

# Exploring the potential of a MEPS/UHPLC-based methodology on the analysis of lipid peroxidation biomarkers related to asthma

Irene C. Camacho<sup>1,\*</sup>, Pedro H. Berenguer<sup>2</sup>, José S. Câmara<sup>1,3</sup>, Rita Câmara<sup>4</sup>, Susana Oliveira<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências da Vida, Universidade da Madeira, Campus Universitário da Penteada, 9020-105, Funchal, Portugal, \*camire@uma.pt

<sup>2</sup> CQM – Centro de Química da Madeira, Universidade da Madeira, Campus Universitário da Penteada, 9020-105, Funchal, Portugal

<sup>3</sup> Departamento de Química, Faculdade de Ciências Exactas e da Engenharia, Universidade da Madeira, Campus Universitário da Penteada, 9020-105, Funchal, Portugal

<sup>4</sup> Unidade de Imunoalergologia, Hospital Dr. Nélio Mendonça, SESARAM, E.P.E., 9004-514 Funchal, Portugal

\* camire@uma.pt

Asthma is a heterogeneous disease characterized by chronic inflammation and long term irreversible remodeling of the airways. The enzymatic peroxidation of the arachidonic acid is part of the pathophysiology of this disease and leads to the formation of powerful inflammatory mediators, characteristic of asthma.

The present work aimed to develop an easy-to-use ultra-high pressure liquid chromatography (UHPLC)-based strategy in order to characterize lipid peroxidation biomarkers: leukotrienes E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>) and B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) and 11β-prostaglandin F<sub>2α</sub> (11βPGF<sub>2α</sub>), eicosanoids present in the urine of asthmatic patients and healthy individuals (control group). A semi-automatic eVol<sup>®</sup>-microextraction by packed sorbent (MEPS) format was developed in order to isolate the target analytes. The method was fully validated under optimal extraction (R-AX sorbent, 3 conditioning-equilibration cycles with 250 μL of ACN-H<sub>2</sub>O at 0.1% FA, 10 extract-discard cycles of 250 μL of sample at a pH of 5.1, elution with 2 times 50 μL of MeOH and concentration of the eluate until half of its volume) and chromatographic conditions (14-min analysis at a flow rate of 300 μL min<sup>-1</sup> in an UHPLC-PDA equipped with a BEH C18 column). Our results indicated good recoveries (>95%) in addition to excellent extraction efficiency (>95%) at three concentration levels (low, mid and high) with precision (RSDs) less than 11%. The lack-of-fit, goodness-of-fit and Mandel's fitting tests, revealed good linearity within the concentration range. Good selectivity and sensitivity were achieved with limits of detection ranging from 0.04 ng mL<sup>-1</sup> for LTB<sub>4</sub> to 1.12 ng mL<sup>-1</sup> for 11βPGF<sub>2α</sub>, and limits of quantification from 0.10 ng mL<sup>-1</sup> for the LTB<sub>4</sub> to 2.11 ng mL<sup>-1</sup> for 11βPGF<sub>2α</sub>.

The developed method was successfully applied to the urine of asthmatic patients and healthy individuals. On average, the urine of asthmatic patients present significantly higher concentrations of 11βPGF<sub>2α</sub> (112.96 ng mL<sup>-1</sup> vs 62.56 ng mL<sup>-1</sup> in control group), LTE<sub>4</sub> (1.27 ng mL<sup>-1</sup> vs 0.89 ng mL<sup>-1</sup> in control group) and LTB<sub>4</sub> (1.39 ng mL<sup>-1</sup> vs 0.76 ng mL<sup>-1</sup> in control group). These results suggest the potential of the target eicosanoids and the developed method on asthma diagnosis and on the follow-up of the therapeutic response.

**Keywords:** Asthma; Biomarkers; Eicosanoids; MEPS; UHPLC.

**Acknowledgments:** This work was supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (CQM Project PEST-OE/UI0674/2019, Portuguese Government funds), and through Madeira 14–20 Program, project PROEQUIPRAM - Reforço do Investimento em Equipamentos e Infraestruturas Científicas na RAM (M1420-01-0145-FEDER-000008) and by ARDITI - Agência Regional para o Desenvolvimento da Investigação Tecnologia e Inovação, through the project M1420-01-0145-FEDER-000005 - Centro de Química da Madeira - CQM<sup>+</sup> (Madeira 14–20 Program).

# Explorando o potencial de uma metodologia baseada em MEPS / UHPLC na análise de biomarcadores de peroxidação lipídica relacionados à asma

Irene C. Camacho<sup>1,\*</sup>, Pedro H. Berenguer<sup>2</sup>, José S. Câmara<sup>1,3</sup>, Rita Câmara<sup>4</sup>, Susana Oliveira<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências da Vida, Universidade da Madeira, Campus Universitário da Penteada, 9020-105, Funchal, Portugal, \*camire@uma.pt

<sup>2</sup> CQM – Centro de Química da Madeira, Universidade da Madeira, Campus Universitário da Penteada, 9020-105, Funchal, Portugal

<sup>3</sup> Departamento de Química, Faculdade de Ciências Exactas e da Engenharia, Universidade da Madeira, Campus Universitário da Penteada, 9020-105, Funchal, Portugal

<sup>4</sup> Unidade de Imunoalergologia, Hospital Dr. Nélio Mendonça, SESARAM, E.P.E., 9004-514 Funchal, Portugal

\* camire@uma.pt

A asma é uma doença heterogénea caracterizada por inflamação crónica e remodelação irreversível das vias aéreas a longo prazo. A peroxidação enzimática do ácido araquidónico faz parte da fisiopatologia dessa doença e leva à formação de poderosos mediadores inflamatórios, característicos da asma.

O presente trabalho teve como objectivo desenvolver uma estratégia baseada em cromatografia líquida de ultra-alta pressão (UHPLC) fácil de usar de forma a caracterizar biomarcadores de peroxidação lipídica: leucotrienos E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>) e B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e 11β-prostaglandina F<sub>2α</sub> (11βPGF<sub>2α</sub>), eicosanóides presentes na urina de pacientes asmáticos e indivíduos saudáveis (grupo controlo). Um formato semi-automático eVol<sup>®</sup>-micoextracção por sorvente embalado (MEPS) foi desenvolvido de forma a isolar os analitos alvo. O método foi totalmente validado sob condições óptimas de extracção (sorvente R-AX, 3 ciclos de condicionamento-equilíbrio com 250 µL de ACN-H<sub>2</sub>O a 0,1% FA, com 10 ciclos de extracção-descarte de 250 µL de amostra a um pH de 5,1, eluição com 2 vezes 50 µL de MeOH e concentração do eluato até metade do seu volume) e cromatográficas (análise de 14 min a uma taxa de fluxo de 300 µL min<sup>-1</sup> num UHPLC-PDA equipado com uma coluna BEH C18). Os nossos resultados indicaram boas recuperações (>95%) além de uma excelente eficiência de extracção (>95%) a três níveis de concentração (baixa, média e alta) com precisões (RSDs) menores que 11%. Os testes *lack-of-fit*, *goodness-of-fit* e *Mandel's fitting* revelaram boa linearidade dentro do intervalo de concentração. Uma boa selectividade e sensibilidade foram alcançadas com limites de detecção variando entre 0,04 ng mL<sup>-1</sup> para o LTB<sub>4</sub> e 1,12 ng mL<sup>-1</sup> para o 11βPGF<sub>2α</sub> e limites de quantificação entre 0,10 ng mL<sup>-1</sup> para o LTB<sub>4</sub> e 2,11 ng mL<sup>-1</sup> para 11βPGF<sub>2α</sub>.

O método desenvolvido foi aplicado com sucesso na urina de pacientes asmáticos e indivíduos saudáveis. Em média, a urina de pacientes asmáticos apresentou concentrações significativamente maiores de 11βPGF<sub>2α</sub> (112,96 ng mL<sup>-1</sup> vs 62,56 ng mL<sup>-1</sup> no grupo controlo), LTE<sub>4</sub> (1,27 ng mL<sup>-1</sup> vs 0,89 ng mL<sup>-1</sup> no grupo controlo) e LTB<sub>4</sub> (1,39 ng mL<sup>-1</sup> vs 0,76 ng mL<sup>-1</sup> no grupo controlo). Estes resultados sugerem o potencial dos eicosanóides-alvo e do método desenvolvido no diagnóstico da asma e no acompanhamento da resposta terapêutica.

**Palavras-chave:** Asma; Biomarcadores; Eicosanóides; MEPS; UHPLC.

Reconhecimentos: Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Projecto CQM PEst-OE/QUI/UI0674/2019, fundos do Governo Português), e através do Programa Madeira 14-20, projecto PROEQUIPRAM - Reforço do Investimento em Equipamentos e Infraestruturas Científicas na RAM (M1420-01-0145-FEDER-000008) e pela ARDITI - Agência Regional para o Desenvolvimento da Investigação e Tecnologia, através do projecto M1420-01-0145-FEDER-000005 - Centro de Química da Madeira - CQM<sup>+</sup> (Programa Madeira 14-20).

Irene C. Camacho<sup>1\*</sup>, Pedro H. Berenguer<sup>2</sup>, José S. Câmara<sup>1,3</sup>, Rita Câmara<sup>4</sup>, Susana Oliveira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências da Vida, Universidade da Madeira, Campus Universitário da Penteada, 9020-105, Funchal, Portugal, \*camire@uma.pt

<sup>2</sup>CQM – Centro de Química da Madeira, Universidade da Madeira, Campus Universitário da Penteada, 9020-105, Funchal, Portugal

<sup>3</sup>Departamento de Química, Faculdade de Ciências Exactas e da Engenharia, Universidade da Madeira, Campus Universitário da Penteada, 9020-105, Funchal, Portugal

<sup>4</sup>Unidade de Imunoalergologia, Hospital Dr. Nélio Mendonça, SESARAM, E.P.E., 9004-514 Funchal, Portugal

35º CONGRESSO DE PNEUMOLOGIA  
III CONGRESSO LISBO-PALOP DE PNEUMOLOGIA  
2019 NOV 7-9

## INTRODUÇÃO

- A asma é uma doença heterogénea caracterizada por inflamação crónica e remodelação irreversível das vias aéreas a longo prazo.
- A peroxidação enzimática do ácido araquidónico é parte da fisiologia desta doença e leva à formação de poderosos metabolitos bioactivos, como os eicosanóides, com um forte potencial para serem utilizados em ambiente clínico como biomarcadores urinários da asma.
- O objectivo deste trabalho é desenvolver uma estratégia *não-invasiva* e fácil de utilizar baseada em cromatografia líquida de ultra alta pressão, utilizando um formato semiautomático eVol® - microextração por sorvente empacotado, de forma a identificar e quantificar biomarcadores de peroxidação lipídica: *leucotrienos E<sub>4</sub> e B<sub>4</sub> e 11β-prostaglandina F<sub>2α</sub>*, presentes na *urina de pacientes asmáticos e indivíduos saudáveis* (grupo de controlo) em idade pediátrica.
- O método desenvolvido foi validado em condições óptimas de extração e de cromatografia e aplicado com sucesso em amostras reais, permitindo a identificação da doença.

## METODOLOGIA



CONDIÇÕES ÓPTIMAS DE EXTRAÇÃO		CONDIÇÕES ÓPTIMAS CROMATOGRAFICAS	
Aparelho	MEPS: - eVol® XR - seringa analítica XCHANGE® - BIN contendo o sorvente R-AX	Aparelho	UPLC Acuity H-Class (Waters Corporation) - Detector PDA 2996 - Coluna BEH C18
Condicionamento	3 ciclos com 250 µL de ACN-H <sub>2</sub> O a 0,1% FA	Temperatura da coluna	30 °C
pH da amostra	5,1	Volume de injeção	5 µL
Extração-descarte de amostra	10 ciclos de 250 µL de amostra	Tempo de análise	14 min
Eluição dos biomarcadores alvo	2 × 50 µL MeOH	Taxa de fluxo	300 µL min <sup>-1</sup>
Concentração do eluato	Metade do volume sob corrente de N <sub>2</sub>	Fase móvel do gradiente	ACN a 0,1% FA e H <sub>2</sub> O a 0,1% FA

## Agradecimentos

Este trabalho foi suportado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (Projeto CQM PEst-OE/QUI/010674/2019, fundos do Governo Português), e através do Programa Madeira 14-20, projeto PROEQUIPRAM - Reforço do Investimento em Equipamentos e Infraestruturas Científicas na RAM (M1420-01-0145-FEDER-000008) e pela ARDITI - Agência Regional para o Desenvolvimento da Investigação Tecnologia e Inovação, através do projeto M1420-01-0145-FEDER-000005 - Centro de Química da Madeira - CQM (Programa Madeira 14-20).

## RESULTADOS

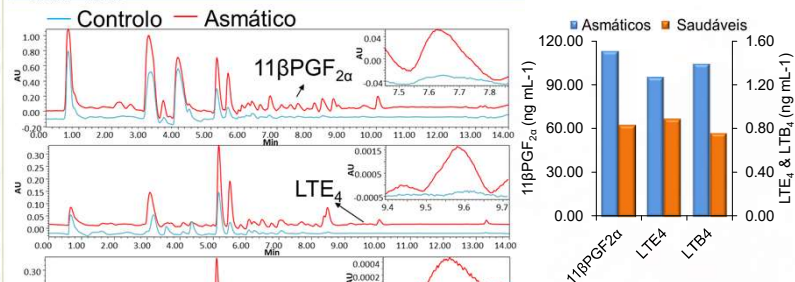
### Performance analítica do método MEPS/UHPLC desenvolvido

**Tabela 1 – Estudo da precisão, exactidão e eficiência da extração do método MEPS/UHPLC desenvolvido.**

Analitos	Nível de concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Precisão (%)		Exactidão (%)	Eficiência da extração
		Repetibilidade Intraday	Precisão intermédia		
11β-Prostaglandina F <sub>2α</sub>	Baixo 25	3,17	4,81	93,62	95,52
	Medio 100	3,17	3,89	100,50	99,71
	Alto 200	3,73	5,40	103,02	98,87
Leucotrieno E <sub>4</sub>	Baixo 2,5	6,63	10,43	96,73	91,13
	Medio 10	4,70	2,86	95,85	83,86
	Alto 20	3,11	1,29	103,51	74,99
Leucotrieno B <sub>4</sub>	Baixo 2,5	6,17	6,54	101,08	84,53
	Medio 10	4,82	3,57	96,32	92,25
	Alto 20	4,58	3,68	100,04	88,14

**Tabela 2 – Efeito de matriz, linearidade, sensibilidade e equação de regressão do método MEPS/UHPLC desenvolvido.**

Analitos	PI	11βPGF <sub>2α</sub>	LTE <sub>4</sub>	LTB <sub>4</sub>
Tempo de retenção (min)	7,43	7,65	9,61	10,75
λ <sub>max</sub> (nm)	366	192	281	270
LDR (ng mL <sup>-1</sup> )	-	5 - 300	0,5 - 30	0,1 - 30
Equação de regressão (matriz)	-	y = 0,0951x - 2,6893	y = 0,0932x + 0,0224	y = 0,1385x - 0,0640
r <sup>2</sup>	-	0,9841	0,9884	0,9989
Efeito de matriz (%)	-	73	76	81
Sensibilidade	-	-	-	-
LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	-	1,12	0,16	0,04
LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )	-	2,11	0,35	0,10
Teste Lack-of-fit	-	-	-	-
F <sub>calculado</sub> :F <sub>tabelado</sub>	-	1,48;2,49	0,67;2,49	0,32;2,22
Teste Goodness-of-fit	-	-	-	-
F <sub>calculado</sub> :F <sub>tabelado</sub>	-	0,00;2,49	0,06;2,49	0,11;2,22
Teste Mandel's fitting	-	-	-	-
F <sub>calculado</sub> :F <sub>tabelado</sub>	-	2,50;7,71	0,12;7,71	0,08;5,99



## CONCLUSÕES

- Ultra-rápido** (tempo de análise <15 min)
- Exacto**
- Preciso**
- Fácil operação**
- Não-invasivo**

Foi desenvolvido um método simples capaz de quantificar biomarcadores eicosanóides da asma em pacientes asmáticos e crianças saudáveis.

A validação apresentou valores compatíveis em todos os parâmetros avaliados.

Aplicado com sucesso em amostras reais.

Método e biomarcadores promissores em relação a outras doenças de foro inflamatório.

## Referência

Pedro H. Berenguer, *et al.* Journal of Chromatography A, 1584 (2019) 42-56.