



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

LYVIA MARIA VASCONCELOS CARNEIRO MAGALHÃES

**VALIDAÇÃO DO TESTE LACTULOSE: MANITOL ATRAVÉS DE HPLC-
MS/MS PARA ANÁLISE DE BARREIRA MORFOFUNCIONAL
GASTROINTESTINAL**

FORTALEZA

2021

LYVIA MARIA VASCONCELOS CARNEIRO MAGALHÃES

**VALIDAÇÃO DO TESTE LACTULOSE: MANITOL ATRAVÉS DE HPLCMS/
MS PARA ANÁLISE DE BARREIRA MORFOFUNCIONAL
GASTROINTESTINAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Biomedicina. Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

Aprovada em: 28/04/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Advane, de Paulo Rodrigues
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Dr. Kirley Marques Canuto
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M167v Magalhães, Lyvia Maria.

Validação do Teste Lactulose: Manitol Através de HPLC MS/MS para Análise de Barreira Morfofuncional Gastrointestinal / Lyvia Maria Magalhães. – 2021.
120 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

1. Biomarcadores. 2. Dosagem. 3. Espectrometria de Massa. 4. Lactulose. 5. Manitol. I. Título.

CDD 610

Aos meus filhos, Felipe e Pedro

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por TUDO. Sem ELE, nada seria possível.

Aos meus pais, Francisco José Azevedo Carneiro e Maria Luiza de Vasconcelos Carneiro, por todo apoio incondicional sempre.

Ao meu amado esposo Felipe Oliveira Magalhães, pelo companheirismo, apoio e incentivo. A minha vitória também é sua.

Aos meus irmãos pela amizade e ombro amigo.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, por sua confiança, ensinamentos, entusiasmo científico e dedicação. Seu trabalho é inspirador.

À Instituição Universidade Federal do Ceará (UFC), através dos professores, servidores e demais alunos, onde aprendi e aprendo diariamente.

Aos participantes da banca examinadora de qualificação e defesa, Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, Dr. Francisco Advane de Paulo Rodrigues, Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento e Dr. Kirley Marques Canuto por contribuir para minha formação e para o enriquecimento do trabalho. Obrigada pelo tempo dedicado.

A todos que contribuíram diretamente no desenvolvimento e finalização do meu trabalho, de forma especial aos meus amigos Pedro Henrique Quintela e Rafaella Gondim por dividir além do trabalho, as angústias do dia a dia.

Aos meus colegas de laboratório LDI e a toda equipe do INCT, UPC-IBIMED pelo compartilhamento de conhecimentos, ajudando no meu crescimento científico e pessoal.

À coordenação e secretaria da Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFC, Prof. Dr. Reinaldo Oriá, e Ivone pela eficiência e por sempre estarem disponíveis no esclarecimento de qualquer dúvida ou questionamento.

Enfim, agradeço a todos que me ajudaram diretamente ou indiretamente a chegar até aqui.

A todos vocês, MUITO OBRIGADA

“Tudo o que fizeres, seja em palavra, seja em ação, façam-no em nome do
Senhor Jesus, dando por meio dele graças a Deus Pai.”
(Colossenses, 3:17)

RESUMO

A espectrometria de massas associada à cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC-MS/MS) promete muitos benefícios em relação à cromatografia líquida na dosagem da excreção dos açúcares lactulose e manitol para a avaliação da barreira morfofuncional gastrointestinal. A técnica apresenta elevados desempenhos analíticos. O presente trabalho envolve o desenvolvimento, otimização e validação de um método analítico para determinação simultânea de lactulose e manitol em amostras de urinas de crianças no município Fortaleza – Ceará usando HPLC-MS/MS. O objetivo principal é validar a eficiência em um sistema HPLC-MS/MS: Ionização por Eletrospray (ESI), avaliando a sensibilidade e o efeito matriz dos compostos em estudo. Foram avaliadas as figuras de mérito como seletividade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), linearidade e exatidão, através de ensaios de recuperação do método. As curvas analíticas foram validadas estatisticamente, e apresentaram uma boa linearidade, com coeficientes de determinação acima de 0,99, estando de acordo com as normas adotadas pela ANVISA. Os valores de LD para lactulose e manitol foram respectivamente 0,0055 e 0,0003 ng/mL e LQ 0,0168 e 0,0010. Os ensaios de exatidão e precisão foram avaliados em três níveis de concentração (100, 500 e 1000 ng/mL). Efeito matriz esteve presente entre 8-30% (supressão de ionização). Com isso, o método foi aplicado em 41 amostras de urinas para estudo do presente trabalho. Foi quantificado lactulose e manitol em todas as amostras analisadas. As amostras foram provenientes de crianças residentes em bairros com diferentes IDH em Fortaleza-CE. Crianças residentes em baixo IDH apresentaram razão L:M significativamente maior que crianças residentes em bairros com IDH maiores ($P < 0,05$) e percentual de excreção de manitol significativamente menor ($P < 0,05$). O presente estudo demonstrou que o teste L:M através de HPLC-MS/MS é rápido, simples e sensível na detecção dos biomarcadores lactulose e manitol na urina para avaliar o comprometimento da barreira morfofuncional gastrointestinal e disfunção entérica ambiental em crianças residentes em regiões com menores IDH as quais apresentam comprometimento de barreira morfofuncional gastrointestinal.

Palavras-chave: Biomarcadores. Dosagem. Espectrometria de massa. Lactulose. Manitol.

ABSTRACT

Mass spectrometry associated with high performance liquid chromatography (MS / MS- HPLC) promises many benefits over liquid chromatography in the dosage of excretion of lactulose and mannitol sugars for the evaluation of the gastrointestinal morphofunctional barrier. The technique has high analytical performances. The present work involves the development, optimization and validation of an analytical method for simultaneous determination of lactulose and mannitol in urine samples from children in the city of Fortaleza - Ceará using MS / MS- HPLC. The main objective is to validate the efficiency in an MS / MS- HPLC system: Ionization by Eletrospray (ESI), evaluating the sensitivity and the matrix effect of the compounds under study. The figures of merit such as selectivity, detection limits (LD) and quantification (LQ), linearity and accuracy were evaluated through tests of recovery of the method. The analytical curves were statistically validated, and showed good linearity, with determination coefficients above 0.99, in accordance with the standards adopted by ANVISA. LD values for lactulose and mannitol were respectively 0.0055 and 0.0003 ng / mL and LQ 0.0168 and 0.0010. The accuracy and precision tests were evaluated at three concentration levels (100, 500 and 1000 ng / mL). Matrix effect was present between 8-30% (ionization suppression). Thus, the method was applied to 41 urine samples to study the present study. Lactuloses and mannitol were quantified in all analyzed samples. The samples came from children living in neighborhoods with different IDH in Fortaleza-CE. Children living in low IDH showed a significantly higher L: M ratio than children living in neighborhoods with higher IDH ($P < 0.05$) and significantly lower percentage of mannitol excretion ($P < 0.05$). The present study demonstrated that the L: M test using MS / MS- HPLC is fast, simple and sensitive in detecting the biomarkers lactulose and mannitol in the urine to assess the impairment of the gastrointestinal morphofunctional barrier and environmental enteric dysfunction in children living in regions with lower IDH which have impaired gastrointestinal morphofunctional barrier.

Keywords: Biomarkers. Dosage. Lactulose. Mannitol. Mass spectrometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Disfunção Entérica Ambiental: origem e conseqüências	19
Figura 2 - O complexo juncional apical da barreira epitelial.....	22
Figura 3 - Estrutura morfológica da barreira intestinal	24
Figura 4 - Estrutura química dos açúcares lactulose e manitol	31
Figura 5 - Transporte de Lactulose e Manitol em Função da Barreira Intestinal	32
Figura 6 - Esquema de um espectrômetro de massas	37
Figura 7 - Mecanismo de Ionização por electrospray.....	40
Figura 8 - Representação do processo de ionização química à pressão atmosférica-AP.	42
Figura 9 - Representação de um sistema quadrupolo simples.....	44
Figura 10 - Fluxograma do caminho percorrido pelos analitos após separação pela coluna cromatográfica até quantificação dos íons produto.....	45
Figura 11 - Esquematização de um processo de validação analítica.....	49
Figura 12 - Fluxograma do preparo das soluções de validação.....	64
Figura 13 - Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas ABSciex, modelo Q-TRAP 5500, LDI- NUBIMED/UDC	65
Figura 14 - Fluxograma do processamento de amostras	67
Figura 15 - Fluxograma do preparo das soluções padrão e urinas fortificadas para análise de efeito matriz.....	68
Figura 16 - Fluxograma do teste L: M.....	72
Figura 17 - Os espectrogramas obtidos dos íons pproduto do PPG e Reserpina.....	73
Figura 18 - Identificação dos íons precursores do Manitol, Lactulose e Sorbitol através da otimização automática do método pelo MRM	75
Figura 19 - Os espectrogramas obtidos no modo negativo (M-1) para íons produtos da lactulose, manitol e sorbitol	77
Figura 20 - Parâmetros analisados na injeção de fluxo para o Manitol 50ng/mL.....	79
Figura 21 - Curva de calibração dos três analitos na presença de ácido fórmico 0,1% à fase móvel	81
Figura 22 – Identificação dos íons precursores	83
Figura 23 - Curva padrão do manitol	88
Figura 24 - Curva de calibração da lactulose	89

Figura 25 - Percentual da excreção de lactulose e manitol nos dois grupos de crianças submetidas ao teste L:M através do HPLC-MS/MS 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Marcadores intestinais associados a absorção, permeabilidade, danos e reparação intestinal, inflamação sistêmica e resposta imune.	27
Tabela 2 - Gradiente de fase móvel para sistema de cromatografia líquida.....	66
Tabela 3 - Parâmetros automáticos dos íons precursores e íons produto da lactulose, manitol e sorbitol, de através de monitoramento de reações múltiplas (MRM)	76
Tabela 4 - Parâmetros automáticos para íons precursores e íons produto provenientes de lactulose, manitol e sorbitol, de através de análise da injeção de fluxo (FIA)	78
Tabela 5 - Condições de separação cromatográfica para coluna (HILIC- ZIC®) e parâmetros ideais para monitoramento da transição de íons.....	82
Tabela 6 - Linearidade, Limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ) do método no sistema HPLC-MS/MS para análise de excreção dos açucares lactulose, manitol e sorbitol.....	84
Tabela 7 - Repetibilidade do método no sistema HPLC-MS/MS para análise de excreção dos açucares lactulose, manitol e sorbitol	85
Tabela 8 - Precisão intermediária do método no sistema HPLC-MS/MS para análise de excreção dos açucares lactulose, manitol e sorbitol.....	85
Tabela 9 - Área dos picos das soluções padrão e amostras de urinas fortificadas	86
Tabela 10 - Tempo de retenção da lactulose e manitol em soluções padrão e urina fortificada	87
Tabela 11 - Recuperação e Efeito Matriz das amostras em urinas fortificadas.....	87
Tabela 12 - Excreção de lactulose, manitol e razão L:M medido através da plataforma HPLC-MS/MS.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE-2	Enzima conversora de angiotensina -2
ACN	Acetonitrila
AF	Ácido Fórmico
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência
ANCA	Anti-citoplasma de neutrófilos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica (do inglês, Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
ASCA	Anticorpos anti-Saccharomyces
BMGF	Bill & Melinda Gates Foundation
CAD	Gás de colisão (do inglês, Collision Gas)
CAP	Calprotectina
CCEM	Centro de Cromatografia e Espectrometria de
CE	Energia de colisão (do inglês, Collision Energy)
CDER	Center for Drug Evaluation and Research
COMEPE	Comitê de Ética em Pesquisa
cps	Contagens por segundo
CUR	Cortina de gás (do inglês, Curtain Gas)
CV	Coefficiente de Variação
CXP	Potencial de saída da célula de colisão (do inglês, Collision Cell Exit Potential)
Da	Dalton
DAO	Diamina oxidase
DEA	Disfunção Entérica Ambiental
DP	Potencial de decomposição (do inglês, Declustering Potential)
EA	Enteropatia ambiental
EM	Efeito matriz
EP	Potencial de entrada (do inglês, Entrance potential)
ESI	Ionização por Eletrospray (do inglês, Electrospray Ionization)
EUA	Estados Unidos da América
FIA	Análise de injeção de fluxo (do inglês, Flow Injection Analysis)

FT-ICR	Ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier
GC	Cromatografia Gasosa
GI	Gastrointestinal
GS1	Gás de nebulização (do inglês, Ion source gas 1/Nebulizer)
GS2	Gás fonte de íons (do inglês, Ion source gas 2/Turbo)
GVHD	Doença do enxerto versus host
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
ICH	International Conference on Harmonization
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
Ig	Imunoglobulina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IPT	Instituto de Pesquisas Tecnológicas
IS	Fonte de ionização
IT	Ion-trap
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
I-FABP	Proteína ligadora de ácidos graxos do óleo
JF	Junções firmes
KDa	Kilodalton
LAF	Lactoferrina
LBP	Proteína de Ligação ao LPS
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 em Série (do inglês, Liquid Chromatography Mass Spectrometry tandem)
LD	Limite de Detecção
LPS	Lipossacarídeo
LQ	Limite de Quantificação
L:M	Razão Lactulose:Manitol
m/z	Razão -carga
mE	Experimental
mM	Milimolar

MLCK	Myosin light-chain kinase
MPO	Mieloperoxidase
MRM	Monitoramnte de reações múltiplas (do inglês, Multiple Reaction Monitoring)
MS	Espectroemtria de massas (do inglês, Mass spectrometry)
MSn	Espectros de de múltiplos estágios
mT	Teórica
NE	Elastase neutrofílica
NEP	Neopterinina
nm	Nanômetro
N ₂	Gás Nitrogénio
PCR	Proteína c-reativa
PI	Padrão Interno
PPG	Polipropileno glicol
ppm	Parte por milhão
Q	Quadrupolo
Q1	Primeiro quadrupolo
Q2	Segundo quadrupolo
Q3	Terceiro quadrupolo
QIT	Armadilha de íons de quadrupolo
QQQ	Triplo Quadrupolo
R	Recuperação
RECODISA	Rede de pesquisas nacional
SAA-1	Soro Amiloide A
SFC	Cromatografia de Fluido Supercrítico
SQR	Substância química de referência
SRM	Monitoramento de reações selecionadas (do inglês, Selected reactionmonitorig)
TEM	Temperatura (do inglês, Temperature)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TOF	Tempo-de-vôo (do inglês, time of flyght)
TR	Tempo de retenção
UF	Urina Fortificada

UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
US-FDA	United States - Food and Drug Administration
ZO	Zonula Occluden
%L	Excreção de lactulose (%)
%M	Excreção de Manitol (%)
μ L	microlitro
α 2-AT	Alfa2-macroglobulina
α -1-AT	Alfa-1-Antitripsina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Disfunção Entérica Ambiental (DEA)	18
1.2	Barreira Morfofuncional Gastrointestinal	20
<i>1.2.1</i>	<i>Morfologia da Barreira Gastrointestinal</i>	20
<i>1.2.1</i>	<i>Barreira Morfofuncional Gastrointestinal e Doenças</i>	26
1.2.2	Avaliação da Permeabilidade Intestinal	27
1.2	Espectrometria de Massas	33
<i>1.2.3</i>	<i>Histórico</i>	33
1.3	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS)	35
<i>1.4.2</i>	<i>Fontes de Ionização (FI)</i>	38
<i>1.4.3</i>	<i>Analisadores de Massas</i>	42
1.5	Validação de Métodos Analíticos	48
1.6	Parâmetros da Validação Analítica	51
<i>1.7.1</i>	<i>Seletividade</i>	51
<i>1.7.2</i>	<i>Linearidade</i>	51
1.7.3	Limite de Detecção (LD)	52
<i>1.7.4</i>	<i>Limite de Quantificação</i>	53
<i>1.7.5</i>	<i>Precisão</i>	54
<i>1.7.6</i>	<i>Exatidão</i>	56
<i>1.7.7</i>	<i>Efeito Matriz</i>	57
1.8	Justificativa	59
2	HIPÓTESES	61
3	OBJETIVOS	62
3.1	Objetivo Geral	62
3.2	Objetivos Específicos	62

4	MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1	Intrumentação	63
4.1.1	<i>Reagentes e Consumíveis</i>	63
4.2	Padrões e Preparo das Soluções Analíticas	64
4.3	Otimização do sistema cromatográfico LC-ESI-MS/MS	65
4.3.1	<i>Condições do sistema de detecção de massas - Interfaces ESI</i>	65
4.3.2	<i>Preparo da fase móvel para o sistema cromatográfico</i>	66
4.4	Preparo das Amostras	66
4.5	Preparo de Urinas Fortificadas	67
4.6	Validação da Metodologia Proposta	68
4.6.1	<i>Seletividade</i>	68
4.6.2	<i>Linearidade</i>	68
4.6.3	<i>Limite de Detecção e Limite de Quantificação</i>	69
4.6.4	<i>Exatidão</i>	69
4.6.5	<i>Precisão</i>	70
4.6.6	<i>Efeito Matriz</i>	70
4.7	Considerações éticas	71
4.7.1	<i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>	71
4.7.2	<i>Teste L:M</i>	71
4.8	Análise Estatística	72
5	RESULTADOS	73
5.1	Condições e Parâmetros do HPLC-MS/MS	73
5.1	Parâmetros de Validação Analítica	83
5.1.1	<i>Sensibilidade</i>	83
5.1.2	<i>Linearidade</i>	83
5.1.3	<i>Limite de Detecção e de Quantificação</i>	84
5.1.4	<i>Exatidão e Precisão</i>	84

5.2.5	<i>Efeito Matriz</i>	86
5.2	Aplicação do método - Alterações da permeabilidade intestinal	88
6	DISCUSSÃO	93
7	CONCLUSÃO	101
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	113
	ANEXO B – TCLE	114
	ANEXO C – CALIBRAÇÃO PPG	116
	ANEXO D – CALIBRAÇÃO RESERPINA	117
	ANEXO E – MRM LACTULOSE	118
	ANEXO F - MRM MANITOL	119
	ANEXO G – MRM SORBITOL	120

1 INTRODUÇÃO

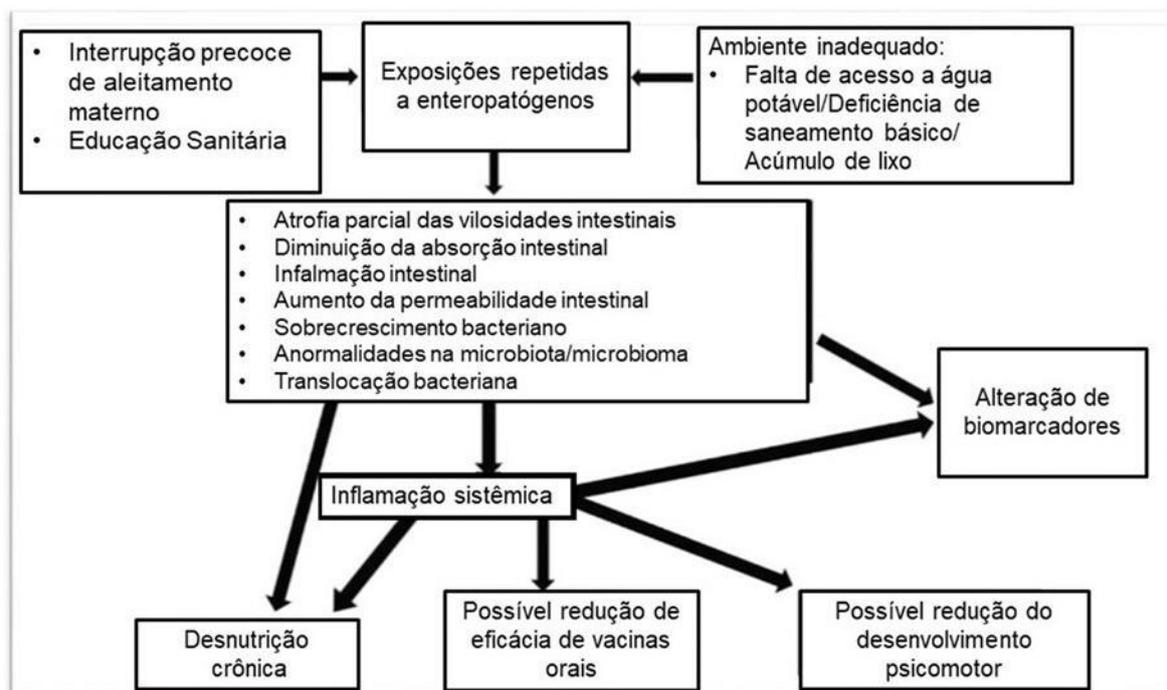
1.1 Disfunção Entérica Ambiental (DEA)

A avaliação da patogenicidade de infecções entéricas no hospedeiro tem se concentrado na avaliação de diarreia definida ou doenças gastrointestinais agudas e os resultados de saúde associados a tais doenças percebidas como binárias, ou seja, morte ou sobrevivência. Foi proposto que a resposta do hospedeiro a infecções entéricas frequentes, altera o intestino de uma forma que afeta adversamente o estado de saúde do hospedeiro, mesmo na ausência de diarreia ou doença gastrointestinal aguda (KOSEK et al., 2017). Por não haver manifestação clínicas aparentes, essas infecções entéricas são pouco estudadas em pesquisas clínicas, apesar de muito tempo desde o aparecimento dos primeiros relatos (MAL-ED NETWORK INVESTIGATORS, 2014).

Na primeira metade da década de 1960 observou-se, na Tailândia, que indivíduos adultos sem sintomatologia gastrintestinal apresentavam redução na absorção intestinal da D-xilose e anormalidades na mucosa do intestino delgado (redução na altura das vilosidades e aumento do infiltrado de linfócitos na lâmina própria) em relação aos indivíduos que viviam nos países desenvolvidos. Em outros países tropicais as mesmas anormalidades morfológicas e funcionais (**FIGURA 1**) foram descritas e o quadro passou a ser denominado enteropatia tropical. Evidências mostraram que essas anormalidades eram adquiridas, ou seja, não estavam presentes no recém-nascido e apareciam depois do primeiro semestre de vida (DENNO et al., 2014; WATANABE; PETRI, 2016).

Após observação que a distribuição geográfica da enteropatia tropical não se restringia somente às regiões tropicais, na década de 1980 autores da América do Sul propuseram a denominação enteropatia ambiental (EA). Nesse contexto, vale destacar que em determinados países desenvolvidos situados na região tropical, como o Qatar e Singapura, não foram identificados esses tipos de anormalidades no intestino delgado (DENNO et al., 2014; GUERRANT et al., 2013; WATANABE; PETRI, 2016).

Figura 1 - Disfunção Entérica Ambiental: origem e consequências. Fatores como ausência de saneamento básico, noções básicas de higiene e repetidas infecções subclínicas, podem contribuir para o desequilíbrio da barreira morfofuncional, podendo levar a inflamação crônica. A inflamação crônica pode comprometer a absorção intestinal e permeabilidade, tendo consequência redução no desenvolvimento neuropsicomotor, a absorção de nutrientes, vacinas e levar a desnutrição na primeira infância.



Fonte: adaptada de WATANABE; PETRI, 2016.

Mais recentemente, foi proposta a denominação disfunção entérica ambiental (DEA) como sinônimo do termo enteropatia ambiental (EA) (KEUSCH et al., 2013) e ampliou-se, também, o interesse na disfunção entérica ambiental em função de sua associação com o déficit de crescimento linear (stunting) observado com frequência em crianças que vivem em condições socioambientais desfavoráveis, como acontece em países em desenvolvimento. Passou-se a valorizar o potencial da disfunção entérica ambiental no comprometimento do pleno crescimento, que é frequentemente observado durante o primeiro ano de vida e irreversível após terceiro ano (DENNO et al., 2014). No entanto, deve ser destacado que a disfunção entérica ambiental pode ocorrer em qualquer faixa etária (BARTELT; BOLICK; GUERRANT, 2019; HARPER et al., 2018; KOSEK et al., 2014, 2017; OWINO et al., 2016).

Em 2018, estimou-se que 151 milhões de crianças menores de cinco anos (22%) sofriam de baixa estatura global (FANZO et al., 2018), principalmente nos países de baixa renda (BLACK et al., 2013). Acredita-se que a baixa estatura contribui para o fraco desenvolvimento cognitivo das crianças, problemas comportamentais e baixo desempenho

escolar que podem persistir até a idade adulta (CHANG et al., 2002; GRANTHAM-MCGREGOR et al., 2007; WALKER et al., 2007).

Além de diminuição do crescimento (diminuição da altura por idade z score), DEA e/ou enteropatógenos são associados a respostas inadequadas a vacinas orais e pode até acelerar a síndrome metabólica e suas consequências cardiovasculares (BARTELT; BOLICK; GUERRANT, 2019).

A DEA não se trata de uma condição patológica simples do aumento da permeabilidade intestinal pelas mudanças morfológicas da barreira morfofuncional intestinal, mas consiste em múltiplas anormalidades, incluindo inflamações entéricas e sistêmicas e alterações metabólicas subsequentes (KOSEK et al., 2017; LOSTIA et al., 2008).

1.2 Barreira Morfofuncional Gastrointestinal

A barreira morfofuncional gastrointestinal é uma das maiores interfaces entre o mundo externo e o meio interno humano. A mucosa intestinal está constantemente exposta ao conteúdo luminal e em condições normais modula a transferência de moléculas como nutrientes, eletrólitos, água, toxinas, micróbios e subprodutos microbianos, do lúmen intestinal para a mucosa. Essas moléculas podem usar a via transcelular e cruzar as membranas apical e basolateral dos enterócitos ou a via paracelular selada por proteínas de junção firme. Como consequência, a barreira intestinal pode afetar o balanço energético, a homeostase da água, a tolerância a antígenos alimentares e a inflamação da mucosa (GENTON; CANI; SCHRENZEL, 2015; KEITA; SÖDERHOLM, 2018) e alterações na função de barreira epitelial ocorrem em condições fisiológicas e patológicas (ZHANG et al., 2020).

A capacidade de proteger do conteúdo luminoso prejudicial e de controlar a permeabilidade da mucosa é definida como a função de barreira intestinal. Se o controle da barreira intestinal for quebrado, por exemplo, por infecções entéricas, isso leva a um aumento da permeabilidade da mucosa e a distúrbios na interação epitelial-imuno-neural (KEITA; SÖDERHOLM, 2018; KUBICA et al., 2012; LIMA et al., 2017).

1.2.1 Morfologia da Barreira Gastrointestinal

Uma das principais características morfológicas do intestino é a existência de vilosidades e de criptas em sua arquitetura. As vilosidades se estendem para o lúmen intestinal e são revestidas por uma só camada de epitélio colunar que contém células

terminalmente diferenciadas. As criptas são invaginações epiteliais na mucosa do intestino, responsáveis pelo potencial proliferativo deste tecido (RODRIGUES et al., 2016).

Conforme as células migram das criptas para o ápice, vão se diferenciando em enterócitos abortivos ou em células secretórias (células caliciformes, células de Paneth ou células enteroendócrinas), reduzindo o ritmo de proliferação e chegando a apoptose no ápice da vilosidade (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006). O complexo juncional apical é necessário para a formação da barreira epitelial (ODENWALD; TURNER, 2017).

As células absorptivas são caracterizadas pela presença de microvilosidades em sua superfície apical, enquanto as células caliciformes apresentam-se em forma de cálice e são caracterizadas por contínua produção de mucina (glicoproteica) para lubrificar e proteger o epitélio intestinal (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006). As células de Paneth encontram-se dispersas na parte inferior da cripta e são responsáveis por secretar proteínas antibacterianas para proteger as células-tronco próximas (PETERSON; ARTIS, 2014). As células enteroendócrinas são responsáveis por secretar vários hormônios intestinais, dentre os quais catecolaminas (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006).

As células epiteliais intestinais interagem entre si através de três complexos juncionais: junções firmes, junções aderentes e desmossomos (KARCZEWSKI et al., 2010; TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001).

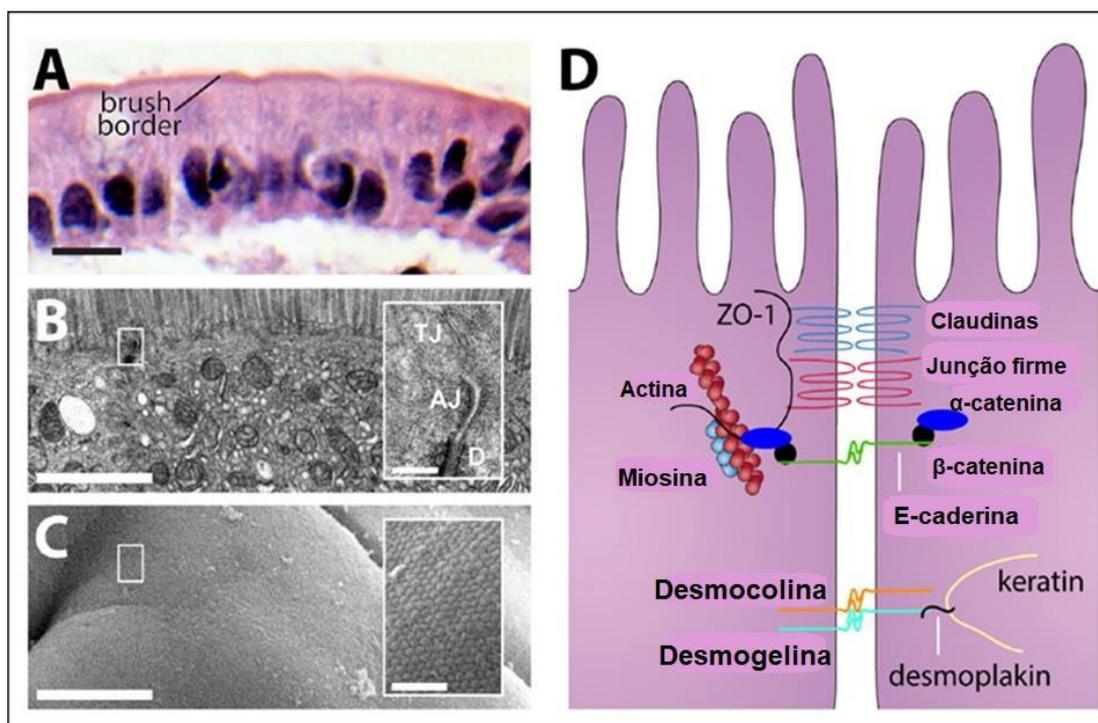
1.2.1.1 Junções Aderentes e Desmossomos

Fornecem forças adesivas necessárias para a manutenção das interações célula-célula. O componente mais conhecido das junções aderentes são as caderinas - proteínas transmembranares de abrangência única que interagem homotipicamente com a porção extracelular das caderinas nas células adjacentes. Na face citoplasmática, as caderinas interagem diretamente com a catenina p120 e a β -catenina, que por sua vez interagem com a α -catenina. Entre outras funções, a α -catenina regula a montagem de actina perijuncional, o que fornece mais resistência a essas estruturas. Além disso, a junção aderente é necessária para a montagem eficiente da junção apertada, uma função que estudos *in vitro* atribuíram à caderina epitelial (Ecadherin) e à α -catenina (**FIGURA 2**) (ODENWALD; TURNER, 2017).

Os desmossomos formam estruturas que se conectam aos filamentos intermediários do citoesqueleto, proporcionando fortes ligações adesivas que mantêm a proximidade celular e são também locais de comunicações intercelulares. Recentemente, uma nova proteína humana conhecida como zonulina foi identificada como moduladora

diretamente da permeabilidade intestinal. Expressão da zonulina de cadeia simples conduz à ativação de moléculas de sinalização, tais como o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGR) e receptor ativado por proteínase 2 (PAR-2), o que resulta no aumento da permeabilidade (RODRIGUES et al., 2016).

Figura 2 - O complexo juncional apical da barreira epitelial intestinal. O complexo juncional apical é necessário para a formação da barreira epitelial. A monocamada epitelial intestinal separa o conteúdo luminal da lâmina própria subjacente. a | Epitélio jejunal humano corado com hematoxilina e eosina, mostrando células formando uma borda em escova da comunidade. Barra de escala = 10µm. b | A microscopia eletrônica de transmissão do epitélio do intestino delgado mostra junções intercelulares, uma borda em escova de microvilosidades e exclusão de organelas da faixa densa de actina cortical logo abaixo da borda em escova. Barra de escala = 500 nm. Detalhe: complexo juncional apical, composto pela junção firme, junção aderente e desmossomo. Barra de escala = 200 nm. c | A microscopia eletrônica de varredura mostra a superfície da borda em escova contínua do intestino delgado. Barra de escala = 2 µm. Detalhe: Matriz de microvilosidades densamente compactadas. Barra de escala = 500 nm. d | A microscopia eletrônica de fratura por congelamento mostra fios de junção rígida. Barra de escala = 100 nm. e | As células epiteliais são mantidas juntas e se comunicam por meio de junções. Esquemático representando proteínas transmembrana juncionais da junção firme (claudinas e proteínas MARVEL associadas à junção firme, junção aderente (E-caderina) e desmossomo (desmogelina e desmocolina) conectado ao citoesqueleto de actina via proteínas citosólicas (ZO1, cateninas e desmoplakin). Junções firmes e aderentes interagem com o citoesqueleto de actina e os desmossomos se conectam aos filamentos intermediários.



Fonte: Adaptada de ODENWALD; TURNER, 2017.

1.2.1.2 Junções Firmes

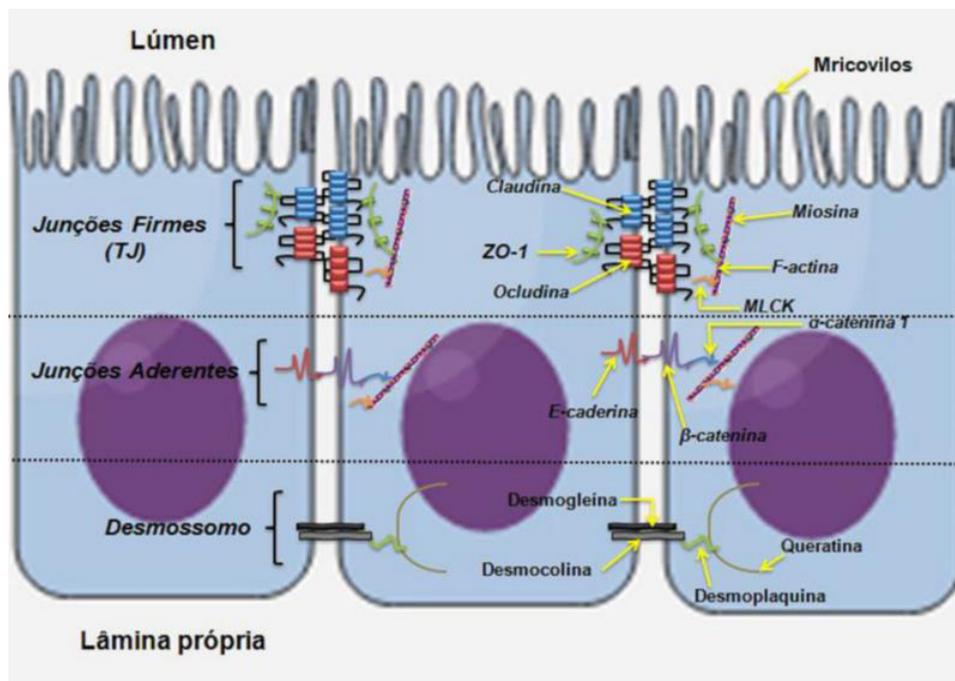
As junções firmes são estruturas complexas e dinâmicas, que incluem mais de 40 proteínas capazes de interagir com a célula adjacente (SCHNEEBERGER; LYNCH, 2004). São constituídas por três grupos de proteínas integrais de membrana- claudinas,

occludinas e moléculas de adesão juncional- além de um número considerável de outras proteínas citoplasmáticas acessórias, as quais incluem as zonula occluden (ZO), cingulina e outras proteínas guanilato-quinase associadas à membrana (RODRIGUES et al., 2016).

As proteínas transmembranares coordenam e refinam os transportes via para celular. Desta forma, proporcionam uma barreira morfofuncional a diversas substâncias e moléculas (CAPLAN, 2008; TURNER, 2009).

As occludinas, a família de claudinas e a tricellulina são proteínas que contêm quatro alças transmembranares e duas extracelulares, com os terminais N e C citoplasmático. As proteínas citoplasmáticas acessórias ZOs, subdividem-se em ZO-1, ZO-2 e ZO-3 e conectam as proteínas transmembranares ao citoesqueleto de actina. Esta interação é necessária para a manutenção da integridade estrutural da função de barreira do epitélio intestinal (**FIGURA 3**). Podendo esta função ser comprometida por diversos estímulos fisiológicos e patológicos (CAPLAN, 2008; TURNER, 2009). As junções firmes, localizadas no local de adesão celular mais apical entre as células epiteliais, são críticas para a formação da barreira paracelular que mantém a hemóstase e determinam também o tamanho e a carga das moléculas que podem passar seletivamente pela barreira (TOKUMASU; TAMURA; TSUKITA, 2017).

Figura 3 - Estrutura morfológica da barreira intestinal. As membranas plasmáticas das células adjacentes são fundidas por meio das junções firmes. As proteínas formadoras dessas junções são claudinas, ocludina e ZO-1, que interagem com os filamentos do citoesqueleto (F-actina e Miosina). Mais abaixo se encontram as proteínas das Junções aderentes: E-caderina, α -catenina 1, β -catenina, δ 1 catenina (também conhecido como P120 catenina; não mostrado) que interagem com F-actina. A MLCK está associada com o anel de actomiosina perijuncional. Desmossomos, que estão localizados abaixo do complexo juncional apical é formado por interações entre desmogleína, desmocolina, desmoplaquina e filamentos de queratina. MLCK (*Myosin light-chain kinase*, do inglês).



Fonte: RODRIGUES et al., 2016.

1.2.1.2.1 Ocludinas

A ocludina (do latim “*occludere*”, passagem restrita), uma fosfoproteína tetraspanina (65 kDa), foi a primeira proteína a ser identificada nas junções firmes (FURUSE et al., 1993). Ela possui quatro domínios transmembranais, ligados a dois extracelulares ricos em tirosina no domínio intracelular C-terminal e N-terminal (SUZUKI, 2020). Sua função deve ser vista mais em um contexto regulador do que como uma proteína estrutural importante no estabelecimento das propriedades da barreira. Seu domínio citoplasmático C-terminal fornece a conexão da ocludina com o citoesqueleto, assegurando uma alta resistência elétrica das monocamadas das células epiteliais e diminuição da permeabilidade paracelular (PERSIDSKY et al., 2006).

1.2.1.2.2 Claudinas

As claudinas (do latim *claudere*, fechar) são uma família de 27 proteínas (20-27 kDa) que possuem quatro domínios transmembranares, com domínios C-terminal e N-terminal citoplasmáticos (TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001). Suas alças extracelulares fazem as interações homofílicas e heterofílicas com células adjacentes, criando uma barreira seletiva para a passagem de determinadas moléculas pela via paracelular (ANDERSON; VAN ITALLIE, 2009). São responsáveis amplamente também pelo controle da adesão celular e pelas características da barreira paracelular (TOKUMASU; TAMURA; TSUKITA, 2017).

Estudos prévios determinaram vários subtipos de claudinas que estão envolvidos na estrutura e funcionamento das junções firmes (TAMURA et al., 2011; TOKUMASU; TAMURA; TSUKITA, 2017; TSUKITA et al., 2008; TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001). Estas possuem padrões de expressão diferentes, com características seletivas de permeabilidade dependentes do número e das posições de aminoácidos carregados na primeira alça extracelular da proteína (RAHNER; MITIC; ANDERSON, 2001). Como exemplo, as claudinas 2 e 15 que apresentam padrões de expressão e função diferentes entre a infância e a vida adulta (TAMURA et al., 2011; WADA et al., 2013).

Estas proteínas podem ser classificadas como formadoras de função de barreira, diminuindo a permeabilidade paracelular; ou formadoras de poros, aumentando a permeabilidade paracelular (ANDERSON; VAN ITALLIE, 2009). As claudina-1, -3, -4, -5, -8, -9, -11, e -14 são exemplos de formadoras de barreira, enquanto claudina-2, -7, -12, e -15 são formadoras de poros (SUZUKI et al., 2014). Diferentes padrões de expressão de claudinas em órgãos, tecidos e células epiteliais regulam sua variedade de funções (TOKUMASU; TAMURA; TSUKITA, 2017).

1.2.1.2.3 Moléculas de Adesão Juncional

São o terceiro grupo de proteínas que compõem o grupo de proteínas membranares que estão envolvidas na construção das junções firmes. São membros da superfamília das imunoglobulinas (Ig) e apresentam peso molecular de aproximadamente 43 kDa (ASSIMAKOPOULOS; PAPAGEORGIOU; CHARONIS, 2011; GONZÁLEZ-MARISCAL et al., 2003). Três membros desta família (JAM-1, JAM-2 E JAM-3) já foram identificados e estruturalmente são constituídas por apenas um domínio transmembranar, um

domínio extracelular N-terminal e pelo pequeno terminal carboxílico citoplasmático (SUZUKI, 2013).

1.2.1.2.4 Zonulas ocludens

As Zonulas ocludens (ZOs) foram as primeiras proteínas específicas identificadas das junções firmes e foram identificadas como, ZO-1 (~220 kDa), ZO-2 (~160 kDa) e ZO-3 (~130 kDa) (ASSIMAKOPOULOS; PAPAGEORGIOU; CHARONIS, 2011; GONZÁLEZ-MARISCAL et al., 2003; SUZUKI, 2013). São proteínas compostas por três domínios PDZ (PDZ-1, PDZ-2 e PDZ-3), um domínio SH3, e um domínio membranal associado à guanilato kinase (SUZUKI, 2013). Estes domínios são importantes por causa do seu papel no arranjo das proteínas, e consequentemente na integridade da membrana (ASSIMAKOPOULOS; PAPAGEORGIOU; CHARONIS, 2011).

1.2.1 Barreira Morfofuncional Gastrointestinal e Doenças

Várias doenças intestinais e sistêmicas estão associadas a aumento da permeabilidade gastrointestinal (GI) através do prejuízo na função de barreira intestinal levando à popularização do diagnóstico e conhecido popularmente como síndrome do intestino permeável (MAES; KUBERA; LEUNIS, 2008; ODENWALD; TURNER, 2013).

Algumas doenças afetam principalmente o intestino, por exemplo a doença inflamatória intestinal, doença celíaca e síndrome do intestino irritável. Além destas, existem doenças sistêmicas ou doenças envolvendo outros sistemas orgânicos, por exemplo, diabetes tipo I, doença do enxerto *versushost* (GVHD), AIDS, artrite reumatoide e autismo (ODENWALD; TURNER, 2013; VAN WIJCK et al., 2011).

As doenças neuroinflamatórias são citadas como potencialmente causadoras de disfunção gastrointestinal. Entre essas doenças estão a esclerose múltipla, distúrbio do espectro da neuromielite óptica, distúrbio associado a glicoproteína de oligodendrócitos de mielina e encefalite autoimune. Doenças do sistema nervoso periférico que afetam o intestino incluem síndrome de Guillain-Barré, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, neuropatia sensorial-autônômica aguda / neuropatia motora-sensorial-autônômica aguda, ganglionopatia autonômica aguda, miastenia gravis e neuropatia autonômica aguda com síndrome paraneoplásica (SAKAKIBARA, 2021).

A análise de permeabilidade pode ajudar a esclarecer o papel da barreira morfofuncional gastrointestinal na doença. Além disso, para avaliação de intervenções

dirigidas à prevenção de aumento da permeabilidade GI e melhoria da integridade do epitélio GI, uma análise sensível da permeabilidade GI é essencial (VAN WIJCK et al., 2011).

1.2.2 Avaliação da Permeabilidade Intestinal

Diferentes métodos são propostos para avaliar a permeabilidade intestinal e suas doenças associadas. Alguns apresentam uma correlação com a função da barreira intestinal, com o dano tecidual e ao grau de inflamação e resposta imune (**TABELA 1**).

Tabela 1 - Marcadores intestinais associados a absorção, permeabilidade, danos e reparação intestinal, inflamação sistêmica e resposta imune.

Biomarcadores	Tipo de Amostra	Função	Patobiologia
A absorção, permeabilidade, danos e reparação intestinal			
Taxa de lactulose: manitol (taxa de L:M)	Urina	A taxa LM é utilizada para avaliar a área de absorção, lesão e reparação da barreira morfofuncional intestinal.	A razão L:M tem mostrado ser um teste sensível para avaliar alterações na permeabilidade, absorção e lesão da barreira morfofuncional gastrointestinal.
% Excreção de lactulose (%L; 342 Da)	Urina	%L mensura o aumento da permeabilidade ou do dano do epitélio intestinal.	%L está associada com doenças que alteram a permeabilidade e / ou lesão da barreira morfofuncional gastrointestinal.
% Excreção de Manitol (%M; 182 Da)	Urina	%M mensura a área de absorção intestinal.	%M está associada com doenças que alteram a área de absorção do intestino.
Proteína ligadora de ácidos graxos do íleo (I-FABP; ~13-14 kDa)	Plasma, soro, urina	Localizado nas células epiteliais do intestino delgado e este é importante para a utilização, transporte e metabolismo de ácidos graxos.	Esse é um marcador bioquímico para a célula intestinal isquemicamente danificado (baixo ou ausência de I-FABP).
Diamina oxidase (DAO; ~91kDa)	Soro	DAO expressa na mucosa intestinal e correlaciona-se inversamente a permeabilidade intestinal.	DAO relacionada a integridade da membrana e maturidade celular da mucosa do intestino delgado
Litostatine-1-beta (Reg1 β ; 19 kDa)	Fecal	Essa proteína é produzida em células de criptas intestinais e desempenha um papel na reparação de tecidos, crescimento e proliferação de células.	Detecção da proteína presente nas fezes, é um indicador da proliferação de células da cripta.

Inflamação Intestinal			
Leucócitos marcados	Fecal	Leucócitos ligados a radiomarcadores, considerado o padrão ouro para teste de inflamação nas fezes	Este indica o aumento de mediadores inflamatórios no aumento da permeabilidade intestinal
Alfa-1-antitripsina (α -1-AT; 52 kDa)	Fecal, Soro	α -1-AT é uma glicoproteína, proteína de fase aguda e é inibidor de proteinase.	A presença na amostra fecal reflete um aumento da permeabilidade intestinal durante o processo inflamatório
alfa2-macroglobulina (α 2M, 820kDa)	Fecal, Soro	É uma glicoproteína que age anti-proteinase, capaz de inativar uma grande variedade de proteínase.	Atua na regulação de reações inflamatórias e inibe a atividade proteolítica da tripsina, da plasmina e da calicreína. Associado a doença de Crohn, mas não doença ulcerativa.
Lactoferrina (LAF; 80 kDa)	Fecal	LAF está presente nos grânulos de neutrófilos e tem atividade antimicrobiana.	Uma concentração elevada é um indicador de inflamação do intestino.
Calprotectina (CAP; 36.5 kDa)	Fecal, plasma, soro, urina	CAP é uma proteína ligadora de cálcio e zinco da família de proteínas S100, formada em granulócitos neutrófilos (também conhecida como MRP-8/14, calgranulina A/B ou S100A8/A9).	CAP é presente no citoplasmática de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos do tecido do íleal. Tem atividade antimicrobiana, imunomoduladora e efeitos antiproliferativos. É um potente fator quimiotático de neutrófilos
Mieloperoxidase (MPO; 150 kDa)	Fecal, urina	MPO está presente nos grânulos de neutrófilos e catalisa a oxidação da substância através H ₂ O ₂ .	O sistema MPO H ₂ O ₂ tem um efeito tóxico sobre os microrganismos e reflete a atividade inflamatória no intestino.
Neopterina (NEP; 253 Da)	Fecal, plasma, soro, urina	NEP é sintetizado e liberado pela reação do sistema imune celular de macrófagos e de células dendríticas após estimulação com IFN-g.	NEP está associada com a ativação do sistema imune celular
Elastase neutrofílica (NE)	Fecal	É uma proteinase serina de grânulos primários de leucócitos polimorfonucleares os quais são liberados após ativação neutrofílica.	Elastase neutrofílica pode solubilizar matriz extracelular e é um indicador de doenças inflamatórias.
Biomarcadores	Tipo de Amostra	Função	Patobiologia

Inflamação sistêmica e resposta imune			
Anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA)	Plasma	São anticorpos para grânulos de neutrófilos. Associados a pacientes com doença ulcerativa, mas não doença de Crohn.	Indica inflamação crônica correlacionada com aumento de permeabilidade intestinal
Anticorpos anti-Saccharomyces (ASCA).	Plasma	Homólogo à parede celular de enterobactérias. Associados a pacientes com doença Crohn, mas não doença ulcerativa.	Indica inflamação crônica correlacionada com aumento de permeabilidade intestinal
Proteína c-reativa (PCR; 125.5 kDa)	Plasma, Soro	PCR é uma proteína de fase aguda produzido exclusivamente no fígado após estimulação pela interleucina-6.	PCR é um marcador para a inflamação aguda e necrose do tecido. A concentração de PCR aumenta dramaticamente após infecções microbianas
Soro Amilóide A (SAA-1; 12.5 kDa)	Plasma, Soro, Urina	O fígado é o principal local de síntese de SAA-1 e é um reagente de fase aguda. SAA-1 tem funções imunomoduladoras (quimiotaxia e expressão de moléculas de adesão), propriedades de citocinas e regulam positivamente metaloproteínas. SAA-1 é envolvido no transporte e metabolismo de colesterol.	O aumento da concentração de SAA-1 é associada com a inflamação sistêmica.
Lipossacarídeo (LPS; ~20 KDa)	Plasma, Soro, Tecido homogenado	LPS é uma endotoxina liberada pelas bactérias.	O aumento de LPS pode induzir efeitos inflamatórios e anti-coagulantes
Proteína de Ligação ao LPS (LBP; 51 kDa)	Plasma, Soro	LBP é uma proteína de fase aguda que é constitutivamente produzida pelo fígado. A proteína catalisa a monomerização do LPS e sua transferência para sCD14 e às lipoproteínas.	Esta proteína tem ambos os papéis na ativação de monócitos por LPS e na neutralização dos LPS pela via da lipoproteína

Fonte: RODRIGUES et al., 2016.

Além das incertezas com os biomarcadores, a comunidade científica ainda não chegou a um consenso sobre quais tipos de definições são relevantes para o entendimento da DEA. Diferenças apresentadas nas populações que sofrem de DEA mostram uma mudança nas distribuições de biomarcadores, tornando difícil fazer diagnósticos individuais, e intervenções em nível de população podem ser mais apropriadas (ROGAWSKI; GUERRANT, 2017).

Após constatação da existência de biomarcadores associados a DEA, o número destes biomarcadores não invasivos vem se expandindo e se caracterizam por diferentes aspectos

da fisiologia e integridade intestinal. O biomarcador mais amplamente utilizado para DEA é o teste de lactulose: manitol (razão L:M) para permeabilidade intestinal que tem sido usado para demonstrar que a permeabilidade intestinal alterada (KOSEK et al., 2017; LOSTIA et al., 2008).

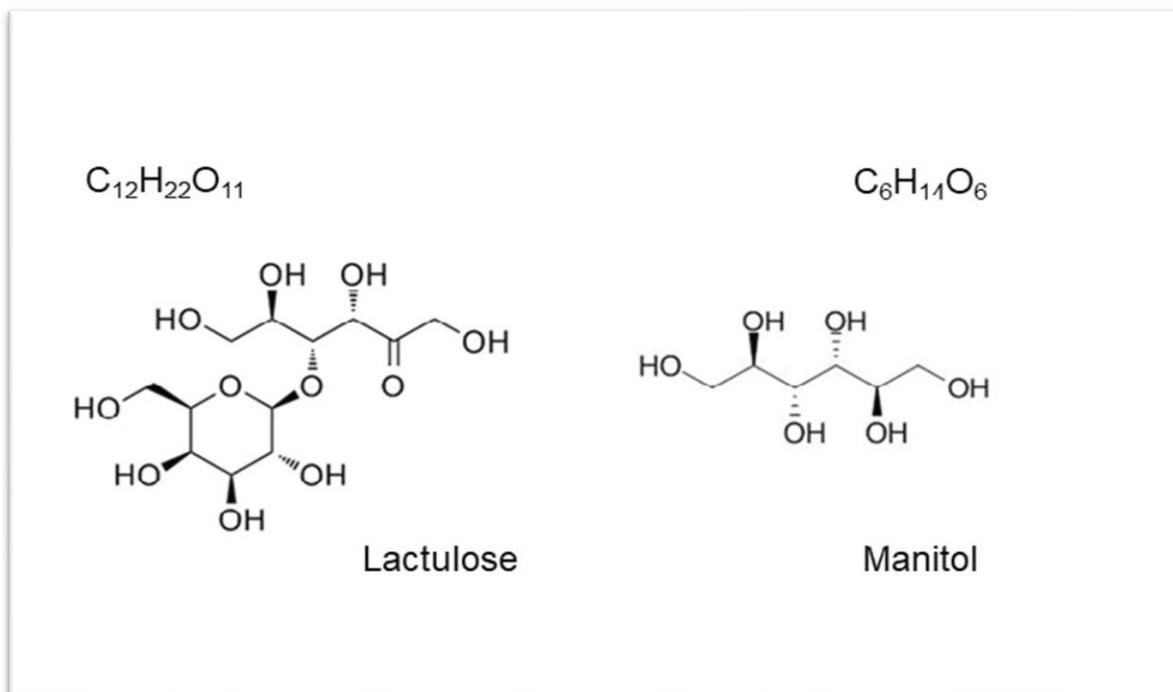
1.2.3.1 Teste Lactulose: Manitol

Existem duas vias de transporte no epitélio intestinal saudável. Na primeira, denominada de transcelular, as moléculas menores do que 0,4 nanômetros (nm), atravessam as membranas celulares através de pequenos poros aquosos (0,4 a 0,7 nm), de alta incidência, presentes na membrana dos enterócitos (LIMA, 1998; TRAVIS; MENZIES, 1992; VOJDANI, 2013). Na segunda, denominada paracelular, a passagem das moléculas ocorre entre as células. Isso acontece com as moléculas maiores do que 0,5 nm, que permeiam a mucosa intestinal através de canais maiores (6,5 nm de raio), de baixa incidência, susceptíveis ao estresse hiperosmolar, presentes nas junções firmes (LIMA, 1998; TRAVIS; MENZIES, 1992; VOJDANI, 2013).

A medida da excreção urinária de açúcares não metabolizados administrados por via oral é um marcador molecular útil de avaliação da área de absorção intestinal, permeabilidade transcelular e paracelular, bem como a integridade da mucosa intestinal (BARBOZA JR. et al., 1999; LIMA et al., 1997; GERVASONI et al., 2016) e vem sendo amplamente aceito para avaliação de alterações na função intestinal (LIMA ET AL., 1997; BARBOZA JR. et al., 1999; DENNO et al., 2014; LEE et al., 2017; LOSTIA et al., 2008).

O teste proposto, denominado teste lactulose:manitol (L:M), baseia-se na análise de dois carboidratos, o manitol, um monossacarídeo de peso molecular de 182 Da, o qual é transportado na célula intestinal através da via transcelular, enquanto outro carboidrato, a lactulose, um dissacarídeo de 342 Da (**FIGURA 4**), é transportado através do cruzamento das junções firmes localizadas nos espaços intercelulares consistentes na via paracelular da barreira intestinal (RODRIGUES et al., 2016).

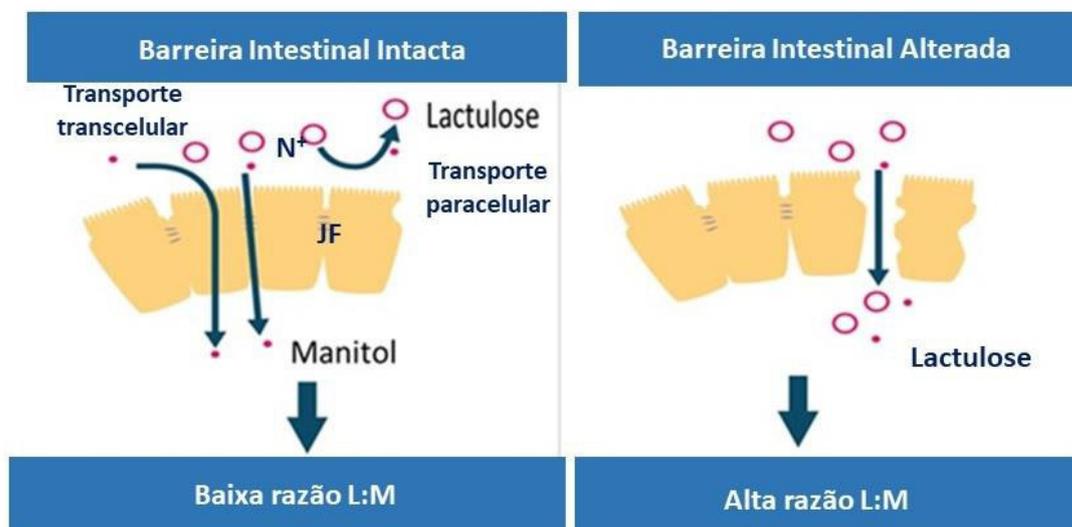
Figura 4 - Estrutura química dos açúcares lactulose e manitol. A lactulose é um dissacarídeo de alto peso molecular que em condições normais é absorvido em concentrações baixas através do intestino. O monossacarídeo manitol, de baixo peso molecular, é absorvido na barreira intestinal íntegra.



Fonte: Adaptada de WWW.CHEMSRC.COM, 2021.

Por se tratar de um teste quantitativo, o teste L:M mede diretamente a capacidade desses dois açúcares não metabolizados em penetrar a mucosa intestinal. A lactulose é uma molécula grande, minimamente absorvida, menos de 1%, pelos enterócitos enquanto o manitol é uma molécula menor e é absorvida por via transcelular em torno de 10% (**FIGURA 5**). Um aumento da excreção urinária de lactulose indica aumento da permeabilidade intestinal, enquanto uma diminuição da excreção de manitol indica diminuição na capacidade absorptiva (DENNO et al., 2014; GERVASONI et al., 2016).

Figura 5 - Transporte de Lactulose e Manitol em Função da Barreira Intestinal. Em condições normais, o manitol é absorvido através de barreira intestinal íntegra via transporte transcelular (10%). A permeação da lactulose ocorre apenas em pequenas quantidades (1%) por transporte paracelular/junções firmes (JF).



Fonte: Adaptada de EXAMINE.COM, 2021.

O teste de L:M tem sido proposto na prática clínica para análise da permeabilidade intestinal em pacientes com dermatite atópica, intolerância a proteína do leite de vaca, doença celíaca, fibrose cística, doença de Crohn, diarreia aguda e crônica e outras doenças e apresentou relação com alteração histopatológica (número de linfócitos de células intra-epiteliais) (CAMPBELL et al., 2003; KUBICA et al., 2012; LOSTIA et al., 2008; PASCHOAL et al., 2008; VILELA et al., 2008). Atualmente é o mais comum teste usado de permeabilidade intestinal e DEA entre as crianças do mundo em desenvolvimento (DENNO et al., 2014), é barato e preciso para avaliar a integridade da mucosa gastrointestinal sem uso de métodos invasivos (GERVASONI et al., 2016).

Com o surgimento da pandemia por SARS-CoV-2 e a possível associação com alterações gastrointestinais, o teste L:M pode ser útil para avaliação dessas alterações em pacientes com manifestações gastrointestinais. Wang e colaboradores (2020), demonstraram uma incidência de diarreia em pacientes com COVID-19 variando entre 2% e 49,5%. A principal causa da diarreia foi considerada a invasão pelo SARS-CoV-2 das células epiteliais do intestino delgado que expressam enzima conversora de angiotensina -2 (ACE-2), causando danos intestinal local.

Existe uma variedade de técnicas analíticas usadas para determinar lactulose e manitol em amostras de urina. Na maioria das vezes são utilizados métodos enzimáticos, sendo também citadas: cromatografia gasosa, cromatografia líquida, cromatografia de troca

iônica e eletroforese capilar. Dentre elas, a Cromatografia Líquida de Alta Performance tem sido um dos métodos mais utilizados, sendo mais simples de realizar, preciso, rápido e de fácil automação (GERVASONI et al., 2018; KUBICA et al., 2012).

Recentemente, a cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas tem sido considerado a plataforma ideal por sua alta seletividade, sensibilidade e produtividade (GERVASONI et al., 2016, 2018; OSS et al., 2010).

1.2 Espectrometria de Massas

1.2.3 Histórico

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica baseada na determinação da relação entre a massa e a carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa. Os princípios fundamentais da MS se deram em 1897 através de experimentos do pioneiro J. J. Thomson, que estudou os raios catódicos, levando a todo posterior desenvolvimento da técnica. Já no ano de 1913, Thomson construiu o primeiro espectrógrafo de s detectando a presença de isótopos no gás neônio, e desta forma, impulsionando a descobertas de compostos isotópicos. Os primeiros espectrômetros foram desenvolvidos por A. J. Dempster (1918) e F. W. Aston (1919), possibilitando a descoberta de diferentes isótopos de elementos, permitindo a medição de s atômicas exatas, além da descoberta de diversos elementos não radioativos. A partir da década de 50 ampliaram-se as pesquisas aplicando-se MS com o desenvolvimento dos analisadores de s do tipo tempo-de-vôo (TOF), ion-trap (IT), quadrupolo (Q) e ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR) (PAZ, 2017).

Atualmente, a espectrometria de massas é uma técnica microanalítica utilizada para obter informação da massa molecular e de características estruturais da amostra. A espectrometria de massas é uma das mais importantes ferramentas analíticas disponíveis aos cientistas, já que é capaz de fornecer informação sobre: i) a composição elementar de amostras; ii) a estrutura molecular; iii) a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas; iv) a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras e ainda é utilizada em diversos estudos na área de Biologia, Ciências Médicas e de Ciências Tecnológicas (RODRÍGUEZ et al., 2003).

A espectrometria de massas tem sido proposta e apresentada como vantagem em determinar e identificar simultaneamente a relação L:M na urina. Os valores de potenciais de sensibilidade e especificidade têm sido avaliados, demonstrando ser um método simples e de fácil execução (KUBICA et al., 2012).

De acordo com a IUPAC, a Espectrometria de massas (MS) é definida como o estudo da matéria pela formação de íons em fase gasosa e posteriormente caracterizados por um Espectrômetro de massas de acordo com sua massa, carga, estrutura ou propriedades físico-químicas (*IUPAC Gold Book*). O resultado de uma análise por MS se dá pela forma de um espectro, onde a abscissa corresponde à razão entre a massa e o número de cargas do íon (m/z) e a ordenada está relacionada à sua intensidade. Em virtude do alto grau informativo das análises, MS pode ser utilizada tanto qualitativamente (ou seja, para identificação de composição elementar de compostos e elucidação estrutural) quanto como para análises quantitativas, em geral onde se buscam determinar analitos nos níveis de traços em matrizes complexas (KIND; FIEHN, 2010; RIBANI et al., 2004).

Um espectro de massa apresenta, além da m/z do composto de interesse, o sinal referente ao padrão isotópico do analito, que por sua vez é resultante do padrão isotópico dos átomos constituintes do composto. Com isso, essa informação pode ser utilizada para prever a presença de alguns átomos com padrões isotópicos bem característicos (Cl, Br, S, dentre outros). Além disso, o espectro de MS também pode, dependendo das condições de aquisição, apresentar sinais referentes à fragmentação do íon originalmente gerado na fonte. Esses fragmentos por sua vez podem ser muito úteis tanto do ponto de vista qualitativo, fornecendo informações auxiliares para elucidação estrutural, quanto quantitativo, no sentido de aumentar a seletividade do método analítico. Finalmente, em virtude do seu caráter universal, o espectro de MS em geral apresenta sinal de outras espécies que são simultaneamente ionizadas ao analito de interesse. Nesse caso é importante ressaltar que a relação de intensidade entre dois íons diferentes no espectro não está diretamente relacionada às concentrações relativas do mesmo em solução, visto o caráter intrinsecamente não quantitativo da técnica (RIBANI et al., 2004).

Assim como em outras técnicas, alguns parâmetros em MS devem ser considerados quando se visa um determinado objetivo analítico. No caso de MS essa questão é aparentemente mais crítica em virtude do fato que diferentes instrumentos apresentam diferenças significativas nesses parâmetros e, paralelamente a isso, apresentam também diferenças significativas de preços. Desse modo, não é incomum um equipamento de MS de baixo valor relativo ser mais útil que um equipamento com preço superior a 10 vezes maior. Um dos parâmetros mais importantes a ser considerado é a Exatidão de s , dada pela diferença entre as s teóricas e obtidas experimentalmente. Esse valor pode ser expresso tanto no modo

absoluto (simplesmente pela diferença, expressa como Da ou mais comumente mDa) como relativo (em unidades de partes por milhão, ppm), de acordo com a expressão abaixo:

$$\Delta m = [(mE - mT)/mT] \times 10^6$$

onde, mE e mT são, respectivamente, as s Experimental e Teórica. Alguns Espectrômetros de s tem a capacidade de fornecer a do composto de interesse com erros inferiores a 5 ppm; essas condições são fundamentais toda vez que se deseja publicar/patentear uma nova molécula (WEBB et al., 2004).

Esses dados são de grande valia, uma vez que se a de um composto desconhecido for medida com exatidão suficiente, sua fórmula molecular pode ser obtida sem nenhum outro tipo de conhecimento prévio do analito de interesse; essa informação pode ser ainda mais exata caso a relação de intensidade entre os íons do padrão isotópico sejam medidos adequadamente (KIND; FIEHN, 2010).

Os pontos fortes da técnica são a velocidade, com separação de analitos em milissegundos, adequação para monitoramentos em tempo real e baixo custo. Encontrando grande aplicação nos campos militar e de segurança para análise de traços de vapores orgânicos, especialmente compostos como explosivos, drogas e agentes de guerra química (COLLINS; LEE, 2002).

1.3 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS)

A cromatografia líquida tem como princípio a separação de componentes presentes em uma amostra. A separação acontece em decorrência de diferenças nas propriedades físico-químicas dos componentes da amostra, os quais interagem distintamente com as fases estacionária e móvel, promovendo a eluição do analito em função de seu tempo de retenção (HARVEY, 2000). Essa técnica, além de ser ideal para a separação, também é utilizada para identificar e quantificar uma substância em uma mistura complexa (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Os parâmetros cromatográficos mais relevantes a serem considerados são: preparo da amostra; volume de injeção; composição e gradiente da fase móvel; fluxo da fase móvel; tipo de fase estacionária; temperatura da coluna; e tipo de detector (HARVEY, 2000; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2011).

Quando acoplada à espectrometria de massas (MS), a cromatografia líquida há muito tempo é uma ferramenta analítica popular e poderosa em uso para quantificação de

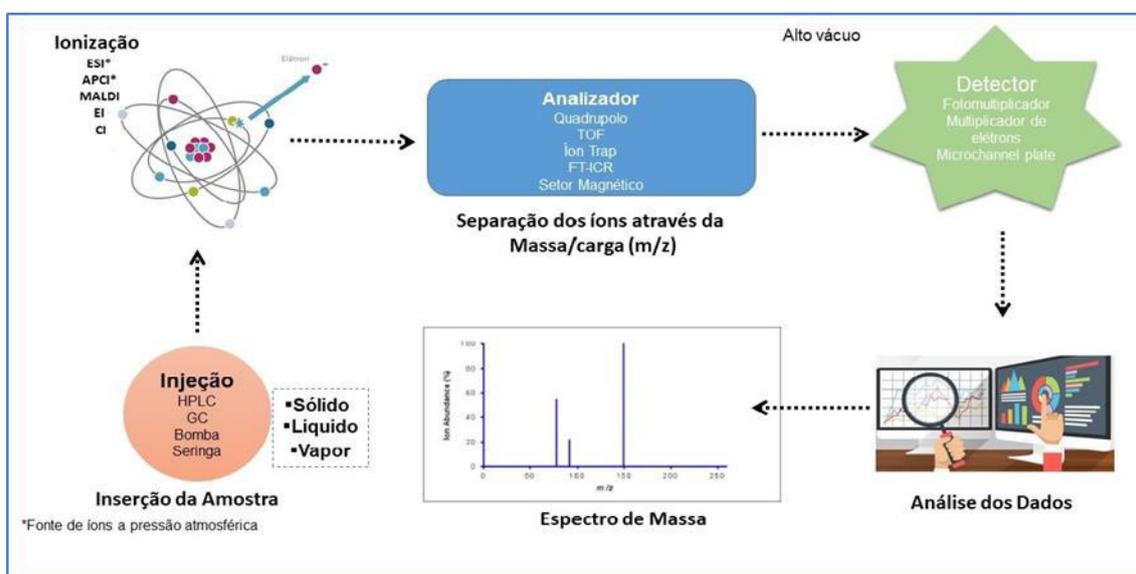
moléculas pequenas e estudos metabolômicos. Técnicas de plataforma de MS de baixa resolução, como triplo quadrupolo (QQQ) e armadilha de íons de quadrupolo (QIT) geralmente têm velocidade de varredura rápida e alta sensibilidade (como QQQ), mas muitas vezes não podem obter espectros de MS de alta precisão. Devido às suas características, a análise de alvo clássica baseada no monitoramento de múltiplas reações (MRM) de um espectrômetro de triplo quadrupolo é a estratégia mais comumente usada para determinação de múltiplos analitos em sistemas complexos, e tem sido considerada como padrão ouro por sua alta sensibilidade, ampla faixa dinâmica, precisão de quantificação confiável e estabilidade (SUN et al., 2020).

Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção por espectrometria de massas *tandem* (MS/MS) é agora considerada a método de escolha para a determinação quantitativa de drogas e metabólitos em fluidos biológicos. A metodologia alcançou seu status preferido porque foi percebido que com MS/MS a detecção foi altamente seletiva e, portanto, eliminada de forma eficaz interferência por impurezas endógenas, além de permitir identificação e quantificação do analito de interesse em concentrações na faixa de nanogramas por mililitro (RATH; MARTÍNEZ-MEJIA; SCHRÖDER, 2015). Mesmo sem qualquer limpeza ou extração de amostras e com muito pouco ou nenhuma separação cromatográfica, impurezas endógenas de biofluidos não foram detectadas, e o único sinal MS/MS observado em biofluidos de controle originado do analito desejado. Portanto, uma percepção comum foi que a utilização de HPLC-MS/MS foi praticamente garantida a seletividade do método e extração de amostra e a cromatografia poderia ser simplificado ou mesmo eliminado (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003). No entanto, o tempo mostrou que a espectrometria de massas tem sua sensibilidade aumentada quando acoplada a cromatografia líquida, portanto não podendo eliminar a separação através da cromatografia (GERVASONI et al., 2016; IGLESIAS, 2013; OSS et al., 2010).

Existem diversos tipos de espectrômetros de massas, cada qual com suas vantagens e limitações (LANÇAS, 2009; NASCIMENTO, 2017). Porém, todos apresentam os mesmos componentes básicos: sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador/separador de s, detector e registrador. Além disso, como será colocado posteriormente, alguns equipamentos apresentam dois analisadores de s separados por uma câmara de colisão. Um esquema da estrutura básica de um espectrômetro de s é mostrado na **FIGURA 6**.

O sistema de injeção da amostra se dá de forma direta na fonte ou através do acoplamento com a Cromatografia Gasosa ou Líquida. Na fonte de íons, os componentes de uma amostra são convertidos em íons positivos ou negativos os quais são imediatamente acelerados em direção ao analisador de massas. A função do analisador é separar tais íons de acordo com a razão entre a sua massa e sua carga elétrica, m/z (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS, 2009; REBELO, 2014). Os espectrômetros de massas podem ser classificados em várias categorias dependendo da natureza do analisador de massas. Finalmente, um detector recebe os íons que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados e armazenados na memória de um computador e mostrado em uma tela (LANÇAS, 2013; NASCIMENTO, 2017).

Figura 6 - Esquema de um espectrômetro de massas. Um espectrômetro de massas é constituído das etapas desde o sistema de inserção da amostra, passando pela fonte de íons, o analisador até o detector, onde se dá a identificação do analito. Todas as etapas dependem do tipo de analito a ser quantificado.



Fonte: Autoria própria (2021).

1.4.1 Sistema de Inserção de Amostras

Em virtude do caráter universal da espectrometria de massas (MS – Mass Spectrometry), sua versatilidade se destaca pelos diferentes tipos de sistemas de inserção de amostras, que podem ser sólidas, líquidas ou até mesmo gasosas. Com isso, o sistema de introdução pode variar desde uma simples bomba de seringa a sistemas de Cromatografia Gasosa (GC do inglês – Gás Chromatography), HPLC (do inglês – High Performance Liquid Chromatography), (UPLC do inglês - Ultra Performance Liquid Chromatography), Eletroforese Capilar (CE do inglês - Capillary Electrophoresis) e Cromatografia de Fluido Supercrítico (SFC).

1.4.2 Fontes de Ionização (FI)

O processo de detecção por MS inicia com a ionização dos compostos alvo. Uma energia é aplicada de acordo com o agente de ionização e transferida direta ou indiretamente à amostra para promoção da ionização do composto. Como existem inúmeros tipos de amostras e espécies químicas, diferentes estratégias de ionização têm sido desenvolvidas para adaptar o sistema a cada situação (BLASCO; PICÓ, 2007; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS, 2013).

As fontes de ionização foram desenvolvidas com o intuito de resolver a incompatibilidade entre as vazões empregadas no sistema cromatográfico. Elas auxiliam na remoção do solvente e na interface entre a coluna cromatográfica e o espectrômetro de massas. Estas fontes facilitam na transferência da amostra que elui da coluna cromatográfica para a fase gasosa (interface coluna-MS) e a ionização da amostra (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS, 2009). As duas interfaces mais utilizadas na espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida é baseada na Ionização a Pressão Atmosférica (API, do inglês Atmospheric Pressure Ionization) que engloba a Ionização por Eletronebulização (ESI, do inglês Electrospray Ionization), a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI, do inglês Atmospheric Pressure Chemical Ionization) (LANÇAS, 2009; NASCIMENTO, 2017; SILVA et al., 2019).

Estas fontes trabalham de forma complementar, sendo a ESI, de caráter mais universal e como maior eficiência para ionizar compostos mais hidrofílicos, enquanto que a APCI é mais eficiente na ionização de compostos com maior hidrofobicidade (HOFFMANN; STROOBANT, 2013; LIU; SUN, 2012).

A fonte ESI tem como princípio fundamental, na ionização do analito, que passa por um capilar metálico mantido sob alta voltagem antes de atingir a câmara de ionização. Um campo elétrico induz a formação de um spray a partir de uma gota em formato cônico na ponta do capilar. As gotículas carregadas, sob atmosfera de gás inerte (usualmente N₂) e temperaturas elevadas, perdem solventes, produzindo o íon quasi-molecular que é direcionado para o analisador de ss (HO et al., 2003; HOFFMANN; STROOBANT, 2013).

A fonte de ionização utilizada neste trabalho foi por Ionização por Eletronebulização (ESI, do inglês Electrospray Ionization).

1.4.2.1 Ionização por Eletronebulização – ESI

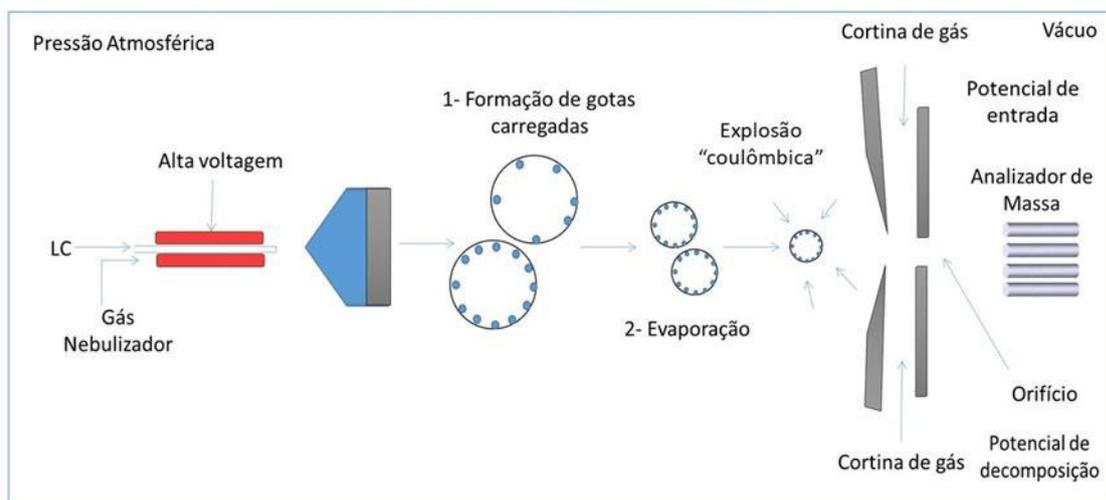
Em ESI, moléculas de baixo ou alto peso molecular, de média a alta polaridade e complexidade estrutural podem ser facilmente ionizadas por um modo brando e analisadas

por MS. A característica principal deste modo de ionização (**FIGURA 7**) é que as espécies dos analitos são ionizadas em solução no interior do capilar e transferidas para a fase gasosa como entidades isoladas, na qual três tipos de íons são formados por processos essencialmente distintos: reações redox (oxidação/redução) que produzem íons moleculares ($M^{\bullet+}$) ou ($M^{\bullet-}$); reações ácido/base (protonação/desprotonação) que resultam na formação de moléculas protonadas ($[M+H]^+$) ou desprotonadas ($[M-H]^-$) onde normalmente são denominadas de íons quasi-moleculares; e reações de coordenação com cátions (geralmente os da família 1A) ou ânions (principalmente cloretos), que leva à formação de moléculas cationizadas ($[M+Na]^+$), ($[M+K]^+$) ou anionizadas ($[M+Cl]^-$) (ALBERICI et al., 2010; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; CROTTI et al., 2006; NASCIMENTO, 2017; RASHED et al., 1995).

As gotículas carregadas, geradas na saída da ponta de eletro pulverização, passam por um gradiente de pressão e gradiente de potencial em direção à região do analisador do espectrômetro de massas. Com o auxílio de uma temperatura elevada de fonte de ESI e / ou outra corrente de gás de secagem de nitrogênio, as gotículas carregadas são continuamente reduzidas em tamanho por evaporação do solvente, levando a um aumento da densidade de carga superficial e uma diminuição do raio da gota. Finalmente, a intensidade do campo elétrico dentro da gota carregada atinge um ponto crítico no qual é cinética e energeticamente possível que os íons na superfície das gotas sejam ejetados para a fase gasosa. Os íons emitidos são amostrados por um cone do skimmer de amostragem e, em seguida, são acelerados no analisador de massas para análise subsequente da moleculares e medição da intensidade do íon (BRUINS, 1998; HO et al., 2003).

A transferência de espécies iônicas da solução para a fase gasosa por ESI envolve três etapas: (1) dispersão de um spray fino de gotículas de carga, seguido por (2) evaporação do solvente e (3) ejeção de íons das gotículas altamente carregadas tubo, que é mantido em alta voltagem (por exemplo, 2,5 - 6,0 kV) em relação à parede da câmara circundante (**FIGURA 7**). É gerada uma névoa de gotículas altamente carregadas com a mesma polaridade da tensão capilar. A aplicação de um gás nebulizador (por exemplo, nitrogênio), que cisalha em torno da solução de amostra eluída, aumenta uma taxa de fluxo de amostra mais alta (STEVENS et al., 2000).

Figura 7 - Mecanismo de Ionização por electrospray. Formação de gotas com superfícies carregadas. A evaporação do solvente, devido à ação do gás nebulizador, diminui o tamanho destas gotas e, conseqüentemente, aumenta a repulsão eletrostática entre as cargas formais em suas superfícies. A tensão superficial das gotas vai se tornando cada vez menor até ocorrer o fenômeno de "explosão coulômbica" das mesmas, que resulta na formação de gotas menores, com posterior liberação dos íons. Forma-se, assim, um "spray" de partículas carregadas.



Fonte: Autoria própria (2021).

A espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) surgiu como uma técnica importante em laboratórios clínicos por fornecer uma ferramenta sensível, robusta e confiável para estudar, em pequenos volumes, biomoléculas não voláteis e termicamente lábeis que não são passíveis de análise por outras técnicas convencionais. Juntamente com um cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC) para fracionamento molecular antes da análise de espectrometria de massas, HPLC / ESI-MS tornou-se uma técnica muito poderosa capaz de analisar moléculas pequenas e grandes de várias polaridades em uma amostra biológica complexa. Com as capacidades de separação adicionais de espectrometria de massas em *tandem* (MS em uma série, comumente denotado como MS / MS), a purificação de amostra complicada e os procedimentos para a formação de derivados comumente usados em cromatografia gasosa (GC) -MS podem ser muito simplificados.

Juntamente com a introdução automatizada de amostras, HPLC / ESI-MS / MS é uma técnica de análise de fluxo para análise rápida e alto rendimento de amostra. O foco dos fabricantes de MS nos últimos anos tem sido o desenvolvimento de analisadores de MS controlados por software de computador amigável, permitindo gerenciamento dessa técnica sem uma compreensão profunda dos complicados processos físicos e princípios matemáticos (HO et al., 2003).

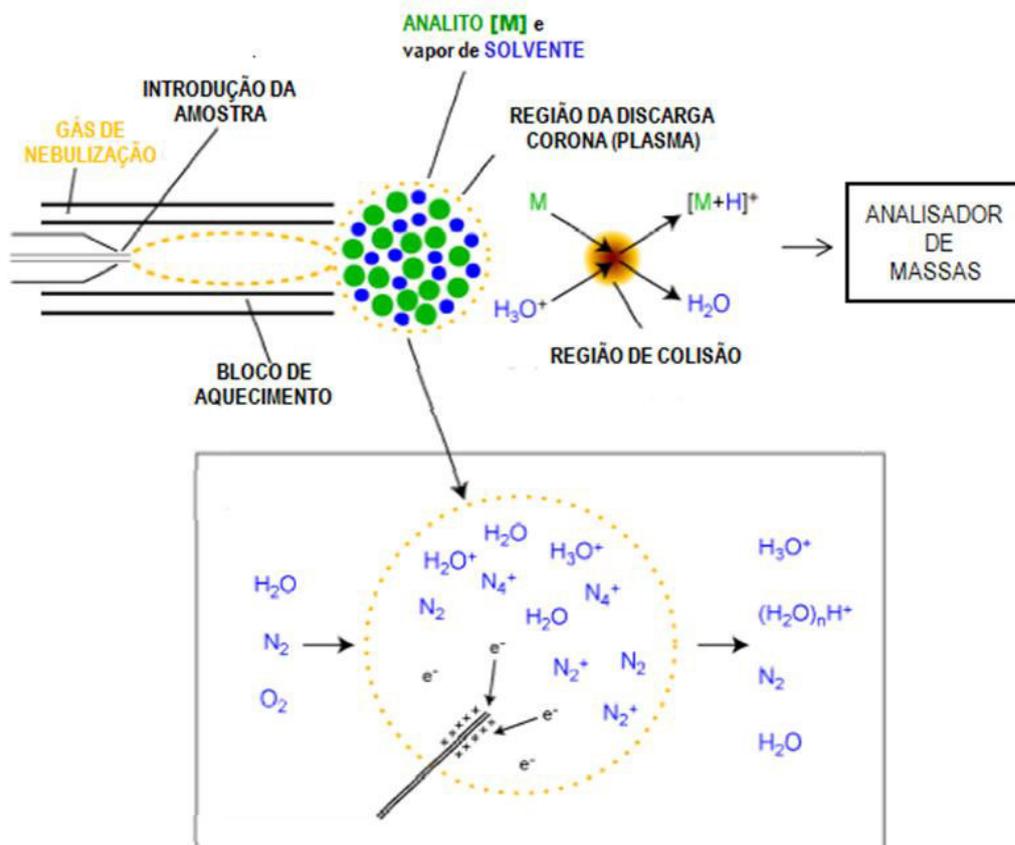
1.4.2.2 Ionização Química à Pressão Atmosférica – APCI

No caso de moléculas de polaridade média a baixa, a ESI pode não apresentar uma resposta adequada para o fim analítico de interesse. Com isso, surge uma técnica de ionização alternativa, Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI) (LANÇAS, 2013; MASIÁ; BLASCO; PICÓ, 2014). A fonte APCI, promove a ionização do analito sob pressão atmosférica quando este colide com uma fonte íons de primários (ex. N_2 , NH_3 , CO) presentes na fonte. Esse tipo de fonte apresenta a vantagem de gerar menos fragmentos no espectro, facilitando a detecção de alguns íons moleculares por promover uma fragmentação mais branda do analito, servindo como técnica complementar a outros tipos de fragmentação (HOFFMANN; STROOBANT, 2013).

É uma ferramenta indicada para a análise de moléculas neutras que não sejam facilmente ionizáveis em solução, e não muito lábeis. Nesse caso, diferentemente de ESI, o analito é primeiramente volatilizado (o que requer que o mesmo apresente certa estabilidade térmica) e posteriormente ionizado. Análoga a ionização química, APCI é uma ionização relativamente suave e induz a pequena ou nenhuma fragmentação do analito, pois não são aplicadas voltagens no spray formado, e as moléculas neutras são levadas para a fase gasosa por um processo térmico.

O processo de dessolvatação é alcançado pelo aquecimento da solução dentro da sonda de APCI, normalmente mantido entre 150 e 550 °C. Isso acontece por meio de uma sonda com um capilar de sílica fundido envolto por uma resistência; a essa é aplicada uma corrente que eleva a temperatura do meio, levando à vaporização da fase móvel. O analito em fase gasosa é então direcionado a uma agulha metálica (Agulha Corona), onde é aplicada alta corrente que induz a ionização. A descarga corona com uma voltagem aplicada entre 3-5 kV proporciona os elétrons que ionizam o analito gasoso via uma série de reações íon/molécula em fase gasosa à pressão atmosférica (Figura 5). Inicialmente são ionizadas as moléculas mais presentes no meio (N_2 , visto que a ionização ocorre à pressão atmosférica), que posteriormente transferem carga para os analitos de interesse por meio de uma cascata de reações íon-molécula (LANÇAS, 2013).

Figura 8 - Representação do processo de ionização química à pressão atmosférica-APCI. No modo positivo, os elétrons energéticos iniciam uma sequência de reações com o gás de nebulização (normalmente nitrogênio) formando íons moleculares de nitrogênio. Dependendo da composição da fase móvel (solvente, S) são formados íons do tipo $S^{•+}$ ou $[S + H]^+$ entre outros, via uma série de reações íon/molécula com os íons moleculares de nitrogênio.



Fonte: Adaptado de NACHTIGALL, 2009.

A técnica de APCI determina massas molares menores do que 2000 unidades, podendo ser usada na maioria dos casos no modo positivo. O fato de serem empregadas temperaturas mais altas, em relação à ESI, desfavorece a técnica, sendo menos utilizada em análise de biomoléculas grandes (ex.: carboidratos e proteínas) e termicamente instáveis (NÚÑEZ; MOYANO; GALCERAN, 2005; PRESTES et al., 2009).

1.4.3 Analisadores de Massas

Após a ionização, os analitos são conduzidos para o interior do analisador de massas sob alto vácuo, onde podem ser selecionados, focalizados e/ou fragmentados de acordo com o seu valor de m/z (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005; WEST et al., 2006).

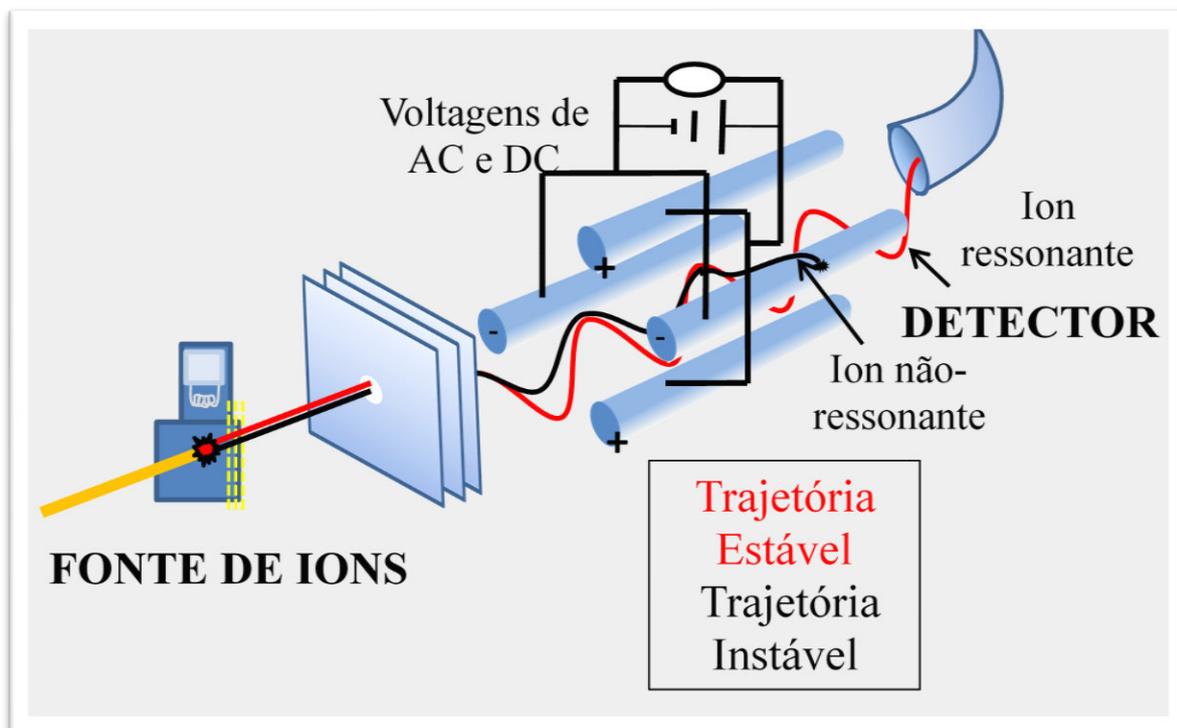
Os analisadores de são selecionados de acordo com tipo de análise e função da dinâmica de funcionamento e de separação de íons (HOFFMANN; STROOBANT, 2013).

Analisadores do tipo triplo quadrupolo (QqQ) e time of flight (TOF) são os mais frequentemente utilizados, devido ao fato de apresentarem características singulares para análises de identificação e quantificação em matrizes biológicas (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009), tais como elevada sensibilidade para o triplo quadrupolo e elevada seletividade para o TOF. Comparativamente, enquanto o primeiro apresenta elevada sensibilidade e baixa resolução o segundo é de alta resolução e baixa sensibilidade (LIU; SUN, 2012). Por essa razão o QqQ é mais utilizado para ensaios de quantificação, enquanto o TOF é adotado para identificação de fármacos (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LIU et al., 2016; THOREN et al., 2016).

1.4.3.1 Sistema Quadrupolos

O analisador de massas mais antigo é o quadrupolo simples, o qual ainda hoje é muito utilizado devido ao seu custo mais acessível e sua facilidade de compreensão e operação (HOFFMANN; STROOBANT, 2013). Estes são constituídos de quatro hastes condutoras paralelas e equidistantes entre si (**FIGURA 9**), sobre as quais são aplicados potenciais combinados de corrente contínua (CC) e radio frequência (RF), que variam em magnitude durante a passagem dos íons pelo quadrupolo. Conforme o campo elétrico gerado, consegue-se que somente íons com a relação massa/carga específica atinjam o detector, enquanto os íons não selecionados são desviados, levando-os a colidir com as hastes, para a sua neutralização (EKMAN; SILBERRING; WESTMAN-BRINKMALM, 2008; NASCIMENTO, 2017). Apresenta uma resolução considerada baixa na faixa de operação de $R=1000$, podendo ter a resolução aumentada em condições favoráveis para valores maiores que $R=4000$. Possui a capacidade de trabalhar com uma ampla faixa de massa sendo ela entre 10 a 4000 Da. A exatidão fornecida pelas análises do mesmo estão entre 0,1 e 0,2 Da (LANÇAS, 2013).

Figura 9 - Representação de um sistema quadrupolo simples. São constituídos de quatro hastes condutoras paralelas e equidistantes entre si sobre as quais são aplicados potenciais combinados de corrente contínua (CC) e radio frequência (RF), que variam em magnitude durante a passagem dos íons pelo quadrupolo. Conforme o campo elétrico gerado, os íons com a relação massa/carga específica atingem o detector, enquanto os íons não selecionados são desviados, levando-os a colidir com as hastes, para a sua neutralização.



Fonte: SILVA et al., 2019.

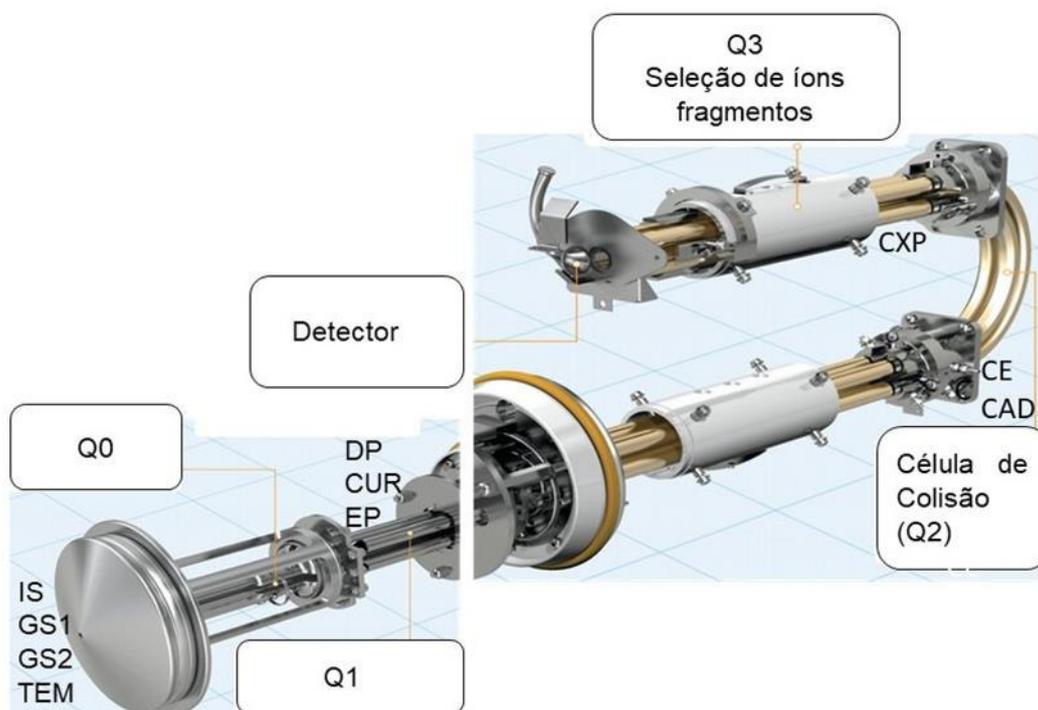
1.4.3.2 Analisador de Massa Triplo Quadrupolo – QqQ

Em equipamentos onde os analisadores de massa são dispostos em sequência, estes são chamados de tandem ou MS/MS. Diversas são as possibilidades de combinações em tandem. A grande popularidade dos espectrômetros de massas sequenciais pode ser atribuída ao surgimento de um instrumento do tipo triplo - quadrupolo. Neste dispositivo, três quadrupolos são dispostos sequencialmente, na **FIGURA 10** está representado esquematicamente o percurso dos íons. No modo de análise empregado, um íon denominado íon precursor ou íon pai, é selecionado no primeiro quadrupolo (Q1) e posteriormente fragmentado na cela de colisão, localizada no segundo quadrupolo (Q2), por dissociação ativada por colisão, Collision Activated Dissociation (CAD). A fragmentação da molécula é produzida a partir da colisão com gás nitrogênio (CAD gas). Os fragmentos gerados, denominados íons produto ou íons filho, são selecionados pela razão m/z no terceiro quadrupolo (Q3) e transmitidos para o sistema de detecção (EKMAN; SILBERRING; WESTMAN-BRINKMALM, 2008; HOFFMANN; STROOBANT, 2013; LANÇAS, 2009). O monitoramento dos produtos obtidos a partir da fragmentação que ocorre no Q2 confere

maior seletividade e permite distinguir de modo eficiente e inequívoco, os analitos de interesse dos interferentes da matriz mesmo que a separação cromatográfica não tenha sido completa. A técnica, desta forma, mostra-se efetiva na análise de agrotóxicos em níveis baixos de concentração, mesmo na presença de interferentes. A fragmentação controlada do MS/MS é uma ferramenta essencial para garantir a confiabilidade na identificação do composto alvo. Outra vantagem desta técnica de fragmentação é a obtenção de sinais mais limpos, melhorando a razão sinal/ruído e diminuindo, portanto, os limites de detecção e quantificação (GARRIDO-FRENICH et al., 2005).

O espectrômetro de massas triploquadruplo pode ser esquematizado de acordo com a **FIGURA 10**.

Figura 10 - Fluxograma do caminho percorrido pelos analitos após separação pela coluna cromatográfica até quantificação dos íons produto. Após a inserção de amostra e sua separação pela coluna cromatográfica, os analitos sofrem ação de um gás nebulizador (GS1) e de aquecimento (GS2) em altas temperaturas (TEM) e em seguida sob uma fonte de ionização (IS) entram no Q0. No Q0 sob um potencial de decomposição (DP) e potencial de entrada (EP) na presença de cortina de gás (CUR) passam para o Q1. No Q1 ocorre a seleção dos íons que no segundo quadrupolo (Q2) sofrem ação de gás (CAD) e energia de colisão (CE). Através do potencial de saída da célula de colisão (CXP), os íons são seleccionados no terceiro triploquadruplo (Q3).



Fonte: Adaptada de AB SCIEX, 2010.

O acoplamento MS/MS permite a utilização de várias estratégias para a seleção dos íons de interesse, tais como a varredura dos íons produto (product íon scan), full scan, varredura dos íons precursores (precursor íon scan), varredura da constante perda de íons

neutros (Constant neutral loss scan), monitoramento seletivo de reação (selected reaction monitoring– SRM) ou monitoramento de reações múltiplas (multiple reaction monitoring– MRM) (SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013).

Ao usar o SRM, tanto o primeiro como o segundo analisador são focalizados nas razões m/z selecionadas, não havendo varredura, o que aumenta a sensibilidade para o monitoramento, associada ao aumento na seletividade. Este é o modo mais comumente utilizado na quantificação de agrotóxicos em amostras de alimentos. Em geral, faz-se uma primeira aquisição com o padrão do composto no modo de varredura do íon produto, para depois selecionar as transições SRM que serão usadas na análise por LC-MS.

1.4.3.3 Analisadores Ion-Trap

O íon-trap é um quadrupolo tridimensional que “captura” todos os íons que são introduzidos em seu interior e os mantém “aprisionados” até que uma determinada radiofrequência seja aplicada e torna os íons de certa razão m/z instáveis, de forma que são liberados do trap.

Analisadores do tipo Quadrupolo – Ion Trap (QIT) consiste em um sistema híbrido, composto por dois analisadores de massas diferentes: um quadrupolo e um do tipo íon trap. Este último é formado por três eletrodos, um em forma de anel que fica entre os outros dois, que têm formato hiperbólico e são isolados nas pontas. A diferença de potencial oscilante entre o anel e os eletrodos hiperbólicos gera um campo magnético capaz de confinar ou deixar passar os íons. Este tipo de analisador tem a característica única de conduzir fragmentações em múltiplos estágios (MS_n). Quando os íons entram no ion-trap, todas as fragmentações ocorrem no mesmo local, mas em tempos diferentes, apresentando melhor sensibilidade na varredura do que os QqQ, mas com a limitação de não realizar aquisições alternadas entre os modos de varredura do íon produto e de varredura de perda neutra. Além disso, estes instrumentos são menos robustos para análise de matrizes mais complexas e podem apresentar baixa repetibilidade e faixa dinâmica muito estreita para a quantificação. O Triplo-quadrupolo – Ion-Trap linear (QLIT) baseia-se em um tipo de configuração similar ao QqQ, onde o Q3 pode ser operado tanto como um filtro de convencional, quanto como uma armadilha de íons com ejeção axial de íons. O QLIT agrupa as vantagens do QqQ e do QIT sem perda de desempenho com relação a seus precursores, podendo ser operado nos mesmos modos que o QqQ, ainda possuindo a habilidade de acúmulo de íons para realizar análises com fragmentações múltiplas para elucidação estrutural. Também possui um recurso de varredura avançada de íons produtos, onde os íons

produtos são acumulados no Ion-Trap, possibilitando o aumento de sensibilidade na varredura, o que o torna ideal para análises onde se deseja quantificar e confirmar a identidade de compostos que possuem padrões de pouca fragmentação (LANÇAS, 2009; MASIÁ; BLASCO; PICÓ, 2014; SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013).

1.4.3.4 Analisadores de Tempo-de-Voo (Time-of-Flight – TOF)

Os analisadores TOF baseiam-se no princípio de que, como os íons são gerados na mesma fonte de ionização do espectrômetro de massas, eles possuem a mesma energia cinética, de maneira que as suas velocidades serão diferenciadas apenas pelas suas massas (velocidade é inversamente proporcional à raiz quadrada da massa do íon). Por isso, neste analisador de massas, os íons produzidos na fonte de ionização são acelerados através de um tubo de voo (de 1 a 2 m de comprimento) para serem identificados, uma vez que o tempo que levam para atravessá-lo está relacionado com a razão m/z de cada íon (LANÇAS, 2009; MASIÁ; BLASCO; PICÓ, 2014; SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013).

Instrumentos do tipo ToF são configurados como: ToF simples ou em sistemas híbridos em série como o analisador quadrupolo – tempo de voo (QToF). Este último é construído de maneira a direcionar os íons ortogonalmente do quadrupolo ao tempo de voo, através de um acelerador de íons, para análises no modo de espectrometria de massas em série (MS/ MS) com varredura dos íons produtos. A grande vantagem destes analisadores está no fato de oferecerem informações espectrais completas com resolução de média a alta ($R=100000$), medida de massa exata e excelente sensibilidade no modo de varredura total. Permitem também a análise de composição elementar, através da medição precisa da razão m/z e conseqüentemente, a quantificação e confirmação inequívocas dos analitos, bem como a triagem e quantificação de compostos desconhecidos ou produtos de degradação. Sendo assim, analisadores do tipo Q-ToF são ideais para a busca de compostos cuja presença é suspeita nas amostras (GARCIA-REYES et al., 2017; SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013).

1.4.3.5 Analisador Orbitrap

Um novo tipo de analisador chamado orbitrap surgiu como uma nova tecnologia na espectrometria de massas de ultra alta resolução (UHR-MS) e chamou a atenção devido ao desempenho analítico em termos de resolução e precisão. O espectrômetro de massas orbitrap emergiu como uma alternativa mais acessível, em relação a tamanho e custo, pois

compartilha vários recursos semelhantes do espectrômetro de massas de ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS) (NASCIMENTO, 2017).

O analisador Orbitrap é precedido de um dispositivo que realiza a injeção externa dos íons (C-trap). Os íons têm sua energia cinética (E_c) diminuída por meio de colisões com gás nitrogênio e em seguida são acelerados no C-trap. Quando todos os íons têm aproximadamente a mesma E_c , eles são ejetados tangencialmente para dentro do analisador sendo aprisionado sem torno do eletrodo central que está sob uma alta voltagem. Os íons são puxados para a região equatorial do analisador devido ao forte campo eletrostático existente na região. O campo eletrostático, aliado com a alta E_c dos íons, faz com que os íons iniciem oscilações axiais, evitando assim que os mesmos se chocam com o eletrodo central. Sendo assim, os íons com mesmo m/z irão oscilar com a mesma frequência e suas imagens decorrentes serão detectadas por sensores presentes nas paredes externas do analisador Orbitrap. Estes sinais são convertidos em frequências por transformada de Fourier e em seguida, por outras operações matemáticas (COVAS, 2019; ELIUK; MAKAROV, 2015; FARRÉ; PICÓ; BARCELÓ, 2014).

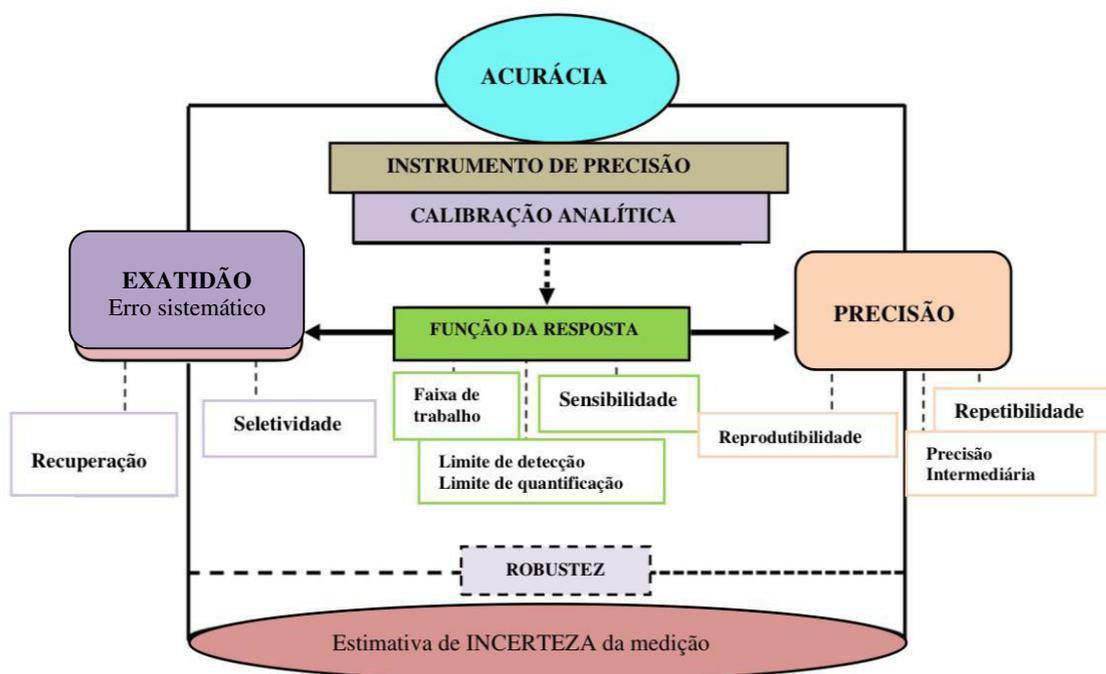
1.5 Validação de Métodos Analíticos

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominado validação (RIBANI et al., 2004).

O principal objetivo do processo de validação de um método é provar que um método analítico é aceitável para o propósito pretendido. A necessidade de laboratórios de usar métodos totalmente validados é agora universalmente aceita como uma forma de obter resultados confiáveis. Existem diversos documentos para validação de métodos, incluindo informações sobre diferentes parâmetros de desempenho. As características clássicas de desempenho são exatidão, limite de detecção, precisão, recuperação, robustez, seletividade, especificidade e veracidade (**FIGURA 11**) (ANVISA, 2017).

Infelizmente, informações contraditórias normalmente estão presentes entre os documentos de validação de método usados por laboratórios. A inconsistência sobre os parâmetros de desempenho pode gerar algum grau de confusão no processo completo de validação de um método (RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020).

Figura 11 - Esquemática de um processo de validação analítica. O processo de validação analítica para um instrumento de precisão passa por várias análises até a garantia da certeza do método. Os principais parâmetros são a linearidade (calibração analítica), precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez do método. A reprodutibilidade é um parâmetro realizado entre laboratórios.



Fonte: Adaptada de RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020.

Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado. As técnicas de separação, tais como cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e eletroforese capilar (CE), vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos (RIBANI et al., 2004).

Vários autores definem validação de métodos e pode-se dizer que os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sofrendo alterações pelas agências reguladoras. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos (ANVISA, 2017).

Todo sistema apresenta limitações, não existe modelos prontos para validação. Validação a 100% de confiabilidade é utopia e os parâmetros exigem adequações às necessidades diferentes para cada método, sendo assim, o importante na validação é conhecer os limites e assegurar que o sistema analítico apresente o desempenho esperado, dentro desses limites esperados no processo de validação (LANÇAS, 2009).

Na validação de procedimentos analíticos, existem os guias desenvolvidos com o objetivo de garantir que os dados gerados possuam a qualidade necessária, em termos de confiabilidade, rastreabilidade, entre outros, para o fim que se propõem. No Brasil existem os guias estabelecidos pelo Ministério da Saúde - “RDC nº 166/2017 - Validação de Métodos de Ensaio Químicos Analíticos” da ANVISA (2017); pelo documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE 008/2016 – Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, produzido pelo INMETRO (2016), onde constam as orientações sobre validação de métodos analíticos; como também o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014) através do Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica.

RIBANI et al., (2004) apresentaram uma excelente revisão sobre validação de métodos como sendo um processo contínuo de avaliação dos métodos, desde a etapa de planejamento até a coleta de dados da aplicação.

Dentro do âmbito geral de validação de métodos é possível distinguir dois tipos: o primeiro, chamado de *validação no laboratório* (“*in house validation*”), consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado (HILL; REYNOLDS, 1999; RT; SMEYERS-VERBEKE; VANDEGINSTE, 1994; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; VAN DER VOET; (HANS) VAN RHIJN; VAN DE WIEL, 1999).

A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade. Pode-se considerar esta etapa como sendo preliminar à *validação completa* (“*full validation*”) (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

O segundo tipo, validação completa, envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação. Estes protocolos requerem um número mínimo de laboratórios e materiais testes para serem incluídos no estudo interlaboratorial para validação completa do método analítico. No Brasil os estudos de comparações interlaboratoriais são coordenados

pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), através do Programa Brasileiro de Metrologia em Química (RIBANI et al., 2004).

1.6 Parâmetros da Validação Analítica

Para validação de métodos analíticos, parâmetros como especificidade/seletividade, função da resposta (gráfico analítico), linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), efeito matriz e robustez se fazem necessários (BRITO et al., 2003; GERVASONI et al., 2016, 2018).

1.7.1 Seletividade

A seletividade do método analítico é o primeiro parâmetro avaliado no desenvolvimento de um método analítico (RIBANI et al., 2004) e deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (ANVISA, 2017).

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir em suas determinações em uma amostra complexa. Em métodos cromatográficos, o uso de testes utilizando técnicas de avançadas detecções, como LC-MS/MS, são apontadas como técnicas altamente seletivas (MAPA, 2014). Portanto, a seletividade deve ser assegurada para garantir que os parâmetros de linearidade, recuperação e precisão não sejam comprometidos (EC, 2017).

1.7.2 Linearidade

A linearidade deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra e corresponde a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais a concentração da substância analisada dentro de uma determinada faixa (ANVISA, 2017; SWARTZ; KRULL, 1998).

Para que a quantificação de determinado analito seja confiável é necessário que se conheça a dependência entre a resposta medida (y) e a concentração (x). Em cromatografia, a relação entre a área e a concentração é linear, podendo ser plotada utilizando

algum software para o tratamento de dados, como o Excel ou Origin, onde são obtidas as equações da reta (Equação 1) e seus coeficientes de determinação (R^2) correspondentes.

$$Y = ax + b \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

y = sinal analítica (intensidade ou área de pico cromatográfico);

x = concentração do analito;

a = inclinação experimental (coeficiente angular);

b = intercepto experimental (coeficiente linear).

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. E no caso de análise de impurezas, o nível de concentração máximo deve ir a 120% do limite máximo estabelecido. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação (r) e determinação (R^2), significância do coeficiente angular, homocedasticidade do modelo e soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear (EURACHEM, 2014). É sabido que a determinação da verdadeira concentração de resíduos de pesticidas em amostras desconhecidas depende da qualidade das curvas de calibração projetadas na validação do método (MARTINS et al., 2013). Geralmente a análise quantitativa é realizada usando regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) em todos os níveis de concentração na condição de variâncias iguais (homoscedasticidade). Como também, existem muitos métodos analíticos que não têm uma precisão constante em uma ampla faixa de concentrações padrão apresentando heterocedasticidade nas variações. Isso implica que a precisão na extremidade inferior da faixa da curva é prejudicada. Para combater essas dificuldades, precisamos modificar nossa abordagem, e o uso do método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) é muito útil para essas práticas (BARBOSA, 2018; MARTINS et al., 2013; MAPA 2014).

1.7.3 Limite de Detecção (LD)

O limite de quantificação (LD) representa a mais baixa concentração de um analito que o procedimento analítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo (ANVISA, 2017; SWARTZ; KRULL, 1998).

Esse parâmetro se faz importante, pois quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito (análise de traços), é importante saber qual o menor

valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2016). Para métodos instrumentais como a LC, GC, espectroscopia etc., o LD pode ser calculado através do método das diluições sucessivas de concentrações conhecidas até o menor nível detectável, utilizando a relação entre o sinal analítico e o ruído da linha de base (INMETRO, 2016; ANVISA, 2017; RIBANI et al., 2004).

Em casos de métodos instrumentais, ainda se pode calcular o LD através do cálculo de no mínimo três curvas de calibração próximas ao suposto LQ, considerando o desvio padrão do coeficiente linear e a sua relação com o coeficiente angular. Os cálculos também podem ser realizados utilizando-se curvas do branco da amostra (EURACHEM, 2014; ANVISA, 2017; INMETRO 2016) através da Equação 3:

$$LD = \frac{3,3sd}{a} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

sd: desvio padrão dos coeficientes lineares da curva

a: coeficiente angular

1.7.4 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a mais baixa concentração da substância analisada que pode ser quantificada com certo limite de confiabilidade (ANVISA, 2017; SWARTZ; KRULL, 1998).

Assim como o LD, o LQ é expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas. Contudo, sabe-se que ao considerar menores concentrações, diminui-se também a precisão das análises. Se maiores precisões forem exigidas, o valor de LQ deve considerar uma maior concentração (RIBANI et al., 2004).

O LQ pode ser determinado através da relação sinal/ruído. Determina-se o ruído proveniente da linha de base e considera-se a concentração capaz de gerar o sinal superior a 10 vezes o ruído (ANVISA, 2017; RIBANI et al., 2004).

O LQ pode também ser calculado através dos parâmetros da curva de calibração da amostra ou do branco, como mostra a Equação 7. O valor da concentração que expressa o LQ, deve ser o primeiro ponto (desconsiderando o branco) da curva de calibração do método (INMETRO, 2016; EURACHEM, 2014).

$$LQ = \frac{10sd}{a} \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

sd: desvio padrão dos coeficientes lineares da curva

a: coeficiente angular

1.7.5 Precisão

A precisão de um método é a medida do erro randômico e é definida como a concordância entre os resultados da réplica de uma amostra. É expresso em percentual de coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo das medidas de replicatas (CAUSON, 1997). A precisão deve ser expressa por meio da reprodutibilidade, precisão intermediária e ou da repetibilidade. A determinação da REPETIBILIDADE deve obedecer aos seguintes critérios:

1. Avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica.

2. Utilizar, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível ou 6 (seis) réplicas a 100% (cem por cento) da concentração do teste individualmente preparadas (ANVISA, 2017).

A precisão de um método analítico pode ser expressa através do desvio padrão (s), conforme a **Equação 5**, ou através do desvio padrão relativo (DPR), ou do coeficiente de variação (CV%), conforme expresso na **Equação 6** (ANVISA, 2017; RIBANI, 2004). Segundo a ANVISA (2017), o valor máximo de dispersão de valores aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (xi-x)^2}{n-1}} \quad \text{Equação (4)}$$

Onde:

\bar{X} : média aritmética de um pequeno número de medições

X: valor individual de uma medição.

n: número de medições

$$CV \% = \frac{sd}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

Onde:

sd= desvio padrão das medidas

X = média das medições

1.7.5.1 Repetibilidade

A repetitividade ou repetibilidade é determinada pela também chamada de precisão intra-corrída, ou precisão intra-dia. Na repetibilidade analisa-se a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo método, o mesmo analista, a mesma amostra, no mesmo laboratório e mesma instrumentação (ANVISA, 2017; LANÇAS, 2009; MAPA, 2014).

Deve-se ter cuidado para não confundir repetibilidade com precisão instrumental, que consiste em inserir repetidas quantidades da mesma amostra no equipamento. Pois isto se configura apenas em precisão do equipamento utilizado e não do método em questão (EURACHEM, 2014; RIBANI et al., 2004).

Segunda a ANVISA (2017), a repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método. Sendo três concentrações: baixa, média e alta, no mínimo, em triplicata. Outra possibilidade é realizar no mínimo seis determinações a 100% da concentração do teste.

1.7.5.2 Precisão Intermediária

Precisão intermediária, também conhecida como precisão inter-corrída ou inter-dias, é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2017).

A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa das maneiras de representar o parâmetro da precisão dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (ANVISA, 2017; RIBANI et al., 2004).

Para a realização das análises de precisão intermediária, recomenda-se no mínimo dois dias de diferença, com analistas diferentes, utilizando as mesmas recomendações utilizadas da repetibilidade (ANVISA, 2017).

1.7.5.3 Reprodutibilidade

A precisão pode também ser expressa em termos de reprodutibilidade, também chamada de precisão inter-laboratorial, na qual se realizam as análises em laboratórios diferentes, como em estudos colaborativos aplicados, por exemplo, à padronização de metodologia analítica. O desvio-padrão obtido através da reprodutibilidade é normalmente duas vezes maior que os obtidos pela repetibilidade, resultados facilmente explicados pela maior variação das condições de análise (ANVISA, 2017; LANÇAS, 2009). Porém, os parâmetros mais comuns em análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos são a repetibilidade e a precisão intermediária.

1.7.6 Exatidão

A exatidão representa um grau de concordância entre os resultados obtidos e um valor aceito como referência ou aceito como verdadeiro (ANVISA, 2017; SWARTZ; KRULL, 1998). É expressa através da recuperação, que é melhor estabelecida pela comparação da resposta de uma amostra extraída em concentrações altas, médias e baixas, com outras não extraídas representando 100% da recuperação (CAUSON, 1997).

A faixa de variação aceitável para uma dada concentração está associada ao nível de concentração em que ela se encontra. Os maiores níveis de concentração comportam variações menores, enquanto concentrações em nível de traços comportam variações mais elevadas (RIBANI et al, 2004).

Pode ser possível avaliar a exatidão comparando resultados do método em estudo com aqueles obtidos a partir de um método já estabelecido. Este pode ser um método de referência na área ou um método já habitualmente utilizado no laboratório em que a validação está em estudo, sendo o método de referência mais utilizado por fornecer valores com menores níveis de incerteza. As análises são efetuadas em replicata, utilizando os dois métodos separados (o método em desenvolvimento e o método de referência) sobre as mesmas amostras, na faixa de concentração em que se pretende validar o método. Com os resultados obtidos, a comparação entre os dois é realizada (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2016; RIBANI et al., 2004).

O estudo de recuperação é expresso em porcentagem de recuperação ($R\%$), e é calculada de acordo com a Equação 8. A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo e da seletividade do mesmo, verificando-se a recuperação a partir de três pontos de concentração da curva, sendo eles nos limites

inferiores, superiores e no meio da curva. Cada concentração realizada em triplicata, totalizando no mínimo nove determinações por analito (ANVISA, 2017; INMETRO, 2016).

$$\text{Recuperação}(\%) = \frac{C1-C2}{C3} \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

Onde:

C1: concentração determinada

C2: concentração determinada na amostra não adicionada

C3: concentração adicionada

Quando é possível a obtenção de amostras sem a presença do analito, C2 assume valor zero, modificando a Equação 8, para a Equação 9 (ANVISA, 2017).

$$\text{Recuperação} (\%) = \frac{C1}{C3} \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

Os valores de recuperação recomendados pela ANVISA, 2017 estão na faixa de 70-120%, porém, para casos em que não é possível obter esses valores, devido a perdas na etapa de partição em caso de analitos de maior polaridade, por exemplo, e desde que se tenha precisão $\leq 20\%$, valores de recuperações mais baixos são aceitos.

Quando se é possível o acesso a matriz isenta do analito, são realizados estudos de recuperação, também chamados de fortificação. Nesse caso, o analito é adicionado à matriz em quantidade conhecida e todas as etapas do método são realizadas, proporcionando um valor de recuperação do analito no método em estudo. Esse procedimento apresenta um problema associado quando o analito de interesse é encontrado naturalmente na amostra, pois, estima-se que esse analito adicionado à matriz provavelmente não será tão fortemente ligado a matriz como aquele que está naturalmente presente na matriz, então, a técnica dará uma impressão irreal da eficiência de extração (ANVISA, 2017; INMETRO, 2016; EURACHEM, 2014; RIBANI et al., 2004).

1.7.7 Efeito Matriz

O efeito Matriz deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a substância química de

referência do analito em solvente e com a amostra fortificada com a substância química de referência (SQR) do analito (ANVISA, 2017).

A espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida, especialmente combinado com ionização por electrospray (ESI) é considerado um dos mais confiáveis e universais métodos de detecção e identificação de diferentes orgânicos analitos em matrizes complexas em níveis de traço. A habilidade de produzir espectros de massas de múltiplos estágios (MS_n) diminui a possibilidade de má interpretação. Por muito tempo, esta capacidade também foi pensada para remover todas as possíveis interferências (GERVASONI et al., 2016; OSS et al., 2010).

Inicialmente, as preocupações foram se o sistema HPLC isolado de um sistema HPLC/MS perderia sua importância como uma ferramenta de separação (a separação seria feita pelo espectrômetro de massas), e que seu uso seria frequentemente restrito à purificação de amostras. O tempo mostrou que essas preocupações não se materializaram. Como regra geral, a eficiência de ionização através de ESI e, portanto, a resposta do analito (área do pico), fortemente depende dos compostos que coeluem com o analito e um dos maiores desafios do sistema é minimizar o efeito matriz que pode ocorrer através de uma separação cromatográfica eficiente ou através de purificação da amostra. O termo "efeito de matriz" foi cunhado para denotar esta dependência (GERVASONI et al., 2016; OSS et al., 2010).

O efeito Matriz foi chamado de "calcanhar de Aquiles" de análise quantitativa de HPLC/MS, e agora é reconhecida como uma das principais fontes de incerteza em HPLC/MS-ESI, e é cada vez mais abordado em diretrizes relacionadas à análise de traços orgânicos. O efeito da matriz pode ser medido como a razão de áreas cromatográficas de pico correspondentes a duas soluções com igual concentração de analito, um preparado por adição de analito na matriz da amostra (pico pós-extração) e outro obtido pela dissolução do analito no solvente (padrão):

$$EM = \frac{\text{área do pico da amostra}}{\text{área do pico no padrão}} \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

Onde, valores de efeito de matriz próximos de 1 significa que compostos coeluentes não têm influência na eficiência de ionização do analito. Efeito de matriz diferente de um indica qualquer supressão de ionização (efeito matriz < 1) ou aumento (efeito matriz > 1). Porque o efeito da matriz se origina da coeluição compostos, a maneira mais óbvia de evitá-lo é usando preparação da amostra que é eficiente o suficiente para eliminar os compostos coeluentes (OSS et al., 2010).

1.8 Justificativa

O presente estudo pretende validar uma nova plataforma de análise de biomarcadores moleculares como lactulose e manitol para análise de alteração de barreira morfofuncional gastrointestinal através do teste de lactulose: manitol (L:M) pelo Centro de Cromatografia e Espectrometria de Massas (CCEM) do núcleo de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará.

O teste L:M é um dos testes mais aceitos para avaliação da função intestinal (BARBOZA JR. et al., 1999; DENNO et al., 2014; KOSEK et al., 2017; LEE et al., 2017; LOSTIA et al., 2008) e existem várias técnicas analíticas usadas para determinação de lactulose e manitol em amostras de urina incluindo ensaio enzimático, cromatografia gás-líquido acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID), e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com detector de índice de refração. Entre estes, uma solução válida para a análise de carboidratos é a separação através da espectrometria de massas com ionização por electrospray acoplada a cromatografia líquida (ESI-MS / MS), devido ao seu alto nível de seletividade e reprodutibilidade (GERVASONI et al., 2018).

O CCEM há décadas trabalha em redes de pesquisas nacional (RECODISA) e internacional (MAL-ED) (<https://nubimed.ufc.br/pt/pesquisas/>) financiadas por agências como CAPES-CNPq, FINEP (MCTI) e Bill & Melinda Gates Foundation (BMGF).

A equipe de pesquisadores do INCT-IBISAB tem longa experiência com ensaios clínicos em hospitais e comunidades, incluídos estudos financiados por órgãos como o National Institute of Health (<https://www.nih.gov/>), Howard Hughes Medical Institute (<https://www.hhmi.org/>) e CNPq.

Foram realizadas pelo CCEM, através da cromatografia líquida (HPLC), 6.432 testes L:M para as amostras do Brasil, África do Sul, Tanzânia, Nepal e Paquistão. Com este teste, destacamos também a análise de 456 amostras urinárias de roedores (camundongos e ratos) para pesquisadores da Universidade Federal do Piauí e Universidade Federal do Rio Grande do Norte, assim como 342 amostras de urinas humanas para pesquisas do Hospital da Messejana.

A plataforma que inclui a cromatografia de alta performance acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS/MS) permite ampliar a capacidade dos estudos para medidas de analitos, nutrientes, metabólitos e fármacos com melhor acurácia, sensibilidade e especificidade. Permite análises moleculares em proteômica de alta resolução e complexidade para amostras biológicas, possibilita estudos moleculares mais eficientes que

os métodos tradicionais e permite análises de moléculas envolvidas em vias de sinalização, incluindo análise de processos pós-traducionais de proteínas e processos de fosforilação. Com tal ferramenta, é possível estudar a alteração da estrutura e função do intestino delgado em amostras de indivíduos com alta exposição a patógenos entéricos, fundamentar relação negativa entre subnutrição e infecções entéricas, observada entre crianças que vivem em comunidades carentes, ou mesmo explicar falhas de intervenções nutricionais e medidas de controle de doenças infecciosas e diarreicas na melhoria do crescimento infantil.

A disfunção entérica ambiental (DEA), também conhecida como enteropatia ambiental (EA) é uma condição subclínica de distúrbio intestinal crônico que é um fator contribuinte à desnutrição na primeira infância, sendo mais comum em ambientes de recursos limitados, alimentação inadequada, não acesso água tratada. Está associada com lesão do intestino delgado, inadequada absorção de nutrientes e inflamação crônica que resulta em comprometimento do crescimento infantil (DENNO et al., 2014).

Esta condição resulta em exposições frequentes a patógenos gastrointestinais e mesmo como a diminuição do índice de diarreia nos locais relacionados, infecções entéricas “silenciosas” e crescimento deficiente persistiam (MAL-ED NETWORK INVESTIGATORS, 2014; TANIUCHI et al., 2012; TROEGER et al., 2018).

Dessa forma, o estudo aqui proposto tem a potencialidade de gerar uma validação do método HPLC-MS/MS para quantificar lactulose e manitol para avaliação da barreira morfofuncional gastrointestinal.

2 HIPÓTESES

Este estudo apresentou três principais hipóteses norteadoras: a) postulamos que o método HPLC-MS/MS atende aos parâmetros de linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão para validação analítica na quantificação de lactulose, manitol e sorbitol na urina; b) postulamos que o método HPLC-MS/MS possui a capacidade de detectar e quantificar a lactulose e manitol como BIOMARCADORES MOLECULARES; c) postulamos que o sistema HPLC-MS/MS possui vantagens diante do HPLC isolado em relação a sensibilidade e tempo de execução de análises.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Validar o método de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para quantificação de lactulose e manitol na urina, onde a razão dos dois açúcares é conhecido como teste L:M para avaliar alterações na barreira morfofuncional gastrointestinal.

3.2 Objetivos Específicos

1. Desenvolver o método analítico para determinação dos biomarcadores lactulose e manitol através de parâmetros da cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas;

2. Comprovar a validação analítica através dos parâmetros seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

3. Aplicação do método validado em amostras de urina dos biomarcadores de barreira morfofuncional gastrointestinal lactulose e manitol.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) do Núcleo de Biomedicina (NUBIMED) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos abaixo:

- ✓ Agitador orbital tipo vortex, modelo QL-901, Eikonol do Brasil Inst. Ópticos e Científicos (Brasil);
- ✓ Balança analítica de precisão com 4 casas decimais, modelo MS104TS/00, METTLER TOLEDO (EUA);
- ✓ Centrífuga eppendorf modelo 5810R (Alemanha);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q MILIPAK[®], Merck KGaA (Alemanha);
- ✓ Sistema LC-MS/MS – Cromatógrafo a líquido – Elkgent LC 100XL/ AB Sciex, Santa Clara (EUA);
- ✓ Gerador de nitrogênio modelo Genius SQ 24 - surveyor LC pumb plus, Peak Scientific (Escócia);
- ✓ Coluna HILIC-ZIC 5 μ , 120 Å, 25cm X 2,1 mm, ES Industries, West Berlin (EUA);
- ✓ Detector Triplo Quadrupolo, Q-TRAP 5500 MS/MS, utilizando o modo de ionização por Eletronebulização (Eletrospray-ESI), ABSciex, Framingham, MA (USA);
- ✓ Sistema de aquisição de dados através do software Analyst 1.4, ABSciex Framingham, MA (EUA).

4.1.1 Reagentes e Consumíveis

Reagentes e consumíveis utilizados no trabalho estão descritos abaixo:

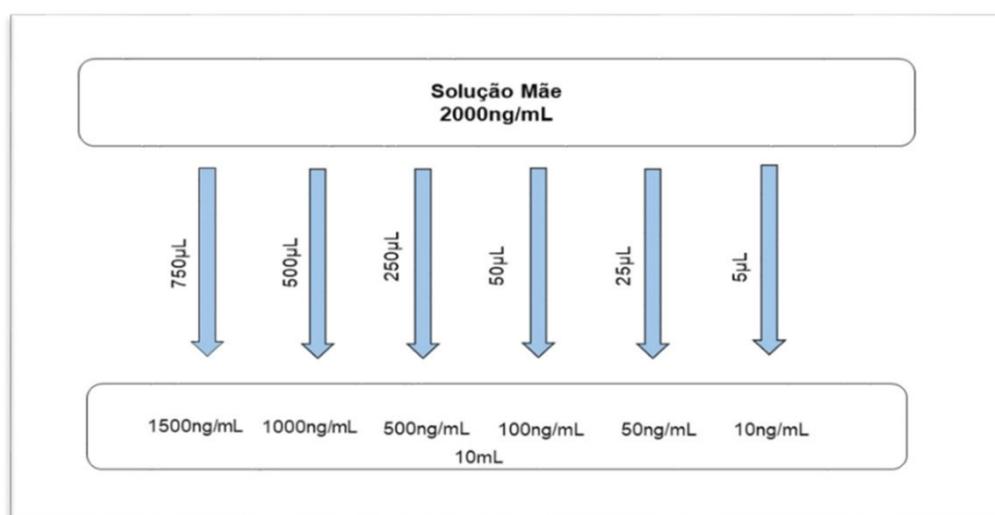
- ✓ Lactulona[®] (Daiichisankyo, São Paulo, BR)
- ✓ Manitol, da Henrifarma, São Paulo, BR
- ✓ Clorexidina (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA).
- ✓ Lactulose (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA);
- ✓ Manitol (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA);
- ✓ Sorbitol (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA);

- ✓ Acetonitrila (ACN) (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA);
- ✓ Ácido Fórmico (AF) (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA);
- ✓ Acetato de Amônio 5mM (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA);
- ✓ Resina Amberlite[®] MB-150 (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA).
- ✓ Kit Standards Chemical - polipropilenoglicol (PPG) e reserpina (ABSciex, Framingham, MA, USA);
- ✓ Micropipetador de 2 à 20 μ L (Eppendorf, Alemanha);
- ✓ Micropipetador de 20 à 200 μ L (Eppendorf, Alemanha);
- ✓ Micropipetador de 100 à 1000 μ L (Eppendorf, Alemanha);
- ✓ Vidrarias comuns de laboratório.
- ✓ Gás Nitrogênio comercial usado na fonte de ionização do sistema LC-MS/MS, para evaporação do solvente e nebulização da amostra (White Martins - Brasil);

4.2 Padrões e Preparo das Soluções Analíticas

Soluções de lactulose, manitol e sorbitol foram preparadas dissolvendo os padrões em eluente B da fase móvel nas concentrações de 10, 50, 100, 500, 1000, 1500 e 2000ng / mL para os três analitos (**FIGURA 12**). As soluções foram então injetadas no sistema HPLC-MS/MS.

Figura 12 - Fluxograma do preparo das soluções de validação. Padrões de lactulose, manitol e sorbitol foram obtidos a partir da diluição no eluente B. A partir da solução mãe (2000ng/mL), foram obtidas as outras soluções.

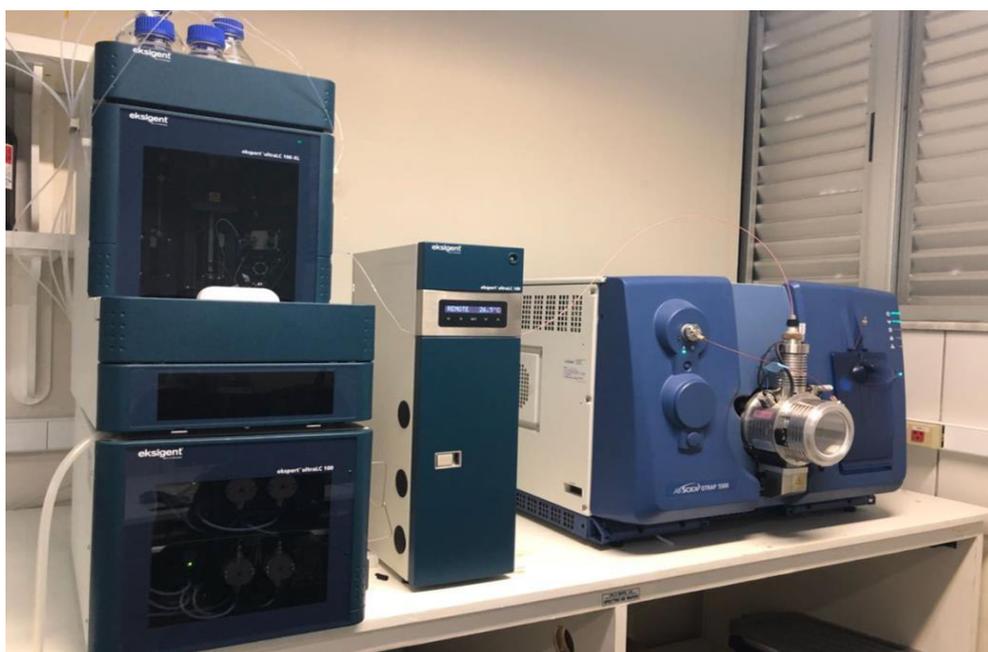


Fonte: Autoria própria (2021).

4.3 Otimização do sistema cromatográfico LC-ESI-MS/MS

Os experimentos deste trabalho foram realizados empregando um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS) (**FIGURA 13**) com interface por eletronebulização (ESI) marca ABSciex Framingham, MA, USA. Para separação dos compostos foi usada uma coluna analítica HILIC-ZIC[®] da marca ES Industries, West Berlin (EUA).

Figura 13 - Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas ABSciex, modelo Q-TRAP 5500, LDI- NUBIMED/UDC.



Fonte: Autoria própria (2021).

4.3.1 Condições do sistema de detecção de massas - Interfaces ESI

A parte inicial deste trabalho se deu através da obtenção dos espectros de massas de cada composto e em seguida a montagem da biblioteca espectral, a fim de obter as condições ótimas de análise dos açúcares do estudo. Para isso, foram realizadas injeções diretamente no espectrômetro de massas, através das fontes ESI com soluções analíticas padrão de 10 ng/mL de cada composto individualmente. Esse procedimento foi aplicado utilizando as fontes ESI para cada composto separadamente. A partir das infusões foi selecionado o modo (negativo) de ionização da fonte. Para a fonte ESI foi ajustada a voltagem do capilar, temperatura da fonte, como também a temperatura e pressão do gás de dessolvatação para secagem do solvente. Nitrogênio foi usado como gás de dessolvatação.

Após a escolha destas condições, foram selecionadas duas diferentes transições, uma para quantificação, denominada íon quantificador/precursor e outra para confirmação, denominada íon qualificador/produto. Estes íons foram monitorados empregando o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM).

4.3.2 Preparo da fase móvel para o sistema cromatográfico

A próxima etapa, após o estabelecimento das condições espectrométricas, foi o desenvolvimento da separação cromatográfica. A definição da fase móvel para a separação cromatográfica foi composta por uma fração aquosa e outra orgânica. A fração aquosa foi composta de uma mistura de solução de acetato de amônio 5,0 mmol/L e a fração orgânica ACN acidificado a 0,05% de ácido fórmico. A fase móvel foi constituída por um gradiente de eluição baseada em informações obtidas por meio de revisão bibliográfica sobre o assunto (KUBICA et al., 2012). A composição do gradiente que foi estabelecido para o método é mostrada na **TABELA 2**.

Tabela 2 - Gradiente de fase móvel para sistema de cromatografia líquida. A corrida iniciou com 75% de acetonitrila em 0,05% de ácido fórmico (eluente B) a 25% de H₂O em 5mM de acetato de amônio (eluente A; pH = 6,84) em 5 min, equilibrado por 2 min, retornando a 10% do eluente B em 0,5 min, e reequilibrando por 2 min antes da próxima injeção.

Tempo (minutos)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	25	75
5	90	10
7	90	10
7,5	25	75
10	25	75

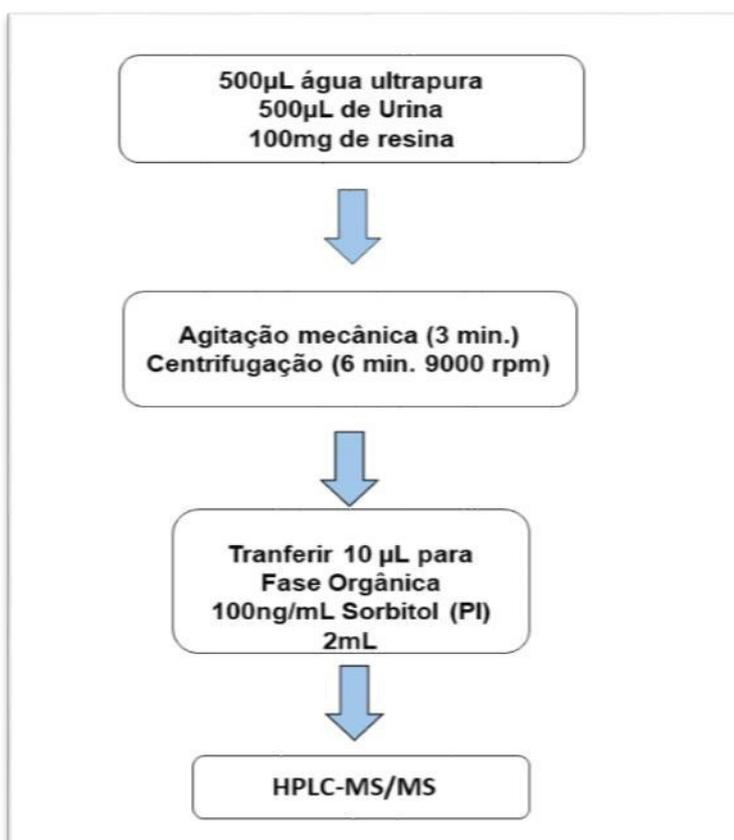
Fonte: Autoria própria (2021).

4.4 Preparo das Amostras

As urinas foram coletadas de crianças participantes do projeto de pesquisa intitulado em “Intervenção com Micronutrientes e Impacto a Longo Prazo no Brasil”. As amostras foram diluídas (1:400) inicialmente em água ultrapura e a essa solução foi adicionado 100mg de resina. Em seguida as amostras homogeneizadas e centrifugadas. Após esse processo, 10µL dessa solução foi adicionada a 100 µL de uma solução de Sorbitol

(100ng/mL), utilizado como padrão interno (PI) e diluída novamente em eluente B até completar o volume de total de 2000 μ L (**FIGURA 14**). As amostras foram então injetadas no sistema HPLC-MS/MS.

Figura 14 - Fluxograma do processamento de amostras. As amostras foram diluídas em água na presença de resina para troca iônica. Após o processo de homogeneização, foram submetidas a centrifugação em tubos eppendorf com filtro 0,22 μ m. Ao final do processo, uma alíquota de 10 μ L foi adicionada ao eluente B na presença de sorbitol como PI (100 μ L), obtendo um volume total de 2mL.

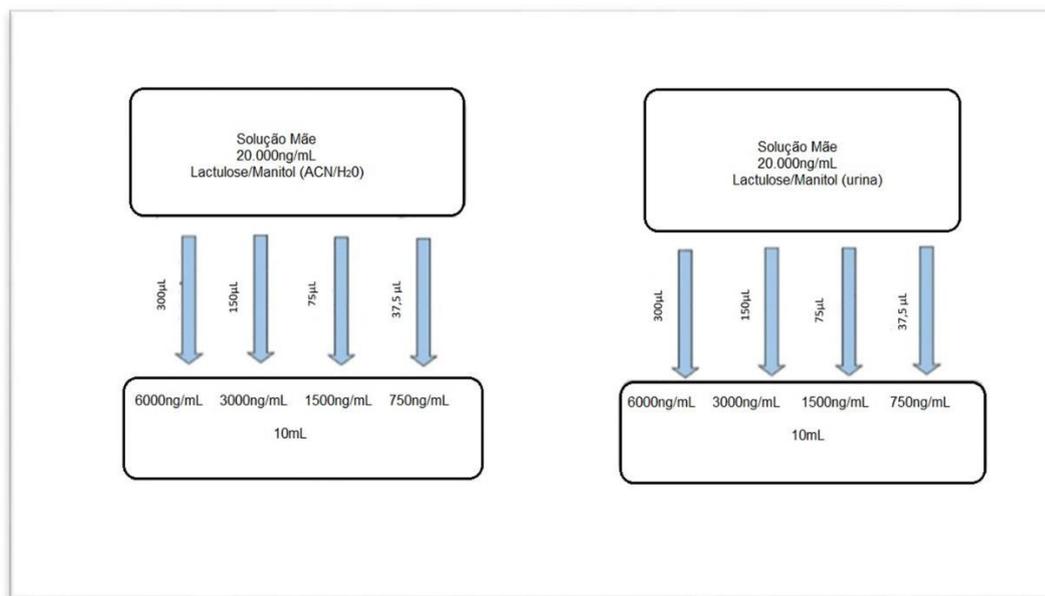


Fonte: Autoria própria (2021).

4.5 Preparo de Urinas Fortificadas

Soluções de lactulose e manitol foram preparadas dissolvendo os padrões em eluente B nas concentrações de 1000, 1500, 3000, 6000 ng / mL de cada analito. A mesma quantidade de lactulose e manitol foi adicionada à urina de voluntários. Obtendo urina fortificada (UF) (**FIGURA 15**).

Figura 15 - Fluxograma do preparo das soluções padrão e urinas fortificadas para análise de efeito matriz. Padrões de lactulose e manitol foram diluídos em eluente B e a partir da solução de 20.000ng/mL foram preparadas as soluções em concentrações de 1000, 1500, 3000 e 6000ng/mL. Para obtenção da UF, foi seguido mesmo fluxograma de preparo em urinas enriquecidas.



Fonte: Autoria própria (2021).

4.6 Validação da Metodologia Proposta

Uma vez definidas as melhores condições para determinação da lactulose e manitol, foram conduzidos os estudos de validação do método.

Os parâmetros analisados para validação analítica foram: especificidade/seletividade, linearidade, LD, LQ exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e efeito matriz (ANVISA, 2017).

4.6.1 Seletividade

A especificidade e seletividade do método foram obtidas através da análise de s obtidos pelo sistema HPLC-MS/MS por meio do conhecimento da relação /carga dos analitos em questão na concentração de 10ng/mL.

4.6.2 Linearidade

O parâmetro da linearidade foi avaliado através da construção do gráfico das curvas analíticas preparadas tanto em solvente, quanto no extrato da matriz. Inicialmente, obteve-

se soluções nas concentrações de 10, 50, 100, 500, 1000, 1500 e 2000ng / mL. Estas soluções foram inicialmente preparadas em solvente a fim de verificar a faixa linear do equipamento. Estas curvas foram realizadas em triplicatas e a linearidade foi avaliada pelo método de regressão linear e calculada a partir da equação de regressão linear

$$y = ax + b$$

Sendo:

y = resposta medida; x = concentração; a = inclinação da curva de calibração (sensibilidade); b = interseção com o eixo y.

4.6.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O cálculo para o limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foi baseado no desvio padrão da amostra na concentração de 100ng/mL e inclinação da curva de calibração nas concentrações de 10, 50, 100, 500, 1000, 1500 e 2000ng/mL) (ANVISA, 2017) de acordo com as equações:

$$LD = \frac{3,3 \times sd}{a}$$

em que: LD = Limite de Detecção; sd = desvio-padrão das leituras de amostras com 100ng/mL; a = inclinação da curva analítica.

$$LQ = \frac{10 \times sd}{a}$$

em que: LQ = Limite de Quantificação sd = desvio-padrão das leituras das amostras com 100ng/mL LD = Limite de Detecção.

4.6.4 Exatidão

A Exatidão foi avaliada através do ensaio de recuperação (ANVISA, 2017). O teste recuperação consistiu na análise em triplicata de amostras de concentrações conhecidas de 100, 500 e 1000ng/mL. O percentual de recuperação foi obtido a partir da equação:

$$\%recuperação = \frac{\text{concentração obtida} - \text{concentração real}}{\text{concentração real}} \times 100$$

4.6.5 Precisão

A precisão do método foi realizada nas concentrações de 100, 500 e 1000ng/mL e expressa através coeficiente de variação (CV), onde o CV foi obtido a partir da equação

$$CV = \frac{sd}{M} \times 100$$

sendo: sd = desvio padrão e M = média dos dados.

A repetibilidade (precisão intra-corrída) foi expressa através da precisão nas mesmas condições de operações (equipamento, analista, reagentes, dia e mesmas condições ambientais).

A precisão intermediária foi expressa pelas variações do laboratório em dias diferentes, mantendo mesmo analista e mesma instrumentação.

4.6.6 Efeito Matriz

Para análise de interferência da matriz, avaliamos a recuperação (R) e o EM (apresentado como supressão de íons) (PETROSINO, T.; SERAFINI, M. 2014). Os resultados foram obtidos nas concentrações de 750, 1500, 3000 e 6000ng/mL) expressos através das áreas de cada analito na urina fortificada (UF) e no eluente B e expresso em %. Os cálculos para R e EM são:

$$R = \frac{\text{área do pico na UF}}{\text{Área do pico na sol. padrão}} \times 100$$

$$EM = \frac{\text{área do pico na UF} - \text{área do pico na sol. padrão}}{\text{área do pico na sol. padrão}} \times 100$$

4.6.7 Aplicação do Método

Foram analisadas 41 amostras de urinas de crianças saudáveis submetidas ao teste L: M.

4.7 Considerações éticas

Esse estudo constitui um dos objetivos do projeto de pesquisa intitulado em “Intervenção com Micronutrientes e Impacto a Longo Prazo no Brasil”, que foi aprovado com parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMEPE/UFC) em 08 de março de 2013, após atendimento das recomendações exigidas (**Anexo A**).

4.7.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

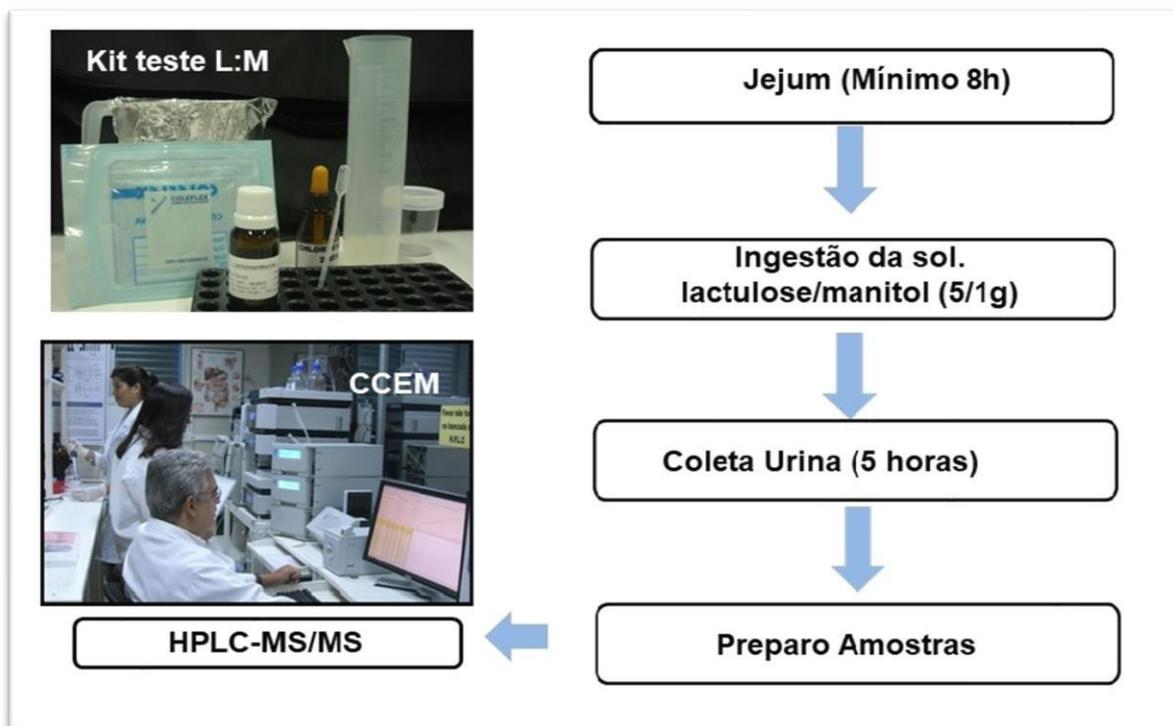
O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi revisado e aprovado pelo COMEPE/UFC, ofício no. 18/13, protocolo COMEPE no. 238/05 em 08 de março de 2013 (**Anexo B**). O consentimento informado por escrito foi assinado pelos pais ou responsáveis das crianças durante a coleta de volume das urinas.

4.7.2 Teste L:M

Após os procedimentos de triagem, assinatura do TCLE, entrevista, preenchimento da ficha epidemiológica e medidas antropométricas, os pais e/ou responsáveis receberam um frasco âmbar contendo 20 mL de uma solução de lactulose: manitol (5/1g) em água, armazenada e acondicionada entre 2° e 8°C, um frasco de clorexidina 0,2%, um frasco de plástico, estéril, graduado, apropriado para a coleta de urina e as orientações referentes a coleta (kit teste L:M). Após jejum de 8 horas, os responsáveis foram orientados a oferecer o frasco da solução à criança, certificando-se da completa ingestão. A posologia da solução para criança abaixo de 10 kg foi 2 mL/kg. Durante 5 horas após a ingestão, toda urina foi coletada no frasco estéril e a cada 50 mL, adicionado uma gota da solução de clorexidina 0,2%.

Ao final do período de 5 horas, foi registrado o volume urinário, retirado uma alíquota de 10 mL da urina e armazenada em -20°C. O restante do volume urinário foi desprezado. Após informação da realização do teste, o membro da equipe retornou à residência da criança para o recebimento da amostra coletada (**FIGURA 16**).

Figura 16 - Fluxograma do teste L: M. A solução de lactulose e manitol foi ingerida em jejum e durante cinco horas a urina foi coletada em recipiente apropriado. Ao final da coleta, o volume total da urina foi registrado e apenas uma alíquota foi utilizada para o teste.



Fonte: Autoria própria (2021).

4.8 Análise Estatística

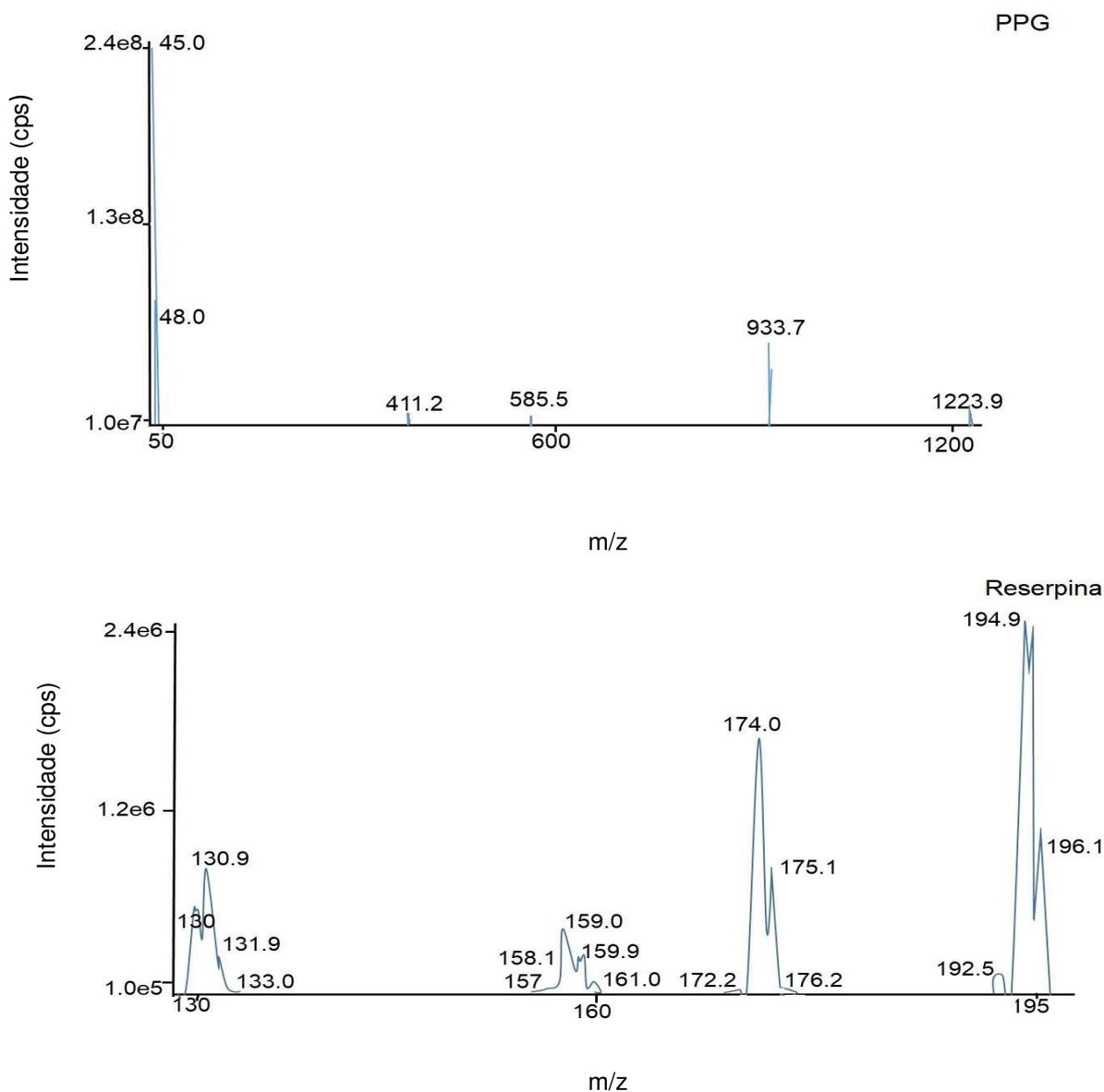
Os dados para validação analítica foram extraídos do software Analyst 1.4.1, EUA, encaminhados para o office excel e apresentados como a média \pm desvio padrão da média. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. Todos os testes foram analisados usando o software GraphPad Prism® (Califórnia, Estados Unidos) e os resultados considerados significativos foram $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Condições e Parâmetros do HPLC-MS/MS

O primeiro passo na elaboração do método foi a calibração da plataforma em ambas as polaridades (*ESI (+)* / *ESI (-)*) com PPG (**ANEXO C**) e reserpina (**ANEXO D**). A reserpina possui massa molar de 608,68 g/mol e o PPG 76,09g/mol (<https://www.chemicalaid.com/>) (**FIGURA 17**).

Figura 17 - Os espectrogramas obtidos dos íons produto do PPG e Reserpina. Gráfico obtido através da injeção direta pelo espectrômetro de massas na concentração de 200 μ M de PPG ($Q1 = 77,30$) no modo negativo e reserpina ($Q1= 609.4$) 1 μ M no modo positivo. O espectrograma dos íons precursores detalha os íons fragmentos selecionados no terceiro quadruplo.

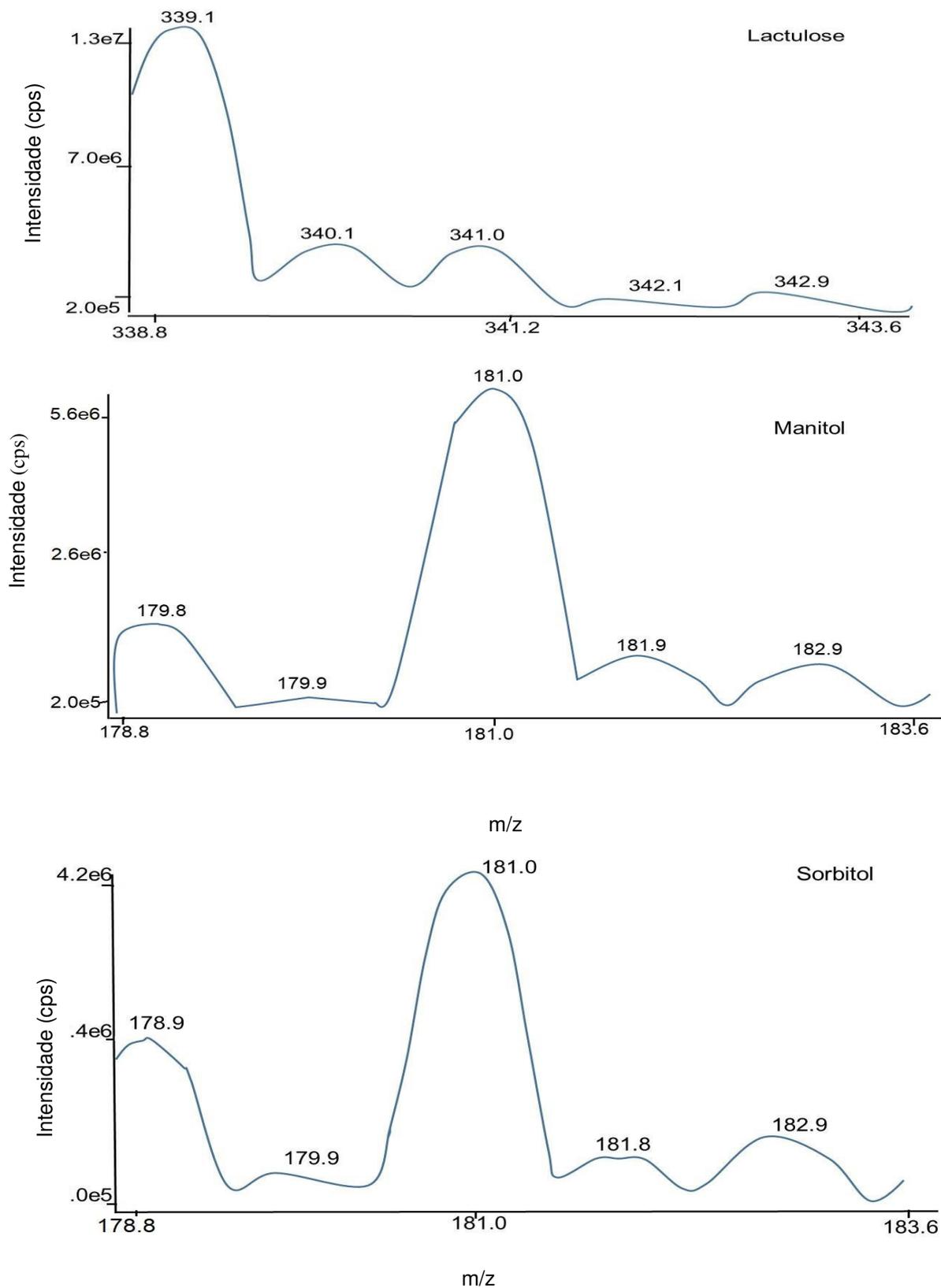


Fonte: Dados da pesquisa.

Para que o espectrômetro de massas faça a identificação dos compostos separados por cromatografia líquida, é necessário que se indique quais íons e fragmentos são formados na fonte e separados no analisador de massas. Para tal, fez-se a infusão direta dos padrões na fonte do espectrômetro de massas. Com a obtenção dos íons e seus fragmentos, registrou-se a maior intensidade dos valores de m/z (**FIGURA 18**), verificando se esta era reproduzível sob as mesmas condições. Além disso, foram ajustadas e registradas as energias que promovem a ionização e fragmentação dos íons que serão monitorados e detectados.

O íon precursor é definido como íon de maior intensidade obtido através do *MRM* (**ANEXOS E, F e G**) expresso pela razão m/z e abundância (cps). Os íons precursores para lactulose, sorbitol e manitol foram respectivamente 341.016, 180.932 e 180.935.

Figura 18 - Identificação dos íons precursoros do Manitol, Lactulose e Sorbitol através da otimização automática do método pelo MRM. Gráficos extraídos do software da plataforma através da otimização automática para os três analitos. As moléculas foram inseridas diretamente no espectrômetro de massas.



Fonte: Dados da pesquisa.

Os íons precursores foram obtidos a partir da fragmentação dos íons no primeiro quadrupolo (Q1). Os íons produzidos pela fragmentação do íon precursor no segundo quadrupolo (Q2), íon produto, foram otimizados em modo automático através da seleção de cinco íons mais intensos. Cada um dos íons foi otimizado em relação ao (DP - Declustering Potencial), potencial aplicado na interface que é responsável por focalizar o íon protonado para o interior do orifício de entrada do cone; e à energia de colisão (CE–Collision Energy), que é responsável pela ótima fragmentação do íon precursor no Q2 e sua posterior passagem pelo terceiro quadrupolo (Q3) (**TABELA 3**).

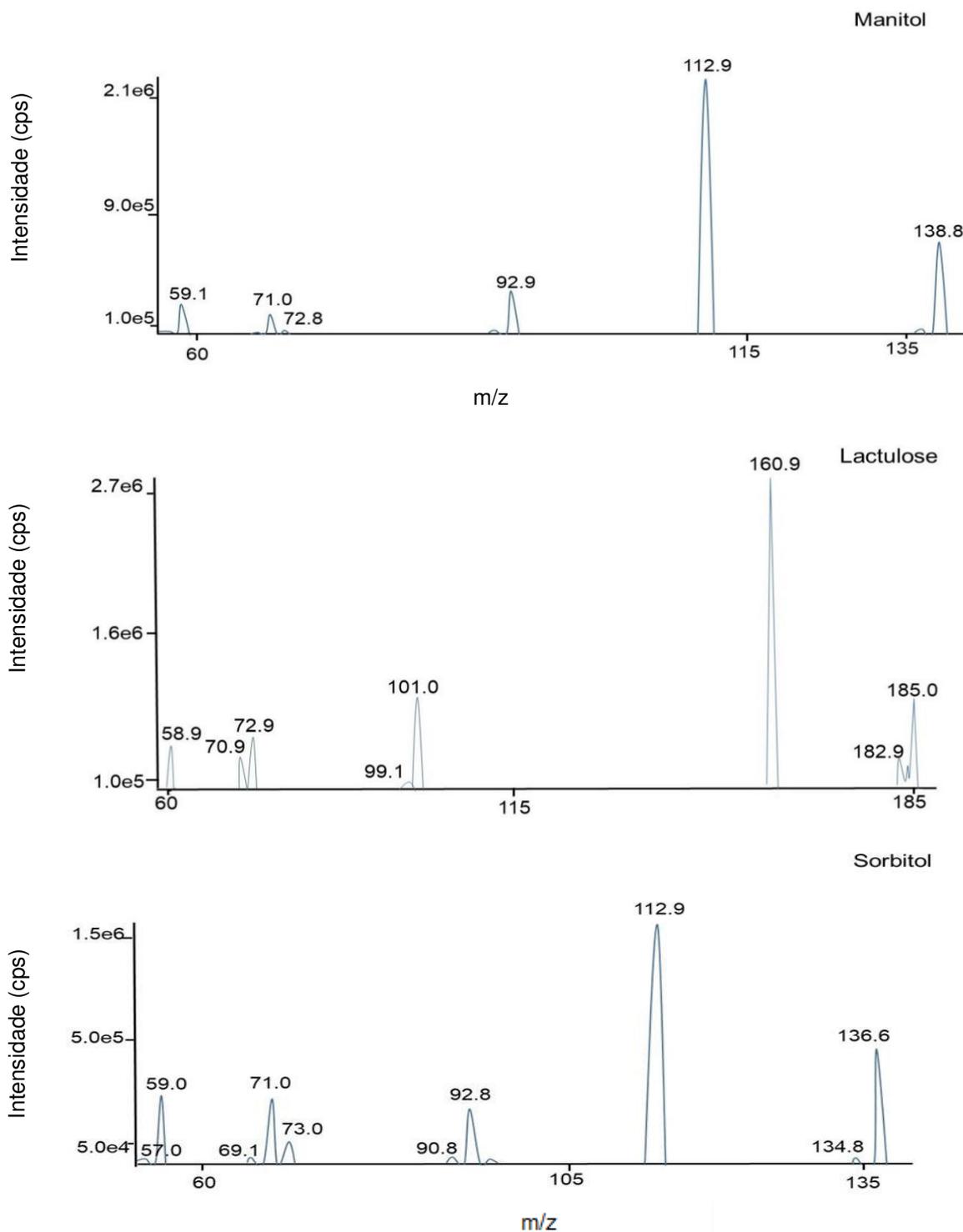
Tabela 3 - Parâmetros automáticos dos íons precursores e íons produto da lactulose, manitol e sorbitol, de através de monitoramento de reações múltiplas (MRM). ^aíon precursor dos analitos; ^bíons produto; ^cpotencial de decomposição (tensão aplicada ao orifício para evitar agrupamento dos íons); ^dpotencial de entrada; ^eenergia de colisão; ^fpotencial de saída da célula de colisão; ^gintensidade do íons fragmentos por MRM; ^hVolt (medida de tensão).

Analitos	Íon Precursor (m/z) ^a	Íons produto (m/z) ^b	DP ^c (V) ^h	EP ^d (V)	CE ^e (V)	CXP ^f (V)	Intensidade ^g (cps)
Lactulose	341.016	160.952			-12	-11	499000
		184.939			-48	-3	420000
		58.947	-75	-10	-48	-9	324000
		100.89			-22	-9	301000
		73.008			-36	-9	281000
Manitol	180.932	112.798			-10	-9	230000
		136.813			-16	-9	193000
		58.994	-60	-10	-26	-9	124000
		71.009			-26	-5	122000
		89.033			-18	-7	109000
Sorbitol	180.935	112.912			-26	-9	225000
		58.924			-16	-7	150000
		136.927	-75	-10	-26	-9	143000
		70.973			-26	-9	131000
		92.879			-24	-11	107000

Fonte: Dados da pesquisa.

Por meio da leitura correta dos íons fragmentos do espectro de massas, é possível deduzir a molécula em estudo (**FIGURA 19**). A partir do espectrograma dos íons precursores são apresentadas as intensidades dos íons fragmentos para cada analito específico.

Figura 19 - Os espectrogramas obtidos no modo negativo (M-1) para íons produtos da lactulose, manitol e sorbitol. Gráficos obtidos através da injeção direta pelo espectrômetro de massas na concentração de 10ng/mL. O espectrograma dos íons precursores detalha os cinco íons fragmentos selecionados no terceiro quadruplo.



Fonte: Dados da pesquisa.

Na **TABELA 4** podemos observar os parâmetros analisados para cada íon precursor através da injeção de fluxo, realizado na concentração de 50 ng/mL sem a utilização da coluna cromatográfica. Diferente do ocorrido no *MRM*, aqui os analitos se encontravam na mesma solução (**FIGURA 20**).

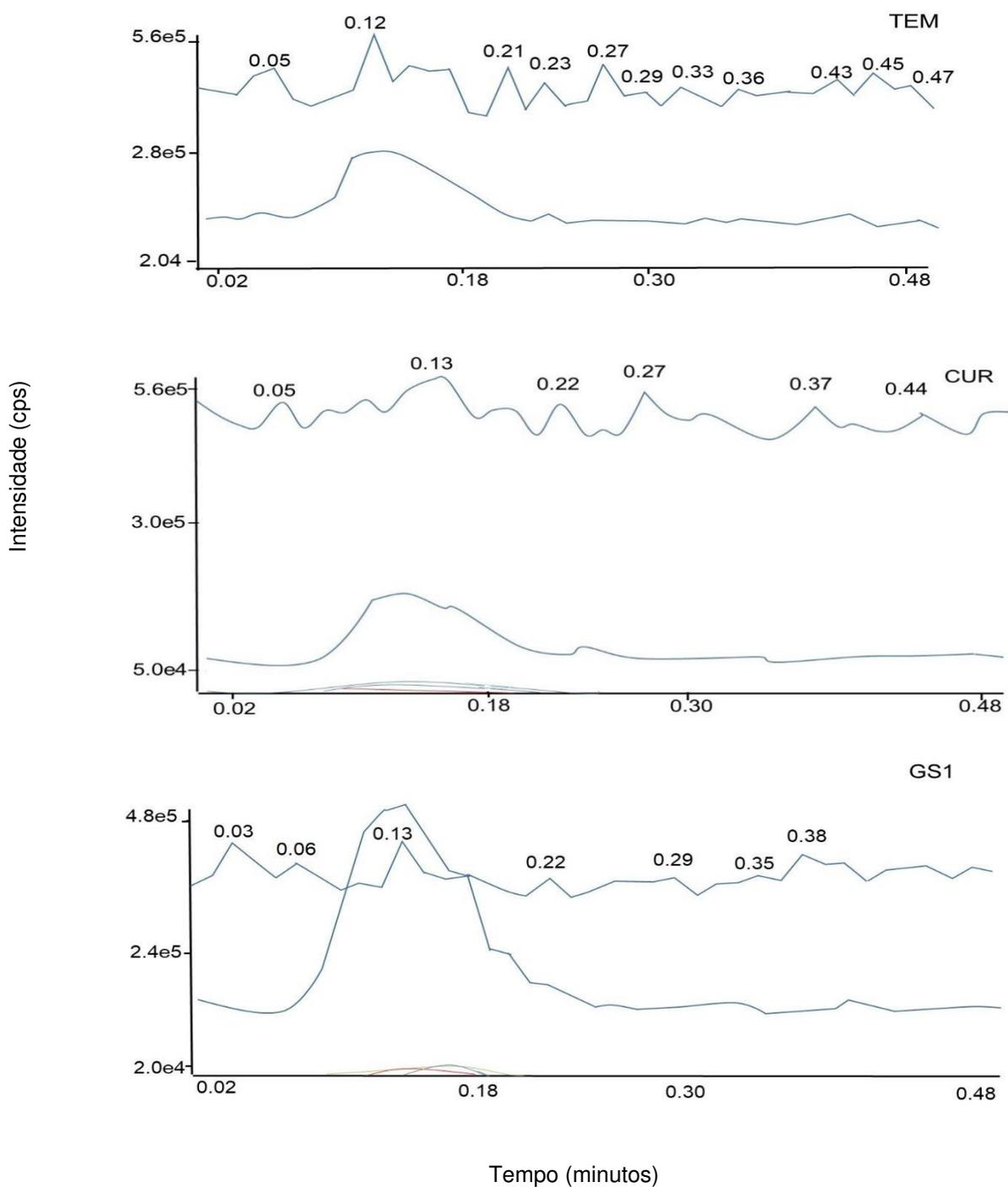
Os cinco íons produto selecionados no Q3, passaram por análise dos parâmetros gás nebulizador (GS1), cortina de gás (CUR), gás de aquecimento (GS2), temperatura (TEM), fonte de íons (IS) e gás de colisão (CAD). O processo foi realizado em temperaturas superiores à 450°C.

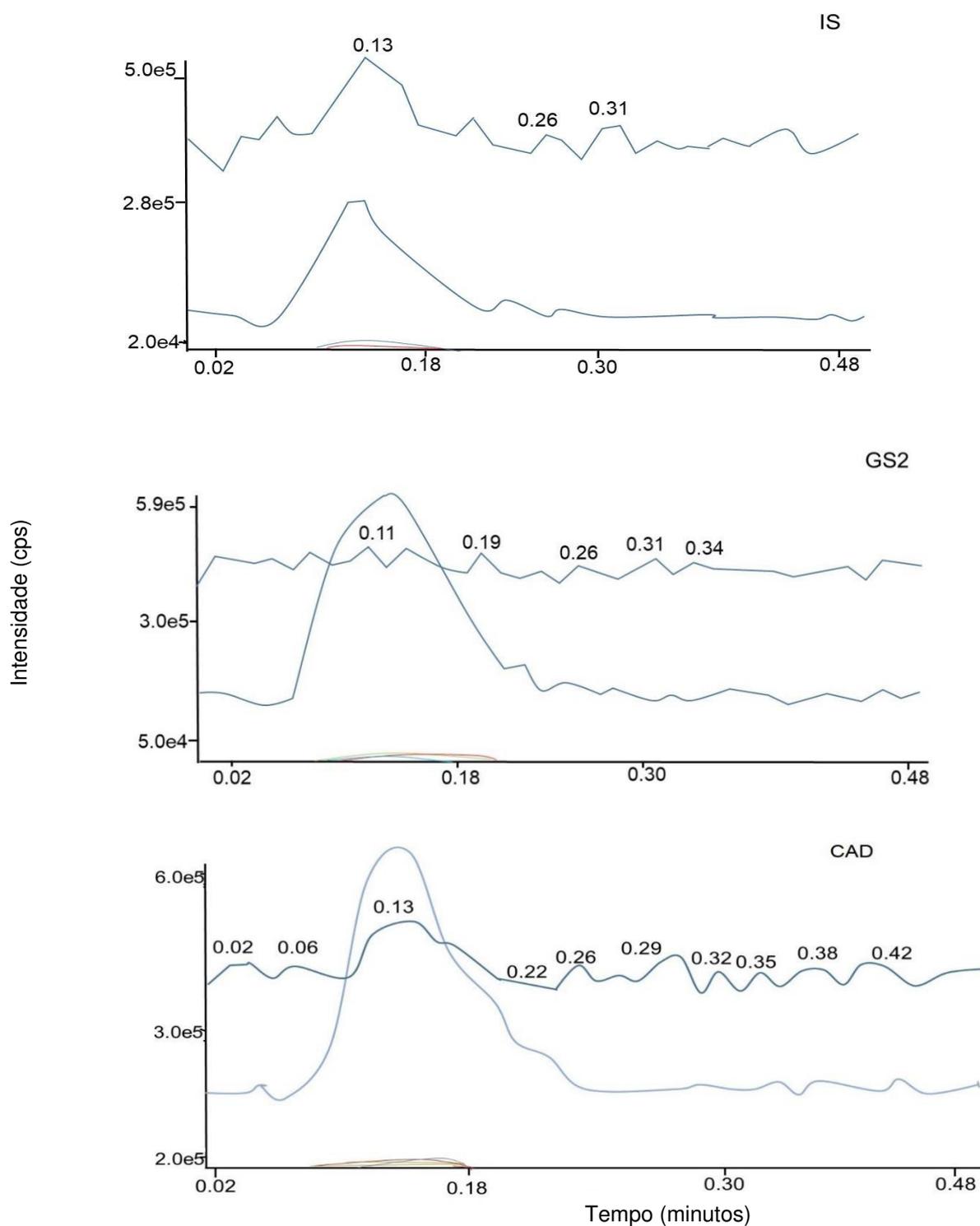
Tabela 4 - Parâmetros automáticos para íons precursores e íons produto provenientes de lactulose, manitol e sorbitol, de através de análise da injeção de fluxo (FIA). ^a íon precursor dos analitos; ^b íons fragementos; ^c temperatura na fonte; ^d gás nebulizador (auxilia na formação de gotículas; ^e fluxo de gás entre orifício e cortina de gás; ^f gás de aquecimento (GS2 e TEM ajudam na dessolvatação); ^g voltagem do *ionspray*, que direciona os íons formados para o analisador; ^h gás de colisão (auxilia na fragmentação dos íons precursores para formação dos íons produto); ⁱ Celsius, unidade de temperatura; ^j psi: libra-força por polegada quadrada; ^k volt (medida de tensão).

Analitos	Íon precursor ^a (m/z)	Íon produto ^b (m/z)	TEM ^c (°C) ⁱ	GS ₁ ^d (psi) ^j	CUR ^e (psi)	GS ₂ ^f (psi)	IS ^g (V) ^k	CAD ^h
Lactulose	341.016	160.952	500		20	40		Médio
		184.939	700		25	50		Alto
		58.947	450	50	20	45	-3500	Alto
		100.89	550		20	45		Alto
		73.008	450		20	45		Alto
Manitol	180.932	112.798	450	50	20	50	-4000	Médio
		136.813	700	45	30	45	-4500	Médio
		58.994	500	50	22	50	-4500	Médio
		71.009	550	50	22	50	-4000	Alto
		89.033	450	50	25	50	-3500	Alto
Sorbitol	180.935	112.912	650	50	30	45	-4500	Médio
		58.924	450	40	20	40	-3500	Alto
		136.927	650	50	20	50	-4500	Alto
		70.973	450	40	20	40	-3500	Alto
		92.879	700	40	20	45	-4500	Médio

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 20 - Parâmetros analisados na injeção de fluxo para o Manitol 50ng/mL. Gráficos obtidos do software da plataforma através da injeção de 50ng/mL de manitol. ^aCAD (energia de colisão); ^bCUR (fluxo de gás entre orifício e cortina de gás); ^cGS1 (gás nebulizador); ^dGS2 (gás de aquecimento); ^eIS (Ion Spray); ^fTEM (Temperatura).





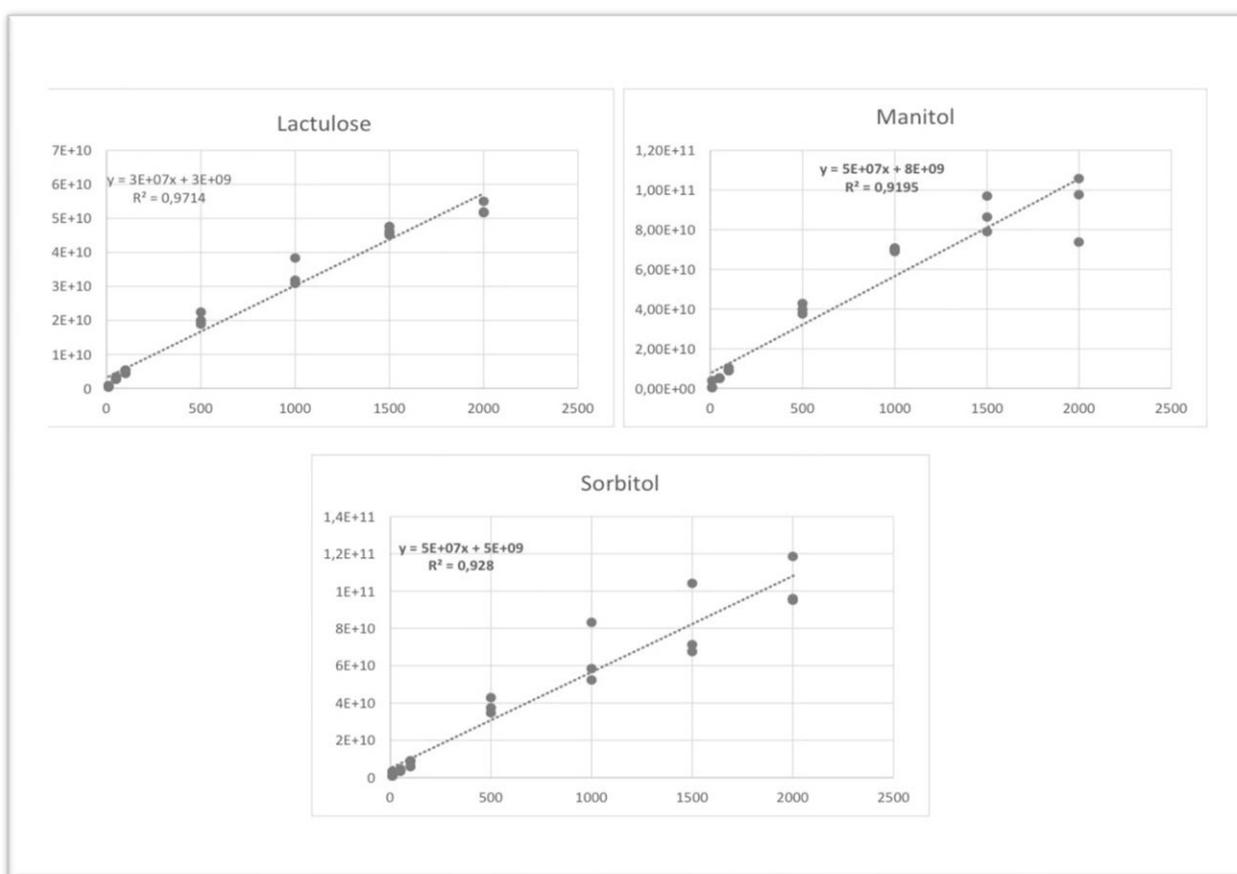
Fonte: Dados da pesquisa.

Após a otimização dos parâmetros para a injeção de fluxo, foi realizada a aquisição do método. Nesta etapa, as substâncias foram separadas através da coluna cromatográfica (*HILIC-ZIC*[®]). Para a utilização da separação através da coluna, foi fundamental a definição da fase móvel e seu gradiente (**TABELA 5**).

A fase móvel consistiu em acetonitrila (ACN) adicionado 0,05% de ácido fórmico (AF), como solvente orgânico (B) e água com 5 mM de Ac. de amônio como solvente inorgânico (A), proporção B/A (75/25), pH 6,84, em fluxo de 300 μ L/m. Utilizamos inicialmente a proposta de fase móvel com adição de ácido fórmico 0,1% ao eluente B, o pH dessa solução se manteve abaixo de cinco (entre 3,5 e 5,6) e o coeficiente de correlação da curva não atingia os padrões recomendados para cromatografia líquida ($r < 0,99$) (**FIGURA 21**). Após a adição de ácido fórmico ao eluente B, esse problema foi corrigido com pH próximo a sete.

Foram verificados alguns gradientes de fase móvel até se chegar a um que apresentasse melhor intensidade dos analitos para lactulose, manitol e sorbitol.

Figura 21 - Curva de calibração dos três analitos na presença de ácido fórmico 0,1% à fase móvel. Curvas obtidas a partir do experimento com a utilização de ácido fórmico como aditivo de fase móvel na concentração de 0,1% (pH = 3,75).



Fonte: Dados da pesquisa.

Para aquisição do método, selecionamos os parâmetros a partir da análise dos parâmetros automáticos realizados na injeção de fluxo e *MRM*. (**TABELA 5**).

Tabela 5 - Condições de separação cromatográfica para coluna (HILIC- ZIC®) e parâmetros ideais para monitoramento da transição de íons. ^aQ íon precursor detectado por monitoramento de reações múltiplas (MRM). ^b q significa o íon produto de melhor quantificação a partir da equação da curva de calibração e coeficiente de correlação (R) . ^c m/z razão /carga em unidade de atômica; ^d V: volt (medida de tensão); ^e psi: libra-força por polegada quadrada. ^f razão do íon precursor (m / z) e do íon produto (m / z) escolhida para evitar a coeluição com s iônicas de manitol.

Gradiente de fase móvel (%)	Eluente B(75/10/75)/Eluente A(25/90/25)
Fluxo	300 µL/min
Volume de Injeção	20 µL
Temperatura do forno da coluna	40 °C
Tempo de corrida da análise	10 min

Parâmetros para íons de transição

Quantitativo [Q] ^a → qualitativo [q] ^b íon precursor (m/z) ^c → íon produto (m/z) ^c		DP (V) ^d	EP (V)	CE (V)	CXP(V)
Lactulose	^Q 341.016 → ^q 160.952 ^a ^Q 341.016 → ^q 58.947 ^a	-135	-10	-12 -48	-11 -9
Manitol	^Q 180.932 → ^q 112.798 ^a ^Q 180.932 → ^q 71.009 ^a	-60	-10	-10 -26	-9 -5
Sorbitol	^Q 180.935 → ^q 112.912 ^a ^Q 80.935 → ^q 58.924 ^f	-75	-10	-26 -16	-9 -7

Parâmetros operacionais MS/MS

		TEM (°C)	GS1 (psi) ^e	CUR (psi)	GS2 (psi) ^e	IS (V)	CAD
Lactulose	^Q 341.016 → ^q 160.952	500	50	20	40	-3500	Médio
	^Q 341.016 → ^q 58.947	500	50	20	45	-3500	Alto
Manitol	^Q 180.932 → ^q 112.798	450	50	20	50	-4000	Médio
	^Q 180.932 → ^q 71.009	550	50	22	50	-4000	Alto
Sorbitol	^Q 180.935 → ^q 112.912	650	50	20	45	-4500	Médio
	^Q 180.935 → ^q 58.973 ^f	450	40	30	40	-3500	Alto
Seleção de parâmetros para análise		500	47	25	5	-3500	Alto

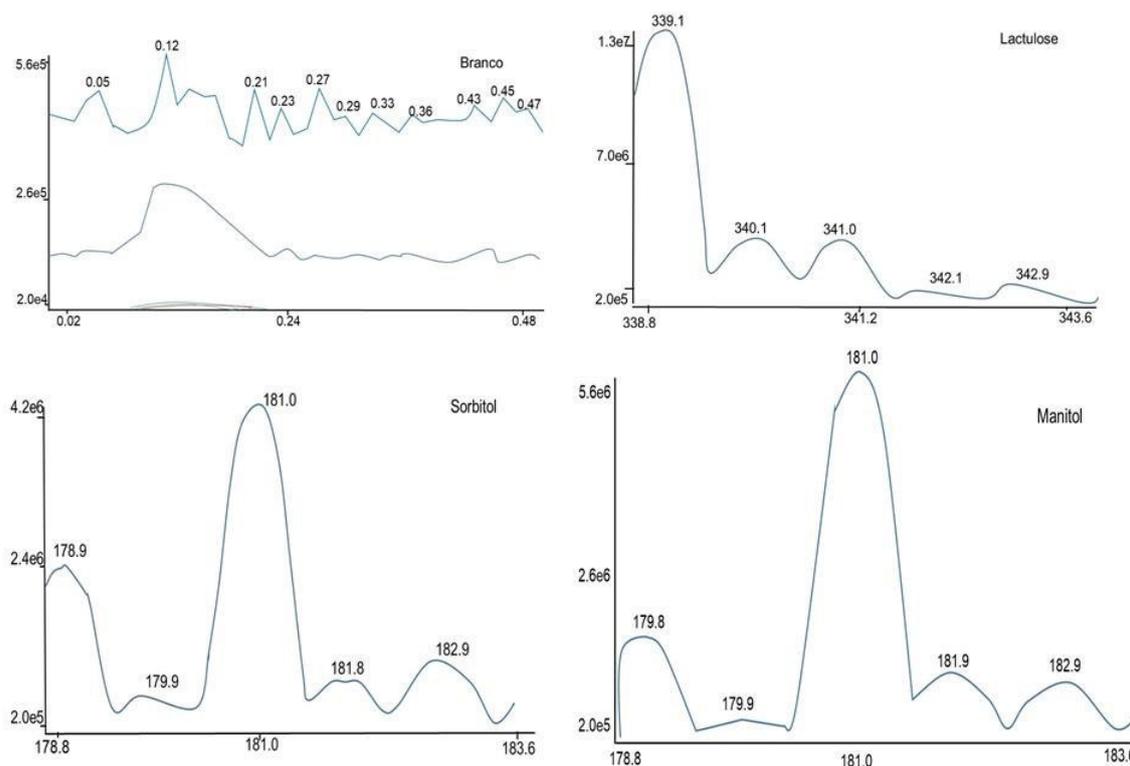
Fonte: Dados da pesquisa.

5.1 Parâmetros de Validação Analítica

5.1.1 Sensibilidade

A seletividade foi avaliada através da comparação entre os gráficos obtidos após o MRM de amostra branco e padrões contendo lactulose, manitol e sorbitol (**FIGURA 22**).

Figura 22 – Identificação dos íons precursoros. Através do MRM foi possível a constatação da sensibilidade do método através da identificação de íons precursoros para lactulose, manitol e sorbitol. Assim como esperado, na amostra sem adição de açúcares, não foi identificado íon precursor.



Fonte: Dados da pesquisa.

5.1.2 Linearidade

Foram construídas curvas analíticas a partir da injeção dos padrões puros em solventes, ou seja, padronização externa. O estudo da linearidade foi realizado na faixa de concentração de 10 a 2000ng/mL, como mostram a **TABELA 6**. Optou-se em utilizar a faixa de trabalho de 10 a 2000ng/mL devido as baixas concentrações encontradas nas amostras analisadas. Respostas lineares foram obtidas na faixa de concentração de para lactulose, manitol e sorbitol. O coeficiente de correlação da equação de regressão linear simples obtidas nesse intervalo para lactulose, manitol e sorbitol foram maiores que 0,99 ($r > 0,99$).

Tabela 6 - Linearidade, Limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ) do método no sistema HPLC-MS/MS para análise de excreção dos açúcares lactulose, manitol e sorbitol. ^a valor da área obtida da curva na amostra em branco; ^b limite de detecção; ^c limite de quantificação; ^d coeficiente de correlação.

Analito (íon precursor <i>m/z</i> / íon produto <i>m/z</i>)	Equação da curva de calibração	LD^b (ng/mL)	LQ^c (ng/mL)	R^d
Lactulose (341.016 / 58.947)	$y = 1.15e^4x^a + 1.33e^6$	0,0055	0,0168	0,991
Manitol (180.932 / 71.009)	$y = 4.46e^4x + 6.42e^6$	0,0003	0,0010	0,993
Sorbitol (180.935 / 58.924)	$y = 5.03e^4x + 7.10e^6$	0,0031	0,0001	0,995

Fonte: Dados da pesquisa.

5.1.3 Limite de Detecção e de Quantificação

O limite de quantificação foi realizado através do método das diluições sucessivas. Onde se obteve a menor concentração com precisão e exatidão disponível no método para cada analito. Foram realizadas três análises dos limites calculados para verificação da exatidão e precisão deles. O limite de detecção seguiu o mesmo princípio do limite de quantificação (**TABELA 6**).

5.1.4 Exatidão e Precisão

A exatidão da metodologia desenvolvida foi avaliada a partir de ensaios de recuperação realizada em três níveis de concentração e em triplicata. Neste trabalho, seguiu-se a recomendação da ANVISA (2017) de que as recuperações em amostras complexas devem estar entre 70 a 120%, na faixa de concentração utilizada. A precisão do método em termos de repetibilidade foi calculada e expressa em termos do coeficiente de variação. A precisão intermediária foi avaliada em dias diferentes e por analistas diferentes, porém em um só nível de concentração (ponto médio) e foi expressa em termos do coeficiente de variação (%CV).

A **TABELA 7** mostra resultados de recuperação, com respectivo coeficiente de variação (%CV) de cada nível de concentração.

Bons resultados foram obtidos e dentro do limite recomendado para os níveis de concentração aplicados para os açúcares, com exceção do Manitol 500ng/mL (132,2%) que apresentou valores de recuperação acima do recomendado (>120%).

Tabela 7 - Repetibilidade do método no sistema HPLC-MS/MS para análise de excreção dos açúcares lactulose, manitol e sorbitol. concentração em amostras fortificadas; ^b concentração obtida através da média dos valores obtidos pela equação da curva de calibração das amostras fortificadas; ^c % recuperação ^d desvio padrão; ^e coeficiente de variação.

	Concentração Inicial ^a (ng/mL)	Concentração obtida ^b (ng/mL) (n = 9)	Recuperação ^c (%)	SD ^d	CV ^e (%)
Lactulose (341.016 / 58.947)	100	95,7	95,7	1,713	1,79
	500	499,237	99,8	6,147	1,23
	1000	994,774	99,4	20,826	2,09
Manitol (180.932 / 71.009)	100	112,9	112,9	11,060	9,79
	500	661,227	132,2	8,625	1,30
	1000	1116,35	111,6	18,705	1,67
Sorbitol (180.935 / 58.924)	100	90,4	90,4	2,251	2,49
	500	568,555	113,71	33,076	5,81
	1000	988,222	98,8	45,816	4,63

Fonte: Dados da pesquisa.

A determinação da precisão intermediária foi realizada em intervalos de 24 horas na concentração de 500ng/ml de lactulose, manitol e sorbitol em três dias consecutivos. Os coeficientes de variação encontrados foram inferiores a 8,7% (**TABELA 8**). Nos dois parâmetros, a exatidão do método pôde ser observada através da recuperação.

Tabela 8 - Precisão intermediária do método no sistema HPLC-MS/MS para análise de excreção dos açúcares lactulose, manitol e sorbitol. ^a concentração em amostras fortificadas; ^b concentração obtida através da equação da curva de calibração em amostras fortificadas com; ^c % recuperação da média das concentrações obtidas em dias diferentes; ^d desvio padrão; ^e coeficiente de variação.

Analito	Dia	Concentração Inicial ^a (ng/mL)	Concentração ^a (ng/mL) (n = 6)	Recuperação (%) ^b	SD ^c	CV(%) ^d
Lactulose (341.016 / 58.947)	1	500	621,6	124,32	41,1	6,6
	2		504,7	100,94	11,8	2,3
	3		607,7	121,54	52,3	8,6
Manitol (180.932 / 71.009)	1	500	531,4	106,28	46,5	8,7
	2		650,7	130,14	31,3	4,8
	3		698,8	139,76	30,2	4,2
Sorbitol (180.935 / 58.924)	1	500	575,6	115,12	50,2	8,7
	2		564,2	112,84	34,8	6,1
	3		657,8	131,56	104,0	5,8

Fonte: Dados da pesquisa.

5.2.5 Efeito Matriz

Para estudo de interferência de efeito matriz, soluções e urinas foram enriquecidas com lactulose e manitol em um intervalo de 750-6000ng/mL. Os cálculos foram realizados através da média das áreas dos picos das duas substâncias (**TABELA 9**).

Tabela 9 - Área dos picos das soluções padrão e amostras de urinas fortificadas. Amostras fortificadas obtidas através de concentrações conhecidas dos analitos em *pool* de urinas. ^aconcentração dos analitos nas solução padrão e na urina fortificada; ^bmédia da área dos picos; ^cdesvio padrão; ^dcoeficiente de variação.

Analito	Concentração ^a (ng/mL)	Amostras	Área dos picos ^b (cps) N=3	DP ^c	CV ^d (%)	
Manitol	750	UF	12523333,33	519839,71	4,150	
		Padrão	23706666,67	973721,38	6,582	
	1500	UF	1,3E+07	253245,59	1,068	
		Padrão	2,4E+07	1769755,16	6,288	
	3000	UF	41350000	727461,33	1,759	
		Padrão	4,9E+07	1545930,14	3,184	
	6000	UF	71253333,33	1912598,58	2,684	
		Padrão	8,4E+07	1553093,68	1,839	
	Lactulose	750	UF	54176,67	1552,23	2,997
			Padrão	51866,66667	1521,26	2,933
		1500	UF	76046,67	5877,77	6,586
			Padrão	95003,33333	8227,71	8,660
3000		UF	130410,00	10424,17	6,728	
		Padrão	174466,6667	21185,92	12,143	
6000		UF	245300,00	7031,59	2,500	
		Padrão	383666,6667	31187,55	8,128	

Fonte: Dados da pesquisa.

Outro parâmetro para análise de interferência do efeito matriz foi o tempo de retenção (TR) da lactulose e manitol nas soluções padrão e na UF (**TABELA 10**). O TR se caracteriza pelo tempo decorrido desde a inserção do analito na plataforma até aparecimento do seu pico cromatográfico.

Tabela 10 - Tempo de retenção da lactulose e manitol em soluções padrão e urina fortificada. Tempo de retenção reproduzido nas amostras padrão e de UF. ^atempo de retenção obtido com a solução padrão; ^btempo de retenção obtido com a urina fortificada; ^c% recuperação.

Concentração Ng/mL	Analitos					
	Manitol			Lactulose		
	Tempo de Retenção Padrão ^a (min)	Tempo Retenção UF ^b (min)	Recuperação (%) ^c	Tempo de Retenção Padrão (min)	Tempo Retenção UF (min)	Recuperação (%)
750	6,87	6,83	99,41	7,18	7,13	99,30
1500	6,86	6,83	99,56	7,17	7,14	99,58
3000	6,84	6,82	99,70	7,16	7,13	99,58
6000	6,84	6,82	99,70	7,16	7,12	99,44
750	6,81	6,81	100	7,13	7,12	99,85
1500	6,82	6,81	99,85	7,14	7,12	99,71
3000	6,81	6,81	100	7,13	7,12	99,85
6000	6,81	6,8	99,85	7,14	7,11	99,57
750	6,8	6,84	100,58	7,12	7,14	100,28
1500	6,81	6,81	100	7,12	7,12	100
3000	6,82	6,81	99,85	7,14	7,12	99,71
6000	6,81	6,81	100	7,13	7,11	99,71

Fonte: Dados da pesquisa.

A interferência do efeito matriz foi medida através da recuperação e supressão de íons (EM) a partir da área dos picos de lactulose e manitol no padrão e em UF, o experimento foi realizado em triplicata (**TABELA 11**).

Tabela 11 - Recuperação e Efeito Matriz das amostras em urinas fortificadas.

Urina fortificada obtida através da adição de concentrações conhecidas do analito na urina de voluntários. ^a concentração conhecida adicionada as soluções padrão e amostras de urina; ^b % obtido através da média das áreas dos picos dos analitos; ^c % expresso em supressão de íons obtidos através das áreas dos picos dos analitos.

Analito	Concentração ^a (ng/mL)	Recuperação ^b (%)	EM ^c (%)
Manitol	750	84,6553	-11,66180758
	1500	84,2355	-10,78431373
	3000	85,1699	-11,82182816
	6000	84,4134	-12,41908415
Lactulose	750	99,82648	4,39800995
	1500	93,92653	-8,884959664
	3000	88,80397	-22,04164551
	6000	135,2735	-30,83954775

Fonte: Dados da pesquisa.

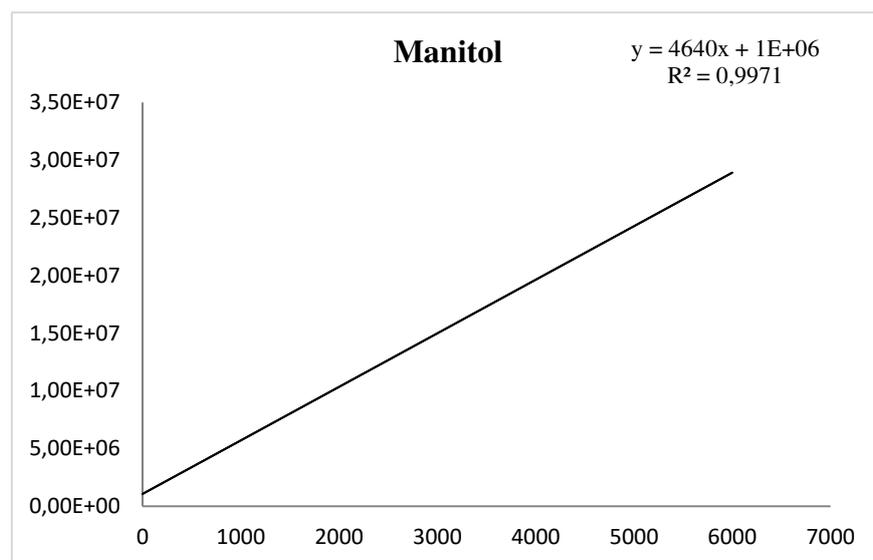
5.2 Aplicação do método - Alterações da permeabilidade intestinal

Como parte do estudo, analisamos a excreção de lactulose, manitol e a razão L:M através do teste L:M para avaliação da permeabilidade intestinal em urina de crianças residentes em áreas com diferentes índices de desenvolvimento humano (IDH) em Fortaleza - Ce.

As crianças foram divididas em dois grupos. No grupo 1, estão agrupadas as crianças residentes em bairro com alto IDH (0,90). No grupo 2, estão agrupadas as crianças residentes em bairro com baixo IDH (0,21) (Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Prefeitura Municipal de Fortaleza - Ce, 2010). Nos dois grupos as crianças não apresentavam diarreia e nenhum sintoma gastrointestinal.

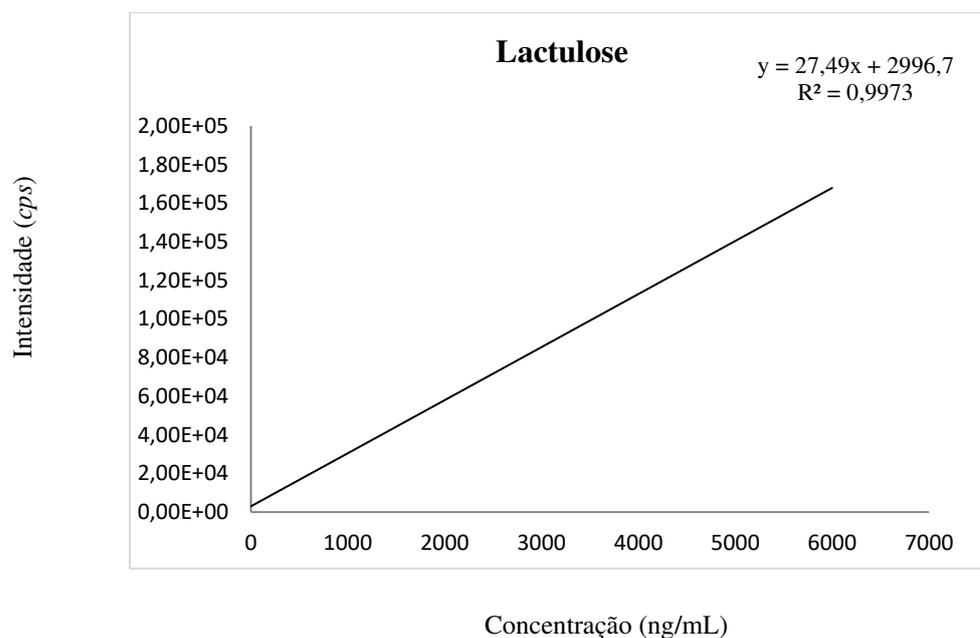
As concentrações de lactulose e manitol foram calculados a partir da área do pico pela equação da curva de calibração da corrida (**FIGURAS 23 e 24**).

Figura 23 - Curva padrão do manitol. Curva obtida entre o intervalo de 750-6000ng/mL de manitol em duplicata.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 24 - Curva de calibração da lactulose. Curva obtida entre o intervalo de 750-6000ng/mL de manitol em duplicata.



Fonte: Dados da pesquisa.

Na **TABELA 12** podemos observar o percentual de excreção de lactulose, manitol e a razão L:M através do HPLC-MS/MS nas urinas das crianças submetidas ao teste L: M.

Tabela 12 - Excreção de lactulose, manitol e razão L:M medido através da plataforma HPLC-MS/MS. No grupo 1, estão agrupadas crianças residentes em áreas com alto IDH (0,91) e no grupo 2, em áreas com baixo IDH (0,21). Foi calculado percentual de excreção de lactulose, manitol e razão L: M.

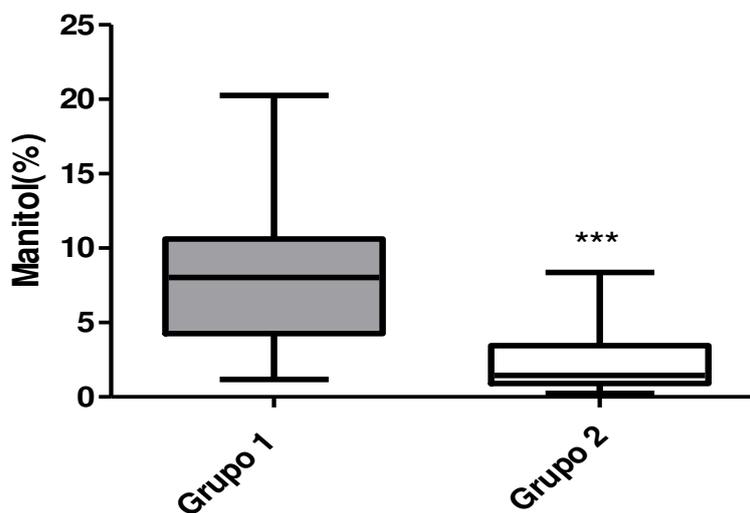
Amostra Grupo 1	Excreção Manitol (%)	Excreção Lactulose (%)	Razão L/M	Amostra Grupo 1	Excreção Manitol (%)	Excreção Lactulose (%)	Razão L/M
001	11,132	0,794	0,071	001	1,449	0,144	0,100
002	20,263	0,998	0,049	002	1,440	0,288	0,200
003	2,362	0,113	0,047	003	1,577	0,301	0,191
004	7,668	0,771	0,100	004	0,831	0,164	0,197
005	9,093	0,696	0,076	005	2,701	0,547	0,202
006	8,087	0,573	0,070	006	0,747	0,194	0,260
007	2,566	0,098	0,038	007	1,643	0,204	0,124
008	8,226	0,441	0,053	008	0,899	0,156	0,174
009	1,171	0,045	0,038	009	0,908	0,158	0,174
010	4,348	0,132	0,030	010	3,457	0,518	0,149
011	8,430	0,507	0,060	011	0,985	0,192	0,194
012	13,295	0,850	0,063	012	3,433	0,408	0,119
013	4,221	0,407	0,096	013	1,512	0,204	0,135
014	17,379	1,020	0,058	014	1,363	0,224	0,164
015	4,695	0,275	0,058	015	4,708	0,649	0,138
016	7,989	0,263	0,071	016	0,761	0,097	0,127
-	-	-	-	017	1,111	0,069	0,062
-	-	-	-	018	1,148	0,197	0,171
-	-	-	-	019	4,737	0,622	0,131
-	-	-	-	020	0,2308	0,032	0,141
-	-	-	-	021	6,038	0,442	0,073
-	-	-	-	022	8,371	1,160	0,138
-	-	-	-	023	0,461	0,059	0,128
-	-	-	-	024	5,662	0,783	0,138
-	-	-	-	025	1,493	0,181	0,121

Fonte: Dados da pesquisa.

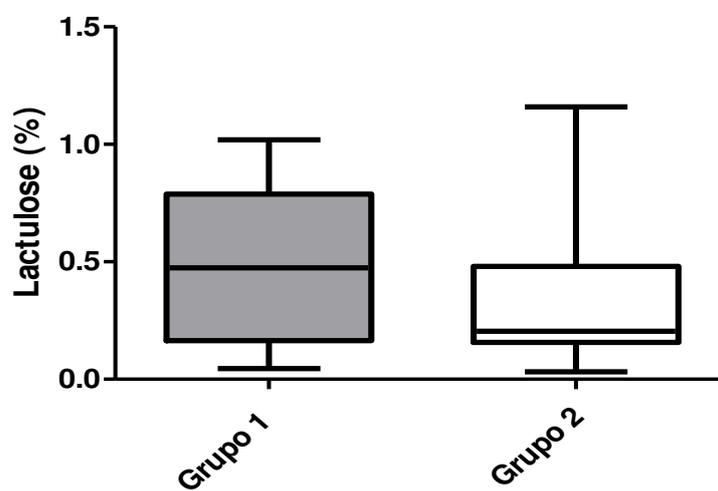
A média da razão L:M encontrada no grupo 1 foi menor (Média = 0,061) do que a encontrada no grupo 2 (0,150). Quando comparada a excreção de manitol entre os dois grupos, encontramos uma diminuição significativa no grupo 2 ($P \leq 0,05$). A excreção de lactulose não foi significativamente diferente entre os dois grupos. A razão L:M foi significativamente maior no grupo 2 ($P \leq 0,05$) (**FIGURA 25**).

Figura 25 - Percentual da excreção de lactulose e manitol nos dois grupos de crianças submetidas ao teste L:M através do HPLC-MS/MS. Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil da porcentagem de excreção de lactulose e manitol e da razão lactulose/manitol dos grupos 1 (n=16) e 2 (n=25). A) Percentual de excreção de manitol. B) Percentual de excreção de lactulose. C) Razão excreção de lactulose/manitol. A análise estatística foi feita através do teste Mann Whitney e os valores considerados significativos foram os $P \leq 0,05$.

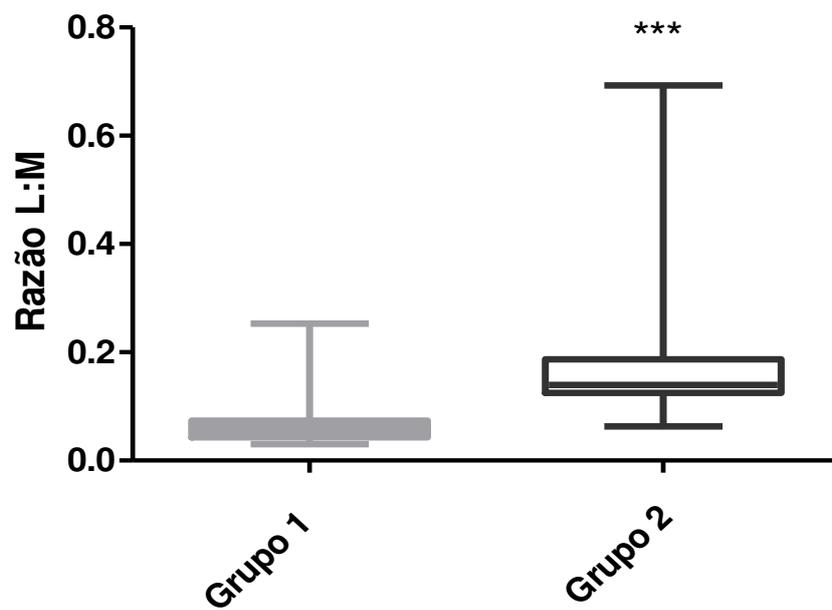
A)



B)



C)



Fonte: Dados da pesquisa.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a utilização dos biomarcadores lactulose e manitol na alteração da barreira morfofuncional gastrointestinal através da espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida. Crianças que viviam em áreas com diferentes índices de desenvolvimento urbano (IDH) foram submetidas ao teste L:M para avaliar possível comprometimento da barreira morfofuncional gastrointestinal.

Vários métodos cromatográficos foram descritos para análise de lactulose e manitol na urina (WELCKER et al., 2004; ZHOU; ZHANG; VERNE, 2009). O método HPLC/MS-MS aqui proposto apresentou vantagens diante da cromatografia líquida isolada, como sua alta sensibilidade, especificidade e produtividade para análise dos biomarcadores lactulose e manitol (GERVASONI et al., 2016).

O analisador de massas utilizado na análise foi um triplo quadrupolo, sendo o analisador quadrupolo mais comumente utilizado em análises quantitativas (FERGUSON; MCCULLOH; ROSENSTOCK, 1965) e o modo de aquisição automático utilizado foi o “Monitoramento De Reações Múltiplas” (MRM), indicado para análises quantitativas (RIBANI et al., 2004). O primeiro passo no desenvolvimento de um método de MRM consistiu na determinação das melhores condições de análise dos analitos de interesse como descrito por Iglesias (2013). A capacidade do MS/MS em monitorar múltiplas transições de íons de reação por execução única dá alta especificidade ao método (KUBICA et al., 2012).

Observamos que o método MS/MS é altamente específico na medida em que se baseia na detecção de íons produto únicos para lactulose, manitol e sorbitol como podem ser vistos na TABELA 3 e relatado por outros autores (KUBICA et al., 2012; LOSTIA et al., 2008).

Os cinco íons produto foram selecionados e obtidos a partir de altas energias de colisão. De acordo com Kind e colaboradores (2018), baixas energias de colisão preservam os íons precursores e apenas alguns íons produto são observados. Aumentar a energia de colisão aumentará a abundância de íons produto em direção a baixas faixas m/z e ao mesmo tempo diminuirá a abundância do íon precursor.

O método de ionização determina como material da amostra é transferido para o espectrômetro de (KIND et al., 2018). A fonte de ionização foi ionização por eletrospray (ESI), sendo a fonte mais utilizada para o acoplamento (KIND et al., 2018; YAMASHITA; FENN, 1984). Pelas características do processo descrito, ESI se aplica muito bem a compostos de polaridade média e alta, daí sua extensa aplicabilidade nos campos

farmacêutico, de alimentos, produtos naturais, dentre outros como mostram alguns trabalhos (CAHILL et al., 2004; SCHLICHOTHERLE-CERNY; AFFOLTER; CERNY, 2003; STREGE, 1999).

A escolha da coluna HILIC-ZIC® se deu por oferecer retenção maior de compostos como lactulose e manitol, como descrito por vários autores (DA SILVA; COLLINS; BOTTOLI, 2014). A coluna HILIC-ZIC® ofereceu também separação satisfatória e tempos de retenção reproduzíveis para lactulose, manitol e sorbitol, nos padrões e amostras analisadas como relatado por Kubica e colaboradores (2012).

A cromatografia líquida com a coluna HILIC-ZIC® foi capaz de separar compostos polares com mesma massa molar e a espectrometria de massas foi capaz de identificá-los (KUBICA et al., 2012; LOSTIA et al., 2008). Pudemos observar a separação dos compostos manitol e sorbitol, mesmo possuindo massas molares iguais, isso devido à capacidade de a espectrometria de massas separar através da relação massa/carga (m/z) e relação íon precursor/ íon produto no triplo quadrupolo - QTRAP 5500. O que confirma a vantagem do sistema HPLC-MS/MS diante do HPLC isolado.

O uso do tempo de retenção é altamente recomendado para alta confiança de identificação de compostos (HERRERA-LOPEZ et al., 2014; LYNN et al., 2015).

Foi observada uma melhor ionização dos íons através do modo negativo usando o ácido fórmico como aditivo. Este é conhecido como aditivo no modo positivo, porém pode ser usado também como aditivo no modo de ionização negativo (LIU et al., 2010).

O ácido fórmico é mencionado como aditivo de fase móvel auxiliando a ionização dos analitos. Ele é volátil e deve ser utilizado em baixa concentração, a fim de evitar que o mesmo interfira no processo de ionização do analito, processo conhecido como supressão de ionização assim como descrito por outros autores como Iglesias (2013) e Trufelli e colaboradores (2011).

A presença do ácido fórmico à fase móvel em diferentes concentrações alterou o pH dela, variando de acordo com a concentração adicionada. Quanto maior a concentração de AF adicionada, menor o pH da fase móvel. Fase móvel com pH abaixo de 6 não apresentou uma boa ionização. A fase móvel com adição de 0,05% de AF apresentou melhor ionização e pH próximo ao neutro (pH = 6,84).

Gan e colaboradores (2021) também observaram que alteração no pH ou no percentual orgânico, pode aumentar significativamente a ionização por ESI e de acordo com Van Wijck e colaboradores (2011), a aplicação de um ácido mais fraco, como o ácido fórmico, aumentou a resposta do dissacarídeo, mas reduziu fortemente a resposta do

monossacarídeo. Diferente do exposto acima, encontramos uma melhor resposta tanto da lactulose como do manitol na presença do AF 0,05% á fase móvel.

Durante o processo de definição da fase móvel, identificamos várias alterações na ionização de acordo com a gradiente de fase móvel. Foram várias tentativas até chegarmos ao gradiente que proporcionasse melhor ionização (**TABELA 3**).

Como a eficiência do eletrospray depende principalmente da composição da fase móvel, a composição ideal do eluente para a separação cromatográfica adequada às vezes não é apropriada para alcançar a resposta máxima do electropray (NÚÑEZ; MOYANO; GALCERAN, 2005).

Assim como descrito por Lostia e colaboradores (2008), o método relatado aqui, com base na identificação do íon do fragmento, supera muitos os problemas encontrados na análise de carboidratos em fluidos biológicos e podem ser considerados uma ferramenta automatizada útil para estudar o intestino e a modificação da barreira morfofuncional gastrointestinal, não só em pediatria, mas também em doenças do adulto, como doença celíaca, doença de Crohn, doença inflamatório intestinal, permitindo uma discriminação precisa do paciente também para restrições de dieta.

Outra vantagem do sistema HLPC-MS/MS é a rapidez na análise individual das amostras quando comparado com o sistema de Cromatografia Líquida (HPLC-PAD) já utilizado no Centro de Cromatografia e Espectrometria de Massas (CEEM), Centro de Biomedicina, INCT-Biomedicina, Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal do Ceará (UFC), onde a corrida tem duração de 35 minutos e no sistema em questão, 10 minutos. Reduzindo assim a menos de um terço o tempo da corrida, com isso, um número maior de corridas pode ser feito em menor intervalo de tempo, aumento assim a robustez de dosagem na plataforma de HPLC-MS/MS e uma das vantagens citados para esse sistema.

Dentro da faixa de trabalho de 10-200ng/mL o coeficiente de correlação foi aceitável ($R \geq 0,991$). O método de quantificação usado é valido para padronização interna do método.

A avaliação da exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) é realizada de várias formas. A mais utilizada pelos pesquisadores é por meio do porcentual de recuperação do analito, DP e CV, respectivamente (BURIN et al., 2008). Os coeficientes de variação não foram superiores a 9,79% como relatado por Barboza Jr. e colaboradores (1999) e Kubica e colaboradores (2012) e deve estar abaixo de 20% de acordo com RDC N°166, 2017, ANVISA. Os valores de recuperação obtidos para exatidão do método variaram entre 95,7 e 139,76 de acordo com as concentrações analisada. Para essa

faixa de concentração a recuperação deve se encontrar entre 70-120% (ANVISA, 2017). Embora recuperações próximas a 100% sejam desejáveis, a extensão da recuperação de um analito pode ser aceita até na ordem de 50-60, se a recuperação for precisa, exata e reprodutível (CHASIN et al., 1998).

Os parâmetros exatidão e precisão constituem a chave para o processo de validação. São requeridos para todos os estudos de validação de métodos, exceto para aqueles com propósito qualitativo, que se destinam apenas a acusar a presença de um analito. Para a análise quantitativa de elementos traços é necessário validar os limites de detecção e de quantificação. Já para análises qualitativas é obrigatório validar apenas o limite de detecção. A avaliação do parâmetro da linearidade é obrigatória para métodos novos e análises qualitativas de componentes majoritários (BRITO et al., 2003).

A adição de uma quantidade específica de resina de troca iônica as amostras de urina, foram suficientes para obter altos valores de recuperação assim como relatado por Kubica e colaboradores (2012).

Como é de conhecimento, a análise de compostos de interesse pode sofrer interferência de outras substâncias, notadamente conhecido como efeito matriz. Em LC-MS/MS essa interferência ocorre no momento da ionização em decorrência da competição no processo de ionização, fazendo com que o sinal do analito em questão seja intensificado ou suprimido (SILVA et al., 2019).

Uma vez desenvolvido o método, umas das questões mais complexas é a análise de efeito matriz (EM) e deve ser sempre avaliado durante a validação de métodos quantitativos de HPLC-MS / MS, sobretudo em matrizes incomplexas como como urina (PETROSINO; SERAFINI, 2014). É ainda mais crítico em virtude do fato de que não se pronuncia diretamente, pois através do MRM, se observa somente o sinal do analito de interesse. Como esses cromatogramas são em geral limpos, tem-se a falsa sensação de que a matriz não interfere no sinal obtido. Outro agravante é que o EM pode ser afetado pelo analito, matriz, preparo da amostra, fase móvel, condições cromatográficas e parâmetros do MS.

Diante disso, o EM se torna um dos maiores problemas da análise através da espectrometria de massas e estudos se baseiam no objetivo de minimizar esse efeito (GERVASONI et al., 2016) através de estratégias como purificação das amostras ou uma separação cromatográfica mais eficiente (TAYLOR, 2005).

Realizamos a análise do efeito matriz pelo método de adição de substância química de referência (SQR) no qual quantidades conhecidas de SQR são acrescentadas à amostra (ANVISA, 2017).

Observamos que o tempo de retenção dos analitos não variou e se apresentaram dentro do intervalo de 2% dos tempos no padrão como descrito por Núñez, Moyano e Galceran (2005).

Observamos uma supressão da ionização em quase todas as concentrações, sendo maior na concentração de 6000 ng/mL nos três analitos. Em nosso método a supressão de íons relatada se apresentou entre 8-30%. No entanto, a supressão não afetou a exatidão e precisão do ensaio uma vez que os sinais para lactulose e manitol ficaram bem acima dos sinais do LD e LQ (PETROSINO; SERAFINI, 2014).

Após a validação analítica do método, a aplicação do método foi demonstrada através da quantificação da excreção de lactulose e manitol em amostras de crianças residentes em áreas com diferentes Índices de Desenvolvimento Urbano (IDH), Fortaleza – Ce.

Em todas as urinas analisadas das crianças submetidas ao teste L:M, foi possível quantificar lactulose e manitol.

A razão L:M encontrada está de acordo com os valores encontrados em amostras de crianças analisadas pelo grupo através de HPLC-PAD (BARBOZA JR. et al., 1999; LIMA et al., 1997).

Em 2017, mais de 160 milhões de crianças (quase 1 criança em cada 3 que vivem em áreas pobres) sofriam as consequências muitas vezes esquecidas de desnutrição e déficit de crescimento na primeira infância. Além de dietas inadequadas, a maioria das crianças tinham infecções intestinais repetidas e múltiplas (BARTELT; BOLICK; GUERRANT, 2019).

A DEA é uma condição subclínica caracterizada por alterações funcionais gastrointestinais e desde a sua descoberta não foi reconhecida como uma prioridade e problema de saúde porque não causa sintomas evidentes e foi relatada em indivíduos saudáveis e ganhou destaque como potencial causa de déficit de crescimento em crianças que vivem em países em desenvolvimento (SETCHELL et al., 2020; WATANABE; PETRI, 2016). No entanto, a determinação de uma definição de consenso clara para DEA permanece um desafio indescritível (ROGAWSKI; GUERRANT, 2017).

Por conta da natureza irreversível das consequências ocasionadas pela DEA, seu diagnóstico deve ser feito antes de pelo menos 2 anos de idade (DENNO et al., 2014).

Considerando que as alterações teciduais que ocorrem na DEA se correlacionam com o aumento da permeabilidade intestinal (BARTELT; BOLICK; GUERRANT, 2019; DENNO et al., 2014; GERVASONI et al., 2016; GUERRANT et al., 2013; LEE; RYAN; DOHERTY, 2014), a realização de um teste diagnóstico capaz de aferi-la se torna útil na clínica. O teste padrão ouro tradicional para diagnóstico tem sido a biópsia intestinal para identificar anormalidades na histologia intestinal. No entanto, esse diagnóstico invasivo é inviável na maioria das pesquisas e muitas configurações clínicas e também é limitada por potencialmente inadequada amostragem, porque a amostra biopsiada pode não ser representativa de todo o intestino (ROGAWSKI; GUERRANT, 2017; SETCHELL et al., 2020; WATANABE; PETRI, 2016). A sugestão de um método não invasivo e de baixo custo vem crescendo e tem sido um desafio nos países em desenvolvimento (ROGAWSKI; GUERRANT, 2017; SETCHELL et al., 2020; WATANABE; PETRI, 2016), pois não há testes de diagnóstico clínico, validados (CAMILLERI et al., 2020).

O teste lactulose:manitol tem apresentado bom desempenho, embora apresente algumas dificuldades de interpretação, principalmente em crianças. A falta de padronização e de estudos de validação em relação à técnica e a ausência de padrão de referência são dificuldades que ainda precisam ser sanadas (MORAIS; SILVA, 2019).

Goto e colaboradores (2002) relataram que os níveis de permeabilidade intestinal são elevados em crianças com baixa estatura no Nepal. Na década de 70, Lindenbaum, Gerson e Kent (1971), mostraram que esta alteração foi reversível em adultos. No entanto, Denno e colaboradores (2014) demonstraram que a DEA em crianças é irreversível após o segundo ano de vida, desencadeando comprometimentos até a vida adulta.

O estudo atual revalida esse parâmetro em crianças sem diarreia com os outros estudos do grupo. De acordo com Vieira e colaboradores (2008), o teste de permeabilidade lactulose: manitol foi considerado anormal ou positivo para fins de comparação se a relação lactulose: manitol foi $\geq 0,0864$.

Não há referência internacional ou padrões de medição que facilitem a padronização do ensaio de lactulose e manitol. Como os valores L:M não podem ser comparados com confiança entre laboratórios, o ponto acima do qual um resultado de teste é interpretado como “anormal” é geralmente definido em um estudo ou laboratório. Uma maior comparação tornaria possível diagnosticar com precisão uma criança como tendo uma relação L:M “anormal” de acordo com um padrão universal, ao invés de um padrão relativo e específico do estudo. Embora o teste L:M seja o ensaio mais comumente usado para estudo da barreira morfofuncional gastrointestinal e tenha sido usado há mais de 2 décadas pelo

nosso grupo de pesquisa e outros, poucos padrões foram adotados na implementação, avaliação de concentrações de analito, ou a interpretação dos resultados (BARBOZA JR. et al., 1999; LEE et al., 2014; LIMA et al., 1997).

Quando comparamos os resultados obtidos entre crianças residentes em regiões com diferentes IDH, podemos observar uma diferença significativa ($P < 0,05$) nas razões L:M e percentual de excreção de manitol. Esses dados sugerem presença de alterações na absorção intestinal em crianças relacionadas com o IDH, como descrito por outros autores (CAMPBELL et al., 2003; LEE et al., 2014).

A desnutrição infantil continua sendo uma característica quase invariável de muitos países em desenvolvimento. As causas estão associadas à complexa interação entre pobreza, quantidade e qualidade inadequada de alimentos, infecções frequentes, más condições sanitárias, práticas de higiene inadequadas e baixa acessibilidade aos serviços de saúde. Além disso, a capacidade de digerir e absorver os alimentos pode ser prejudicada por doenças frequentes e crônicas, como a infecções entéricas (GOTO; MASCIE-TAYLOR; LUNN, 2009).

De acordo com Benedetti e colaboradores (1997), crianças em países de baixa e média renda comumente experimentam inflamação sistêmica de baixo grau, que pode suprimir a produção de fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e resultar em falha de crescimento linear. A inflamação sistêmica é considerada causa e consequência de DEA.

Weisz e colabores (2012) observaram menor crescimento linear em crianças de 2 a 5 anos em Malawi (África) associado a maior excreção de lactulose, enquanto melhor crescimento, foi associado a menor excreção de lactulose, acesso a água limpa, não dormir com animais e sem história prévia de desnutrição. Oitenta e sete por cento das crianças estudadas demonstraram evidências de enteropatia ambiental. Relacionando assim, a integridade intestinal anormal ao crescimento linear reduzido nessas crianças.

Em bebês de Bangladesh, a razão L:M foram maiores que em bebês do Reino Unido e 62% mostraram evidências de dano a mucosa intestinal quando comparados com os do Reino Unido (GOTO; MASCIE-TAYLOR; LUNN, 2009).

No entanto, a DEA se trata de uma condição complexa (WATANABE; PETRI, 2016), onde nenhum fator único foi identificado com culpado (BARTELT; BOLICK; GUERRANT, 2019), necessitando assim de avaliação detalhada para diagnóstico e um

grande interesse em validar o diagnóstico de biomarcadores para essa condição subclínica (BARTELT; BOLICK; GUERRANT, 2019).

Devido a necessidade de diagnóstico para avaliação da permeabilidade intestinal, se faz essencial o estudo de alternativas diagnósticas que sejam precisas, simples e não invasivas. Os sistemas analisadores baseados em LC-MS/MS totalmente automatizados e "fechados" provavelmente terão um papel importante no futuro da química clínica (VOGESER; STONE, 2020).

Este é o primeiro estudo através da plataforma HPLC-MS/MS pelo CCEM. Como perspectiva futura, gostaríamos de confirmar os resultados deste estudo em um número maior de crianças para melhor definir os valores de corte relacionados à DEA. Além disso, ampliar análise de biomarcadores para permeabilidade de barreira morfofuncional gastrointestinal, estudos de metabolômica e outros. Para análise metabolômica, a plataforma HPLC-MS/MS vem sendo considerada componente fundamental, sendo a técnica mais comumente utilizada (ABDELNUR, 2011; ABDELNUR; CALDANA; MARTINS, 2014).

7 CONCLUSÃO

Os parâmetros para detecção de lactulose e manitol através de HPLC-MS/MS podem sofrer interferência na ausência de um aditivo de fase móvel, alteração de pH e gradiente de concentração da fase móvel. A análise da excreção de lactulose e manitol na urina realizada através da plataforma HPLC-MS/MS superou a cromatografia líquida isolada em relação ao tempo de execução de análises e sensibilidade. Também foi capaz de identificar compostos de mesma massa molar como o manitol e o sorbitol. Diante do exposto, a plataforma se apresentou como uma ferramenta importante no diagnóstico de alterações na barreira morfofuncional gastrointestinal de forma precisa e simples. Adicionalmente, esse teste para avaliação da barreira morfofuncional gastrointestinal foi demonstrado como método não invasivo para monitorar a presença de DEA e outras doenças como doenças diarreicas, desnutrição e outras em crianças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB SCIEX. **Home**. Disponível em: <<https://absciex-prod64.adobecqms.net/.html>>. Acesso em: 15 abr. 2021.

ABDELNUR, P. V. **Imageamento químico por espectrometria de massas utilizando MALDI (MALDI Imaging Mass Spectrometry) aplicado a tecidos vegetais**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2011.

ABDELNUR, P. V.; CALDANA, C.; MARTINS, M. C. M. Metabolomics applied in bioenergy. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 22, 2014.

ALBERICI, R. M. et al. Analysis of fuels via easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, n. 1, p. 15–22, 5 fev. 2010.

ANDERSON, J. M.; VAN ITALLIE, C. M. Physiology and Function of the Tight Junction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 2, 2009.

ANVISA. **RESOLUÇÃO RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017 - Imprensa Nacional**. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/materia>>. Acesso em: 18 mar. 2021.

ASSIMAKOPOULOS, S. F.; PAPAGEORGIOU, I.; CHARONIS, A. Enterocytes' tight junctions: From molecules to diseases. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 2, n. 6, p. 123–137, 2011.

BARBOSA, I. L. **Desenvolvimento de métodos de análise de drogas de abuso em dried urine spots (DUS) por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS)**. Campinas: Universidade de Campinas, 2018.

BARBOZA JR., M. S. et al. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 12, p. 1499–1504, 1999.

BARTELT, L. A.; BOLICK, D. T.; GUERRANT, R. L. Disentangling Microbial Mediators of Malnutrition: Modeling Environmental Enteric Dysfunction. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 3, p. 692–707, 2019.

BLACK, R. E. et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. **The Lancet**, v. 382, n. 9890, p. 427–451, 2013.

BLASCO, C.; PICÓ, Y. Liquid Chromatography - Mass Spectrometry. In: **Food Toxicants Analysis: Techniques, Strategies and Developments**. [s.l.] Elsevier, 2007. p. 509–559.

BRITO, N. M. et al. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, n. 0, 2003.

BRUINS, A. P. Mechanistic aspects of electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v. 794, n. 1–2, p. 345–357, 1998.

CAHILL, J. D. et al. Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1041, n. 1, p. 171–180, 2004.

CAMILLERI, M. et al. Randomised clinical trial: significant biochemical and colonic transit effects of the farnesoid X receptor agonist tropifexor in patients with primary bile acid diarrhoea. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 52, n. 5, p. 808–820, 2020.

CAMPBELL, D. I. et al. Chronic T cell-mediated enteropathy in rural west African children: relationship with nutritional status and small bowel function. **Pediatric Research**, v. 54, n. 3, p. 306–311, 2003.

CAPLAN, A. I. All MSCs are pericytes? **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p. 229–230, 2008.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, The role of chromatography and capillary electrophoresis in the biosciences. v. 689, n. 1, p. 175–180, 1997.

CHANG, S. M. et al. Early childhood stunting and later behaviour and school achievement. **Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines**, v. 43, n. 6, p. 775–783, 2002.

CHASIN, A. M. et al. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. v. 11, n. 1, p. 1–6, 1998.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. [s.l.] Editorada Unicamp, 2006.

COLLINS, D. C.; LEE, M. L. Developments in ion mobility spectrometry-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 372, n. 1, p. 66–73, 2002.

COVAS, T. R. **Petroleômica por espectrometria de massas Orbitrap: um enfoque em geoquímica**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2019.

CROSNIER, C.; STAMATAKI, D.; LEWIS, J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. **Nature Reviews. Genetics**, v. 7, n. 5, p. 349–359, 2006.

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

DA SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Monolithic capillary columns based on silica and zirconium oxides for use in hydrophilic interaction liquid chromatography. **Microchemical Journal**, v. 116, p. 249–254, 2014.

DE BENEDETTI, F. et al. Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 4, p. 643–650, 1997.

DENNO, D. M. et al. Use of the lactulose to mannitol ratio to evaluate childhood environmental enteric dysfunction: a systematic review. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 59 Suppl 4, p. S213–219, 2014.

EUROPEAN COMMISSION. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.** EUROPEAN COMMISSION, 2017. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf>.

EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, K. **Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications.** [s.l.] John Wiley & Sons, 2008.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 3, p. 210–230, 2009.

ELIUK, S.; MAKAROV, A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. **Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto, Calif.)**, v. 8, p. 61–80, 2015.

EXAMINE.COM. **Fructose vs Glucose vs HFCS.** Disponível em: <<https://examine.com/nutrition/fructose-vs-glucose-vs-hfcs/>>. Acesso em: 9 maio. 2021.

FANZO, J. et al. 2018 Global Nutrition Report: Shining a light to spur action on nutrition. In: [s.l.] Bristol, UK: Development Initiatives, 2018.

FARRÉ, M.; PICÓ, Y.; BARCELÓ, D. Application of ultra-high pressure liquid chromatography linear ion-trap orbitrap to qualitative and quantitative assessment of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1328, p. 66–79, 2014.

FERGUSON, R. E.; MCCULLOH, K. E.; ROSENSTOCK, H. M. Observation of the Products of Ionic Collision Processes and Ion Decomposition in a Linear, Pulsed Time-of-Flight Mass Spectrometer. **The Journal of Chemical Physics**, v. 42, n. 1, p. 100–106, 1965.

FURUSE, M. et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. **The Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 6 Pt 2, p. 1777–1788, 1993.

GAN, J. et al. One step extraction followed by HPLC-ESI-MS/MS for multi-residue analysis of diacylhydrazine insecticides in water, sediment, and aquatic products. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 210, p. 111853, 2021.

GARCIA-REYES, J. F. et al. HRMS: Hardware and Software. In: **Applications in High Resolution Mass Spectrometry: Food Safety and Pesticide Residue Analysis.** 1. ed. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 15–57.

GARRIDO-FRENICH, A. et al. Potentiality of gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry in vanguard and rearguard methods of pesticide residues in vegetables. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 14, p. 4640–4648, 2005.

GENTON, L.; CANI, P. D.; SCHRENZEL, J. Alterations of gut barrier and gut microbiota in food restriction, food deprivation and protein-energy wasting. **Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 34, n. 3, p. 341–349, 2015.

GERVASONI, J. et al. Validation of an LC-MS/MS Method for Urinary Lactulose and Mannitol Quantification: Results in Patients with Irritable Bowel Syndrome. **Disease Markers**, v. 2016, 2016.

GERVASONI, J. et al. Validation of UPLC-MS/MS Method for Determination of Urinary Lactulose/Mannitol. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 10, 2018.

GONZÁLEZ-MARISCAL, L. et al. Tight junction proteins. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 81, n. 1, p. 1–44, 2003.

GOTO, R. et al. Poor intestinal permeability in mildly stunted Nepali children: associations with weaning practices and Giardia lamblia infection. **The British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 2, p. 141–149, 2002.

GOTO, R.; MASCIE-TAYLOR, C. G. N.; LUNN, P. G. Impact of intestinal permeability, inflammation status and parasitic infections on infant growth faltering in rural Bangladesh. **The British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 10, p. 1509–1516, 2009.

GRANTHAM-MCGREGOR, S. et al. Developmental potential in the first 5 years for children in developing countries. **The Lancet**, v. 369, n. 9555, p. 60–70, 2007.

GUERRANT, R. L. et al. The impoverished gut—a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 10, n. 4, p. 220–229, 2013.

HARPER, K. M. et al. Environmental enteric dysfunction pathways and child stunting: A systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006205, 2018.

HARVEY, D. J. Electrospray mass spectrometry and collision-induced fragmentation of 2-aminobenzamide-labelled neutral N-linked glycans. **Analyst**, v. 125, n. 4, p. 609–617, 2000.

HERRERA-LOPEZ, S. et al. Simultaneous screening of targeted and non-targeted contaminants using an LC-QTOF-MS system and automated MS/MS library searching. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, n. 9, p. 878–893, 2014.

HILL, A. R.; REYNOLDS, S. L. Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. **The Analyst**, v. 124, n. 6, p. 953–958, 1999.

HO, C. et al. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 24, n. 1, p. 3–12, 2003.

HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.

IGLESIAS, A. H. Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas. v. 53, n. 9, p. 1–13, 2013.

INMETRO. **ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf>.

KARCZEWSKI, J. et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 298, n. 6, p. G851-859, 2010.

KEITA, Å. V.; SÖDERHOLM, J. D. Mucosal permeability and mast cells as targets for functional gastrointestinal disorders. **Current Opinion in Pharmacology, • Endocrine & Metabolic Diseases • Gastrointestinal**. v. 43, p. 66–71, 2018.

KEUSCH, G. T. et al. Implications of acquired environmental enteric dysfunction for growth and stunting in infants and children living in low- and middle-income countries. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 34, n. 3, p. 357–364, 2013.

KIND, T. et al. Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 37, n. 4, p. 513–532, 2018.

KIND, T.; FIEHN, O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. **Bioanalytical Reviews**, v. 2, n. 1, p. 23–60, 2010.

KOSEK, M. et al. Assessment of Environmental Enteropathy in the MAL-ED Cohort Study: Theoretical and Analytic Framework. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 59, n. Suppl 4, p. S239–S247, 2014.

KOSEK, M. N. et al. Causal Pathways from Enteropathogens to Environmental Enteropathy: Findings from the MAL-ED Birth Cohort Study. **EBioMedicine**, v. 18, p. 109–117, 2017.

KUBICA, P. et al. Modern approach for determination of lactulose, mannitol and sucrose in human urine using HPLC-MS/MS for the studies of intestinal and upper digestive tract permeability. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 907, p. 34–40, 2012.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna**. [s.l.] ATOMO, 2009.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2013.

LEE, C. S.; RYAN, E. J.; DOHERTY, G. A. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: The role of inflammation. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 14, p. 3751–3761, 14 abr. 2014.

LEE, G. O. et al. Lactulose: mannitol diagnostic test by HPLC and LC-MSMS platforms: considerations for field studies of intestinal barrier function and environmental enteropathy. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 59, n. 4, p. 544–550, 2014.

LEE, G. O. et al. Infant Nutritional Status, Feeding Practices, Enteropathogen Exposure, Socioeconomic Status, and Illness Are Associated with Gut Barrier Function As Assessed by the Lactulose Mannitol Test in the MAL-ED Birth Cohort. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 1, p. 281–290, 2017.

LIMA, A. A. et al. Mucosal injury and disruption of intestinal barrier function in HIV-infected individuals with and without diarrhea and cryptosporidiosis in northeast Brazil. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 92, n. 10, p. 1861–1866, 1997.

LIMA, A. A. et al. Determinant Variables, Enteric Pathogen Burden, Gut Function, and Immune-Related Inflammatory Biomarkers Associated with Childhood Malnutrition: A Prospective Case-Control Study in Northeastern Brazil. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 36, n. 12, p. 1177–1185, 2017.

LIMA, A. A. M. **Glutamina e alanil-glutamina: síntese química, efeito no transporte de água, eletrólitos e permeabilidade intestinal**. Fortaleza - CE: Federal do Ceará, 1998.

LINDENBAUM, J.; GERSON, C. D.; KENT, T. H. Recovery of small-intestinal structure and function after residence in the tropics. I. Studies in Peace Corps volunteers. **Annals of Internal Medicine**, v. 74, n. 2, p. 218–222, 1971.

LIU, D. Q.; SUN, M. Formation of the Ions of Methylindoles in APCI Mass Spectrometry. **ISRN Spectroscopy**, v. 2012, p. e973649, 2012.

LIU, X. et al. Deconvolution and database search of complex tandem mass spectra of intact proteins: a combinatorial approach. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 9, n. 12, p. 2772–2782, 2010.

LIU, Y. et al. Simultaneous detection and comparative pharmacokinetics of amoxicillin, clavulanic acid and prednisolone in cows' milk by UPLC-MS/MS. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1008, p. 74–80, 2016.

LOSTIA, A. M. et al. A liquid chromatography/mass spectrometry method for the evaluation of intestinal permeability. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 10–11, p. 887–892, 2008.

LYNN, K.-S. et al. Metabolite Identification for Mass Spectrometry-Based Metabolomics Using Multiple Types of Correlated Ion Information. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 4, p. 2143–2151, 2015.

MAES, M.; KUBERA, M.; LEUNIS, J.-C. The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. **Neuro Endocrinology Letters**, v. 29, n. 1, p. 117–124, 2008.

MAL-ED NETWORK INVESTIGATORS. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 59 Suppl 4, p. S193–206, 2014.

MARTINS, A. P. B. et al. Participacao crescente de produtos ultraprocessados na dieta brasileira (1987-2009). **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 4, p. 656–665, ago. 2013.

MASIÁ, A.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography–mass spectrometry. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 2, p. 11–24, 1 maio 2014.

MASSART, D. L.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B. An introduction to method validation. v. 22, n. 5, p. M15–M15, 1994.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019–3030, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **INSTRUÇÃO NORMATIVA CONJUNTA Nº 1, DE 16 DE JUNHO DE 2014** Brasília, 2014. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/INC01_16_01_2014_atualizada_ato_69_01_10_19.pdf>. Acesso em: 12 maio. 2021

MORAIS, M. B. DE; SILVA, G. A. P. DA. Environmental enteric dysfunction and growth. **Jornal De Pediatria**, v. 95 Suppl 1, p. 85–94, 2019.

NACHTIGALL, F. M. **Uso de tecnicas de espectrometria de massas com ionização a pressão atmosferica no estudo de propriedades intrinsecas de liquidos iônicos imidazolios**. [s.l.] Universidade de Campinas, 2009.

NASCIMENTO, M. C. B. DO. **Investigação fitoquímica e atividade biológica das cascas de Luehea speciosa willd**. Belém: Universidade Federal do Pará, 21 dez. 2017.

NÚÑEZ, O.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. LC–MS/MS analysis of organic toxics in food. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, LC-Tandem MS. v. 24, n. 7, p. 683–703, 2005.

ODENWALD, M. A.; TURNER, J. R. Intestinal permeability defects: is it time to treat? **Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association**, v. 11, n. 9, p. 1075–1083, 2013.

ODENWALD, M. A.; TURNER, J. R. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 1, p. 9–21, 2017.

OSS, M. et al. Electrospray Ionization Efficiency Scale of Organic Compounds. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 7, p. 2865–2872, 1 abr. 2010.

OWINO, V. et al. Environmental Enteric Dysfunction and Growth Failure/Stunting in Global Child Health. **Pediatrics**, v. 138, n. 6, 2016.

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validation of chromatographic methods for the determination of residues of veterinary drugs in foods. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190–1198, 2008.

PAZ, W. H. P. **Aplicações de espectrometria de massas e estudo biológico do extrato dos frutos da remela-de-cachorro (Clavija lancifolia – Theophrastaceae)**. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2017.

PERSIDSKY, Y. et al. Rho-mediated regulation of tight junctions during monocyte migration across the blood-brain barrier in HIV-1 encephalitis (HIVE). **Blood**, v. 107, n. 12, p. 4770–4780, 2006.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 141–153, 2014.

PETROSINO, T.; SERAFINI, M. Matrix effect in F₂-isoprostanes quantification by HPLC-MS/MS: a validated method for analysis of iPF₂α-III and iPF₂α-VI in human urine. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 965, p. 100–106, 2014.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009.

RAPOSO, F.; IBELLI-BIANCO, C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 129, p. 115913, 2020.

RASHED, M. S. et al. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. **Pediatric Research**, v. 38, n. 3, p. 324–331, 1995.

RATH, S.; MARTÍNEZ-MEJIA, M. J.; SCHRÖDER, C. H. K. CONSIDERAÇÕES E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS DO GUIA DE VALIDAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICA DE FÁRMACOS EM PRODUTOS PARA ALIMENTAÇÃO ANIMAL E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 697–708, jun. 2015.

REBELO, A. M. **Desenvolvimento e validação de método analítico, via LC-ESI-MS/MS, para determinação de agrotóxicos em arroz irrigado (Oryza sativa, L.)**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2014.

RIBANI, M. et al. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RODRIGUES, F. A. DE P. et al. Fisiologia da Barreira Epitelial Intestinal. In: ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. DE C. (Eds.). **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. 1. ed. [s.l.] Editora Blucher, 2016. p. 441–478.

RODRÍGUEZ, A. et al. Effect of lipids and zeolite incorporation on total apparent digestibility of diets with sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) foliage in pigs. v. 37, p. 421–424, 2003.

ROGAWSKI, E. T.; GUERRANT, R. L. The burden of enteropathy and “subclinical” infections. **Pediatric clinics of North America**, v. 64, n. 4, p. 815–836, 2017.

SAKAKIBARA, R. Gastrointestinal dysfunction in neuroinflammatory diseases: Multiple sclerosis, neuromyelitis optica, acute autonomic ganglionopathy and related conditions. **Autonomic Neuroscience**, v. 232, p. 102795, 2021.

SCHLICHTERLE-CERNY, H.; AFFOLTER, M.; CERNY, C. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry of small polar compounds in food analysis. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 10, p. 2349–2354, 2003.

SCHNEEBERGER, E. E.; LYNCH, R. D. The tight junction: a multifunctional complex. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 286, n. 6, p. C1213-1228, 2004.

SETCHELL, K. D. et al. Su1591 IDENTIFICATION OF A BILE ACID BIOMARKER IN MALNOURISHED CHILDREN WITH ENVIRONMENTAL ENTEROPATHY IN PAKISTAN. **Gastroenterology**, v. 158, n. 6, p. S, 2020.

SILVA, R. et al. Efficiency of ESI and APCI ionization sources in LC-MS/MS systems for analysis of 22 pesticide residues in food matrix. **Food Chemistry**, v. 297, p. 124934, 2019.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2005.

SISMOTTO, M.; PASCHOAL, J. A. R.; REYES, F. G. R. Aspectos analíticos e regulatórios na determinação de resíduos de macrolídeos em alimentos de origem animal por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 449–461, 2013.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2011.

STEVENS, R. D. et al. Assay for free and total carnitine in human plasma using tandem mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 727–729, 2000.

STREGE, M. A. High-performance liquid chromatographic–electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 725, n. 1, p. 67–78, 1999.

SUN, X.-D. et al. Exploration advantages of data combination and partition: First chemometric analysis of liquid chromatography–mass spectrometry data in full scan mode with quadruple fragmentor voltages. **Analytica Chimica Acta**, v. 1110, p. 158–168, 2020.

SUZUKI, H. et al. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. **Science (New York, N.Y.)**, v. 344, n. 6181, p. 304–307, 2014.

SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 70, n. 4, p. 631–659, 2013.

SUZUKI, T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. **Animal Science Journal**, v. 91, n. 1, p. e13357, 2020.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. v. 2, 1998.

TAMURA, A. et al. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. **Gastroenterology**, v. 140, n. 3, p. 913–923, 2011.

TANIUCHI, M. et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. and its evaluation on colonies, culture broths, and stool. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 2, p. 121–128, 2012.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 328–334, 2005.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

THOREN, K. L. et al. Comparison of Information-Dependent Acquisition on a Tandem Quadrupole TOF vs a Triple Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometer for Broad-Spectrum Drug Screening. **Clinical Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 170–178, 2016.

TOKUMASU, R.; TAMURA, A.; TSUKITA, S. Time- and dose-dependent claudin contribution to biological functions: Lessons from claudin-1 in skin. **Tissue Barriers**, v. 5, n. 3, p. e1336194, 2017.

TRAVIS, S.; MENZIES, I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 82, n. 5, p. 471–488, 1992.

TROEGER, C. et al. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1211–1228, 2018.

TRUFELLI, H. et al. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, n. 3, p. 491–509, 2011.

TSUKITA, S. et al. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. **Oncogene**, v. 27, n. 55, p. 6930–6938, 2008.

TSUKITA, S.; FURUSE, M.; ITOH, M. Multifunctional strands in tight junctions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 4, p. 285–293, 2001.

TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews. Immunology**, v. 9, n. 11, p. 799–809, nov. 2009.

VAN DER VOET, H.; (HANS) VAN RHIJN, J. A.; VAN DE WIEL, H. J. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 2, p. 159–171, 1999.

VAN WIJCK, K. et al. Novel analytical approach to a multi-sugar whole gut permeability assay. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 26, p. 2794–2801, 2011.

VIEIRA, M. M. et al. Carotenoids, retinol, and intestinal barrier function in children from northeastern Brazil. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 47, n. 5, p. 652–659, 2008.

VILELA, E. G. et al. Gut permeability to lactulose and mannitol differs in treated Crohn's disease and celiac disease patients and healthy subjects. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 12, p. 1105–1109, 2008.

VOGESER, M.; STONE, J. A. A suggested standard for validation of LC-MS/MS based analytical series in diagnostic laboratories. **Clinical Mass Spectrometry**, v. 16, p. 25–32, 2020.

VOJDANI, A. For the assessment of intestinal permeability, size matters. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 19, n. 1, p. 12–24, 2013.

WADA, M. et al. Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na⁺ flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. **Gastroenterology**, v. 144, n. 2, p. 369–380, 2013.

WALKER, S. P. et al. Early childhood stunting is associated with poor psychological functioning in late adolescence and effects are reduced by psychosocial stimulation. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. 2464–2469, 2007.

WANG, H. et al. The liver injury and gastrointestinal symptoms in patients with Coronavirus Disease 19: A systematic review and meta-analysis. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 44, n. 5, p. 653–661, 2020.

WATANABE, K.; PETRI, W. A. Environmental Enteropathy: Elusive but Significant Subclinical Abnormalities in Developing Countries. **EBioMedicine**, v. 10, p. 25–32, 2016.

WEBB, K. et al. Methodology for accurate mass measurement of small molecules. In: **Methodology for accurate mass measurement of small molecules**. 01. [s.l.] Best Practice Guide, 2004. v. 01.

WEISZ, A. J. et al. Abnormal gut integrity is associated with reduced linear growth in rural Malawian children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 55, n. 6, p. 747–750, 2012.

WELCKER, K. et al. Increased intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease. **European Journal of Medical Research**, v. 9, n. 10, p. 456–460, 2004.

WEST et al. **Fundamentos de química analítica**. [s.l.] Pioneira Thomson Learning, 2006.

WWW.CHEMSRC.COM.Disponível em: <<https://www.chemsrc.com/>>. Acesso em: 9 maio. 2021.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Negative ion production with the electrospray ion source. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 20, p. 4671–4675, 1984.

ZHANG, H. et al. Specific ACE2 expression in small intestinal enterocytes may cause gastrointestinal symptoms and injury after 2019-nCoV infection. **International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 96, p. 19–24, 2020.

ZHOU, Q.; ZHANG, B.; VERNE, G. N. Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. **Pain**, v. 146, n. 1–2, p. 41–46, 2009.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 139/09

Foaleza, 05 de junho de 2009

Prezado Doutor,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE de acordo com as Resoluções 196/96 e complementares, aprovou na reunião do dia 04 de junho de 2009, a realização do sub-projeto 2 protocolo COMEPE 238/05 "Intervenção com micronutrientes: impacto a longo prazo no Brasil", no Instituto Educacional O Canarinho.

Atenciosamente,

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

Ao Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Investigador

ANEXO B – TCLE

Intervenção com Micronutrientes e Impacto a Longo Prazo no Brasil
(Escola Ganharho: Objetivos a)

Nome do Participante _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ECLARECIDO

Estamos convidando sua criança para participar de uma pesquisa de genética para infecções gastrointestinais e impedimento de crescimento e desenvolvimento. Este estudo é um parceria entre a Universidade Federal do Ceará e a Universidade da Virgínia, nos Estados Unidos. Amostras de fezes, dados antropométricos e dados sócio-culturais serão coletados e examinados,aremos testes de DNA nas amostras coletadas para ver as características hereditárias que podem provavelmente produzir infecções gastrointestinais ou impedimento do crescimento e desenvolvimento.

O objetivo deste estudo é aprender sobre a tendência para infecções gastrointestinais e seus efeitos no desenvolvimento. O objetivo do teste genético é identificar os fatores que contribuem para o desenvolvimento de certas doenças.

Para participar deste estudo você deve concordar com os termos aqui expostos.

O que estamos tentando descobrir:

Sua criança foi selecionada porque estuda em uma escola pública de Fortaleza está na faixa etária entre 2 e 36 meses, além de não apresentar sintoma de diarreia nos últimos 15 dias antes da coleta das amostras.

Nossa grupo de pesquisa tem estudado o impacto das doenças diarreicas em crianças de comunidades carentes de Fortaleza. Os estudos realizados permitiram a associação entre as diarreias persistentes e algumas infecções entéricas específicas com a ruptura da barreira intestinal, provocando alterações na sua função absorptiva e predispondo crianças a uma maior carga de diarreias. Observamos que a ocorrência de doenças diarreicas nos dois primeiros anos de vida e a presença de determinados patógenos entéricos, podem influenciar o crescimento linear da criança. Episódios de diarreia persistente nos dois primeiros anos de vida mostraram ter associação com um déficit de crescimento de 1,5 a 4n aos 4 a 6 anos de idade nessas crianças. Além disso, a idade de início da criança na escola e a idade de início escolar se significativamente atrasadas pelas doenças diarreicas ocorridas no início da infância.

Na busca por alternativas para a diminuição do impacto causado pelas doenças diarreicas causadas por vírus, bactérias ou parasitas observamos a grande eficiência da solução de re-hidratação oral baseada em glutamina quando comparada à tradicional solução à base de glicose. Além disso, temos estudado a influência da suplementação de micronutrientes, como zinco, vitamina A e cálcio na dieta de crianças susceptíveis às doenças diarreicas, observando a redução no número de crianças doentes.

Estes estudos têm sido realizados em duas comunidades carentes de Fortaleza: Pq. Universitário e Gonçalves Dias, ambas situadas em Fortaleza e próximas à Faculdade de Medicina. Acompanhando os quadros diarreicos dessas duas comunidades ao longo dos últimos 2 anos, observamos que mesmo nas crianças que não apresentam diarreia como sintoma, ainda existe uma alta prevalência de inflamação intestinal e de enteropatógenos que podem oportunamente causar as doenças diarreicas sendo as defesas imunológicas são reduzidas. Isso vem acontecendo principalmente em virtude de condições higiênicas-sanitárias insatisfatórias e de ocorrência de uma dieta nutricional balanceada.

Para que possamos realmente avaliar o impacto lesão da presença destes agentes infecciosos, principalmente quando não há diarreia, se faz necessária a avaliação destes agentes e crianças que não residem nessas comunidades e que não sofrem com a falta de saneamento básico e a alimentação correta. Os resultados deste estudo para os participantes serão mencionados em termos e conhecimento do risco para as doenças diarreicas. A sociedade em geral se beneficia de qualquer redução nestas doenças da pobreza.

O que acontecerá:**Existem duas partes para este estudo:**

1. Um profissional de saúde (enfermeira ou agente de saúde) visitará escola e coletará uma amostra de fezes de sua criança.
2. Um questionário será aplicado para coletar informações sócio-ambientais.
3. Medidas antropométricas serão também verificadas e registradas em um formulário.
4. As amostras serão encaminhadas para o Laboratório de Doenças Fecciosas da UF para a realização dos testes. Os resultados de fezes e serão guardadas 2 amostras para identificar microrganismos.
5. Suas amostras ficarão armazenadas por 5 anos após o final do estudo.

Benefícios

As amostras fecais coletadas serão avaliadas através de métodos convencionais e técnicas de biologia molecular, quando aplicáveis, para a detecção de patógenos entéricos. A detecção de helmintos e protozoários, através do exame parasitológico de fezes, ou o crescimento de bactérias reconhecidas patogenicamente intestinal, através de cultura, será informada aos responsáveis e uma indicação de tratamento será instituída pelo médico pediatra responsável pelo estudo.

Versão: 06.042009

(Versão: 001)

Página 1 de 2

Dr. Ivan Pereira Monteiro
Coordenador Adjunto do Curso
de Pós-graduação em Pesquisa
COMEP/UFCE



Riscos:

Não existem riscos físicos, sociais ou psicológicos neste estudo.

Confidencialidade:

A confidencialidade e a privacidade dos dados de sua criança serão resguardadas, segundo normas éticas brasileiras.

Responsabilidade em Caso de Lesões:

Se seu filho apresenta qualquer dano como resultado direto do estudo, você deverá entrar em contato com o Dr. Aldo Lima no fone 3366 8437 para receber a terapia necessária. Qualquer dano resultante de sua participação será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e assistência integral se você passa a ter direito ao assinar este formulário de consentimento e entrar nesses estudos pois todo dano mediante o estudo é de inteira responsabilidade do pesquisador.

Para quem ligar:

Se você tem: (1) alguma questão sobre o estudo, por favor ligue para Dr. Aldo A. Lima, Unidade de Pesquisa Clínica, UFC (Tel. 3366 8445); (2) alguma questão sobre seus direitos como participante de um estudo, por favor ligue para Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (CMEPE), Tel.: 336 8437, ou peça a alguém do estudo para ajudá-lo a contatar com as pessoas certas.

LIBERTADE DE RESISIR:

A participação de sua criança neste estudo é completamente voluntária. Você é livre para retirá-la do estudo a qualquer momento sem prejuízos. Apenas avise a um dos membros da equipe.

Número total de participantes e duração da participação:

O número total de participantes previstos para este estudo está estimado em 83 crianças.

Nome do Sujeito
(Se < 18 anos)

Pai ou Guardião Legal
(NOME LETAL POR SI)

Pai ou Guardião Legal
(ASSINATURA)

dd/ mm/ ano

Assinatura da Terceira Parte

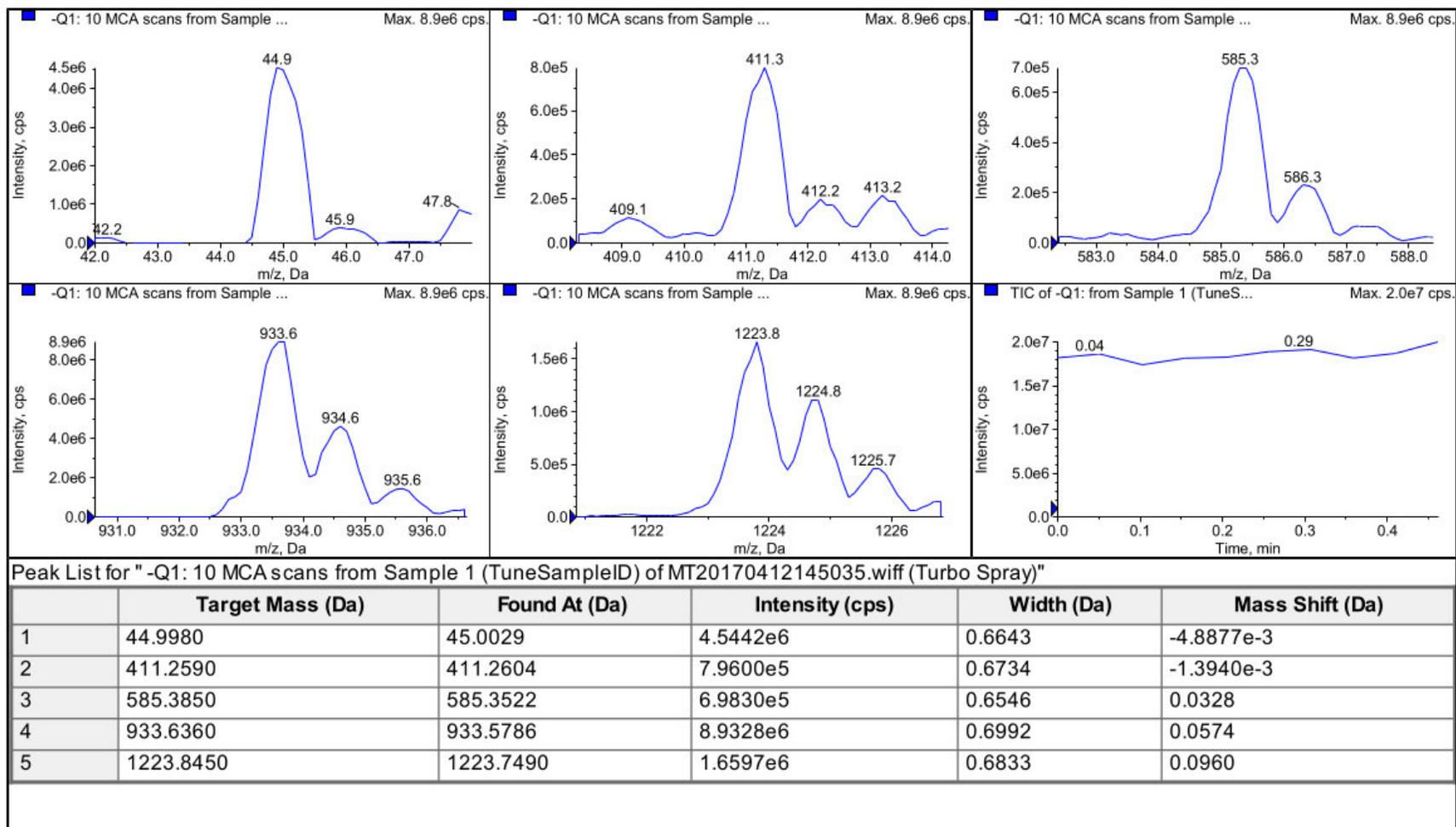
dd/ mm/ ano

Assinatura do Membro da Pesquisa

dd/ mm/ ano

ANEXO C – CALIBRAÇÃO PPG

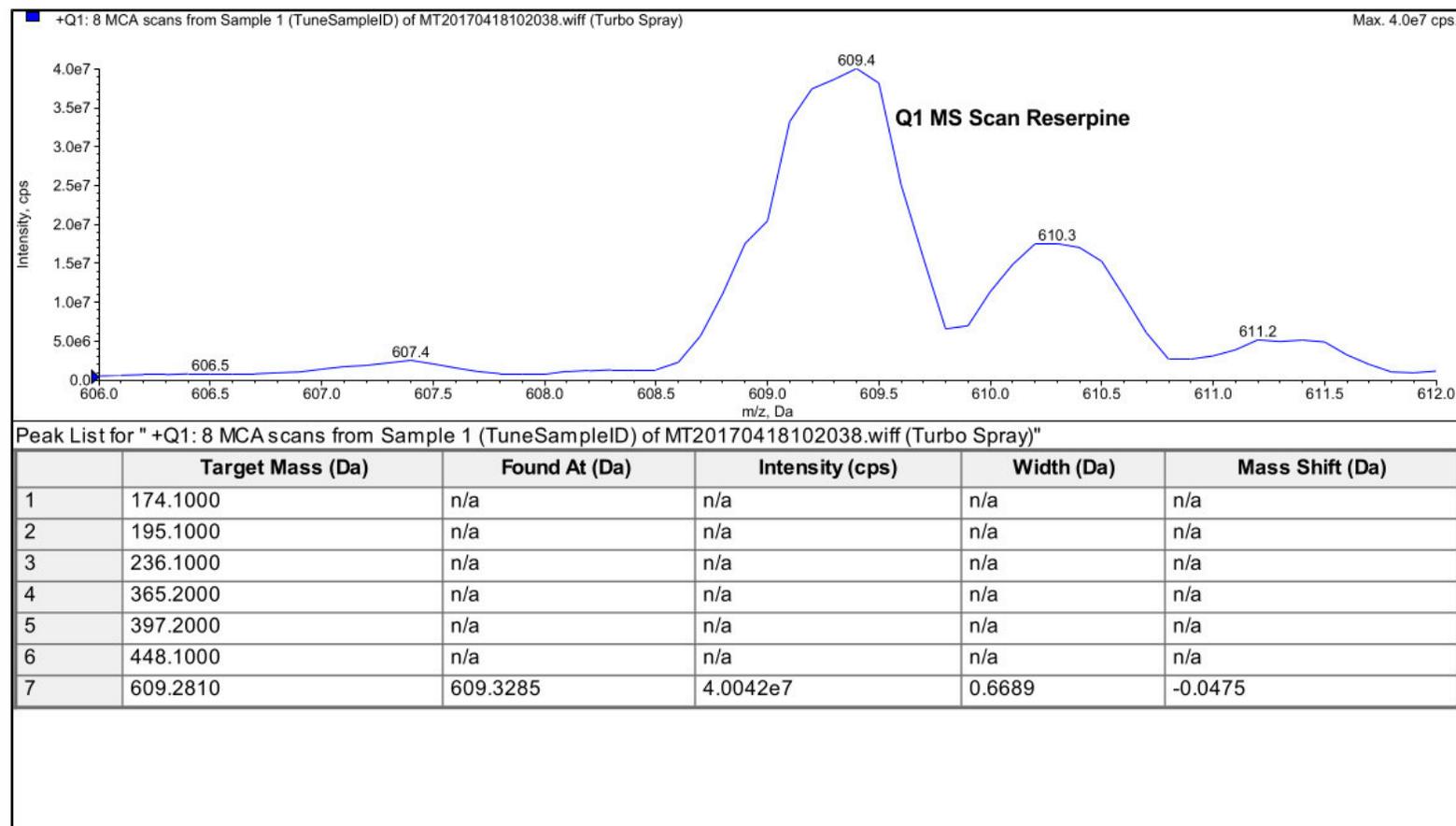
Printing Time: 2:51:43 PM
 Printing Date: Wednesday, April 12, 2017



Collected by: UFC-PC\UFC
 Electronic Signature: no
 Operator: UFC

ANEXO D – CALIBRAÇÃO RESERPINA

Printing Time: 10:32:24 AM
 Printing Date: Tuesday, April 18, 2017



Collected by: UFC-PC\UFC
 Electronic Signature: no
 Operator: UFC

ANEXO E – MRM LACTULOSE

Friday, December 15, 2017, 09:54

Infusion Compound Optimization

MS/MS Analysis, negative

Precursor ion: MW Ion Search Window: ± 0.500 (Da)
 Product ion: Auto Select, Criteria:
 From the most intense: 5 peaks. Build final method using 5 most intense peaks.
 Exclude Product Ions within ± 18.000 (Da) of Precursor Ion m/z.
 Min. mass for product ion: 50.000 (Da). Threshold for product ion > 0.0 (cps)

Quad 1 Resolution: Unit resolution, Quad 3 Resolution: Unit resolution

Target Compound	MW (neutral, Da)	No. Charges
FKA_Lactulose	342.300	1

Initial Q1 Scan	Mass (Da)	Intensity (cps) (5 MCA Average)
Target Compound		
FKA_Lactulose	341.016	945539

Parameter: DP	Start: -300.0	Stop: -1.0	Step: 5.0
---------------	---------------	------------	-----------

Masses (Da)	Current Value	New Value	Intensity (cps)
341.016	-90.0	-135.0	1129651

Final Q1 Scan	Mass (Da)	Intensity (cps) (5 MCA Average)
Target Compound		
FKA_Lactulose	341.013	1101024

Final Q1MI Method: FKA_Lactulose_QOpt_FinalQ1MI_Neg.dam

Target Compound: FKA_Lactulose

Initial Product Mass	Initial Product Ion Intensity (cps) (26 MCA Sum)
160.952	499000
184.939	420000
58.947	324000
100.899	301000
73.008	281000

Parameter: CE	Start: -130.0	Stop: -5.0	Step: 2.0
---------------	---------------	------------	-----------

Masses (Da)	Current Value	New Value	Intensity (cps)
341.013/58.947	-40.0	-48.0	36057
341.013/73.008	-40.0	-36.0	42190
341.013/100.899	-40.0	-22.0	76912
341.013/160.952	-40.0	-12.0	242368
341.013/184.939	-40.0	-48.0	83160

Parameter: CXP	Start: -55.0	Stop: -0.0	Step: 2.0
----------------	--------------	------------	-----------

Masses (Da)	Current Value	New Value	Intensity (cps)
-------------	---------------	-----------	-----------------

ANEXO F - MRM MANITOL

Thursday, December 21, 2017, 09:35

Infusion Compound Optimization

MS/MS Analysis, negative

Precursor ion: MW Ion Search Window: ± 0.500 (Da)
 Product ion: Auto Select, Criteria:
 From the most intense: 5 peaks. Build final method using 5 most intense peaks.
 Exclude Product Ions within ± 18.000 (Da) of Precursor Ion m/z.
 Min. mass for product ion: 50.000 (Da), Threshold for product ion > 0.0 (cps)

Quad 1 Resolution: Unit resolution, Quad 3 Resolution: Unit resolution

Target Compound	MW(neutral, Da)	No. Charges
HF_Manitol_180.9	182.170	1

Initial Q1 Scan	Mass (Da)	Intensity(cps) (5 MCA Average)
Target Compound		
HF_Manitol_180.9	180.944	795810

Parameter: DP	Start: -300.0	Stop: -1.0	Step: 5.0
---------------	---------------	------------	-----------

Masses(Da)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
180.944	-90.0	-60.0	836807

Final Q1 Scan	Mass (Da)	Intensity(cps) (5 MCA Average)
Target Compound		
HF_Manitol_180.9	180.932	877561

Final Q1MI Method: HF_Manitol_180.9_QOpt_FinalQ1MI_Neg.dam

Target Compound: HF_Manitol_180.9

Initial Product Mass	Initial Product Ion Intensity(cps) (26 MCA Sum)
112.798	230000
136.813	193000
58.994	124000
71.009	122000
89.033	109000

Parameter: CE	Start: -130.0	Stop: -5.0	Step: 2.0
---------------	---------------	------------	-----------

Masses(Da)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
180.932/58.994	-40.0	-26.0	26142
180.932/71.009	-40.0	-26.0	24239
180.932/89.033	-40.0	-18.0	38417
180.932/112.798	-40.0	-10.0	98857
180.932/136.813	-40.0	-16.0	55819

Parameter: CNP	Start: -88.0	Stop: -0.0	Step: 2.0
----------------	--------------	------------	-----------

Masses(Da)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
------------	---------------	-----------	----------------

ANEXO G – MRM SORBITOL

Friday, December 08, 2017, 10:34

Infusion Compound Optimization

MS/MS Analysis, negative

Precursor ion: MW Ion Search Window: ± 0.500 (Da)
 Product ion: Auto Select, Criteria:
 From the most intense: 5 peaks. Build final method using 3 most intense peaks.
 Exclude Product Ions within ± 18.000 (Da) of Precursor Ion m/z.
 Min. mass for product ion: 50.000 (Da). Threshold for product ion > 0.0 (cps)

Quad 1 Resolution: Unit resolution, Quad 3 Resolution: Unit resolution

Target Compound	MW (neutral, Da)	No. Charges
Sigma_Sorbitol	182.200	1

Initial Q1 Scan	Mass (Da)	Intensity (cps) (5 MCA Average)
Target Compound		
Sigma_Sorbitol	180.940	823138

Parameter: DP	Start: -300.0	Stop: -1.0	Step: 5.0
---------------	---------------	------------	-----------

Masses (Da)	Current Value	New Value	Intensity (cps)
180.940	-90.0	-75.0	835251

Final Q1 Scan	Mass (Da)	Intensity (cps) (5 MCA Average)
Target Compound		
Sigma_Sorbitol	180.935	840616

Final Q1MI Method: Sigma_Sorbitol_QOpt_FinalQ1MI_Neg.dam

Target Compound: Sigma_Sorbitol

Initial Product Mass	Initial Product Ion Intensity (cps) (26 MCA Sum)
112.912	225000
58.924	150000
136.927	143000
70.973	131000
92.879	107000

Parameter: CE	Start: -130.0	Stop: -5.0	Step: 2.0
---------------	---------------	------------	-----------

Masses (Da)	Current Value	New Value	Intensity (cps)
180.935/58.924	-40.0	-26.0	31997
180.935/70.973	-40.0	-26.0	28572
180.935/92.879	-40.0	-24.0	24560
180.935/112.912	-40.0	-10.0	101710
180.935/136.927	-40.0	-16.0	49818

Parameter: CXP	Start: -55.0	Stop: -0.0	Step: 2.0
----------------	--------------	------------	-----------

Masses (Da)	Current Value	New Value	Intensity (cps)
-------------	---------------	-----------	-----------------