são frequentemente utilizados para a extração de ácidos orgânicos como um grupo de metabólitos, em urina e outros fluidos biológicos, antes da sua introdução no sistema cromatográfico. Dentre os diversos solventes que podem ser empregados para

extração, o acetato de etila e o éter dietílico – individualmente, ou ambos em sucessão – são os mais utilizados. O éter dietílico é mais recomendado para extrair ácidos orgânicos mais hidrofóbicos, ao passo que o acetato de etila para os ácidos mais hidrofílicos. As amostras são acidificadas e saturadas com sais inorgânicos, e a extração é realizada em temperatura ambiente (CHARMERS; LAWSON, 1982).

Embora seja um método simples, muitos trabalhos de impacto científico vêm sendo publicados utilizando solventes para a extração de ácidos orgânicos, principalmente devido a sua eficiência na extração e obtenção de um *screening* com maior número metabólitos ácidos, o que possibilita a elucidação de vias metabólicas alteradas.

Utilizando a abordagem metabolômica perfil metabólico, Reinecke et al. (2012) avaliaram os níveis de ácidos orgânicos na urina de 39 crianças com deficiência na cadeia respiratória (DCR) visando melhor entender as perturbações devido a essa deficiência metabólica, e fornecer um primeiro passo crítico para o desenvolvimento de biomarcadores para a DCR. Para isso, as amostras de urina foram acidificadas com uma solução aquosa de ácido clorídrico 5 N até atingir $\text{pH} < 2$ e, em seguida, os metabólitos ácidos orgânicos foram extraídos com os solventes acetato de etila (6 mL) e éter dietílico (3 mL). O estudo demonstrou que o perfil de ácidos orgânicos estudado por abordagem metabolômica pode melhor destacar as complexas diferenças metabólicas observadas no perfil metabólico global dos grupos controle e indivíduos com DCR (REINECKE et al., 2012).

Visando estudar as condições analíticas para determinação, por GC-MS, de ácidos orgânicos em urina relacionados a desordens metabólicas como acidúria metilmalônica, acidúria malônica, acidúria glutárica tipo I e II e biomarcadores considerados importantes em condições como câncer, anorexia nervosa, Alzheimer e doença de Huntington, Christou et al. (2014) utilizaram apenas acetato de etila (3 mL) com prévia acidificação com HCl e saturação salina com NaCl das amostras, para extração biomarcadores ácidos orgânicos. O método exibiu boa repetibilidade das análises, e assim concluíram que os níveis de ácidos nas amostras de urina de crianças estavam na faixa normal (CHRISTOU et al., 2014).

Seo et al (2016) utilizaram a extração líquido-líquido sequencial com os solventes éter dietílico (3 mL) e acetato de etila (2 mL), após acidificação com 10% de H_2SO_4 e saturação com NaCl das amostras de urina de ratos submetidos à administração intraperitoneal de GHB, na obtenção do perfil abrangente de ácidos orgânicos envolvidos no ciclo do ácido cítrico, incluindo os ácidos gamahidroxibutírico (GHB) e 2-hidroxiglutárico (2-HT), para entender os eventos bioquímicos e monitorar o metabolismo de ácidos orgânicos alterados devido ao

tratamento com GHB. Níveis elevados de 18 ácidos orgânicos em urina foram obtidos com o método, indicando um distúrbio metabólico de ácidos orgânicos devido à administração única do GHB (SEO et al., 2016).

Diante do exposto e da relevância biológica dos ácidos orgânicos, neste capítulo, a abordagem metabolômica perfil metabólico com foco nos ácidos orgânicos, em urina de portadores e não portadores da síndrome *Cri Du Chat*, foi realizada visando obter informações sobre possíveis alterações metabólicas que ocorrem devido à síndrome genética.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o perfil metabólico de ácidos orgânicos em urina de portadores e não portadores da síndrome genética *Cri Du Chat* através de abordagem metabolômica, por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), visando o entendimento de possíveis alterações metabólicas associadas à síndrome.

2.2 Objetivos específicos

- Adequar as metodologias de extração líquido-líquido de ácidos orgânicos em urina para determinar por GC-MS os referidos metabólitos em maiores intensidades;
- Utilizar abordagem metabolômica perfil metabólico para observar possíveis alterações metabólicas entre os grupos portadores e não portadores da síndrome *Cri Du Chat*;
- Identificar, através de métodos estatístico univariados e métodos estatísticos multivariados, os metabólitos ácidos orgânicos responsáveis pela discriminação entre os grupos portadores e não portadores de *Cri Du Chat*;
- Avaliar as alterações nas vias metabólicas resultantes da síndrome genética *Cri Du Chat* em comparação aos não portadores.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e solventes

Os solventes piridina, acetato de etila, éter etílico e hexano foram adquiridos da Panreac (Barcelona, Espanha). Ácido clorídrico (HCl) e cloreto de sódio (NaCl) foram adquiridos da Qhemis (São Paulo, Brasil). A água ultrapura foi obtida a partir de um sistema de purificação MilliQ. Os agentes derivantes cloridrato de metoxiamina, MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida) com 1% TMCS (trimetilclorosilano), o padrão interno (IS) hexadecano ($\text{nC}_{16}\text{H}_{34}$) e o padrão de n-alcenos (C7-C40) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, EUA).

3.2 Coleta da amostra e estocagem

As amostras de urina dos portadores e não portadores *Cri Du Chat* (CDC) foram obtidas e armazenadas conforme descritos na seção 3.2 – Coleta da amostra e estocagem (Materiais e Métodos), Capítulo 1 – *Fingerprinting* metabólico em urina de portadores e não portadores da síndrome *Cri Du Chat*, desta tese.

3.3 Preparo da amostra e reações de derivação

Com o objetivo de obter a maior cobertura de metabólitos ácidos orgânicos em altas intensidades, três métodos de extração líquido-líquido foram adaptados e suas eficiências de extração foram avaliadas utilizando um volume de 200 μL de um *pool* de urina preparada a partir da mistura de volumes iguais de sete amostras de voluntários sem a condição genética CDC (3 mulheres e 4 homens – $27,3 \pm 2,81$ anos).

Os métodos de extração estudados e as reações de derivação usadas neste capítulo consistiram em:

- i) **Método 1 (MÉT1)** – adaptação do método de extração de ácidos orgânicos em urina proposto por Bouatra et al. (2013). Dez microlitros de uma solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) em concentração 6 mol L^{-1} foram adicionados para acidificação de 200 μL da amostra de urina ($\text{pH} < 1$), e 70 μL de uma solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) em concentração 3 mol L^{-1} foram adicionados para aumentar a força iônica do

meio. Os ácidos orgânicos foram extraídos com 600 μL de acetato de etila e 600 μL de éter etílico e submetidos à agitação em *shaker*, por 15 min cada solvente. Alíquotas de 450 μL de cada fase orgânica foram transferidas para um *vial* de vidro de 1,5 mL e secos com gás nitrogênio. O resíduo da evaporação foi reconstituído em 25 μL da solução de cloridrato de metoxiamina em piridina, na concentração de 20 mg mL^{-1} , e mantido sob agitação em *shaker* por 60 min e temperatura de 60 °C. Após metoximação, os ácidos orgânicos extraídos foram sililados com 25 μL de MSTFA (N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano) por 60 min de agitação e temperatura de 60 °C.

- ii) **Método 2 (MÉT2)** – procedimento de extração de ácidos orgânicos em urina adotado por Bouatra *et al.* (2013), com ajuste do volume dos reagentes de metoximação e sililação. Assim, 150 μL da solução de cloridrato de metoxiamina em piridina (20 mg mL^{-1}) foram adicionados à amostra e submetidos à agitação em *shaker* por 30 min e temperatura de 60 °C. Após essa etapa de reação, 350 μL de solução aquosa de HCl 6 mol L^{-1} foram adicionados ($\text{pH} < 1$) e a força iônica da amostra foi aumentada (1 mol L^{-1}) com solução aquosa de NaCl 3 mol L^{-1} . Seiscentos microlitros de acetato de etila e 600 μL de éter etílico, por vez, foram adicionados às amostras e submetidos à agitação em *shaker* por 15 min. Alíquotas de 450 μL de cada fase orgânica foram transferidas para um *vial* de vidro de 1,5 mL e secos com gás nitrogênio. Os ácidos orgânicos extraídos e secos foram derivados com 25 μL de MSTFA por agitação em *shaker* por 60 min e temperatura de 60 °C. Após reação, 25 μL de hexano foram adicionados, agitados em vórtex por 30 s, e as amostras foram analisadas por cromatografia a gás e espectrometria de massas (GC-MS).
- iii) **Método 3 (MÉT3)** – adaptação do método de extração de ácidos orgânicos em urina proposto por Reinecke (2012) e modificado por Tordiffe *et al.* 2017. Os ácidos orgânicos da amostra de urina previamente acidificada ($\text{pH} < 1$) e com a força iônica do meio aumentada (1 mol L^{-1}) foram extraídos com 1,0 mL de acetato de etila e 600 μL de éter etílico, em que cada solvente foi submetido à agitação em *shaker* por 15 min. Para manter a relação proporcional de volume das fases orgânicas, 750 μL do extraído por acetato de etila e 450 μL do extraído por éter etílico foram retirados e transferidos para um *vial* de vidro de 1,5 mL, e secos com gás nitrogênio. O resíduo da evaporação foi reconstituído em 25 μL da solução de cloridrato de metoxiamina em piridina, na concentração de 20 mg mL^{-1} , e mantido sob agitação em *shaker* por 60 min e temperatura de 60 °C. Após metoximação, os ácidos orgânicos extraídos foram sililados com 25 μL de MSTFA (N-

metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano) por 60 min de agitação e temperatura de 60 °C.

3.4 Preparo da amostra para análise do perfil metabólico de ácidos orgânicos

Duzentos microlitros (200 µL) de urina foram acidificados até pH < 1,0 a partir de uma solução aquosa de HCl 6 mol L⁻¹ e a força iônica foi aumentada pela adição de uma solução aquosa de NaCl 3 mol L⁻¹. Os ácidos orgânicos foram extraídos com 600 µL de acetato de etila e 600 µL de éter etílico, com agitação de 300 rpm (aprox. 12 G) em *shaker*, durante 15 min para cada solvente. Alíquotas de 450 µL de cada fase orgânica foram transferidas para um *vial* de vidro de 1,5 mL e secos com gás nitrogênio. O resíduo da evaporação foi reconstituído em 25 µL de cloridrato de metoxiamina em piridina (20 mg mL⁻¹) e submetido a agitação de 300 rpm (aprox. 12 G), em *shaker*, por 60 min a 60 °C. Após metoximação, 25 µL de MSTFA com 1% de TMCS foram adicionados às amostras e submetidos por mais 60 min de agitação sob mesma velocidade, e em 60 °C.

Depois das etapas de reação, as amostras derivadas foram resfriadas à temperatura ambiente (25 °C ± 1) e 10 µL de hexadecano (C₁₆H₃₄) em hexano (100 mg L⁻¹) foram adicionados antes das análises cromatográfica como padrão interno (PI) para avaliar o desempenho da injeção automática, e sua intensidade foi usada para normalizar a intensidade dos ácidos orgânicos identificados. As etapas são resumidamente apresentadas conforme Figura 2.1.

Figura 2.1 Procedimento geral dos métodos de extração e análise de ácidos orgânicos em urina visando análise metabolômica da síndrome CDC.

FONTE: Autoria própria

Amostras de *quality control* (QC) foram usadas para avaliar a variabilidade analítica e expressar o coeficiente de variação (CV) dos ácidos orgânicos analisados entre as corridas cromatográficas. Assim, as intensidades dos íons m/z referentes aos ácidos orgânicos detectados em mais que 80% de todos os QC e com $CV < 30\%$ foram considerados para posteriores análises multivariadas.

3.5 Condições de análise por GC-MS

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas, série GCMS-QP2010 Ultra da Shimadzu, e auto injetor AOC-20i. Um microlitro (1 μL) das amostras derivadas foi injetado nem modo *split* (1:25), temperatura do injetor mantida em 250 °C, gás hélio (99,999% de pureza) foi usado como gás de arraste na vazão 1,0 mL min^{-1} . A coluna cromatográfica capilar usada foi a Rtx-5MS (5% difenil-95% dimetilpolisiloxano, 30 m $\times$ 250 μm d.i. $\times$ 0,25 μm de espessura do filme) da Restek, USA. A temperatura inicial do forno foi de 80 °C, mantida por 1 min, seguida pela rampa linear de 6 °C min^{-1} até 300 °C, então mantida por 3,33 min. O espectrômetro de massas foi operado utilizando-se ionização por elétrons em 70 eV, modo *full scan* de análise na faixa de m/z de 45-600, com taxa de aquisição de 2,5 scan s^{-1} , tempo de *delay* 4,0 min e temperaturas da fonte de íons e da interface em 250 e 290 °C, respectivamente.

3.6 Pré-processamento dos dados e identificação dos metabólitos

Os dados obtidos foram pré-processados e os metabólitos identificados conforme descritos na seção 3.6 do capítulo 1, com exceção dos parâmetros de desconvolução espectral (`avoid.processing.mz = c(73:75,147:149)` e alinhamento espectral (`mz.range = 45:600`).

3.7 Tratamento dos dados e análise estatística

Para avaliação do melhor método de extração, as análises foram realizadas em replicatas ($n = 5$), e o tratamento dos dados foi realizado conforme descrito na seção 3.7 do capítulo 1, com adição do autoescalamento das intensidades dos metabólitos.

Para análise do perfil metabólico de ácidos orgânicos nas amostras de urina dos portadores de *Cri Du Chat* (CDC) e dos controles (CTL) todos os procedimentos de pré-processamento e de análise estatística adotados estão descritos na seção 3.7 do capítulo 1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Adequação do método de extração de ácidos orgânicos em urina

A seleção do melhor método de extração foi baseada nos critérios descritos no capítulo 1, que consiste na obtenção do maior número de ácidos orgânicos identificados pelas bibliotecas comerciais NIST e GMD; obtenção de sinais m/z em maiores intensidades dos metabólitos, avaliados através de análise multivariada de dados, e boa reprodutibilidade entre as medidas dos ácidos orgânicos.

As Figuras 2.2.a-b mostram os cromatogramas de íons totais (TIC) dos 3 métodos adaptados para extração de ácidos orgânicos em urina e o diagrama de Venn comparando o número de metabólitos identificados por GC-MS, respectivamente.

Figura 2.2 a) Cromatogramas de íons totais (TIC) das replicatas de análise de ácidos orgânicos em urina utilizando 3 métodos de extração; b) diagrama de Venn com o número de metabólitos ácidos orgânicos identificados utilizando os diferentes métodos de extração. MÉT1 (método 1 - adaptação do proposto por Bouatra et al. 2013); MÉT2 (método 2 - adotado por Bouatra et al. 2013); MÉT3 (método 3 - adotado por Tordiffe et al. 2017).

FONTE: Autoria própria, utilizando *softwares* Origin 8.0 e *Bioinformatics & Evolutionary Genomics* (disponível em <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Em uma primeira inspeção visual puderam-se observar perfis cromatográficos similares quando os diferentes métodos de extração foram adotados (Figura 2.2.a). Observou-se variação na altura dos picos cromatográficos, sendo o MÉT2 o que apresentou picos com as menores

alturas em relação aos MÉT1 e MÉT3, e com esses dois últimos foram obtidos picos com alturas similares entre si, ao longo da análise cromatográfica.

Após a subtração dos valores de intensidade dos ácidos orgânicos com os valores de intensidades do branco, posterior exclusão de sinais com maiores intensidades no branco que nas amostras, e soma das intensidades de compostos identificados como sendo iguais, porém com diferentes números de sítios derivados na molécula (por exemplo: ácido 5-hidroxiindoleacético-2TMS e ácido 5-hidroxiindoleacético-3TMS), 82 ácidos orgânicos foram obtidos. Dentre eles, 76 com intensidades dos íons m/z maiores que 10^3 foram compartilhados entre os 3 métodos de extração aplicados, e 6 deles possuíram intensidades dos íons menores que o limite de detecção estabelecido (10^3) quando o MÉT2 foi aplicado (Figura 2b) e que consistem de metabólitos endógenos e exógenos de importância biológica como os ácidos antranílico, málico, glicérico, galacturônico, β -D-glicopiranurônico e ferúlico.

Previamente, pode-se afirmar que o procedimento de extração de ácidos orgânicos em urina adotado por Bouatra et al. (2013), com ajuste no volume dos reagentes de metoximação e sililação (MÉT2) foi o menos eficiente, nesse primeiro quesito, por apresentar picos cromatográficos com alturas inferiores comparados ao MÉT1 e ao MÉT3, e menor número de ácidos orgânicos extraídos e identificados.

4.1.1 Análise de componentes principais (PCA)

Os gráficos de PCA foram obtidos a partir dos valores das intensidades dos ácidos orgânicos identificados na urina, transformados ($\log_{10}$) e autoescalados. Considerando as duas componentes principais, PC1 e PC2, 93,3% da variância total dos dados foi explicada, em que a primeira componente (PC1) descreveu 77,8% da variância total e a segunda componente (PC2) descreveu 15,5%. As Figuras 2.3.a-b mostram os gráficos de *scores* e de *loadings* da avaliação dos três métodos de extração de ácidos orgânicos em urina.

Figura 2.3 Gráficos de escores (a) e de *loadings* (b) para a avaliação de três métodos de extração de ácidos orgânicos em urina: MÉT1 (método 1- adaptação do proposto por Bouatra et al. 2013); MÉT2 (método 2- adotado por Bouatra et al. 2013); e MÉT3 (método 3- adotado por Tordiffe et al. 2017).

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software* XLSTAT.

O gráfico de *scores* mostrou a separação entre as replicatas das amostras empregando três diferentes métodos de extração de ácidos orgânicos em urina, bem como a formação de dois grupos (A e B) ao longo dos eixos da PC1 (Figura 2.3.a). O grupo A correspondeu às cinco replicatas das amostras do *pool* de urina em que os metabólitos foram extraídos empregando o método 2 (MÉT2) e estão localizadas no eixo negativo da PC1; o grupo B foi formado pelas replicatas das amostras extraídas utilizando os métodos 1 e 3 (MÉT1 e MÉT3), localizados no eixo positivo da PC1. Ao longo do eixo positivo da PC2, observou-se a formação de dois grupos representados pelas replicatas das amostras extraídas empregando os métodos 1 e 2, e a formação de um grupo composto pelas amostras extraídas pelo método 3, situado no eixo negativo da PC2.

As variáveis que mais contribuem para uma dada componente principal foram as que apresentaram pesos em módulo maiores que 0,70 na matriz de *loadings* da PC1 e da PC2 (Tabela 2.1), conforme descrito no capítulo 1.

Tabela 2.1 Matriz de *loadings* da análise de componentes principais (PC1 × PC2): Efeito das variáveis na seleção do método de extração de ácidos orgânicos em urina. Valores em negrito correspondem aos pesos em módulo maiores que 0,70.

ÁCIDOS ORGÂNICOS	PC1	PC2	ÁCIDOS ORGÂNICOS	PC1	PC2
Ácido Pirúvico	-0,69	0,65	Ácido Treônico/Eritrônico	0,96	-0,27
Ácido Láctico	0,93	-0,12	Ácido 2-hidroxi glutárico	0,97	-0,23
Ácido 2-hidroxiisobutírico	0,95	0,20	Ácido 2-oxoglutarico	-0,48	0,85
Ácido Glicólico	0,96	-0,22	Ácido Pimélico	0,75	0,63
Ácido Levulínico	0,70	0,62	Ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico	0,97	-0,22
Ácido Oxálico	0,75	-0,25	Ácido 3-hidroxifenilacético	0,94	0,28
Ácido 2-hidróxi-2-metilbutírico	0,67	0,65	Ácido 4-hidróxi-oxocicloacético	0,96	0,25
Ácido 3-hidroxipropiônico	0,97	-0,20	Ácido 4-hidroxibenzóico	0,71	0,68
Ácido 3-hidroxiisobutírico	0,99	0,03	Ácido 4-hidroxifenilacético	0,83	0,54
Ácido 2-hidroxi valérico	0,87	0,46	Ácido 2,5-furanodicarboxílico	0,91	0,39
Ácido 3-metil-2-oxovalérico	-0,37	0,89	Furoilglicina	0,98	-0,14
Ácido 2-metil-3-hidroxibutírico	0,99	0,10	Ácido Subérico	0,38	0,90
Ácido 3-hidroxiisovalérico	0,95	0,01	Ácido Isocítrico Lactona	0,97	-0,15
Ácido Metilmalônico	0,99	0,08	Ácido Quinolínico	0,96	-0,24
Ácido 2-etilhidracrílico	0,98	0,18	Ácido Aconítico	0,99	-0,08
Ácido Benzóico	0,86	-0,45	Ácido Homovanílico	0,90	0,43
Ácido Fosfórico	0,90	-0,32	Ácido Gentísico	-0,33	0,34
Ácido 3-hidroxicapróico	0,86	0,31	Ácido 4-hidroximandélico	1,00	-0,06
Ácido Succínico	1,00	-0,05	Ácido Azeláico	0,45	0,88
Ácido Metilsuccínico	0,98	0,20	Ácido 3,5-dihidroxibenzóico	0,85	0,50
Ácido 5-hidroxi valérico	0,99	-0,02	Ácido Cítrico	0,95	-0,30
Ácido Glicérico	0,97	-0,21	Ácido Hipúrico	0,91	-0,29
Ácido Fumárico	0,92	0,24	Ácido 3-(3-hidroxifenil)-3-hidroxipropiônico	0,99	0,08
Ácido (R,R)-2,3-dihidroxibutanóico	0,98	-0,18	Ácido Vanililmandélico	0,99	-0,09

FONTE: Autoria própria

			Continuação		
ÁCIDOS ORGÂNICOS	PC1	PC2	ÁCIDOS ORGÂNICOS	PC1	PC2
Ácido 5-hidroxihexanóico	0,15	0,92	Ácido 4-hidroxifenilático	0,97	0,04
Ácido (R,S)-2,3-dihidroxibutanóico	0,98	-0,20	Ácido 3,4-dihidroxihidrocinâmico	0,98	-0,17
Ácido Láctico dímero	0,96	0,25	Ácido Glucurônico	0,99	0,04
Ácido Metilmaléico	0,61	0,78	Ácido 3-indolacético	0,70	0,37
Ácido Glutárico	0,99	0,06	Ácido Galacturônico	0,98	0,01
Ácido 3-deoxitetrônico	0,94	-0,31	Ácido Pantotênico	0,94	-0,32
Ácido 3-metilglutárico	0,92	0,37	Ácido Vanililhidracrílico	1,00	-0,03
Ácido 2-deoxitetrônico	0,95	-0,29	Ácido β-D-glicopiranurônico	0,99	-0,16
(E)-Ácido 3-metilglutacônico	0,90	0,41	Ácido Kinurênico	0,21	-0,77
Ácido Citramálico	0,98	-0,18	Ácido 2-hidroxipúrico	-0,04	-0,43
(Z)-Ácido 3-metilglutacônico	0,99	-0,10	Ácido Ferúlico	0,97	-0,10
Ácido Antranílico	0,96	-0,26	Ácido 3-Hidroxipúrico	0,99	-0,14
Ácido Málico	0,97	-0,20	Ácido 5-hidroxiindolacético	0,99	-0,13
Ácido Piroglutâmico	0,85	-0,46	Ácido 4-hidroxipúrico	0,97	-0,22
Ácido 3-metiladípico	0,97	0,13	Ácido Xanturênico	0,30	-0,75
Ácido 5-hidroximetil-2-furancarboxílico	0,99	0,12	p-Tolil-β-D-glucuronida	0,97	-0,23
Ácido 2-hidroxifenilacético	0,73	0,68	Fenilacetilglutamina	0,89	-0,34

FONTE: Autoria própria

Ainda conforme a Tabela 2.1, todas as variáveis (ácidos orgânicos) de maiores pesos selecionadas foram correlacionadas positivamente no eixo da PC1. Assim, analisando os agrupamentos formados pelas replicatas das amostras de urina extraídas por diferentes métodos no gráfico de *scores* (Figura 3.a), observou-se que utilizando o método 2 (MÉT2) um maior número de metabólitos ácidos orgânicos foi extraído em menor intensidade na urina devido à sua associação no eixo negativo da PC1. Em contrapartida, as amostras do método 1 (MÉT1) estão mais posicionadas ao longo do eixo positivo da PC1, apresentando maiores valores nas intensidades dos metabólitos. Devido às amostras do método 3 (MÉT3) estarem posicionadas mais próximas da origem no gráfico de *scores*, em relação às amostras do método 1 (MÉT1), pode-se inferir uma menor correlação entre a PC e as variáveis em estudo.

A segunda componente principal (PC2) destacou poucas variáveis de maior importância com pesos positivos que consistem em metabólitos ácidos dicarboxílicos, oxo-monocarboxílicos e ácido graxo hidroxilado, como o ácido 5-hidroxihexanóico (0,92), o ácido subérico (0,90), o ácido azeláico (0,88), o ácido 3-metil-2-oxovalérico (0,89), o ácido 2-oxoglutárico (0,85) e o ácido metilmaléico (0,78), que estão envolvidos em sua maioria no metabolismo de lipídeos e degradação de aminoácidos. Ademais, maiores intensidades dessas variáveis podem ser obtidas aplicando MÉT1 e MÉT3 por possuírem pesos positivos no gráfico de *loadings* e agrupamento dos dois grupos de amostras ao longo do eixo positivo da PC2 no gráfico de *scores*.

As variáveis correlacionadas com pesos negativos na PC2 foram os ácidos kinurênico (-0,77) e xanturênico (-0,75), ambos metabólitos endógenos envolvidos no metabolismo do triptofano e que podem influenciar em processos neurofisiológicos e neuropatológicos (WISHART et al., 2018). Utilizando o MÉT3, maiores intensidades dos íons *m/z* desses dois metabólitos podem ser obtidas devido aos pesos negativos das variáveis obtidas pelo gráfico de *loadings*, e pelas amostras estarem localizadas no eixo negativo da PC2 conforme o gráfico de *scores*.

Esse comportamento reforça a aplicação do MÉT1 como o mais adequado para a extração do maior número de metabólitos ácidos orgânicos e com maiores intensidades dos íons *m/z* nos cromatogramas.

4.1.2 Análise de agrupamento hierárquico (HCA)

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) é muito adequada para identificar grupos de amostras de acordo com suas similaridades ou dissimilaridades, e consiste em uma ferramenta em potencial para analisar conjuntos de dados, incluindo a detecção de agrupamentos esperados ou inesperados e a presença de *outliers* (SILVA et al., 2012).

A HCA foi aplicada às intensidades dos metabólitos transformadas em logaritmos ($\log_{10}$) e autoescaladas, e os agrupamentos foram gerados usando o método de Ward com distância Euclidiana. Conforme mostra o dendrograma representado pela Figura 2.4, houve a formação de três grupos distintos correspondentes às cinco replicatas das amostras de urina extraídas utilizando os métodos 1, 2 e 3.

Figura 2.4 Dendrograma agrupando os diferentes métodos de extração de ácidos orgânicos em urina. (MÉT1-1, MÉT1-2, MÉT1-3, MÉT1-4, MÉT1-5: Replicatas do método 1; MÉT2-1, MÉT2-2, MÉT2-3, MÉT2-4, MÉT2-5: Replicatas do método 2; MÉT3-1, MÉT3-2, MÉT3-3, MÉT3-4, MÉT3-5: Replicatas do método 3).

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software* XLSTAT.

O grupo formado pelas amostras do método 2 (MÉT2) apresentou maior dissimilaridade em relação aos grupos compostos pelas amostras extraídos com os métodos 1 e 3 (MÉT1 e MÉT3). Esse comportamento está relacionado às menores intensidades obtidas dos metabólitos extraídos por esse método, como apresentado anteriormente pela PCA, o que mostra a complementariedade da análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) à análise de componentes principais (PCA) quanto à visualização das semelhanças e diferenças existentes na aplicação de métodos adaptados de extração de ácidos orgânicos em urina.

4.1.3 Avaliação da reprodutibilidade dos métodos de extração

Um parâmetro analítico utilizado como critério para seleção do método mais eficiente para extração dos ácidos orgânicos em urina é a reprodutibilidade. Uma das maneiras de estimar a reprodutibilidade dos dados é através do coeficiente de variação (% CV):

$$\% CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2.1})$$

Em que s e $\bar{x}$ são o desvio padrão e a média entre as replicatas de determinada variável, respectivamente.

Para avaliar a distribuição do coeficiente de variação dos metabólitos ácidos orgânicos identificados aplicando 3 métodos de extração, um *box plot* foi construído e está representado na Figura 2.5.

Figura 2.5 *Box plot* dos coeficientes de variação das intensidades dos metabólitos ácidos orgânicos extraídos da urina utilizando os três métodos adaptados: + representa a média aritmética do conjunto de dados; ○ representa *outlier*

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software* XLSTAT.

As medianas dos coeficientes de variação dos ácidos orgânicos avaliando MÉT1, MÉT2 e MÉT3 foram 9,5, 10,1 e 11,0%, respectivamente. No entanto, tem-se que a maior reprodutibilidade dos dados pode ser obtida quando o MÉT1 é utilizado, em comparação aos demais métodos de extração avaliados.

Assim, combinando as maiores intensidades obtidas dos íons m/z referentes aos ácidos orgânicos identificados demonstradas pelos métodos multivariados não supervisionados PCA e HCA, bem como a maior reprodutibilidade entre as medidas visualizada através de *box plot* dos coeficientes de variação dos metabólitos analisados e o maior número de metabólito identificado, o MÉT1 foi selecionado e aplicado para extração de ácidos orgânicos em urina nas análises posteriores.

3.2 Perfil metabólico de ácidos orgânicos em urina de portadores e não portadores de *Cri Du Chat*

Ácidos orgânicos foram extraídos de 33 amostras de urina de indivíduos selecionados portadores da condição genética *Cri Du Chat* (CDC, $n = 16$) e não portadores (CTL $n = 17$). No geral, 76 metabólitos foram identificados putativamente, incluindo ácidos orgânicos contendo ou não nitrogênio na estrutura, grupo hidróxido e grupo oxo.

Os valores de intensidade foram subtraídos pela intensidade do branco, e os dados faltantes (*missing values*) foram substituídos pelo valor de menor intensidade entre os grupos controle. Os dados foram escalados por Pareto para minimizar a influência das variáveis dominantes e o gráfico de PCA foi construído (Figura 2.6).

Como observado na Figura 2.6, não houve efetiva separação ou agrupamento das amostras de urina no gráfico de *scores* que pudesse distinguir as duas classes como CDC e CTL. Ademais, considerando as duas componentes principais PC1 e PC2 apenas 42,6% da variância total dos dados foi explicada, sendo 32,2% da variância total descrita pela PC1, e 10,4% descrita pela PC2. Esse comportamento era esperado devido à complexidade da urina como matriz biológica, bem como a variabilidade biológica devido à diferença no metabolismo ocasionada pelos diferentes hábitos alimentares e diferentes estilos de vida dos indivíduos (WESTERHUIS et al., 2010).

Pode-se observar também que não houve um bom agrupamento entre as amostras do QC, o que indica instabilidade da instrumentação analítica para a análise do perfil metabólico de ácidos orgânicos em amostras de urina (MASTRANGELO et al., 2015).

Figura 2.7 Intensidade do íon m/z 57, referente ao padrão interno hexadecano.

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software* eRah.

Figura 2.8 Gráfico de scores da análise de componentes principais (PCA) para os ácidos orgânicos das amostras de urina de indivíduos portadores de *Cri Du Chat* (CDC) e controles/não portadores (CTL) após normalização pelo padrão interno: pontos em vermelho são referentes aos *quality controls* (QCs).

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software* XLSTAT.

Conforme apresentado na Figura 2.8, após a normalização pela intensidade do padrão interno, a variabilidade analítica dos oito QCs foi menor em relação à apresentada na Figura 2.6, o que resulta em dados com boa precisão entre as análises cromatográficas e garantia de que qualquer variação na intensidade dos metabólitos seja relacionada à alteração da condição biológica estudada e não a erros sistemáticos.

Notou-se ainda que a amostra CDC47, referente à urina de um portador de *Cri Du Chat*, apresentou um comportamento diferenciado, localizando-se mais distante das outras amostras. Porém, a referida amostra foi mantida na análise multivariada uma vez que não há informações clínicas suficientes que a classifique como um *outlier*.

Uma vez que a PCA não foi suficiente para uma discriminação entre os grupos CDC *versus* CTL, o método supervisionado de regressão baseado na análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Square-Discriminant Analysis*) foi usado para modelar as diferenças entre os metabólitos responsáveis pela separação entre os grupos. Como mostrado na Figura 2.9, ocorreu evidente separação entre os dois grupos

avaliados quando o modelo de PLS-DA foi aplicado, sugerindo alteração no perfil metabólico de ácidos orgânicos entre as diferentes condições biológicas estudadas.

Os valores acumulados do modelo PLS-DA com 4 variáveis latentes das variâncias explicadas foram $R^2X = 0,538$ e $R^2Y = 0,953$, e para variância predita $Q^2Y = 0,699$, o que mostra o adequado ajuste dos dados ao modelo.

Figura 2.9 Gráfico de PLS-DA das amostras de urina de portadores (CDC) e não-portadores da síndrome (CTL) *Cri Du Chat*.

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software* XLSTAT.

O modelo PLS-DA foi validado utilizando o método de validação cruzada *k-fold* (*5-fold cross-validation*), em que o conjunto total de amostras foi dividida em 5 grupos de validação e de teste, e o modelo foi predito por repetição até que todas as amostras estivessem no grupo de teste uma vez e apenas uma (WESTERHUIS et al., 2008). Com esse modelo, 77% ($\pm 9\%$) das amostras foram preditas corretamente, sugerindo a ausência de *overfitting* do modelo supervisionado.

Consequentemente, as variáveis com valores de VIP maiores que 1,0 foram selecionadas e classificadas como as responsáveis pela separação e discriminação dos dois grupos formados no gráfico de PLS-DA referentes às amostras de urina dos portadores de CDC e dos controles (CTL). Após a verificação dos valores de VIP, o teste estatístico univariado não-paramétrico

Mann-Whitney foi realizado para obter os p -valores dos metabólitos ácidos orgânicos que refletem uma mudança significativa entre as duas diferentes condições biológicas.

A normalidade de distribuição dos dados foi verificada usando os testes de *Shapiro-Wilk* e *Lillefors*, os quais obtiveram-se valores de $p < 0,0001$ para ambos os testes. Assim, como o p -valor calculado foi menor que o nível de significância de 95% ($p = 0,05$), deve-se rejeitar a hipótese nula (H_0 : a variável da qual a amostra foi extraída segue uma distribuição normal) em favor da hipótese alternativa (H_a : a variável da qual a amostra foi extraída não segue uma distribuição normal). Logo, torna-se conveniente aplicar um teste estatístico univariado não-paramétrico, como o teste de *Mann-Whitney*.

Deste modo, nove metabólitos apresentaram valores de $VIP \geq 1,0$ e p -valores $\leq 0,05$ (ácido tricarbalílico, ácido indoleacético, ácido antranílico, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido 4-hidroxihipúrico, ácido pantotênico, ácido homovalínico e ácido vanililmandélico), identificando-os como potenciais biomarcadores da condição genética *Cri Du Chat*.

A Tabela 2.2 apresenta o nome do metabólito identificado putativamente, três íons fragmentos m/z em maior intensidade no espectro de massa, os valores de VIP , os p -valores do teste- t não-paramétrico *Mann-Whitney* das intensidades normalizadas pelo padrão interno, *fold change* calculado a partir da razão da média das intensidades normalizadas pelo padrão interno das amostras do grupo CDC e grupo CTL, coeficiente de variação baseado nas amostras de *quality control* (%CV-QC)

Tabela 2.2 Ácidos orgânicos identificados putativamente, em suas formas trimetilsililadas e/ou metoximadas, responsáveis pela discriminação entre os grupos CDC e CTL: íons m/z em negrito correspondem ao pico base; t_R é o tempo de retenção do metabólito; $LTPRI_{(calc.)}$ e $LTPRI_{(lit)}$ são as siglas em inglês para índice de retenção com programação linear de temperatura (*Linear Temperature Programmed Retention Indexes*) calculado e da literatura, respectivamente; código HMDB; $VIP \geq 1,0$, p -valores $\leq 0,05$, % *fold change* e coeficientes de variação baseados em *quality control* (%CV-QC)

Metabólito	Código HMDB	m/z	t_R (min)	$LTPRI$ (calc.)	$LTPRI$ (lit)	% Erro $LTPRI$	VIP	p-valor	% <i>fold change</i>	%CV-QC
Ácido antranílico	HMDB0001123	194 , 120, 119	14,39	1478	1503	1,69	1,2	0,003	57,9	20,7
Ácido 4-hidroxibenzóico	HMDB0000500	267 , 223, 193	17,11	1625	1635	0,60	1,1	0,005	44,2	6,0
Ácido 4-hidroxifenilacético	HMDB0000020	252 , 179, 296	17,35	1639	1648	0,56	1,1	0,002	47,3	4,8
Ácido tricarbalílico	HMDB0031193	377 , 185, 217	19,14	1742	1732	-0,58	1,5	0,009	68,0	7,6
Ácido homovanílico	HMDB0000118	209 , 326, 311	19,81	1783	1785	0,13	1,0	0,041	35,2	8,4
Ácido vanililmandélico	HMDB0000291	297 , 298, 299	21,79	1905	1903	-0,10	1,0	0,049	37,3	4,4
Ácido indolacético	HMDB0000197	130 , 247, 232	23,08	1936	1941	0,28	1,4	0,002	66,1	3,2
Ácido pantotênico	HMDB0000210	103 , 291, 117	23,62	2023	2024	0,04	1,0	0,012	33,4	8,9
Ácido 4-hidroxihipúrico	HMDB0013678	193 , 294, 194	26,96	2251	2233	-0,82	1,0	0,012	32,4	7,3

FONTE: Autoria própria.

O aumento ou diminuição da concentração dos ácidos orgânicos representadas pelas intensidades dos íons extraídos foi avaliada por análise de % *fold changes*. Os nove metabólitos alterados apresentaram valores de % *fold changes* entre 32,4% a 68,0%, mostrando que as intensidades relativas dos metabólitos ácido tricarbálico, ácido indoleacético, ácido antranílico, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido 4-hidroxihipúrico, ácido pantotênico, ácido homovalínico e ácido vanililmandélico são aumentadas nas amostras de urina dos portadores de CDC comparados às amostras dos controles CTL.

A Figura 2.10 mostra os *box plots* das intensidades normalizadas dos ácidos orgânicos alterados significativamente entre os grupos CDC e CTL, com seus respectivos *p*-valores, corroborando aos dados de *fold changes*.

Figura 2.10 *Box plots* da variação das intensidades dos ácidos orgânicos em urina de portadores de *Cri Du Chat* (CDC) e controles (CTL) com seus respectivos *p*-valores: + representa a média aritmética do conjunto de dados; o representa *outlier*.

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software* XLSTAT.

4.2 Análise das vias metabólicas afetadas pela síndrome CDC

A análise das vias metabólicas (*metabolic pathways*) foi conduzida a partir dos nove metabólitos ácidos orgânicos estatisticamente significativos (valor de VIP $\geq 1,0$ e p -valor $\leq 0,05$) identificados e responsáveis pela discriminação dos grupos CDC e CTL, com o auxílio dos *softwares online* MetaboAnalyst 3.0 e KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), para avaliar a perturbação das vias metabólicas ocasionada pela síndrome do *Cri Du Chat*. Para aumentar a especificidade dos resultados das vias metabólicas, o organismo selecionado no banco de dados da KEGG foi o *Homo Sapiens*.

O gráfico de impacto representado pela Figura 2.11 mostra que os 9 metabólitos alterados devido à síndrome genética estão envolvidos em 8 vias metabólicas que consistem no metabolismo da tirosina, metabolismo da fenilalanina, metabolismo do triptofano, biossíntese da fenilalanina-tirosina-triptofano, biossíntese do pantotenato e da coenzima A (CoA), metabolismo da beta-alanina, biossíntese da ubiquinona e outros terpenoides e quinonas e metabolismo do nitrogênio. Porém, apenas três vias metabólicas obtiveram p -valor $\leq 0,05$, considerando no mínimo dois metabólitos por cada via, sendo elas: metabolismo da tirosina ($p = 0,002$), metabolismo da fenilalanina ($p = 0,009$), metabolismo do triptofano ($p = 0,026$).

Figura 2. 11

Gráfico de impacto das vias metabólicas identificadas a partir da alteração estatisticamente significativa de ácidos orgânicos urinários entre os grupos de portadores e não portadores de *Cri Du Chat*. Círculos de cor laranja representam maiores impactos nos metabolismos mencionados ($p \leq 0,05$); Apenas as 3 vias metabólicas com $p \leq 0,05$ foram destacadas.

FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma *online Metaboanalyst 4.0* (disponível em: <https://www.metaboanalyst.ca>).

Das três vias metabólicas alteradas significativamente, apenas seis metabólitos foram responsáveis pela alteração no metabolismo de portadores e não portadores da síndrome CDC, sendo eles o ácido 4-hidroxifenilacético, o ácido vanililmandélico e o ácido homovanílico, envolvidos no metabolismo da tirosina; os ácidos 4-hidroxibenzoico e 4-hidroxifenilacético, envolvidos no metabolismo da fenilalanina; e os ácidos antranílico e indolacético, envolvidos no metabolismo do triptofano. A Figura 2.12 mostra o envolvimento dos metabólitos mencionados e suas respectivas reações bioquímicas dentro das vias metabólicas alteradas.

O metabolismo da tirosina foi a via metabólica mais impactada, com três metabólitos alterados (ácido 4-hidroxifenilacético, ácido homovanílico e ácido vanililmandélico) em altas intensidades na urina dos portadores de CDC em relação aos controles. Furtado et al. (2017) determinaram as concentrações de tirosina em plasmas de portadores de CDC e controles, e encontraram baixos níveis do aminoácido nas amostras de CDC quando comparados com as amostras do grupo controle. Sendo assim, sugeriram que o baixo nível de tirosina afeta a biossíntese de catecolaminas em portadores de *Cri Du Chat* (FURTADO et al., 2017).

Neste trabalho, a alteração na biossíntese das catecolaminas (epinefrina, norepinefrina e dopamina) pode ser observada pelos altos níveis dos metabólitos ácido homovanílico e ácido vanililmandélico detectados na urina de portadores da condição genética CDC. Os níveis alterados desses metabólitos podem ser resultados da conversão da dopamina pelas enzimas monoamina oxidase (MAO) e dopamina β -hidroxilase (DBH), o que resulta em disfunções neurotransmissoras que podem explicar alterações na atividade motora, mudança de humor, déficit de atenção e hiperatividade (KAPUR; MANN, 1992; KOBAYASHI, 2001), características comumente observadas em portadores de CDC.

O ácido 4-hidroxifenilacético está envolvido no metabolismo da tirosina como produto da oxidação da tiramina, uma amina endógena biossintetizada do aminoácido tirosina sob a atividade da enzima L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC) ou disposta de forma exógena, por ser composto encontrado em alimentos (HIROI, 1998; WASSENBERG et al., 2010). Os altos níveis do ácido 4-hidroxifenilacético detectados nas amostras de urina dos portadores de CDC podem estar relacionados à metabolização da tiramina pela ação da MAO, o que reforça a desregulação dessa enzima no metabolismo da tirosina nos portadores da síndrome. Todavia, a quantificação dessas enzimas e de outros metabólitos como aminoácidos e dopamina podem auxiliar para o melhor entendimento das alterações das reações bioquímicas relacionadas à síndrome genética estudada.

O metabolismo do triptofano é afetado em diversas condições médicas e, consequentemente, o triptofano e seus derivados metabólitos têm diversos efeitos nos sistemas endócrinos e metabólicos (BENDER, 1982). Durante a via biossintética, o ácido indolacético é gerado como produto da degradação do triptofano sob a ação das bactérias presentes no intestino, ou através de processos endógenos pela desaminação oxidativa da triptamina mediada pela enzima monoamina oxidase (FERRARI et al., 2014).

Alta concentração do ácido indolacético foi encontrada na urina de portadores de CDC. Esse aumento pode estar relacionado ao metabolismo bacteriano do triptofano no lúmen

intestinal, que sob condições alteradas de absorção do triptofano, o ácido indolacético é formado em altas quantidades, podendo ser absorvido pelo intestino grosso e ser excretado na urina, ou a sua formação pode ocorrer após um usual processo de conjugação no fígado (BENDER, 1982).

Altos níveis do ácido indolacético já foram relacionados a sintomas de ansiedade e depressão em pacientes com doença crônica no rim (KARU et al., 2016), e que a presença desse metabólito no cérebro gerado durante o metabolismo do triptofano pode contribuir com o surgimento de doenças neurodegenerativas (FERRARI et al., 2014), características comumente observadas em portadores da condição genética CDC.

Outro metabólito relacionado ao metabolismo do triptofano e que também apresentou diferença significativa entre os grupos foi o ácido antranílico. Sua produção ocorre na via metabólica da quinurenina, na qual o triptofano é convertido a N-formilquinurenina por meio das enzimas indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) ou triptofano 2,3-dioxigenase (TDO), ambas responsáveis pela formação de metabólitos que modulam as atividades dos sistemas imune, reprodutivo e nervoso central (VERDIN, 2015).

A quinurenina, formada pela rápida ação da enzima formamidase na conversão da N-formilquinurenina, é posteriormente catabolizada a ácido antranílico pela quinureninase. Assim, pode-se inferir em um aumento na circulação da enzima quinurenina ou um aumento da sua atividade e, conseqüentemente, maior conversão do metabólito quinurenina à ácido antranílico devido à condição genética CDC, ou também a redução na atividade da enzima quinurenina-3-monooxigenase que pode favorecer preferencialmente a formação do ácido antranílico no metabolismo do triptofano (CHRISTENSEN et al., 2018), e posteriormente eliminado na urina.

Essas observações podem estar correlacionadas à presença do ácido quinolínico, um metabólito presente na via metabólica da quinurenina, que embora não tenha apresentado variação estatística significativa na intensidade dos sinais entre os grupos CTL e CDC (VIP = 1,0; p -valor = 0,488), pode ser utilizada para correlação com a formação preferencial do ácido antranílico conforme o aumento da circulação e alta atividade da enzima quinureninase, desfavorecendo a conversão de outros metabólitos *downstream* à quinurenina.

O ácido 4-hidroxibenzóico é um derivado da tirosina através de um conjunto de reações bioquímicas não totalmente elucidada, e que participa como precursor na biossíntese da ubiquinona (coenzima Q10), uma molécula lipofílica que desempenha uma função importante na mitocôndria como transportadora de elétrons da cadeia respiratória (ACOSTA et al., 2016,

PIERREL, 2017). As altas intensidades do metabólito ácido 4-hidroxibenzóico na urina de portadores de CDC poderiam ser indicativas de alteração na biossíntese da ubiquinona devido à condição genética. Já foi relatado que a produção de energia via ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) é afetada quando a coenzima Q10 é inadequada, resultando na determinação de altas concentrações de ácido succínico em urina (KAŁUŻNA-CZAPLIŃSKA, 2011).

Entretanto, não houve diferença significativa do metabólito ácido succínico entre os grupos CDC e CTL (VIP = 1,1; p -valor = 0,087), sugerindo que a biossíntese e a atividade da ubiquinona não são alteradas pela condição genética CDC, e que os níveis alterados do ácido 4-hidroxibenzóico podem ser resultantes da transformação de polifenóis pela microflora intestinal. Essa informação pode ser reforçada pela presença em maiores intensidades nas amostras de urina, no presente trabalho, do metabólito ácido 4-hidroxihipúrico, outro produto final do metabolismo de polifenóis pela microflora intestinal. Já foram relatadas alterações em maiores concentrações dos ácidos 4-hidroxibenzóico e 4-hidroxihipúrico como produtos de transformação microbiana intestinal devido à inclusão proposital de polifenóis na dieta de ratos e humanos (GONTHIER et al, 2003; JACOBS et al., 2012).

O ácido pantotênico, ou vitamina B5, é requerido na síntese da coenzima A (CoA), uma molécula importante no metabolismo energético para o piruvato entrar no ciclo de Krebs como acetil-CoA, e para o α -cetoglutarato ser transformado em succinil-CoA no referido ciclo (SALWAY, 2013). Assim, as maiores intensidades do composto encontradas na urina dos portadores de CDC podem ser correlacionadas a uma dieta rica em ácido pantotênico por esse grupo, fazendo com que quantidade suficiente do composto seja utilizada para ativação do ciclo de Krebs e o excesso excretado intacto na urina, o que corrobora as concentrações normais de ácido succínico (sem diferença significativa) entre os grupos CDC e CTL nesse trabalho.

Outro composto alterado em altas intensidades foi o ácido tricarbalílico (ácido 1,2,3-propanocarboxílico), um metabólito que participa no ciclo de Krebs como um inibidor da enzima aconitase (HU et al., 2018). Dessa forma, pode-se inferir que a determinação do ácido tricarbalílico em maior intensidade nas amostras de urina dos portadores de CDC deve ser resultado de sua maior circulação no organismo, o que influencia na interconversão dos ácidos cítrico, cis-aconítico e isocítrico, dificultando assim a produção e a liberação de energia na célula por essa via.

5 CONCLUSÕES

Neste capítulo, alterações nos perfis metabólicos de ácidos orgânicos em urina de não portadores (CTL) e portadores da síndrome genética *Cri Du Chat* (CDC) foram avaliadas através de abordagem metabolômica *untargeted* utilizando cromatografia a gás e espectrometria de massas (GC-MS).

Previamente à utilização da abordagem metabolômica, alguns métodos de extração de ácidos orgânicos foram avaliados. Com isso, pode-se inferir que a adequação do procedimento de extração líquido-líquido mostrou ser uma etapa importante para se obter um método capaz de identificar um maior número de metabólitos com alta intensidade e alta reprodutibilidade entre as análises cromatográficas; e as análises estatísticas multivariadas não-supervisionadas PCA e HCA foram ferramentas quimiométricas indispensáveis para seleção do melhor método de extração quando múltiplos analitos estão envolvidos.

Ácidos orgânicos foram selecionados por estarem envolvidos em diversas vias metabólicas, e assim, quaisquer variações em seus níveis podem indicar disfunções e insuficiências na atividade de diversas enzimas, bem como alterações em diversos processos metabólicos.

Deste modo, a análise de ácidos orgânicos por GC-MS e a aplicação da abordagem metabolômica permitiram identificar nove metabólitos em níveis mais elevados no grupo de amostras de urina dos portadores de CDC comparados ao grupo CTL (ácido tricarbálico, ácido indolacético, ácido antranílico, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 4-hidroxihipúrico, ácido pantotênico, ácido homovanílico e ácido vanililmandélico), o que mostra a eficácia das estratégias bioanalíticas para detectar prováveis alterações, em nível molecular, devido à síndrome.

A partir da análise das vias metabólicas foi possível entender as alterações metabólicas e os impactos no metabolismo resultantes da síndrome CDC. Tem-se que, dentre os nove metabólitos ácidos orgânicos identificados em níveis elevados na urina de portadores de CDC, seis impactam significativamente no metabolismo da tirosina (ácido 4-hidroxifenilacético, ácido vanililmandélico e ácido homovanílico), no metabolismo da fenilalanina (ácido 4-hidroxibenzoico e ácido 4-hidroxifenilacético) e no metabolismo do triptofano (ácido antranílico e ácido indolacético). Estes impactos foram associados a alterações neuropsiquiátricas comumente observadas em portadores de CDC, à atividade de transformação da microbiota intestinal, e à deficiência na atividade enzimática nos portadores de CDC.

Portanto, os dados e resultados apresentados neste capítulo podem contribuir para o desenvolvimento de terapias que visem estimular o desenvolvimento cognitivo e comportamental dos portadores de CDC, com intervenções médicas e farmacológicas apropriadas, ou terapias alternativas para reduzir os sintomas da síndrome.

Contudo, medidas da concentração e da atividade das enzimas envolvidas na biossíntese e transformação de metabólitos em determinadas vias metabólicas devem ser realizadas para corroborar os resultados encontrados neste trabalho, bem como para fornecer uma melhor compreensão de alguns estágios das vias biológicas perturbadas por esta síndrome.

Capítulo 3

Avaliação do *fingerprinting* metabólico da urina depositada em papel filtro

1 INTRODUÇÃO

1.1 Uso de papel filtro para coleta de biofluidos

Atualmente, o modo mais comum de armazenar fluidos biológicos com a finalidade da determinação de drogas ou biomarcadores de patologias é através da coleta de volumes (mililitros) da amostra biológica em tubos, que por sua vez é levada a um laboratório especializado para execução de análises qualitativas e quantitativas. Porém, esse procedimento agrega desvantagens tanto econômicas quanto operacionais, uma vez que necessita de treinamento apropriado para orientar a coleta ou até mesmo coletar (urina e sangue, respectivamente), uso de reagentes e padrões para conservação da amostra, necessidade de armazenamento com condições adequadas anterior à análise e gastos com transporte de materiais biológicos quando as medidas não são realizadas no local da coleta.

No quesito biológico, o procedimento convencional para coleta de sangue, por exemplo, além de consistir em uma prática consideravelmente invasiva (Figura 3.1a), torna-se inviável para coletas sucessivas desse fluido biológico em neonatos e em experimentação que se utilizam animais cobaias, devido ao volume reduzido de sangue (HENION et al., 2013).

Em relação ao modo convencional de coleta de urina, apesar de ser bastante simples e que pode ser realizada em casa, desde que sejam seguidas as corretas instruções, requer um volume considerável da amostra e que seja armazenada em recipientes resistentes ao vazamento, principalmente quando a amostra deve ser transportada para longas distâncias (Figura 3.1b). Ademais, a água é um meio que muitas reações de decomposição química acontecem, o que torna indispensável obter meios adequados de armazenamento que garantam a estabilidade química da amostra, como o uso de temperaturas baixas (ANTUNES; NIEDERAUER; LINDEN, 2013).

Figura 3.1 Modos convencionais de coleta e armazenamento de fluidos biológicos: a) sangue; b) urina.

FONTE: Adaptado de Hyperscience (Disponível em <https://hyperscience.com>).

Diante do exposto, existem alternativas aos procedimentos atuais de coleta e armazenamento de biofluidos como sangue, plasma e urina, e que vem ganhando destaque pela sua eficiência em conservação da amostra, manutenção do seu perfil químico e necessidade de volume reduzido, que é a utilização de membranas porosas como por exemplo, papel filtro. A técnica consiste na impregnação dos referidos fluidos biológicos no papel e, após secagem, os compostos endógenos e/ou exógenos podem ser extraídos e analisados quantitativamente (BALCÁZAR; MEESTERS, 2014) (Figura 3.2).

Figura 3.2 Coleta de fluidos biológicos a) sangue e b) urina em papel filtro.

FONTE: Adaptado de Drug Detection Technology (Disponível em <http://www.drugdetection.co.za/dried-blood-spots-2221.html>) e DLE Genética Humana e Doenças Raras (Disponível em <https://dle.com.br/dle-collect/dle-collect-filter-paper/807-instrucoes-de-coleta-de-urina-em-papel-filtro>).

Essa técnica foi popularizada pela impregnação de um pequeno volume de sangue em papel filtro (cartão Guthrie) como teste para avaliação de erros inatos do metabolismo, como a fenilcetonúria, e foi difundida pela comunidade científica como teste da mancha de sangue seco (DBS, do inglês *dried blood spot*) (PARKER; CUBITT, 1999). Assim, a realização da

coleta por DBS é pouco invasiva e fácil, consistindo em uma pequena picada no dedo em adultos, ou no calcanhar em neonatos; requer mínimo treinamento, podendo-se realizar em casa; necessidade de pequeno volume de amostra (30 a 100 μ L por mancha). As amostras em DBS podem ser transportadas via correios para laboratórios clínicos ou bioanalíticos sem a necessidade de gastos adicionais como manutenção de baixas temperaturas para a conservação da amostra durante o transporte (DROLET et al., 2017).

Desde então, essa técnica tem sido comumente utilizada na coleta de sangue em estudos que variam desde testes farmacocinéticos clínicos à determinação de biomarcadores de distúrbios metabólicos que afetam neonatos (SPOONER et al., 2009; ADAM et al., 2011). Neste último, a grande vantagem do uso da técnica é a utilização de volumes reduzidos da amostra (μ L), sendo viável para testes clínicos que requerem sucessivas coletas em neonatos (HENION et al., 2013).

1.2 Urina seca em papel filtro

Outro procedimento similar que vem ganhando destaque é análise de urina seca em papel filtro, denominado tiras de urina seca (DUS, do inglês *dried urine strips*). Utilizando-se a DUS como matriz analítica e avaliando-se sua viabilidade para uso e expansão do diagnóstico clínico de diversos distúrbios metabólicos destaca-se o trabalho de Kuhara (2001), que desenvolveu um método para determinação de metabólitos de diferentes classes químicas e alvos de 22 erros inatos do metabolismo que afetam neonatos, como deficiência nas enzimas *ornithine carbamoyl transferase*, *fructose-1,6-bisphosphatase* e *succinic semialdehyde dehydrogenase*, bem como diagnóstico de homocisteinúria (KUHARA, 2001).

Nos últimos anos, a DUS tem sido utilizada em diversas aplicações como na determinação da concentração urinária de creatinina (BALCÁZAR;MEESTERS, 2014), para testes diagnósticos do papilomavirus humano (HPV) (FRATI et al., 2015) e para a determinação de metilcitrato como biomarcador de um grupo de distúrbios do metabolismo que incluem a acidemia propiônica, a acidúria metilmalônica e dos efeitos de cobalaminas (DHAHOURI et al., 2018).

Poucos estudos são encontrados quando o objetivo é utilizar a DUS para a determinação de metabólitos de múltiplas classes químicas e visando a sua aplicação em estudos metabolômicos. Dentre eles, destaca-se o trabalho de Michopoulos et al. (2010) que investigaram a viabilidade do uso da técnica da urina depositada e seca em papel filtro quanto

à estabilidade de seus metabólitos para aplicação em estudos metabolômicos *untargeted*, utilizando UHPLC-MS como técnica analítica. Os autores concluíram que o uso da técnica DUS é uma boa alternativa à técnica convencional de coleta de líquidos para obtenção de perfis metabólicos (MICHPOULOS et al., 2010).

Com o objetivo de se investigar diferenças entre dois tipos de técnicas de amostras, DUS e urina líquida foram avaliadas e comparadas quanto à sua aplicabilidade em estudos metabolômicos. A estabilidade das amostras foi avaliada conforme diferentes temperaturas de armazenamento (–20 °C, 25 °C e 37 °C) e em três tempos distintos (três dias, uma semana e duas semanas), e os metabólitos analisados por GC-MS e HILIC-LC-MS/MS. Mudanças significativas em diferentes classes de metabólitos foram observadas quando as amostras foram armazenadas em temperaturas elevadas mesmo em menores tempos de armazenamento, exceto para a classe de ácidos orgânicos quando DUS foi utilizada. Os autores concluíram que a metodologia contribui para a expansão das demandas bioanalíticas em estudos de saúde e medicina de precisão (DROLET et al., 2017).

Entretanto, existe uma resistência para transferência e adaptação do método de coleta e armazenamento de biofluidos em papel filtro, e para avaliar a possibilidade do uso de biofluidos coletados em papel filtro a comparação de resultados analíticos obtidos pelo método de coleta convencional com os dados obtidos da coleta em papel parece ser uma alternativa viável para inclusão e aceitação de metodologias alternativas em bioanalítica (WICKREMSINHE et al., 2013; BALCÁZAR; MEESTERS, 2014).

1.3 Papel filtro e interação com biomoléculas

Papel é produzido a partir de fibras de madeira, cujo principal componente é a celulose, um polissacarídeo de fórmula química $(C_6H_{10}O_5)_n$ em que cada unidade de repetição contém duas unidades de glicose e seis grupos hidroxilas que se ligam umas às outras através de forças moleculares, tais como ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, resultando em uma rede tridimensional de elevada força mecânica (NELSON; COX, 2002). A Figura 3.3 mostra a estrutura monomérica do polímero celulose.

Figura 3.3 Estrutura monomérica do polímero celulose.

FONTE: Autoria própria, utilizando o *software ACD/Chem Sketch 2.5*.

O papel filtro é uma barreira semipermeável em que cuja classificação é baseada nos seguintes aspectos: a) habilidade das fibras em se manterem juntas na presença de um substrato sólido; b) porosidade; c) habilidade para reter o substrato; d) velocidade de fluxo material através do papel; e) capacidade para absorver o substrato e f) compatibilidade química. Sua utilização em DBS ou DUS não é como uma barreira, mas como um meio absorvente do substrato (HENION et al., 2013).

O mecanismo de interação de biomoléculas em papel filtro foi descrito por Henion et al. (2013) em seu artigo de revisão. Os grupos hidroxilas presentes na estrutura da celulose, principal constituinte do papel filtro, interagem por ligação de hidrogênio com água e substratos hidrofílicos como biomoléculas de alta massa molecular (DNA e proteínas), moléculas de baixa massa molecular (metabólitos) e eletrólitos presentes em fluidos biológicos, ocorrendo a quebra da ligação de hidrogênio intramolecular e um inchaço das fibras do papel é observado. À medida que a água é evaporada ocorre a contração dessas fibras e os compostos hidrofílicos presentes no meio interagem mais fortemente com as hidroxilas da estrutura polimérica (HENION et al., 2013).

A Figura 3.4 mostra como uma molécula de aminoácido e de água interagem por ligação de hidrogênio com a celulose, e sugerem ser esse o mecanismo de estabilização de pequenas moléculas nas fibras do papel filtro.

Figura 3.4 Mecanismos de interação de metabólitos em papel. a) Estrutura química da celulose seca (sem a presença de metabólitos); b) interação de metabólitos com grupos funcionais da celulose; c) estrutura da celulose com metabólitos impregnados e após evaporação da água.

FONTE: Adaptado de Henion et al., 2013.

A partir do entendimento da interação de biomoléculas na estrutura do papel, pode-se inferir no potencial deste meio polimérico para conservação de biofluidos. Deste modo, neste capítulo, a conservação e estabilidade da urina depositada e seca em papel filtro foram avaliadas ao longo do tempo e diferentes temperaturas de armazenamento, como um método alternativo de coleta deste fluido biológico para aplicações em bioanalítica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil global de metabólitos em amostras de urina seca depositadas em papel Whatman 903[®] sob diferentes condições de armazenamento, por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), visando a análise de multianalitos/multibiomarcadores.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar os *fingerprinting* metabólicos da urina depositada e seca em papel filtro com a urina líquida;
- Avaliar diferentes condições de temperatura e de tempo para conservação dos metabólitos da urina seca depositada em papel;
- Viabilizar o uso do papel Whatman 903[®] para determinação de metabólitos alterados significativamente devido à síndrome genética *Cri Du Chat*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo da amostra e extração dos metabólitos da urina impregnada em papel Whatman 903®

O procedimento de extração foi adaptado do realizado por Kuhara (2001), com algumas modificações nas dimensões do papel filtro, na forma de adição de urina ao papel e na coleta do volume final do eluato. Dessa forma, 200 μL de uma mistura de igual volume de urina (*pool*) de sete voluntários não portadores de *Cri Du Chat* foram adicionados a um papel filtro de 1,4 cm $\times$ 2,5 cm (Whatman® 903) e secos em temperatura ambiente (25 °C) por 4 h. Após secagem, os papéis foram armazenados em sacos plásticos vedados e dali retirados para análise do *fingerprinting* metabólico após 1, 5, 10 e 30 dias, com a finalidade de se avaliar o efeito do tempo e da temperatura de armazenamento (25 °C e -20 °C) na estabilidade da amostra.

Os componentes da urina solúveis em água foram eluídos com 1,0 mL de água deionizada, permanecendo em contato por 5 min; após esse tempo, um volume de 600 μL foi recuperado (Figura 3.5) e armazenado em tubo plástico do tipo Eppendorf.

Figura 3.5 Procedimento geral de deposição e secagem de urina em papel com posterior eluição: (a) Papel Whatman® 903 (dimensões: 1,4 cm $\times$ 2,5 cm); (b) adição de 200 μL de urina no papel; (c) armazenamento em sacos plásticos em condições específicas; d) eluição dos componentes da urina solúveis em água; e) coleta do eluato.

FONTE: Autoria própria.

Foram adicionadas 200 U mL⁻¹ de urease ao eluato e submetidas a agitação em *shaker*, por 1 h e na temperatura de 37 °C para degradação da ureia. Posteriormente, 400 μL de metanol

foi adicionado à amostra para precipitar as proteínas, e então foi submetida a agitação em vórtex por 30 s, mantida em temperatura de 4 °C por 20 min e centrifugada a 8000 rpm por 8 min.

Duzentos microlitros do sobrenadante foram evaporados completamente usando nitrogênio N₂ e foram inicialmente derivatizados com 25 µL da solução de cloridrato de metoxiamina (MeOx) em piridina (20 mg mL⁻¹), por 2 h, sob agitação em *shaker* (300 rpm; aprox. 12 G) e em temperatura de 60 °C. Posteriormente, 25 µL de MSTFA (N-metil-N-trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano) foram adicionados para sililação dos metabólitos e submetidos a mais 2 h de agitação, em temperatura de 60 °C.

As amostras derivadas foram resfriadas à temperatura ambiente (25 °C ± 1) e 10 µL de hexadecano (C₁₆H₃₄) preparado em hexano na concentração de 100 mg L⁻¹ foram adicionados antes da análise cromatográfica, como padrão interno, para avaliar o desempenho da injeção automática. Todas as amostras foram analisadas por cromatografia acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

3.2 Condições de análise por GC-MS

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas, série GCMS-QP2010 Ultra da Shimadzu, e auto injetor AOC-20i. Um microlitro (1 µL) das amostras derivadas foi injetado em modo *split* (1:25), temperatura do injetor mantida em 250 °C, gás hélio (99,999% de pureza) foi usado como gás de arraste na vazão 1,0 mL min⁻¹. A coluna cromatográfica capilar usada foi a Rtx-5MS (5% difenil-95% dimetilpolisiloxano, 30 m × 250 µm d.i. × 0,25 µm de espessura do filme) da Restek, EUA. A temperatura inicial do forno foi de 80 °C, mantida por 1 min, seguida pela rampa linear de 6 °C min⁻¹ até 300 °C, então mantida por 3,33 min. O espectrômetro de massas foi operado utilizando-se ionização por elétrons em 70 eV, modo *full scan* de análise na faixa de 45-600 *m/z*, com taxa de aquisição de 2,5 scan s⁻¹, tempo de *delay* 4,0 min e temperaturas da fonte de íons e da interface em 250 e 290 °C, respectivamente.

3.3 Pré-processamento dos dados

Os dados cromatográficos obtidos foram pré-processados conforme descrito na seção 3.6 dos capítulos 1 e 2. Desse modo, a desconvolução espectral (setDecPar (min.peak.width = 2, min.peak.height = 1000, noise.threshold = 500, avoid.processing.mz = c(73:75, 147:149)),

alinhamento espectral (setAlPar (min.spectra.cor = 0.90, max.time.dist = 3, mz.range = 45:600)), e recuperação de dados faltantes de 50% entre os grupos das amostras foram os parâmetros utilizados (DOMINGO-ALMENARA et al., 2016).

3.4. Processamento dos dados e identificação dos metabólitos

Os íons m/z (*features*) de maiores intensidades com seus respectivos tempos de retenção foram dispostos em uma matriz de dados utilizando Microsoft Excel 2016, tendo as intensidades dos metabólitos identificados subtraídas pela intensidade média dos brancos. As análises foram realizadas em triplicata, e os metabólitos foram excluídos quando suas intensidades foram iguais a zero ou negativas após subtração com os brancos. O algoritmo *k-nearest neighbor* (KNN) foi aplicado aos dados faltantes, utilizando o *software* XLSTAT®, quando a intensidade do *feature* não foi detectada em apenas uma das replicatas. As intensidades dos metabólitos foram normalizadas pela intensidade do padrão interno hexadecano, assim como no capítulo 2.

Os metabólitos foram identificados por comparação dos espectros de massas dos picos obtidos com os espectros de massas dos compostos registrados nas bibliotecas do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e *Golm Metabolome Database* (GMD), com 80% de similaridade entre eles, com auxílio do programa *NIST Mass Spectral Search* (versão 2.0).

3.5 Análise estatística dos dados

Apenas os metabólitos cujas intensidades foram detectadas entre as triplicatas e com coeficientes de variação (CV) menores que 30% em todas as condições experimentais avaliadas foram considerados para análise estatística.

A normalidade dos dados foi avaliada pelos testes de *Shapiro-Wilk* e *Lilliefors*. A variância dos dados foi avaliada utilizando o teste estatístico univariado não-paramétrico *Mann-Whitney*, no intervalo de confiança de 95%. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o *software* XLSTAT®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estabilidade das amostras de urina depositadas e secas em papel Whatman® 903 e submetidas a diferentes condições de armazenamento como temperatura e tempo foi estudada com o objetivo de utilização de uma metodologia promissora de coleta e armazenamento de fluidos biológicos para determinação simultânea de potenciais biomarcadores de distúrbios metabólicos e genéticos. Para isso, intervalos de tempo pré-determinados de 1, 5, 10 e 30 dias, nas temperaturas de -20 e 25 °C foram adotados.

Os perfis cromatográficos das amostras de urina depositadas em papel foram similares sob as diferentes condições de armazenamento. Da mesma forma, observaram-se semelhanças entre os perfis cromatográficos das amostras de urina depositadas e seca em papel da amostra de urina analisada diretamente e usada como referência (REF), mostrando que os perfis metabólicos são conservados ao longo do tempo, sob diferentes temperaturas, e utilizando a técnica de deposição e secagem da urina em papel filtro Whatman® 903 (Figura 3.3).

Figura 3.6 Cromatogramas de íons totais (TIC) das amostras de urina depositadas em papel filtro sob diferentes condições de armazenamento: D = Dia(s); REF = Amostra referência – urina líquida sem contato com papel; Branco = todos os reagentes e solventes utilizados no procedimento da seção 3.1, capítulo 3, incluindo o papel filtro Whatman® 903, exceto a urina depositada e seca.

FONTE: Autoria própria

Após o pré-processamento dos dados, uma matriz contendo 341 *features* alinhados para todas as amostras foi obtida, dentre os quais 73 metabólitos foram identificados utilizando as bibliotecas comerciais, possuindo diversificadas classes químicas como ácidos orgânicos, compostos nitrogenados e fosfatados, carboidratos e aminoácidos (Tabela 3.1).

Para facilitar a visualização de possíveis variações nos perfis metabólicos devido às diferentes condições de armazenamento, apenas os metabólitos com coeficiente de variação (CV) entre as triplicatas menores que 30% e que foram detectadas em todas as condições estudadas foram considerados para análise. Assim, 46 metabólitos de variadas classes químicas com suas respectivas áreas normalizadas e referentes aos seus íons m/z de maior intensidade foram considerados. É importante salientar que mesmo usando 63,0% dos metabólitos identificados para o estudo, ainda é um número que representa uma ampla faixa de compostos de variadas classes, uma vez que um número limitado de alvos é comumente avaliado em estudos empregando o procedimento de deposição e secagem de amostra biológica (sangue e urina) em papel filtro.

Dentre eles, destacam-se os trabalhos de Antunes, Niederauer e Linden (2013), que utilizaram amostragem DUS na determinação, validação e avaliação da aplicabilidade clínica de dois metabólitos, ácido hipúrico e creatinina, como biomarcadores da exposição ocupacional de tolueno, e o de Michelly, Meyer e Maurer (2017) que determinaram 15 drogas de diversas classes como antidepressivos, benzodiazepínicos, neurolépticos, opioides e estimulantes utilizando a técnica de DUS em comparativo à técnica convencional de coleta, os quais mostraram que a nova técnica permite o monitoramento de uma vasta faixa de drogas e seus metabólitos de diversas classes (ANTUNES;NIEDERAUER;LINDEN, 2013; MICHELY; MEYER; MAURER, 2017).

Visando verificar a normalidade dos dados obtidos, os testes de *Shapiro-Wilk* e *Lilliefors* foram aplicados. Com isso, foi obtido que os metabólitos identificados após a deposição da urina em papel filtro não seguem uma distribuição normal, uma vez que os p-valores para todas as condições de tempo e temperatura foram menores que 0,0001 ($p < 0,0001$) para os dois testes aplicados. Desse modo, um teste estatístico univariado não-paramétrico deve ser utilizado para análise da variância dos dados.

Tabela 3.1 Metabólitos identificados em todas as condições experimentais estudadas: t_R (min): tempo de retenção do composto eluído; HMDB: *Human Metabolome Database*. O asterisco (*) indica que o metabólito foi identificado em todas as condições experimentais.

t_R (min)	Metabólito	Código HMDB
5,55	Fenol (1TMS)*	HMDB0000228
5,67	Ácido láctico (2TMS)	HMDB0000190
5,73	Ácido 2-hidroxiisobutírico (2TMS)*	HMDB0000729
5,94	Ácido glicólico (2TMS)*	HMDB0000115
6,47	Alanina (2TMS)	HMDB0000161
7,05	Ácido Oxálico (2TMS)	HMDB0002329
7,42	p-Cresol (1TMS)*	HMDB0001858
7,64	Ácido 3-hidroxiisobutírico (2TMS)*	HMDB0000336
8,42	Ácido 2-metil-3-hidroxibutírico (2TMS)*	HMDB0000354
8,66	Ácido 3-hidroxiisovalérico (2TMS)*	HMDB0000754
8,83	Valina (2TMS)	HMDB0000883
9,08	Ácido 2-etil-3-hidroxipropiônico (2TMS)*	HMDB0000396
9,79	Ureia	HMDB0000294
9,90	Etanolamina (3TMS)	HMDB0000149
10,78	Glicina (3TMS)	HMDB0000123
10,88	Ácido succínico (2TMS)*	HMDB0000254
11,00	Catecol (2TMS)*	HMDB0000957
11,37	Ácido glicérico (3TMS)	HMDB0000139
11,48	Uracila (2TMS)	HMDB0000300
11,68	Ácido (R*,R*)-2,3-Dihidroxibutanoico (3TMS)*	HMDB0000498
11,89	Ácido (R*,S*)-2,3-Dihidroxibutanoico (3TMS)*	HMDB0002453
11,99	Serina (3TMS)*	HMDB0000187
12,57	Treonina (3TMS)*	HMDB0000167
12,74	Hidroquinona (2TMS)	HMDB0002434
13,08	Ácido 3-desoxitetrônico (3TMS)*	HMDB0000360
13,50	Ácido 2-desoxitetrônico (3TMS)*	HMDB0000337
13,99	Ácido 3-aminoisobutírico (3TMS)	HMDB0003911
14,29	Ácido aminomalônico (3TMS)	HMDB0001147
15,01	Eritritol/Treitol (4TMS)*	HMDB0004136
15,29	Ácido piroglutâmico (2TMS)*	HMDB0000267
15,89	Ácido treônico (4TMS)*	HMDB0000943
15,98	Creatinina (3TMS)	HMDB0000562
16,35	Ácido 2-hidroxiglutarico (3TMS)*	HMDB0000606
16,87	Ácido 3-hidróxi-3-metilglutarico (3TMS)*	HMDB0000355
17,23	Ácido 4-hidroxibenzoico (2TMS)*	HMDB0000500
17,30	Fenilalanina (2TMS)	HMDB0000159
17,46	Ácido 4-hidroxifenilacético (2TMS)*	HMDB0000020
18,05	Ácido 2-desoxipentônico (4TMS)*	HMDB0059753

		Continuação
tr (min)	Metabólito	Código HMDB
18,26	Arabinose/Xilose (MeOx, 4TMS)*	HMDB0000646
18,85	5-hidroxiindol (2TMS)	HMDB0059805
18,92	Levoglucoano (3TMS)*	HMDB0000640
19,29	Xilitol (5TMS)*	HMDB0002917
19,41	Ramnose (MeOx, 4TMS)*	HMDB0000849
19,56	Ácido aconítico (3TMS)*	HMDB0000072
19,93	Ácido homovanílico (2TMS)	HMDB0000118
20,00	Glicerol-3-fosfato (4TMS)*	HMDB0000126
20,12	Ácido 2-ceto-L-glucônico (5TMS)*	HMDB0011732
20,96	Ácido cítrico (4TMS)*	HMDB0000094
21,08	Ácido hipúrico (1TMS)*	HMDB0000714
21,30	Lisina (4TMS)	HMDB0000182
21,36	Ácido 3-(3-hidroxifenil)-3-hidroxi-propionico (3TMS)*	HMDB0002643
21,74	Ácido Quínico (5TMS)*	HMDB0003072
21,88	Tirosina (2TMS)*	HMDB0000158
22,13	Ácido glucônico 1,5-lactona (4TMS)*	HMDB0000150
22,43	Glicose (MeOx, 5TMS)*	HMDB0000122
22,94	Sorbitol/Manitol (6TMS)*	HMDB0000247
23,14	Galactitol/Dulcitol (6TMS)*	HMDB0000107
23,32	Ácido galactárico (6TMS)*	HMDB0000639
23,71	Ácido 3-hidróxi-3-(4-hidróxi-3-metoxifenil)-propanoico (3TMS)	HMDB0133486
23,75	Ácido pantotênico (3TMS)*	HMDB0000210
24,11	Ácido glucônico (6TMS)*	HMDB0000625
24,27	Ácido palmítico (1TMS)	HMDB0000220
24,31	Ácido glucárico (6TMS)	HMDB0000663
24,51	Allo-Inositol (6TMS)*	HMDB0240211
25,33	N-acetilglucosamina (4TMS)	HMDB0000803
25,44	Mio-Inositol (6TMS)*	HMDB0000211
25,95	Ácido 3-hidroxihipúrico (2TMS)	HMDB0006116
26,18	Sedoheptulose (MeOx, 6TMS)	HMDB0003219
27,20	Ácido Esteárico (1TMS)	HMDB0000827
30,37	Uridina (3TMS)	HMDB0000296
33,09	Sacarose (8TMS)	HMDB0000258
33,37	Maltose (MeOx, 8TMS)	HMDB0000163

O teste não-paramétrico univariado *Mann-Whitney* foi aplicado para avaliar a estabilidade dos analitos conforme os tempos de armazenamento (1, 5, 10 e 30 dias) em relação às duas temperaturas estudadas (–20 °C e 25 °C). Não houve diferença estatística significativa entre as intensidades dos 46 metabólitos identificados em relação ao tempo e temperatura de

armazenamento (1 dia: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vs $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; 5 dias: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vs $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; 10 dias: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vs $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; 30 dias: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vs $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Esse resultado é um indicativo de que não existe necessidade de baixas temperaturas para garantir valores de intensidades constantes dos metabólitos conforme os mesmos tempos de armazenamento quando a urina é depositada em papel filtro.

Volumes iguais de urina ($600\text{ }\mu\text{L}$) foram analisados sem deposição em papel filtro utilizando os mesmos volumes de água para dessorção dos metabólitos e volume final do eluato coletado para análise, com o objetivo de se obter áreas de referência dos metabólitos (REF) e ser utilizado para avaliar a eficiência de extração dos metabólitos em papel filtro. Entretanto, para o procedimento ser considerado eficiente, os metabólitos identificados após deposição e secagem da urina em papel devem apresentar intensidades sem diferença significativa em relação ao tempo e sob as duas temperaturas de armazenamento.

Nenhum dos 46 metabólitos avaliados apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando as amostras REF foram comparadas às amostras depositadas e secas em papel filtro nos tempos de 1, 5, 10 e 30 dias, e acondicionados nas temperaturas de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esses dados mostram que os metabólitos se apresentam estáveis em concentração, mesmo após a urina ser depositada e seca em papel filtro e armazenada em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), o que torna o procedimento viável para o transporte de urina para laboratórios clínicos quando a análise não é realizada no mesmo local de coleta sem necessidade do condicionamento da amostra em temperaturas baixas.

Desse modo, tem-se que a técnica de coleta de urina em papel é útil para análise do metaboloma por garantir estabilidade dos compostos mesmo armazenada em temperatura ambiente, e por consistir em modo de amostragem que proporciona risco reduzido de contaminação e custo reduzido de transporte (HENION et al., 2013).

Existem algumas limitações quanto à utilização apenas dos 46 metabólitos identificados em todas condições experimentais após deposição da amostra em papel filtro. A primeira está relacionada com a impossibilidade de avaliação prática de todos os metabólitos alterados significativamente devido à síndrome de CDC, utilizando as abordagens metabolômicas *fingerprinting* e perfil metabólico de ácidos orgânicos, através da técnica coleta de urina em papel filtro. Todavia, os metabólitos ácido 4-hidroxifenilacético e ácido 4-hidroxibenzoico alterados nas abordagens perfil metabólico e *fingerprinting* metabólico foram considerados na avaliação das suas estabilidades quando armazenados em papel filtro, não mostrando diferença significativa na intensidade de seus *features* ao longo do tempo e armazenados em temperatura ambiente.

Foi mostrado que estes metabólitos estão envolvidos no metabolismo da tirosina como produto da oxidação da tiramina, sendo ele o ácido 4-hidroxifenilacético; e o ácido 4-hidroxibenzoico é um metabólito que está relacionado a transformações microbianas oriundas da ingestão de polifenóis em portadores da síndrome CDC. Desse modo, tem-se que a técnica DUS mostra-se efetiva para avaliação clínica desses potenciais biomarcadores da síndrome do *Cri Du Chat*.

De modo geral, esse procedimento consiste de um método de coleta que possibilita a determinação múltiplos biomarcadores de diversas classes químicas que, por sua vez, detectará alterações em mais de uma condição metabólica, o que reforça a potencialidade do uso da técnica.

5 CONCLUSÕES

A coleta de fluidos biológicos como urina, em papel filtro, é um procedimento moderno de preparo de amostras para análises bioanalíticas por apresentar vantagens tanto analíticas quanto econômicas.

Neste capítulo de tese foi demonstrado que o perfil metabólico de amostras de urina coletadas e secas em papel filtro foi conservado por um longo período de armazenamento, e que a utilização de baixas temperaturas ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) para conservação dos metabólitos até 30 dias não foi um fator determinante quando comparado ao armazenamento da amostra em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

O *fingerprinting* metabólico das amostras de urina analisadas diretamente, sem deposição em papel filtro, apresentou intensidades dos metabólitos sem diferença estatística significativa quando comparadas às amostras de urina depositada e seca em papel, mostrando assim a eficiência de extração dos metabólitos impregnados nas fibras do papel e a viabilidade de utilização do procedimento de armazenamento e conservação do metaboloma urinário em papel filtro.

É notável que o preparo de amostra para obtenção do *fingerprinting* metabólico é mais extenso que o procedimento clássico aplicado em urina direta. Desse modo, é relevante avaliar a redução de etapas de processamento da amostra, como impregnação e secagem prévia da enzima urease em papel filtro, com o intuito de obter um eluato final com ureia degradada.

Por fim, este procedimento mostrou-se muito viável para determinação simultânea de metabólitos de variadas classes químicas em urina, com conservação da abundância de metabólitos mesmo sem a utilização de baixas temperaturas, etapa essencial em bioanálises, o que ressalta as vantagens analíticas e econômicas para o seu transporte e estabilidade química dos analitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, M.J.; VAZQUEZ, F.L.; DESBATS, M.A.; CERQUA, C.; ZORDAN, R.; TREVISSON, E.; SALVIATI, L. **Biochim Biophys Acta**. v. 1857, p. 1079-1085, 2016. Doi: 10.1016/j.bbabbio.2016.03.036.

ADAM, B.W.; HALL, E.M.; STERNBERG, M.; LIM, T.H.; FLORES, S.R.; O'BRIEN, S.; SIMMS, D.; LI, L.X.; DE JESUS, V.R.; HANNON, W.H. The stability of markers in dried-blood spots for recommended newborn screening disorders in the United States. **Clinical Biochemistry**. v. 44, p. 1445–1450, 2011. Doi: doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.09.010

ALBERICE, J.V.; AMARAL, A.F.S.; ARMITAGE, E.G.; LORENTE, J.A.; ALGABA, F.; CARRILHO, E.; MÁRQUEZ, M.; GARCÍA, A.; MALATS, N.; BARBAS, C. Searching for urine biomarkers of bladder cancer recurrence using a liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis–mass spectrometry metabolomics approach. **Journal of Chromatography A**. v. 1318, p. 163–170, 2013. Doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.002

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n.2, p. 111-119, 2010. Doi: 10.1016/j.trac.2009.12.003.

ANTUNES, M.V.; NIEDERAUER, C.G.; LINDEN, R. Development, validation and clinical evaluation of a dried urine spot method for determination of hippuric acid and creatinine. **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 1276–1280, 2013. Doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.07.004

ARAMBARRI, I.; GARCIA, R.; MILLÁN, E. Optimisation of tin determination in aqua regia–HF extracts from sediments by electrothermal atomic absorption spectrometry using experimental design. **Analyst**. v. 125, p. 2084–2088, 2020. Doi: 10.1039/b005846g.

ASSUNÇÃO, N.A.; BECHARA, E.J.H.; SIMIONATO, A.V.C.; TAVARES, M.F.M.; CARRILHO, E. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS): vinte anos de desenvolvimento. **Quim. Nova**. v. 31, n. 8, p. 2124-2133, 2008.

ATAPATTU, S.N.; ROSENFELD, J.M. Solid Phase Analytical Derivatization. In: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Amsterdam: Elsevier, 2018. Doi: doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14248-9.

AUSTDAL, M.; THOMSEN, L.C.V.; TANGERÅS, L.H.; SKEI, B.; MATHEW, S.; BJØRGE, L.; AUSTGULEN, L.; BATHEN, T.F.; IVERSEN, A-C. Metabolic profiles of placenta in preeclampsia using HR-MAS MRS Metabolomics. **Placenta**. v. 36, n. 12, p. 1455-1462, 2015. Doi: doi.org/10.1016/j.placenta.2015.10.019.

BALCÁZAR, J.S.C.; MEESTERS, R.J.W. Bioanalytical comparison between dried urine spots and liquid urine bioassays used for the quantitative analysis of urinary creatinine concentrations. **Bioanalysis**. v. 6, n. 21, p. 2803–2814, 2014. 10.4155/BIO.14.197

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como Fazer Experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria**. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.

BENDER, D.A. Biochemistry of tryptophan in health and disease. **Molec. Aspects Med.** v. 6, p. 101-197, 1982. Doi: 10.1016/0098-2997(83)90005-5

BERK, Z. **Food process engineering and technology**. London: Elsevier, 2013. 620 p.

BHAGAVAN, N.V.; HA, C-E. **Essentials of Medical Biochemistry With Clinical Cases**. London: Academic Press, 2015. 732 p.

BLAU, N.; VAN SPRONSEN, F.J.; LEVY, H.L. Phenylketonuria. **The Lancet**, v. 376, p. 1417-1427, 2010.

BORDINI, D.C.M.; MONEDDEIRO, F.F.S.S.; CAMPOS, E.G.; ALVES, M.N.R.; BUENO, L.H.P.; MARTINIS, B.S. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**. v. 7, p- 125-143, 2015. Doi: dx.doi.org/10.4322/sc.2015.022

BOUATRA, S.; AZIAT, F.; MANDAL, R.; GUO, A.C.; WILSON, M.R.; KNOX, C.; BJORNDahl, 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. The human urine metabolome. **PLoS ONE**. v. 8, p- 73076. 2013. Doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0073076

BRUGNARA, L.; VINAIXA, M.; MURILLO, S.; SAMINO, S.; RODRIGUEZ, M.A.; BELTRAN, A.; LERIN, C.; DAVISON, G.; CORREIG, X.; NOVIALS, A. Metabolomics Approach for Analyzing the Effects of Exercise in Subjects with Type 1 Diabetes Mellitus. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-8, 2012. Doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0040600

BUJAK, R.; STRUCK-LEWICKA, W.; MARKUSZEWSKI, M. J.; KALISZAN, R. Metabolomics for laboratory diagnostics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 108–120, 2015. Doi: doi.org/10.1016/j.jpba.2014.12.017

CANUTO, G.A.B.; DA COSTA, J.L.; DA CRUZ, P.L.R.; DE SOUZA, A.R.L.; FACCIO, A.T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K.T.; TAVARES, M.F.M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Quím. Nova**, v. 41, p. 75-91. Doi: dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170134

CARTA, F.; LUSSU, M.; BANDINO, F.; NOTO, A.; PEPPI, M.; CHUCHUEVA, N.; ATZORI, L.; FANOS, V.; PUXEDDU, R. Metabolomic analysis of urine with Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy in patients with idiopathic sudden sensorineural hearing loss: A preliminary study. **Auris Nasus Larynx**. v. 44, n. 4, p. 381-389, 2017. Doi: doi.org/10.1016/j.anl.2016.10.003

CAUCHI, M.; WEBER, C.M; BOLT, B.J.; SPRATT, P.B.; BESSANT, C.; TURNER, D.C.; WILLIS, C.M.; BRITTON, L.E.; TURNER, C.; MORGAN, G. Evaluation of gas chromatography mass spectrometry and pattern recognition for the identification of bladder cancer from urine headspace, **Anal. Methods**. v. 8, p. 4037-4016, 2016. Doi: 10.1039/c6ay00400h

CHALMERS, R.A.; LAWSON, A.M. **Organic Acids in Man: Analytical Chemistry, Biochemistry and Diagnosis of the Organic Acidurias**. New York: Springer, 1982. 530 p.

CHAN, E.C.Y.; PASIKANTI, K.K.; NICHOLSON, J.K. Global urinary metabolic profiling procedures using gas chromatography–mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 6, n. 10, 1483–1499, 2011. Doi:10.1038/nprot.2011.375

CHRISTENSEN, M.H.E.; FADNES, D.J.; RØST, T.H.; PEDERSEN, E.R.; ANDERSEN, J.R.; VÅGE, V.; ULVIK, A.; MIDTTUN, Ø.; UELAND, P.M.; NYGÅRD, O.K.; MELLGREN, G. Inflammatory markers, the tryptophan-kynurenine pathway, and vitamin B status after bariatric surgery, **PLoS One**, v. 5, p. 1-14, 2018. Doi: 10.1371/journal.pone.0192169.

CHRISTOU, C; GIKA, H.G; RAIKOS, N; THEODORIDIS, G. GC-MS analysis of organic acids in human urine in clinical settings: A study of derivatization and other analytical parameters. **Journal of Chromatography B**, v. 964, p. 195-201, 2014. Doi: doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.12.038

COELHO, T.L.S.; BRAGA, F.M.S.; SILVA, N.M.C.; DANTAS, C.; LOPES JÚNIOR, C.A.; DE SOUSA, S.A.A.; VIEIRA, E.C. Optimization of the protein extraction method of goat meat using factorial design and response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 283, p. 63-17, 2019. Doi: doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.055

CORNISH, K.; BRAMBLE, D. Cri du Chat syndrome: genotype-phenotype correlations and recommendations for clinical management, **Dev Med Child Neurol**. 44 (202) 494-497. Doi: 10.1111/j.1469-8749.2002.tb00312.x.

DA COSTA, S.S.L.; PEREIRA, A.C.L.; PASSO, E.A.; ALVES, J.P.H.; GARCIA, C.A.B.; ARAUJO, R.G.O. Multivariate optimization of an analytical method for the analysis of dog and cat foods by ICP OES. **Talanta**, v. 108, p. 157-164, 2013. Doi: doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.002

DANIELSSON, A.P.H.; MORITZ, T.; MULDER, H.; SÉGEL, P. Development of a gas chromatography/mass spectrometry-based metabolomics protocol by means of statistical experimental design. **Metabolomics**, v. 8, p. 50–63, 2012. Doi: 10.1007/s11306-011-0283-6

DHAHOURI, N.A; LANGHANS, C-D; HAMMADI, Z.A; OKUN, J.G; HOFFMANN, G.F; AL-JASMIA, F; AL-DIRBASHI, O.Y. Quantification of methylcitrate in dried urine spots by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the diagnosis of propionic and methylmalonic acidemias. **Clinica Chimica Acta**, v. 487, p 41-45, 2018. Doi: 0.1016/j.cca.2018.09.017

DOMINGO-ALMENARA, X.; BREZMES, J.; VINAIXA, M.; SAMINO, S.; RAMIREZ, N.; RAMON-KRAUEL, M.; LERIN, C.; MARTA, D.; IBA, L.; CORREIG, X. eRah: A Computational Tool Integrating Spectral Deconvolution and Alignment with Quantification and Identification of Metabolites in GC/MS-Based, **Anal. Chem.** v. 88, p. 9821–9829, 2016. Doi: 10.1021/acs.analchem.6b02927.

DROLET, J; TOLSTIKOV, V; WILLIAMS, B.A; GREENWOOD, B.P; HILL, C.; VISHNUDAS, V.K; SARANGARAJAN, R.; NARAIN, N.R; KIEBISH, M.A. Integrated Metabolomics Assessment of Human Dried Blood Spots and Urine Strips. **Metabolites**, v. 7, p. 1-14, 2017. Doi: 10.3390/metabo7030035

DUDZIK, D.; ZORAWSKI, M.; SKOTNICKI, M.; ZARZYCKI, W.; GARCÍA, A.; ÂNGULO, S.; LORENZO, M.P.; BARBAS, C.; RAMOS, M.P. GC–MS based Gestational Diabetes

Mellitus longitudinal study: Identification of 2-and 3-hydroxybutyrate as potential prognostic biomarkers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 144, p. 90–98, 2017. Doi: [dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.056](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.056)

DUNN, W. B.; BROADHUST, D., I.; ATHERTON, H. J.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L. Systems level studies of mamalian metabolites: the role of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chem. Soc. Rev.**, v. 40, p. 387-426, 2011. Doi: 10.1039/b906712b

DUNN, W.B.; BAILEY, N.J.C.; JOHNSON, H.E. Measuring the metabolome: current analytical Technologies. **Analyst**, v. 130, p. 606-625, 2005. Doi: 10.1039/B418288J

ENGELKING, L.R. Gluconeogenesis. In: **TEXTBOOK of Veterinary Physiological Chemistry**. London: Academic Press, 2015. p. 225-230.

FERRARI, R.; PUGINI, S.M.P.; ARCE, A.I.C.; COSTA, E.J.X.; MELO, M.P. Metabolite of tryptophan promoting changes in EEG signal and the oxidative status of the brain. **Cell Biochem Funct.** v. 32, p. 496–501, 2014. Doi: 10.1002/cbf.3043

FERREIRA, M.M.C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**, Ed. Unicamp: Campinas, 2015. 493p.

FRATI, E.R.; MARTINELLI, M; FASOLI, E; COLZANI, D; BIANCHI, S; BINDA, S; OLIVANI, P; TANZI, E. HPV Testing from Dried Urine Spots as a Tool for Cervical Cancer Screening in Low-Income Countries. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-5, 2015.

FURTADO, D.Z.S.; LEITE, F.B.V.M.; BARRETO, C.N.; FARIA, B.; JEDLICKA, L.D.L.; SILVA, E.J.; SILVA, H.D.T.; BECHARA, E.J.H.; ASSUNÇÃO, N.A. Profiles of amino acids and biogenic amines in the plasma of Cri-du-Chat patients, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.140, p. 137–145, 2017. Doi: 10.1016/j.jpba.2017.03.034

GAGNEBIN, Y.; TONOLI, D.; LESCUYER, P.; PONTE, B.; DE SEIGNEUX, S.; MARTIN, P-Y.; SCHAPPLER, J.; BOCCARD, J.; RUDAZ, S. Metabolomic analysis of urine samples by UHPLC-QTOF-MS: impact of normalization strategies. **Analytica Chimica Acta**. v. 955, n. 22, p. 27-35, 2017. Doi: doi.org/10.1016/j.aca.2016.12.029

GENETICS HOME REFERENCE. Cri-du-chat syndrome. Bethesda, 2020. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/cri-du-chat-syndrome#statistics>. Acesso em: 14 Mai. 2020).

GIKA, H.G.; THEODORIDIS, G.A.; WILSON, I.D. Hydrophilic interaction and reversed-phase ultraperformance liquid chromatography TOF-MS for metabolomic analysis of Zucker rat urine. **J. Sep. Sci.** v. 31, p. 1598 – 1608, 2008. Doi: 10.1002/jssc.200700644

GONTHIER, M-P.; CHEYNIER, V.; DONOVAN, J.L.; MANACH, C.; MORAND, C.; MILA, I.; LAPIERRE, C.; RÉMÉSY, C.; SCALBERT, A. Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. **Journal of Nutrition**, v.133, p. 461-467, 2003. Doi: 10.1093/jn/133.2.461

GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, R.; CASTILLA-QUINTERO, R.; GARCÍA-BARRERA, T.; GÓMEZ-ARIZA, J.L. Development of a metabolomic approach based on urine samples and

direct infusion mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**. v. 465, p. 20-27, 2014. Doi: doi.org/10.1016/j.ab.2014.07.016

GROMSKI, P.S.; MUHAMADALI, H.; ELLIS, D.I.; XU, Y.; CORREA, E.; TURNER, M.L.; GOODACRE, R. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Analytica Chimica Acta**. v. 879, p. 10-23, 2015. Doi: dx.doi.org/doi:10.1016/j.aca.2015.02.012

GROOTVELD, M. **Introduction to the Applications of Chemometric Techniques in 'Omics' Research: Common Pitfalls, Misconceptions and 'Rights and Wrongs'**. Leicester: The Royal Society of Chemistry, 2014.

HENDERSON, A.R. Testing experimental data for univariate normality. **Clinica Chimica Acta**, v. 366, p. 112-129. Doi: doi.org/10.1016/j.cca.2005.11.007

HENION, J.; OLIVEIRA, R.V.; CHACE, D.H. Microsample analyses via DBS: challenges and opportunities. **Bioanalysis**. v. 5, n. 20, p. 2547–2565, 2013. Doi: 10.4155/BIO.13.197

HIROI, T.; IMAOKA, S.; FUNAE, Y. Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 249, p. 838-843, 1998. Doi: 10.1006/bbrc.1998.9232

HUMBERT, L; HOIZEY, G; LHERMITTE, M. Drugs Involved in Drug-Facilitated Crimes (DFC): Analytical Aspects: 1—Blood and Urine. In: Kintz, P. **Toxicological Aspects of Drug-Facilitated Crimes**. London: Elsevier, 2014, v. 1, p. 159-180.

JACOBS, D.M.; SPIESSER, L.; GARNIER, M.; DE ROO, N.; VAN DORSTEN, F.; HOLLEBRANDS B.; VAN VELZEN, E.; DRAIJER, R.; VAN DUYNHOVEN, J. SPE-NMR metabolite sub-profiling of urine. **Anal Bioanal Chem**. v. 404, p. 2349-2361, 2012. Doi: 10.1007/s00216-012-6339-2

JACYNA, J.; KORDALEWSKA.; M.; MARKUSZEWSKI, M.J. Design of Experiments in metabolomics-related studies: An overview. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 64, p. 598-606, 2019. Doi: oi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.027

JIYA, A.; HUANG, Q.; WANG, G.; ZHA, W.; YAN, B.; REN, H.; GU, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, Q.; SHAO, F.; SHENG, L.; SUN, J. Global analysis of metabolites in rat and human urine based on gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Anal. Biochem.**, v. 379 p. 20-26, 2008. Doi: 10.1016/j.ab.2008.04.025

KALUŻNA-CZAPLIŃSKA, J. Noninvasive urinary organic acids test to assess biochemical and nutritional individuality in autistic children. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 686–691, 2011. Doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.01.015

KANANI, H.; CHRYSANTHOPOULOS, P.K.; KLAPA, M.I. Standardizing GC-MS metabolomics. **Journal of Chromatography B**. v. 871, p. 191-201, 2008. Doi: doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.04.049

KAPUR, S.; MANN, J.J. Role of the dopaminergic system in depression. **Biol Psychiatry**. v. 32, p.1–17, 1992. Doi: 10.1016/0006-3223(92)90137-O

KARU, N.; MCKERCHER, C.; NICHOLS, D.S.; DAVIES, N.; SHELLIE, R.A.; HILDER, E.F.; JOSE, M.D. Tryptophan metabolism, its relation to inflammation and stress markers and

association with psychological and cognitive functioning: Tasmanian Chronic Kidney Disease pilot study. **Bmc Nephrol.** v. 17, p. 158-171, 2016. Doi: 10.1186/s12882-016-0387-3.

KOBAYASHI, K. Role of catecholamine signaling in brain and nervous system functions: new insights from mouse molecular genetic study, **J Investig Dermatol Symp Proc.** v. 6, p 115-121, 2001. Doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.00011.x.

KOEK, M. M.; JELLEMA, R. H.; GREEF J. V.D.; TAS, A. C.; HANKEMEIER, T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. **Metabolomics.** v. 7, p. 307–328, 2011. Doi: 10.1007/s11306-010-0254-3

KOMODA, T.; MATSUNAGA, T. **Biochemistry for Medical Professionals.** London: Academic Press, 2015. 101 p.

KUHARA, T. Diagnosis of inborn errors of metabolism using filter paper urine, urease treatment, isotope dilution and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B,** v. 758, p. 3–25, 2001. Doi: doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00138-4

KUMAR, B.; PRAKASH, A.; RUHELA, R.K.; MEDHI, B. Potential of metabolomics in preclinical and clinical drug development. **Pharmacological Reports.** v. 66, p. 956–963, 2014. Doi: doi.org/10.1016/j.pharep.2014.06.010

LEITE, G.G.F.; AZEVEDO, H.; DE OLIVEIRA, T.M.; FURTADO, D.Z.S.; ASSUNÇÃO, N.A. Cri-du-Chat Syndrome interactome network: Correlating genotypic variations to associated phenotypes. **Gene Reports,** v. 11, p. 179–187, 2018. Doi: doi.org/10.1016/j.genrep.2018.03.019

LEJEUNE, J.; LAFOURCADE, J.; BERGER, R.; VIALATTE, J.; BOESWILLWALD, M.; SERINGE, P.; TURPIN, R. 3 cases of partial deletion of the short arm of a 5 chromosome. **C R Hebd Seances Acad Sci.,** v. 257, p. 3098-3102, 1963.

LEJEUNE, J.; RETHORÉ, M.O.; PEETERS, M.; DE BLOIS, M.C.; RABIER, D.; PARVY, P.; BARDET, J.; KAMOUN, P. Cri-du-chat disease: plasma and urinary amino acids. **Ann Genet.,** v. 33, p. 16-20, 1990.

LI, X.; LONG, D.; JI, J.; YANG, W.; ZENG, Z.; GUO, S.; JI, Z.; QI, G.; CHEN, S. Sample preparation for the metabolomics investigation of poly-gamma-glutamate-producing *Bacillus licheniformis* by GC–MS. **Journal of Microbiological Methods,** v. 94, p. 61–67, 2013. Doi: 10.1016/j.mimet.2013.04.006.

LIU, Y.; CHEN, T.; QIU, Y.; CHENG, Y.; CAO, Y.; ZHAO, A., JIA, W. An ultrasonication-assisted extraction and derivatization protocol for GC/TOFMS-based metabolite profiling. **Anal Bioanal Chem.** v. 400, p. 1405–1417, 2011. Doi: 10.1007/s00216-011-4880-z

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTROM, A.; PETTERSEN, J.; BERGAM, R. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems,** v. 42, p. 3–40, 1998. Doi: 10.1016/S0169-7439(98)00065-3

MAINARDI, P. C.; PERFUMO, C.; CALÌ, A.; COUCOURDE, G.; PASTORE, G.; CAVANI, S.; ZARA, F.; OVERHAUSER, J.; PIERLUIGI, M.; BRICARELLI, F.D. Clinical and

molecular characterisation of 80 patients with 5p deletion: genotype-phenotype correlation, **J Med Genet.** 38 (2001) 151–158. Doi 10.1136/jmg.38.3.151.

MASTRANGELO, A.; FERRARINI, A.; REY-STOLLE, F.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(ED)-Q-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 900, p. 21-35, 2015. Doi: dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.001.

METABOLOMICS SOCIETY. **Metabolomics**. Nevada, 2020. Disponível em: <http://metabolomicssociety.org/metabolomics>. Acesso em: 13 mai. 2020.

MICHELY, J.A.; MEYER, M.R.; MAURER, H.H. Dried urine spots - A novel sampling technique for comprehensive LC-MSⁿ drug screening. **Analytica Chimica Acta**, v. 982, p.112-121, 2017. Doi: 10.1016/j.aca.2017.05.033

MICHOPOULOS, F.; THEODORIDIS, G.; SMITH, C.J.; WILSON, I.D. Metabolite profiles from dried biofluid spots for metabonomic studies using UPLC combined with oaToF-MS. **J. Proteom. Res.** v. 9, p. 3328–3334, 2010. Doi: 10.1021/pr100124b.

MILLER, J.N.; MILLER, J.C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5th ed. United Kingdom: Pearson Education Limited, 2005. 268 p.

MISRA, B.; VAN DER HOOFT, J.J.J. Updates in metabolomics tools and resource: 2014-2015. **Electrophoresis**, v. 37, p. 86-110, 2016.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. Hoboken: Wiley, 2012. 752 p.

MUDIAM, MKR.; CH, R.; SAXENA P.N. Gas Chromatography- Mass Spectrometry Based Metabolomic Approach for Optimization and Toxicity Evaluation of Earthworm Sub-Lethal Responses to Carbofuran. **PLoS ONE**. v. 8 (12), p. e81077, 2013. Doi: 10.1371/journal.pone.0081077.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**. New York: W.H Freeman and Company, 2002. 1009 p.

NOVAES, C.G.; YAMAKI, R.T.; DE PAULA, V.F.; DO NASCIMENTO JÚNIOR, B.B.; BARRETO, J.A.; VALASQUES, G.S.; BEZERRA, M.A. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo. **Revista Virtual de Química**, v. 9 (3), p. 1184-1215, 2017. Doi: 10.21577/1984-6835.20170070

PAPAMICHAEL, M.M.; KATSARDIS, C.; ERBAS, B.; ITSIOPOULOS, C.; TSOUKALAS, D. Urinary organic acids as biomarkers in the assessment of pulmonary function in children with asthma. **Nutrition Research**, v. 61, p. 31-49, 2019. Doi: doi.org/10.1016/j.nutres.2018.10.004

PARKER, S.P; CUBITT, W.D. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. **J. Clin. Pathol.** v. 52, p. 633–639, 1999.

PEETERS M.A.; RETHORÉ, M.O.; ARIS, L.; MEGARBANE, A.; CATTANEO, F.; LEJEUNE, J. Metabolic anomalies in cri du chat syndrome (5p-) lymphocytes and de novo purine synthesis, **Ann Genet.**, v. 34, p. 219-225, 1991.

REINECKE, C.J.; KOEKEMOER, G.; VAN DER WESTHUIZEN, F.H.; LOUW, R.; LINDEQUE, J.Z.; MIENIE, L.J.; SMUTS, I. Metabolomics of urinary organic acids in respiratory chain deficiencies in children. **Metabolomics**, v. 8, p. 264-283, 2011. Doi: 10.1007/s11306-011-0309-0

REZZI, S.; COLLINO, S.; GOULET, L.; MARTIN, F-P. Metabonomic approaches to nutrient metabolism and future molecular nutrition. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 112-119, 2013. Doi: 10.1016/j.trac.2013.09.004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROUX, A., THÉVENOT, E.A., SEGUIN, F., OLIVIER, M-F., JUNOT, C. Impact of collection conditions on the metabolite content of human urine samples as analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Metabolomics**, v. 11, p. 1095–1105, 2015. Doi: 10.1007/s11306-014-0764-5

RUTKOWSKA, M; PŁOTKA-WASYLKA, J; SAJID, M; ANDRUCH, V. Liquid–phase microextraction: A review of reviews. **Microchemical Journal**, 2019. In press.

SACCENTI, E.; HOEFSLOOT, H.C.J.; SMILDE, A.K.; WESTERHUIS, J.A.; HENDRIKS, M.M.W.B. Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. **Metabolomics**, v. 10, p.361–374, 2014. Doi: 10.1007/s11306-013-0598-6

SCOPES, K.R. **Protein Purification: Principles and Practice**. New York: Springer Science+, 1982. 287 p.

SEO, C; PARK, M; CHOI, B; LEE, S; PAIK, M-J. Metabolomic analysis of urinary organic acids following intraperitoneal injection with c-hydroxybutyric acid in rats. **Metabolomics**, v. 12, p. 190-199, 2016. Doi: 10.1007/s11306-016-1125-3

SILVA, A.F.; LIMA, G.R.S.; ALVES, J.C.; SANTOS, S.H.; GARCIA, C.A.B.; ALVES, J.P.H.; ARAUJO, R.G.O.; PASSOS, E.A. Evaluation of Trace Metal Levels in Surface Sediments of the Sergipe River Hydrographic Basin, Northeast Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 23, p.1669-1679, 2012. Doi: 10.1590/S0103-50532012005000028

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, p. 665-676, 2011.

SITTER,B.; BATHEN, T.F.; TESSEM, M-B.; GRIBBESTAD, I.S. High-resolution magic angle spinning (HR MAS) MR spectroscopy in metabolic characterization of human cancer. **Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.** v. 54, p. 239–254, 2009. Doi: 10.1016/j.pnmrs.2008.10.001

SPOONER, N.; LAD, R.; BARFIELD, M. Dried Blood Spots as a Sample Collection Technique for the Determination of Pharmacokinetics in Clinical Studies: Considerations for the Validation of a Quantitative Bioanalytical Method. **Anal. Chem.** v. 81, n. 4, p. 1557–1563, 2009. Doi: 10.1021/ac8022839

STRUCK-LEWICKA, W.; KORDALEWSKA, M.; BUJAK, R.; MPANGA, A.Y.; MARKUSZEWSKI, M.; JACYNA, J.; MATUSZEWSKI, M.; KALISZAN, R.; MARKUSZEWSKI, M.J. Urine metabolic fingerprinting using LC–MS and GC–MS reveals metabolite changes in prostate cancer: A pilot study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, p. 351–361, 2015. Doi: dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.12.026

SUÁREZ, M.; CAIMARI, A.; DEL BAS, J.M.; AROLA, L. Metabolomics: An emerging tool to evaluate the impact of nutritional and physiological challenges. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 96, p. 79–88, 2017. Doi: doi.org/10.1016/j.trac.2017.06.003

TANAKA, K.; ISSELBACHER, K.J. Experimental ss-hydroxyisovaleric aciduria induced by biotin deficiency. **Lancet**, v. 2, p. 930–931, 1970.

TORDIFFE, A.S.W.; REENEN, M.V.; REYERS, F.; MIENIE, L.J. Gas chromatography-mass spectrometry profiles of urinary organicacids in healthy captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). **Journal of Chromatography B**, v. 1049–1050, p. 8–15, 2017. Doi: 10.1016/j.jchromb.2017.02.018

TSOUKALAS, D.; ALEGAKIS, A.; FRAGKIADAKI, P.; PAPAKONSTANTINO, E.; NIKITOVIC, D.; KARATARAKI, A.; NOSYREV, A.E.; PAPADAKIS, E.G.; SPANDIDOS, D.A.; DRAKOULIS, N.; TSATSAKIS, A.M. Application of metabolomics: Focus on the quantification of organic acids in healthy adults. **Int J Mol Med**, v. 40, p. 112–120, 2017. Doi: 10.3892/ijmm.2017.2983.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 11, p. 463–471, 1963. Doi: 10.1016/S0021-9673(01)80947-X

VANDEGINSTE, B.G.; BUYDENS, L.M.; DE JONG, S.; LEWI, P.J.; SMEYERS-VERBEKE, J. **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part 1**. Amsterdam: Elsevier, 1997. 867 p.

VÁZQUEZ-FRESNO, R.; LLORACH, R.; ALCARO, F.; RODRIGUEZ, M.A.; VINAIXA, M.; CHIVA-BLANCH, G. ESTRUCH, R.; CORREIG, X.; ANDRÉS-LACUEVA, C. ¹H-NMR-based metabolomic analysis of the effect of moderate wine consumption on subjects with cardiovascular risk factors. **Electrophoresis**, v. 33, p. 2345–2354, 2012. Doi: 10.1002/elps.201100646

VERDIN, E. NAD⁺ in aging, metabolism, and neurodegeneration. **Science**, v. 350, p.1208–1213. Doi: 10.1126/science.aac4854

VILLAS-BÔAS, S.G.; ROESSNER, U.; HANSEN, M.A.E.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Metabolome analysis: an introduction. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2007. 329 p.

WANG, Y.; LIU, S.; HU, Y.; LI, P.; WAN, J-B. Current state of the art of mass spectrometry-based metabolomics studies – a review focusing on wide coverage, high throughput and easy identification. **RSC Advances**, v. 5, p. 78728– 78737, 2015. Doi: 10.1039/C5RA14058G

WASSENBERG, T.; WILLEMSSEN, M.A.; GEURTZ, P.B.; LAMMENS, M.; VERRIJP, K.; WILMER M.; LEE, WT.; WEVERS, R.A.; VERBEEK, M.M. Urinary dopamine in aromatic

L-amino acid decarboxylase deficiency: the unsolved paradox. **Mol Genet Metab.** v. 101, p. 349-356, 2010. Doi: 10.1016/j.ymgme.2010.08.003

WEI, S.; ZHANG, J.; LIU, L.; YE, T.; GOWDA, G.A.; TAYYARI, F. Ratio analysis nuclear magnetic resonance spectroscopy for selective metabolite identification in complex samples. **Anal Chem.** v. 8, p. 7616–7623, 2011. Doi: 10.1021/ac201625f

WESTERHUIS, J. A.; HOEFSLOOT, H.C.J.; SMIT, S.; VIS, D.J.; SMILDE, A.K.; VAN VELZEN, E.J.J.; VAN DUIJNHOFEN, J.P.M.; VAN DORSTEN, F.A. Assessment of PLSDA cross validation. **Metabolomics**, v. 4, p. 81–89, 2008. Doi: 10.1007/s11306-007-0099-6

WESTERHUIS, J.A.; VAN VELZEN, E.J.J.; HOEFSLOOT, H.C.J.; SMILDE, A.K. Multivariate paired data analysis: multilevel PLSDA versus OPLSDA. **Metabolomics**, v. 6, p. 119–128, 2010. Doi: 10.1007/s11306-009-0185-z

WICKREMSINHE, E.R.; HUANG, N.H.; ABDUL, B.G.; KNOTTS, K.; RUTERBORIES, K.J.; MANRO, J.R. Preclinical bridging studies: understanding dried blood spot and plasma exposure profiles. **Bioanalysis**. v. 5, n. 2, p.159–170, 2013. Doi: 10.4155/BIO.12.309

WIEDMER, S.; HYOTYLAINEN, T. Selection of Analytical Methodology for metabolomics. In: Chromatographic Methods in Metabolomics. London: The Royal Society of Chemistry, 2013. v.18, p.1-10.

WILLIAMS, A.; KOEKEMOER, G.; LINDEQUE, Z.; REINECKE, C.; MEYER, D. Qualitative serum organic acid profiles of HIV-infected individuals not on antiretroviral treatment. **Metabolomics**, v. 8, p. 804–818, 2012. Doi: 10.1007/s11306-011-0376-2

WILSON, I.D. Chromatographic and Electrophoretic Separations Combined with Mass Spectrometry for Metabolomics. In: Lindon, J.C.; Nicholson, J.K.; Holmes, E. **The handbook of metabolomics and metabolomics**. Oxford: Elsevier B.V., 2007. v.1, p. 149-169.

WISHART, D.S.; FEUNANG, Y.D.; MARCU, A.; GUO, A.C.; LIANG, K.; VÁZQUEZ-FRESNO, R.; SAJED, T.; JOHNSON, D.; LI, C.; KARU, N.; SAYEEDA, Z.; LO, E.; ASSEMPOUR, N.; BERJANSKII, M.; SINGHAL, S.; ARNDT, D.; LIANG, Y.; BADRAN, H.; GRANT, J.; SERRA-CAYUELA, A.; LIU, Y.; MANDAL, R.; NEVEU, V.; PON, A.; KNOX, C.; WILSON, M.; MANACH, C.; SCALBERT, A. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Res.** v. 4, p. D608-D617, 2018. DOI: 10.1093/nar/gkx1089.

WITTMANN, B.M.; STIRDIVANT, S.M.; MITCHELL, M.W.; WULFF, J.E., MCDUNN, J.E.; LI, Z.; DENNIS-BARRIE, A.; NERI, B.P.; MILBURN, M.V.; LOTAN, Y.; WOLFERT, R.L. Bladder Cancer Biomarker Discovery Using Global Metabolomic Profiling of Urine. **PLoS ONE**. v. 9, p. 1-19, 2014. Doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0115870

YANG, Q.; LIN, S-S.; YANG, J-T.; TANGA, L-J.; YU, R-Q. Detection of inborn errors of metabolism utilizing GC-MS urinary metabolomics coupled with a modified orthogonal partial least squares discriminant analysis. **Talanta**, v. 165, p. 545-552. Doi: 10.1016/j.talanta.2017.01.018.

YI, L.; SHI, S.; YI, Z.; HE, R.; LU, H.; LIANG, Y. MeOx-TMS derivatization for GC-MS metabolic profiling of urine and application in the discrimination between normal C57BL/6J

and type 2 diabetic KK-Ay mice.
Anal. Methods. v. 6, p. 4380-4387, 2014. Doi: 10.1039/C3AY41522H