

Soluções Agilent para lipidômica

# MAIOR PERSPECTIVA SOBRE O METABOLISMO DE LIPÍDIOS

The Measure of Confidence

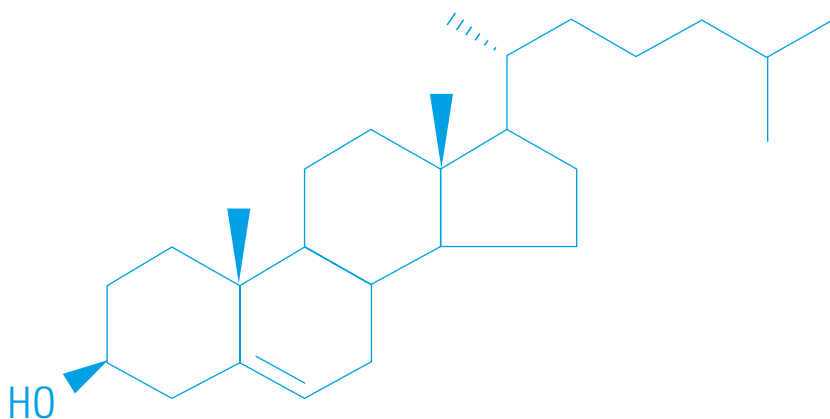


**Agilent Technologies**

# COMPREENDENDO A LIPIDÔMICA

## O que é lipidômica?

O termo "lipidoma" refere-se a todos os lipídios que existem em um organismo e aos seus efeitos em diversos processos celulares. Para compreender a lipidoma, é importante caracterizar e quantificar os lipídios, tanto de forma coletiva quanto individual. A espectrometria de massas surgiu como uma ferramenta de detecção analítica, suportando a determinação do perfil de lipídios para a pesquisa lipidômica.



### Fluxos de trabalho de lipidômica

O fluxo de trabalho de shotgun lipidômico é uma técnica bem conhecida com base em infusão projetada para produzir rapidamente dados quantitativos de classe de lipídios em um pequeno número de lipídios usando padrões internos de classe. Esta abordagem produz informações sobre a classe do lipídio, a composição e os grupos R, mas não fornece identificação clara dos lipídios. O shotgun lipidômico pode ser realizado em um espectrômetro de massas de triplo quadrupolo (QQQ) ou quadrupolo tempo de voo (Q-TOF). Os usuários podem atingir classes de lipídios específicas usando a

varredura de ion precursor ou modos de varredura de perda neutra em espectrômetros de massa de QQQ. Um instrumento de Q-TOF oferece mais sensibilidade do que um QQQ nos modos de varredura e exatidão de massa mais alta, mas não apresenta a especificidade da varredura de perda neutra do QQQ.

Uma grande limitação do shotgun lipidômico é a supressão de ions causada pela diversidade química dos lipídios e suas eficiências de ionização muito distintas. Sem a separação dos lipídios, apenas as informações de MS e MS/MS não podem resolver diferenças biologicamente relevantes na estrutura, como a localização de ligação dupla, a posição do

grupo R, etc. A natureza química diversificada das classes de lipídios apresentam um desafio constante ao desenvolvimento de metodologias de separação para resolver e identificar lipídios individuais.

A determinação de perfil lipidômico, uma técnica de separação, surgiu como uma abordagem mais abrangente, produzindo a quantificação e a identificação relativa de centenas de lipídios em uma única análise. Este desenvolvimento foi possibilitado por avanços na cromatografia, assim como pelo desenvolvimento de espectrometria de massas de mobilidade de ions (IMS) e ferramentas de análise de software avançadas.

# FERRAMENTAS DE LIPIDÔMICA PARA DIVERSAS APLICAÇÕES

A Agilent é a principal fornecedora de instrumentos, consumíveis, informática e suporte técnico para cromatografia e espectrometria de massas para a pesquisa lipidômica global em diversas áreas de aplicação.

## **Pesquisa básica e clínica**

Examine lipídios em biofluidos complexos para identificar biomarcadores de lipídios e compreender o metabolismo celular em um nível de detalhes que não é possível com métodos analíticos clássicos. A lipidômica pode ser usada para documentar perfis de lipídios e revelar alterações em lipídios que ocorrem em distúrbios metabólicos, além de desempenhar um papel fundamental na compreensão dos mecanismos de aterosclerose, acidente vascular cerebral, hipertensão e obesidade.

## **Agricultura**

Compreenda as funções dos lipídios na agricultura através de seu impacto no solo e na biologia vegetal.

## **Alimentos e nutrição**

Identifique e avalie como os lipídios, de forma independente ou junto com proteínas, regulam

as funções celulares e sub-celulares, como a sinalização e expressão do gene. Estudos de lipidômica abrangentes estão possibilitando novas descobertas das ligações entre os alimentos que ingerimos e a nossa saúde.

## **Farmacêutica**

Identifique lipídios para melhorar a descoberta de drogas e fornecer a base para tratamentos mais eficientes para doenças debilitantes.

## **Biocombustíveis**

Determine o perfil de lipídios em ácidos graxos e microalgas produtoras de óleo como importantes marcadores para determinar a compatibilidade e as métricas de desempenho para biocombustíveis. A lipidômica está desempenhando uma função na execução de novas sequências de moléculas para produzir ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEEs), um componente do biodiesel.

*“Ao trabalhar com a Agilent, desenvolvemos em conjunto fluxos de trabalho avançados para a detecção de lipídios de baixa abundância usando uma combinação de captura, separação e cromatografia nanofluidica seguida de espectrometria de massas tandem de alta resolução. Esta abordagem acrescentou detalhes importantes para a nossa compreensão. Através de nossa parceria com a Agilent, também estamos estendendo nossa pesquisa a áreas relacionadas à lipidômica, como a metabolômica, glicômica e proteômica.”*

**MARKUS WENK, PH.D.**

UNIVERSIDADE NACIONAL DE CINGAPURA



# O DESAFIO DA SEPARAÇÃO LIPIDÔMICA

## Múltiplas abordagens, diversas soluções

A diversidade estrutural dos lipídios exige várias abordagens de separação; não há uma solução única adequada para todas as classes. A cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS) tem sido tradicionalmente usada para a caracterização de acil graxo; isso proporciona informações detalhadas sobre o grupo R, mas perde as informações sobre o lipídio devido ao preparo de amostras (saponificação). Terpenos e esteróis são preferencialmente analisados por GC/MS devido à melhor separação e ionização cromatográfica.

A cromatografia líquida (LC) e a cromatografia de fluidos supercríticos (SFC) são técnicas amplamente utilizadas que preservam as informações do lipídio, não exigem derivatização e fazem facilmente a interface com espectrômetros de massas de pressão atmosférica. A escolha do método cromatográfico afeta a classe de lipídios resolvidos e detectados, sendo assim, depende da aplicação.

Categoria do lipídio	GC/MS	LC/MS	SFC/MS
Ácidos graxos (acilos)	...	..	..
Glicerolípidos (triglicerídeos)	.	...	..
Glicerofosfolípídios		...	..
Esfingolípídios		...	..
Lipídios esteróis	...	..	..
Lipídios prenol		..	..
Sacarolípídios		...	..
Terpenos (plantas)	...	..	..
Policetidos	.	..	..

Tabela 1. Visão geral da força relativa de diferentes separações cromatográficas para várias classes de lipídios. ... indica a melhor técnica de separação para uma determinada classe.

A Agilent suporta uma gama completa de soluções lipidômicas (Figura 1), com uma plataforma de análise de dados unificada para todos os GC/MS, LC/MS e SFC/MS.



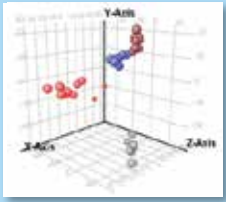
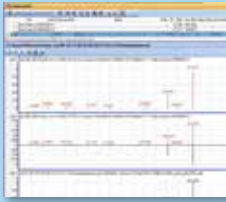




	Aquisição de dados	Buscador de recursos	Alinhamento e análise estatística	Identificação	Análises de reações químicas
		Software MassHunter	Software Mass Profiler Professional		
Instrumentos analíticos		 <p>Qualitativo</p>	 <p>Análise e visualização</p>	 <p>ID Browser usando o banco de dados METLIN e a biblioteca Fiehn da Agilent</p>	 <p>Pathway Architect usando bancos de dados públicos, como o KEGG</p>
		 <p>Profinder</p>			
					

Figura 1. Soluções de fluxo de trabalho de lipidômica Agilent

# TECNOLOGIA POTENTE, FLEXÍVEL E CONFIÁVEL PARA LIPIDÔMICA

## A cromatografia de lipídios

A LC de fase normal e de fase reversa oferece várias vantagens para a separação de lipídios. A LC de fase normal permite a avaliação rápida das classes de lipídios (Figura 2), enquanto a LC de fase reversa fornece reprodutibilidade de tempo de retenção excelente e separação dos lipídios em uma classe (Figura 3). Em análises abrangentes de lipídios, a LC de fase normal é usada para o fracionamento com base em classes, seguida de LC de fase reversa das frações para resolver lipídios individuais.

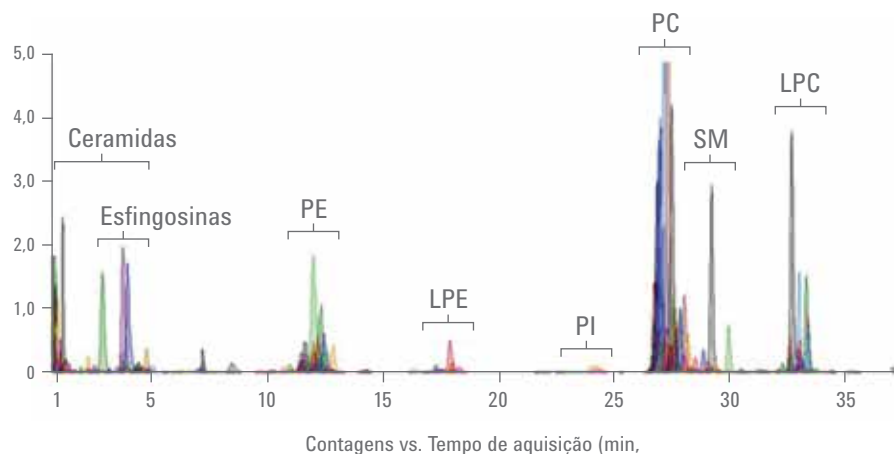


Figura 2. Separação por LC/MS de fase normal de extrato de fígado demonstrando a separação por classe de lipídio. PE = fosfatidiletanolamina; LPE = lisofosfatidiletanolamina; PI = fosfatidilinositol; PC = fosfatidilcolina; LPC = lisofosfatidilcolina.

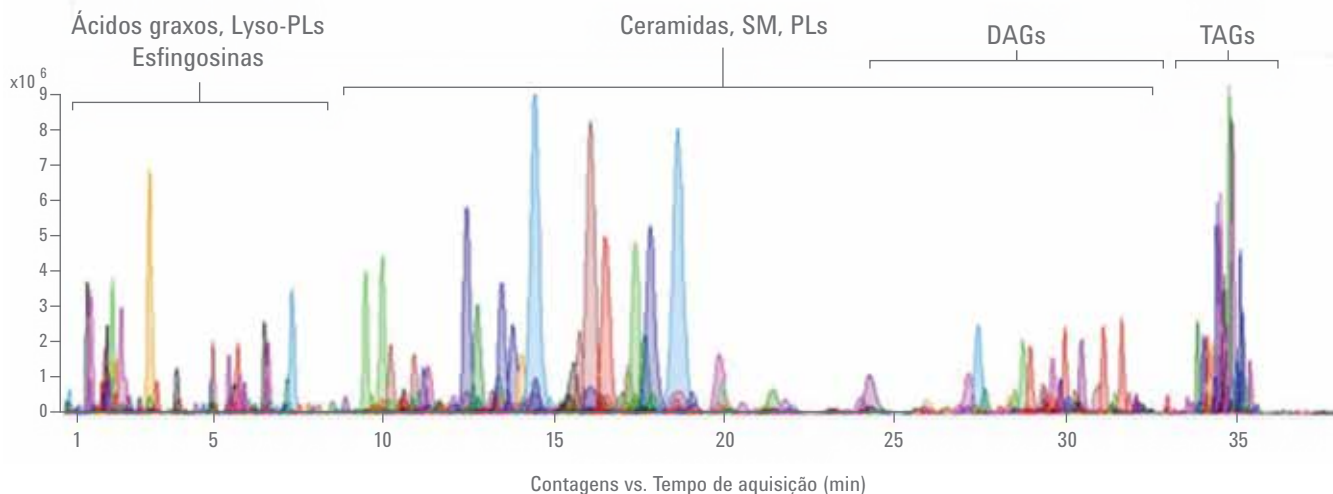


Figura 3. Separação por LC/MS de fase reversa de extrato de fígado demonstrando a separação dentro da classe de lipídio. PL = fosfolípido; SM = esfingomielina; DAG = diacilglicerol; TAG = triacilglicerol.

## Cromatografia de fluido supercrítico (SFC)

A SFC utiliza dióxido de carbono muito denso como o componente principal na fase móvel da SFC. Uma forma da cromatografia de fase normal, a SFC é ortogonal à LC de fase reversa, fornecendo separação de alta resolução de lipídios polares e não polares em uma única análise. A SFC é bastante eficaz para resolver misturas complexas de lipídios (Figura 4). O sistema SFC Agilent 1260 foi projetado para alternar facilmente entre os modos de LC e SFC por meio de uma válvula de alternância simples.

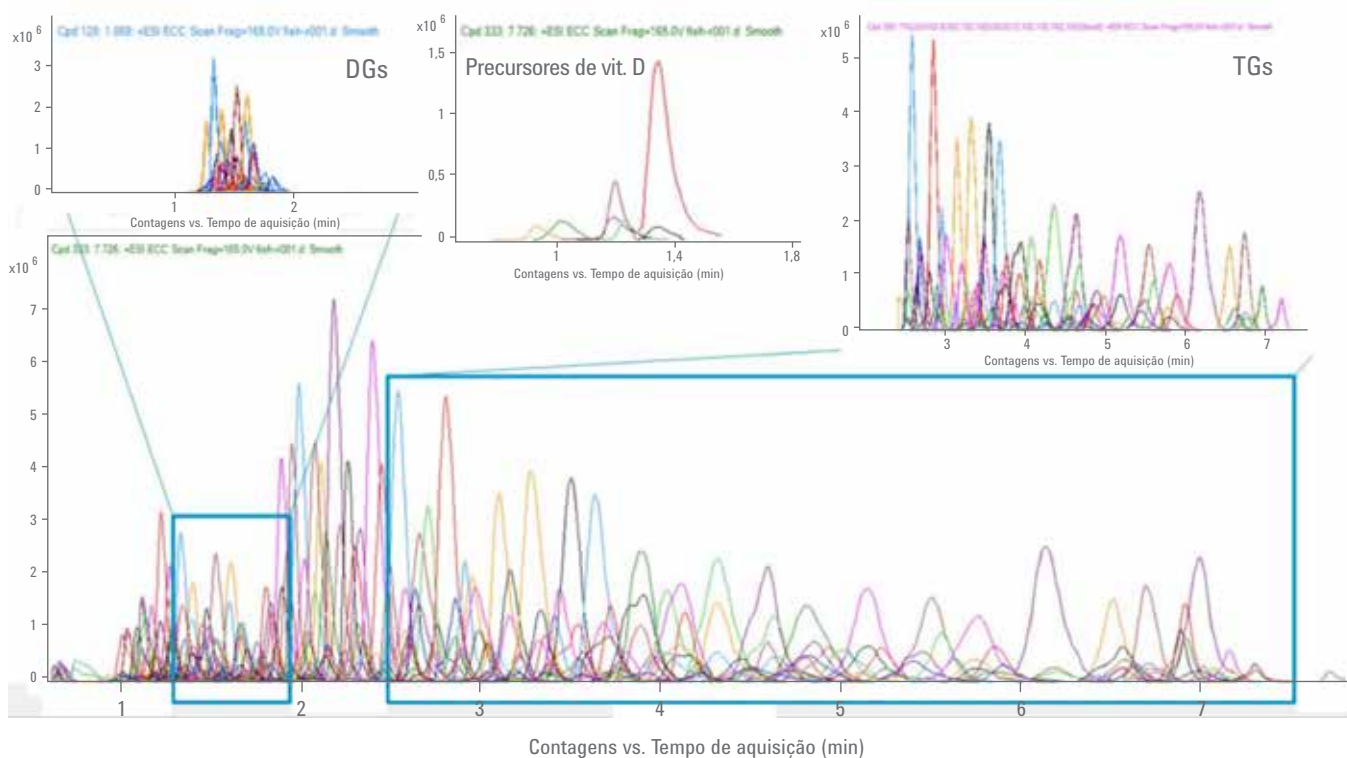


Figura 4. Análise por SFC/MS de óleo de peixe de um suplemento alimentar comercial. Os cromatogramas de íons extraídos demonstram o alto poder de resolução que a SFC oferece para a análise de misturas complexas de lipídios.

O sistema híbrido SFC/UHPLC analítico Agilent 1260 Infinity permite uma versatilidade ainda maior quando um espectrômetro de massas (MS) é incorporado como um detector adicional. A capacidade de alternar rapidamente entre a SFC/MS e a HPLC/MS é um recurso muito eficiente para a lipidômica.

### Sistema SFC Agilent 1260

- Integrado – Controle de software simples da SFC de ponta agora em todas as plataformas de LC/MS Agilent
- "Verde" – Permite a separação rápida e de alta resolução de compostos que não podem ser separados facilmente por métodos de LC, com uso limitado de solventes orgânicos
- Potente – Lipídios polares e não polares podem ser separados em uma única corrida
- Versátil – Proporciona alta flexibilidade com grande confiabilidade



## A vantagem da mobilidade de íons

A tecnologia de mobilidade de íons fornece uma dimensão adicional e ortogonal de separação para amostras complexas como os lipídios. Após a separação cromatográfica, os lipídios são separados na fase gasosa, fornecendo a separação da classe de lipídios com base na seção transversal de colisão do íon do lipídio (Figura 5). A mobilidade de íons também pode fornecer separação de classe de lipídio para amostras complexas. O sistema IMS Q-TOF Agilent 6560 (Figura 6) oferece medições de massa precisas combinadas com a separação por mobilidade com a mais alta resolução comercialmente disponível.

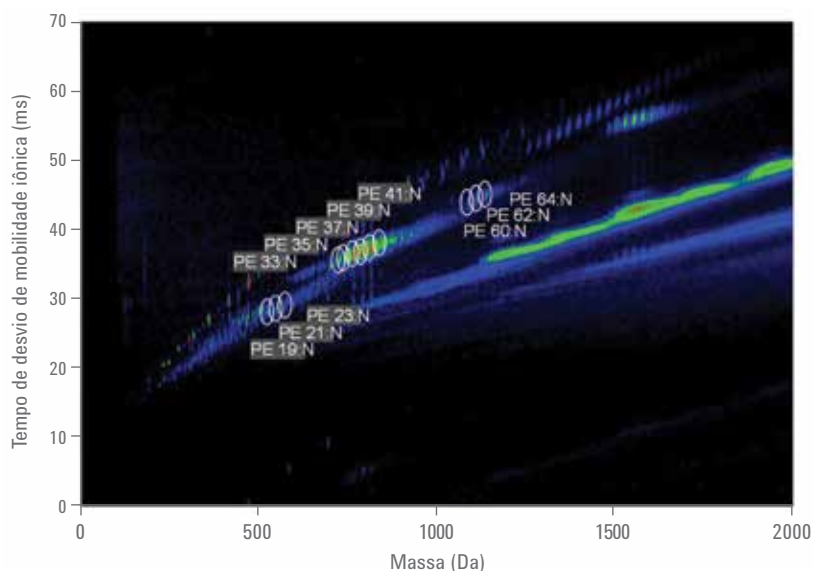


Figura 5. A separação por IMS de uma mistura infundida de fosfatidiletanolamina (PE). O aumento do tempo de desvio é associado ao aumento do número de átomos de carbono.

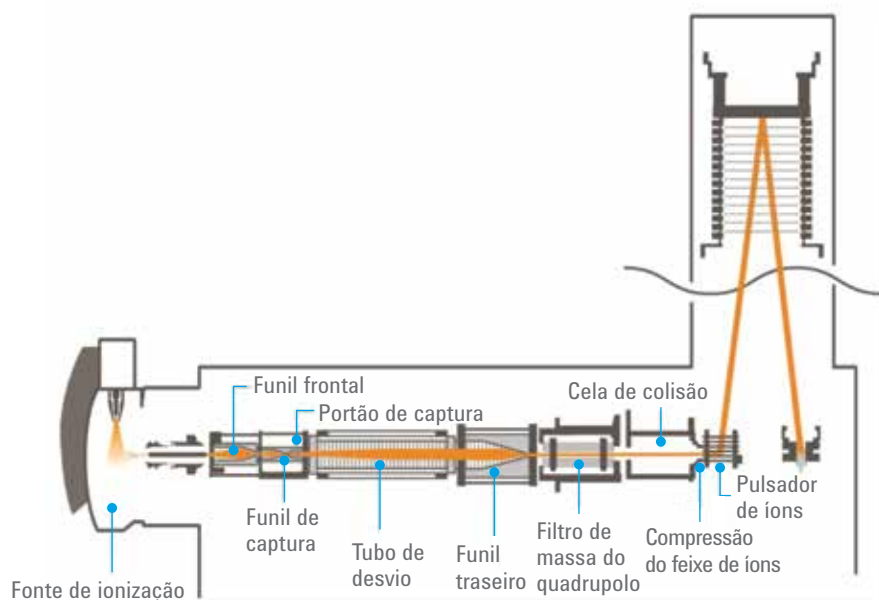


Figura 6. Cada segmento do conjunto de funis dinâmico, que inclui um funil frontal para enriquecer a amostra, funil de íons de captura, tubo de desvio e funil traseiro de foco, foi desenvolvido cuidadosamente para maximizar a transmissão de íons da fonte para o analisador de massa de alta resolução Q-TOF. Isto permite a resolução e a caracterização de amostras complexas usando a análise de LC/IM/MS, além de manter a alta sensibilidade, fornecendo um meio de estudar a diversidade estrutural de moléculas alvo.

## Identificação de lipídios

LIPID Metabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS) é uma associação de laboratórios criada para desenvolver o primeiro sistema de classificação de lipídios reconhecido internacionalmente, incluindo a nomenclatura de lipídios e as representações estruturais necessárias para identificar um grande número de lipídios. O sistema de classificação LIPID MAPS compreende oito categorias de lipídios (Figura 7), com cada categoria caracterizada pela extensa diversidade estrutural e funcional, atribuível a diferentes cadeias alifáticas, estereoisomeria, quiralidade e porções do grupo cabeça.

A observação e a identificação de lipídios englobam a classe, a composição elementar, o tamanho e a localização do grupo R, o número e a localização de ligações duplas e a orientação da ligação dupla (cis/trans).

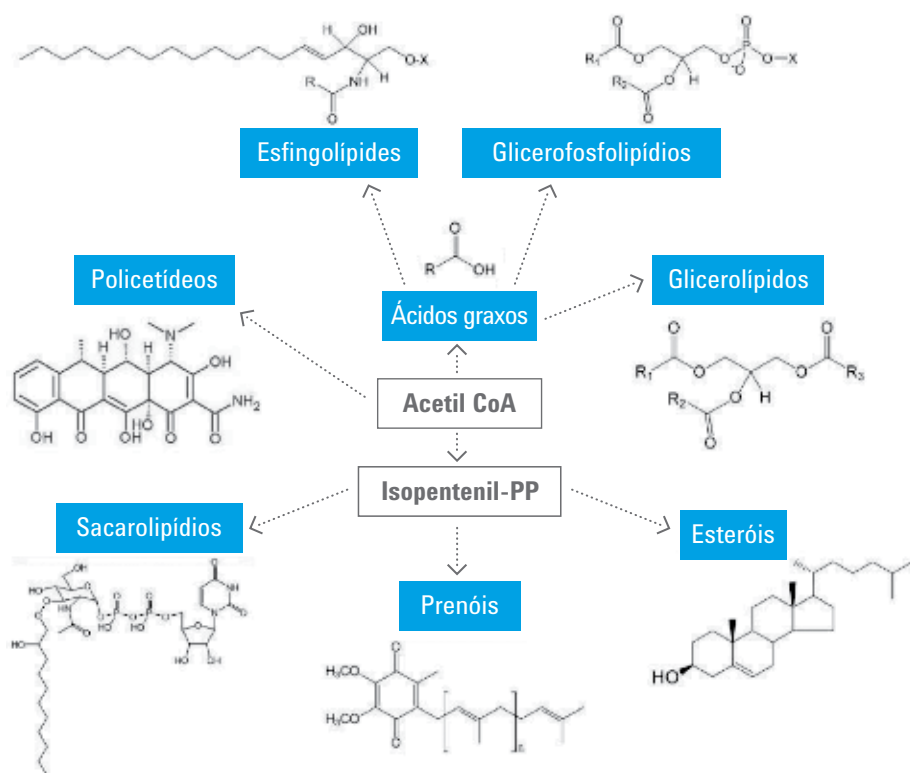


Figura 7. As oito classes de lipídios diferentes são definidas pela associação LIPID MAPS.

A Agilent oferece diversas soluções para observar ou identificar lipídios: correspondência com bancos de dados, correspondência com a biblioteca espectral de MS/MS ou correspondência espectral teórica de MS/MS. A correspondência de bancos de dados pode ser realizada usando o banco de dados Agilent-METLIN ou o SimLipid, pacote de software da PREMIER BioSoft. A correspondência de biblioteca espectral de MS/MS é realizada somente com a biblioteca de MS/MS Agilent-METLIN, que é produzida usando padrões químicos. O SimLipid também suporta a correspondência teórica de MS/MS de espectros de lipídios.

O banco de dados Agilent-METLIN e a biblioteca de MS/MS podem ser usados para a observação e identificação de lipídios. Ele contém aproximadamente 36.600 entradas de lipídios do LIPID MAPS, sendo que cerca de 640 destas têm espectros de MS/MS de padrões. O banco de dados SimLipid engloba oito categorias de lipídios e 36.224 entradas de lipídios.

## Software projetado para proporcionar flexibilidade

Na determinação de perfil dos lipídios, diversas amostras são analisadas com o intuito de comparar e descobrir as diferenças entre os grupos de amostras. A Agilent oferece o software MassHunter Profinder para a extração de lipídios e o alinhamento entre as amostras. Os resultados apenas de MS podem ser exportados para o SimLipid para a identificação ou para o Mass Profiler Professional (MPP) para análise estatística. Se o SimLipid não for usado para a identificação, os lipídios podem ser identificados no MPP usando o ID Browser integrado e o banco de dados Agilent-METLIN para fornecer uma correspondência de massa exata. Dependendo da abordagem de análise de dados, diversos fluxos de trabalho podem ser utilizados, usando uma combinação de soluções de software Agilent (Figura 8).

Se os dados de MS/MS foram adquiridos, a análise pode ser realizada usando o software de análise qualitativa MassHunter, com a identificação por meio do SimLipid ou do Banco de dados e biblioteca de compostos pessoais de metabólitos (PCDL) METLIN Agilent (Figura 9).

O SimLipid está disponível no site da PREMIER Biosoft International: [www.premierbiosoft.com/lipid/index.html](http://www.premierbiosoft.com/lipid/index.html).

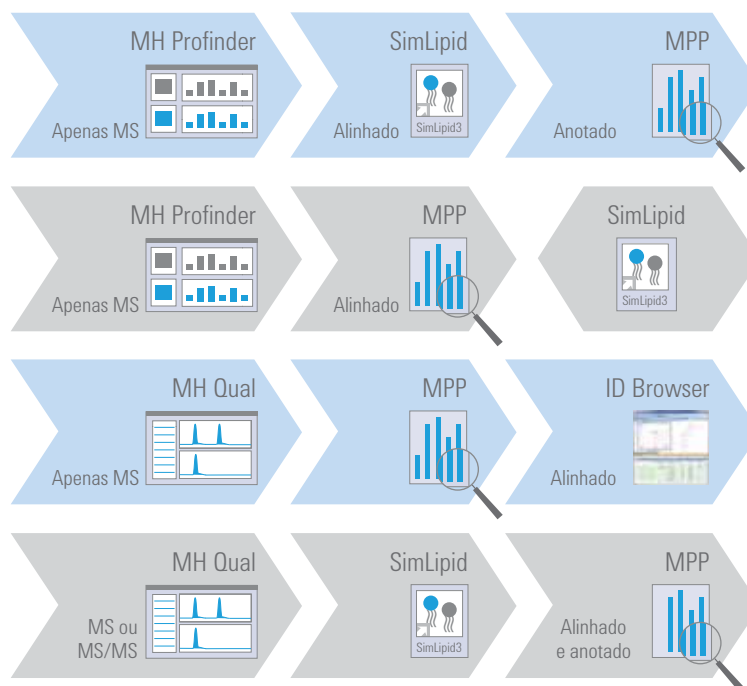


Figura 8. Fluxo de trabalho de lipidômica integrado ao software MassHunter.



Figura 9. Resultados de pesquisa na biblioteca de MS/MS de uma amostra de soro humano no software de análise qualitativa MassHunter em relação ao PCDL de metabólito METLIN. O espectro superior é o MS/MS coletado em um Q-TOF Agilent para um dos compostos; o inferior é o espectro da biblioteca do METLIN. O intermediário mostra o espectro da diferença. A pontuação na Lista de compostos (92.6) indica um resultado de alta qualidade.

## O Pathway Architect revela um contexto biológico importante

A análise de amostras de lipídios por LC/MS apresenta desafios especiais devido à escolha da cromatografia adequada, assim como a observação e identificação de compostos encontrados. Abordagens de determinação de perfil não-alvo provavelmente fornecerão um número maior de lipídios candidatos sem um contexto biológico.

O módulo Pathway Architect do MPP pesquisa, filtra, mapeia e visualiza dados em reações biológicas. Dois tipos de análises de reações são suportados; um é a análise de Rede derivada de literatura com base no processamento de linguagem natural de literatura publicada, enquanto o outro foi projetado para analisar reações biológicas da curadoria disponíveis publicamente, como KEGG, BioCyc e Wikipathways. Os dados experimentais foram projetados com base nestas reações e permitem que os usuários filtrem, ampliem ou selecionem os dados de forma interativa. As reações podem ser selecionadas e uma lista de lipídios, proteínas, metabólitos, transcrições e genes pode ser exportada e usada por outros programas para criar novos experimentos com reação direcionada.

Neste exemplo (Figura 10), um fluxo de trabalho de análise de lipídio começa com a determinação do perfil não segmentado de uma amostra por MS e MS/MS para encontrar o máximo de componentes de lipídio possíveis. O software de identificação SimLipid é usado para apontar os resultados, que são então visualizados no Pathway Architect em uma reação de KEGG.

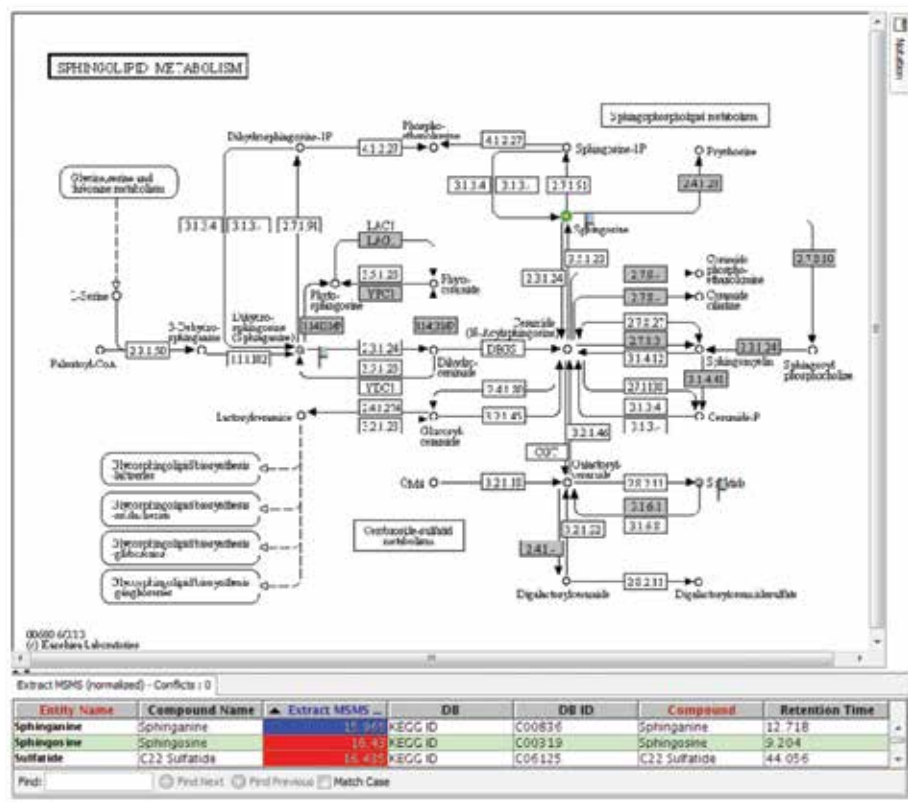


Figura 10. Resultados de uma análise de reação de uma amostra de soro humano no Pathway Architect usando o banco de dados de reações de KEGG. Três compostos de lipídios foram identificados usando o SimLipid e estavam presentes na reação do metabolismo de esfingolípides. Os compostos são destacados em amarelo na reação; o composto selecionado atualmente (esfingosina) é destacado em verde.

# AUTOMAÇÃO PARA LIPIDÔMICA

## Preparo de amostras automático para obter melhores resultados

Os protocolos automatizados para o preparo de amostras de lipidômica aumentam a reprodutibilidade e diminuem o tempo gasto no preparo de amostras para análise. Além disso, a automação libera funcionários importantes para tarefas mais complexas e minimiza o impacto da rotação da equipe, que é especialmente importante em estudos de longo prazo. Por exemplo, um método de extração semiautomático para fosfolipídios e esfingolipídios de plasma humano foi desenvolvido usando a Plataforma de manuseio automatizado de líquidos Bravo Agilent no laboratório do Dr. Markus Wenk na SLING, a incubadora de lipidômica da Universidade Nacional de Cingapura.

## Comparação de etapas no protocolo manual x semiautomático

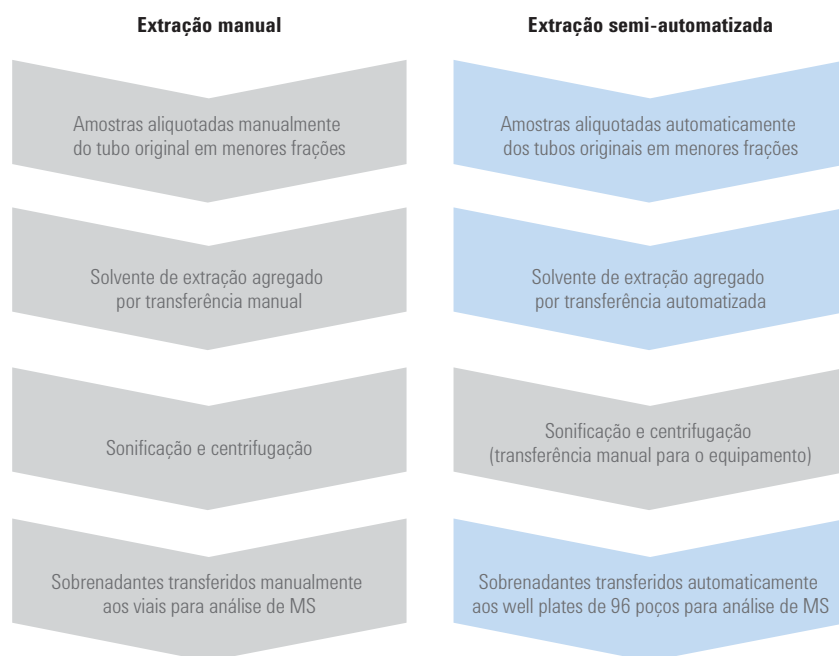
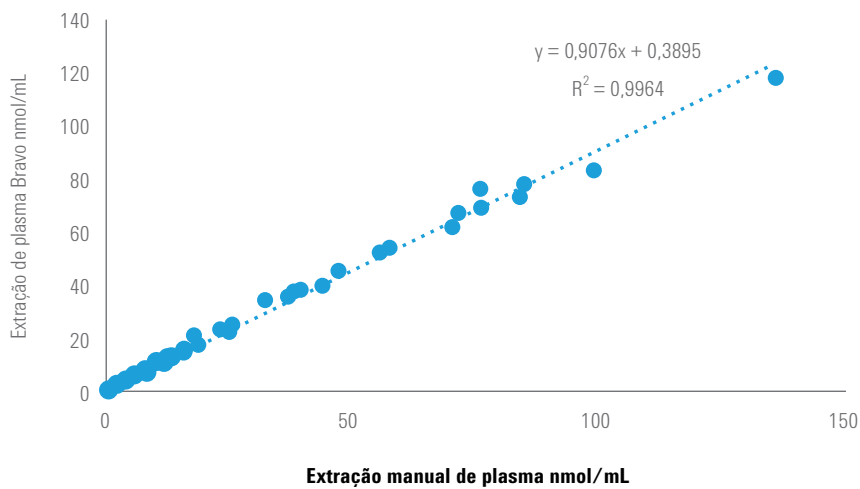


Figura 11: No laboratório Wenk, um método automático usando a Plataforma de manuseio de líquidos Bravo substitui três das quatro etapas no preparo de amostras de fosfolipídio e esfingolipídio.



As soluções de manuseio automatizado de líquidos da Agilent aumentam a produtividade sem comprometer a qualidade dos dados ao simplificar tarefas propensas a erros, como o manuseio, a classificação e a vedação de líquidos.



Padrão de lipídio	%RSD Semiautomático	%RSD Manual
PE 14:0/14:0	4,80	7,13
PC 14:0/14:0	5,85	5,72
C17 Ceramida	7,32	11,97
LysoPC 20:0	5,27	5,05
SM 30:1	3,79	4,96
GluCer d18:1/8:0	6,81	6,34

Figura 12. O plano de regressão mostra os resultados de quantificação equivalentes para o método de preparo semiautomático na plataforma de manuseio de líquidos Bravo em relação ao método manual. Na tabela à direita, você pode observar que o método semiautomático é melhor na quantificação dos lipídios padrão.

# SOLUÇÕES PARA LIPIDÔMICA GC/MS E LC/MS AGILENT

## Instrumentos de GC/MS



### Sistema GC/MSD 5977A series

Ideal para análise não segmentada e descoberta de rotina. O GC/MSD Agilent 5977A fornece confiabilidade e facilidade de uso para examinar grandes números de amostras.



### Sistema GC/MS triplo quadrupolo 7000C e 7010

Obtenha excelente quantificação de MS/MS e limites de detecção muito baixos com o 7010 para análises orientadas mais exigentes.



### Sistema GC/MS Q-TOF 7200B

Identifique lipídios desconhecidos anteriormente com os dados de MS/MS de alta resolução. O GC/MS Q-TOF Agilent 7200B complementa o poder de separação do GC 7890C com dados contínuos de alta resolução.



A Agilent tem uma linha completa de colunas e consumíveis para GC e LC, de todos os instrumentos no seu laboratório, para apoiar a pesquisa de lipidômica. Encontre o melhor conjunto de soluções para o seu laboratório em [www.agilent.com/chem/selectiontools](http://www.agilent.com/chem/selectiontools)

## Instrumentos de LC/MS



### Sistemas analíticos SFC 1260 Infinity

O SFC/MS Agilent 1260 permite separações rápidas e de alta resolução de lipídios que não podem ser separados facilmente por outros métodos. Lipídios polares e não polares podem ser separados em uma única corrida, com alta flexibilidade, alta precisão e confiabilidade excelente.



### Q-TOF de massa precisa 6500 Series

Ideal para determinar o perfil e identificar compostos de baixo peso molecular, o Q-TOF 6500 series fornece funcionalidade de MS/MS. A exatidão de massa típica aumenta a confiança na identificação de lipídios e reduz falsos positivos em pesquisas em bancos de dados.



### LC 1290 Infinity II

Atinge desempenho de separação e detecção excelentes, disponibilizando dados de alta qualidade com confiança. A capacidade de amostra e a velocidade do ciclo de injeção unem-se a novos níveis de utilização para permitir alta produtividade.



### LC/MS Série 6400 triplo quadrupolo

Com experimentos de MRM extremamente rápidos e desempenho sólido e confiável, o LC/MS triplo quadrupolo 6400 series permite um tempo de atividade alto para analisar grandes conjuntos de amostras. A sensibilidade de nível sub-fentograma permite a detecção de lipídios de baixa abundância.



### Plataforma de manuseio automatizado de líquidos Bravo Agilent

Para o preparo de amostras de lipídios, a plataforma Bravo é capaz de transferir amostras de tubos de coleta para o formato de well plate, realizando adições de líquido e extração de amostras.



Para obter mais informações, faça o download da Visão geral e do guia de fluxo de trabalho de lipidômica, que apresentam instruções para análise de lipidômica usando os softwares de análise quantitativa MassHunter, Profinder, SimLipid e MPP. Estes guias fornecem detalhes passo a passo para os fluxos de trabalho de lipidômica. Encontre-os pesquisando por 5991-1643EN e 5991-1644EN (materiais em inglês), disponíveis em [www.agilent.com/chem/library](http://www.agilent.com/chem/library).

Saiba mais

[www.agilent.com/chem/lipidomics](http://www.agilent.com/chem/lipidomics)

Encontre um centro de atendimento ao cliente Agilent

[www.agilent.com/chem/contactus](http://www.agilent.com/chem/contactus)

Brasil

**0800-7281405**

**chem\_vendas@agilent.com**

Europa

**info\_agilent@agilent.com**

Ásia-Pacífico

**inquiry\_lsca@agilent.com**

Essas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc. 2015  
Publicado nos Estados Unidos, 11 de maio de 2015  
5991-5419PTBR



**Agilent Technologies**