

Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Exatas
Pós Graduação em Química

Brenda Lee Simas Porto

Métodos rápidos para análise de ácidos graxos em alimentos e seleção de biomarcadores para aterosclerose

Juiz de Fora
2015



Brenda Lee Simas Porto

Métodos rápidos para análise de ácidos graxos em alimentos e seleção de biomarcadores para aterosclerose

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração: Química Analítica, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Juiz de Fora

2015

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Simas Porto, Brenda Lee.

Métodos rápidos para análise de ácidos graxos em alimentos e seleção de biomarcadores para aterosclerose / Brenda Lee Simas Porto. -- 2015.
111 f.

Orientador: Marccone Augusto Leal de Oliveira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

1. Ácido graxo. 2. Gordura trans. 3. Ácido linoleico conjugado. 4. Aterosclerose. 5. Metabolômica. I. Leal de Oliveira, Marccone Augusto, orient. II. Título.

Dedico esse trabalho aos
meus pais, pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar pelos caminhos de luz.

Ao meu esposo Thiago. Meu amor, meu amigo, meu companheiro de todas as horas. Não existem palavras pra expressar toda a gratidão que sinto por você, que me ajudou e me apoiou em absolutamente tudo, desde o momento que entrou na minha vida. Estar em sintonia com o ser amado é a melhor coisa do mundo, e nós somos assim... Te amo!!

Aos meus amados pais Ely e Inês por todo o incentivo, por me ensinarem a ser persistente e dedicada, por nunca deixarem de acreditar em mim, os amo muito! À minha "rimã" Cindy por todo o carinho, amizade, cumplicidade e torcida, te amo Magrela!!

À minha família por toda a torcida e apoio, em especial aos meus avós Joaquim e Tereza e aos meus tios Adilson e Maria do Carmo.

Ao meu querido orientador Marcone, foram oito anos de muito aprendizado! Agradeço-te de coração por cada ensinamento, por toda a sua paciência, as risadas, os conselhos, por acreditar em mim, por me ajudar a crescer pessoal e profissionalmente, enfim, por sua amizade!

Ao professor Rafael Arromba pelos conselhos e amizade.

Às "ICs" Isaura e Jéssica pela ajuda com a parte experimental. No meio de todos os tubos e balões das extrações surgiu "o bonde do caderno azul"!

À todos os colegas que passaram pelo GQAQ, em especial à Cariñita, Fernando, nobre deputado Lucas, Paula, camarada Pedro, Rafael, Renatinha e Sandro fanfarrão. Agradeço pela amizade e aprendizado, compartilhamos angustias, medos, tristezas e até uma pontinha de loucura! Mas também houve muitas risadas, festas, piadas, cafés, alegrias e cervejas (mesmo sem que eu bebesse ahaha)!! Foi mais fácil passar por tudo isso com vocês!

Aos professores do Departamento de Química pelos ensinamentos, sobretudo àqueles que participaram diretamente em minha formação: Alexandre Leitão, Aloísio, Ana Paula, Adilson, Cherrine, Denise, Dora, Eugênio, Flávia, Hélio, Joana, Júlio, Luiz Fernando, Mauro, Mireille, Mônica, Renata, Renato, Richard e Rosana.

À Céphora, Hernani, Kenia, Marco e Mônia pelas conversas sobre cromatografia a gás, aprendi muito com vocês. Muito obrigada!

Ao Douglas pela ajuda com as análises térmicas dos óleos vegetais.

Aos demais colegas da química com quem estudei, aprendi, fiz trabalhos e provas... Muito obrigada a todos vocês!

Aos queridos companheiros da CEU, minha família em 2012. Obrigada pelo apoio, torcida, passeios, risadas e festas: Claudia, Daniela, Juliana, Kenia, Marcel e Thiago Gomes.

À professora Marina Tavares por me indicar para a mobilidade acadêmica, foi uma grande oportunidade para aprender, muito obrigada!

À professora Coral Barbas e demais professores do CEMBIO pelo estágio e aprendizado durante a estadia na Espanha.

Aos colegas do CEMBIO por me ensinarem o preparo das amostras e o tratamento dos dados para LC-MS e GC-MS, em especial à Gi e à Alessia.

Aos colegas da gastronomia pelas amostras de óleos vegetais, pelas incríveis criações na cozinha e excelentes momentos de descontração, pelo apoio, torcida e risadas.

À banca de qualificação professora Céphora, Gustavo e Marco pelas correções, contribuições e sugestões.

À Universidade Federal de Juiz de Fora pela infraestrutura e apoio à participações em eventos.

À FAPEMIG pela bolsa concedida.

À Força Aérea Brasileira e à empresa EADS-CASA pelo convênio de mobilidade acadêmica e pela bolsa concedida.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

"Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir."

Cora Coralina

RESUMO

Foi proposto um método alternativo para a determinação de ácidos graxos *trans* expressos em ácido elaídico por CZE com detecção direta no UV. A solução de eletrólito consistiu de 12,0 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, 12,0 mmol L⁻¹ de brij 35 e MeOH/ACN na proporção de 33:17 v:v. Os ácidos graxos *trans* foram quantificados com sucesso em amostras de bala de caramelo, mistura para bolo, waffer recheado, chocolate e mistura para pão de queijo em 13 minutos de análise com a estatística baseada no cálculo de uma fator de resposta usando o ácido cis-nonadecaenóico como padrão interno. A comparação estatística entre CZE-UV e o método clássico de análise por GC-FID não apresentou diferenças significativas no intervalo de 95% de confiança. Também foi proposto um método alternativo para análise *target* de CLA por *fast* GC usando a coluna SLB-IL111 com 15 m de comprimento e 0,10 mm de diâmetro interno. A separação ocorreu em isoterma a 168 ° C e os isômeros de CLA *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 eluíram em 4,6 e 4,7 minutos, respectivamente. Duas amostras de leite com diferentes teores de CLA em sua composição foram analisadas e quantificadas por adição de padrão. A comparação estatística entre o método proposto com a coluna SLB-IL11 e o método clássico de análise por GC-FID com a coluna CPSil-88 não apresentou diferenças significativas no intervalo de 95% de confiança. O terceiro foco deste trabalho envolve a busca de biomarcadores para aterosclerose instável, utilizando a abordagem de *fingerprint* em metabolômica. Foi selecionado um grupo de 38 pacientes, entre homens e mulheres, metade diagnosticada com aterosclerose instável e metade com aterosclerose estável. A partir da análise do plasma desses pacientes, por LC-MS e GC-MS, foi possível selecionar 25 metabólitos como candidatos a biomarcadores para a enfermidade. Destes, apenas 18 puderam ser identificados e classificados como ácidos graxos, aminoácidos e carnitinas. Sua variação entre as amostras testadas sugere que a alimentação humana pode estar relacionada com as diferenças no metabolismo de pacientes diagnosticados com aterosclerose estável e instável.

Palavras chave: Ácido graxo. Gordura *trans*. Ácido linoleico conjugado. Aterosclerose. Metabolômica.

ABSTRACT

An alternative method for determination of trans fatty acids expressed as elaidic acid in CZE-UV with direct detection was proposed. The background electrolyte used consisted of 12,0 mmol L⁻¹ of sodium tetraborate buffer, 12,0 mmol L⁻¹ of brij 35 and MeOH/ACN in ratio 33:17 v:v. Trans fatty acids in different samples such as butter toffee, cake mix, stuffed wafers, chocolate and a mix for brazilian cheese bread were successfully quantified within an analysis time of 13 min, considering the statistical approach based on response factor calculation using cis-nonadecaenoic acid as internal standard. The statistical comparison between CZE-UV and the classical GC method for the analyzed samples did not present significant differences within the 95% confidence interval. Also was proposed an alternative method for the target analysis of CLA by fast GC using the SLB-IL111 column with 15 m length and 0.10 mm in internal diameter. The separation occurred with isotherm at 168 ° C and the CLA isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 eluting at 4.6 and 4.7 minutes, respectively. Two samples of milk with different CLA content in its composition was analyzed and quantified by standard addition. The statistical comparison between the proposed method with the column SLB-IL111 and the classical GC method with the column CPSil-88 did not present significant differences within the 95% confidence interval. The third focus of this work involves the search of biomarkers for unstable atherosclerosis, using fingerprint approach in metabolomics. It selected a group of 38 patients, men and women, half diagnosed with unstable atherosclerosis and half with stable atherosclerosis. From the plasma analysis of these patients, by LC-MS and GC-MS, 25 metabolites as biomarkers candidate for this disease were selected. In which, only 18 could be identified and classified as fatty acids, amino acids, and carnitines. Its variation between samples suggests that human food may be related to the differences in the metabolism of patients diagnosed with stable and unstable atherosclerosis.

Keywords: Fatty acid. Trans fat. Conjugated linoleic acid. Atherosclerosis. Metabolomic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. 1– Etapas de trabalho para análises <i>metabolic fingerprinting</i>	22
Figura 3. 1 – Exemplo de AG saturado e insaturado.....	24
Figura 3. 2 – Estrutura esquemática de isômeros cis-trans.....	25
Figura 3. 3 – Diferentes nomenclaturas para o ácido linolênico.	25
Figura 4. 1 – Representação esquemática de um equipamento de CE-UV-Vis.....	31
Figura 4. 2 – Representação esquemática de um equipamento de HPLC.	34
Figura 4. 3 – Representação esquemática de um equipamento de GC.	36
Figura 4. 4 – Analisador de massa do tipo Quadrupolo - TOF.	39
Figura 5. 1 – Amostras de alimentos analisados.....	43
Figura 5. 2 – Processo de extração lipídica.	44
Figura 5. 3 – Procedimento de saponificação.	45
Figura 5. 4 – Procedimento de transesterificação.	46
Figura 5. 5 – Eletroferogramas para misturas de padrões.	49
Figura 5. 6 – Eletroferogramas dos diferentes alimentos processados analisados.	52
Figura 5. 7 – Cromatogramas para os diferentes alimentos processados analisados.	55
Figura 5. 8: Comparação da análise de gordura trans por GC e CE.	56
Figura 6. 1 – Processo de extração lipídica.	60
Figura 6.2 – Procedimento de transesterificação.	61
Figura 6. 3 – Cromatogramas mostrando a eluição dos isômeros de CLA.....	65
Figura 6. 4 – Comparação dos métodos de extração para amostras de manteiga.....	66
Figura 6. 5 – Adição de padrão de CLA <i>cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12</i> à amostras de leite.	67
Figura 7. 1 – Esquema do preparo das amostras para análise por GC-MS.	76
Figura 7. 2 – Esquema do preparo das amostras para análise por LC-MS.	79
Figura 7. 3 – Representação do modelo de OPLS-DA obtido para a técnica de GC-MS.	83
Figura 7. 4 – Comparação do cromatograma das amostras 30 e 13.....	84
Figura 7. 5 – Representação do modelo de OPLS-DA obtido para a técnica de LC-MS.	85
Figura 7. 6 – Representação da previsão das amostras não participantes do modelo por LC-MS.	86
Figura 7. 7 – Relação entre os candidatos a biomarcadores encontrados nas diferentes plataformas analíticas.....	90
Figura A1.1 – Revisão da literatura sobre análise de AG por CE.....	106
Figura A1.2 – Análise de óleos vegetais, NIR, MIR e Raman.	107
Figura A1.3 – Análise de gordura <i>trans</i> por CE e GC.....	108
Figura A2. 1 – Planejamento de experimentos no preparo de amostras.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Valores utilizados para gerar o modelo de regressão, razão entre AEL/IS.....	50
Tabela 5.2 – Resultados estatísticos para o modelo de análise de AGT.	50
Tabela 5.3 – Resultados da quantificação dos AGT por CE e GC.	54
Tabela 6.1 – Diluição das amostras de leite.....	62
Tabela 6.2 – Resultados da quantificação do CLA em leite.	69
Tabela 7.1 – Relação dos pacientes do grupo piloto e estágio da enfermidade.	74
Tabela 7.2 – Relação dos pacientes do grupo de validação do modelo e estágio da enfermidade.....	75
Tabela 7.3 – Resultados obtidos pela análise dos dados de GC-MS.....	82
Tabela 7.4 – Resultados obtidos pela análise dos dados de LC-MS.	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
AEL	Ácido elaídico
AES	Ácido esteárico
AGEs	Ácidos graxos essenciais
AGL	Ácidos graxos livres
AGP	Ácido graxo poli-insaturado
AGS	Ácido graxo saturado
AGT	Ácido graxo trans
ALI	Ácido linoleico
ALN	Ácido linolênico
AOL	Ácido oleico
APA	Ácido palmítico
AVN	Ácido vacênico
Brij 35	Éter laurílico de polioxietileno 23
BSTFA	N, O – bis (trimetilsilil) trifluoracetamida
CE	Eletroforese capilar
CLA	Ácido linoleico conjugado
CZE	Eletroforese capilar de zona
d.e.	Diâmetro externo
d.i.	Diâmetro interno
DAD	Arranjo de diodos
DHA	Ácido docosahexaenóico
CCE	Comprimento de cadeia equivalente
ECV	Enfermidades cardiovasculares
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FEO	Fluxo eletrosmótico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EtOH	Etanol
FAME	Ésteres metílicos de ácidos graxos
FM	Fase móvel
GC	Cromatografia a gás
GC-FID	Cromatografia a gás com detecção por ionização em chama

GC-MS	Cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas
HAc	Ácido acético
HDL	Colesterol de alta densidade
HFo	Ácido fórmico
HPLC	Cromatografia a líquido de alta eficiência
IS	Padrão interno
LC-MS	Cromatografia a líquido com detecção por espectrometria de massas
LDL	Colesterol de baixa densidade
ME	Metil éster
MeOH	Metanol
MS/MS	Espectrômetro de massas acoplado
PS	Pico do sistema
O-MtAm	Cloridrato de orto-metoxiamina
TMCS	Trimetilclorosilano
TOF	Analisador de massa por tempo de voo
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 METABOLÔMICA	20
3 OS ÁCIDOS GRAXOS	24
4 TÉCNICAS ANALÍTICAS	30
4.1 ELETROFORESE CAPILAR.....	30
4.2 CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA	33
4.3 CROMATOGRAFIA A GÁS	35
4.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	37
5 ANÁLISE RÁPIDA DE GORDURA TRANS EM ALIMENTOS PROCESSADOS POR CZE-UV COM DETECÇÃO DIRETA	40
5.1 OBJETIVOS.....	41
5.1.1 Objetivos Gerais.....	41
5.1.2 Objetivos específicos.....	41
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.2.1 Reagentes e soluções.....	42
5.2.2 Amostras	43
5.2.3 Procedimento para extração lipídica	44
5.2.4 Procedimento de preparo de amostra para CE	45
5.2.5 Procedimento de preparo de amostra para GC	45
5.2.6 Instrumentação	46
a) CE.....	46
b) GC.....	47
5.2.7 Tratamento de dados	48
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
5.4 CONCLUSÕES.....	55
6 ANÁLISE RÁPIDA DE CLA EM LEITE POR FAST GC-FID	57

6.1 OBJETIVOS.....	58
6.1.1 Objetivos Gerais.....	58
6.1.2 Objetivos específicos	58
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS	59
6.2.1 Reagentes e soluções.....	59
6.2.2 Amostras	59
6.2.3 Procedimento para extração lipídica	59
6.2.4 Procedimento de transesterificação	60
6.2.5 Diluição das amostras para quantificação	61
6.2.6 Instrumentação para GC-FID	62
6.2.7 Tratamento de dados	63
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	63
6.4 CONCLUSÕES.....	69
7 SELEÇÃO DE BIOMARCADORES EM PLASMA HUMANO POR ANÁLISE FINGERPRINT.....	70
7.1 OBJETIVOS.....	71
7.1.1 Objetivo geral	71
7.1.2 Objetivos específicos	71
7.2 MATERIAIS E MÉTODOS	72
7.2.1 Reagentes e soluções.....	72
7.2.2 Obtenção e seleção das amostras.....	72
7.2.3 GC-MS	75
7.2.4 LC-MS.....	78
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	81
7.3.1 GC-MS	81
7.3.2 LC-MS.....	83
7.3.3 Interpretação biológica.....	86

7.4 CONCLUSÕES	90
8 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	92
REFERÊNCIAS.....	93
APÊNDICE 1 TRABALHOS PUBLICADOS.....	106
APÊNDICE 2 CAPÍTULO DE LIVRO.....	109
APÊNDICE 3 TRABALHOS PARALELOS	110
APÊNDICE 4 COLABORAÇÕES	111
APÊNDICE 5 PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS	113

1 INTRODUÇÃO

A industrialização e a vida moderna introduziram nos hábitos humanos escolhas pouco saudáveis. O tempo, outrora dedicado ao preparo de refeições caseiras e à prática de atividades prazerosas, foi cada vez mais tomado pelo trabalho, trânsito e atividades desgastantes. Por estarem sempre cansadas e sem tempo as pessoas foram optando por escolhas mais fáceis e práticas como o consumo de alimentos industrializados, em alguns casos, em associação com o abandono das atividades físicas. Todavia, movimentos recentes como o *slow food* (MALATESTA *et al.*, 2007) e documentários em prol do resgate aos bons hábitos de alimentação evidenciam a preocupação humana com sua saúde e a crescente busca por alimentos mais saudáveis e confiáveis.

Os alimentos são compostos por três principais macronutrientes: as proteínas, os carboidratos e os lipídeos. Este último grupo está presente nas discussões cotidianas através da preocupação com o consumo de gordura saturada, gordura trans, ômega-3 e para os adeptos ao *fitness*, preocupações inclusive com o consumo de ácido linoleico conjugado (CLA). Os ômega-3 podem auxiliar na diminuição do processo inflamatório causador de enfermidades cardiovasculares (TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000; VALENZUELA e NIETO, 2003; MCLEOD *et al.*, 2004; AMANO *et al.*, 2011), enquanto que as gorduras saturadas e gorduras *trans* têm sido relacionadas ao aumento deste processo inflamatório (SILVA e FERRAZ, 2006; MOSSOBA *et al.*, 2009), o CLA por sua vez, tem sido relacionado com a perda de gordura corporal e a ação anticarcinogênica (PARIZA *et al.*, 2001; CHILLIARD *et al.*, 2007).

A exposição de informações nos rótulos tais como “não contém *trans*” ou “contém ômega-3”, pode trazer ao consumidor uma falsa sensação de tranquilidade. A ANVISA preconiza através da Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003) que se pode declarar um alimento com “zero” de ácido graxo *trans* quando ele contiver valor menor ou igual a 0,2 g por porção deste tipo de gordura. Tal fato é preocupante do ponto de vista nutricional, pois pode levar um consumidor em condições físicas ou fisiológicas particulares a

ingerir compostos que podem agravar seu quadro clínico de transtorno metabólico.

Dentro desse contexto evidencia-se a necessidade de métodos analíticos mais rápidos que produzam, contudo, resultados tão confiáveis quanto os obtidos pelos métodos tradicionais para a análise da qualidade dos alimentos, tanto para controle industrial quanto para a proteção dos consumidores. Métodos mais rápidos podem ser úteis também para diminuir os custos com cada análise, aumentar a frequência analítica, e conseqüentemente auxiliar na agilidade do monitoramento e fiscalização da qualidade dos alimentos. Portanto, um dos objetivos deste trabalho foi propor métodos de análise de ácidos graxos (AG) considerados relevantes do ponto de vista nutricional, que fossem mais rápidos que o método clássico utilizado na técnica de GC, mas que gerassem resultados similares aos obtidos por essa técnica de separação.

Para tal, se propõe focar em pequenos conjuntos de analitos ligados a uma problemática específica, eximindo assim a necessidade da análise do perfil completo dos AG. Há casos em que informações pontuais e específicas a respeito da amostra são suficientes para resolver o problema, como em trabalho anterior, cujo objeto de estudo foi analisar os ácidos graxos poli-insaturados (AGP) da família dos ω -3 em amostras de ovos comuns e enriquecidos (PORTO *et al.*, 2011). Em casos como este, uma análise rápida e com menores morosidade e custo pode responder de forma satisfatória ao questionamento propulsor da investigação.

Durante o desenvolvimento deste projeto de pesquisa houve a oportunidade da realização de uma mobilidade acadêmica, no *Centro de Excelencia en Metabolómica y Bioanálisis (CEMBIO)* na *Universidad San Pablo* em Madri, Espanha. Este centro de pesquisa tem vasta experiência no que tange estudos que buscam biomarcadores para diversas enfermidades, confrontando análises químicas de diferentes grupos de pacientes a partir da utilização da quimiometria.

A busca de biomarcadores envolve diferentes abordagens de pesquisa no campo da metabolômica. Pode-se partir de vários tipos de amostras biológicas como plasma, soro, urina, tecido, saliva, e assim realizar análises exploratórias ou análises alvo. Os estudos de análise exploratória, como o desenvolvido neste trabalho, geralmente apresentam ao menos dois grupos de pacientes ou cobaias

com alguma enfermidade, submetidas a diferentes dietas, ou ainda a diferentes tratamentos com drogas. Os resultados das análises químicas das amostras em questão são confrontados a partir de modelos bioestatísticos. Tais modelos fornecem uma lista de metabólitos que diferenciam os grupos testados, e estes são os metabólitos considerados como candidatos a biomarcadores para o estudo.

Através da análise de amostras de plasma de pacientes com aterosclerose foi possível avaliar, ainda que indiretamente, os efeitos da má alimentação na saúde das pessoas. Foram investigados dois grupos de pacientes diagnosticados com aterosclerose em diferentes estágios: estável e instável. O cerne do estudo foi buscar metabólitos com potencial para serem utilizados como indicadores auxiliares no processo de diagnóstico precoce e prognóstico para tal enfermidade cardiovascular em pacientes que futuramente sejam diagnosticados com aterosclerose.

2 METABOLÔMICA

As ciências “ômicas” adotam uma visão holística das moléculas que compõem uma célula, tecido ou organismo. Destinam-se principalmente a detecção universal de genes (genômica), mRNA (transcriptômica), proteínas (proteômica) e metabólitos (metabolômica) em uma amostra biológica específica de uma maneira não-alvo e não-tendenciosa. Estas ciências podem ser aplicadas não só para uma maior compreensão dos processos fisiológicos normais, mas também em processos patológicos em que desempenham um papel na detecção, diagnóstico e prognóstico. Auxiliando então na nossa compreensão da etiologia de doenças, por exemplo, por sua estratégia de ação em que se presta a investigar várias moléculas de diferentes classes (HORGAN e KENNY, 2011). Destas ciências apenas a metabolômica foi utilizada neste trabalho, portanto, este texto tratará brevemente sobre sua definição e rotina de trabalho.

A metabolômica pode ser definida como o estudo dos metabólitos de dado um sistema (célula, tecido, fluidos ou organismo) sob um dado conjunto de condições. Embora o metaboloma, conjunto de moléculas que representam o metabolismo de um organismo, esteja delimitado por um menor domínio quando comparado ao proteoma ou ao transcriptoma, ele é mais diverso, contendo muitas moléculas biológicas diferentes, o que a torna física e quimicamente mais complexa do que os outros “omas” (URBANCZYK-WOCHNIAK *et al.*, 2003; GOODACRE *et al.*, 2004; HORGAN e KENNY, 2011).

Existem duas formas principais de abordagem dos estudos em metabolômica: *metabolite target analysis* e *metabolite untarget analysis*. A análise dirigida, *metabolite target analysis*, é o processo analítico clássico aplicado para medir a concentração de um número limitado de compostos conhecidos. Neste caso pode-se utilizar um método de preparo de amostras específico, direcionando assim a análise química. Já na análise não dirigida, *metabolite untarget analysis*, ou ainda, *metabolic fingerprinting*, é feita uma análise do perfil dos metabólitos presentes na amostra em estudo. O perfil das amostras de diferentes origens ou estados biológicos passam por modelagem multivariada, que considera tal perfil como sua impressão digital. Este recurso é mais utilizado quando não se tem muita informação a respeito do sistema

estudado e é a estratégia mais indicada para a busca de biomarcadores e diagnósticos (FIEHN, 2001; URBANCZYK-WOCHNIAK *et al.*, 2003).

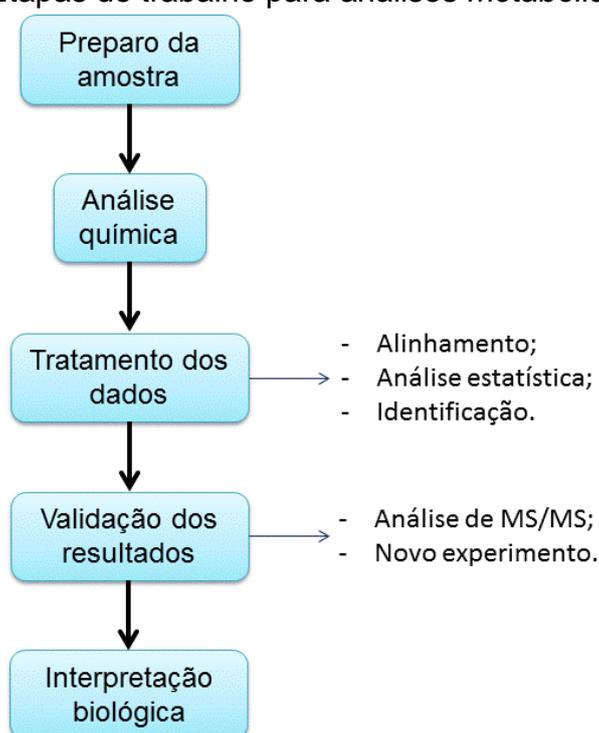
Com a abordagem *metabolic fingerprinting* a análise multivariada do conjunto de sinais permite estabelecer relações de diferenças e semelhanças entre os indivíduos cujas amostras estão sendo analisadas. Devido à grande variedade de propriedades físico-químicas e concentrações dos metabólitos nas amostras, não existe uma única técnica analítica que possa atender a identificação de todos eles (HORGAN e KENNY, 2011). Sendo assim, é bastante frequente empregar diferentes técnicas de separação acopladas com detectores de espectrometria de massas (MS) num mesmo estudo, ou ainda, utilizar também a ressonância magnética nuclear (NMR) para auxiliar na identificação destes compostos em um mesmo estudo (Funari *et al.*, 2013).

Em geral o tipo de amostra ajuda a definir a técnica analítica a ser utilizada no estudo. A GC-MS é compatível com metabólitos voláteis e termicamente estáveis como ácidos orgânicos, aminoácidos, aminas e açúcares (VALLEJO *et al.*, 2009; GARCÍA e BARBAS, 2011; GU *et al.*, 2011). Apresenta como principal vantagem o processo de tratamento de dados, por possuir uma biblioteca de espectros de massa comercial específica para estudos de metabolômica (KIND *et al.*, 2009). Entretanto, os métodos de preparo de amostra para se empregar esta técnica de separação são muito invasivos, incluindo a precipitação das proteínas e posterior derivatização do material contido no sobrenadante (GARCÍA e BARBAS, 2011). Além disso, a biblioteca de espectros está atrelada ao uso de coluna e método específicos para que a ordem de eluição possa ser considerada no tratamento de dados, o que são desvantagens.

A CE-MS é principalmente utilizada na análise de aminoácidos em amostras de urina e apresenta como principais vantagens um preparo simples da amostra, que inclui apenas filtração e diluição da mesma, curtos tempos de análise e demanda de pequena quantidade de amostra (BALDERAS *et al.*, 2010; ALBERICE *et al.*, 2013). Já a LC-MS é a técnica de separação mais versátil e utilizada para estudos de metabolômica, sendo compatível com compostos polares e apolares com pesos moleculares que variam desde cerca de 100 à cerca de 1500 Da (HORGAN e KENNY, 2011; CIBOROWSKI *et al.*, 2012; ALBERICE *et al.*, 2013; FUNARI *et al.*, 2013; GONZÁLEZ-PEÑA *et al.*, 2015). A principal desvantagem para essas técnicas de separação em meio líquido são a

falta de uma biblioteca de espectros de massas dedicada a estudos de metabolômica, o que torna lento o tratamento de dados. A figura 2.1 mostra um fluxograma que aponta as principais etapas de desenvolvimento de um estudo do tipo *metabolic fingerprinting*.

Figura 2. 1– Etapas de trabalho para análises *metabolic fingerprinting*.



Fonte: A AUTORA.

Após o tratamento estatístico e a obtenção de uma lista de massas significativas são realizadas pesquisas em diversas bases de dados gratuitas e disponíveis na internet (SMITH *et al.*, 2005; WISHART *et al.*, 2007; SUHRE e SCHMITT-KOPPLIN, 2008). Estas bases de dados auxiliam o analista na identificação dos metabólitos quando ele compara o espectro de massas obtido nas amostras com o espectro de massas apresentado nas bases de dados. Posteriormente ele precisa eliminar as interseções decorrentes do uso de diferentes bases de dados, e enfim obter uma lista de metabólitos identificados.

A partir dessa lista de candidatos a biomarcadores pode ser feita a interpretação biológica dos resultados. Esta interpretação considera as diferentes rotas metabólicas do sistema em estudo e propõe uma hipótese de alteração deste determinado sistema biológico. Para se comprovar essa

hipótese podem ser realizados novos experimentos, utilizando desta vez uma análise *target*, seja no mesmo conjunto de amostras, seja num novo conjunto.

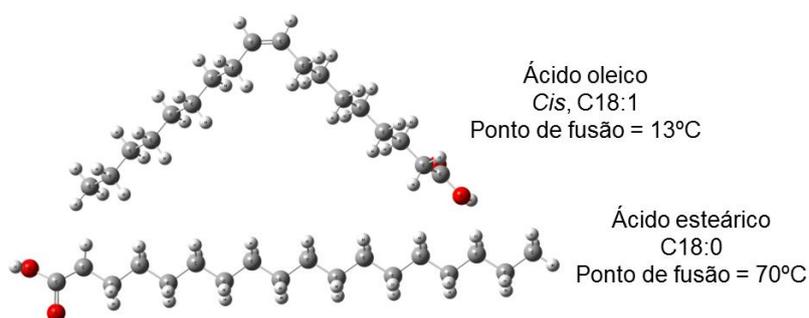
Pode-se perceber que os estudos de metabolômica são realmente complexos e exigem conhecimentos multidisciplinares como química analítica, espectrometria de massas, quimiometria, bioquímica e medicina. Desta forma, os grupos de pesquisa que trabalham neste nicho costumam ser compostos por pesquisadores de diferentes áreas como químicos, farmacêuticos, estatísticos, físicos, biólogos e médicos.

3 OS ÁCIDOS GRAXOS

Os AG são ácidos carboxílicos, geralmente monocarboxílicos, alifáticos, não ramificados, saturados ou insaturados, apresentando, na maioria das vezes, cadeia hidrocarbonada longa com número par de átomos de carbono. O grupo carboxila constitui a região polar dos AG, enquanto que o restante da cadeia é apolar. Existem muitas classificações para os AG quanto ao tamanho da cadeia carbônica e não cabe a esse texto discutir tal característica, contudo, os AG mais comuns possuem comprimento de cadeia entre 4 e 22 átomos de carbono (HARWOOD, 2007).

A presença ou não de insaturações na cadeia hidrocarbônica é outro aspecto de classificação dos AG, sendo chamados de saturados quando não possuem insaturações na cadeia carbônica e chamados de insaturados quando possuem uma (monoinsaturados) ou mais (AGP) insaturações (HARWOOD, 2007). A figura 3.1 exemplifica a disposição espacial do ácido esteárico (saturado) e do ácido oleico (insaturado). A cadeia hidrocarbônica de um AG saturado existe, geralmente, sob a forma estendida, uma vez que esta conformação linear, flexível é o estado de menor energia, ou seja, a cadeia estando estendida minimiza as repulsões entre os grupos metila vizinhos (SOLOMONS e FRYHLT, 2006).

Figura 3. 1 – Exemplo de AG saturado e insaturado.



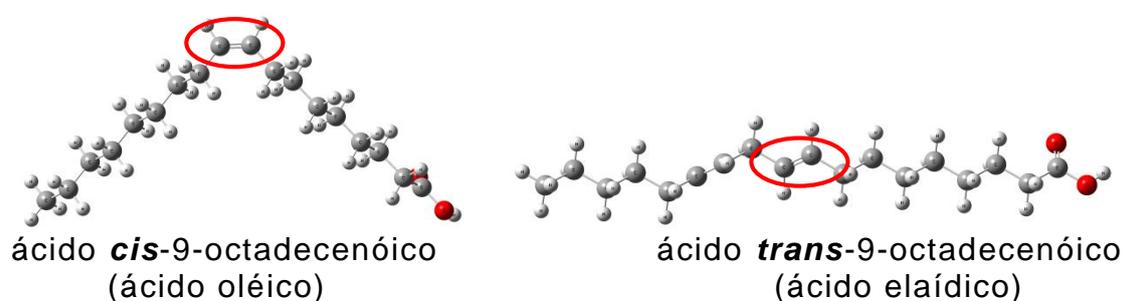
Fonte: A AUTORA.

Tal conformação linear permite um melhor empacotamento da cadeia carbônica, fazendo com que as moléculas de um AG saturado fiquem mais próximas. Em contraste, os AG insaturados contêm dobramentos rígidos em suas cadeias carbônicas, pois as duplas ligações praticamente não giram e uma

angulação de 30° é produzida para cada dupla presente na conformação *cis*. Como consequência, em geral os AG saturados possuem pontos de fusão maiores que AG insaturados (SOLOMONS e FRYHLT, 2006; HARWOOD, 2007).

A presença de insaturações restringe a rotação da cadeia hidrocarbônica, fazendo com que ocorra isomeria em torno da dupla ligação. O isômero chamado *cis* tem os dois hidrogênios ligados aos átomos da dupla ligação do mesmo lado de um plano imaginário traçado paralelamente à insaturação, enquanto que no isômero *trans* esses hidrogênios se encontram em lados opostos, figura 3.2.

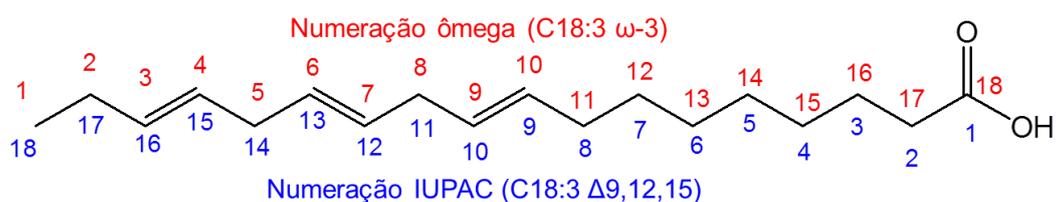
Figura 3. 2 – Estrutura esquemática de isômeros cis-trans.



Fonte: A AUTORA.

Existe ainda outra forma de se referir aos AG insaturados, conhecida como “família dos ácidos ômega”. Neste caso, a enumeração da cadeia hidrocarbônica começa a partir do primeiro carbono da extremidade oposta à carboxila (ao contrário das regras da IUPAC). Por exemplo, o ácido α -linolênico pode ser abreviado como: C18:3 Δ 9,12,15 ou como C18:3 ω -3, especificando apenas a dupla ligação localizada no carbono de número 3 contado a partir do último carbono da cadeia (SOLOMONS e FRYHLT, 2006), como apresentado na figura 3.3.

Figura 3. 3 – Diferentes nomenclaturas para o ácido linolênico.



Fonte: A AUTORA.

Ao enumerar os carbonos a partir do carbono mais distante do grupo carboxílico, é possível agrupar os diferentes AG em “famílias ω ” de acordo com a posição que estes apresentam a primeira dupla ligação em suas estruturas. Os principais representantes dessa família ω são o ácido oléico (AOL, ω -9), o ácido linoleico (ALI, ω -6) e o ácido linolênico (ALN, ω -3). E dentre eles os mais importantes são o ALN, cujas fontes predominantes são alguns óleos vegetais e de peixes, e o ALI, que é encontrado em óleos vegetais como de soja, de girassol e de milho (BENATTI *et al.*, 2004). Estes AG são importantes por serem considerados ácidos graxos essenciais (AGEs), ou seja, àqueles os quais o organismo humano é incapaz de produzir.

Esses AG tem sua biossíntese não realizada devido à ausência de enzimas que são capazes de inserir ligação dupla entre os carbonos 12-13 e 15-16. O ALN dá origem ao ácido eicosapentaenóico (EPA), e por conseguinte o ácido docosahexaenóico (DHA) que pertencem a classe dos ω -3, enquanto que o ALI, depois da biossíntese gera o ácido araquidônico (ARA). Para suprir as necessidades fisiológicas, o ALN e o ALI devem estar em quantidades suficientes na alimentação (LICHTENSTEIN *et al.*, 1993; JUDD *et al.*, 2002; HARWOOD, 2007).

As famílias de AG ω -3 e ω -6 competem entre si pela enzima delta-6-dessaturase. Logo, devido a essa natureza competitiva, cada AG pode interferir no metabolismo do outro, apresentando implicações nutricionais. Um excesso de ω -6 irá reduzir o metabolismo de ω -3, levando possivelmente a um déficit de seus metabólitos, incluindo o ácido docosahexaenóico (DHA), comprometendo o sistema imunológico. Entretanto, o aumento exagerado de ω -3 reduz a relação desses AG (ω -6: ω -3) a níveis baixos, de 3:1, propiciando assim alterações indesejáveis na coagulação sanguínea. Devido ao fato dos AGE necessitarem da mesma enzima para serem convertidos, ressalta-se a importante manutenção da proporção 5:1 entre ω -6 e ω -3 na dieta oral e enteral, pois esta proporção pode influenciar na formação de neurotransmissores e prostaglandinas, fatores que são vitais para manter a função cerebral normal (LICHTENSTEIN *et al.*, 1993; TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000; JUDD *et al.*, 2002; VALENZUELA e NIETO, 2003; MCLEOD *et al.*, 2004; AMANO *et al.*, 2011).

Desde 1980 diversos estudos têm investigado a importância dos AGP na alimentação humana, pois eles auxiliam no desenvolvimento cerebral e visual do bebê antes e após o nascimento. Além disso, contribuem para a diminuição dos níveis de triacilgliceróis e colesterol total no sangue, prevenindo assim enfermidades cardiovasculares (ECV) como a aterosclerose, aumentam a fluidez do sangue, diminuem a pressão sanguínea e reduzem a agregação plaquetária. Também são utilizados como mediadores de alergias em processos inflamatórios, em tratamentos contra epilepsia e ainda diminuem o risco de câncer de cólon (TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000; VALENZUELA e NIETO, 2003; MCLEOD *et al.*, 2004; AMANO *et al.*, 2011).

O processo inflamatório que ocorre nas artérias está diretamente ligado a ECV como a aterosclerose e estudos apontam que os ácidos graxos insaturados com conformação trans (AGT) oriundos da alimentação humana cada vez mais baseada em alimentos processados industrialmente, aumenta este processo inflamatório, afetando negativamente o funcionamento do endotélio. A literatura evidencia que o teor de AGT oriundos do processo de hidrogenação industrial de óleos vegetais é expresso em ácido elaídico (AEL), inclusive nas tabelas nutricionais, uma vez que este compreende de 80-100% dos AGT presentes em produtos industrializados que utilizam gordura vegetal hidrogenada (PARODI, 1976; ARO *et al.*, 1998). A importância do AEL para o metabolismo humano está relacionada com sua capacidade de inibir a ação das enzimas dessaturases, prejudicando a conversão do ALN em EPA. O EPA, que é convertido em prostaglandina, apresenta um importante papel nas atividades anti-inflamatórias do organismo, além de atuar na prevenção de coágulos nas artérias e veias (FERRUCCI *et al.*, 2006).

No entanto, os AGT de origem natural como o CLA, formados a partir do processo de biohidrogenação por bactérias da flora do sistema digestivo de ruminantes e encontrados principalmente na carne e no leite destes animais, têm chamado bastante atenção da comunidade científica. Embora possam existir muitos isômeros para o CLA, dois em particular têm se destacado em função dos seus efeitos biológicos positivos já identificados, os isômeros *cis*-9, *trans*-11 e o *trans*-10, *cis*-12. O isômero *cis*-9, *trans*-11 pode atuar como potente anticarcinogênico natural, enquanto que o isômero *trans*-10, *cis*-12 pode afetar o metabolismo lipídico, sendo então responsável por redução na quantidade de

gordura acumulada no corpo do animal. Esses efeitos foram observados em ensaios laboratoriais com ratos e em menor escala em seres humanos que exerçam algum tipo de atividade física (PARIZA *et al.*, 2001; CHILLIARD *et al.*, 2007).

O CLA pode ser formado no rúmen pela biohidrogenação incompleta de AG da dieta, mas também, endogenamente através da dessaturação do ácido graxo C18:1 *trans*-11, o ácido vacênico (AVN), por uma enzima presente na glândula mamária e tecido adiposo chamada estearoil-CoA dessaturase ou Delta dessaturase. Estudos com ruminantes, onde os pesquisadores promoveram a infusão de diferentes porcentagens de CLA no abomaso dos animais resultaram em significativa redução na produção e porcentagem de gordura no leite. Ocorreu diminuição nos AG de cadeia curta e média (4:0 - 14:0) e incremento nos AG de cadeia longa (18:0, 18:2 e 18:3) (JIANG *et al.*, 1996; CHOUINARD *et al.*, 1999; BAUMGARD *et al.*, 2001). A principal fonte de CLA na alimentação dos seres humanos é proveniente da gordura do leite e da carne de animais ruminantes, sendo que mais de 70% do CLA presente nesses alimentos é representado pelo isômero *cis*-9, *trans*-11 (MCLEOD *et al.*, 2004).

A partir do conhecimento dessas informações a respeito dos CLA a indústria de suplementos alimentares passou a produzir e comercializar cápsulas com CLA, como já é feito com os ω -3 há mais tempo. Mesmo sendo conhecidos efeitos benéficos para alguns isômeros de CLA o Ministério da Saúde, através do Informe técnico nº23 de 17 de abril de 2007 (BRASIL, 2007), proíbe a comercialização de suplementos a base de CLA no Brasil, pois seus fabricantes recomendam o uso de mais de 20 vezes às quantidades comumente consumidas pela população. O Ministério da Saúde entende que existem efeitos adversos relacionados ao consumo exagerado desses nutrientes, principalmente atribuídos ao isômero *trans*-10, *cis*-12 como a esteatose hepática, hiperinsulinemia e diminuição dos níveis séricos de leptina (WEST *et al.*, 1998; TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000; WEST *et al.*, 2000; KELLY, 2001; CLÉMENT *et al.*, 2002; GIBNEY *et al.*, 2002; TAKAHASHI *et al.*, 2002; YAMASAKI *et al.*, 2003; POIRIER *et al.*, 2005).

A respeito do exposto pôde-se verificar que os AG ω -3 auxiliam na reversão de processos de inflamação e redução da pressão sanguínea, os CLA, que são um tipo especial de gordura *trans*, possuem efeitos anticarcinogênicos

e podem auxiliar na redução de gordura corporal e os AGT como o AEL podem contribuir fortemente para o aumento de processos inflamatórios que estão ligados à ECV. Deste modo é importante ressaltar a relevância da educação alimentar da população no que diz respeito ao consumo de gorduras, pois enquanto algumas são benéficas, outras são muito prejudiciais à saúde.

4 TÉCNICAS ANALÍTICAS

4.1 ELETROFORESE CAPILAR

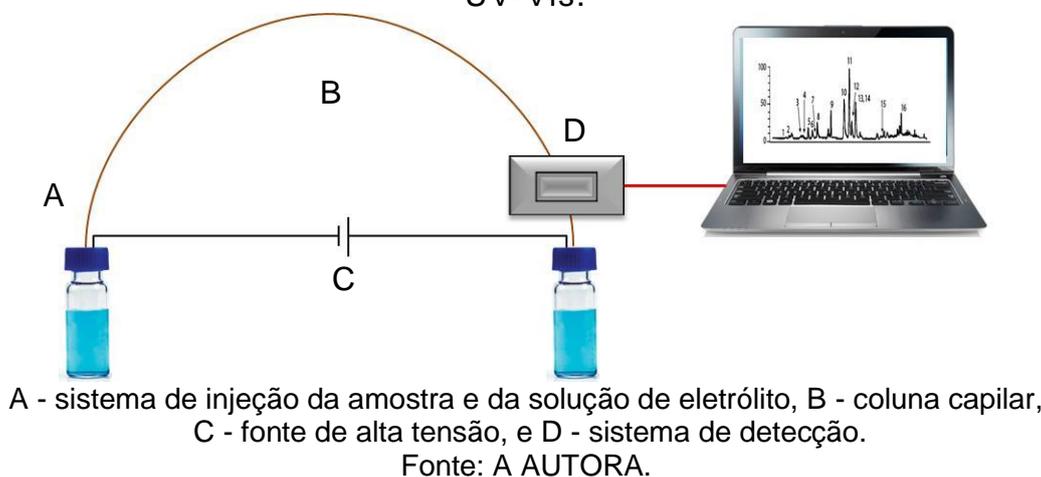
A Eletroforese Capilar (CE) é definida como uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos que podem ser neutros (desde que a carga seja gerada no sistema), íons solvatados ou espécies ionizáveis, através de uma solução de eletrólito contida no interior de um tubo capilar de sílica fundida, mediante a aplicação de um campo elétrico. Esta técnica de separação é muito versátil, existindo assim diversos modos de CE, para diferentes aplicações, matrizes e analitos.

No presente trabalho apenas o modo de eletroforese capilar de zona (CZE) foi utilizado, portanto apenas este modo de CE será tratado neste texto. Em CZE, a separação dos analitos é conduzida em tubos capilares (canal de migração) com dimensões que podem variar de 15 a 125 μm de diâmetro interno, e 36 a 100 cm de comprimento. A geometria do capilar (elevada área superficial interna em comparação ao volume) favorece a dissipação do calor (oriunda do efeito Joule), sendo possível o estabelecimento de campos elétricos substancialmente elevados (100 - 1000 V/cm), resultando em separações de alta eficiência (geralmente excede 10^5 pratos teóricos), alta resolução e curtos tempos de análise (BAKER, 1995; TAVARES, 1996).

Durante a análise, uma fonte de corrente contínua de alta tensão é utilizada para estabelecer o campo elétrico constante ao longo do capilar, com valores típicos de voltagem no intervalo de -30 a 30 kV. A fonte de alta tensão é conectada ao sistema de análise através de eletrodos de platina, imersos nos reservatórios de eletrólito, aos quais também ficam imersas as extremidades do capilar, fechando o circuito elétrico quando ocorre a aplicação da voltagem. A Figura 4.1, mostra um esquema simples para um equipamento típico de CE. Quando o campo elétrico é aplicado, cada zona (constituída de um analito) migra com velocidade constante (velocidade eletroforética), mas diferenciada, em função da razão carga/tamanho, proporcionando assim a separação. Numa dada condição ideal de diluição infinita e desconsiderando a força iônica, quanto maior for a carga e menor for o raio do íon solvatado, mais rapidamente este migrará pela solução de eletrólito. Para minimizar o aquecimento do capilar gerado

devido ao efeito Joule, este é acondicionado em cartuchos com sistema de termostatização por líquido ou ar forçado (Baker, 1995; Tavares, 1996).

Figura 4. 1 – Representação esquemática de um equipamento de CE-UV-Vis.



Uma característica importante em análises por CE é a presença do fluxo eletrosmótico (FEO), geralmente no sentido catodo-anodo que ocorre por influência do campo elétrico aplicado. O FEO é caracterizado por um perfil radial constante da velocidade, não contribuindo, portanto, para o alargamento das bandas. Esta peculiaridade diferencia a CE dos métodos cromatográficos em fase líquida, que apresenta uma variação parabólica para o perfil da velocidade dentro da coluna, característica do fluxo induzido por pressão. O controle adequado do FEO é de grande importância para a eficiência da separação, por isso as propriedades físico-químicas da solução de eletrólito devem ser controladas. Entre estas propriedades destacam-se o pH, concentração e força iônica do tampão, viscosidade, adição ou não de solvente orgânico e a temperatura de trabalho (BAKER, 1995; TAVARES, 1996).

Os AG de cadeia longa apresentam características semelhantes à de ácidos fracos cujos pKa são em torno de 5, e portanto, de maneira geral, para estes AG a separação é realizada em contra-fluxo (velocidades dos fluxos eletrosmótico e eletroforético na mesma direção, porém em sentido contrário), em solução de eletrólito com pH > 8 (para mantê-los em sua forma aniônica) e mediante a presença de grande percentual de solventes orgânicos no intuito de aumentar a solubilidade dos AG no meio condutor, impedindo assim que formem

micelas. A ordem de migração dos ácidos graxos saturados (AGS) de cadeia longa vai do C18 para o C10, pois quanto maior o tamanho, menor é a resistência ao fluxo eletrosmótico, logo maior é a velocidade aparente deste AG. Contudo, quando na amostra estão presentes AGS e ácidos graxos insaturados (AGI) não é tão simples prever a ordem de migração, pois as insaturações modificam o volume da cadeia do AGI, se este for comparado ao AGS com o mesmo número de carbonos na cadeia. Pode-se ter, todavia, uma previsão da ordem de eluição através do cálculo do comprimento de cadeia equivalente (CCE) apresentado na equação 1 (ERIM *et al.*, 1995; ROLDANASSAD e GAREIL, 1995):

$$CCE = N_C - 2N_{C=C} \quad (1)$$

onde N_C e $2N_{C=C}$ correspondem ao número total de carbonos e ao número total de duplas ligações, respectivamente.

Contudo, este cálculo é apenas uma estimativa, pois quando o número de insaturações aumenta, este fato oriunda o enovelamento das cadeias carbônicas dos AG, não permitindo assim que elas se apresentem estendidas como ocorre com AGS. Para a análise simultânea de AGS e AGI com tamanho entre 10 e 20 carbonos, incluindo espécies *cis-trans*, é frequente uso de ciclodextrinas na solução de eletrólito, pois elas atuam como discriminadores, devido à interação com sua cavidade, entre os isômeros geométricos. Também deve ser adicionado à solução de eletrólito um tensoativo que pode ser aniônico ou neutro, além de solventes orgânicos para facilitar a separação e a solubilização dos mesmos (ERIM *et al.*, 1995; ROLDANASSAD e GAREIL, 1995).

Toda a análise é monitorada por um sistema de detecção; ou seja, quando os analitos cruzam o detector, este registra o sinal na forma de picos com bandas de pequena espessura. Logo, um gráfico de sinal em função do tempo é registrado e recebe o nome de eletroferograma.

Uma característica bastante particular da técnica de CE é que a detecção dos analitos pode ocorrer na própria coluna capilar. Quando é utilizado capilar com revestimento externo que absorva na região do UV como é o caso do revestimento de polimida ou mesmo de teflon, deve-se retirar uma pequena seção de seu revestimento externo por queima. Esta seção serve como “cela” do detector e é comumente chamada de janela. A luz incide sobre a janela do capilar, onde a amostra absorve parte desta luz e a outra parte é detectada por

um fotodetector, geralmente, um fotodiodo (BAKER, 1995). O princípio da detecção por UV é baseado na Lei de Beer, em que a absorvância se relaciona com a concentração do analito através da equação 2:

$$A = abC \quad (2)$$

onde a é a absorvidade molar, b é o caminho óptico (em cm), que neste caso seria o diâmetro interno do capilar e C é a concentração do soluto. A absorvidade molar depende do grupo cromóforo presente na molécula a ser analisada (este é o sítio que absorve a luz na estrutura molecular do soluto), do comprimento de onda da luz incidente, do pH e da composição da solução de eletrólito.

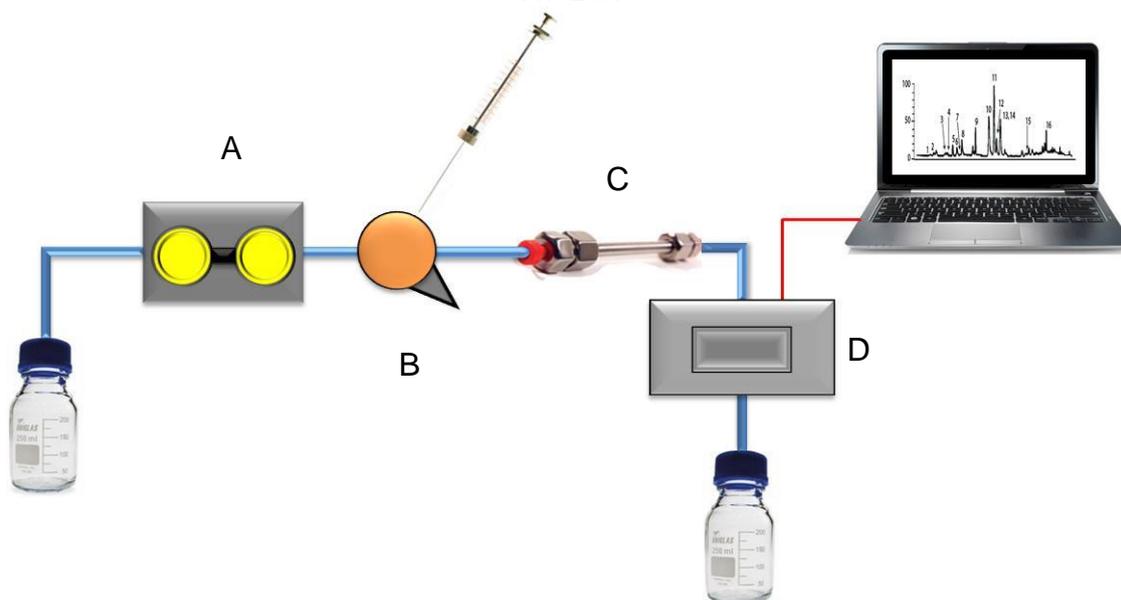
Os AGS possuem baixa absorvidade molar, e conseqüentemente são analisados por CZE com detecção indireta por UV. Este tipo de detecção baseia-se na adição de um agente cromóforo à solução de eletrólito. Este composto necessita ter alta absorvidade molar no comprimento de onda selecionado, mobilidade efetiva próxima a dos analitos, o que reduz a dispersão por eletromigração e ter preferencialmente carga elétrica negativa (ROLDANASSAD e GAREIL, 1995). O cromóforo mais utilizado na detecção indireta de AG por CE é o dodecilbenzenossulfonato de sódio (SDBS), seguido da adenosina monofosfato (AMP) (OLIVEIRA *et al.*, 2014). O cromóforo faz com que se forme uma linha base com alta absorvidade molar, sendo assim, quando um AG é detectado, a absorvidade molar decresce e isso constitui a detecção indireta. Entretanto, nem todos os AG são analisados unicamente de forma indireta, os AGI e principalmente os AGP possuem alguma absorvidade molar, podendo então ser analisados por detecção direta no UV (TAVARES *et al.*, 2003; PORTO *et al.*, 2011).

4.2 CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA

A Cromatografia a Líquido (LC) baseia-se na separação dos solutos pela interação dos analitos entre um solvente chamado de fase móvel e uma fase estacionária, seja ela sólida finamente dividida ou líquida imobilizada numa superfície sólida. Para diferenciar as técnicas clássicas de LC da versão moderna de separação em meio líquido, onde são necessárias bombas de alta

pressão e modernos sistemas de automatização, esta nova versão passou a ser chamada de cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC). Graças a esse sistema de alta pressão a HPLC é a técnica de separação mais difundida e utilizada em análises de rotina. Isso se dá por suas altas sensibilidade e resolução, fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e acima de tudo, sua ampla aplicabilidade a substâncias de interesse para a indústria e para muitos campos da ciência (AQUINO NETO e NUNES, 2003). Um esquema simplificado para o equipamento de HPLC é mostrado na figura 4.2:

Figura 4. 2 – Representação esquemática de um equipamento de HPLC.



A - bomba de alta pressão, B - sistema de injeção da amostra, C - coluna e forno da coluna e D - sistema de detecção.

Fonte: A AUTORA.

A HPLC possui quatro elementos fundamentais: o sistema de bombas de alta pressão, o sistema de introdução da amostra, a coluna cromatográfica e o sistema de detecção. As bombas de alta pressão estão relacionadas com o tempo de retenção, a repetibilidade e a sensibilidade do detector, pois podem interferir diretamente no alargamento das bandas, o que ocasionaria perda de sensibilidade. Por outro lado, estas podem ser operadas à pressão ou volume constante, dependendo da montagem do equipamento. A forma tradicional de

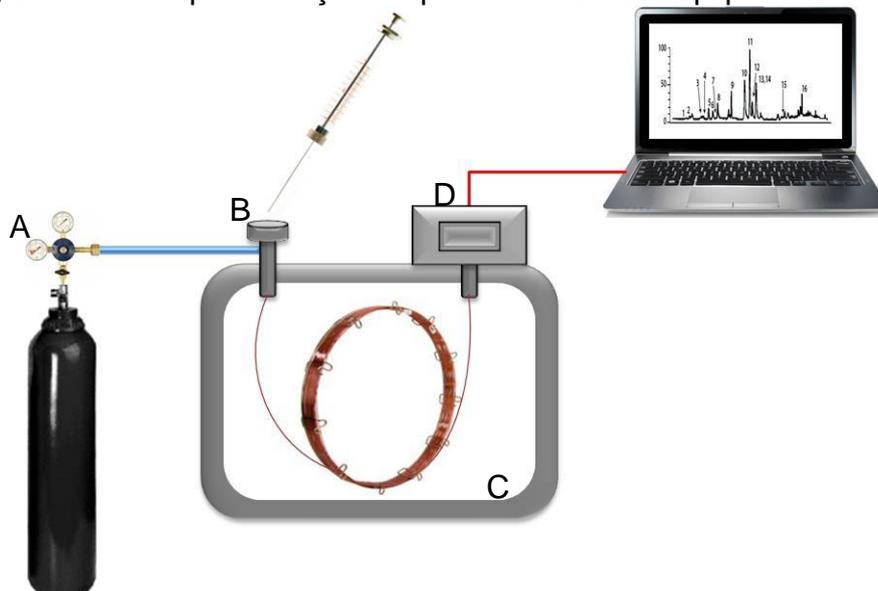
injetar a amostra nesse sistema é por meio de uma microsseringa de injeção mediante sistema manual ou automatizado com boa repetibilidade.

A coluna cromatográfica é o sistema de separação e em geral, para HPLC, são construídas de tubos de aço inoxidável. A maioria das colunas tem um comprimento total que varia entre 10 e 30 cm e d.i. de cerca de 5,0 mm. Uma coluna muito utilizada é a de fase reversa, chamada de C18, essa coluna separa compostos semi-polares como ácidos fenólicos, flavonoides e alcaloides. Já para separação de compostos polares como açúcares, vitaminas e ácidos orgânicos pode ser utilizada a cromatografia à líquido de interação hidrofílica (HILIC). Para a proteção da coluna é comum o uso de uma pequena coluna análoga com comprimentos que variam de 1 a 4 cm, são chamadas de coluna de guarda ou pré-coluna. O detector mais difundido é o de UV-Vis, por ser sensível a uma grande faixa de compostos e mais acessível devido ao valor de comercialização. Entretanto, nos últimos anos equipamentos de HPLC tem sido acoplados à detectores de espectrometria de massas (MS), o que revolucionou a sensibilidade e a gama de aplicações para essa técnica de separação (AQUINO NETO e NUNES, 2003; SKOOG *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2012).

4.3 CROMATOGRAFIA A GÁS

A cromatografia a gás (GC) é uma técnica física de separação dos componentes de uma mistura através de uma fase móvel gasosa inerte carregada sobre uma fase estacionária. Esta técnica é utilizada para a separação de compostos voláteis ou volatilizáveis, ou seja, os compostos a serem analisados devem apresentar compatível pressão de vapor à temperatura de separação (SKOOG *et al.*, 2006). Sendo assim, à medida que o caráter iônico do composto aumenta, e, portanto, diminui a sua volatilidade, diminui também a possibilidade de análise do mesmo por GC, o que não é problema para a técnica de CE que se aplica justamente a análise de compostos iônicos ou ionizáveis (TAVARES, 1996). Já a técnica de HPLC separa compostos polares e apolares, nos quais a pouca volatilidade não se apresenta como inconveniente (AQUINO NETO e NUNES, 2003). Na figura 4.3 é apresentado um esquema simplificado para o equipamento de GC:

Figura 4. 3 – Representação esquemática de um equipamento de GC.



A - suprimento de gás de arraste, B - sistema de injeção da amostra, C - coluna e forno da coluna e D - sistema de detecção.

Fonte: A AUTORA.

Um equipamento de GC pode ser dividido em 4 partes principais: suprimento de gás de arraste, sistema de injeção da amostra, colunas e forno da coluna e sistema de detecção. Os gases de arraste devem ser quimicamente inertes e os mais utilizados são o hidrogênio, hélio, nitrogênio ou argônio. A escolha do gás de arraste depende principalmente do tipo de detector utilizado, por exemplo, para cromatografia a gás com detecção por ionização em chama (GC-FID) normalmente utiliza-se o hidrogênio e para GC-MS o hélio (SKOOG *et al.*, 2006). Assim como para a HPLC, na GC a inserção da amostra é uma etapa muito importante, pois a ela está ligado, por exemplo, um possível alargamento das bandas, ocasionando perda de resolução. O método mais comum de injeção da amostra, líquida ou gasosa, envolve o uso de uma microseringa que injeta a amostra num vaporizador instantâneo localizado no topo da coluna cromatográfica a uma temperatura cerca de 50 °C acima da temperatura de vaporização do componente menos volátil presente na amostra (AQUINO NETO e NUNES, 2003).

Inicialmente as colunas de GC eram do tipo empacotada, entretanto, a partir da década de 60 estas foram substituídas por colunas capilares com fase estacionária aderida na parede interna para a maioria de aplicações, uma vez que proporcionam análises mais rápidas. As colunas capilares possuem

comprimento que varia de 2 até 100 m e precisam ser submetidas a altas temperaturas bem controladas para manter os analitos em sua forma gasosa após a injeção, por isso são montadas no interior de um forno com temperatura controlada. Os detectores localizam-se na saída da coluna e sua função é medir as pequenas quantidades dos componentes separados, presentes na corrente do gás de arraste que elui da coluna. Um dos detectores mais utilizados em GC é o detector por ionização em chama (FID). O FID é um queimador que entra em ignição eletricamente, levando à pirólise a maioria dos compostos de carbono presentes no fluxo de hidrogênio. Esses compostos de carbono, incluindo então os ésteres de AG, ao serem pirolisados produzem íons e elétrons capazes de conduzir eletricidade, a qual é amplificada, convertida e registrada.

4.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma poderosa e versátil ferramenta largamente utilizada para a determinação e quantificação dos compostos presentes em uma amostra. O princípio de funcionamento de qualquer espectrômetro de massas baseia-se na detecção de íons selecionados de acordo com a sua razão massa-carga (m/z), lembrando que m é a massa em u (unidade de massa atômica ou também conhecida como Dalton (Da), definida como 1/12 da massa de um átomo do isótopo de ^{12}C) (CROTTI *et al.*, 2006). Uma análise por espectrometria de massas envolve as seguintes etapas principais: ionização, separação dos íons formados pela razão m/z e contagem do número de íons de cada tipo. A maior parte dos íons formados possui carga unitária, conseqüentemente, m/z em geral é a massa do íon (PUIGGRÒS *et al.*, 2011).

As amostras podem ser introduzidas em um espectrômetro de massas de várias maneiras, sendo que a infusão direta e a infusão através de uma coluna capilar são as mais comuns. A infusão capilar pode introduzir pequenas quantidades da amostra no espectrômetro de massas sem destruir o vácuo. Esta técnica geralmente está acoplada a técnicas de separação incluindo a GC, HPLC e CE, que primeiramente separam os componentes de uma mistura para posterior análise. Existem várias técnicas de ionização, e isso se deve à grande variedade de amostras e espécies de interesse. Amostras sólidas, líquidas ou

gasosas, contendo espécies voláteis, ou não, e com interesses que englobam desde a análise elementar até a determinação da composição de proteínas, requerem diferentes processos de ionização (PUIGGRÒS *et al.*, 2011).

Os analisadores de massas separam os íons de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, a razão m/z . O analisador mais comum é o quadrupolo, pois é simples, tem preço relativamente baixo e facilidade de ser entendido e operado. O quadrupolo é composto por quatro barras de metal cilíndricas em que um par de barras é mantido em um potencial elétrico positivo, enquanto o outro a um potencial negativo. Uma combinação de corrente contínua (DC) e radiofrequência (Rf) é aplicada nas barras, que passam a atuar como filtros. Somente os íons que apresentarem determinada razão m/z , a qual esteja em ressonância com o campo aplicado, irão passar pelas barras do quadrupolo e serão detectados. Os demais íons que entrarem no quadrupolo terão trajetórias instáveis e, como consequência, atingirão as barras e serão eliminados pela bomba de vácuo (CROTTI *et al.*, 2006).

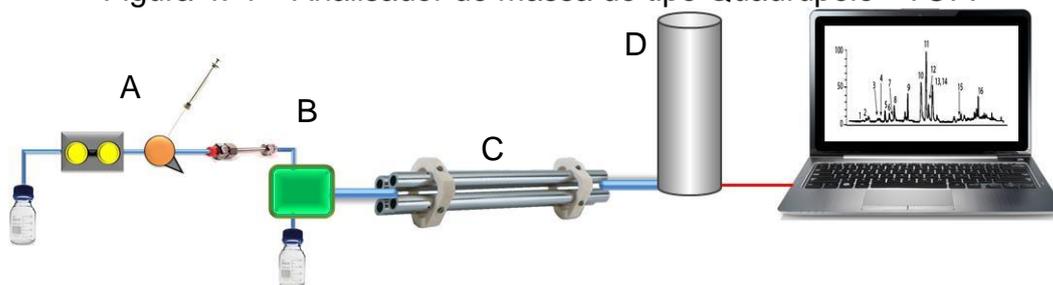
Outro analisador de massas que tem seu uso bastante difundido é o analisador de massas por tempo de voo (TOF). Neste analisador os íons produzidos são acelerados e passam por um tubo de separação livre de campo e com cerca de um metro de comprimento. Todos os íons que entram no tubo, a priori possuem a mesma energia, logo, suas velocidades variam de forma inversa às suas massas, fazendo com que os íons mais leves cheguem primeiro ao detector (SKOOG *et al.*, 2006).

Alguns equipamentos modernos unem dois tipos de analisadores de massas para formar um analisador ainda mais potente, chamado de Espectrômetro de massa acoplado (MS/MS). Primeiramente as moléculas são selecionadas e fragmentadas, o sistema então é capaz de isolar e refragmentar um fragmento selecionado (íon precursor), gerando um espectro para o fragmento. Para escolha do íon pai deve ser realizada uma análise no modo de varredura, e a partir do espectro de massas da molécula de interesse, é selecionado o íon de maior intensidade para ser refragmentado. A análise de detectores hifenados propicia maior seletividade e sensibilidade ao sistema (DE GRANDE e AQUINO NETO, 1990).

Um exemplo de hifenação MS/MS é o acoplamento de um quadrupolo a um TOF, ambos analisadores de massas. Supondo que neste caso o MS/MS

esteja também conectado a uma técnica de separação, como a de cromatografia a líquido, por exemplo, o instrumento deveria incluir um dispositivo de separação (HPLC), a fonte de íons (ESI), o filtro de massas (Quadrupolo) e o analisador de massas (TOF). Este equipamento, representado na figura 4.4, é comumente chamado de LC-Q-TOF.

Figura 4. 4 – Analisador de massa do tipo Quadrupolo - TOF.



A - Sistema de separação, neste caso um HPLC, B - fonte de íons, C - filtro de massas quadrupolo, D - analisador de massas TOF.

Fonte: A AUTORA.

5 ANÁLISE RÁPIDA DE GORDURA TRANS EM ALIMENTOS PROCESSADOS POR CZE-UV COM DETECÇÃO DIRETA

Recentemente, em junho de 2015, as gorduras *trans* foram banidas de todos os alimentos processados pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos (F.D.A., 2015). A princípio as indústrias alimentícias estadunidenses têm o prazo de três anos para se adequarem as novas regras. Tal fato apenas evidencia a preocupação da sociedade e das agências governamentais com a qualidade dos alimentos, e também das gorduras, consumidos pela população.

A técnica clássica de análise de AG é a GC-FID, devido à sua alta resolução e sensibilidade (SEPPÄNEN-LAAKSO *et al.*, 2002). Contudo, tal análise apresenta alguns inconvenientes. Os AG são pouco voláteis e possuem baixa estabilidade térmica, principalmente os AGPI, sendo necessária, portanto sua conversão a grupos mais voláteis, tais como ésteres de trimetilsilil ou ésteres metílicos (A.O.C.S., Reapproved 1997 Revised 2001). No caso particular de análise de AGT é necessária a utilização de uma coluna específica que demanda longos tempos de análise. Dentro deste contexto, parece ainda existir demanda pelo desenvolvimento de métodos mais rápidos de análise de AGT que possibilitem maior controle do processo nas indústrias, ou mesmo, de fiscalização por parte das agências governamentais.

Uma técnica de separação que vem se estabelecendo como alternativa para análise de AG ao longo dos últimos anos é a CE (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Suas principais vantagens frente à GC são curto tempo de análise, possível ausência de extração (CASTRO *et al.*, 2010; BARRA, CASTRO, *et al.*, 2013), ausência de passos de derivatização, separação dos analitos a baixas temperaturas, o que favorece significativamente a frequência analítica, e ainda, maior seletividade para AG, enquanto que para a técnica de GC podem ocorrer interferências devidas à presença de açúcares.

O primeiro relato sobre a análise da AGT utilizando CZE foi realizado com detecção indireta no UV-Vis, a análise foi realizada em 10 minutos e o método foi aplicado para a determinação de AGT em amostras de óleo hidrogenado de castanha do Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Mais tarde vários estudos que utilizaram este método para analisar diferentes amostras foram publicados

(BALESTEROS *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2010; BARRA *et al.*, 2012; BARRA, CASTRO, *et al.*, 2013; BARRA, OLIVEIRA, *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2013; SATO *et al.*, 2014). No entanto, foi relatada a dissolução parcial do polímero de revestimento do capilar por ação da solução de eletrólito, o que perturbava significativamente o perfil de separação (BALESTEROS *et al.*, 2007). A solução encontrada foi a utilização de um capilar mais resistente a solventes orgânicos, com revestimento exterior constituído por um polímero fluorado (BARRA, CASTRO, *et al.*, 2013), mais caro e menos comum nos laboratórios até então.

Recentemente foi relatada metodologia de análise de AGT por CZE que utiliza detecção condutométrica sem contato (C4D) (WONG *et al.*, 2013). A separação demora 37 minutos e parece ocorrer a partir da adição de duas ciclodextrinas diferentes na solução de eletrólito, o que tal solução mais complexa de se preparar e mais cara de se utilizar na rotina de um laboratório. Contudo, do nosso conhecimento, não foram encontrados registros na literatura envolvendo método de análise de AGT por CZE-UV com detecção direta.

5.1 OBJETIVOS

5.1.1 Objetivos Gerais

- Disponibilizar método alternativo para análise rápida de AGT por CZE-UV que apresentasse composição de solução de eletrólito simples e de baixo custo, bem como análises com alta frequência analítica.

5.1.2 Objetivos específicos

- Aplicar o método à amostras de alimentos processados;
- Comparar os resultados encontrados por CE com os gerados por GC;
- Verificar a necessidade de extração no preparo das amostras;
- Demonstrar as vantagens do uso do fator de resposta como ferramenta estatística para quantificação.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes e os padrões utilizados foram de grau analítico. A água foi purificada por deionização utilizando o sistema Milli-Q com resistividade de 18,5 M Ω cm (Millipore, Bedford, MA, EUA). Metanol (MeOH), acetonitrila (ACN), hexano, isopropanol, ácido acético, sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), tetraborato de sódio (Na₂B₄O₇) e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos na Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Polioxietileno 23 lauril éter (Brij 35) foi adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Solução de metóxido de sódio foi adquirida na Fluka (St. Louis, MO, EUA).

Padrões de AG para análise de CE tais como ácido nonadecaenoico (C19:1), AEL (C18:1t9), AOL (C18:1c9), ALI (C18:2n6) e ALN (C18:3n3) foram adquiridos na Sigma (St. Louis, MO, EUA). Soluções individuais dos AG foram preparadas por dissolução de quantidades apropriadas na concentração de 20,0 mmol L⁻¹ em MeOH. Todas as soluções foram armazenadas em freezer até a análise. Uma mistura de padrões foi preparada diariamente na concentração de 1,0 mmol L⁻¹ a partir da diluição apropriada das soluções estoque de cada AG em MeOH.

Padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) para análise por CG, tais como elaidato de metila (C18:1t ME), oleato de metila (C18:1c ME), linoleato de metila (C18:2 ME), linolenato de metila (C18:3 ME) e a mistura comercial de 37 componentes Supelco FAME 37 foram adquiridos na Sigma (St. Louis, MO, EUA). Soluções individuais dos FAME foram preparadas por dissolução de quantidades apropriadas em hexano na concentração de 1,0 mmol L⁻¹. Todas as soluções foram armazenadas em um freezer até a análise.

A solução extratora foi preparada por adição de três partes de hexano para duas partes de isopropanol num balão volumétrico (HARA e RADIN, 1978). Solução aquosa de Brij 35 (50,0 mmol L⁻¹) foi preparada por dissolução com um banho de ultrassom e mantida sob refrigeração a 4 °C para evitar a formação de mofo. A solução de Brij 35 foi utilizada apenas pelo período de 20 dias (pois após este período nova solução era preparada). Solução de NaOH (0,5 mol L⁻¹) foi

preparado em metanol. Soluções de Na_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ($100,0 \text{ mmol L}^{-1}$) foram preparadas em água deionizada.

A solução de eletrólito era preparada diariamente por diluição de mistura de 1,2 mL $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (100 mmol L^{-1}), 2,4 mL de Brij 35 (50 mmol L^{-1}), 3,3 mL de MeOH, 1,7 mL de acetonitrila em balão volumétrico de 10 mL usando água para completar o volume (PORTO *et al.*, 2011). A solução de eletrólito era levada ao ultrassom por 10 minutos para eliminar as bolhas de ar antes de ser utilizada.

5.2.2 Amostras

As amostras foram compradas no mercado local. Decidiu-se trabalhar com amostras de alimentos processados e tipicamente consumidos pelos brasileiros. Foram escolhidas diferentes matrizes alimentícias, com diferentes teores de AGT em sua composição. Logo, amostras de bala de caramelo, mistura para bolo de chocolate, biscoito wafer, chocolate e mistura para pão de queijo foram os alvos selecionados. A gordura foi extraída usando uma solução de hexano e isopropanol (HARA e RADIN, 1978); a transesterificação foi realizada por catálise básica com solução de metóxido de sódio em metanol (CHRISTIE, 1993; CHRISTIE e HAN, 2012); e uma solução de hidróxido de sódio em metanol foi utilizada para o passo de saponificação (OLIVEIRA *et al.*, 2003). A imagem fotográfica das amostras analisadas está apresentada na figura 5.1.

Figura 5. 1 – Amostras de alimentos analisados.



Fonte: A AUTORA.

5.2.3 Procedimento para extração lipídica

Pesou-se cerca de 1,0 g de cada amostra a fim de se obter 80 mg de gordura extraída em 20 mL solução. Foram adicionados 7,5 mL de solução extratora e 5,0 mL de solução de Na_2SO_4 . A mistura foi submetida a uma etapa de sonicação por 10 minutos e em seguida a agitação em vortex durante 1,0 minuto. Em seguida a mistura foi deixada em repouso num banho de gelo até a obtenção da separação de fases. A fase orgânica (superior) foi transferida para uma proveta, a fase aquosa foi lavada mais duas vezes com 5,0 mL de solução extratora (HARA e RADIN, 1978) e o volume foi completado para 20,0 mL com hexano (para facilitar a posterior divisão da amostra em partes iguais). O extrato resultante foi dividido em quatro balões de fundo chato pesados previamente e identificados, o solvente foi evaporado a 40 °C sob vácuo até que permanecesse apenas a fase lipídica. Depois disso, cada frasco foi novamente pesado e a massa inicial do balão descontada para se obter apenas a massa de gordura extraída em cada balão. A figura 5.2 ilustra o processo de extração.



Fonte: A AUTORA.

5.2.4 Procedimento de preparo de amostra para CE

Duas frações lipídicas das quatro extraídas foram saponificadas por refluxo com 2,0 mL de uma solução de NaOH / MeOH a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em banho de água ($75 - 80 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 20 minutos. Depois da reação de saponificação, as amostras foram transferidas para um balão volumétrico de 5,0 mL e o volume completado com MeOH. A solução foi armazenada num frasco tampado em freezer até a análise. Antes da injeção no equipamento de CE as amostras foram diluídas com MeOH em uma proporção de 1:2 v/v em balão volumétrico de 1,0 mL contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de C19:1, utilizado como padrão interno (IS). A figura 5.3 ilustra o procedimento de saponificação.

Figura 5. 3 – Procedimento de saponificação.



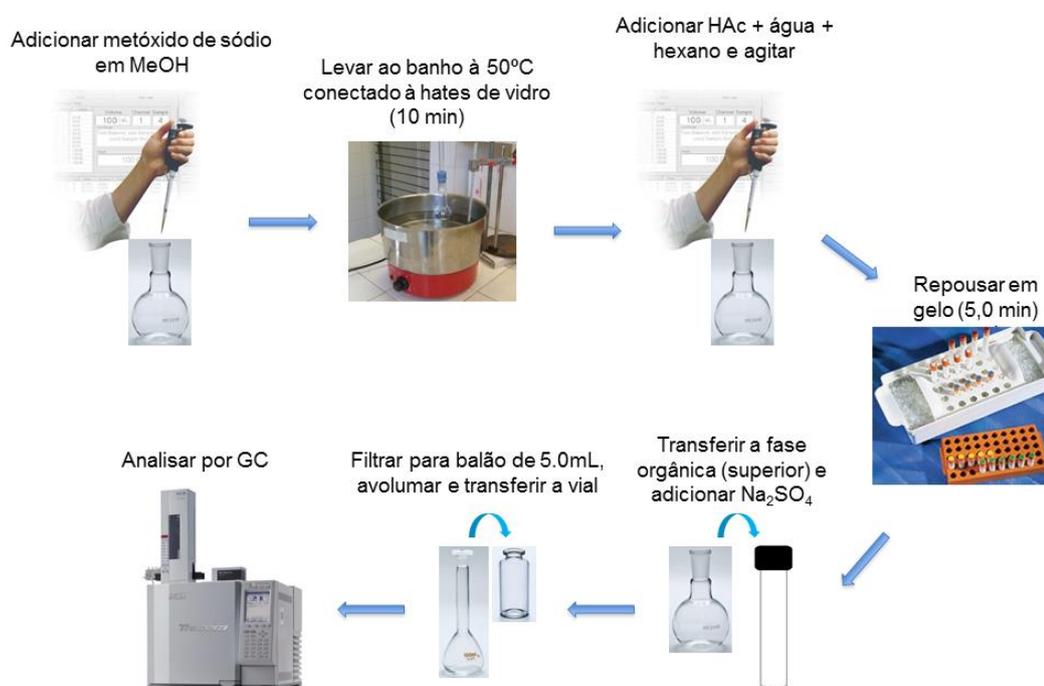
Fonte: A AUTORA.

5.2.5 Procedimento de preparo de amostra para GC

As duas frações lipídicas extraídas restantes foram transesterificadas usando catálise básica (CHRISTIE, 1993; CHRISTIE e HAN, 2012). Foram adicionados 2,0 mL de solução de metóxido de sódio em metanol, em seguida, o balão foi aquecido sob refluxo em banho térmico a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos. O banho foi desligado e a solução foi arrefecida para então ser desconectada do refluxo. Em seguida, $100 \text{ } \mu\text{L}$ de ácido acético glacial foram adicionados para neutralizar a solução, seguidos por 5,0 mL de água deionizada e 3,0 mL de hexano. Após agitação em vórtex e a separação das fases em banho de gelo, a fase orgânica (superior) foi colocada num tubo de vidro pirex de 10,0 mL e mais

de 3,0 mL de hexano foram adicionados à primeira mistura para uma extração mais eficiente. Após agitação e separação de fases, a fase orgânica (superior) foi transferida para o mesmo tubo de vidro pirex e 1,0 g de Na_2SO_4 anidro foram adicionados para secar a solução de FAME. A solução foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL, o volume completado com hexano e finalmente transferida e armazenada num frasco com tampa em freezer à temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até a análise. Antes da injeção no equipamento de GC, a solução foi transferida para um *vial* e analisada sem diluição. A figura 5.4 apresenta um esquema para o procedimento de transesterificação.

Figura 5. 4 – Procedimento de transesterificação.



Fonte: A AUTORA.

5.2.6 Instrumentação

a) CE

Os experimentos de CZE foram conduzidos num equipamento de CE da Agilent (7100 CE, Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) equipado com DAD; as análises foram realizadas em comprimento de onda de 200 nm (*peakwidth* > 10 min; 2.0 s response time; 2.5 Hz). A temperatura do capilar foi mantida em $27\text{ }^\circ\text{C}$

e para a aquisição e tratamento de dados foi utilizado o *software* HP ChemStation, (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA). As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (12,5 mbar durante 7,5 s) e o sistema de eletroforese foi operado sob polaridade normal, voltagem positiva e constante de 27 kV. Capilares de sílica fundida revestidos de polimida foram utilizados para todos os experimentos (Polymicro Technologies, Phoenix, EUA), com comprimento de 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo) × 50 µm d.i. × 375 µm d.e. Quando um novo capilar foi utilizado, este era condicionado por fluxo de solução de NaOH à 1,0 mol L⁻¹ de (30 min), água deionizada (15 min) e solução de eletrólito (15 min). Entre as análises, o capilar foi lavado com uma solução de NaOH a 0,50 mol L⁻¹ (2 min), água deionizada (2 min) e solução de eletrólito (2 min). Ao final do dia o capilar foi lavado com solução de NaOH a 0,50 mol L⁻¹ (2 min) e água deionizada (2 min) e mantido no cartucho fora do equipamento de CE.

b) GC

A análise dos FAME foi realizada em um cromatógrafo a gás da Shimadzu (GC 2010-Plus, Shimadzu, Kyoto, Japão), com injetor tipo *split-splitless*, auto injetor AOC-i-20 e detecção por ionização em chama. Uma coluna capilar de sílica fundida foi usada (CP-SIL 88 for FAME; 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm, Agilent Technologies, Palo Alto, USA). As condições cromatográficas foram: volume de injeção de 1,0 µL no modo *split* de 1:50, vazão de 20 mL min⁻¹ a 250 °C; a temperatura do FID foi fixada em 270 °C; as temperaturas do forno foram inicialmente programadas à 80 °C com aumento de 4 °C min⁻¹ até 220 °C, mantida por 5 min; depois a temperatura aumentou de 4 °C min⁻¹ até 240 °C e foi mantida por 10 min. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com vazão de 1,0 mL min⁻¹ e a pressão foi de 140,3 kPa. Os compostos foram identificados por co-injeção de padrões e por comparação do tempo de retenção com os tempos da mistura FAME 37. Os AG foram determinados por normalização de área e expressos em g por 100 g de gordura (A.O.C.S., Reapproved 1997 Revised 2001).

5.2.7 Tratamento de dados

Os programas Microsoft Excel, Origin Pro e Action (ESTATCAMP, 1997-2014) foram utilizados para processamento estatístico dos dados. Testes como normalidade, linearidade e homocedasticidade (DANZER; CURRIE, 1998) foram realizados a fim de verificar a confiabilidade dos resultados.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

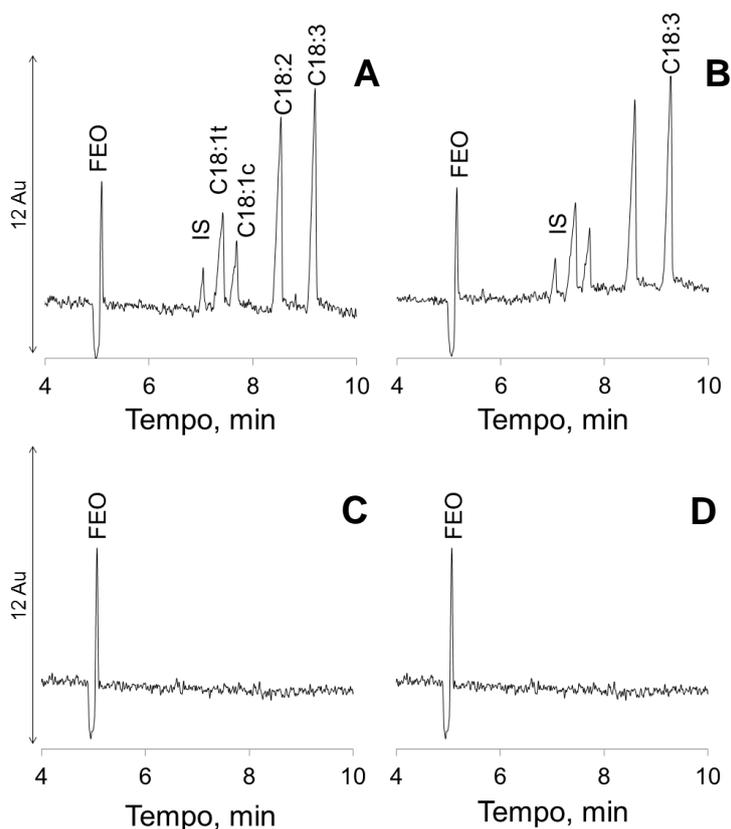
A análise de AG por CE com detecção direta por UV pode ser executada usando uma solução de eletrólito contendo um tampão com um pH maior do que o pKa dos AG (~5,0), a fim de manter os AG em sua forma aniônica, juntamente com um seletor químico de homólogos *cis-trans*, e um solvente orgânico para evitar a formação de micelas. O efeito de Brij 35 na presença de solvente orgânico duplo, tal como, MeOH e ACN, para a separação de AG usando CZE-UV, foi discutido de forma detalhada em trabalho anterior (PORTO *et al.*, 2011). Assim, a solução de eletrólito utilizada neste estudo consistiu de tetraborato de sódio (pH ~ 9,2), com MeOH, ACN e Brij 35.

Neste trabalho anterior o AEL foi utilizado como IS, portanto, para esta nova aplicação foi necessário um estudo para a escolha do AG que poderia ser utilizado como IS para análise de AEL como analito alvo. A fim de corrigir as variações instrumentais o C19:1c, foi escolhido como IS. Este AG possui insaturação e, portanto, alguma absorvidade molar, contém número ímpar de átomos de carbono na cadeia, sendo menos frequentemente encontrado na natureza e ainda, possui CCE próximo ao dos AG anteriormente analisados com essa solução de eletrólito.

Quando a análise de uma mistura de padrões de AGI foi realizada, como mostrado na Figura 5.5A, o perfil de separação demonstrou que o C19:1c apresentava as características adequadas para ser utilizado como um IS. Além disso, a fim de demonstrar que nenhuma ocorrência de interferência é observada devido à presença de AGS e o solvente orgânico utilizado para a dissolução dos analitos, um ensaio experimental foi executado. A figura 5.5B mostra uma mistura de AGS e AGI, A figura 5.5C mostra a injeção de metanol, solvente orgânico utilizado para a diluição dos padrões e amostras e a figura 5.5D mostra

a injeção dos AGS palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0). Como se pode observar, os AGS, devido à sua absorvidade molar insignificante em 200 nm, não apresentam sinal no comprimento de onda utilizado para análise de AGI por detecção direta.

Figura 5. 5 – Eletroferogramas para misturas de padrões.



A - Injeção dos AGI C18:1t, C18:1c, C18:2, C18:3, todos na concentração de 0,5 mmol L⁻¹; B - Injeção dos AGI listados em A com AGS C16:0 e C18:0 na concentração de 0,5 mmol L⁻¹; C - Injeção de metanol; D - Injeção dos AGS listados em B. Condições experimentais: $\lambda = 200$ nm, temperatura de 27 °C, injeção hidrodinâmica de 12,5 mbar por 7,5 s, voltagem positiva e constante de 27 kV, capilar de polimida com comprimento de 48,5 cm e 50 μ m de d.i.

Fonte: A AUTORA.

O método proposto para quantificação de AGT em alimentos processados foi baseado em um estudo estatístico, incluindo o cálculo do fator de resposta (FR) utilizando C19:1 como o IS (BALESTEROS *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2010; PORTO *et al.*, 2011). Para calcular FR, um experimento aleatório foi realizado com base em soluções padrões preparadas em triplicatas verdadeiras de AEL em diferentes níveis de concentração (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 mmol L⁻¹),

mantendo-se fixa a concentração do IS em 1,0 mmol L⁻¹. A Tabela 5.1 mostra os valores da razão de área dos picos, utilizados para implementar o modelo de regressão linear, uma vez que o teste de homoscedasticidade (teste de Cochran) não foi violado.

Tabela 5.1 – Valores utilizados para gerar o modelo de regressão, razão entre AEL/IS.

$[X_{AEL}]/[IS]$	Sinal 1 ^a réplica	Sinal 2 ^a réplica	Sinal 3 ^a réplica	Desvio padrão
0,4	0,28	0,30	0,29	0,010
0,8	0,78	0,84	0,76	0,040
1,2	1,11	1,05	1,25	0,100
1,6	1,75	1,78	1,67	0,060
2,0	2,00	2,08	1,96	0,060

Fonte: A AUTORA.

O modelo de regressão obtido foi satisfatório, não apresentando falta de ajuste (equação 3) para um intervalo de 98% de confiança (p -valor = 0,020), pois o valor de $F_{falta\ de\ ajuste}$ calculado foi menor que o valor de $F_{crítico\ falta\ de\ ajuste}$ para C18:1t de acordo com a Tabela 5.2. Além disso, os valores de significância da regressão (F_{sig}) foram aceitáveis, pois o F_{sig} calculado foi pelo menos cinco vezes maior do que o $F_{crítico\ sig}$ de 4,67 (DANZER e CURRIE, 1998).

Tabela 5.2 – Resultados estatísticos para o modelo de análise de AGT.

Coeficiente angular	Intercepto	R^2	F_{sig}	$F_{crítico\ sig}$	$F_{lack\ of\ fit}$	$F_{crítico\ falta\ de\ ajuste}$	R_F
1,10±0,04	-0,12 ± 0,05	0,98 3	776,46	9,07	5,21	6,55	1,10

$F_{crítico\ falta\ de\ ajuste\ 0,01,\ 3;\ 10}$

$F_{crítico\ sig\ 0,01,\ 1,\ 13}$

Fonte: A AUTORA.

$$F = \frac{s_{y,x}^2}{s_y^2} = \frac{\sum_{i=1}^p m_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 / (p - 2)}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^{m_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 / (m - p)} \quad (3)$$

O procedimento de quantificação se baseia na utilização de um fator de resposta (F_R), tal como descrito pela seguinte expressão matemática (equação 4):

$$\frac{A_{AGT}}{[AGT]} = F_R \frac{A_{IS}}{[IS]} \quad (4)$$

onde, A_{AGT} é a área do pico do AGT, $[AGT]$ é a concentração do AGT, F_R é o fator de resposta (coeficiente angular da reta), A_{IS} é a área do pico do IS e $[IS]$ é a concentração do IS, fixada em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Como o modelo de regressão não apresentou falta de ajuste, o coeficiente angular pode ser utilizado como fator de resposta na equação 2. A quantificação do %AGT nas amostras foi realizada utilizando a equação 5, obtida após rearranjo da equação 4 e inclusão dos fatores de diluição:

$$\% AGT = \left(\frac{A_{AGT} [IS]}{A_{IS} F_R} \frac{V_1}{V_2} \frac{MM_{C18:1t} V_3}{m_{extraída}} \right) \times 10 \quad (5)$$

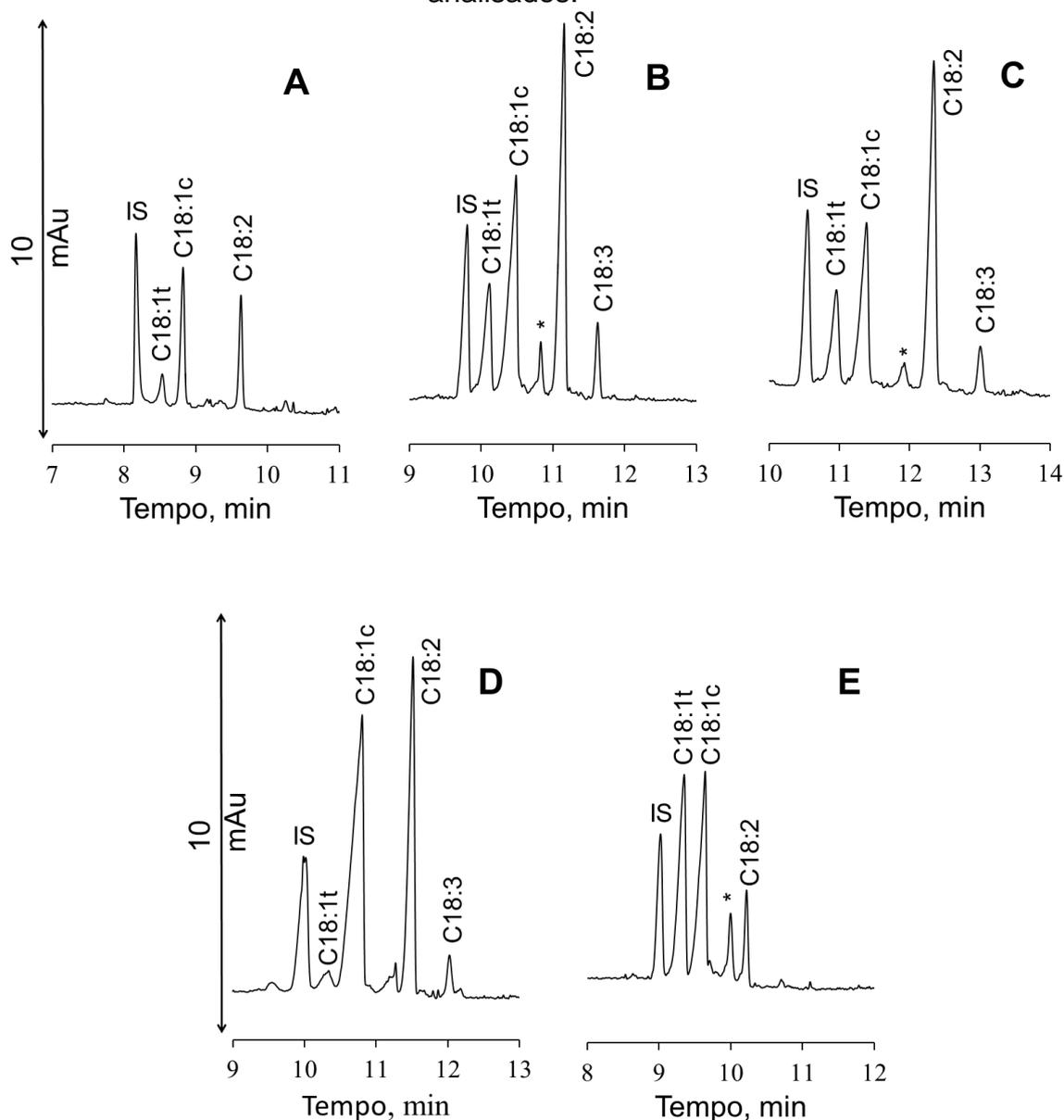
Em que V_1 é o volume do balão volumétrico onde a diluição foi preparada para análise (neste caso, foi de $0,001 \text{ L}$), V_2 é o volume pipetado da solução da amostra, $MM_{C18:1t}$ é a massa molecular do ácido elaídico ($282,46 \text{ g mol}^{-1}$), V_3 é o volume total da solução estoque da amostra (neste caso, $0,005 \text{ L}$) e $m_{extraída}$ é a massa de gordura obtida depois da evaporação do solvente no processo de extração descrito acima (neste caso, cerca de $0,02 \text{ g}$).

Tendo obtido o modelo para a quantificação, começaram os testes de preparo das amostras. A primeira ideia foi tentar a saponificação direta das amostras, ou seja, a ideia de eliminar uma das etapas necessárias para análises por GC procedimento de preparo das amostras pouparia bastante tempo do analista. No entanto, esse teste revelou a formação de uma massa de cor parda e textura vitrificada nas amostras. Logo, pôde-se concluir que o comportamento apresentado foi uma consequência do elevado teor de açúcar nas amostras, e, portanto, esta ideia foi descartada.

Como não foi possível eliminar a etapa de extração, dois procedimentos de extração de gordura comumente utilizados na literatura foram testados: o primeiro cuja solução extratora é composta por uma mistura de clorofórmio e metanol (FOLCH *et al.*, 1957); e o segundo com solução extratora composta por uma mistura de hexano e álcool isopropílico (HARA e RADIN, 1978). Ambos os extratos foram transesterificados por catálise básica (CHRISTIE, 1993; CHRISTIE e HAN, 2012) e analisados por GC-FID. A comparação entre o perfil e a percentagem de área obtida para os AG em amostras diferentes, com os dois

métodos testados, mostrou que ambos os métodos foram equivalentes (resultados não apresentados). Por isso, decidiu-se trabalhar com o método proposto por HARA e RADIN (1978), uma vez que os reagentes utilizados são menos tóxicos e também, por ser mais fácil sua remoção dos tubos, visto que a fase lipídica é extraída pela fase orgânica, que é a fase superior da mistura composta que se forma durante o procedimento de extração.

Figura 5. 6 – Eletroferogramas dos diferentes alimentos processados analisados.



IS é o C19:1c e * são AG desconhecidos. A - Bala de caramelo, B - Mistura para bolo, C - Wafer recheado, D - Chocolate e E - Mistura para pão de queijo. Condições experimentais na figura 5.5.

Fonte: A AUTORA.

As análises por CE ocorreram sob polaridade normal e em contra fluxo, pois no pH de trabalho os analitos estavam presentes em solução na sua forma aniônica. A figura 5.6 mostra os eletroferogramas obtidos para as diferentes amostras testadas, os quais apresentam variações significativas do tempo de migração dos AG para as diferentes amostras.

Para verificar se a origem dessa variação no tempo estava no método, uma mesma solução contendo mistura de padrões foi injetada repetidamente. Observou-se que não havia uma variação no tempo de migração tão grande quanto a variação observada entre as diferentes amostras. Além disso, os *vials* contendo a solução de eletrólito foram reabastecidos a cada análise, tanto para as amostras quanto para os padrões, por isso acredita-se que a variação no tempo de migração não foi causada por eletrólise da solução de eletrólito, ou por sua composição, mas pelo efeito de matriz. Por outro lado, é importante notar que em todos os casos a separação do par de *cis-trans* não é comprometida. O tempo de migração do AGT nas amostras foi confirmado por co-injeção de amostras com o padrão.

Observa-se na figura 5.6 que as amostras B, C e E apresentam um pico entre os analitos C18:1c9 e C18:2n6. Acredita-se que este sinal seja referente a algum AG mono ou poli-insaturado, visto que apenas essas classes de AG apresenta sinal no método proposto. Além disso, a CZE possui sensibilidade para detectar a matéria saponificável da amostra, logo se acredita ser razoável inferir que tais picos não sejam referentes à interferência de açúcares. As amostras foram analisadas em duplicatas genuínas tanto por CE quanto por GC, e os valores de AGT encontrados estão apresentados na Tabela 5.3.

O limite de quantificação (LQ) para o método proposto foi calculado a partir da equação 6 em cada uma das amostras analisadas, tal resultado está apresentado na tabela 5.3. Considera-se o LQ como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser determinado por meio do ruído da linha base calculado numa região próxima ao sinal de interesse. Neste caso, a região definida para esse cálculo em todas as amostras foi a região dos dois minutos anteriores ao tempo de migração do pico do IS. Determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de

quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

$$LQ = 10 \times \frac{s_{ruído} \times C_a}{H_{máx} - H_{mín}} \quad (6)$$

onde $s_{ruído}$ é a estimativa do desvio padrão da linha base, C_a é a concentração do analito na análises, $H_{máx}$ é a altura máxima do pico do analito e $H_{mín}$ é a altura mínima do pico do analito, medida a base do pico.

Tabela 5.3 – Resultados da quantificação dos AGT por CE e GC.

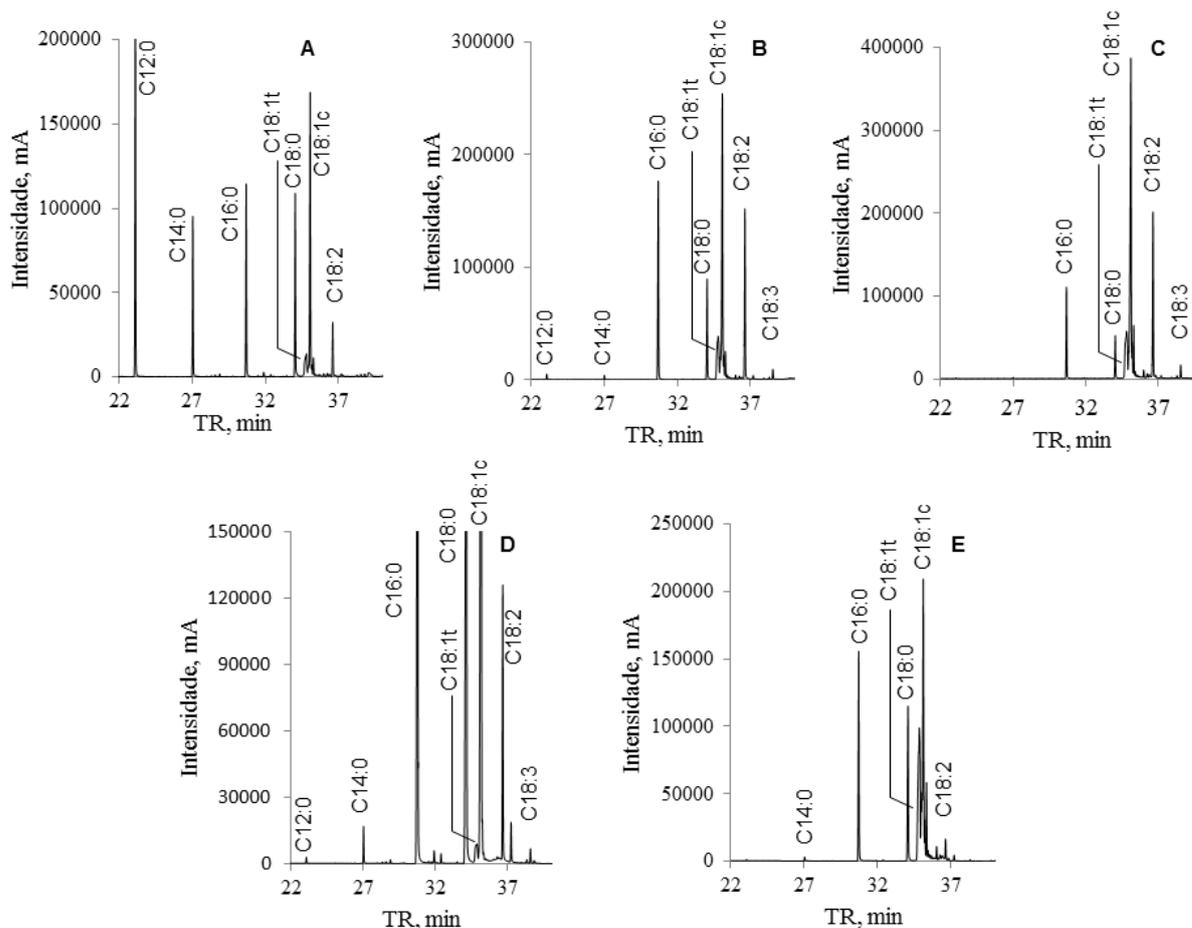
Amostras	CE ^a	Média ^{a,b}	LQ - CE ^c (mmol L ⁻¹)	GC ^a	Média ^{a,b}
BC1	3,4	3,2±0,2	0,6	3,3	3,10±0,3
BC2	3,1			2,9	
MB1	10,4	10,0±0,6	0,2	9,0	8,90±0,2
MB2	9,6			8,7	
WR1	9,9	10,4±0,7	0,5	11,4	11,1±0,4
WR2	10,9			10,9	
MPQ1	22,4	23,4±1,0	1,0	25,4	24,9±0,7
MPQ2	24,4			24,4	
CH1	1,3	1,3±0,1	0,5	1,4	1,40±0,1
CH2	1,4			1,3	

BC- Bala de caramelo; MB - mistura para bolo; WR - Wafer recheado; MPQ - Mistura para pão de queijo; CH - Chocolate; a - g de AGT por 100g de gordura; b - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk (p -valor = 0,97) e teste- t pareado nas amostras (p -value: 0,65) foram realizadas utilizando os valores médios.

Fonte: A AUTORA.

Os resultados da quantificação de AGT obtidos por CZE-UV e GC-FID foram comparados por meio de teste- t pareado, gerando um p -valor de 0,65 (valor- $p > 0,05$), o que indica que não foram encontradas diferenças significativas entre os dois métodos para $\alpha = 0,05$. Os cromatogramas obtidos para as amostras são mostrados na Figura 5.7. Todas as amostras puderam ser analisadas e quantificadas por ambas as técnicas.

Figura 5. 7 – Cromatogramas para os diferentes alimentos processados analisados.



A - Bala de caramelo, B - Mistura para bolo, C - Wafer recheado, D - Chocolate e E - Mistura para pão de queijo. Condições experimentais: coluna CP-SIL 88 com 100 m de comprimento, volume de injeção de 1,0 μL no modo *split* de 1:50, vazão de 20 mL min^{-1} , injetor a 250 $^{\circ}\text{C}$; detector a 270 $^{\circ}\text{C}$; programação de temperatura inicialmente a 80 $^{\circ}\text{C}$ com aumento de 4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 220 $^{\circ}\text{C}$, mantida por 5 min; novo aumento de 4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 240 $^{\circ}\text{C}$ e mantida por 10 min, H_2 como gás de arraste, vazão de 1,0 mL min^{-1} e pressão de 140,3 kPa.

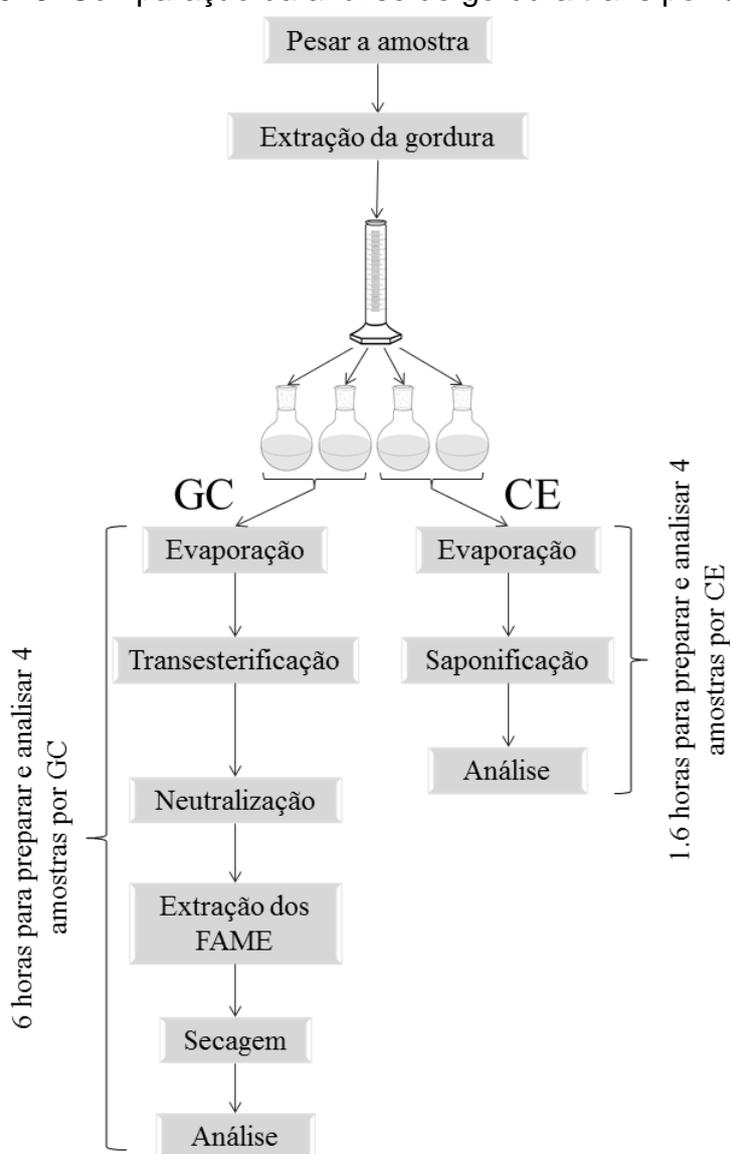
Fonte: A AUTORA.

5.4 CONCLUSÕES

A CZE-UV apresenta vantagens em comparação com o método GC-FID, tais como: um curto tempo de análise se comparado à análise em coluna de 100 m, maior frequência analítica, baixo consumo de reagentes orgânicos, menos etapas no preparo das amostras e ausência da necessidade de uma coluna específica para realização das análises. Em comparação com os outros métodos para a análise de AGT por CE, o presente método utiliza uma solução

tampão de tetraborato sem a adição de ciclodextrinas modificadas, de modo que a análise é mais simples e de menor custo. Além disso, o capilar de polimida é estável quando exposto à solução de eletrólito utilizada neste trabalho, podendo ser utilizado para um número maior de análises, não necessitando de um capilar específico para a composição do eletrólito. Apesar de não analisar o perfil dos AG majoritários, que incluiria alguns AGS, este método de rastreio rápido é mais seletivo para os AGI e pode ser útil para monitorar a qualidade dos alimentos, especialmente para análise *target* de AGT.

Figura 5. 8: Comparação da análise de gordura trans por GC e CE.



Fonte: A AUTORA.

6 ANÁLISE RÁPIDA DE CLA EM LEITE POR FAST GC-FID

A EMBRAPA Gado de Leite, com sede na cidade de Juiz de Fora, tem nos últimos anos, investido em estudos que possam monitorar a qualidade do pasto oferecido ao rebanho, buscando uma maior concentração dos AG precursores dos CLA, os ácidos ALI e ALN, nos diferentes tipos de forrageiras (CASTRO *et al.*, 2013). Uma das linhas de pesquisa de interesse é a seleção da forrageira com maiores quantidades dos precursores de CLA em sua composição.

A forrageira considerada mais promissora neste aspecto é então servida ao gado, que por sua vez, produz leite com maiores teores do isômero de CLA de interesse, o *cis-9, trans-11*. Com a melhor escolha da alimentação do gado a EMBRAPA pretende levar aos produtores a tecnologia necessária para disponibilizar à população um alimento com maior qualidade nutricional que propicie os benéficos efeitos anticarcinogênicos do CLA *cis-9, trans-11*.

Estudos desse tipo geram grande quantidade de amostras cujas análises tem como principal foco a quantidade de CLA, sobretudo do isômero *cis-9, trans-11* presente. Conseqüentemente, ocorre uma grande demanda de análises de leite nos laboratórios dedicados à pesquisa. Tal demanda passa por um ponto de estrangulamento, que é o tempo necessário para preparo e análise das amostras, bem como do tratamento dos dados, visto que a quantificação é feita por normalização de área, o que significa que todos os sinais precisam ser considerados. E no caso do leite, são cerca de 150 diferentes sinais referentes à presença de AG que precisam ser integrados e conferidos por amostra.

Percebeu-se então que a análise *target* deste tipo de gordura poderia ser interessante para auxiliar na produção de leite com maiores teores de CLA. Como já mencionado anteriormente, a técnica clássica utilizada para determinação do perfil de AG é a GC-FID. Quando o alvo da análise são os CLA, tradicionalmente são utilizadas colunas de alta polaridade, compostas por cianopropil siloxano e comercializadas como SP2560 ou CP-SIL88 com 100 m de comprimento (DELMONTE *et al.*, 2011). Utilizando tais colunas o tempo de análise pode chegar a 80 minutos (CRUZ-HERNANDEZ *et al.*, 2007), o que torna o trabalho lento e oneroso em laboratórios de rotina, com grande demanda de análises.

Na última década foram introduzidas no mercado colunas com fases estacionárias (FE) de diferentes polaridades, com o objetivo de tornar mais rápida e eficiente a separação de AG por GC (ANDERSON *et al.*, 2002; SIGMA, 2011). Rapidamente foram publicados vários trabalhos apresentando e comparando a eficiência das novas FE com as já tradicionalmente utilizadas para a separação de isômeros de AG considerados críticos (DELMONTE *et al.*, 2008; PAYAGALA *et al.*, 2009; RAGONESE, TRANCHIDA, DUGO, *et al.*, 2009; BUCHANAN *et al.*, 2011; DELMONTE *et al.*, 2011).

Neste contexto, percebeu-se que os métodos de separação tradicionais por GC disponíveis na literatura para a análise dos dois CLA de interesse biológico, a saber, *cis-9*, *trans-11* e *trans-10*, *cis-12*, apresentam como principal desvantagem um longo tempo de análise. Logo, acredita-se que propostas de análise mais rápidas, que possam aumentar a frequência analítica em laboratórios de rotina possam ser ainda de interesse da comunidade científica.

6.1 OBJETIVOS

6.1.1 Objetivos Gerais

- Disponibilizar método alternativo de análise rápida dos isômeros de CLA *cis-9*, *trans-11* e *trans-10*, *cis-12* de interesse biológico por GC-FID.

6.1.2 Objetivos específicos

- Otimizar o método de análise de CLA;
- Aplicar o método em amostras de leite;
- Quantificar os CLA na amostra pelo método proposto e comparar com o método tradicional a partir da técnica de GC-FID;
- Propor um método de quantificação mais rápido, focado apenas no CLA.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes e os padrões utilizados foram de grau analítico. Água foi purificada por deionização utilizando o sistema Milli-Q com resistividade de 18,5 M Ω cm (Millipore, Bedford, MA, EUA). Metanol, hexano, isopropanol, ácido acético, sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos na Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Solução de metóxido de sódio foi adquirida na Fluka (St. Louis, MO, EUA).

Padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) para análise por CG, tais como oleato de metila (C18:1c ME), linoleato de metila (C18:2 ME), linolenato de metila (C18:3 ME), a mistura comercial de CLA contendo o *cis*-9, *trans*-11 e o *trans*-10, *cis*-12 e a mistura comercial de 37 componentes Supelco FAME 37 foram adquiridos na Sigma (St. Louis, MO, EUA). O padrão BASF (LUTA-60) composto por palmitato de metila (C16:0 ME), estearato de metila (C18:0 ME), linoleato de metila (C18:2 ME) e CLA (*cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12) foram gentilmente cedidos pela EMBRAPA Gado de Leite. Soluções individuais dos FAME foram preparadas por dissolução de quantidades apropriadas em hexano na concentração de 1,0 mmol L⁻¹. Todas as soluções foram armazenadas em um freezer até a análise.

A solução extratora foi preparada por adição de três partes de hexano a duas partes de isopropanol num balão volumétrico. Solução de Na₂SO₄ (0,5 mol L⁻¹) foi preparada em água.

6.2.2 Amostras

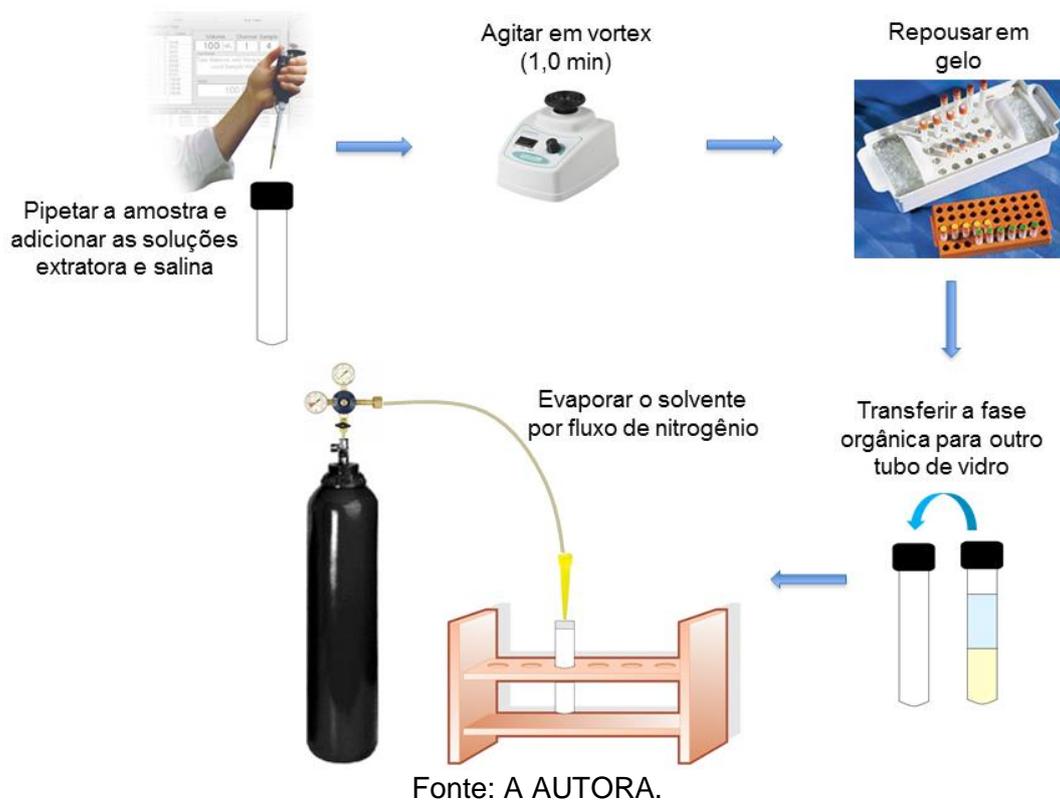
As amostras de leite cru e manteiga caseira com diferentes teores de CLA, foram gentilmente cedidas pela EMBRAPA Gado de Leite - Juiz de Fora.

6.2.3 Procedimento para extração lipídica

Foram pipetados 2,0 mL de leite para tubo de vidro com rosca e tampa, no caso da manteiga foram pipetados 40,0 μ L para o tubo de vidro. Em seguida,

adicionou-se 7,5 mL de solução de extratora e 5,0 mL de solução de Na_2SO_4 , a mistura foi agitada em vórtex por 1,0 minuto. Em seguida foi deixada em repouso em banho de gelo até se obter a separação de fases. A fase orgânica (superior) foi transferida para um tubo de vidro (HARA e RADIN, 1978) e o solvente foi evaporado por fluxo de nitrogênio até que permanecesse apenas a fase lipídica no tubo. As amostras foram preparadas em duplicata e a figura 6.1 ilustra o processo de extração.

Figura 6. 1 – Processo de extração lipídica.



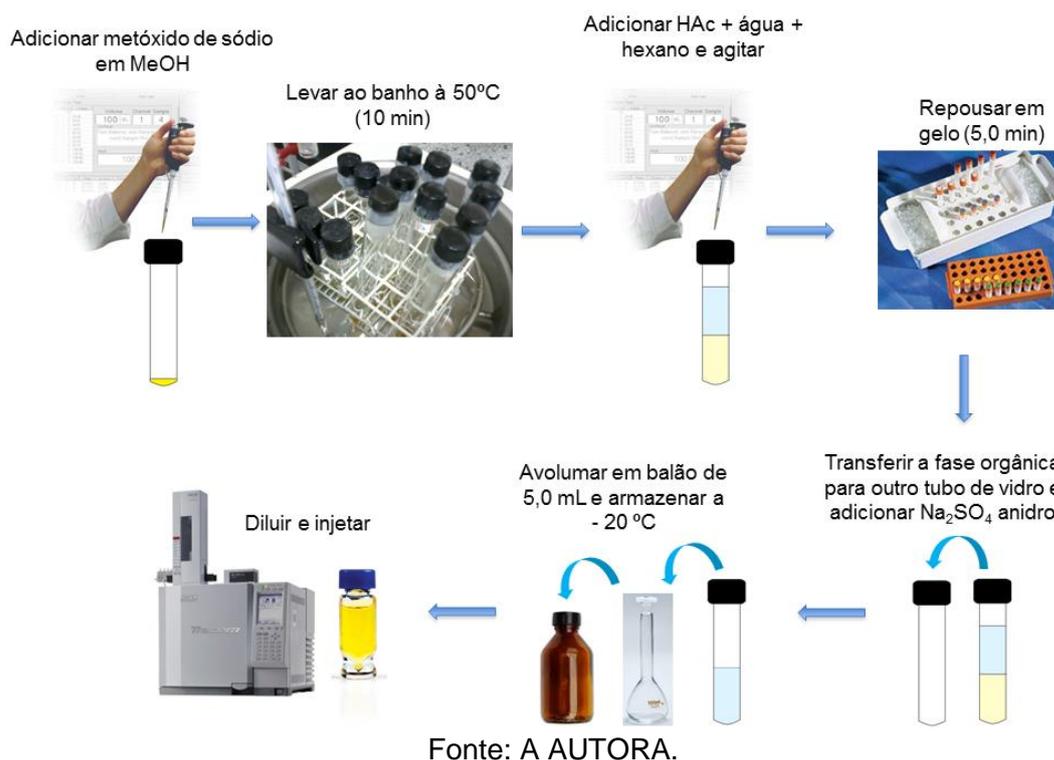
6.2.4 Procedimento de transesterificação

As duas frações lipídicas extraídas (duplicata) foram transesterificadas usando catálise básica (CHRISTIE, 1993; CHRISTIE e HAN, 2012). Foram adicionados 2,0 mL de solução de metóxido de sódio em metanol ao tubo que continha o extrato de gordura, em seguida, o tubo foi tampado e aquecido em banho térmico a 50 °C durante 10 minutos. Aguardou-se o resfriamento do tubo até a temperatura ambiente para adicionar 100 µL de ácido acético glacial e assim neutralizar a solução. Também foram adicionados 5,0 mL de água

deionizada e 2,5 mL de hexano para realizar a extração dos FAME formados na reação.

Após agitação em vórtex e separação das fases em banho de gelo, a fase orgânica (superior) foi transferida para outro tubo de 10,0 mL e mais 2,5 mL de hexano foram adicionados ao primeiro tubo para uma extração mais eficiente. Após agitação e separação das fases, a fase orgânica (superior) foi transferida para o mesmo tubo onde foi acondicionada a primeira alíquota e 1,0 g de Na_2SO_4 anidro foram adicionados para secar a solução de FAME. A solução foi transferida para um balão de 5,0 mL e avolumada com hexano. Finalmente a amostra foi transferida para um frasco com tampa e armazenada em freezer à temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da análise. A figura 6.2 apresenta um esquema para o procedimento de transesterificação.

Figura 6.2 – Procedimento de transesterificação.



6.2.5 Diluição das amostras para quantificação

Para a quantificação das amostras foram necessárias duas injeções, uma contendo apenas a amostra (solução A) e a outra contendo a amostra e uma

mistura de padrões de CLA, composta pelos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans* 10, *cis* 12 (solução B). Ambas as soluções foram diluídas em um balão de 1,0 mL e os volumes utilizados estão apresentados na tabela 6.1.

Também foi realizada a análise de uma mistura de padrões (solução C), apenas para confirmação da área dos padrões. As áreas do pico referente ao isômero de CLA *cis*-9, *trans*-11 foram utilizadas posteriormente para a quantificação de tal isômero nas amostras analisadas.

Tabela 6.1 – Diluição das amostras de leite.

Soluções	Volumes (μL)		
	Padrão	Amostra	Hexano
A – Amostra	-	920	80
B – Amostra + Padrão	920	80	-
C – Padrão	80	-	920

* Na concentração de $9,0 \text{ mmolL}^{-1}$.

Fonte: A AUTORA.

Neste trabalho o isômero de CLA *cis*-9, *trans*-11 foi analisado e quantificado em duas amostras de leite distintas, e para ambas o processo de diluição está apresentado na tabela 6.1. As soluções preparadas para as duas amostras foram analisadas por GC-FID utilizando duas colunas distintas, a SLB-IL111 e a CP-Sil 88.

6.2.6 Instrumentação para GC-FID

A análise dos FAME foi realizada em um cromatógrafo a gás da Shimadzu (GC 2010-Plus, Shimadzu, Kyoto, Japão), com injetor tipo *split-splitless*, auto injetor AOC-i-20 e detecção por ionização em chama. Duas colunas capilares de sílica fundida foram usadas, uma de FE polar (CP-SIL 88 for FAME; 100 m x 0,25 mm x 0,2 μm , Agilent Technologies, Palo Alto, USA) e a outra de líquido iônico (SLB-IL111; 15 m x 0,10 mm x 0,08 μm , Supelco, Bellefonte, PA, EUA). As condições cromatográficas para a CP-SIL 88 foram: volume de injeção de 1,0 μL no modo *split* com razão 1:50; injetor e detector à 250 $^{\circ}\text{C}$; vazão do gás de arraste (H_2) de 1,5 mL min^{-1} ; temperatura programada iniciando em 45 $^{\circ}\text{C}$ por 4,0 minutos e razão de aquecimento de 13 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 175 $^{\circ}\text{C}$; 175 $^{\circ}\text{C}$ por 27 minutos e razão de aquecimento de 4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 215 $^{\circ}\text{C}$; 215 $^{\circ}\text{C}$ por 35 minutos

e fluxo de N₂ de 30 mL min⁻¹ (CRUZ-HERNANDEZ *et al.*, 2007). Já para as análises na coluna SLB-IL111 as condições foram: volume de injeção de 1,0 µL no modo *split* com razão 1:100; injetor e detector à 250 °C; vazão do gás de arraste (H₂) de 1,0 mL min⁻¹; velocidade linear de 26 cm s⁻¹, isoterma em 168 °C (DELMONTE *et al.*, 2011) com tempo de análise de 6,0 minutos. Os compostos foram identificados por co-injeção de padrões e por comparação do tempo de retenção com os tempos das misturas de padrões FAME 37 e LUTA60. O FAME do isômero de CLA *cis*-9, *trans*-11 foi determinado por adição de padrão e expresso em mg L⁻¹.

6.2.7 Tratamento de dados

Os programas Microsoft Excel, Origin Pro e Action (Estatcamp, 1997-2014) foram utilizados para processamento estatístico dos dados.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para a separação dos CLA de interesse foram realizados alguns testes por CE utilizando metodologias já disponíveis na literatura tanto para detecção direta (PORTO *et al.*, 2011) quanto para detecção indireta (CASTRO *et al.*, 2010). Foram introduzidas nestas soluções de eletrólito compostos, tal como diferentes ciclodextrinas e solventes orgânicos, que pudessem auxiliar na separação dos isômeros de CLA de interesse, contudo, a separação de tais isômeros não foi possível. Também foi realizado um teste de separação dos CLA por CE a partir de um método que separou sete isômeros, incluindo os dois de interesse biológico (LIU *et al.*, 2012), entretanto, não conseguimos reproduzir tal separação, além disso, esse método descreve a separação dos isômeros de CLA após 30 minutos de análise, tempo ainda considerado longo para uma análise de monitoramento, que é a proposta aqui abordada.

Buscou-se então uma alternativa para a separação dos isômeros de CLA de interesse por GC, utilizando a coluna de FE SLB-IL111. Esta mesma FE foi utilizada anteriormente para aplicações envolvendo a separação de CLA, voltada à separação de vários isômeros e utilizando colunas de 100 m (DELMONTE *et al.*, 2011) e 200 m (DELMONTE *et al.*, 2012) de comprimento. Estas aplicações

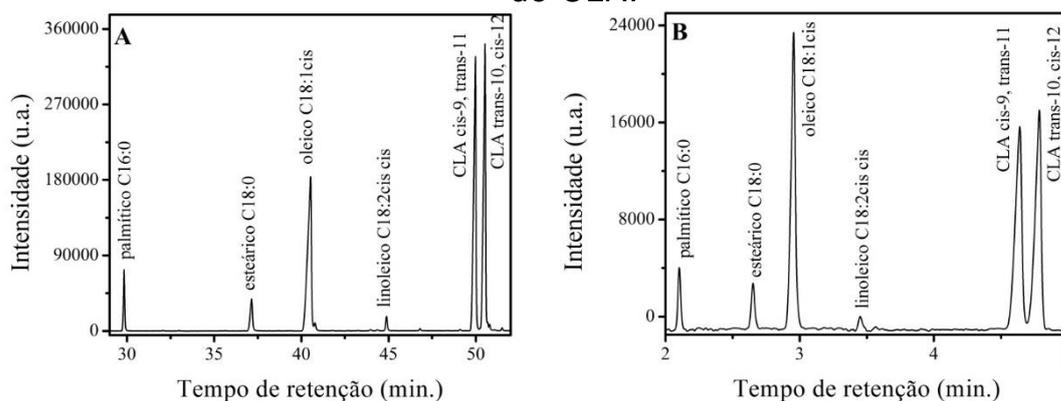
são interessantes para as pesquisas com CLA, pois separaram o isômero *trans-7*, *cis-9* do *cis-9*, *trans-11*, os mais abundantes na gordura do leite, contudo, tais métodos ainda gastam de 30 à 130 minutos para informar o teor de *cis-9*, *trans-11*, isômero de interesse com ação anticarcinogênica.

A partir dessas informações, buscou-se por uma coluna capilar que tivesse a mesma FE de líquido iônico, mas com dimensões reduzidas onde se pudesse obter uma separação mais rápida dos dois CLA de interesse biológico. Foi então encontrada uma coluna comercial, a SLB-IL111 de 15 m de comprimento, que fora utilizada anteriormente para análise de biodiesel (RAGONESE, TRANCHIDA, SCIARRONE, *et al.*, 2009; BUCHANAN *et al.*, 2011; SIGMA, 2011). A utilização de colunas com menores comprimentos, diâmetro interno e espessura do filme, bem como, com maior velocidade linear aplicada e aquecimento da coluna por isoterma tem sido chamadas de *fast GC* (KORYTÁR *et al.*, 2002; MAŠTOVSKÁ e LEHOTAY, 2003; MATISOVÁ e DÖMÖTÖROVÁ, 2003).

Um método de análise de biodiesel foi utilizado como ponto de partida para a análise de CLA por *fast GC* (DELMONTE *et al.*, 2011). Foi feita a injeção do padrão LUTA-60 na coluna SLB-IL111 com 15 m de comprimento utilizando as condições inicialmente descritas por Delmonte e colaboradores ao utilizarem uma coluna de mesma composição de fase estacionária, mas com 100 m de comprimento, figura 6.3 - B.

A mesma mistura de padrões foi analisada na coluna CPSil-88 e seu cromatograma é mostrado na figura 6.3 - A. Percebe-se que o perfil de separação se mantém para ambas as análises, contudo, o tempo gasto na primeira análise é cerca de 10 vezes maior que o tempo de análise dispensado pela segunda coluna para realizar o mesmo trabalho.

Figura 6. 3 – Cromatogramas mostrando a eluição dos isômeros de CLA.



Foi preparada uma mistura de padrões com os CLA na concentração de $9,0 \text{ mmolL}^{-1}$ a partir do padrão LUTA-60 comercial. Em A - Análise com coluna CPSil-88 com 100 m de comprimento, volume de injeção de $1,0 \mu\text{L}$ no modo *split* de 1:50, injetor e detector a $250 \text{ }^\circ\text{C}$; programação de temperatura inicialmente a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 min, aumento de $13 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $175 \text{ }^\circ\text{C}$; $175 \text{ }^\circ\text{C}$ por 27 minutos novo aumento de $4 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $215 \text{ }^\circ\text{C}$; $215 \text{ }^\circ\text{C}$ por 35 minutos; em B - Análise com coluna SLB111 com 15 m de comprimento, volume de injeção de $1,0 \mu\text{L}$ no modo *split* com razão 1:100; injetor e detector à $250 \text{ }^\circ\text{C}$; isoterma em $168 \text{ }^\circ\text{C}$ com tempo de análise de 6,0 minutos

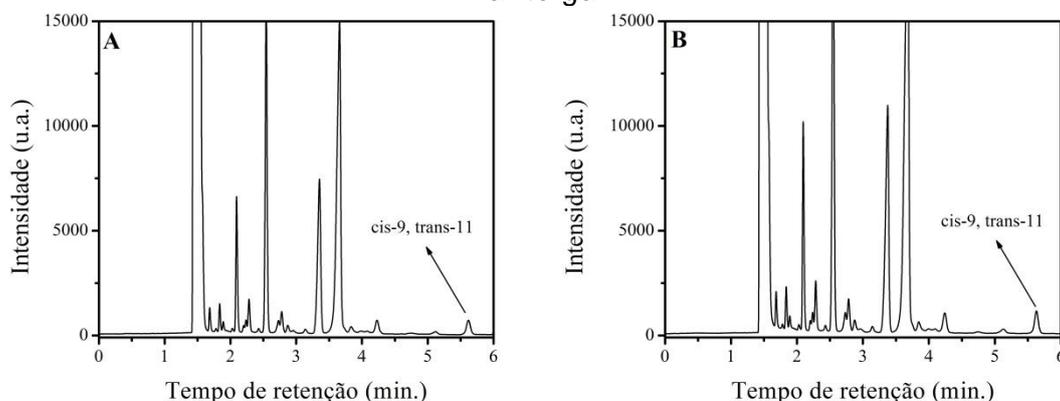
Fonte: A AUTORA.

Para verificar se o perfil obtido com os padrões se manteria nas amostras era necessária a injeção de uma amostra, que por sua vez, precisava de um método de preparo eficiente. Sendo assim, foram testados dois métodos de extração de gordura de uso bastante difundido na literatura, um que utiliza clorofórmio e metanol (FOLCH *et al.*, 1957) e outro que utiliza hexano e isopropanol (HARA e RADIN, 1978) como solução extratora. Ambos os extratos foram transesterificados por catálise básica (CHRISTIE, 1993; CHRISTIE e HAN, 2012) com solução de metóxido de sódio.

As principais diferenças entre esses dois métodos de extração são a polaridade e a toxicidade dos solventes, bem como, a localização da fase orgânica no tubo durante a extração. No primeiro, a fase orgânica fica abaixo da fase aquosa, sendo, portanto, um pouco mais difícil de ser coletada quando se utiliza um tubo de vidro no lugar de um funil de separação. Já no segundo, a fase orgânica fica acima da fase aquosa, essa diferença ocorre devido às diferentes

densidades dos solventes utilizados. Os cromatogramas obtidos neste teste são apresentados na figura 6.4¹.

Figura 6. 4 – Comparação dos métodos de extração para amostras de manteiga.



A – Extração com clorofórmio e metanol e B – Extração com álcool isopropílico e hexano. Condições experimentais na figura 6.3.

Fonte: A AUTORA.

Para o teste de escolha do método de extração foi utilizada uma amostra de manteiga gentilmente cedida pela EMBRAPA Gado de Leite - Juiz de Fora. Optou-se por trabalhar com a manteiga no lugar do leite por ser ela produto da junção do leite de todos os animais do mesmo grupo de estudo, e conseqüentemente, estar disponível em maiores quantidades do que as amostras de leite individual. Ademais, a composição da gordura presente na manteiga é a mesma da presente no leite, sendo a manteiga, todavia menos sensível ao processo de congelamento e descongelamento que ocorre durante os testes, para coleta da amostra.

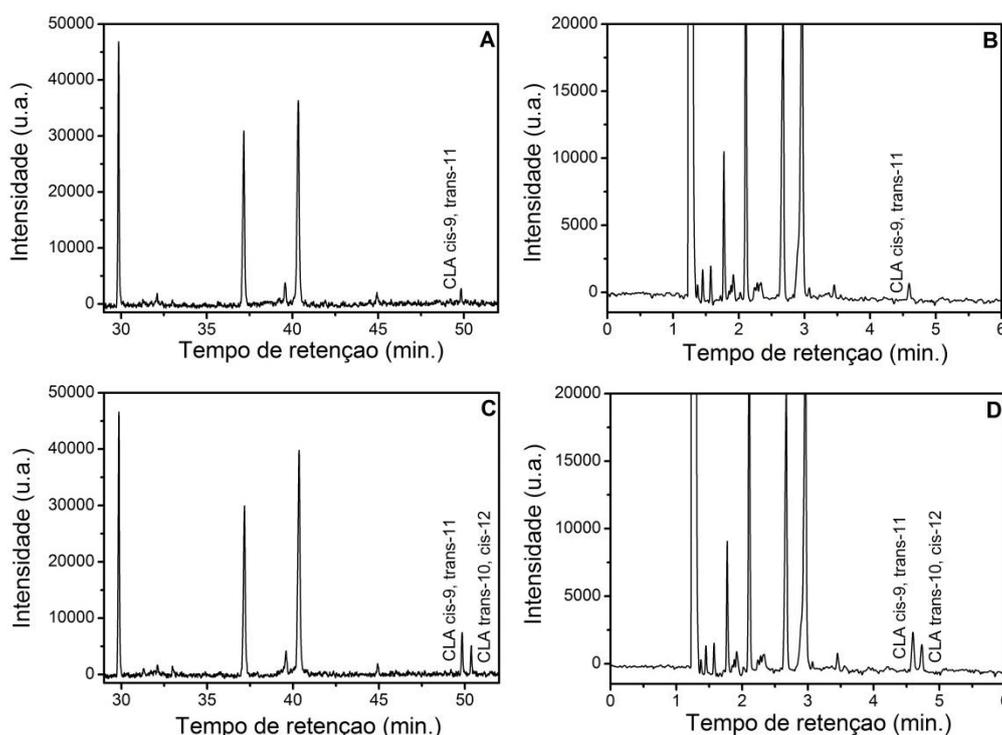
Os cromatogramas foram comparados de forma qualitativa e foi possível observar, para todas as amostras testadas, que ambos os métodos geram respostas similares como pode ser observado na figura 6.4 para a amostra de manteiga. Ainda na figura 6.4 observa-se que o sinal obtido em A é ligeiramente menor que o obtido em B quando se avalia, ainda que de forma qualitativa, a

¹ Observa-se uma variação de cerca de um minuto no tempo de retenção do isômero *cis-9, trans-11* da Figura 6.3 - B para a Figura 6.4. Esta variação ocorreu por terem sido utilizadas duas colunas SLB-IL111 ao longo dos experimentos, e ainda por que a coluna utilizada para obter o cromatograma da Figura 6.4 estava com 14 m de comprimento, não mais os 15 m entregues pelo fabricante.

intensidade dos picos. Sendo assim, optou-se por trabalhar com a extração por hexano e isopropanol (3:2 v:v) já que esta mistura é menos tóxica e de mais fácil utilização.

O método aponta-se como seletivo para a separação rápida dos CLA de interesse, visto que tanto no padrão quanto na amostra ambos parecem não coeluir com outros AG. Entretanto, muitos outros picos, referentes a uma enorme gama de AG presentes em amostras de leite eluem antes dos CLA, formando uma região de coeluição (1,0 a 3,5 min), inclusive com o pico referente ao solvente, como pode ser visto na figura 6,5 - B. Sabendo que a quantificação de AG por GC é normalmente realizada por normalização de área (A.O.C.S., Reapproved 1997 Revised 2001) e, geralmente, expressa em g por 100 g de AG totais, sendo considera neste cálculo a área de todos os AG presentes na amostra, concluiu-se que seria necessária uma quantificação diferente para os CLA nesta análise rápida aqui proposta.

Figura 6.5 – Adição de padrão de CLA *cis-9*, *trans-11* e *trans-10*, *cis-12* à amostras de leite.



A e C – Coluna CPSil-88; B e D – Coluna SLB111.

Fonte: A AUTORA.

Muitas são as formas de se quantificar um determinado analito. Pode-se construir uma curva analítica interna, preparando-se soluções com quantidade fixa de matriz que não contenha o analito e quantidades crescentes de padrão. Pode-se construir uma curva analítica externa, preparando-se soluções com quantidades crescentes de padrão e ausência da matriz. Pode-se fazer uso de fatores de resposta adicionando às análises um padrão interno para correção de variações experimentais. E existe ainda a curva de adição de padrão que relaciona o sinal do analito na amostra com o sinal do analito à amostra dopada com padrão em concentração conhecida (SKOOG *et al.*, 2006).

Foram realizados testes com diferentes AG, a saber, C13:0; C15:0; C19:0; C19:1, para que pudessem ser utilizados como IS, e assim, realizar a quantificação através de um fator de resposta. Entretanto, todos os AG testados eluíam na região de coeluição, e, portanto, não poderiam ser aplicados para este fim. Resolveu-se então realizar a quantificação por adição de padrão, que considera as relações:

$$S_1 = k[A_a] \quad (7)$$

$$S_2 = k[A_a] + k[A_p] \quad (8)$$

onde S_1 é o sinal do analito na amostra, k uma constante de proporcionalidade, $[A_a]$ é a concentração do analito na amostra, S_2 é o sinal do analito na solução padrão e $[A_p]$ é a concentração do analito na solução padrão. Ao rearranjarmos essa relações chegamos a:

$$[A_a] = \frac{S_1[A_p]V_p}{V_a(S_2 - S_1)} \quad (9)$$

onde V_p é o volume da solução padrão e V_a é o volume da solução de extrato da amostra utilizado. A figura 6.5 mostra a adição de padrão em uma das amostras analisadas por ambas as colunas. Pode-se perceber que o isômero *trans-10*, *cis-12* não pode ser detectado nos dois casos, sendo quantificado e comparado apenas o isômero *cis-9*, *trans-11*.

A Tabela 6.2 apresenta os resultados da quantificação do isômero *cis-9*, *trans-11* por GC utilizando nas duas colunas aqui comparadas as diluições apresentadas na tabela 6.1. O preparo das amostras e sua quantificação foi feito em duplicata e o teste-*t* pareado realizado nos valores médios com 95% de confiança. Como o p-valor calculado é maior que 0,05 aceitou-se a hipótese nula,

de que não existem evidências que os valores obtidos por ambos os métodos sejam significativamente diferentes.

Tabela 6.2 – Resultados da quantificação do CLA em leite.

Amostras	[<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11] ^a		p-valor ^b
	CPSil-88	SLB-IL111	
Leite controle	0,18	0,23	0,14
Leite enriquecido	0,36	0,35	

a - g L⁻¹; b - Teste *t* pareado com 95% de confiança.

Fonte: A AUTORA.

6.4 CONCLUSÕES

A partir da utilização de uma coluna com FE diferenciada foi possível separar e quantificar o CLA *cis*-9, *trans*-11 em amostras de leite cru. A principal contribuição deste método alternativo de análise de CLA proposto é o aumento da frequência analítica em laboratórios dedicados a esse tipo de pesquisa. Se comparado a um método de análise tradicional desses compostos, o método aqui proposto aumenta em dez vezes a frequência de análise, diminuindo assim o tempo de obtenção dos resultados bem como, os gastos com gases utilizados nas análises de GC.

7 SELEÇÃO DE BIOMARCADORES EM PLASMA HUMANO POR ANÁLISE FINGERPRINT

A aterosclerose é uma enfermidade sistêmica que consiste no depósito e infiltração de lipídeos nas paredes e nas artérias. Acredita-se que as placas ateroscleróticas começam a depositar-se em nossas artérias já na infância, seguindo o acúmulo com o tempo, de modo que quando chegamos à fase adulta, já sofremos com quantidades consideráveis de placa acumulada. Um grande número de doenças com apresentações clínicas diferentes são relacionados com aterosclerose; entre estes, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, aneurisma abdominal e isquemia dos membros inferiores. Estas enfermidades determinam a morbidade e mortalidade em populações de estilo ocidental. Contudo, apesar desse amplo espectro de doenças, a maioria das manifestações agudas da aterosclerose compartilha como etiologia principal a ruptura de uma placa aterosclerótica. Esta ruptura é seguida da formação de um trombo que pode levar à obstrução total ou parcial do fluxo arterial. Este processo causa insuficiência de oxigênio para satisfazer as necessidades do coração, cérebro e outros órgãos, podendo, em último caso, gerar uma necrose na região onde houve falta de oxigenação (FALK, 1989; DAVIES, 1990).

O início de ruptura da placa é um processo complexo, a inflamação do lipídeo presente leva à degradação e enfraquecimento do tecido com a placa. Por outro lado, a proliferação de células da parede interna das artérias e a síntese de colágeno exercem efeitos estabilizadores e reparadores. Os aspectos biológicos relacionados à presença da placa determinam, em grande medida, se o trombo será ou não formado. A liberação do ateroma foi mais bem estudada nas artérias coronárias e, por conseguinte, surgiram correlações entre a morfologia das placas, o grau de formação dos trombos e o tipo de síndrome coronária resultante nos pacientes. Estas observações levaram a um conceito de placas ateroscleróticas instáveis: placas com uma morfologia instável que dão origem ao aparecimento de doença da artéria coronária instável (DAVIES, 1990; PASTERKAMP *et al.*, 1998; KINLAY e EGIDO, 2006).

São muitos os fatores de risco reconhecidos como fatores indutores desta disfunção endotelial. A influência genética é inquestionável, mas existem muitos outros fatores como o tabagismo, a hipertensão arterial, diabetes, obesidade,

idade avançada entre outros, que aceleram o curso da enfermidade permitindo assim a aparição das complicações relacionadas à placa e conseqüentemente, às síndromes derivadas desta (CATENA *et al.*, 2003). Uma questão de especial relevância é que um dos fatores de risco também considerado é se o paciente sofreu ou não um evento coronário anteriormente. Mesmo que muitos pacientes não voltem a sofrer novos eventos, eles pertencem, seguramente, a um grupo de maior risco. Essa diferença, de voltar ou não a sofrer novos eventos pode ser associada à estabilidade da placa aterosclerótica. Mas os motivos pelos quais em alguns casos a placa se estabiliza e em outros não, ainda são desconhecidos.

Existe então um grande interesse em conhecer os mecanismos biológicos e moleculares envolvidos na progressão da aterosclerose, mecanismos esses que fazem com que ela se torne estável ou instável. Além disso, na era da “medicina personalizada”, contar com marcadores que definam o risco de um novo evento poderia não só reduzir o número de pacientes em urgências, como também poderia prevenir a evolução da enfermidade em novos paciente por meio de tratamento adequado em função de um diagnóstico precoce.

7.1 OBJETIVOS

7.1.1 Objetivo geral

- Encontrar candidatos à biomarcadores que ajudem a diferenciar pacientes com aterosclerose estável e instável.

7.1.2 Objetivos específicos

- Realizar a análise, em diferentes plataformas analíticas, de amostras de plasma de pacientes diagnosticados com aterosclerose;
- Obter modelos bioquímico-estatísticos que ajudem a descrever a enfermidade;
- Encontrar possíveis biomarcadores que auxiliem a definir o risco de um novo episódio coronário.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes e os padrões utilizados foram de grau analítico. A água foi purificada por deionização utilizando o sistema Milli-Q plus 185 system (Millipore, Billerica, MA, USA). Metanol, etanol, acetonitrila, ácido fórmico (HFO), cloridrato de orto-metoxiamina (O-MtAm), solução comercial de 1 % de trimetilclorosilano (TMCS) em N, O – bis (trimetilsilil) trifluoracetamida (BSTFA), piridina (Py), heptano e estearato de metila foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

As soluções de fase móvel (FM) foram preparadas por diluição de 1,0 mL de HFO em água e em ACN, em balão volumétrico de 1,0 L, para preparo das FM A e B respectivamente. A solução de EtOH:MeOH utilizada para precipitação de proteínas em LC-MS foi preparada por mistura de volumes iguais dos solventes em balão volumétrico de 25 mL e mantida a – 20 °C. A solução de O-MtAm:Py foi preparada por dissolução de 150 mg de O-MtAm em 10 mL de Py utilizando balão volumétrico na capela. Esta solução foi armazenada a – 20 °C e utilizada por no máximo 15 dias. A solução de estearato de metila foi preparada na concentração de 10,0 mg L⁻¹ a partir de solução estoque de 1000 mg L⁻¹, ambas mantidas a – 20 °C.

7.2.2 Obtenção e seleção das amostras

Foram coletadas amostras de plasma de cerca de 600 pacientes da Fundação Jiménez Díaz Hospital (Madri, Espanha) pela equipe do médico Sr. José Tuñón ao longo do ano de 2006. Todos os pacientes sofriam de aterosclerose e as amostras foram coletadas seis meses após o primeiro evento desses pacientes, neste caso, infarto do miocárdio.

Todos os pacientes foram acompanhados durante seis anos após o primeiro evento e ao longo deste período percebeu-se que alguns deles mantiveram-se estáveis, ou seja, não sofreram novos eventos durante o tempo de acompanhamento, e os demais pacientes apresentaram pelo menos um segundo evento durante os anos em que tiveram acompanhamento médico. O

estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do hospital e as amostras foram identificadas por meio de códigos para manter a privacidade dos pacientes e mantidas sob refrigeração na temperatura de - 80 °C até o momento da análise.

Foi selecionado, pela equipe médica, com base nos dados acumulados ao longo dos seis anos de acompanhamento, um grupo de 38 amostras em que metade dos pacientes se manteve estável e a outra metade sofreu vários eventos ao longo desse tempo, sugerindo assim que parte desses pacientes teriam aterosclerose estável e parte deles teriam aterosclerose instável. Este grupo piloto, apresentado na Tabela 7.1, foi selecionado de forma bastante homogênea, tentando-se igualar nos dois grupos (recorrentes e não recorrentes) características que pudessem produzir diferenças metabólicas como sexo, idade, índice de massa corporal (IMC), dentre outras características. O cálculo do IMC foi realizado a partir da equação 10 abaixo:

$$IMC = \frac{m}{h^2} \quad (10)$$

onde m é a massa corporal em quilograma e h é a altura do paciente em metros.

Tabela 7.1 – Relação dos pacientes do grupo piloto e estágio da enfermidade.

Amostra	Paciente	Recorrente	IMC	Gênero	Idade	CA	Glicose
1	415	S	37	M	69	113	-
2	452	N	24	M	78	95	101
3	4184	S	38	M	75	125	113
4	2150	N	29	M	67	96	91
5	417	S	28	M	80	102,5	-
6	4139	N	34	M	71	119	103
7	4220	S	31	M	75	99	92
8	479	N	30	M	73	97	115
9	247	S	30	M	73	94	-
10	358	N	28	M	61	101	-
11	4189	S	26	M	50	104	96
12	487	N	23	M	69	86	94
13	362	S	36	M	44	111	-
14	4143	N	29	M	61	103	106
15	4252	S	27	M	58	97	98
16	4259	N	-	M	72	-	89
17	448	S	38	M	61	121	107
18	2165	N	23	M	61	91	98
19	2157	S	27	M	54	101	96
20	2287	N	26	M	71	90	173
21	4134	S	-	M	46	-	-
22	466	N	24	M	53	86	96
23	431	S	37	M	49	117	112
24	4121	N	30	M	65	107	115
25	484	S	-	F	74	-	-
26	4163	N	31	F	70	118	98
27	446	S	30	F	80	99	102
28	468	N	24	F	68	96	97
29	4104	S	34	F	60	103	115
30	4192	N	27	F	65	96	112
31	413	S	24	F	76	87	-
32	4182	N	32	F	71	102	94
33	4144	S	40	F	67	122	100
34	2110	N	27	F	55	71	109
35	496	S	34	F	81	108	106
36	4274	N	30	F	79	94	100
37	4156	S	26	M	75	98	110
38	4196	N	26	M	79	92	112
Valores médios		S	32		66	106	104
		N	28	-	68	97	102

Recorrentes: S - sim e N - não; Gênero: M - masculino e F - feminino;
CA - circunferência abdominal, dada em cm; Glicose dada em mg dL⁻¹.

Fonte: A AUTORA.

Um novo conjunto de amostras foi selecionado para ser analisado com a técnica que fornecesse mais resultados. A finalidade da análise de um novo grupo de amostras foi de promover uma validação externa do modelo, prevendo

as amostras do segundo grupo no modelo bioestatístico obtido com o primeiro grupo. O segundo grupo está apresentado na Tabela 7.2.

Tabela 7.2 – Relação dos pacientes do grupo de validação do modelo e estágio da enfermidade.

Amostras	Paciente	Recorrente	IMC	Gênero	Idade	CA	Glicose
39	334	S	38	M	69	127	173
40	2230	N	34	F	73	-	160
41	2153	S	24	M	67	97	94
42	234	N	29	F	69	101	-
43	412	S	-	F	74	93	-
44	443	N	27	M	67	100	100
45	4306	S	-	M	72	-	118
46	2114	N	25	M	72	97	93
47	383	S	26	M	67	95	107
48	2281	N	-	H	67	-	125
49	470	S	27	M	72	110	89
50	2174	N	30	F	71	97	160
51	2188	S	28	F	60	107	91
52	414	N	30	M	73	104	-
53	4120	S	28	F	71	102	-
54	2208	N	25	M	72	100	118
Valores médios		S	29	-	69	104	112
		N	29	-	71	100	126

Recorrentes: S - sim e N - não; Gênero: M - masculino e F - feminino; CA - circunferência abdominal, dada em cm; Glicose dada em mg dL⁻¹.

Fonte: A AUTORA.

As amostras foram analisadas por GC-MS (GARCÍA e BARBAS, 2011) e por LC-MS (CIBOROWSKI *et al.*, 2012) utilizando métodos já estabelecidos para essas amostras. Ambas as metodologias visam obter um amplo quadro a respeito dos analitos encontrados, não priorizando nenhuma classe de compostos presentes nas amostras.

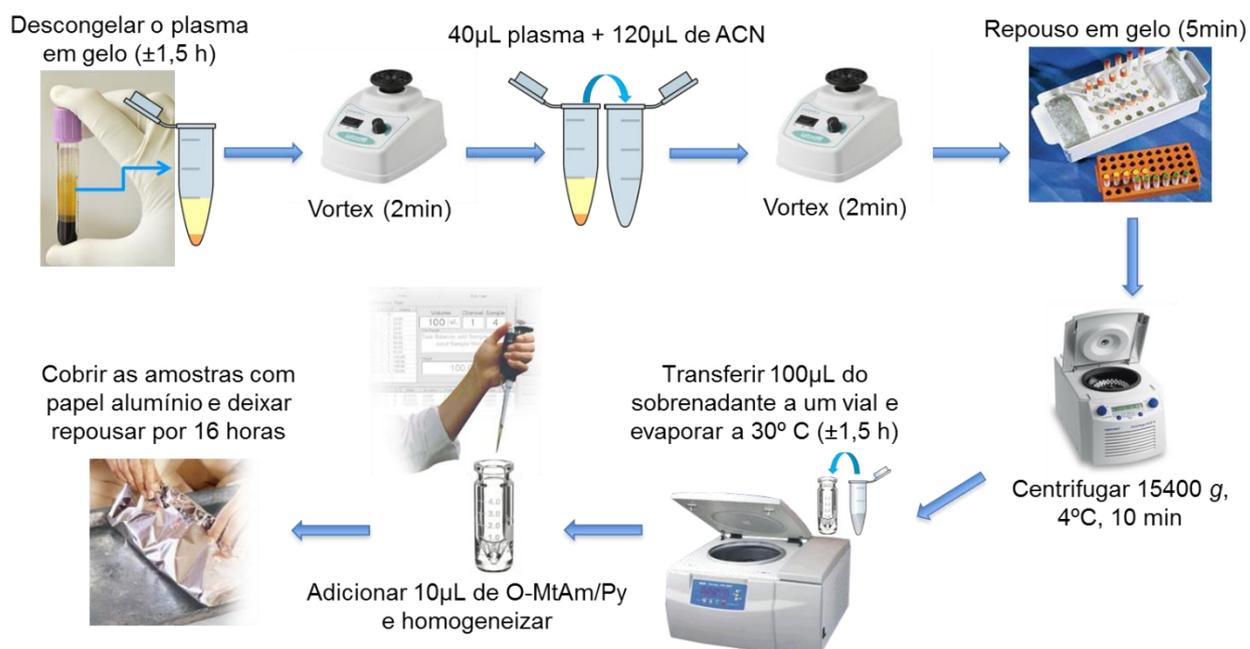
7.2.3 GC-MS

O preparo das amostras para análise por GC-MS está representado no esquema da figura 7.1. As amostras de plasma foram descongeladas em banho de gelo para que o processo ocorresse de forma lenta, não ocasionando choque térmico nas mesmas. As proteínas foram precipitadas pela adição de ACN, a mistura foi agitada em vortex e centrifugada. O volume de 100 µL de sobrenadante foi transferido para um *vial* e o solvente foi evaporado à 30 °C em um concentrador de amostras a vácuo. Após a evaporação, foram adicionados

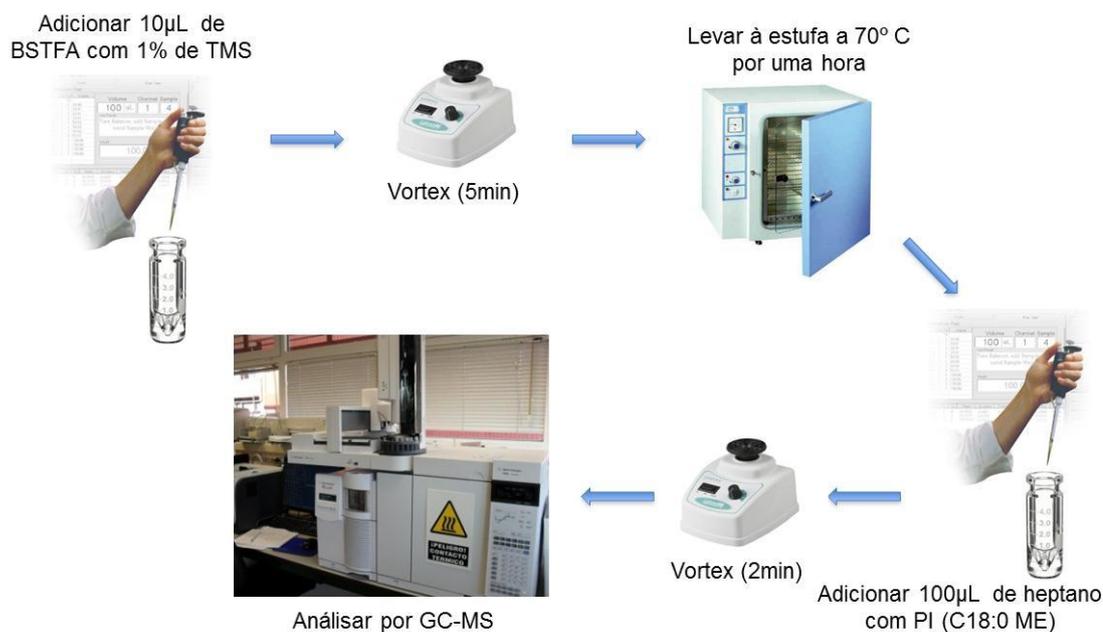
10 μL de solução de cloridrato de orto-metoxiamina em piridina na concentração de 15,0 mg L^{-1} , os *vials* foram tampados (com tampas descartáveis de alumínio e silicone) e as amostras acondicionadas em estantes, cobertas com papel alumínio e mantidas na temperatura ambiente por 16 horas.

Figura 7. 1 – Esquema do preparo das amostras para análise por GC-MS.

1º Dia



2º Dia



Fonte: A AUTORA.

Os vials foram destampados e a estes foram adicionados 10 μL de solução comercial de TMCS em BSTFA na concentração de 1%, os vials foram tampados, agitados em vortex e aquecidos em estufa a 70 $^{\circ}\text{C}$ por uma hora. Aguardou-se que os vials voltassem à temperatura ambiente, os vials foram destampados e a estes foram adicionados 100 μL de solução do FAME estearato de metila (C18:0ME) em heptano na concentração de 10,0 mg L^{-1} . Os vials foram novamente tampados e agitados em vortex para posterior análise. Foram necessários dois dias de manipulação da amostra antes que estas pudessem ser analisadas no equipamento de GC-MS. Todo o material utilizado neste processo foi descartado de forma apropriada, em descarte biológico. Sempre foram observadas as questões de segurança como a utilização de luvas descartáveis, óculos de segurança e máscaras de proteção, por se tratar de análise de amostras de plasma humano.

As análises foram realizadas num equipamento de cromatografia a gás da Agilent modelo 5975C TAF Series GC/MSD System Data Sheet utilizando a coluna Agilent DB5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,55 μm) e 10 m de coluna de guarda. Foram injetados 2 μL de amostra, o gás de arraste foi o hélio na razão de 1 mL min^{-1} , a temperatura do injetor foi de 250 $^{\circ}\text{C}$, com razão *split* de 1:10, a separação ocorreu com gradiente de temperatura com temperatura inicial de 60 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto seguido de um aumento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 325 $^{\circ}\text{C}$, a temperatura da linha de transferência para o detector foi de 290 $^{\circ}\text{C}$, da fonte foi de 230 $^{\circ}\text{C}$ e do quadrupolo de 150 $^{\circ}\text{C}$. A fonte de íons operou a -70 eV no modo de varredura com uma range de massas de 50-600 m/z.

Este método de análise é um método padrão que permite posterior comparação dos resultados com uma biblioteca de espectros especialmente desenvolvida para trabalhos que envolvam análise de metabólitos humanos, a biblioteca de Fiehn (KIND *et al.*, 2009). O uso desse método tem como principal vantagem a comparação dos tempos de retenção dos analitos, o que não é possível de ser feito com outras bibliotecas de espectros onde constam somente o perfil de fragmentação do composto.

Os dados obtidos com o *software* ChemStation (*software* que controla o GC-MS e a aquisição dos dados) passaram por processo de deconvolução utilizando o *software* AMIDS. A partir dos dados deconvolucionados o AMIDS

compara os espectros obtidos na análise com os espectros disponíveis na biblioteca de Fiehn, gerando então uma lista de metabólitos identificados e possivelmente presentes para cada uma das amostras analisadas.

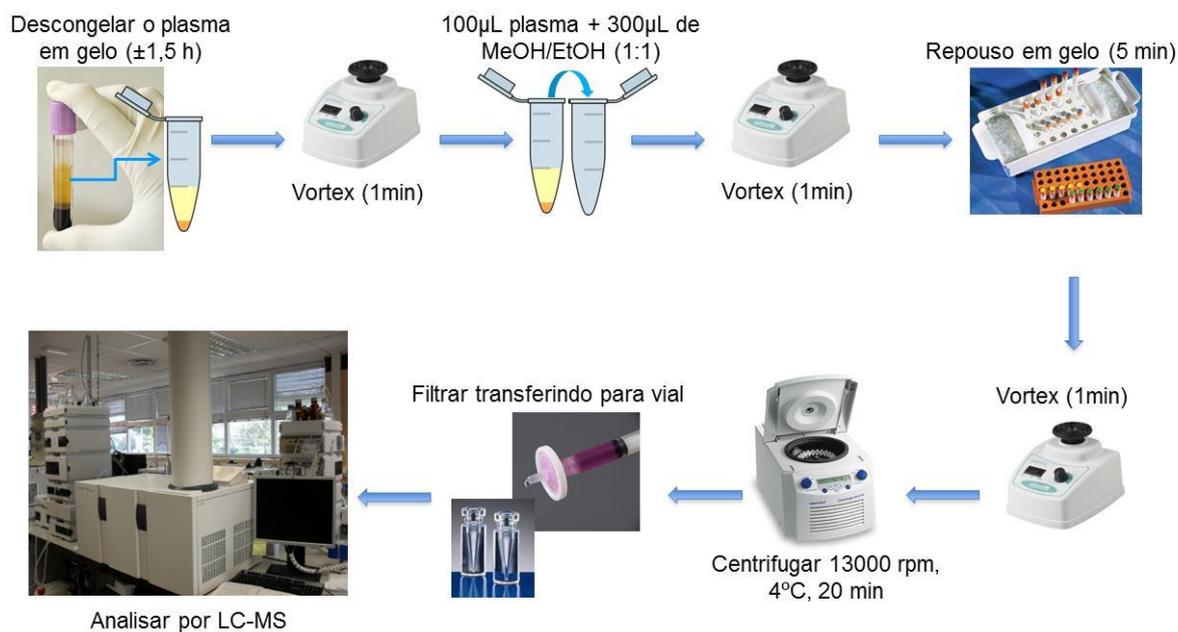
Os metabólitos identificados tem sua presença verificada nos dados originais, usando o ChemStation. É observado se os tempos de retenção gerados a partir da comparação com a biblioteca de espectros são reais, bem como, se o perfil de fragmentação possui alta similaridade (acima de 85%) com o perfil de fragmentação disponível na biblioteca. Os metabólitos que passam por esse teste são então alinhados no *software MASS PROFILER PROFESSIONAL* (MPP) utilizando o éster metil estearato, adicionado às amostras como padrão interno. É gerado então um único arquivo em que todas as amostras, assim como todos os analitos identificados, são arranjados na forma de uma matriz.

Essa matriz é utilizada para a realização dos cálculos estatísticos multivariados, com discriminação das amostras em grupos e posterior obtenção de modelo bioestatístico no *software SIMCA*. Os compostos selecionados como significativos após o tratamento de dados são então submetidos à interpretação biológica juntamente com os metabólitos oriundos de outras técnicas analíticas.

7.2.4 LC-MS

As amostras foram preparadas de acordo com o esquema apresentado na figura 7.2 abaixo. As amostras de plasma foram descongeladas em banho de gelo e as proteínas foram precipitadas pela adição da mistura de solventes metanol:etanol na proporção 1:1 v:v previamente resfriadas à - 20 °C. A mistura foi agitada em vortex, centrifugada e o sobrenadante foi filtrado diretamente a um vial para posterior análise. É válido ressaltar que todo o material manipulado neste preparo de amostra foi descartado de forma adequada, juntamente com outros materiais biológicos.

Figura 7. 2 – Esquema do preparo das amostras para análise por LC-MS.



Fonte: A AUTORA.

As análises foram realizadas em um equipamento de cromatografia a líquido da Agilent modelo Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC-MS utilizando coluna Supelco Discovery HS C₁₈ (150 x 2,1 mm, 3 μ m) e coluna de guarda Supelco Discovery HS C₁₈ (20 x 2,1 mm, 3 μ m). Foram injetados 10 μ L de amostra mantidas no equipamento na temperatura de 4 °C, a fase móvel consistiu em água + 0,1% de ácido fórmico (A) e ACN + 0,1% de ácido fórmico (B). O gradiente utilizado iniciou com 25% de B até 95% de B em 35 minutos, retornando a condição de partida, 25% de B durante 9 minutos. O fluxo foi de 0,6 mL/min, os dados foram coletados em polaridade positiva na temperatura de 330 °C e o detector foi operado em modo de varredura completa com massas de 50 a 1000 m/z.

Para controle do equipamento, obtenção dos dados e criação do método de deconvolução foi utilizado o *software* Mass Hunter. Os dados de LC-MS foram deconvolucionados utilizando o *software* DA-Reprocessor e posteriormente foram alinhados utilizando o *software* MPP. Neste ponto foi criada uma matriz de dados contendo os diferentes analitos obtidos para cada amostra. Foi então realizado um filtro de presença de 90% em um dos dois grupos – caso e controle. Esta matriz passou por análise estatística no SIMCA, onde foi possível obter um

modelo bioquímico-estatístico. Desta forma foi extraída uma lista de massas estatisticamente significativas para esta enfermidade encontradas nas amostras.

Diferentemente do tratamento dos dados da técnica de GC-MS, ainda não existe para a técnica de LC-MS uma biblioteca de espectros em que seja possível a comparação do perfil de fragmentação concomitantemente com o tempo de retenção. Sendo assim, a lista de massas obtida foi submetida à diferentes bases de dados disponíveis gratuitamente: Metlin (SMITH *et al.*, 2005), Masstrix (SUHRE e SCHMITT-KOPPLIN, 2008) e HMDB (WISHART *et al.*, 2007).

Estas bases de dados geram listas de possíveis metabólitos para cada massa encontrada. É feita então uma tabela com todos os possíveis metabólitos encontrados para cada massa utilizando uma planilha de dados do Excel. A princípio são excluídos os metabólitos propostos pelas bases de dados que não sejam de origem humana ou que não sejam comumente encontrados nesse organismo. Ao final deste trabalho é obtida então uma lista de massas correlacionadas com metabólitos.

Para comprovar a presença desses metabólitos as amostras são novamente analisadas no equipamento de LC-MS, desta vez no modo *tandem*, para gerar os espectros de MS-MS das massas selecionadas. São ainda analisados padrões dos possíveis metabólitos encontrados, também no modo *tandem*, com o objetivo de comparar o perfil de fragmentação das massas encontradas nas amostras com o perfil de fragmentação dos padrões.

Uma vez comprovada a presença desses metabólitos na amostra, esses compostos selecionados estatística e biologicamente se unem aos resultados obtidos por outras técnicas analíticas para auxiliar no entendimento de qual rota metabólica é alterada pela enfermidade. A interpretação biológica é feita buscando a presença e função destes compostos no metabolismo humano, bem como as implicações na alteração de sua produção.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.3.1 GC-MS

Todas as amostras foram analisadas exceto a amostra 8 que não foi encontrada na caixa onde as demais amostras selecionadas haviam sido armazenadas. Acredita-se que tal amostra tenha sido extraviada ainda no hospital, sendo então estocada juntamente com amostras de outro estudo. Também não foram consideradas no modelo as amostras que não apresentaram sinal na análise de cromatografia a gás, como as amostras 9 e 25. Após o processo de derivatização das amostras foi observada a formação de um precipitado no fundo dos *vials*, acredita-se que por problemas com vedação inadequada durante o processo de manipulação.

Os espectros obtidos através da análise de amostras de plasma de pacientes que sofrem de aterosclerose foram comparados com a biblioteca de espectros disponível. Em seguida pode-se alinhar os dados onde foram encontrados um total de 116 metabólitos nas amostras. Contudo, dentre esses 116 metabólitos, nem todos foram identificados em todas as amostras, podendo ser inclusive uma característica particular de apenas um dos pacientes.

Para evitar trabalhar com metabólitos que seguramente não são característicos da enfermidade, foi feito um filtro de presença de 90%. Este filtro busca metabólitos que estejam presentes em pelo menos 17 (90% de 19) pacientes em um dos dois grupos. Podendo ser aceito, por exemplo, um metabólito presente em 17 amostras dos pacientes com aterosclerose instável e presente em apenas 3 dos pacientes com aterosclerose estável. Após este filtro de presença restaram 46 compostos organizados em uma matriz de dados. Estes dados foram normalizados a partir da abundância de metil estearato, padrão interno adicionado a todas as amostras em concentração constante. Na sequência estes dados foram avaliados por estatística univariada, foram extraídos dois compostos significativos ao nível de 95% de confiança através da aplicação do teste de variância (Teste F) e teste-*t* (t de *Student*). Estes resultados estão apresentados na tabela 7.3.

Tabela 7.3 – Resultados obtidos pela análise dos dados de GC-MS.

Composto	Massa	Tempo de retenção	%Variação
Ácido β-hidroxibutirico	104	8,2	60,7
Ácido α-hidroxibutirico	104	7,7	43,9
Ácido oleico (C18:1)	282	20,4	46,7
Ácido palmítico (C16:0)	256	18,8	13,5
Ácido linoleico (C18:2)	280	20,3	23,8
Metionina	149	13,0	11,5
Glicerol	92	9,8	19,7

Fonte: A AUTORA.

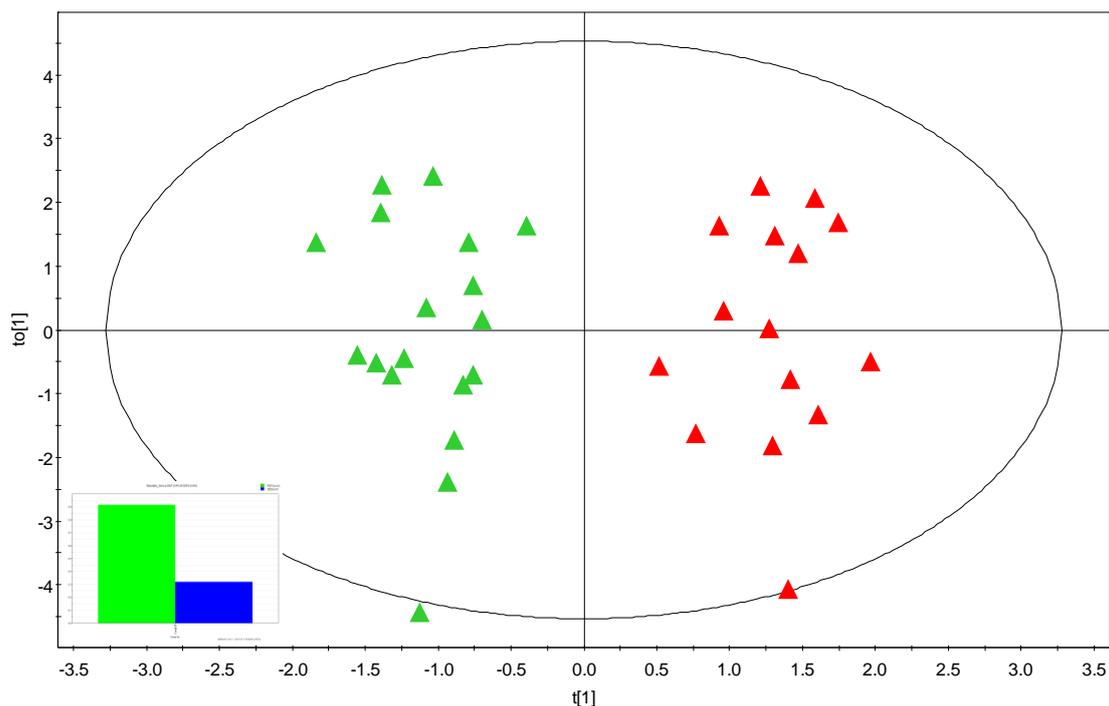
Para a análise multivariada os dados foram escalonados por variância única e foram construídos modelos de Análise de Componentes Principais (PCA) (não mostrado) e Análise Discriminante de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonal (OPLS-DA), mostrado na figura 7.3. O detalhe na figura 7.3 mostra os coeficientes de correlação (R^2) e de predição (Q^2). Como neste trabalho foram utilizadas amostras de humanos, sem qualquer controle sob sua alimentação, hábitos ou medicamentos, admitiu-se como aceitáveis valores de $R^2 = 0,916$ e $Q^2 = 0,319$. A partir da análise multivariada foram selecionados sete compostos com base nos gráficos de *S-Plot* e *Jack-Knife* (não mostrados). Dois destes sete compostos coincidiram com os que foram obtidos por análise univariada. Estes resultados estão apresentados na Tabela 7.3.

A massa apresentada na tabela não possui as casas decimais, pois após o alinhamento estas são perdidas. O percentual de variação entre o grupo de pacientes com aterosclerose estável frente o instável foi calculado de acordo com a equação abaixo, considerando a abundância dos metabólitos em cada grupo:

$$\%Variação = \left(\frac{\text{média dos instáveis}}{\text{média dos estáveis}} \times 100 \right) - 100 \quad (7)$$

Onde valores positivos sinalam que este metabólito está aumentado no grupo dos pacientes com aterosclerose instável e valores negativos sinalizam que o metabólito está diminuído neste grupo.

Figura 7. 3 – Representação do modelo de OPLS-DA obtido para a técnica de GC-MS.



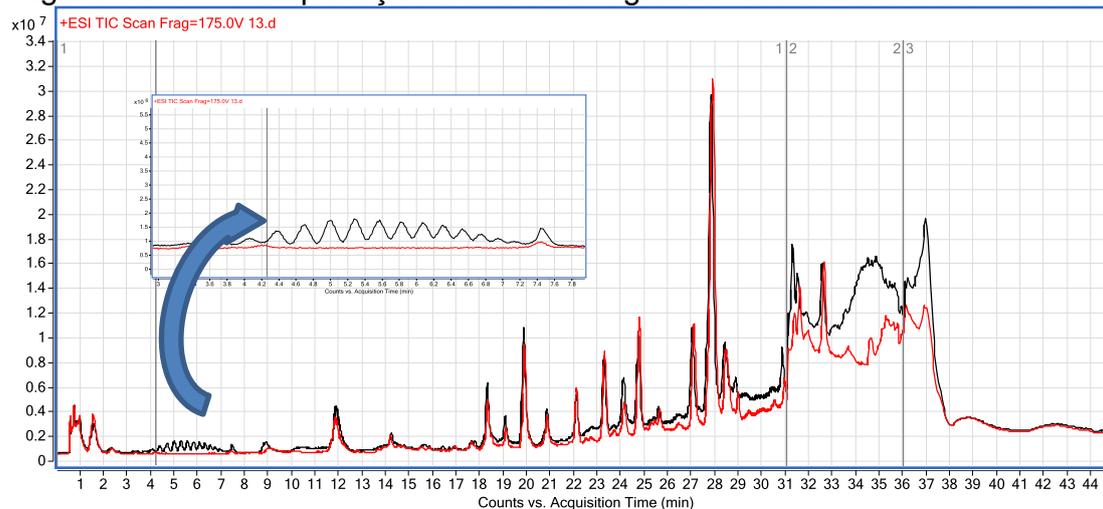
Abaixo a representação dos coeficientes de correlação (R^2 em verde = 0,916) e predição (Q^2 em azul = 0,319) para o modelo. Na figura os pacientes estáveis são representados por: ▲ e os recorrentes por: ▲.

Fonte: A AUTORA.

7.3.2 LC-MS

No equipamento de LC-MS a amostra 8 também não foi analisada e houve algum problema na manipulação da amostra 30. Ela apresentou valores de intensidade mais altos quando comparada com as demais amostras e, além disso, apresentou picos anômalos na região entre três e oito minutos de análise, figura 7.4. Acredita-se que esses picos estejam relacionados com o material com o qual fora confeccionado o frasco de coleta e/ou armazenamento da amostra, picos referentes a interferência do polietilenoglicol.

Figura 7. 4 – Comparação do cromatograma das amostras 30 e 13.



Fonte: A AUTORA.

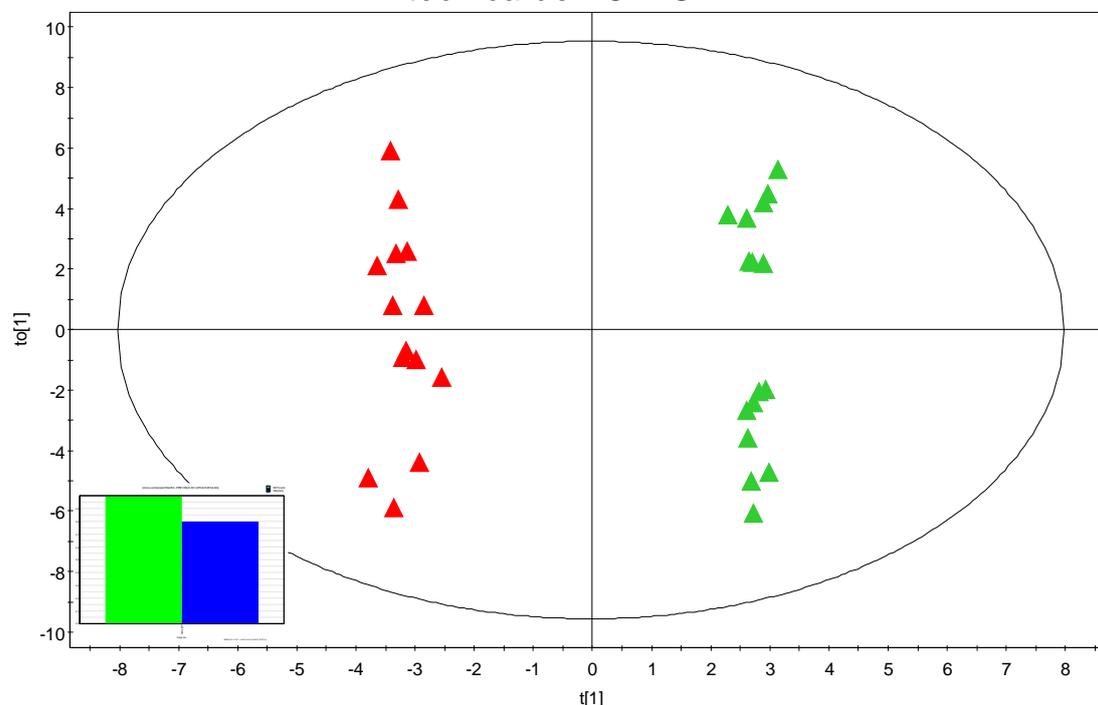
Os espectros obtidos através da análise de amostras do plasma dos pacientes com aterosclerose instável e estável foram reprocessados e alinhados. A partir deste alinhamento foram encontradas 37.666 massas diferentes. Foi realizado um filtro de 90% de presença e constatou-se que em média, cada amostra continha cerca de 5.000 massas presentes e 32.000 massas ausentes, este fato comprova a grande variabilidade existente entre os indivíduos. Após este filtro de presença restaram apenas 1.205 massas, das quais 33 foram dadas como significativas após os testes univariados e 38 após os testes multivariados, ambos a 95% de confiança. Essas massas foram submetidas às bases de dados para identificação e confirmadas por meio de injeção de padrões bem como por análise de MS-MS das amostras, os resultados foram organizados e apresentados na Tabela 7.4.

Tabela 7.4 – Resultados obtidos pela análise dos dados de LC-MS.

Composto	Massa	Tempo de retenção	%Variação
Octenocarnitina	285,1939	2,28	48,7
Liso PC (20:5)	541,3169	15,86	-45,1
Ácido Glicocólico	465,3089	8,39	43,5
Ubiquinona	250,1203	12,25	-40,3
Metil-hidroxi-butanoato	208,1096	12,25	-39,6
Acetilcarnitina	203,1155	0,72	28,5
Derivado de vitamina D	430,3086	18,43	27,1
Liso PE (0:0/20:5)	499,2702	15,71	-25,5
Ácido mirístico	228,2089	26,56	24,8
Betaina	117,0789	0,75	-20,4
Triptofano	204,0892	0,95	15,7
-	139,0608	0,67	-17,8
-	148,0528	0,94	53,4
-	290,1141	12,25	-45,7
-	262,2295	28,51	42,2
-	648,2424	10,27	21,5
-	414,2054	14,21	15,7
-	472,2577	14,21	5,1

Fonte: A AUTORA.

Figura 7.5 – Representação do modelo de OPLS-DA obtido para a técnica de LC-MS.

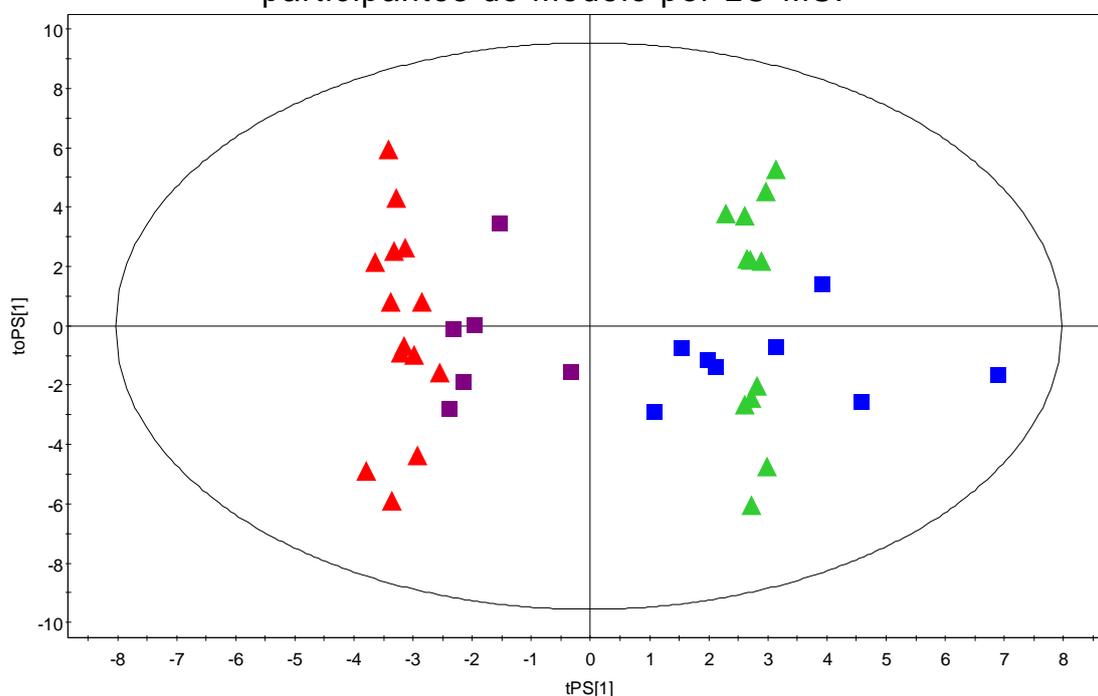


Abaixo a representação dos coeficientes de correlação (R^2 em verde = 0,993) e predição (Q^2 em azul = 0,798) para o modelo. Na figura os pacientes estáveis são representados por: ▲ e os recorrentes por: ▲.

Fonte: A AUTORA.

Acredita-se que o modelo obtido através do uso da técnica de LC-MS tenha sido mais confiável por haver uma menor manipulação das amostras, gerando assim mais metabólitos estatisticamente confiáveis e significativos, figura 7.5. Ainda assim, este segundo grupo de amostras foi analisado apenas por LC-MS única e exclusivamente pelo fator limitante deste tipo de estudos, o volume de amostra disponível. A previsão das amostras deste novo grupo de pacientes pode ser observada na figura 7.6 que contém as amostras estáveis e recorrentes previstas no modelo.

Figura 7. 6 – Representação da previsão das amostras não participantes do modelo por LC-MS.



Na figura os pacientes estáveis que participam do modelo são representados por: ▲ e os recorrentes por: ▲. Já os pacientes estáveis previstos, não participantes do modelo são representados por: ■ e os recorrentes por: ■.

Fonte: A AUTORA.

7.3.3 Interpretação biológica

Os resultados obtidos a partir deste estudo piloto constituem um interessante apoio às aplicações das técnicas de metabolômica para o estudo da aterosclerose estável frente à instável. É importante ressaltar que, antes de desenvolver uma possível interpretação biológica dos dados, os estudos estatísticos mostraram uma classificação das amostras de acordo com o grupo

que pertenciam. Esse fato credencia a hipótese de partida, de que existem diferenças entre o metabolismo de pacientes com aterosclerose que culmina com que sejam classificadas como estáveis e recorrentes.

Ácidos graxos livres

A excessiva carga energética da alimentação combinada com a falta de exercícios físicos, o ganho progressivo de peso, em especial o que se acumula na forma de gordura, a composição da dieta, sobretudo com excessivo consumo de AGT, AGS, carboidratos refinados e o tabagismo têm sido reconhecidos como os principais fatores de risco das ECV (GREGOR e HOTAMISLIGIL, 2007). Alguns dos metabólitos encontrados a partir do estudo estatístico são AGL como o ácido oleico e o ácido mirístico, ambos aumentados nos pacientes com aterosclerose recorrente. Os AGL são AG não esterificados que circulam no fluxo sanguíneo unidos à albumina. Eles têm sua origem na lipólise dos triacilgliceróis, armazenados no tecido adiposo, bem como na ação das fosfolipases sobre os fosfolípídeos. Essa liberação, assim como sua captação por diversos tecidos, é regulada principalmente pela insulina e a atividade adrenérgica (CURI *et al.*, 2002). Na literatura podem ser encontrados trabalhos que relacionam o aumento de AGL em plasma com a resistência à insulina e a problemas cardíacos (STANLEY *et al.*, 2005).

Também existem trabalhos que comprovam que a intervenção da medicina preventiva focada no controle destes fatores de risco é eficiente para reduzir o risco clínico já que gera a diminuição do estresse metabólico. Esse estresse metabólico é acompanhado de uma elevação de AGL no sangue e atualmente é aceito que este fator seja um dos responsáveis pelo desenvolvimento da resistência à insulina. É conhecido que dentro da primeira hora da ocorrência de uma síndrome coronária aguda o corpo produz uma elevação nos níveis plasmáticos de AGL devido ao estado de estresse gerado, e quanto maior a elevação, maior é a incidência de arritmias ventriculares fatais (MARITIM *et al.*, 2003; DE CHAMPLAIN *et al.*, 2004; BLOCH-DAMTI e BASHAN, 2005; EVANS *et al.*, 2005).

É bastante interessante também conhecer o perfil dos AGL presentes no plasma sanguíneo, pois níveis elevados de AGS como o palmítico ou o mirístico induzem à morte das células musculares responsáveis por sintetizar a cápsula

fibrosa da placa aterosclerótica, o que poderia contribuir para sua instabilidade. O ácido mirístico encontra-se aumentado no grupo dos pacientes recorrentes deste estudo e pertence a uma classe de AG cuja ingestão dietética excessiva se relaciona também com incrementos nos níveis de colesterol LDL no sangue, fator de risco cardiovascular de primeira ordem. Estes efeitos seriam potencializados com a presença de altas concentrações de insulina no sangue (ST-DENIS *et al.*, 2012).

Em contrapartida, esses efeitos podem ser em parte, compensados por alguns AGP. Diversos estudos apontam que ao se incorporar à dieta alimentos ricos em AGP ω -3, induz-se processos anti-inflamatórios nas placas ateroscleróticas, o que incrementa a estabilidade das mesmas, contribuindo assim para a diminuição da incidência da patologia coronária aguda (THIES *et al.*, 2003; AMANO *et al.*, 2011). No presente estudo não foi possível detectar variações dos AGL desta série entre os grupos de pacientes estudados, contudo, verificou-se significativa redução dos lisofosfolídeos que incorporam o C20:5. É difícil inferir a causa de estarem diminuídos nos pacientes recorrentes frente aos estáveis, entretanto, sabe-se que estes AG são sintetizados a partir do ALN, o qual deve ser incorporado através da dieta, portanto, é possível que a dieta destes pacientes não tenha sido tão rica em produtos de origem vegetal e pescados, como a dos pacientes em que a recorrência não foi observada.

Alcilocarnitinas

Os pacientes recorrentes aos eventos cardiovasculares apresentaram elevações significativas em algumas alcilocarnitinas como a acetilcarnitina, butilcarnitina e octenoilcarnitina. Esta classe de compostos está diretamente envolvida na β -oxidação e já foi apontado que podem ser acumuladas durante a isquemia miocárdica, contribuindo assim para a disfunção da membrana em zonas isquêmicas (FORD *et al.*, 1996).

Corpos cetônicos

Os corpos cetônicos são compostos químicos produzidos nas mitocôndrias das células do fígado, sua função é administrar energia ao coração e ao cérebro (CURI *et al.*, 2002). Nas amostras analisadas foi observada uma elevação de β -hidroxibutirato plasmático no conjunto de pacientes recorrentes

para novos eventos coronários. Este dado não chega a ser considerado como uma cetoacidose, mas poderia ser reflexo de uma resistência insulínica subjacente. Esta hipótese estaria de acordo com os resultados encontrados por Vallejo e colaboradores (VALLEJO *et al.*, 2009) onde foram identificados níveis plasmáticos de corpos cetônicos como possíveis biomarcadores de diabetes e resistência insulínica, ambas condições relacionadas intimamente com as ECV.

Aminoácidos e α -hidroxibutirato

Este estudo encontrou variação nos níveis de aminoácidos como metionina e triptofano, mas também encontrou níveis distintos entre os grupos de pacientes para outros dois metabólitos associados ao metabolismo de aminoácidos, a betaína e o α -hidroxibutirato. Falhas na conversão da metionina (aumentada nos recorrentes) podem desenvolver a aterosclerose, por uma maior transformação em homocisteína, que é um aminoácido sulfurado importante na transferência de grupos metil no metabolismo celular. Os níveis de homocisteína são regulados pela betaína (diminuída nos recorrentes), o que diminui a concentração da última no sangue. Pode-se supor então que seja possível que esses pacientes tenham um aumento da homocisteína no plasma, que não foi observado neste experimento, mas concordaria com o exposto acerca da metionina.

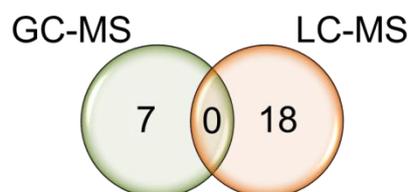
O α -hidroxibutirato tem como função a síntese da glutatona, que pode ser afetada por demandas altas de estresse oxidativo, aumentando excessivamente sua velocidade de produção. Estudos anteriores (GALL *et al.*, 2010) associaram o α -hidroxibutirato com a sensibilidade a insulina e sugeriram então que este composto fosse usado como marcador antecessor tanto da resistência a insulina quanto de alterações na regulação da glicose. Considerando que grande quantidade dos pacientes recorrentes possuem altas taxas de açúcar no sangue verifica-se que os resultados deste estudo estão em sintonia com estudos que o antecederam.

7.4 CONCLUSÕES

O trabalho realizado durante o estágio na *Universidad San Pablo CEU*, por se tratar da busca de biomarcadores para uma enfermidade cardiovascular, revelou-se próximo à proposta inicial do projeto onde a conclusão parcial a que se chegou foi que a instabilidade da enfermidade também está ligada à má alimentação dos pacientes. Alimentação esta, aparentemente relacionada ao consumo de alimentos com altos teores de gordura e açúcar em detrimento do consumo de alimentos mais saudáveis como peixes e derivados de leite. Tais informações podem ser comprovadas ao se observar a tabela 7.1, onde a média da glicose e principalmente do IMC dos pacientes com aterosclerose instável são maiores que a dos pacientes com aterosclerose estável.

A utilização de mais de uma plataforma analítica é muito importante para se conhecer ao máximo as amostras analisadas. A figura 7.7 mostra a relação dos compostos encontrados nas duas técnicas empregadas nesse estudo. Pode-se perceber que as informações são complementares, visto que não há nenhum metabólito comum às duas técnicas. A técnica de GC-MS proporcionou metabólitos relacionados principalmente com o metabolismo dos ácidos graxos livres e dos aminoácidos. Já a técnica de LC-MS proporcionou metabólitos relacionados principalmente com o metabolismo das carnitinas e dos aminoácidos. Tais compostos, por estarem em diferentes proporções nos grupos de amostras analisadas, sugerem que a instabilidade da placa aterosclerótica pode estar relacionada com alterações em alguma rota metabólica no organismo dos pacientes recorrentes.

Figura 7. 7 – Relação entre os candidatos a biomarcadores encontrados nas diferentes plataformas analíticas.



Fonte: A AUTORA.

Este foi um estudo piloto, com amostras selecionadas pelos médicos que acompanharam cerca de 600 pacientes ao longo de 6 anos. O próximo passo da

pesquisa é reunir um novo grupo de amostras e determinar, desta vez com uma análise *target*, as reais concentrações dos candidatos a biomarcadores selecionados em um número maior de pacientes. Se tais resultados corroborarem com os encontrados nesse estudo, a elucidação dos mecanismos de atuação da recorrência da aterosclerose estará mais próxima de ser entendida.

8 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Os capítulos 5 e 6 apresentam metodologias de análise *target* para dois diferentes tipos de AG, ambos com importância biológica, utilizando para tal as técnicas analíticas de CE-UV e GC-FID. Os métodos apresentam significativo aumento da frequência analítica, importantes para análises *screening* de rotina. Acredita-se que ambos os métodos analíticos propostos possam vir a ser aceitos e utilizados em laboratórios dedicados à qualidade dos alimentos, ou ainda, que possam auxiliar a agências governamentais no controle da qualidade e da segurança alimentar no Brasil.

No capítulo 7 foi realizado um estudo com amostras de plasma de pacientes diagnosticados com aterosclerose estável e instável. Foi possível realizar o prognóstico de alguns pacientes a partir do modelo gerado, sendo tal prognóstico concordante com o desenvolvimento da enfermidade em cada caso. É importante ressaltar que tais amostras não foram utilizadas na construção do modelo bioestatístico, sendo este um indício de que a medicina personalizada caminha para tornar-se realidade. Percebeu-se ainda através deste estudo que a dieta atua fortemente na saúde de um indivíduo, e que o ideal para uma vida saudável é o equilíbrio.

REFERÊNCIAS

A.O.C.S. **Determination of cis and trans Fatty Acids in Hydrogenated and Refined Oils and Fats by Capillary GLC.** Official Method Ce1f-96: AOCS Press Reapproved 1997 Revised 2001.

ALBERICE, J. V. *et al.* Searching for urine biomarkers of bladder cancer recurrence using a liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis–mass spectrometry metabolomics approach. **Journal of Chromatography A**, v. 1318, p. 163-170, 2013. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967313015847> >.

AMANO, T. *et al.* Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on coronary plaque instability: An integrated backscatter intravascular ultrasound study. **Atherosclerosis**, v. 218, n. 1, p. 110-116, 2011. ISSN 0021-9150. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915011004655> >.

ANDERSON, J. L. *et al.* Characterizing Ionic Liquids On the Basis of Multiple Solvation Interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 47, p. 14247-14254, 2002. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ja028156h> >.

AQUINO NETO, F. R. D.; NUNES, D. D. S. E. S. **Cromatografia: Princípios básicos e Técnicas afins**. 1. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187 ISBN 85-7193-086-4.

ARO, A. *et al.* Analysis of C18:1 cis and trans fatty acid isomers by the combination of gas-liquid chromatography of 4,4-dimethyloxazoline derivatives and methyl esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 8, p. 977-985, 1998. ISSN 0003-021X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-998-0275-5> >.

BAKER, D. R. **Capillary electrophoresis**. Wiley, 1995. ISBN 9780471117636. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=QRJrAAAAMAAJ> >.

BALDERAS, C. *et al.* Metabolomic approach to the nutraceutical effect of rosemary extract plus omega-3 PUFAs in diabetic children with capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 5, p. 1298-1304, Dec 15 2010. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <Go to ISI>://000281576500024 >.

BALESTEROS, M. R. *et al.* Determination of olive oil acidity by CE. **Electrophoresis**, v. 28, n. 20, p. 3731-3736, Oct 2007. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200700507> >.

BARRA, P. M. C. *et al.* A rapid method for monitoring total trans fatty acids (TTFA) during industrial manufacturing of Brazilian spreadable processed cheese by capillary zone electrophoresis. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 456-461, Feb 2012. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511003227> >.

BARRA, P. M. C. *et al.* An alternative method for rapid quantitative analysis of majority cis-trans fatty acids by CZE. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 33-41, Jun 2013. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.044> >.

BARRA, P. M. C. *et al.* Simultaneous analysis of saturated and unsaturated fatty acids present in pequi fruits by capillary electrophoresis. **Quimica Nova**, v. 36, p. 1430-1433, 2013. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000900025&nrm=iso >.

BAUMGARD, L. H.; SANGSTER, J. K.; BAUMAN, D. E. Milk Fat Synthesis in Dairy Cows Is Progressively Reduced by Increasing Supplemental Amounts of trans-10, cis-12 Conjugated Linoleic Acid (CLA). **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 6, p. 1764-1769, 2001. Disponível em: < <http://jn.nutrition.org/content/131/6/1764.abstract> >.

BENATTI, P. *et al.* Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 281-302, 2004. ISSN 0731-5724. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/07315724.2004.10719371> >. Acesso em: 2013/12/17.

BLOCH-DAMTI, A.; BASHAN, N. Proposed Mechanisms for the Induction of Insulin Resistance by Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox signaling**, v. 7, n. 11 & 12, p. 1553-1567, 2005. Disponível em: < <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2005.7.1553> >.

BRASIL. **Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003**. ANVISA: D.O.U. - Diário Oficial da União 2003.

_____. **Informe Técnico n. 23, de 17 de abril de 2007**. ANVISA. Brasília: Ministério da Saúde 2007.

BUCHANAN, M. D.; STENERSON, K. K.; SIDISKY, L. M. SLB-IL111 for Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Applications. Bellefonte, PA, 2011. Disponível em: < http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/1/t411139.pdf >. Acesso em: 03/05/2015.

CASTRO, P. M. *et al.* Total Trans Fatty Acid Analysis in Spreadable Cheese by Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 1403-1409, 2010. ISSN 0021-8561. Disponible em: < <http://dx.doi.org/10.1021/Jf904212m> >.

CASTRO, R. D. C. *et al.* Analysis of the main conjugated linoleic acid (CLA) precursors (C18:2 n-6 and C18:3 n-3) in *Brachiaria ruziziensis* by capillary zone electrophoresis. **Central European Journal of Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1286-1296, Aug 2013. ISSN 1895-1066. Disponible em: < <http://link.springer.com/article/10.2478%2Fs11532-013-0262-z> >.

CATENA, E. *et al.* Ateromatosis y aterotrombosis carotídea. Implicación del factor tisular. **Angiología**, v. 55, n. 1, p. 64-76, 2003. ISSN 0003-3170. Disponible em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003317003747907> >.

CHILLIARD, Y. *et al.* Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 8, p. 828-855, 2007. ISSN 1438-9312. Disponible em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200700080> >.

CHOUINARD, P. Y. *et al.* Conjugated Linoleic Acids Alter Milk Fatty Acid Composition and Inhibit Milk Fat Secretion in Dairy Cows. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 8, p. 1579-1584, 1999. Disponible em: < <http://jn.nutrition.org/content/129/8/1579.abstract> >.

CHRISTIE, W. W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: CHRISTIE, W. W. (Ed.). **Advances in Lipid Methodology - Two**. 1. Dundee: Oily Press, 1993. p.69-111.

CHRISTIE, W. W.; HAN, X. Chapter 7 - Preparation of derivatives of fatty acids. In: CHRISTIE, W. W. e HAN, X. (Ed.). **Lipid Analysis (Fourth edition)**: Woodhead Publishing, 2012. p.145-158. ISBN 978-0-9552512-4-5.

CIBOROWSKI, M. *et al.* Metabolomics with LC-QTOF-MS Permits the Prediction of Disease Stage in Aortic Abdominal Aneurysm Based on Plasma Metabolic Fingerprint. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31982, 2012. Disponible em: < <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0031982> >.

CLÉMENT, L. *et al.* Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 9, p. 1400-1409, Sep 2002. Disponible em: < <http://www.jlr.org/content/43/9/1400.abstract> >.

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, p. 287-292, 2006. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000200020&nrm=iso >.

CRUZ-HERNANDEZ, C. *et al.* Evaluating the Conjugated Linoleic Acid and Trans 18:1 Isomers in Milk Fat of Dairy Cows Fed Increasing Amounts of Sunflower Oil and a Constant Level of Fish Oil. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 8, p. 3786-3801, 2007. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030207718350> >.

CURI, R. *et al.* **Entendendo a gordura: Os ácidos graxos**. 1. Barueri: 2002. 580 ISBN 85-204-1355-2.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998). **Pure Appl. Chem.**, v. 70, n. 4, p. 993-1014, 1998. Disponível em: < <http://old.iupac.org/reports/1998/7004danzer/index.html> >.

DAVIES, M. J. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic-heart-disease. **Circulation**, v. 82, n. 3, p. 38-46, Sep 1990. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2203563> >.

DE CHAMPLAIN, J. *et al.* Oxidative stress in hypertension. **Clinical And Experimental Hypertension (New York, N.Y.: 1993)**, United States, v. 26, n. 7-8, p. 593-601, 2004. ISSN 1064-1963. Disponível em: < <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=15702613&lang=pt-br&site=ehost-live> >.

DE GRANDE, S. M. B.; AQUINO NETO, F. R. D. A espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas EM-EM. **Química Nova**, v. 13, n. 3, p. 191-199, 1990. Disponível em: < http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol13No3_191_v13_n3_%286%29.pdf >.

DELMONTE, P. *et al.* Evaluation of highly polar ionic liquid gas chromatographic column for the determination of the fatty acids in milk fat. **Journal of Chromatography A**, v. 1233, n. 0, p. 137-146, 2012. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967312002555> >.

DELMONTE, P. *et al.* Separation characteristics of fatty acid methyl esters using SLB-IL111, a new ionic liquid coated capillary gas chromatographic column. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 3, p. 545-554, 2011. ISSN 0021-

9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967310016602> >.

DELMONTE, P. *et al.* Preparation, chromatographic separation and relative retention times of cis/trans heptadecaenoic (17:1) fatty acids. **Journal of Chromatography A**, v. 1214, n. 1–2, p. 30-36, 2008. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967308018876> >.

ERIM, F. B.; XU, X.; KRAAK, J. C. Application of micellar electrokinetic chromatography and indirect UV detection for the analysis of fatty acids. **Journal of Chromatography A**, v. 694, n. 2, p. 471-479, 1995. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196739401114T> >.

ESTATCAMP. **Portal Action**. São Carlos: <http://www.portalaction.com.br/> 1997-2014.

EVANS, J. L.; MADDUX, B. A.; GOLDFINE, I. D. The Molecular Basis for Oxidative Stress-Induced Insulin Resistance. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, v. 7, n. 7 & 8, 2005. Disponível em: < <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2005.7.1040> >.

F.D.A. U.S. Food and Drug Administration, FDA Cuts Trans Fat in Processed Foods. 2015. Disponível em: < <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm372915.htm> >. Acesso em: 10/07/2015.

FALK, E. Morphologic features of unstable atherothrombotic plaques underlying acute coronary syndromes. **The American Journal of Cardiology**, v. 63, n. 10, p. E114-E120, 1989. ISSN 0002-9149. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0002914989902427> >.

FERRUCCI, L. *et al.* Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 2, p. 439-446, 2006. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16234304> >.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2, p. 155–168, 2001. Disponível em: < <http://www.hindawi.com/journals/ijg/2001/914970/abs/> >.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL

TISSUES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, May 1957. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/226/1/497.short> >.

FORD, D. A. *et al.* Accumulation of Unsaturated Acylcarnitine Molecular Species During Acute Myocardial Ischemia: Metabolic Compartmentalization of Products of Fatty Acyl Chain Elongation in the Acylcarnitine Pool. **Biochemistry**, v. 35, n. 24, p. 7903-7909, Jan 1996. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/bi960552n> >. Acesso em: 2013/12/12.

FUNARI, C. S. *et al.* Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422013001000019&script=sci_arttext >. Acesso em: 25/04/2015.

GALL, W. E. *et al.* α -Hydroxybutyrate Is an Early Biomarker of Insulin Resistance and Glucose Intolerance in a Nondiabetic Population. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10883, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010883> >.

GARCÍA, A.; BARBAS, C. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Based Metabolomics. In: (Ed.). **Metabolic Profiling**: Humana Press, v.708, 2011. p.191 - 204.

GIBNEY, M. J. *et al.* Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid: insights from molecular markers sterol regulatory element-binding protein-1c and LXR [alpha]. **Diabetes**, v. 51, n. 7, Jul 2002. ISSN 00121797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086931> >. Acesso em: 2015/4/28.

GONZÁLEZ-PEÑA, D. *et al.* Multiplatform metabolomic fingerprinting as a tool for understanding hypercholesterolemia in Wistar rats. **European Journal of Nutrition**, p. 1-14, 2015/05/13 2015. ISSN 1436-6207. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-015-0914-1> >.

GOODACRE, R. *et al.* Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 245-252, 2004. Disponível em: < [http://dbkgroup.org/Papers/trends%20in%20biotechnology_22_\(245\).pdf](http://dbkgroup.org/Papers/trends%20in%20biotechnology_22_(245).pdf) >.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 9, p. 1905-1914, Sep 2007. Disponível em: < <http://www.jlr.org/content/48/9/1905.abstract> >.

GU, Q. *et al.* Evaluation of automated sample preparation, retention time locked gas chromatography–mass spectrometry and data analysis methods for the metabolomic study of Arabidopsis species. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 21, p. 3247-3254, 2011. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967311000719> >.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 90, n. 1, p. 420-426, 1978. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269778900465> >.

HARWOOD, C. M. S. A. J. L. Fatty Acid and Lipid Structure. In: GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L., *et al* (Ed.). **The lipid handbook**. 3. London: Taylor & Francis Group, 2007. p.1-36. ISBN 13: 978-0-8493-9688-5.

HORGAN, R. P.; KENNY, L. C. 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. **The Obstetrician & Gynaecologist**, v. 13, n. 3, p. 189-195, 2011. ISSN 1744-4667. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1576/toag.13.3.189.27672> >.

JIANG, J. *et al.* Occurrence of Conjugated Cis-9, Trans-11-Octadecadienoic Acid in Bovine Milk: Effects of Feed and Dietary Regimen. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 3, p. 438-445, 1996. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203029676383X> >.

JUDD, J. *et al.* Dietary cis and trans monounsaturated and saturated FA and plasma lipids and lipoproteins in men. **Lipids**, v. 37, n. 2, p. 123-131, Jan 2002. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-002-0871-9> >.

KELLY, G. S. Conjugated Linoleic Acid: A Review. **Alternative Medicine Review**, v. 6, n. 4, p. 367, Aug 2001. ISSN 10895159. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/med/11578253> >. Acesso em: 2015/4/28/.

KIND, T. *et al.* FiehnLib: Mass Spectral and Retention Index Libraries for Metabolomics Based on Quadrupole and Time-of-Flight Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 24, p. 10038-10048, Dec 2009. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac9019522> >. Acesso em: 2013/12/09.

KINLAY, S.; EGIDO, J. Inflammatory Biomarkers in Stable Atherosclerosis. **The American Journal of Cardiology**, v. 98, n. 11, Supplement 1, p. S2-S8, 2006. ISSN 0002-9149. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002914906017358> >.

KORYTÁR, P. *et al.* Practical fast gas chromatography: methods, instrumentation and applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 9–10, p. 558-572, 2002. ISSN 0165-9936. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993602008117> >.

LI, M. *et al.* Recent advances of chromatography and mass spectrometry in lipidomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 1, p. 243-249, Jan 2011. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <Go to ISI>://000285781200025 >.

LICHTENSTEIN, A. H. *et al.* Hydrogenation impairs the hypolipidemic effect of corn oil in humans. Hydrogenation, trans fatty acids, and plasma lipids. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 13, n. 2, p. 154-61, Feb 1993. Disponível em: < <http://atvb.ahajournals.org/content/13/2/154.abstract> >.

LIU, X. *et al.* Method for Screening of Bacterial Strains Biosynthesizing Specific Conjugated Linoleic Acid Isomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 38, p. 9705-9710, Sep 2012. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf3032843> >. Acesso em: 2013/12/16.

MALATESTA, S. *et al.* The Slow Food Companion. Carrù, 2007. Disponível em: < http://www.slowfood.com/about_us/img_sito/pdf/Companion_ENG.pdf >. Acesso em: 25/04/2015.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003. ISSN 1099-0461. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.10058> >.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Practical approaches to fast gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 153-180, 2003. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967303004485> >.

MATISOVÁ, E.; DÖMÖTÖROVÁ, M. Fast gas chromatography and its use in trace analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 199-221, 2003. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967303003108> >.

MCLEOD, R. S. *et al.* Conjugated linoleic acids, atherosclerosis, and hepatic very-low-density lipoprotein metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 6, p. 1169S-1174S, Jun 2004. Disponível em: < <http://ajcn.nutrition.org/content/79/6/1169S.abstract> >.

MOSSOBA, M. M.; MOSS, J.; KRAMER, J. K. G. Trans Fat Labeling and Levels in U.S. Foods: Assessment of Gas Chromatographic and Infrared Spectroscopic Techniques for Regulatory Compliance. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 5, p. 1284-1300, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19916366> >.

OLIVEIRA, M. A. L. *et al.* 20 Years of Fatty Acid Analysis by Capillary Electrophoresis. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14094-14113, 2014. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/9/14094> >.

OLIVEIRA, M. A. L. *et al.* Method development for the analysis of trans-fatty acids in hydrogenated oils by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, n. 10, p. 1641-1647, May 2003. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200305394> >.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 4, p. 283-298, 2001. ISSN 0163-7827. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016378270100008X> >.

PARODI, P. W. Composition and structure of some consumer-available edible fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 53, n. 8, p. 530-534, Aug 1976. ISSN 0003-021X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02586253> >.

PASTERKAMP, G. *et al.* Relation of arterial geometry to luminal narrowing and histologic markers for plaque vulnerability: the remodeling paradox. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 32, n. 3, p. 655-662, 1998. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109798003040> >.

PAYAGALA, T. *et al.* Trigonal Tricationic Ionic Liquids: A Generation of Gas Chromatographic Stationary Phases. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 160-173, Jan 2009. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac8016949> >.

POIRIER, H. *et al.* Development of conjugated linoleic acid (CLA)-mediated lipoatrophic syndrome in the mouse. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 73-79, 2005. ISSN 0300-9084. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908404002329> >.

PORTO, B. L. S.; DE SOUZA, M. V. N.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Analysis of Omega 3 Fatty Acid in Natural and Enriched Chicken Eggs by Capillary Zone

Electrophoresis. **Analytical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 541-546, May 2011. ISSN 0910-6340. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2116/analsci.27.541> >.

PUIGGRÒS, F. *et al.* Nutritional biomarkers and foodomic methodologies for qualitative and quantitative analysis of bioactive ingredients in dietary intervention studies. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7399-7414, 2011. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967311012386> >.

RAGONESE, C. *et al.* Evaluation of Use of a Dicationic Liquid Stationary Phase in the Fast and Conventional Gas Chromatographic Analysis of Health-Hazardous C18 Cis/Trans Fatty Acids. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 13, p. 5561-5568, Jul 2009. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac9007094> >.

RAGONESE, C. *et al.* Conventional and fast gas chromatography analysis of biodiesel blends using an ionic liquid stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 51, p. 8992-8997, 2009. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967309015969> >.

ROLDANASSAD, R.; GAREIL, P. Capillary Zone Electrophoretic Determination of C-2-C-18 Linear Saturated Free Fatty-Acids with Indirect Absorbency Detection. **Journal of Chromatography A**, v. 708, n. 2, p. 339-350, Aug 1995. ISSN 0021-9673. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00390-9](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(95)00390-9) >.

SATO, R. T. *et al.* Rapid Separation of Free Fatty Acids in Vegetable Oils by Capillary Zone Electrophoresis. **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 3, p. 241-246, 2014. ISSN 1099-1565. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/pca.2499> >.

SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. **Analytica Chimica Acta**, v. 465, n. 1-2, p. 39-62, 2002. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267002003975> >.

SIGMA, A. Supelco Ionic Liquid GC Column Literature & Applications. 2011. Disponível em: < <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/gas-chromatography/columns/ionic-liquid-literature.html> >. Acesso em: 01/05/2015.

SILVA, F. O.; FERRAZ, V. Double use of microwaves in fatty acid preparation for elaidic acid determination as phenacyl ester using high-performance liquid

chromatography in Brazilian fat products. **Talanta**, v. 68, n. 3, p. 643-645, 2006. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914005002821> >.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. Porto Alegre: Bookman, 2006. 839 ISBN 0-03-002078-6.

SMITH, C. A. *et al.* METLIN: A Metabolite Mass Spectral Database. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, n. 6, p. 747-751, 2005. ISSN 0163-4356. Disponível em: < http://journals.lww.com/drug-monitoring/Fulltext/2005/12000/METLIN__A_Metabolite_Mass_Spectral_Database.16.aspx >.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLT, C. B. Lipídeos. In: SOLOMONS, T. W. G. e FRYHLT, C. B. (Ed.). **Química Orgânica**. 8ª. Rio de Janeiro: LTC, v.2, 2006. p.366-396.

ST-DENIS, C.; CLOUTIER, I.; TANGUAY, J.-F. Key Fatty Acid Combinations Define Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Viability. **Lipids**, v. 47, n. 11, p. 1073-1084, Nov 2012. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-012-3718-6> >.

STANLEY, W. C.; RECCHIA, F. A.; LOPASCHUK, G. D. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 3, p. 1093-1129, Jul 2005. Disponível em: < <http://physrev.physiology.org/content/85/3/1093.abstract> >.

SUHRE, K.; SCHMITT-KOPPLIN, P. MassTRIX: mass translator into pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. suppl 2, p. W481-W484, Jul 2008. Disponível em: < http://nar.oxfordjournals.org/content/36/suppl_2/W481.abstract >.

TAKAHASHI, Y. *et al.* Dietary conjugated linoleic acid reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 133, n. 3, p. 395-404, 2002. ISSN 1096-4959. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096495902001641> >.

TAVARES, M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, p. 173-181, 1996. Disponível em: < http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol19No2_173_v19_n2_12.pdf >.

TAVARES, M. *et al.* Applications of Capillary Electrophoresis to the Analysis of Compounds of Clinical, Forensic, Cosmetological, Environmental, Nutritional and Pharmaceutical Importance, nutritional and pharmaceutical importance. **J.**

Braz. Chem. Soc. , v. 14, n. 2, p. 281-290, 2003. Disponível em: < <http://jbcs.sbq.org.br/imagebank/pdf/v14n2a16.pdf> >.

THIES, F. *et al.* Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 361, n. 9356, p. 477-485, 2003. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673603124683> >.

TSUBOYAMA-KASAOKA, N. *et al.* Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. **Diabetes**, v. 49, n. 9, p. 1534-1542, Sep 2000. Disponível em: < <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/49/9/1534.abstract> >.

URBANCZYK-WOCHNIAK, E. *et al.* Parallel analysis of transcript and metabolic profiles: a new approach in systems biology. **EMBO Rep**, v. 4, n. 10, p. 989-993, 2003. ISSN 1469-221X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.embor944> >.

VALENZUELA, A. B.; NIETO, S. K. Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. **Revista chilena de pediatría**, v. 74, p. 149-157, 2003. ISSN 0370-4106. Disponível em: < http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-41062003000200002&nrm=iso >.

VALLEJO, M. *et al.* Plasma fingerprinting with GC-MS in acute coronary syndrome. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 6, p. 1517-1524, Jul 2009. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-2610-6> >.

WEST, D. B. *et al.* Conjugated Linoleic Acid Persistently Increases Total Energy Expenditure in AKR/J Mice without Increasing Uncoupling Protein Gene Expression. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 10, p. 2471-2477, Oct 2000. Disponível em: < <http://jn.nutrition.org/content/130/10/2471.abstract> >.

WEST, D. B. *et al.* **Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse.** 1998. R667-R672.

WISHART, D. S. *et al.* HMDB: the Human Metabolome Database. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. suppl 1, p. D521-D526, Jan 2007. Disponível em: < http://nar.oxfordjournals.org/content/35/suppl_1/D521.abstract >.

WONG, Y. F.; SAAD, B.; MAKAHLEH, A. Capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection for the determination of cis/trans isomers of octadec-9-enoic acid and other long chain fatty acids.

Journal of Chromatography A, v. 1290, p. 82-90, May 17 2013. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.014> >.

YAMASAKI, M. *et al.* Modulation of body fat and serum leptin levels by dietary conjugated linoleic acid in Sprague-Dawley rats fed various fat-level diets. **Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 30-35, 2003. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900702008420> >.

ZHOU, B. *et al.* **LC-MS - based metabolomics**. *Molecular BioSystems*, 2012. 481.

APÊNDICE 1 TRABALHOS PUBLICADOS

Figura A1.1 – Revisão da literatura sobre análise de AG por CE.

Molecules 2014, 19, 14094-14113; doi:10.3390/molecules190914094

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Review

20 Years of Fatty Acid Analysis by Capillary Electrophoresis

Marcone Augusto Leal de Oliveira *, Brenda Lee Simas Porto, Isaura Daniele Leite Faria, Patricia Lopes de Oliveira, Patricia Mendonça de Castro Barra, Renata de Jesus Coelho Castro and Renata Takabayashi Sato

Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ), Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: marcone.oliveira@ufjf.edu.br; Tel.: +55-32-2102-3310; Fax: +55-32-2102-3314.

Received: 5 February 2014; in revised form: 7 August 2014 / Accepted: 25 August 2014 /

Published: 9 September 2014

Abstract: A review taking into account the literature reports covering 20 years of fatty acid analysis by capillary electrophoresis is presented. This paper describes the evolution of fatty acid analysis using different CE modes such as capillary zone electrophoresis, non-aqueous capillary electrophoresis, micellar electrokinetic capillary chromatography and microemulsion electrokinetic chromatography employing different detection systems, such as ultraviolet-visible, capacitively coupled contactless conductivity, laser-induced fluorescence and mass spectrometry. In summary, the present review signals that CE seems to be an interesting analytical separation technique that is very useful for screening analysis or quantification of the usual fatty acids present in different matrices, offering short analysis times and a simple sample preparation step as inherent advantages in comparison with the classical methodology, making it a separation technique that is very attractive for quality control in industry and government agencies.

Keywords: fatty acids; capillary electrophoresis; review

1. Introduction

Fatty acids (FAs) comprise carboxylic acids that are aliphatic and typically linear, and monocarboxylic acids with long hydrocarbon chains which are represented by the general form

Fonte: MOLECULES, doi: 10.3390/molecules190914094.

Figura A1.2 – Análise de óleos vegetais, NIR, MIR e Raman.

Food Anal. Methods
DOI 10.1007/s12161-015-0121-y

Quantification of Extra-virgin Olive Oil Adulteration with Soybean Oil: a Comparative Study of NIR, MIR, and Raman Spectroscopy Associated with Chemometric Approaches

Thiago O. Mendes · Roney A. da Rocha ·
Brenda L. S. Porto · Marcone A. L. de Oliveira ·
Virgílio de C. dos Anjos · Maria J. V. Bell

Received: 10 September 2014 / Accepted: 1 February 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract In this work, blends of olive and soybean oils were analyzed by near-infrared spectroscopy (NIR), mid-infrared (MIR), and Raman techniques to evaluate adulterations in olive oils. A representative group of different commercial brands of soybean oil and extra-virgin olive oil were analyzed by gas chromatography with flame ionization detector in order to explore the chemical similarity and composition of the fatty acid (FA) profile. Two stock solutions were prepared, one produced from a mixture of soybean oils and the other from the mixture of olive oils. From these stock solutions, 60 samples were prepared, simulating adulteration levels of extra-virgin olive oil with soybean oil between 0 and 100 %. It was possible to fit a model able to predict fraud within the interval investigated by partial least squares regression approach, with precision and accuracy values for root mean squared error of prediction of 1.76 (NIR), 4.89 (MIR), and 1.57 (Raman) and coefficient of determination R^2 greater than 0.98 for the three techniques. The methodologies demonstrated to be very useful for the quantification of extra-virgin olive oil adulteration with soybean oil, presenting short analysis time, low cost, and absence of sample preparation procedures as main advantages.

Keywords NIR · MIR · Raman · PLS · Adulteration · Olive oil

Introduction

Olive oil is a nutritious food—tasty, healthy, and well-liked throughout the world. It is produced from the pressing of the olive (*Olea europaea*), and their production and use are more significant in the Mediterranean diet where it is considered as the main source of fat (Lopez et al. 2014). Regular consumption of olive oil is associated with reduction of risk factors and occurrence of degenerative and chronic diseases like diabetes, obesity, high blood pressure, heart disease, metabolic syndrome, and atherosclerosis (Lopez et al. 2014; Priore et al. 2014). Olive oil composition, rich in phenolic compounds, has also high antioxidant activity, has anti-inflammatory activity, causes potential reduction of serum low density lipoproteins (LDL), and prevents certain types of cancer (Lamy et al. 2014) as well as slows cellular aging (Becerra-Herrera et al. 2014; Priore et al. 2014).

Besides fresh consumption, olive oil is used in cooking as an ingredient in industrial formulations, seasonings, sauces, fillings, toppings, pasta, and various bakery products. Its use has become widespread in developing edible films (Pereda et al. 2014) and biodegradable packaging, used as a physical barrier and antimicrobial protection for fruits, vegetables, and minimally processed products (Ma et al. 2012; Marcos et al. 2014; Valenzuela et al. 2013). The pharmaceutical industry has constantly evaluated its use for the production of moisturizing cream for skin (Franco et al. 2014; Lorenzini et al. 2014) protection against UV radiation (D'Angelo et al. 2005) and striae gravidarum treatment (Soltanipoor et al. 2012) and of

T. O. Mendes · R. A. da Rocha · V. d. C. dos Anjos ·
M. J. V. Bell (✉)

LEM (Laboratório de Espectroscopia de Materiais), Departamento de Física, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, 36036-330 Juiz de Fora, MG, Brazil
e-mail: mjbell@fisica.ufjf.br

T. O. Mendes · B. L. S. Porto · M. A. L. de Oliveira
GQAQ (Grupo de Química Analítica e Quimiometria),
Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora,
Campus Universitário, 36036-330 Juiz de Fora, MG, Brazil

Published online: 20 February 2015

 Springer

Figura A1.3 – Análise de gordura *trans* por CE e GC.

Food Control 55 (2015) 230–235



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont



Fast screening method for the analysis of trans fatty acids in processed food by CZE-UV with direct detection

Brenda Lee Simas Porto, Isaura Daniele Leite Faria, Thiago de Oliveira Mendes, Marcone Augusto Leal de Oliveira*

GQAQ (Grupo de Química Analítica e Quimiometria) Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Cidade Universitária, CEP 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:
 Received 15 November 2014
 Received in revised form 18 February 2015
 Accepted 19 February 2015
 Available online 27 February 2015

Keywords:
 Capillary zone electrophoresis
 Fast screening method
 Trans fatty acids
 Elaidic acid
 Processed food

ABSTRACT

In the present work, an alternative method for trans fatty acids (TFA) analysis with direct UV detection using capillary zone electrophoresis (CZE-UV) is proposed. The background electrolyte used consisted of 12.0 mmol L⁻¹ of tetraborate buffer, 12.0 mmol L⁻¹ of Brij 35, 33% methanol and 17% acetonitrile. Trans fatty acids in different samples such as butter toffee, cake mix, stuffed wafers, chocolate and a mix for Brazilian cheese bread were successfully quantified within an analysis time of 13 min, taking into account the statistical approach based on response factor calculation using C19:1 (nonadecaenoic acid) as internal standard. The statistical comparison between CZE-UV and the classical GC method for the analyzed samples did not present significant differences within the 95% confidence interval.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Unsaturated fatty acids with a trans conformation for human consumption, increasingly found in processed foods, are associated with increased levels of low-density lipoprotein cholesterol and decreased high-density lipoprotein cholesterol when compared with diets high in oleic or linoleic acids, both cis fatty acids (Judd et al., 2002; Lichtenstein et al., 1993; Mensink & Katan, 1990). Today, it is a requirement of government agencies to determine the level of trans fatty acids (TFA) in foods, to guide consumers on the lipid composition, especially those who suffer from heart problems, obesity or hypertension. The elaidic acid (EA) is a common TFA in processed foods, its effect on the human metabolism is related to its ability to inhibit the action of desaturase enzymes, thereby impairing the conversion of linoleic acid into arachidonic acid (Kummerow, 2009). It has been reported that trans fatty acids derived from industrial hydrogenation of vegetable oils is expressed in EA, since it comprises 80–100% of the TFA present in processed products that use hydrogenated vegetable fat (Mossoba, Moss, & Kramer, 2009; Silva & Ferraz, 2006; Tavella et al., 2000).

In general, the official method for fatty acid analysis is gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID), due to its high resolution and sensitivity (Seppänen-Laakso, Laakso, & Hiltunen, 2002). However, fatty acid analysis by GC-FID presents some drawbacks due to low volatility and thermal stability, so derivatization steps are required to convert carboxyl groups into a more volatile form, such as trimethylsilyl esters or methyl esters (AOCS, Reapproved 1997 Revised 2001). On the other hand, in the particular case of TFA analysis by GC-FID, the use of a specific column with a length of about 100 m is required, which results in longer analysis time. Thus, the development of a method for the fast screening of TFA has become attractive.

Over the past 20 years, capillary electrophoresis (CE) has developed as a separation technique based on differentiated migration of neutral compounds, solvated ions or ionizable species in a capillary column filled with a convenient background electrolyte (BGE), when subjected to an electric field. This technique has been pursued in the scientific community as an attractive alternative separation technique for fatty acid analysis (Oliveira et al., 2014). The major advantages of this technique compared to GC are the short analysis time, absence of the derivatization step and separation of the analytes at lower temperatures; these factors significantly increase the analytical throughput.

The first report on the analysis of TFA using CZE was with indirect detection. The analysis was achieved in 10 min and the

* Corresponding author.
 E-mail address: marcone.oliveira@ufjf.edu.br (M.A.L. de Oliveira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.027>
 0956-7135/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Fonte: FOOD CONTROL, doi: 10.1016/j.foodcont.2015.02.027.

APÊNDICE 2 Capítulo de livro

Figura A2. 1 – Planejamento de experimentos no preparo de amostras.

1ª prova Revisão	Autor: BORGES	Edição:	Revisor:	01/08/2014
	Capítulo: 04	Páginas: 10	Operador:	

4

Planejamento de experimentos aplicado ao preparo de amostras

Marcone Augusto Leal de Oliveira, Brenda Lee Simas Porto, Fernando Antonio Simas Vaz, Renata Takabayshi Sato

4.1 Otimização univariada *versus* otimização multivariada

Em todas as áreas da Química, é costumeiro realizar a otimização de processos em geral, principalmente quando esses são inéditos ou precisam ser adaptados à realidade de um laboratório, por exemplo. Raramente, um processo dispensa essa etapa como parte de seu desenvolvimento. Pelo contrário, uma etapa de otimização pode ser considerada uma das mais cruciais de uma metodologia, pois pode garantir resultados melhores e mais confiáveis.

Otimização significa o procedimento pelo qual se busca um resultado ótimo (não necessariamente o maior valor possível), seja ele um rendimento de reação, a magnitude de um sinal analítico, o tempo gasto e o custo de uma análise, dentre outros, diante das possibilidades oferecidas pelo sistema a ser otimizado. Isso é frequentemente feito (o que nem sempre é o correto) de duas formas: **tentativa e erro**: um método mais arcaico, em que diferentes condições experimentais são testadas, sem necessariamente uma lógica ou critério, até que um experimento tenha êxito; ou **univariada**, quando cada parâmetro (fator ou variável) do sistema é investigado

separadamente enquanto os outros fatores, já avaliados ou não, são mantidos constantes. Entretanto, ambos os caminhos acima citados podem levar à obtenção de um resultado **ótimo relativo**, que pode ser diferente em outra combinação de condições ou níveis.

A Figura 4.1 mostra uma otimização univariada genérica, cuja resposta procurada pode ser um rendimento de reação química, por exemplo. As variáveis 1 e 2 podem ser temperatura do ambiente reacional e a concentração de um reagente, respectivamente. Nesse exemplo, a variável 2 foi mantida constante (no nível 3), enquanto a variável 1 foi investigada. O valor máximo (55 %) foi obtido no nível 4 da variável 1. Este nível foi mantido constante, e a variável 2 foi então investigada, o que resultou em um valor otimizado de 85 %.

Se, em vez de fixar a variável 2 no nível 3, ela fosse fixada em outro nível, ou seja, se fossem tomados outros pontos de partida, a otimização tomaria outro rumo. É possível observar na Figura 4.2 à esquerda que, para o mesmo sistema, o rendimento da reação otimizado foi 95 %, quando a variável 2 foi inicialmente mantida no nível 5. Se o ponto de partida fosse o nível 1, o rendimento ótimo seria 28 %.

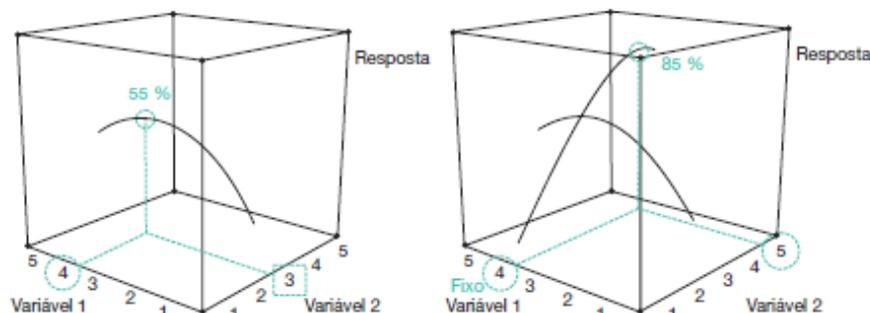


Figura 4.1 Otimização univariada das variáveis de um sistema.

Fonte: BORGES *et al*, ISBN: 9788521626947.

APÊNDICE 3 Trabalhos paralelos

Monitoramento químico de óleos de canola, girassol, milho, soja e oliva após tratamento térmico em temperaturas obtidas em fogões domésticos.

Colaboradores: *Brenda Porto, Thiago Mendes, Douglas Faza, William Martini, Maria José Bell, Marcone Oliveira.*

Avaliação do preparo de amostra de gordura abdominal de carne bovina e suína sem extração com solventes orgânicos.

Colaboradores: *Brenda Porto, Arina Gomes, Flávia Campos, Rafael Arromba, Marcone Oliveira.*

Avaliação da extração da fase lipídica de amostras de plasma de pacientes com síndrome metabólica para análise do perfil de AG por

GC-FID. Colaboradores: *Brenda Porto, Jéssica Cordeiro, Thiago Mendes, Nádia Fox e Marcone Oliveira.*

APÊNDICE 4 Colaborações

Arina Gomes, graduanda em Química pela Universidade Federal de Juiz de Fora. **Avaliação dos AG ω -3 em amostras de peixe enlatado.** Contribuição: Treinamento e auxílio nas análises do perfil de AG por GC.

Gabriela Kuhl, mestranda em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina. **Avaliação de CLA em leite fermentado.** Contribuição: Treinamento e auxílio nas análises do perfil de AG por GC.

Heveline Silva, professora do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora. **Validação de método para avaliação biológica de complexos de platina.** Contribuição: Cálculos estatísticos.

Jéssica Cordeiro, graduanda em Química pela Universidade Federal de Juiz de Fora. **Avaliação de amostras de azeite de dendê por CE e GC.** Treinamento e auxílio nas análises do perfil de AG por CE e GC.

Lucas Matos Duarte, doutorando em Química pela Universidade Federal de Juiz de Fora. **Modelagem por espectroscopia Raman para a quantificação de quatro edulcorantes.** Contribuição: Treinamento e auxílio com a quantificação dos edulcorantes por CE.

Patrícia Lopes de Oliveira, doutoranda em Química pela Universidade Federal de Juiz de Fora. **Avaliação de amostras de manteiga de garrafa por CE e GC.** Contribuição: Treinamento e auxílio nas análises do perfil de AG por GC.

Paula Rocha Cheline, doutora em Farmácia pela Universidade Federal de Minas Gerais. **Análise simultânea de quatro antituberculostáticos por Raman e HPLC-DAD.** Contribuição: Auxílio nas medidas de espectroscopia Raman.

Rafael Arromba, professor do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora. **Análise de nitrato e nitrito como proposta uma**

pedagógica para disciplina de Química Ambiental. Contribuição: Treinamento e auxílio nas medidas de CE.

Rafaela Martins, graduanda em Química pela universidade Federal de Juiz de Fora. **Desenvolvimento de método para análise de edulcorantes por CE.** Contribuição: Treinamento e auxílio no desenvolvimento do método e nas análises por CE.

Rosana Gonçalves, mestranda em Ciência e Tecnologia do Leite pela Universidade Federal de Juiz de Fora. **Avaliação da quantidade de CLA em amostras de queijo.** Contribuição: Treinamento e auxílio nas análises do perfil de AG por GC.

Thiago de Oliveira Mendes, doutorando em Física pela Universidade Federal de Juiz de Fora. **Espectroscopia vibracional para a quantificação da gordura do leite.** Contribuição: Análise do perfil dos AG por GC-FID.

_____, **Tutorial para análise de dados de estudos de metabolômica.** Contribuição: Auxílio no planejamento dos experimentos e no preparo das amostras.

_____, **Análise do perfil de AG em leite e soro lácteo para previsão de fraude.** Contribuição: Treinamento e auxílio nas análises por CE e GC.

William da Silva Martini, graduando em Química pela Universidade Federal de Juiz de Fora. **Caracterização química de óleos vegetais.** Contribuição: Treinamento e auxílio nas análises do perfil de AG por GC.

APÊNDICE 5 Participação em eventos

1. 38ª Reunião Anual da SBQ, 2015.

Pôster: Análise rápida de CLA em amostras de leite por GC.

2. I Tarde de imersão do curso de gastronomia, 2014.

Palestra: Alimentos e gorduras - mocinhos, vilões e mitos.

3. XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2014.

Pôster: Análise do perfil de ácidos graxos em amostras de gordura abdominal de suínos, bovinos e aves por cromatografia a gás (GC-FID).

4. 21st ITP and 20th LACE, 2014.

Pôster: Development of a rapid method for the analysis of total trans-fatty acids in processed food using capillary electrophoresis with direct detection.

5. 2nd Workshop on collaborative research between CEU San Pablo University & Brazilian Universities Research Institutions, 2013.

Palestra: Metabolomic study of stable vs unstable atherosclerosis patients - searching for prognostic markers of new cardiovascular events.

6.XII SECyTA, 2012.

Pôster: Metabolomic study of stable vs unstable atherosclerosis patients searching for prognostic markers of new cardiovascular events.

7. 16º Encontro Nacional de Química Analítica, 2011.

Pôster: Otimização de metodologia de extração de fase lipídica para análise de AGP ômega-3 em ovos enriquecidos por eletroforese capilar.