

Padronização e validação de metodologia para verificação de permeabilidade intestinal utilizando cromatografia gasosa

Standardization and validation of methodology for verification of intestinal permeability using gas chromatography

Jacqueline Nakau Mendonça¹; Nilian Carla Silva Souza², Guilherme Vannucchi Portari³, Julio Sérgio Marchini⁴, Paula Garcia Chiarello⁵ & Alceu Afonso Jordão Júnior⁵

RESUMO - A permeabilidade intestinal pode ser verificada utilizando o teste lactulose/manitol, sendo este não invasivo e de grande interesse na área nutricional e clínica, uma vez que auxilia na identificação precoce de patologias. O objetivo deste trabalho foi a padronização do método de separação e quantificação do manitol e da lactulose e sua validação utilizando amostra biológica de ratos, utilizando a técnica de cromatografia gasosa. Desta forma, verificou-se que a urina após 5 horas da administração oral do manitol e lactulose foi a de maior interesse na determinação da permeabilidade intestinal com excreção de $2,18 \pm 0,73$ % de manitol e $0,27 \pm 0,10$ % de lactulose com uma razão manitol/lactulose de $0,12 \pm 0,04$. Em resumo, trata-se de um teste eficaz, fácil de ser realizado e não prejudicial para o organismo quando comparado com outros testes descritos na literatura.

PALAVRAS-CHAVE - Padronização, Permeabilidade Intestinal, Manitol, Lactulose, Cromatografia Gasosa.

SUMMARY - The intestinal permeability can be verified using the test lactulose / mannitol, which is noninvasive and great interest in nutritional and clinical since assists in early identification of diseases.

The aim of this study was to standardize the method of separation and quantification of mannitol and lactulose and validation using biological sample of rats, using the technique of gas chromatography. Thus, it was found that the urine after 5 hours of oral administration of mannitol and lactulose was of most interest in determining the intestinal permeability with excretion of 2.18 ± 0.73 % of mannitol and 0.27 ± 0.10 % lactulose with a mannitol / lactulose ratio of 0.12 ± 0.04 . In short, this is a test effective, easy to be done and not harmful to the body when compared with other tests described in the literature.

KEYWORDS - Standardization, Intestinal Permeability, Mannitol, Lactulose, Gas chromatography.

INTRODUÇÃO

O epitélio intestinal tem a finalidade de transportar nutrientes essenciais para o organismo¹⁶, além de ser uma barreira seletiva que reveste e protege o intestino, evitando a absorção de substâncias nocivas. No entanto, a parede intestinal pode sofrer modificações por decorrência de doenças como cirrose hepática^{8,15}, pancreatite aguda¹¹, doença celíaca^{10,19}, câncer de cólon¹⁷, doença de Crohn's¹⁸ e reações adversas a alimentos¹⁸, podendo apresentar manifestações clínicas como diarreia e perda de peso, devido alteração na permeabilidade intestinal².

A permeabilidade intestinal (PI) está relacionada com a capacidade da mucosa intestinal em permitir a passagem de moléculas para a corrente sanguínea. Devido a este fato, técnicas recentemente estudadas são capazes de estimar a permeabilidade intestinal através da administração oral de açúcares alvo, que não são metabolizados e atravessam a mucosa sem serem transportados ativamente^{2,5}, e posteriormente são determinados em fluidos biológicos, em especial na urina¹⁸.

O interesse pela permeabilidade intestinal surgiu em 1930 com os pioneiros McCane e Madders que utilizaram ramnose, xilose e arabinose como moléculas alvo na determinação da PI, desde então, o uso de diferentes moléculas, incluindo o Cr-EDTA, polietileno glicol, monossacarídeos e dissacarídeos tem sido avaliados e estudados para verificação da PI de forma mais eficiente¹⁶, a fim de investigar e prever doenças relacionadas com danos no intestino¹⁰.

O método mais aceito para verificação da integridade da barreira intestinal é o teste de manitol (monossacarídeo) e lactulose (dissacarídeo)^{5,6} que são transportados por caminhos transcelular e paracelular, respectivamente^{7,16}. Sabendo que passagem transcelular depende da área superficial da mucosa, enquanto passagem paracelular depende da integridade da mucosa; a quantidade absorvida dos açúcares será diferente. Consequentemente, a razão lactulose/manitol (L/M) nos conduz a verificação das condições da permeabilidade intestinal³.

Recentemente, verificou-se que o uso de cromatografia gasosa (CG) permite medir adequadamente a presença de manitol e lactulose em amostras biológicas, provando ser um excelente método para explorar a permeabilidade intestinal normal e em condições patológicas¹⁸. Outros métodos, como por exemplo, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear tem sido estudada com finalidade clínica, mas a não possibilidade de quantificação dos açúcares em questão aparece como uma desvantagem na utilização deste método¹².

Apesar da disponibilidade de várias técnicas analíticas para medir açúcar em amostras biológicas, a separação e quantificação relatada de mono- e di-sacarídeos tem sido um trabalho desafiador, que demandou um grande esforço para alcançar o sucesso⁶.

OBJETIVO

Padronização e validação de uma técnica para dosagem de lactulose e manitol urinário, por cromatografia gasosa para

Recebido em 15/07/2008

Aprovado em 03/11/2009

¹Aluna de Iniciação Científica do Curso de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

² Mestranda em Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

³Doutorando em Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

⁴Professor Titular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

⁵Professor Doutor do Curso de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

a verificação da permeabilidade intestinal utilizando um modelo experimental com ratos, após a ingestão oral de uma sobrecarga de lactulose e manitol.

MATERIAL E MÉTODO

Equipamentos

O cromatógrafo gasoso utilizado foi um GC 17A Shimadzu, equipado com auto-injetor no modo *split*, coluna capilar polidimetilsiloxano (Heliflex® AT™-1, Alltech, EUA) e detector de ionização de chama (DIC).

Reagentes

Manitol, (Riedel-de Haën, Alemanha), mio-inositol (Fluka, Suíça), lactulose (Inalco, Itália), fenil-β-D-glicosídeo (Acros Organics, Bélgica), piridina (Aldrich, Alemanha), hidroxilamina (Sigma-Aldrich, Hong Kong), N-trimetilsililimidazol (Acros Organics, Bélgica).

Soluções padrões

Foram realizadas diluições sucessivas da solução mãe de manitol e lactulose, variando de 0,01 a 20 mg/mL para o manitol e 0,001 a 2 mg/mL para a lactulose, correspondendo a 5 pontos na curva padrão, servindo como parâmetro na quantificação dos mesmos nas amostras biológicas.

Condições cromatográficas

Após otimização foram adotadas as seguintes condições operacionais: coluna capilar AT-1 possuindo 10 metros de comprimento, 0,53 milímetros de diâmetro e 1,2 μm de espessura da fase estacionária. O gás de arraste utilizado foi o hélio (He), com um fluxo de 2,4 mL/min e velocidade linear de 30 cm/s, proporcionando um pressão de 10 KPa na coluna capilar. A programação da temperatura no forno da coluna foi a seguinte: temperatura inicial de 250°C com aumento de 8°C/min por 6 min, atingindo uma temperatura final de 300°C, permanecendo nesta temperatura por 1,5 minutos. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 7,75 minutos.

Derivatização das amostras

Os padrões e amostras foram derivatizadas seguindo protocolo já descrito na literatura⁷. Uma alíquota de 200 μL de cada amostra foi transferida para vial de vidro de 2 mL com tampa de teflon, adicionando 40 μL de padrão interno contendo 20 mg/mL de fenil-β-D-glucosídeo (padrão interno da lactulose) e 20 mg/mL de mio-inositol (padrão interno do manitol).

As amostras foram submetidas à evaporação até a secar a 70°C com fluxo de gás nitrogênio. O resíduo foi resuspenso em 400 μL de piridina contendo 25 mg/mL de hidroxilamina, em seguida foi aquecido a 70°C durante 1 hora e centrifugado por 5 minutos em 2250 rotações por minutos. Uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi transferido para um vial de vidro cônico e adicionado 200 μL do derivante N-trimetilsililimidazol, deixando reagir durante 30 minutos a 70°C, desta forma ocorreu a silição das moléculas de açúcar. Do derivado uma alíquota de 100 μL foi transferida para o insert e 2 μL foram injetados no cromatógrafo gasoso para análise.

Parâmetros analíticos para a validação do método

O método proposto foi validado seguindo os parâmetros analíticos de especificidade, linearidade, faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação; possibilitando a validação do método de separação utilizado¹⁴.

Experimentação animal

Foram utilizados ratos machos saudáveis (n=11) da linhagem

Wistar recém-desmamados, oriundos do Biotério Central do Campus da USP Ribeirão Pretos, a fim de verificar a aplicabilidade do método. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais com livre acesso à ração e água.

Os animais permaneceram em jejum por 24 horas para posterior coleta de urina. As amostras foram coletadas antes (basal) e após a dose oral de 100 mg de manitol e 200 mg de lactulose dissolvidos em 1 mL de água destilada, administrada por gavagem (sonda intragástrica). A coleta de urina foi realizada no período de 5 horas e, nas 19 horas subsequentes (perfazendo 24 horas de coleta) a administração da dose oral de L e M.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As excreções dos analitos nas urinas de 5 e 24 horas foram analisadas por teste t para amostras pareadas estabelecendo como nível de significância $p < 0,05$.

RESULTADOS

A corrida cromatográfica foi realizada em um período de 7,75 minutos com tempos de retenção dos analitos de interesse apresentados na Tabela 1. A mesma tabela apresenta coeficientes de variação $\leq 0,019$ para análises realizadas em um mesmo dia (intra-ensaio) e coeficiente de variação $\leq 0,42$ para análises realizadas em dias distintos (interensaio). Na Tabela 2 são apresentados os fatores de separação e na Tabela 3 os valores para a resolução cromatográfica.

A figura 1 mostra um cromatograma referente à análise de padrões de manitol (1,0 mg/mL) e lactulose (0,1 mg/mL), e seus respectivos padrões internos, mio-inositol e fenil-β-D-glucosídeo, com concentração de 20 mg/mL cada enquanto a figura 2 traz o cromatograma referente à análise de urina. A Tabela 4 mostra os parâmetros validados para o método. A faixa de aplicação do método ficou entre 0,01 a 20 mg/mL para o manitol e 0,001 a 2 mg/mL para a lactulose. O coeficiente de linearidade (R^2) foi de 0,9997 para o manitol e 0,9995 para a lactulose, sendo $y = 0,2455x - 0,0189$ e $y = 0,3579x + 0,0035$, suas respectivas equações das retas. A recuperação encontrada foi de 120 e 116 % para manitol e lactulose, respectivamente. Os limites de detecção foram de 0,001 e 0,0001 mg/mL enquanto os limites de quantificação foram de 0,002 e 0,0002 mg/mL para manitol e lactulose respectivamente.

Na Tabela 5 são apresentadas as porcentagens de excreção urinário de manitol e lactulose em relação à dose inicial onde nota-se uma diminuição significativa da excreção de manitol do período de 5 horas ($2,18 \pm 0,73$ %) para o período final de 24 horas ($1,36 \pm 0,67$ %), enquanto para a lactulose houve manutenção.

TABELA I

Tempos de retenção médios (tr) e coeficiente de variação referente aos analitos e respectivos padrões interno.

Analito	Tempo retenção ± DP (min)*	CV (%) ¹	CV (%) ²
Manitol	1,8±0,034	0,019	0,070
Mio-inositol	2,3±0,032	0,014	0,065
Fenil-β-D-glucosídeo	3,0±0,028	0,0092	0,31
Lactulose	6,3±0,026	0,0042	0,42

* médias de 12 injeções

¹ coeficiente de variação intra-ensaio, determinado por medições realizadas em um mesmo dia.

² coeficiente de variação interensaio, determinado por medições realizadas em dias distintos.

TABELA II
Fator de separação* (-) entre os analitos de interesse.

Razão entre os analitos	Fator de separação (α)
Manitol/Mio-inositol	1,2854
Mio-inositol/ Fenil- β -D-glucosídeo	1,2947
Fenil- β -D-glucosídeo/Lactulose	2,0808
Lactulose/Manitol	3,4626

*fator de separação ou retenção relativa, é a razão entre o tempo de retenção de cada analito, sendo $\alpha \geq 1$.

TABELA III
Resolução cromatográfica (Rs) dos picos dos analitos.

Analitos	Resolução (Rs) \pm DP*
Manitol	10,04 \pm 5,504
Mio-inositol	3,047 \pm 1,374
Fenil- β -D-glucosídeo	1,182 \pm 0,4122
Lactulose	10,61 \pm 7,835

* médias de 12 injeções

TABELA IV
Resultados dos parâmetros de validação.

	Manitol	Lactulose
Faixa de aplicação	0,01 - 20 mg/mL	0,001 - 2,0 mg/mL
Linearidade (R ²)	0,9997	0,9995
Limite de Detecção	0,001 mg/mL	0,0001 mg/mL
Limite de Quantificação	0,002 mg/mL	0,0002 mg/mL
% de recuperação	120,05	116,06
Tempo de retenção (min)	1,814 \pm 0,0165	2,337 \pm 0,0182

TABELA V
Porcentagem de excreção urinária (média \pm DP)* após 5 e 24 horas a administração oral de lactulose e manitol.

	Manitol (%)	Lactulose (%)	L/M
5 horas	2,18 \pm 0,73 [#]	0,27 \pm 0,10	0,12 \pm 0,04
24 horas	1,36 \pm 0,67 [#]	0,24 \pm 0,10	0,17 \pm 0,08

* médias de 11 animais. # indica p<0,05

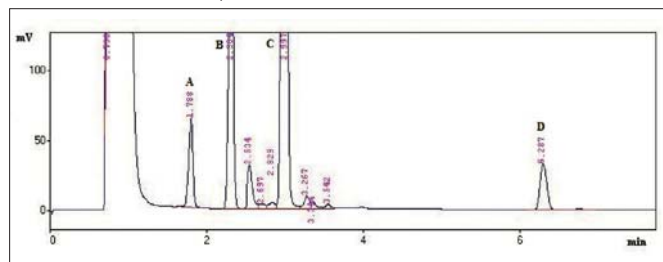


Figura 1 - Cromatograma obtido com a injeção dos padrões nas concentrações de 1,0 mg/mL de manitol (A), mio-inositol (B), fenil- β -D-glucosídeo (C) e 0,1 mg/mL de lactulose (D).

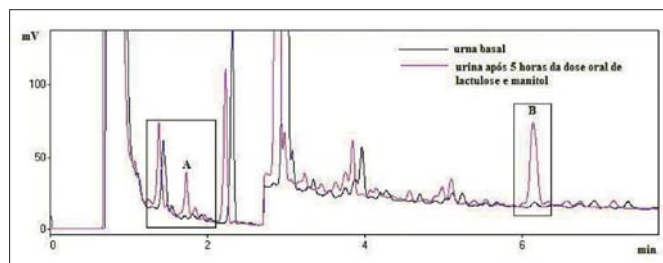


Figura 2 - Cromatograma obtido com a injeção dos padrões nas concentrações de 1,0 mg/mL de manitol (A), mio-inositol (B), fenil- β -D-glucosídeo (C) e 0,1 mg/mL de lactulose (D).

DISCUSSÃO

A metodologia para determinação de permeabilidade intestinal utilizando açúcares como marcadores aliada à cromatografia gasosa é de grande valia na área clínica por ser inócua, não invasiva e possuir precisão e especificidade. Os valores apresentados para a validação da presente metodologia demonstram sua qualidade com respeito a precisão, exatidão e especificidade.

De acordo com a figura 1, observa-se que os picos apresentam diferentes tempos de retenção (Tabela 1), corroborando com os fatores de separação da Tabela 2, sendo que, quanto maior o fator de separação mais distante os picos se apresentam.

Com relação à análise de urina, nota-se que os resíduos presentes na mesma não interferem na separação dos analitos de interesse. Portanto, o método apresentou-se seletivo, uma vez que, foi capaz de distinguir o analito de interesse na presença de interferentes da matriz^{1,9,14}.

A linearidade compreende a capacidade do método em obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em um intervalo específico^{1,9,14}, o qual pode ser verificados com os resultados da curva de calibração.

O limite de detecção (LD), considerado concentração em que a razão entre o sinal gerado pelo analito e o ruído gerado pelo branco for igual a 3, e o limite de quantificação (LQ), caracterizado pela concentração em que a razão entre o sinal gerado pelo analito e o ruído gerado pelo branco for igual a 10; verificou-se LD e LQ correspondem a concentrações 10 e 5 vezes mais diluído que a menor concentração da curva de calibração, respectivamente (Tabela 4), apontando boa sensibilidade do método.

A experimentação animal, após a padronização do método, possibilitou sua validação em amostras de urina e aplicabilidade do mesmo, o qual resultou em dados coerentes.

A utilização preferencial da urina após 5 horas a administração da dose oral de lactulose e manitol, viabiliza a realização do teste em um período curto de tempo, sendo esta uma vantagem relevante.

Conclui-se, portanto, que o método proposto pode ser uma excelente ferramenta no estudo clínico de doenças relacionadas com a modificação da permeabilidade intestinal, sendo este menos invasivo quando comparado com outros métodos já existente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à FAPESP pela bolsa concedida, processo n° 2006/06040-0.

O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (Protocolo n°127/206).

REFERÊNCIAS

- 1- ANVISA-BRASIL. Guia para validação de métodos analíticos e Bioanalíticos. Resolução-Re n°. 899, de 29 De Maio de 2003.
- 2- BARBOZA Jr., M.S.; SILVA, T. M. J.; GUERRANT, R. I. & LIMA, A. A. M. – Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. Brazilian Journal of Medicine and Biological Research 32:1499-1504 (1999)
- 3- BIJLSMA, P. B.; PEETERS, R. A.; GROOT, J. A.; DEKKER, P. R.; TAMINIAU, J. A. J. M. & DER MEER, R. V. – Differential in vivo and in vitro intestinal permeability to lactulose and mannitol in animals and humans: a hypothesis. Gastroenterology 108:687-696, 1995.
- 4- CLAUSEN, M. R. & MORTENSEN, P. B. – Lactulose, disaccharides and colonic flora. Clinical consequences. Drugs, 53(6):930-942, 1997.

- 5- DUMAS, F.; AUSSEL, C.; MARTIN, P. & GIBOUDEAU, J. – Gas Chromatography applied to the lactulose-mannitol intestinal permeability test. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 654:276-281, 1994.
- 6- FARHADI, A.; KESHAVARZIAN, A.; FIELDS, J. Z.; SHEIKH, M. & BANAN, A. – Resolution of common dietary sugars from probe sugars for test of intestinal permeability using capillary column gas chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 836(1-2):63-68, 2006.
- 7- FARHADI, A.; KESHAVARZIAN, A.; HOLMES, E.W.; FIELDS, J.; ZHANG, L. & BANAN, A. – Gas chromatographic method for detection of urinary sucralose: application to the assessment of intestinal permeability. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 784:145-154, 2003.
- 8- FELD, J. J.; MEDDINGS, J. & HEATHCOTE, E. J. – Abnormal intestinal permeability in primary biliary cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.*, 51:1607-1613, 2006.
- 9- INMETRO. Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. DOQ-CGCRE-008 – Revisão 02 – JUNHO/2007.
- 10- JOHNSTON, S. D.; SMYE, M.; WATSON, R. G. P.; McMILLAN, S. A.; TRIMBLE, E. R. & LOVE, A. H. G. – Lactulose-mannitol intestinal permeability test: a useful screening test for adult coeliac disease. *Ann. Clin. Biochem.*, 37:512-9, 2000.
- 11- NAGPAL K.; MINOCHA V. R.; AGRAWAL V. & KAPUR S. – Evaluation of intestinal mucosal permeability function in patients with acute pancreatitis. *The American Journal of Surgery* 192:24-28, 2006.
- 12- LEE, J. & CHUL CHUNG. B. – Simultaneous measurement of urinary polyols using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 831:126-131, 2006.
- 13- PARONI R.; FERMO I.; MOLteni L.; FOLINI L.; PASTORE M. R.; MOSCA A. & BOSI E. – Lactulose and mannitol intestinal permeability detected by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 834(1-2):183-187, 2006.
- 14- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L. F. C. – Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím. Nova*, 27(5):771-780, 2004.
- 15- SPAHR, L.; BRESSON-HADNI, S.; AMANN, P.; KERN, I.; GOLAZ, O.; FROSSARD, J. L. & HADENGUE, A. – Allopurinol, oxidative stress and intestinal permeability in patients with cirrhosis an open-label pilot study. *Liver International* ISSN 54-60, 2007.
- 16- STEINER, J. M.; WILLIAMS, D. A. & MOELLER, E. M. – Development and validation for simultaneous separation and quantification of 5 different sugars in canine urine. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 164-170 (2000).
- 17- SUKKAR, S. G.; SCHENONE, E. – Experimental assessment of chemotherapy-induced early intestinal damage in colon cancer the lactulose-mannitol permeability test. *Tumori*, 90(5):461-463, 2004.
- 18- VENTURA, M.T.; POLIMENO, L.; AMORUSO, A. C.; GATTI, F.; ANNOSCIA, E.; MRINARO, M.; DI LEO, E.; MATINO, M. G.; BUQUICCHIO, R.; BONINI, S.; TURSI, A. & FRANCAVILLA, A. – Intestinal permeability in patients with adverse reactions to food. *Digestive and Liver Disease* 38:732-736, 2006.
- 19- VILELA, E. G.; FERRARI, M. L. A.; TORRES, H. O. G.; MARTINS, F. P.; GOULART, E. M. A.; LIMA, A. S. & DA CUNHA, A. S. – Intestinal Permeability and Antigliadin Antibody Test for Monitoring Adult Patients with Celiac Disease. *Dig. Dis. Sci.* 52:1304-1309, 2007.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior
 Curso de Nutrição e Metabolismo
 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP
 Av. Bandeirantes 3900
 CEP. 14049-900 Ribeirão Preto/SP
 Email: alceu@fmrp.usp.br
 Fone: 16 36024564

**Educação continuada à distância
 é com a SBAC**

Navegue pelo portal SBAC E-Learning

www.sbac.org.br/ead



SBAC
eLEARNING

A mais perfeita tradução de proximidade!