

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA LC-MS PARA A DOSAGEM DO HORMÔNIO CORTISOL EM FEZES DE MAMÍFEROS.

Maria Eduarda Teixeira Rocatto (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Flávio Augusto Vicente Seixas (Co-orientador), Antonio Campanha Martinez (Orientador). E-mail: ra127543@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Umuarama, PR.

Ciências Agrárias, Medicina Veterinária.

Palavras-chave:

Bem-estar animal; Estresse; HPLC-MS/MS.

RESUMO

Este estudo avaliou uma metodologia para quantificação de cortisol fecal em bovinos usando HPLC-MS/MS, comparando os resultados com a técnica de quimiluminescência. Para isso, amostras de fezes de nove animais foram coletadas e o cortisol extraído pelo método líquido-líquido. A dosagem foi realizada por comparação com curva de calibração. Os resultados mostraram variações significativas nos níveis de cortisol, de não detectável a 7.799 ng/mL, sugerindo problemas na homogeneização das amostras. A metodologia provou ser viável, mas a falta de uniformidade na distribuição do cortisol nas fezes indica a necessidade de uma homogeneização mais rigorosa antes de aplicar a técnica rotineiramente.

INTRODUÇÃO

A quantificação de glicocorticoides (GC) é frequentemente empregada para avaliar o bem-estar animal, devido sua função no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e na regulação do estresse (AGUIAR *et al.*, 2023). Tradicionalmente, a dosagem é realizada em amostras de sangue, método que pode induzir estresse e comprometer a precisão dos resultados. Como alternativa, a análise de metabólitos de cortisol em fezes se destaca como uma abordagem não invasiva, não estressante, e que não altera o comportamento natural dos animais (PALME, 2012). Este trabalho avaliou uma metodologia para a quantificação de cortisol fecal utilizando HPLC-MS/MS.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Foram coletadas amostras de nove animais, de ambos os sexos criados de forma extensiva, com suplementação de sal mineral em uma região de clima subtropical. Fezes frescas foram coletadas diretamente da ampola retal, no período da manhã, armazenadas em sacos plásticos (4°C), homogeneizadas manualmente com espátula, em menos de 30 minutos o processo para extração do cortisol foi iniciado. Para isso, foi adicionado 5 mL de metanol a 80% em 0,5 g de fezes em tubos de vidro, a mistura foi agitada em vórtex, por 2 min e centrifugada a 2.500 G por 15 min. Os sobrenadantes foram filtrados com filtro de seringa (0,45 µm) e transferidos para *vial* de LCMS, e permaneceram congelados (-20 °C), até análise. Para a curva de calibração, foram extraídos 5g de amostras de um *pool* de fezes, que foram adicionados com diferentes concentrações de cortisol. Os parâmetros da análise por LCMS/MS são mostrados na figura 01.

Item	Value	Setting	Units
Mode	Binary gradient	Binary gradient	
Total Flow	0.3000	0.3000	mL/min
B.Conc	35,0	35,0	%
Pump A Flow			mL/min
Pump B Flow			mL/min
Pump A Pressure	219		kgf/cm2
Pump B Pressure	220		kgf/cm2
Pump A Degassing Unit	-95		kPa
Pump B Degassing Unit	Not Connected		kPa
Oven Temperature	40,0	40	C
Temperature Limit(Maxi	90	90	C
Overlap Mode	Off	Off	
Vial No. (Autosampler)	1-2		
Injection Volume	10		µL
Nebulizing Gas Flow	3,0	3,0	L/min
Drying Gas Flow	7,0	7,0	L/min
Heating Gas Flow	13,0	13,0	L/min
Interface	ESI		
Interface Voltage		4,0	kV
Interface Current	6,7		uA
Interface Temperature	370	370	C
Desolvation Temperatur	631	631	C
DL Temperature	110	110	C
Heat Block Temperature	450	450	C
Conversion Dynode Volt		10,0	kV
Detector Voltage		1,66	kV
IG Vacuum	2,6e-03		Pa
PG Vacuum	1,4e+02		Pa
CID Gas	270	270	kPa

Figura 01- Parâmetros do HPLC e do MS para detecção do cortisol extraído das fezes.

Foram injetadas 14 amostras (9 animais e 5 para a curva de calibração) de 10 µL cada, totalizando 28 injeções (duplicata). Além disso, amostras de soro de três dos animais tiveram o teor de cortisol mensurado por quimiluminescência para comparação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 2 (A e B), mostra o cromatograma TIC+ usado para na detecção do cortisol, no tempo de 6,8 min e, a figura 2 (C) mostra a curva de calibração utilizada na

dosagem. Nos teores corrigidos com o teor de diluição, observou-se uma discrepância que varia do não detectável à 7.799 ng/mL (Tabela 01).

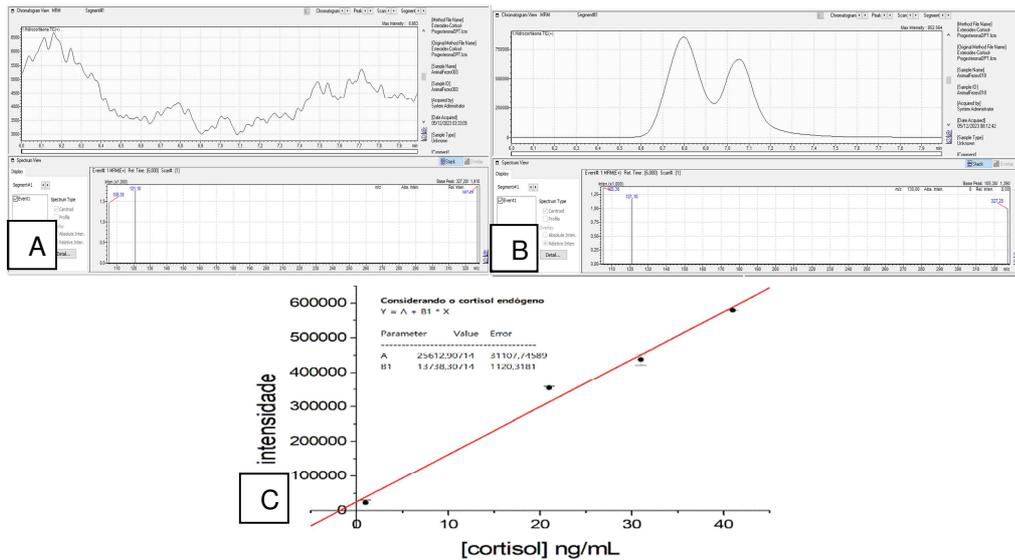


Figura 02. A- Cromatograma TIC+ do cortisol extraído da amostra de fezes do animal 01. Verifica-se que o pico referente ao cortisol não aparece nos tempos de retenção 6,80 e 7,05 min. B- Cromatograma TIC+ do cortisol extraído da amostra do animal 36. Nota-se que o pico referente ao cortisol é bem evidente nos tempos devidos. C- Curva de calibração para dosagem de cortisol nas amostras.

Tabela 1 Comparação entre os teores de cortisol dosado nas fezes (LCMS-MS) com o teor dosado no soro (quimioluminescência).

Método	Valor dosado (ng/mL)	
	Média	Desvio Padrão
LCMS/MS	1.166,71	2.429,89
Quimioluminescência	24,67	17,47

O cortisol, junto com outros esteroides e sais biliares, não é excretado uniformemente no duodeno, o que pode causar concentração desigual nas fezes (MOBIGLIA, 2014), justificando a importância de uma homogeneização rigorosa das amostras, talvez por falha nesta homogeneização possa ser suposto a grande

alteração em alguns dos valores encontrados, chegando a 7.799 ng/mL em uma das amostras, e com isto há uma possível falha na apresentação dos resultados obtidos.

CONCLUSÕES

O método de LCMS/MS permitiu a identificação e dosagem do hormônio esteroide cortisol em amostras de fezes de bovinos, indicando a viabilidade da metodologia. Contudo, a discrepância entre os teores dosados nas fezes entre os animais e com o soro, sugere a necessidade de uma homogeneização mais eficaz das amostras antes de aplicar a metodologia para as análises de rotina.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao programa PIBIC-CNPq/UEM, CAPES e Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, D.; MARQUES, C.; PEREIRA A.C. The Importance of Monitoring Cortisol in the Agri-Food Sector-A Systematic. *Metabolites*. Portugal, v. 13 n.6, p. 692, Maio, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10302238/> Acesso em: 26 Ago. 2024.

PALME, R. Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Anim. Welf.* Austria, v. 21, n. 3, p. 331-337, Ago. 2012. Disponível em: <https://www.ufaw.org.uk/downloads/awj-abstracts/v21-3-palme.pdf>. Acesso em: 26 Ago. 2024.

MOBIGLIA, A.M.; CAMILO, F. R.; FERNADES, J.J.R. Mensuração de metabólitos de cortisol nas fezes como um indicador de estresse em bovino de corte. *Arch. Zootec.* Goiás, V. 63, n. 241, p. 1-9. Jan. 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/316892772_Mensuracao_de_metabolitos_de_cortisol_nas_fezes_como_um_indicador_de_estresse_em_bovino_de_corte. Acesso em: 26 Ago. 2024.