

Marcel Piovezan

**OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE
EXTRATO DE AMORA PRETA (*Rubus fruticosus* var. *Lochness*)
E SEU EFEITO SOBRE A DIETA HIPERLIPÍDICA EM RATOS
MEDIANTE ANÁLISE METABOLÔMICA**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Química,
Departamento de Química,
Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito para
a obtenção do grau de
Doutor em Química.
Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu
Micke

Florianópolis, SC – Brasil
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fiovezan, Marcel

Otimização e caracterização química de extrato de amora preta (*Rubus fruticosus* var. *Lochner*) e seu efeito sobre a dieta hiperlipídica em ratos mediante análise metabolômica / Marcel Fiovezan ; orientador, Gustavo Amadeu Micke - Florianópolis, SC, 2014.
214 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Extrato de amora preta. 3. Desenvolvimento de método analítico. 4. Dieta hiperlipídica. 5. Metabolômica. I. Micke, Gustavo Amadeu. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Tenho muitos à agradecer, desde o início da minha trajetória de vida que levou até este topo. São pais, irmão, família, professores, amigos, conhecidos, e todos os que passaram por minha trajetória. Assim, agradeço e enfatizo os que levo na alma.

Domingos e Isair, sem vocês nada seria possível iniciar e me levar tão longe. Amo vocês demais!

Meu irmão Mateus, Impossível ter pedido um melhor. Te amo!

Aos meus tios: Irene e Luís Carlos Funez pelo carinho incondicional, por acreditarem no meu sonho e apoiarem sempre.

À muitos, dos professores que levaram meu conhecimento por caminhos estranhos, difíceis, incontroláveis e que aprendi a amar.

Aos meus amigos de longa data Lucilene, Robmara e Elaine que sempre estiveram aqui, mesmo longe.

A minha “irmã de alma” e de quase toda essa travessia Rafaella Trilha, com você sempre foi alegre, divertido, sofrido, calmo e intenso, como uma amizade verdadeira e cheia de carinho deve ser.

Agradecimento aos companheiros de laboratório: Michele Barcellos, Luciano Vitali, Jacqueline Vistuba, Mônia Azevedo, Maressa Dolzan, Daniel Spudeit, Juliana Bastos, Ana Carolina de Oliveira Costa.

E um especial agradecimento à minha querida amiga Melina Heller, dividindo sonhos, dores e profissão, sei de tudo que fizestes por mim e serei sempre grato.

Aos meus companheiros de moradia em Madrid, Thiago dos Santos Gomes e Emerson Castillho Martins pelas alegrias que só tivemos no “pisso de Urgel”. Aos meus queridos companheiros brasileiros da San Pablo –CEU, Kenia Bispo (Sem seu trabalho eu não teria uma tese, obrigado pelos plasmas), Thiago e Brenda, Juliana Alberice e Daniela Saraiva (tarô, chá e janta). Claudia Balderas Arroyo que além da amizade, me ensinou tudo sobre metabólômica (Viva México!).

Aos meus orientadores: Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke pela oportunidade e Prof. Dr. Javier Gutiérrez-Mañero, Prof. Dr. Beatriz Ramos – Solano e Prof. Dr. Coral Barbas da San-Pablo CEU de Madrid por acreditarem ao final no meu trabalho.

Aos órgãos de financiamento: CAPES e Força Aérea Brasileira pelo convênio de mobilidade Brasil- Espanha.

HOMENAGEM

À minha família...

“Puedo volver./ Puedo callar./ Puedo forzar la realidad./ Puedo doler./ Puedo arrasar./ Puedo sentir que no doy más./ Puedo escurrir./ Puedo pasar./ Puedo fingir que me da igual./ Puedo incidir./ Puedo escapar./ Puedo partirme y negociar la otra mitad./ Puedo romper./ Puedo olvidar./ Puede comerme la ansiedad./ Puedo salir./ Puedo girar./ Puedo ser fácil de engañar./ Puedo joder./ Puedo encantar./ Puedo llamarte sin hablar./ Puedo vencer./ Puedo palmar./ Puedo saber que sin vosotros puede más./ Puede ser que mañana esconda mi voz./ Por hacerlo a mi manera...” “Saber que sin vosotros duele más.” Sálvese quien pueda (Vetusta Morla)

Aos colegas de trabalho...

“Te he dejado en el sillón las pinturas y una historia en blanco./ Yo me marchó a otro lugar./ puede que el viaje sea largo./ La burbuja en que crecí nos vendió comodidad y un nudo entre las manos./ Yo escogí la ambigüedad, tú el fantasma y lo real./ todo en el mismo barco”. Al respirar (Vetusta Morla)

Aos pesquisadores...

...”Lo sé porque muchos ya se fueron, y hoy sigo sus pasos al caminar”. “Nadie nos enseña dónde parar.” Los buenos (Vetusta Morla)

Aos que desacreditaram...

Úsame sin miedo/ úsame, tu escudo humano, tu perro extraño guardián./ Recibí el revés, salvé nuestro tesoro, de cupones sin premiar./ Úsame sin miedo úsame tu coartada, tu excusa para soñar./ Escudo humano (Vetusta Morla)

Para refletir...

“Talvez, lo que te hace grande no sea difícil de ver./ Tal vez, cada guiño esconda, la llave que intentas tener./ Ya ves, se nos queda grande y hay riesgo de alarma otra vez./ Tal vez, cuando todo amaine la suerte nos vuelva a vencer./ Y en el vaivén de planes sin marcar cae sobre ti la bomba universal;/ no hay colisión, ni ley, ni gravedad que te pueda hacer caer aunque tiren a dar”. Lo que te hace grande (Vetusta Morla).

RESUMO

A obesidade, a resistência à insulina e a herança genética são os principais fatores associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e a diabetes mellitus tipo 2 (DM2), sendo que os dois primeiros fatores podem ser afetados pelo tipo de alimentação. Os alimentos baseados em plantas e derivados ricos em compostos bioativos podem ser capazes de reduzir o estresse oxidativo e melhorar o perfil lipídico com implicações em melhorias no quadro de patologias relacionadas com vias metabólicas, como é o caso da DM2. A amora preta é um fruto rico em compostos dessa natureza, como antocianinas e flavanols. Estes por sua vez, variam em tipo e quantidade dentro do fruto por razões como, produção agrícola, efeitos ambientais, e/ou, de processos de conservação e extração desses compostos para administração como suplemento na forma de extratos em dietas, causando grande discrepância de resultados em ensaios de bioatividade. A diabetes é caracterizada e monitorada pela taxa de um único metabólito presente na corrente sanguínea, a glicose. No entanto, a obesidade e a diabetes afetam o metabolismo do organismo como um todo, e a medição de limitados compostos para diagnosticar ou monitorá-las, bem como, a eficácia de terapias é basicamente incompleta. Portanto, uma perspectiva mais abrangente de múltiplos metabólitos deve ser tomada. Tal abordagem é comumente referida como metabolômica, a qual permite por exemplo, uma impressão digital do plasma (metabólitos) em caso de um grupo de indivíduos obesos em comparação com um grupo saudável. Depois de impressões digitais, os metabólitos presentes, ou encontrados alterados na comparação podem ser identificados, visando interpretação bioquímica e a descoberta mais precisa e específica dos conjuntos de marcadores desta doença. Os objetivos finais são a melhoria do diagnóstico, prognóstico e monitoramento de terapias. Diante do exposto, esta tese buscou definir a melhor condição de extração de antocianinas e outros flavonóides da amora preta para produção de um extrato através de planejamento de experimentos, e que o extrato seja estável frente ao armazenamento por período controlado de 120 dias à -20°C . Os resultados apontaram diferente condição ideal de extração dependendo do solvente utilizado. A proporção dos solventes MeOH e EtOH, bem como a temperatura de extração foi de 100 % e 48°C , assim como, ao considerar um tempo de

sonicação de 5 min para MeOH e 30 min para EtOH, a porcentagem de HCl foi de 0,0 e 0,2 %, respectivamente. Para avaliação dos efeitos metabólicos ocasionados pelos compostos bioativos provenientes da amora preta sobre obesidade e DM2, foram utilizados animais de experimentação da raça Sprague Dawle alimentados com dietas controladas, sendo uma delas adicionada de extrato de amora. Para tanto, um extrato foi preparado e caracterizado quanto ao teor da antocianina majoritária (cianidina-3-glicosídeo: $1032,0 \pm 2,3 \text{ mg L}^{-1}$) pela técnica de cromatografia líquida (LC-UV e LC-MS/MS). Quanto ao teor de flavanol (epicatequina: $498,6 \pm 7,5 \text{ mg L}^{-1}$) um método de extração e separação foi desenvolvido, validado e aplicado para o extrato utilizando a técnica de eletroforese capilar (CE-UV). A avaliação metabolômica foi realizada pela técnica de UPLC-ESI-QToF/MS, onde foram investigados os metabólitos em plasma de ratos tratados por 90 dias com dieta hiperlipídica (grupo Caf) e outro adicionado de extrato de amora preta (CafR) e um grupo controle com dieta padrão (grupo Std). Os perfis metabólicos dos ratos tratados com dieta hiperlipídica foram comparados com os tratados com dieta padrão (Caf vs Std) e os tratados com dieta hiperlipídica adicionada de extrato de amora preta com relação aos de dieta hiperlipídica (CafR vs Caf). Os metabólitos identificados foram lipídeos do subgrupo dos: acil graxos, liso- e glicerofosfolídeos e esfingolipídeos encontrados alterados nas comparações entre dietas. Independente do gênero, os ratos suplementados com extrato de amora (dieta CafR), apresentaram diminuição percentual em acilcarnitinas (melhora no processo de β -oxidação lipídica), lisofosfatidilcolinas e esfingolipídeos (perda de massa gorda e melhora no processo de inflamação) e aumento em fosfatidilcolinas (melhora no quadro de obesidade e estresse oxidativo). Por fim, a suplementação com extrato de amora na dieta hiperlipídica parece melhorar o quadro de obesidade e consequentemente protelar o desenvolvimento de DM2.

Palavras-chave: amora preta, CE-UV, UPLC-ESI-QToF/MS, obesidade, diabetes tipo 2, dieta hiperlipídica, metabolômica

ABSTRACT

Obesity, insulin resistance and genetic heritage are the principal factors associated with the development of cardiovascular diseases and type 2 diabetes mellitus (T2DM), whereby the two first factors can be avoided by having certain food intake habits. Plant intake and derivatives extract when rich in bioactive compounds, have properties to reduce the oxidative stress and improve lipid profiles with implications in pathologies related with metabolic pathways, like as T2DM. The blackberry fruit is rich in bioactive compounds, such as anthocyanins and flavanols. The type and quantity of flavonoids in blackberry fruit may vary for reasons as agricultural production, environmental effects, and/or conservation processes and extraction of these compounds for administration as a supplement in diets, causing big discrepancy results in bioactivity assay. The diabetes is characterized and monitored by the rate of one metabolite present in the blood, the glucose. However, obesity and diabetes affect the metabolism as a whole, and the measurement of limited compounds to diagnose or monitor them, as well as the effectiveness of therapies is essentially incomplete. Therefore, a more comprehensive view of multiple metabolites must be taken. This approach is commonly referred as metabolomics, which enables for example, a fingerprint of the plasma metabolites in the case of an obese group, compared with a healthy group. After fingerprints, present or changed metabolites in the comparison can be identified aiming biochemical interpretation, and the discovery of specific sets of markers of this disease. The ultimate goals are to improve the diagnosis, prognosis and monitoring of therapies. Given the above, the proposal of this thesis was to define the best extraction condition of anthocyanins and other flavonoids from blackberry to produce an extract using design of experiments, and if this extract is stable in storage for controlled period (120 days at -20 °C). The results showed different ideal condition of extraction depending on the solvent used. The proportion of the solvents MeOH and EtOH, and the temperature of extraction was 100 % and 48 °C, when considering a sonication time of 5 min for MeOH and 30 min to EtOH, the HCl percentage were 0.0 and 0.2%, respectively. To evaluate the metabolic effects caused by bioactive compounds from blackberry on obesity and T2DM, the Sprague Dawley rats were taken with controlled diets, where to one diet was

added blackberry extract. To do so, an extract was prepared and characterized on content of the majority anthocyanin (cyanidin-3-glucoside: $1032.0 \pm 2.3 \text{ mg L}^{-1}$) by liquid chromatography technique (LC-UV and LC-MS/MS). To the flavanol content of (epicatechin: $498.6 \pm 7.5 \text{ mg L}^{-1}$) a method of extraction and separation was developed, validated and applied in the extract using capillary electrophoresis (CE-UV). The metabolomics analysis were performed by UPLC-ESI-QToF/MS technique, in which were investigated the metabolites in rats plasma treated for 90 days with high fat diet (Caf group) and another added blackberry extract (CafR group) and a control group with standard diet (Std group). The metabolic profiles of treated rats with high fat diet were compared with standard diet (Std vs Caf) and those treated with high fat diet with added blackberry extract with respect to the high-fat diet (CafR vs Caf). The identified metabolites were lipids the subgroup: fatty acyl, lyso and glycerophospholipids and sphingolipids altered in comparisons between diets. Independently of gender, the rats supplemented with blackberry extract (CafR group) showed percentual decrease in acylcarnitines (improvement in lipid β -oxidation process), lysophosphatidylcholines and sphingolipids (loss of fat mass and improvement in the inflammation process) and increase in phosphatidylcholines (improvement in obesity and oxidative stress). Finally, the supplementation of blackberry extract appears to improve the obesity and consequently delay in the development of T2DM.

Keywords: blackberry, CE-UV, UPLC-ESI-QToF/MS, obesity, T2DM, high fat diet, metabolomic.

RESUMEN

La obesidad, la resistencia a la insulina y la herencia genética son los principales factores asociados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2 (DM2), al cual los dos primeros factores pueden ser afectados por el tipo de dieta. La adición de extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos ha sido propuesta como una estrategia factible para el desarrollo de alimentos funcionales con una actividad antioxidante incrementada. Dentro de las frutas que contienen abundantes compuestos fenólicos antioxidantes, se incluye la mayoría de los frutos de tipo baya como la mora, rica principalmente en antocianos y flavanoles. El contenido de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante puede cambiar de acuerdo a la variedad de la fruta, además de razones como: la producción agrícola, los efectos ambientales y/o los procesos de conservación y extracción de estos compuestos, causando grandes diferencias de resultados en pruebas de bioactividad. La diabetes es caracterizada y monitorizada por un único metabolito presente en la sangre, la glucosa. Sin embargo, la obesidad y la diabetes afectan el metabolismo del organismo como un todo, y la medición de limitados compuestos para su diagnóstico y control, así como la eficacia de las terapias es esencialmente incompleta. En este sentido, nuevos avances en la metodología analítica deben permitir obtener más información y de más calidad, para poder avanzar en su comprensión. En la última década, la metabolómica ha surgido, se viene desarrollando y consolidando como una disciplina dedicada al estudio global de los metabolitos (productos del metabolismo) presentes en un sistema biológico. En base a lo anterior, la presente tesis de investigación pretende definir las mejores condiciones de extracción de antocianos y otros flavonoides de la mora, para la producción de un extracto a través del diseño de experimentos, donde el extracto sea estable en almacenamiento durante un periodo controlado (120 días a -20 °C). Los resultados demuestran un estado óptimo para los diferentes disolventes de extracción evaluados. Las proporciones de los disolventes MeOH y EtOH, así como la temperatura de extracción fueron 100% y 48 °C. Sin embargo, al considerar un tiempo de extracción de 5 min para el MeOH y 30 min para el EtOH, el porcentaje de HCl fue de 0 y 0,2%

tivamente. Además pretende profundizar en el conocimiento de las alteraciones metabólicas que puedan presentarse en un grupo de animales de experimentación, utilizando para este estudio ratas Sprague Dawley. Para evaluar los efectos metabólicos causados por los compuestos antioxidantes a partir de la mora, en la obesidad y la DM2, se preparó y caracterizó un extracto de mora, además se determinó el contenido del antociano mayoritario (cianidina-3-glucósido: $1032,0 \pm 2,3 \text{ mgL}^{-1}$) mediante la técnica de cromatografía líquida (LC-UV y LC-MS/MS). Para la determinación del contenido de flavanoles (epicatequina: $498,6 \pm 7,5 \text{ mg L}^{-1}$) se desarrolló un método de extracción y separación, el cual fue validado por la técnica de electroforesis capilar (CE-UV). La evaluación metabólica se realizó por la técnica UPLC-ESI-QToF/MS, fueron investigados los metabolitos en plasma de ratas tratadas durante 90 días con una dieta rica en grasa (grupo Caf) y otra añadida con el extracto de mora (CafR) y un grupo control con dieta estándar (grupo Std). Los perfiles metabólicos de las ratas tratadas con la dieta rica en grasa fueron comparados con los tratados con dieta estándar (Caf vs Std) y los tratados con dieta rica en grasas con adición de extracto de mora se compararon con respecto a la dieta hiperlipídica (CafR vs Caf). Los resultados muestran un cierto cambio en el metabolismo a causa de la dieta, sugiriendo que los metabolitos responsables e identificados corresponden principalmente a lípidos: acilos grasos, esfingolípidos y glicerofosfolípidos. Independientemente del género, las ratas que tomaron la dieta con extracto de moras (grupo CafR) mostraron una disminución porcentual de acilcarnitina (mejora en el proceso de β -oxidación de los lípidos), lisofosfatidilcolinas y esfingolípidos (pérdida de grasa y mejora en el proceso de inflamación) y un aumento en fosfatidilcolinas (mejora bajo la obesidad y el estrés oxidativo). Por último, la suplementación con extracto de mora en la dieta rica en grasas parece mejorar la condición de obesidad y por lo tanto retrasar el desarrollo de la DM2.

Palabras-clave: mora, CE-UV, UPLC-ESI-QToF/MS, obesidad, diabetes tipo 2, dieta hiperlipídica, metabólico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Núcleo básico e subclasses dos flavonóides.	34
Figura 2. Estrutura química mais comum das unidades de procianidinas do Tipo A e Tipo B (Monagas, <i>et al.</i> 2010).	36
Figura 3. Estruturas químicas das antocianinas dependendo do pH e reação de degradação. Legenda: $R_1 = H$ ou açúcar, R_2 e $R_3 = H$ ou metila. Adaptado de (Castañeda-Ovando, <i>et al.</i> 2009).	38
Figura 4. Estrutura das seis antocianinas mais abundantes em frutas e vegetais. Fonte: Adaptado de (Can, 2012).	39
Figura 5. Relação entre as ômicas e fatores externos. Adaptada de (Nicholson, <i>et al.</i> 2007).	50
Figura 6. Fluxo de trabalho em uma abordagem de Análise metabolômica não dirigida. Adaptado de (Gary J. Patti, 2012).	60
Figura 7. (a) A matriz de dados usado em PCA com n linhas (observações) e k colunas (As variáveis). (b) Ilustração do PCA. (I) Os dados da matriz X visualizados no espaço 3D. (ii) Três componentes principais para os dados. (iii) Projeção dos dados para os primeiros dois PCs como um gráfico de dispersão. Figura adaptada de (Kavraki 29 julho 2013).	70
Figura 8. (a) Exemplo de um gráfico de dispersão de pontos “ <i>score plot</i> ” e (b) Exemplo de um gráfico de dispersão de carga “ <i>loadingplot</i> ”.	71
Figura 9. PLS. (a) observações podem ser vistas como dois grupos de pontos, no espaço preditor (X) e um na resposta do espaço (Y); (b) Score plot, separação em dois grupos de acordo com as variáveis X relevantes em consideração às classes de Y.	73

Figura 10. Ilustração geométrica entre modelos de PLS-DA e OPLS-DA. (a) Visualização em duas dimensões. Adaptado de (Wiklund, Johansson <i>et al.</i> 2008).....	74
Figura 11. Fisiologia básica do pâncreas. Legenda: (A) Pâncreas, (B) Ilhotas de Langerhans (ou ilhotas pancreáticas), são os locais de produção de dois hormônios, insulina (hormônio hipoglicemiante - facilita o ingresso da glicose existente no sangue em diversos tipos de células, principalmente as musculares e as do fígado, onde são armazenadas como glicogênio) produzidas pelas células β . E glucagon (hormônio hiperglicemiante – responsável pela hidrólise do glicogênio hepático, o que leva à liberação de glicose para o sangue) produzidas pelas células α	84
Figura 12. Fluxograma do procedimento aplicado para estudo da extração.	95
Figura 13. Avaliação quanto ao teor de antocianinas totais dentro de uma mesma condição de extração no decorrer do tempo de estocagem de até 120 dias à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. F-ratio = 0,17 – 4,20.....	98
Figura 14. Avaliação quanto ao teor de antocianinas totais com relação as diferentes condições de extração. F = 25,63.....	98
Figura 15. Avaliação quanto ao teor de flavonóides totais dentro de uma mesma condição de extração no decorrer do tempo de estocagem à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. F-ratio = 3,83 – 57,73.	100
Figura 16. Avaliação quanto ao teor de flavonóides totais com relação as diferentes condições de extração. F ratio =22,17.....	100
Figura 17. Avaliação quanto ao teor de flavonóides totais dentro de uma mesma condição de extração no decorrer do tempo de estocagem à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. F-ratio = 0,50 – 6,80.	105

Figura 18. Avaliação quanto ao teor de flavonóides totais com relação as diferentes condições de extração. F-ratio = 45,57..... 105

Figura 19. Avaliação quanto ao teor de antocianinas totais dentro de uma mesma condição de extração no decorrer do tempo de estocagem à -20 °C. F-ratio = 2,10 – 49,10; 107

Figura 20. Avaliação quanto ao teor de antocianinas totais com relação as diferentes condições de extração. F = 4,90. 107

Figura 21. Procedimento de extração de flavonóides livres do extrato de amora preta..... 114

Figura 22. Perfil de análise por LC-ESI/MS/MS de antocianinas em extrato de amora preta usando monitoramento de reações múltiplas (MRM). Separação em coluna C18 (30 mm, 2,0 mm DI, 2,2 µm tamanho de partícula), temperatura 35 °C; injeção da amostra de 2 µL. Ionização (*electrospray ESI*) no modo íon positivo (+ESI); Parâmetros para MS/MS: cortina de gás, 10 psi; temperatura, 400 °C, gás 1, 45 psi; gás 2, 45 psi; gás CAD, médio. Legenda: (A) *m/z* 595→287 para cianidina-3-rutinosídeo; (B) *m/z* 507→303 para delphinidina-3-(6-acetil)-glicosídeo; (C) *m/z* 465→303 para delphinidina-3-galactosídeo ou delphinidina-3-glicosídeo; (D) *m/z* 449→287 para cianidina-3-galactosídeo ou cianidina-3-glicosídeo; (E) *m/z* 435→303 para delphinidina-3-arabinosídeo; (F) *m/z* 419→287 para cianidina-3-arabinosídeo. 120

Figura 23. Cromatograma representativo da identificação da quantidade de picos cromatográficos referentes às antocianinas no extrato de amora preta. A separação foi realizada em coluna C18 de dimensões (100 mm x 4 mm; 3 µm de tamanho de partícula), acoplada a uma pré-coluna da mesma empresa de dimensões (10 mm x 4 mm e 5 µm de tamanho de partícula), temperatura de 20 °C; volume de injeção, 10 µL e detecção

em 520 nm. Legenda: (1) cianidiana-3-glicosídeo, (2-5) antocianinas não identificadas. 122

Figura 24. Cromatograma da adição de padrão de cianidina – 3 – galactosídeo no extrato de amora-preta. A separação realizada em coluna C18 de dimensões (100 mm x 4 mm; 3 µm de tamanho de partícula), acoplada a uma pré-coluna da mesma empresa de dimensões (10 mm x 4 mm e 5 µm de tamanho de partícula), temperatura de 20 °C; volume de injeção, 10 µL e detecção, 520 nm. Legenda: (1) cianidiana – 3 - glicosídeo; (2-5) antocianinas não identificadas; (6) cianidina – 3 – galactosídeo..... 123

Figura 25. Eletroferograma no método de pH elevado. A separação de uma mistura de sete padrões de compostos fenólicos de 100 mg L⁻¹, (A); Adição de padrões na amostra de amora preta (50 mg L⁻¹), (B); Extrato metanólico de amora diluído em água (1:1, v/v), (C). Composição do Eletrólito (BGE): 20 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio a pH de 9,2 e metanol 30% (v/v). Condições de análise: capilar de sílica, L_{tot} = 38,5 cm, L_{det} = 28,5 cm, 50 µm de diâmetro interno; 0,5 psi, 10 s de injeção hidrodinâmica; 25 °C; +30 kV de tensão aplicada, detecção direta em 200 nm. Legenda: (+)-catequina e (-)-epicatequina (1,2), rutina (3), quercetina (4), ácido ferúlico (5), ácido gálico (6), ácido protocatechuico (7), cianidina- 3-glicosídeo (9) e não identificados (8,10 e 11). 126

Figura 26. Solução padrão, 50 mg L⁻¹ (A) e amostra de amora depois da extração orgânica (B). Legenda: (-)-epicatequina (1), (+)-catequina (2) e ácido 4-hidroxibenzóico, 69 mg L⁻¹, (IS). Composição do BGE: ácido fosfórico, 30 mmol L⁻¹; SDS, 40 mmol L⁻¹ e TEA, 0,1% (v/v) a pH 2,3. Condições analíticas: capilar de sílica não revestido, L_{tot} = 30,5 cm, L_{det} = 20,5 cm, 50 µm de diâmetro interno; 0,5 psi; 10 s de injeção hidrodinâmica; 25 °C; -15 kV tensão aplicada, detecção direta em 200 nm. Tempo de análise total, 10 min. 128

Figura 27. Desenho experimental para avaliação dos efeitos metabólicos de dietas em cobaias. Legenda: Fêmeas (F), Machos (M) e respectivas dietas: padrão (Std), cafeteria (Caf) e cafeteria + extrato de amora (CafR).....	136
Figura 28. Preparo de amostra para análise metabólica.	139
Figura 29. Fluxo de trabalho simplificado para estudo metabólico aplicado no presente estudo.....	145
Figura 30. PCA-X sem transformação dos dados e escalonamento em unidade de variância (UV*) para todas as amostras mais QC no modo positivo de ESI. As simbologias das amostras foram coloridas manualmente para melhor observação. Legenda: (A) Amostras de QC analisadas antes das sequências de amostras; (B) Amostras de QC analisadas intercaladas com as amostras.	147
Figura 31. Sobreposição das 25 análises de QC realizadas em polaridade positiva de ESI. Legenda: (A) Curvas de pressão da bomba de fase móvel; (B) Cromatogramas de íons totais (TIC).....	148
Figura 32. PCA-X sem transformação dos dados e escalonamento em unidade de variância (UV*) para todas as amostras no tempo de 90 dias de tratamento com dietas no modo de positivo de ESI. As simbologias das amostras foram coloridas manualmente para melhor observação. Legenda: Dieta padrão – Std, Dieta cafeteria – Caf e Cafeteria + extrato de amora – CafR. Elipse Hotelling's T^2 (0.95).....	149
Figura 33. PCA com transformação logarítmica e escalonamento Pareto para as amostras de plasma de ratos machos em ambas polaridades de ESI. As simbologias das amostras foram coloridas manualmente para melhor observação. Legenda: dieta padrão – Std, dieta cafeteria – Caf e cafeteria + extrato de amora – CafR; Elipse Hotelling's T^2 (0.95).....	152

Figura 34. PCA com transformação logarítmica e escalonamento Pareto para as amostras de plasma de ratos fêmeas em ambas polaridade de ESI. As simbologias das amostras foram coloridas manualmente para melhor observação. Legenda: dieta padrão – Std, dieta cafeteria – Caf e cafeteria + extrato de amora – CafR; Elipse Hotelling's T^2 (0.95). 153

Figura 35. Modelos de PLS-DA e OPLS-DA para comparações de dietas em machos para ambos os modos de ionização em electrospray. Legenda: dieta padrão (■); cafeteria (▲); cafeteria + extrato de amora (●). Elipse Hotelling's T^2 (0.95). 157

Figura 36. Modelos de PLS-DA e OPLS-DA para comparações de dietas em fêmeas para ambos os modos de ionização em eletrospray. Legenda: dieta padrão (■); cafeteria (▲); cafeteria + extrato de amora (●). Elipse Hotelling's T^2 (0.95). 158

Figura 37. As carnitinas são nomeadas de acordo com a quantidade de carbonos e insaturações na posição (X) do esqueleto base. A classe dos fosfolípídeos é definida pela natureza da base nitrogenada ou do polioli esterificado ao grupo fosfato (X). A distribuição de espécies dentro de qualquer classe de fosfolípido é determinada pelos substitutos de acil graxos nas posições sn-1 e sn-2 do esqueleto de glicerol. O dipalmitoil mostrado aqui seria designado PC(16:0/16:0) ou PC(32:0) se X fosse colina. Se o ácido araquidônico fosse esterificado na posição sn-2 da molécula seria designada PC(16:0/20:4) ou PC(36:4). Um lisofosfolípídeo (LPL) refere-se a qualquer fosfolípídeo que falte uma das suas duas cadeias de O-acil. LPLs possuem uma função álcool livre em qualquer posição sn-1 ou sn-2. As LPLs são por exemplo produtos da reação enzimática da fosfolipase tipo A sobre fosfolípídeos. No caso de o fosfolípídeo PC(16:0/16:0) sofrer reação enzimática na posição sn-2, passaria a chamar-se LPC(16:0). Fontes: LIPIDMAPS, METLIN, (Postle 2008). 167

Figura 38. Via biossintética em células de mamíferos correlacionando PC*, PE e PS. Adaptado de (Vance, 2013 ; Pavlovic, 2013). 174

Figura 39. Vários esfingolipídeos provocam resultados deletérios metabolicamente semelhantes à ceramida. No entanto, apenas a formação de ceramida (no presente esquema representado apenas com outros esfingolipídeos de interesse no presente estudo) foi demonstrada que podem mediar distúrbios induzidos por inflamação. A inibição das enzimas indicadas convida aos resultados descritos. Legenda: esfingosina – 1 – fosfato (S1P), esfingomielinase sintase (SMS), esfingomielinase (SMase) e esfingosina quinase (SK). Adaptado de (Bikman, 2012). 180

Figura 40. Comparação entre os OPLS-DAs para machos e fêmeas da comparação Caf vs Std, (A). SUS-plot para comparação Caf vs Std para machos e fêmeas, (B). 183

Figura 41. Comparação entre os OPLS-DAs para machos e fêmeas da comparação CafR vs Caf, (A). SUS-plot para comparação CafR vs Caf para machos e fêmeas, (B). 184

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Subclasses, características químicas e exemplos de flavonóides determinados em frutas vermelhas ¹	35
Tabela 2. Metodologias de extração e determinação de flavonóides em frutas vermelhas para análise em HPLC.	43
Tabela 3. Procedimentos de extração e determinação de compostos fenólicos em frutas vermelhas utilizando CE.....	46
Tabela 4. Sites de base de dados para busca e identificação de metabólitos aplicados na interpretação biológica em metabolômica. ...	79
Tabela 5. Variáveis e níveis investigados no planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1}	92
Tabela 6. Combinação das variáveis do planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1}	92
Tabela 7. Matriz do fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1} com níveis experimentais e respostas.	102
Tabela 8. Resultado para o planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1} . .	103
Tabela 9. Transições MRM de antocianinas e suas energias de fragmentação (Valls, <i>et al.</i> 2009).....	118
Tabela 10. Parâmetros de validação do método.....	131
Tabela 11. Composição da dieta pelete padrão (Std).	134
Tabela 12. Composição das dietas por 100 g.....	135

Tabela 13. Conteúdo calórico das dietas padrão (Std), cafeteria (Caf) e cafeteria + extrato de amora (CafR) por 100 g de dieta.	135
Tabela 14. Parâmetros de qualidade dos modelos de PCA.	154
Tabela 15. Efeitos na redução do número de características moleculares estatisticamente significativos após aplicação do filtro de presença (FbF) e test <i>t</i> para cada comparação em termos de dieta.	156
Tabela 16. Resumo dos parâmetros de qualidade para os modelos de PLS-DA e OPLS-DA, onde os valores de R^2 e Q^2 são apresentados em percentual.	159
Tabela 17. Metabólitos identificados e alterações para efeitos da dieta de cafeteria sobre a padrão em machos.	161
Tabela 18. Metabólitos identificados e alterações para efeitos da dieta de cafeteria + extrato de amora sobre a cafeteria em machos.	163
Tabela 19. Metabólitos identificados e alterações para efeitos da dieta de cafeteria sobre a padrão em fêmeas.	164
Tabela 20. Metabólitos identificados e alterações para efeitos da dieta de cafeteria + extrato de amora sobre a cafeteria em fêmeas.	166
Tabela 21. Perfil de ácidos graxos das dietas (mg g^{-1}).	170
Tabela 22. Alterações metabólicas em esfingolipídeos.	180

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

+ESI e -ESI – polaridade positiva e negativa, respectivamente de ESI
ACN - Acetonitrila
ANOVA – Análise de variância
APCI - Ionização química a pressão atmosférica
BGE – Eletrólito de corrida
Caf – Grupo de dieta de cafeteria (hiperlipídica)
C3G – cianidina-3-glicosídeo
CDP-colina – via metabólica Citidinadifosfocolina
CE – eletroforese capilar
CMC- concentração micelar crítica
CafR - Grupo de dieta de cafeteria (hiperlipídica) + extrato de amora
CV – Coeficiente de variação percentual
CZE – Eletroforese capilar de zona
DM – Diabetes mellitus
ESI – Ionização por eletrospray
Et₂O – éter dietílico
EtOAc – Acetato de etila
EtOH - Etanol
FAME – ésteres metílicos de ácidos graxos
FbF – Filtro de aplicação de bandeiras (*Filter by flags*)
FFA – Ácidos graxos livres
FR – Fator resposta
GC – Cromatografia gasosa
g_{eq} – grama equivalente
HILIC – Cromatografia de interação hidrofílica
HMDB - Human Metabolome Database
HMP – Human Metabolome Project
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
ID – Insulino dependente
IS – Padrão interno
k – Colunas em matriz de dados
KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
L_{det} – Comprimento do capilar até o detector
LDL- Lipoproteína de baixa densidade
LIF – Detector de fluorescência induzida por laser

LIPIDMAPS - Metabolites and Pathways Strategy
LLE - Extração líquido-líquido
LOD – Limite de detecção
LOQ – Limite de quantificação
LPA – Ácido Lisofosfatídico
LPC - Lisofosfatidilcolina
LPE - Lisofosfatidiletanolamina
LPI - Lisofosfatidilinositol
LPS - Lisofosfatidilserina
LSD – Least significant difference
 L_{tot} – Comprimento total do capilar
 m/z – Razão massa/carga
 M^+ - X - Íon fragmento
 M^+ - Íon molecular
MAE - Extração assistida por micro-ondas
MALDI - Dessorção de matriz assistida por laser
MassTRIX - Mass Translator into Pathways
MEKC – cromatografia eletrocinética micelar capilar
MeOH - Metanol
METLIN - Metabolite and Tandem Mass Database
MFE – Extração das entidades moleculares (*Molecular feature extraction*)
MPP – Mass Profiler Professional
MRM- monitoramento de reações múltiplas
MS – Espectrômetro de massas
MS/MS - *tandem* espectrômetro de massas
MTBE – Metil tert-butil éter
MVA - Análise estatística multivariada
NID – não insulino dependente
NIST - National Institute of Standards and Technology
 ^1H NMR – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
OPLS-DA - Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Estruturas Latentes
PA - Ácido fosfatídico
PC – Componente principal
PC* - Fosfatidilcolina
Pc – Ponto central
PCA – Análise de componentes principais

PDA ou DAD – Detector de arranjo de diodos
PE - Fosfatidiletanolamina
PI - Fosfatidilinositol
pKa – logaritmo negativo da constante de dissociação para ácido fraco
PLS-DA - Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais
PS - Fosfatidilserina
Q² - Variância da previsibilidade do modelo
QC - Controle de qualidade
R² – Variância de ajuste do modelo
RSD – Desvio padrão relativo
Std – Grupo de dieta padrão (comercial)
S1P – esfingosina - 1 – fosfato
SD – Desvio padrão
SDS- dodecil sulfato de sódio
SFC – Cromatografia em fluido supercrítico
SLE - extração sólido-líquido
SPE - extração em fase sólida
STB – Tetraborato de sódio
SUS-plot – Estrutura única e compartilhada
TEA – Trietilamina
TG – Triglicerídeos
TIC - Cromatograma de íons totais
t_M – Tempo de migração eletroforético
ToF - tempo de voo
t_R – Tempo de retenção cromatográfico
UPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência
UV – Ultravioleta
UV* – Escala por Unidade de variância
UVA - Análise estatística univariada
VLDL- lipoproteína de muito baixa densidade

* nota: asterisco usado para diferenciar siglas iguais

SUMÁRIO

Introdução	29
1 Revisão da literatura	31
1.1 Frutas vermelhas (Berries)	32
1.2 Compostos bioativos: Flavonóides	33
1.2.2 Antocianidinas e Antocianinas	36
1.3 Métodos de extração	40
1.3.1 Métodos de extração e purificação de flavonóides	40
1.3.2 Extração para determinação analítica	41
1.4 Métodos de análise e quantificação	42
1.5 Metabolômica.....	48
1.5.1 O estado da arte.....	48
1.5.2 Origem da metabolômica	50
1.5.3 Conceitos	52
1.5.3.1 Metaboloma.....	52
1.5.3.2 Metabolômica.....	52
1.5.3.3 Metabólito	53
1.5.4 Tecnologias analíticas	53
1.5.4.1 Ressonância Magnética Nuclear (NMR).....	54
1.5.4.2 GC-MS	54
1.5.4.3 LC-MS.....	55
1.5.4.4 CE-MS.....	56
1.5.4.5 SFC-MS.....	57
1.5.4.6 MALDI-MS.....	57
1.5.5 Estratégias de análise metabolômica.....	58
1.5.5.1 Análise dirigida (Metabolite targeted analysis).....	58
1.5.5.2 Análise não dirigida (Metabolic Fingerprinting).....	58
1.5.6 Fluxo de trabalho não dirigido em metabolômica.....	59
1.5.6.1 Desenho de experimento em metabolômica	59
1.5.6.2 Preparo de amostra	61
1.5.6.3 Aquisição e análise de dados.....	63
1.5.6.4 Reprocessamento de dados (Data re-processing)	63

1.5.6.5 Criação do conjunto de dados (Data set creation)	64
1.5.6.6 Alinhamento (Alignment).....	64
1.5.6.7 Pré-tratamento de dados (Data pre-treatment).....	65
1.5.7 Tratamento de dados (Data treatment)	67
1.5.7.1 Filtragem de dados (Data filtering).....	67
1.5.7.2 Valores em falta (Missing values)	68
1.5.8 Análise estatística (Statistical analysis).....	68
1.5.8.1 Análise de Componentes Principais (PCA)	69
1.5.8.2 Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)	72
1.5.8.3 Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Estruturas Latentes (OPLS-DA)	74
1.5.9 Modos de visualização	75
1.5.9.1 Estrutura única e compartilhada (Shered and Unique Structure) ..	75
1.5.10 Revisão dos resultados	75
1.5.10.1 Validação analítica	75
1.5.10.2 Validação estatística	77
1.5.11 Interpretação biológica	78
1.5.12 Aplicação em Nutrigenômica	79
1.6 Hiperlipidemia e diabetes tipo 2.....	82
2 Objetivos	87
2.1 Geral.....	87
2.3 Específicos	87
3 Otimização da extração de antocianinas e flavonóides totais de amora preta	89
3.1 Metodologia Experimental	90
3.1.1 Características das amostras de Rubus fruticosus	90
3.1.2 Pré-preparo e estocagem das amoras.....	90
3.1.3. Otimização do procedimento de extração de compostos bioativos utilizando planejamento fatorial fracionário com ponto central do tipo 2_{IV}^{4-1}	90
3.1.4 Determinação de antocianinas totais	93

3.1.5 Determinação de flavonóides totais	93
3.1.6 Otimização do processo de extração	94
3.1.7 Análise estatística.....	94
3.2 Resultados e Discussão	96
3.2.1 Otimização da extração de compostos bioativos da amora-preta.....	96
3.2.1.1 Otimização usando metanol como solvente extrator	97
3.2.1.2 Otimização usando etanol como solvente extrator	104
4 Caracterização química do extrato de amora preta para aplicação em estudo metabolômico.....	109
4.1 Metodologia experimental	110
4.1.1 Preparo do extrato de amora preta para estudo metabolômico.....	110
4.1.2 Caracterização química do extrato	110
4.1.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC–ESI-MS/MS)..	111
4.1.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - UV).....	112
4.1.2.3 Electroforese capilar (CE-DAD)	113
4.2 Resultados e discussão	117
4.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – ESI/MS/MS).....	117
4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - UV)	121
4.2.3 Eletroforese capilar (CE-DAD).....	124
4.2.3.1 Desenvolvimento do método	124
4.2.3.2 Validação do método.....	129
5 Análises metabolômicas por UPLC- ESI – QtoF/MS em plasma de ratos e efeitos sobre hiperlipidemia	133
5.1 Metodologia experimental	134
5.1.1 Desenho experimental de aplicação nas cobaias	134
5.1.2 Extrato de amora preta	137
5.1.3 Perfil de ácidos graxos das dietas.....	137
5.1.4 Análises metabolômicas por UPLC-ESI QToF/MS.....	138
5.1.4.1 Reagentes	138
5.1.4.2 Preparação da amostra de plasma	138
5.1.4.3 Instrumentação UPLC – ESI-QToF/MS.....	139
5.1.4.4 Tratamento de dados e análise estatística	141

5.2 Resultados e Discussão	146
5.2.1 Validação analítica e detecção de outliers	146
5.2.2 Pré - tratamento e tratamento dos dados.....	150
5.2.3 Identificação dos metabólitos.....	160
5.2.3.1 Efeitos da dieta de cafeteria frente à padrão (Caf vs Std)	169
5.2.3.2 Efeitos da dieta de cafeteria + extrato de amora frente à cafeteria (CafR vs Caf).....	171
5.2.4 Bases bioquímicas e interpretação biológica.....	172
5.2.5 Modos de visualização SUS-plot	182
6 Conclusões e perspectivas	186
7 Referências	189

INTRODUÇÃO

Diversos produtos naturais estão relacionados com a promoção da saúde, mas especial atenção tem sido dada à alimentos que reduzem o estresse oxidativo e melhoram o perfil lipídico e suas implicações no envelhecimento, degeneração neurológica e cardiovascular. Os alimentos com maior potencial em atividade são plantas e seus derivados. Neste contexto, encontram-se as frutas vermelhas “*berries*” (morango, mirtilo, cereja, framboesa, amoras, etc...) que tem chamado atenção da comunidade científica pelos efeitos apresentados sobre a resistência a insulina e outras patologias relacionadas com vias metabólicas (Canada, 2012; Paredes-López, *et al.* 2010).

A presença e quantidade de metabólitos secundários em frutas vermelhas como flavonóides (flavanol e antocianinas), taninos (condensados: proantocianidinas e hidrolisáveis: galotaninos e elagiotaninos), estilbenos e ácidos fenólicos está sujeita a efeitos da produção agrícola e ambiental, e/ou, de processos de conservação e extração desses compostos para administração como suplemento em dieta, causando grande discrepância entre as quantidades presentes nos frutos e de resultados em bioatividade.

A escolha da investigação sobre um alimento funcional particular deve ser dirigida para aqueles em que há uma história da sua capacidade para reduzir o risco da patologia e que esteja entre a(s) mais comum(s) na população, e/ou que representem a maior taxa de mortalidade. Entre essas patologias estão incluídas a hiperlipidemia e diabetes, particularmente obesidade e diabetes tipo 2 (DM2), cuja incidência na população está aumentando a um ritmo alarmante mundialmente.

Países como Brasil e Espanha não são uma exceção (Brunzell, *et al.* 2008; Kipping, *et al.* 2008; Ogden, *et al.* 2007; Samaras, 2000). De fato, a taxa de obesidade no Brasil é cerca de 10% da população e mais de 30% tem excesso de peso (Braguinsky, 2002). Na Espanha a obesidade atinge 15% e sobrepeso superior a 50% da população. (Basterra-Gortari, *et al.* 2007). Segundo dados da Federação Internacional de Diabetes são projetados que a cifra de pessoas doentes aumentará para 553 milhões até 2030, isto é, a cada 10 segundos aproximadamente, três pessoas a mais são diagnosticadas com diabetes (IDF, 2011). Tanto a obesidade e diabetes são os principais fatores de risco no desenvolvi-

mento de doenças cardiovasculares, e é precisamente esta a principal causa de mortes (Mathers, *et al.* 2009).

A diabetes é caracterizada e monitorada pela taxa de um único metabólito presente na corrente sanguínea, a glicose. No entanto, a obesidade e a diabetes afetam outras vias metabólicas, como a síntese protéica e lipídica. Por afetar o metabolismo do organismo como um todo, a medição de limitados compostos biomarcadores para diagnosticar ou monitorar a obesidade e diabetes, bem como a eficácia de terapias é basicamente incompleta, e portanto, uma perspectiva mais abrangente de múltiplos metabólitos deve ser tomada. Tal abordagem é comumente referido como metabolômica, a qual permite por exemplo, uma impressão digital do plasma (metabólitos) em caso de um grupo de diabéticos, em comparação com um grupo saudável. Depois de impressões digitais, os metabólitos presentes, ou encontrados alterados na comparação entre os grupos podem ser identificados, visando interpretação bioquímica e a descoberta mais precisa e específica dos conjuntos de marcadores desta doença. Os objetivos finais são a melhoria do diagnóstico, prognóstico e monitoramento de terapias.

Diante do exposto esta tese busca definir a melhor condição de extração de antocianinas e outros flavonóides da amora preta para produção de um extrato através de planejamento de experimentos, e que o extrato seja estável frente ao armazenamento por período controlado. Para avaliação dos efeitos metabólicos ocasionados pelos compostos bioativos provenientes da amora preta sobre obesidade e diabetes tipo 2, um extrato foi preparado e caracterizado quanto ao teor da antocianina majoritária (cianidina-3-glicosídeo) pela técnica de cromatografia líquida. Quanto ao teor de flavanol (epicatequina) um método de extração e separação foi desenvolvido, validado e aplicado no extrato utilizando a técnica de eletroforese capilar. O extrato caracterizado foi administrado concomitante com uma dieta hiperlipídica em ratos e o plasma dos animais foi avaliado em uma perspectiva metabolômica, comparando com os grupos controle (dieta padrão) e à somente dieta hiperlipídica. Esta tese é uma parceria entre a Universidade Federal de Santa Catarina e a Universidad San Pablo – CEU (Madrid, Espanha), onde além da formação pessoal busca trazer ao Brasil a tecnologia metabolômica e suas potencialidades.

1 Revisão da literatura

1.1 Frutas vermelhas (*Berries*)

Pelo mundo diversas orientações dietéticas recomendam o consumo de frutas e vegetais como fonte de fibras, nutrientes essenciais e componentes fitoquímicos, que promovem melhora na saúde e reduzem o risco de doenças crônicas (Acosta-Montoya, *et al.* 2010; Andersen, 1985; Rao, 2010). Nas últimas décadas diversos produtos naturais foram estudados e relacionados com melhorias na saúde. No entanto, especial atenção tem sido dada àqueles alimentos que reduzem o estresse oxidativo e melhoram o perfil lipídico e suas implicações em situações de envelhecimento, degeneração neurológica e efeitos cardiovasculares, entre outros (Canada, 2012).

Os alimentos com maior valor agregado do ponto de vista fisiológico incluem aqueles derivados de plantas e extratos de plantas, dentre eles especial relevância têm se dado a classe pertencente à família *Rosaceae* do gênero *Rubus*, que formam um vasto grupo e bastante difundido. Essas plantas são cultivadas na América, Europa, África e Ásia, compreendendo entre 400 a 500 espécies (Lorenzi, 2006; Jepson, 2005). As frutas vermelhas são também conhecidas como “*berries*”, termo usado comumente para descrever qualquer fruta pequena, de sabor adocicado e formato arredondado incluindo morangos, mirtilos, framboesas, groselhas e amoras entre outras (Paredes-López, *et al.* 2010; Seeram, 2008; Jepson, 2005). Estes frutos são relacionados com o envelhecimento, a resistência à insulina e outras patologias que envolvem diferentes vias metabólicas (Seeram, 2008 ; Paredes-López, *et al.* 2010). A habilidade desses frutos como promotores da saúde está associada a diferentes classes e concentrações de compostos polifenólicos (Howard, *et al.* 2012).

Dentre os compostos polifenólicos presentes em *berries* destacam-se as antocianinas, monômeros fenólicos extra às antocianinas e polímeros fenólicos (Lee, *et al.* 2012). Os compostos polifenólicos auxiliam na melhora da saúde e reduzem os riscos de doenças crônicas como câncer, doenças coronárias, e relacionadas com stroke (derrames) e demência (Poulev, *et al.* 2003). As antocianinas, as quais são responsáveis pela pigmentação desses frutos são os mais estudados como anticâncer, anti-inflamatório, antioxidante e protetores no desenvolvimento da obesidade e síndrome metabólica (Paredes-López, *et al.* 2010), apesar de os

elagiotaninos (polímeros fenólicos) serem os componentes mais abundantes em berries (Maatta-Riihinen, *et al.* 2004; Mertz, *et al.* 2007).

A qualidade desses alimentos com bioatividade está intrinsecamente relacionada com o entendimento e controle da sua composição química para que assim, seus efeitos benéficos sejam estabelecidos. Por outro lado, a quantidade de compostos polifenólicos é afetada por fatores genéticos (gênero, espécie, cultivar/genótipo) e ambientais (maturidade do fruto, idade da planta, estação de crescimento, localização, exposição à luz, temperatura, estresse biótico e abiótico, entre outros) das plantas que originam os frutos. (Lee, Dossett *et al.* 2012)

Outro ponto importante se refere às formas de conservação e preparação desses frutos, pois as antocianinas, por exemplo, são compostos de baixa estabilidade degradando-se com facilidade (Castañeda-Ovando, *et al.* 2009).

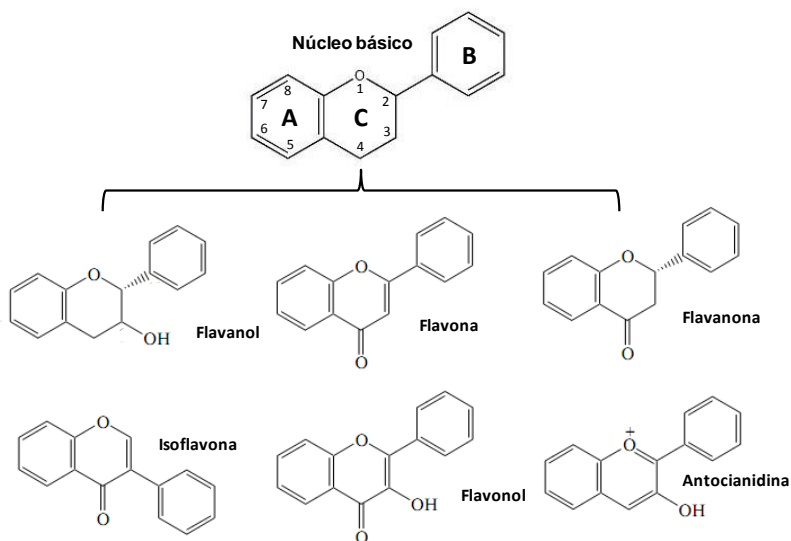
1.2 Compostos bioativos: Flavonóides

Os flavonóides são um grupo de compostos que estão presentes nas plantas como produtos secundários de seus metabolismos. Desempenham diversas funções biológicas desde crescimento, desenvolvimento e proteção contra intempérie da natureza, como pragas, doenças, entre outras (Gould 2006) Estes compostos são encontrados em maiores concentrações nas folhas, sementes, flores e nos frutos. (Kong, Chia *et al.* 2003)

Os flavonóides podem ser divididos (Figura 1) em subclasses de acordo com suas características químicas e propriedades que apresentam. Cada molécula contém dois ou mais anéis aromáticos, cada um com pelo menos um grupamento hidroxila aromático e conectado por uma ponte de carbonos. Esta ponte consiste de três carbonos (anel C: 2,3 e 4) e um átomo de oxigênio (anel C: 1) ligados a dois átomos de carbono do anel aromático (anel A) para formar um terceiro anel de 6 membros [anel C (Fig. 1)]. Os flavonóides são ainda divididos com base na ligação do anel B para o anel C, bem como os estados de oxidação e os grupos funcionais do anel C. A Tabela 1 apresenta as subclasses de flavonóides em ordem crescente de estado de oxidação juntamente com outros atributos importantes que identificam cada subclasse. Dentro de cada subclasse, flavonóides individuais e isoflavonas são identificados e

caracterizados por hidroxilação e conjugações com o anel B, ocorrendo o mesmo entre os anéis A e C (Beecher, 2003).

Figura 1. Núcleo básico e subclasses dos flavonóides.



Muitos flavonóides estão presentes na natureza na forma glicosilada (ligada a açúcares) e outros conjugados (ligados à outras estruturas). Isto contribui para a alta complexidade e grande número de moléculas já identificadas (Harborne, 2000; Beecher, 2003).

Tabela 1. Subclasses, características químicas e exemplos de flavonóides determinados em frutas vermelhas¹.

Subclasse de Flavonóides	Conexão do anel B – C (posição em C)	Insaturação no anel C	Posição do grupo funcional no anel C	Exemplos
<i>Flavanol</i>	2	Inexistente	3-Hidroxil	(+)-Catequina (+)-Galocatequina (-)-Epicatequina (-)-Epigalocatequina
			3 -O-galato	(-)-Epicatequina-3-galato (-)-Epigalocatequina-3-galato
<i>Flavonol</i>	2	Dupla ligação entre 2 – 3	3- Hidroxil, 4-Oxo	Kaempferol Miricetina Quercetina Rutina
<i>Antocianidina</i>	2	Dupla ligação entre 1 – 2 e 3 – 4	3-Hidroxil	Cianidina Delfinidina Malvidina Pelargonidina Petunidina Peonidina

¹ Ver na Figura 1 as posições de conexão, insaturação (ões) e grupos funcionais na estrutura do núcleo básico dos flavonóides. Adaptado de (Beecher, 2003).

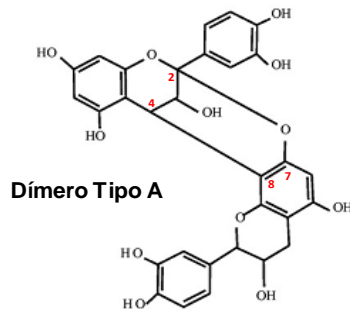
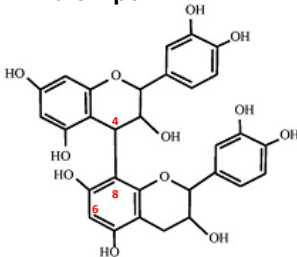
Nos alimentos, muitos flavonóides se encontram na forma polimerizada, produzidos pelas planta, ou como resultado de um processo industrial. Estes polímeros são chamados de taninos. De acordo com a estrutura química, os taninos são divididos em hidrolisáveis e condensados.

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos gálicos e elágicos glicosilados, onde os grupos hidroxila do açúcar estão esterificados com os ácidos fenólicos (gálico e/ou elágico), sendo os elagitaninos encontrados com maior frequência que os galotaninos. Abundantemente difundidos no reino vegetal, a classe de taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de flavan-3-ol e ou, flavan-3,4-diol [grupos hidroxila ligados ao núcleo da subclasse dos flavanol nas posições 3 e ou 4 (Figura 1)] (Monteiro, *et al.* 2005). As unidades flavânicas estão ligadas umas as outras carbono-carbono (C – C) ou por ligação éter (C –

O – C). São inúmeras as subclasses de taninos; no entanto, procianidinas (polímeros de epi e ou catequina), prodelfinidinas (polímeros de epi e/ou galocatequina) e propelargonidinas (polímeros de epi e/ou afselequina) ou suas misturas, são as três mais comuns presentes na alimentação humana proveniente de plantas. A vasta diversidade estrutural é resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, variações de posições entre suas ligações e a estereoquímica destes compostos (Monteiro, *et al.* 2005; Beecher, 2003; Harborne, 2000). Como pode ser observado nas proantocianidinas dímeras (Figura 2) e trímeras, que são sub-classificadas e denominadas de proantocianidinas B e proantocianidinas C, respectivamente. As variações das proantocianidinas B e C resultam da ligação interflavana, entre C4 → C6 ou C4 → C8 de outra unidade flavanol. Já as proantocianidinas do tipo A possuem uma ligação adicional tipo éter entre O7 → C2 (Yanagida, *et al.* 2003; Monagas, *et al.* 2010; Kimura, *et al.* 2011).

Figura 2. Estrutura química mais comum das unidades de procianidinas do Tipo A e Tipo B (Monagas, *et al.* 2010).

Dímero Tipo B



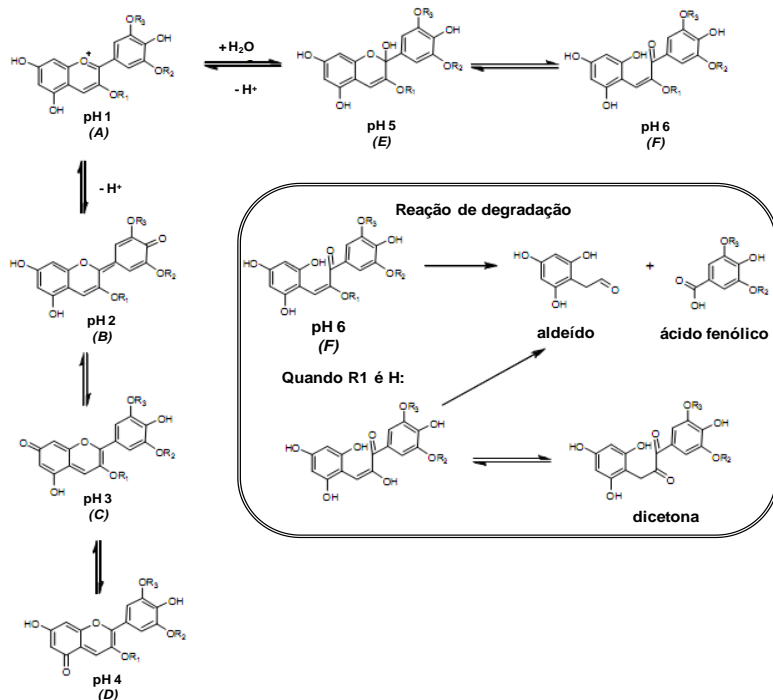
1.2.2 Antocianidinas e Antocianinas

As antocianinas (do grego *anthos* = flor e *kianos* = azul) são a classe de compostos polifenólicos responsável pela pigmentação de flores e frutos, e também das folhas de angiospermas. Estes pigmentos vão desde laranja brilhante, rosa, vermelho, violeta até azul. Devido a sua alta solubilidade em água são interessantes como corantes naturais. (Castañeda-Ovando, *et al.* 2009; Andersen, 2006). A coloração destas

moléculas se deve a estrutura de ressonância do cátion flavílium (2-fenilbenzopirílium). Quando dissolvidos em água, uma série de estruturas secundárias são formadas a partir do cátion flavílium devido a pH, hidratação e reações tautoméricas (Figura 3) (Andersen, 2006).

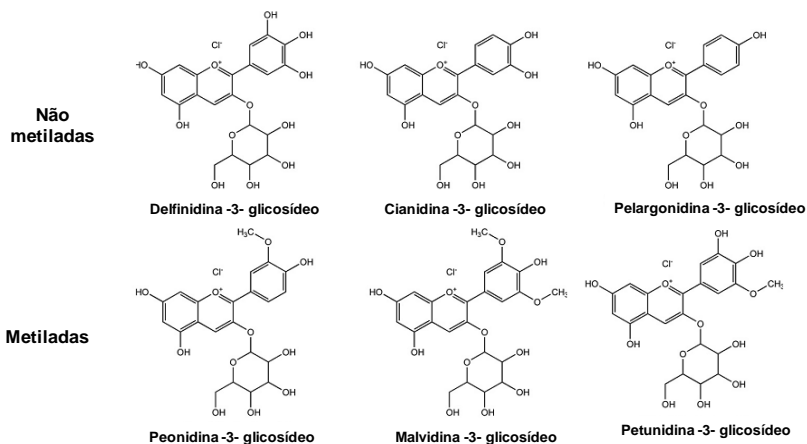
Em pH 1,0 o cátion flavílium é a espécie predominante e apresenta coloração vermelha (Fig. 3A). Com o aumento do pH ocorre uma rápida desprotonação. Em valores entre 2,0 e 4,0 são predominantes as estruturas de anidrobases quinoidais (Fig. 3B - D). A hidratação do cátion flavílium em pH entre 5,0 e 6,0 leva ao equilíbrio duas espécies incolores, pseudo-base carbinol (Fig. 3E) e chalcona (Fig. 3F), respectivamente. À temperatura ambiente, e em meio levemente acidificado, o equilíbrio entre as formas carbitol e chalcona é muito lento e leva horas para ser atingido. O aumento da temperatura desloca o equilíbrio na direção da formação da base chalcona (Heredia, *et al.* 1998). Em pH acima de 7,0 as antocianinas são degradadas dependendo dos grupos substituintes da molécula (Fig. 3, reação de degradação).

Figura 3. Estruturas químicas das antocianinas dependendo do pH e reação de degradação. Legenda: $R_1 = \text{H}$ ou açúcar, R_2 e $R_3 = \text{H}$ ou metila. Adaptado de (Castañeda-Ovando, *et al.* 2009).



As antocianidinas (aglicona) são a estrutura básica das antocianinas (glicosídeos). Esta última apresenta molécula de açúcar e, em muitos casos grupos acilados. As diferenças de estruturas estão principalmente associadas à quantidade de grupos hidroxilas ligados, à natureza, quantidade e tipo de açúcar, bem como à posição de ligação no íon flavílium (Castañeda-Ovando, *et al.* 2009). Do total de antocianinas identificadas até o ano de 2006, cerca de 90 % estão baseadas em apenas seis antocianidinas, pelargonidina (Pg), cianidina (Cy), peonidina (Pn), delphinidina (Dp), petunidina (Pt) e malvidina (Mv) (Figura 4).

Figura 4. Estrutura das seis antocianinas mais abundantes em frutas e vegetais.
Fonte: Adaptado de (Can, 2012).



Dentre as antocianinas destacam – se os derivados de cianidina, sendo cianidina 3 - glicosídeo muito mais frequente na natureza que as demais antocianinas não metiladas, delphinidinas e pelargonidinas (Clifford, 2000; Castañeda-Ovando, *et al.* 2009; Dey, 1993; Kong, *et al.* 2003).

A diversidade de tipos de antocianinas está associada com a natureza, número e posições de ligações, tornando as antocianinas aciladas o grupo mais variado estruturalmente. Os grupos acilas aromáticos incluem os ácidos hidroxicinâmicos (*p*-cumárico, cafeico, ferrúlico, sinápico e ácidos 3,5-dihidroxicinâmico). Entre os grupos acilas alifáticos o mais frequente é o ácido malônico e não menos importante outros, como ácidos acético, málico, oxálico, succínico e tartárico (Andersen, 2006).

Em trabalho de revisão realizado por Lee, *et al* (2012) a identificação em espécies de frutos do tipo *Rubus* apontam para concentrações majoritárias de derivados de cianidina e formas não aciladas. Especificamente em amora preta “*blackberry*” são reportados cianidina-3 malonilglicosídeo e cianidina-3-dioxialilglicosídeo como mais frequentes antocianinas aciladas (Lee, *et al.* 2012).

1.3 Métodos de extração

1.3.1 Métodos de extração e purificação de flavonóides

Os procedimentos de extração e purificação de compostos bioativos de fontes naturais têm valorosa importância para utilização desses fitoquímicos na elaboração de dietas, suplementos alimentares, para indústria farmacêutica e cosmetológica. A importância dos métodos de extração está associada ao fato que diferentes metodologias introduzem diferentes combinações de antocianinas e outros compostos fenólicos no extrato resultante, que podem conferir diferentes bioatividades (Dai, *et al.* 2009).

Recentemente Cerón e colaboradores (2012) aplicaram a extração de antocianinas de amora (*Rubus glaucus*) utilizando fluido supercrítico (SCF) com CO₂ como solvente extrator e co-solvente etanol. Foram constatados bons rendimentos na extração com 85,4 ± 0,1 mg de antocianina por kg de amora peso fresco em 65 minutos de extração. As condições otimizadas foram de 140 bar e 305 K de pressão e temperatura, respectivamente. Os autores afirmam a necessidade da utilização de co-solvente, devida a baixa solubilidade de cianidina – 3 – glicosídeo em CO₂, e a posterior evaporação do etanol (Cerón, *et al.* 2012).

A extração com solventes orgânicos tem sido a forma de isolamento mais aplicada para flavonóides oriundos de frutos. Os compostos fenólicos podem ser extraídos por moagem, secagem ou liofilização dos frutos, ou somente pela imersão destes com subsequente extração com solventes (Merken, 2000). Técnicas como extração em fase sólida (SPE), normalmente em cartuchos de C18 ou Sephadex – L20 (Donner, *et al.* 1997; Jordheim, *et al.* 2011) e Amberlite XAD7 (Denev, *et al.* 2010), também são utilizadas.

Os solventes aplicados variam desde água, metanol, etanol, acetona, acetato de etila e suas misturas com água e muitas vezes soluções acidificadas são preferíveis, devido, por exemplo, à polaridade das antocianinas (Kim, 2010; Can, 2012).

Estas misturas de solventes implicam em co-extrações de substâncias não fenólicas como açúcares, ácidos orgânicos e proteínas, requerendo muitas vezes procedimentos de purificação como extrações com solventes, SPE, rota-evaorações (Castañeda-Ovando, *et al.* 2009).

Alguns fatores como tamanho das partículas sólidas, temperatura de extração, pressão, tipos de solventes e tempo de extração influenciam fortemente no processo e na qualidade do produto final.

O aumento da temperatura é diretamente proporcional à quantidade de antocianina e compostos fenólicos extraídos das frutas vermelhas, no entanto, há o limite de degradação destes compostos que deve ser otimizado. Cacace e colaborador (2003), estudaram o processo de transferência de massa na otimização da extração de compostos fenólicos e antocianinas em groselha preta. Utilizaram planejamento de experimentos e avaliaram dois sistemas de solvente, etanol (%) em água e água sulfurada (mg L^{-1} de SO_2) sob agitação mecânica. Resultou que as condições de extração que não favorecem a degradação de antocianinas foram entre 50 – 160 minutos para etanol (20 – 80 %) e 40 – 100 minutos para água sulfurada (1300 – 200 mg L^{-1}) (Cacace, 2003).

A utilização de ultrassom como ferramenta de extração mostra sua potencialidade como procedimento não térmico e sua atividade biocida (Tiwari, *et al.* 2010). A aplicação de extração assistida por ultrassom pode aumentar a quantidade extraída de antocianinas entre 6% e 35% (Vilkhun, 2008). No entanto, a aplicação por longos períodos em alta potência desencadeia processo de degradação (Tiwari, *et al.* 2010).

1.3.2 Extração para determinação analítica

A extração utilizando solventes é a técnica mais utilizada para determinação analítica de flavonóides. Metanol e etanol são os solventes mais empregados, entre tanto, metanol foi 20 % mais efetivo que etanol e 73 % mais efetivo que água para extração de antocianinas em uvas. Vale ressaltar que muitas vezes etanol se mostra preferível frente à toxicidade do metanol (Castañeda-Ovando, *et al.* 2009). A utilização de solventes acidificados auxiliam na conservação das antocianinas, mas altas concentrações provocam hidrólise das aciladas e ou degradações (Kapasakalidis, *et al.* 2006).

A extração em mirtilo utilizando metanol acidificado resultou em maiores quantidades de antocianinas totais, cerca de 2 vezes mais que usando solução aquosa com acetona. (Lee, *et al.* 2004). A utilização de acetona como solvente para extração de antocianinas em sorgo (*Black sorghum*) não é aconselhável, pois foi comprovada a formação de pira-

noantocianinas a partir de antocianinas por adição oxidativa mediada pela presença de acetona (Awika, *et al.* 2005). Usando metanol acidificado com 0,1 % HCl foi possível extrair antocianinas; no entanto, nestas condições não se pode afirmar se são oriundas da amostra ou produto de hidrólise durante o processo de extração. (Castañeda-Ovando, *et al.* 2009). Vatai, T. e colaboradores (2009) em estudo de degradação, observaram que após 2 meses de estocagem a $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ de extratos acidificados foi detectada a formação de pigmentos poliméricos (Vatai, *et al.* 2009).

1.4 Métodos de análise e quantificação

Os procedimentos de preparo de amostras e caracterização de extratos de plantas são variados. Especificamente em berries, é amplamente utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para separação e quantificação de compostos polifenólicos, e muitas vezes associada a procedimentos prévios para concentração ou purificação como resinas Amberlite ou SPE (Cuevas-Rodríguez, *et al.* 2010). Para caracterização de antocianinas são utilizados detectores de arranjo de diodos (DAD); no entanto, as variações com detectores de massas (MS) são as mais promissoras, como com ionização por *electrospray* (ESI), ionização química a pressão atmosférica (APCI), dessorção de matriz assistida por laser/ionização por tempo de voo (MALDI-ToF-MS) (Wang, *et al.* 2000) No entanto, espectrômetro de massas combinados em série *tandem* (MS/MS) tem sido extensivamente usado para identificação e caracterização de antocianinas, por proporcionar maiores informações estruturais. O mesmo acontece com a utilização de ressonância magnética nuclear (NMR) (Tian, *et al.* 2005; Castañeda-Ovando, *et al.* 2009). Na Tabela 2, estão resumidas as condições aplicadas para extração em frutas vermelhas para determinação usando HPLC.

Tabela 2. Metodologias de extração e determinação de flavonóides em frutas vermelhas para análise em HPLC.

<i>Pré-preparo</i>	<i>Amostra</i>	<i>Procedimento de extração</i>	<i>Técnica</i>	<i>Referência</i>
Pulverizada em meio de nitrogênio (N ₂) líquido	Amora (<i>Rubus laciniatus Willd</i>)	<i>Etapa 1:</i> Acetona (1:1) (m/v); <i>Etapa 2:</i> o sedimentado com acetona em água (70:30, v/v); <i>Etapa 3:</i> Sobrenadante combinado (1:2, v/v) com clorofórmio; <i>Etapa 4:</i> Evaporação da acetona, sob vácuo a 35 °C, aferir a um volume conhecido com água.	HPLC – UV e HPLC -MS/MS	(Stintzing, <i>et al.</i> 2002)
Pulverizada em meio de nitrogênio (N ₂) líquido	Amora - preta	<i>Etapa 1:</i> Adição de 100 mL de acetona em 50 g de amostra deixados por 3 minutos e filtrado; <i>Etapa 2:</i> Segunda extração com acetona em água (70:30, v/v) ; <i>Etapa 3:</i> Sobrenadante combinado e misturado com acetona: clorofórmio (1:2, v/v), estocado uma noite a 1°C; <i>Etapa 4:</i> A fração aquosa foi rota-evaporada retirando a acetona, sob vácuo a 42 °C, aferir a 200 mL com água.	HPLC – UV e HPLC-ESI-MS	(Fan-Chiang, 2005),
Trituradas e congeladas – 20 °C e liofilizadas	Framboesa e mirtilo	<i>Etapa 1:</i> Adição de 10 mL de metanol 90 % contendo 0,5 % de ácido fórmico em 100 mg de amostra sonificado por 10 min. e centrifugado; Feito 3x o procedimento. <i>Etapa 2:</i> Rota-evaporação, (< 40 °C), <i>Etapa 3:</i> Purifica em cartucho C18 <i>Etapa 4:</i> Eluição 5 mL de metanol acidificado (0,1 % ácido fórmico) <i>Etapa 5:</i> Secas com N ₂ , resuspensas 1 mL água acidificada(0,1 % ácido fórmico) e filtradas .	HPLC-ESI-MS/MS	(Tian, <i>et al.</i> 2005)

Estocadas a – 80 °C, Liofilizadas e guardadas a – 20 °C	Amora – preta (<i>Rubus spp.</i>)	<p><i>Etapa 1:</i> Amostra diluída 1:5 (m/v) com metanol 80 % acidificado [0,3 % ácido trifluoroacético (TFA)] e filtrada em algodão por 3 vezes;</p> <p><i>Etapa 2:</i> A fração hidroalcolólica rota-evaporado o metanol, < 40 °C;</p> <p><i>Etapa 3:</i> O evaporado particionado com acetato de etila (4 x 120 mL);</p> <p><i>Etapa 4:</i> Fração aquosa submetida à coluna de resina Amberlite – XAD-7 e eluído os polifenólicos com 1 L de metanol (0,3 % TFA).</p> <p><i>Etapa 5:</i> Evaporar resíduo e congelar</p>	HPLC – DAD e HPLC-ESI-MS	(Cuevas-Rodríguez, <i>et al.</i> 2010)
Triturada congelada	Mirtilo	<p><i>Extração:</i> 5 g amostra + 95 mL de MeOH 100 %, ultrassom por 10 min.</p> <p><i>Hidrólise:</i> 25 mL do extrato + 8,5 mL (HCl, 35 %) por 2 horas; Filtração em 0,22 µm, seguido de injeção</p>	HPLC - PDA	(Burdulis, 2008)
Amostra fresca triturada	Cereja e amora	Amostra triturada 1:1 (m/v) com água, centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro de 0,2 µm PVDF.	HPLC - DAD	(Can, 2012)

Os métodos reportados na literatura sugerem a utilização de múltiplas etapas de extração ou sofisticada instrumentação analítica, como HPLC – MS/MS para determinação de antocianinas. Todavia, estas elaboradas etapas acrescem erros nas determinações, perdas de amostra e consumo excessivo de solventes e materiais. A injeção direta de amostras e determinação rápida, livre de pré-extração e alta recuperação sugerem um método ideal para determinação de compostos de relativa instabilidade, caso das antocianinas (Can, 2012).

Para determinação de flavanóis como catequina e epicatequina em frutas vermelhas são reportadas utilização da técnica de HPLC com detectores de UV (Häkkinen, *et al.* 1999) e fluorescência induzida por laser (LIF) (Tsanova-Savova, *et al.* 2005).

A eletroforese capilar (CE) tem sido amplamente aplicada para determinação de compostos fenólicos em variadas matrizes, como em vinhos, tubérculos, café, chás, sucos, bebidas, plantas medicinais, óleos vegetais, cereais, frutas entre outros (Ignat, *et al.* 2011; Hurtado-Fernandez, *et al.* 2010). Especificamente em frutas vermelhas a Tabela 3 resume os procedimentos de extração, sistemas de tampão utilizados na separação e os compostos detectados por CE com detecção por UV.

Tabela 3. Procedimentos de extração e determinação de compostos fenólicos em frutas vermelhas utilizando CE.

<i>Amostra</i>	<i>Processo de extração</i>	<i>Sistema tampão / pH separação</i>	<i>Compostos detectados</i>	<i>Referência</i>
Abiu- roxo, amora	<p><u>Fenólicos livres:</u> Fruta triturada em metanol, seguida de acidificação (HCl, pH = 2), saturação com NaCl;</p> <p>Extração por 3x com éter etílico; Evaporação e resuspensão com 1 mL de etanol:água (1:1); Filtração (0,45 µm); Injeção.</p> <p><u>Hidrólise:</u> Resíduo aquoso do anterior, 4h, (4 mol L⁻¹ NaOH, 10 mmol L⁻¹ EDTA, 1% ácido ascórbico), neutralização (pH = 2, HCl); Extração com éter como fenólicos livres</p>	50 mmol L ⁻¹ Tetraborato de sódio + 7,5 % MeOH (v/v) / 9,2	<p>Ácidos:</p> <p>chlorogênico, ferílico, p-cumárico, cafeico, gálico e protocatechuico</p>	(Fukuji, <i>et al.</i> 2010)
Morango, Fruto do sabugueiro (Elderberry)	<p><u>Morango:</u> Suco extraído com MeOH (3 % ácido fórmico); Extrato eluído em cartucho Sep – Pak C18 com MeOH (3 % ácido fórmico); Rotaevaporado a 40 °C até obtenção de pó.</p> <p><u>Fruto do sabugueiro:</u> Macerado por dias com MeOH (1 % HCl); Rotaevaporado e diluído com pequeno volume de solução aquosa (3 % ácido fórmico);</p> <p>Segue procedimento de extração em cartucho C18</p>	150 mmol L ⁻¹ borato de sódio / 8,0	<p>Cianidina 3-glicosídeo, Cianidina 3-sambubiosídeo-5-glucosídeo, Cianidina 3,5-diglicosídeo, Cianidina 3-sambubiosídeo, Pelargonidina 3- glicosídeo, Pelargonidina 3- rutinosídeo, Pelargonidina 3-succinilglicosídeo</p>	(Bridle, 1997)

Groselha preta	1 g de pó comercial obtido por spray-drying + 25 mL água particionado com CHCl ₃ , Et ₂ O, EtOAc e MeOH; Após 1 noite a 4 °C filtrado (retirar maltodextrina); O filtrado limpo foi seco e redissolvido em 3 mL de água; Diluído 1:10 (v/v) em água e analisado.	25 mmol L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ e 25 mmol L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ + 30 % ACN (v/v) / 1,5	Cianidina 3-glicosídeo, Cianidina 3-rutinosídeo, Delfinidina 3-glicosídeo	(da Costa, <i>et al.</i> 1998)
Oxicoco (cranberry)	5 g + 20 mL EtOH 95%: HCl 1,5 M [85:15(v/v)] por 3x; 3 mL extrato + 15 mL HCl 1% em MeOH purificação em cartucho, seguido de eluição com 2 mL HCl 1% em MeOH; Secagem e resuspensão com 2 mL MeOH:água (1:1)	150 mmol L ⁻¹ H ₃ PO ₄ , 3 M ureia e 50 mmol L ⁻¹ β - ciclodextrina / 2,11	Cianidina, Peonidina	(Watson, 2004)
Mirtilo, oxicoco, morango, groselhas preta e vermelha	<u>Ultrassom</u> : extração com metanol 70 % (1 % HCl + 20 mg ácido ascórbico) por 3x. SPE: 5 mL do extrato acima foi pré-concentrado em cartuchos de C18; Eluição com MeOH. Os primeiros 500 µL usados para análise	35 mmol L ⁻¹ tetraborato de sódio / 9,3	<i>Trans</i> - resveratrol quercetina, (+)-catequina, e ácidos: cinâmico, chlorogênico, ferrúlico, <i>p</i> -cumárico e cafeico	(Ehala, <i>et al.</i> 2005)
Sea buckhorn	<u>SLE</u> : 10 g berries congeladas foram trituradas com 20 mL de mistura MeOH:água (70:30) por 1 hora e estocada em congelador por uma noite; Filtrado e armazenado à 4°C antes da análise.	20 mmol L ⁻¹ tetraborato de sódio / 9,3	Ácido ascórbico, catequina, miricetina, quercetina e <i>trans</i> -resveratrol	(Gorbatsova, <i>et al.</i> 2007)

Adaptado de (Hurtado-Fernandez, *et al.* 2010).

As condições de extração aplicadas para isolamento e análise de flavonóides e compostos fenólicos em berries utilizando eletroforese capilar normalmente baseiam-se em procedimentos laboriosos, partindo desde homogeneização da amostra, filtração/centrifugação, evaporação entre outros, até extração sólido líquido (SLE) e extração em fase sólida (SPE) ou em associação. Ainda, a utilização de extração assistida por micro-ondas (MAE) e ultrassom é aplicada com êxito no processo de extração. (Hurtado-Fernandez, *et al.* 2010) Apesar da versatilidade de modos de separação em CE, observa-se a ampla aplicação do modo de separação de eletroforese capilar em zona (CZE) com variações na composição e pH do eletrólito.

1.5 Metabolômica

1.5.1 O estado da arte

Os avanços pós-genômicos datados de 2001 tratam de traduzir, entender e melhorar o conhecimento da genética em benefício da saúde humana (Oresic, 2009). Os estudos genômicos motivaram o aperfeiçoamento e desenvolvimento de técnicas automatizadas e rápidas no âmbito da química, biologia e da bioinformática.

Os desenvolvimentos nestas áreas abriram um leque de possibilidades em estudar os processos biológicos, nomeadas de tecnologias “ÔMICAS” (genômica, transcriptômica, proteômica e metabonômica) (Schmidt, 2004). As ciências ômicas representam um estudo rigoroso de várias moléculas, processos biológicos, ou funções fisiológicas (Faber, *et al.* 2007).

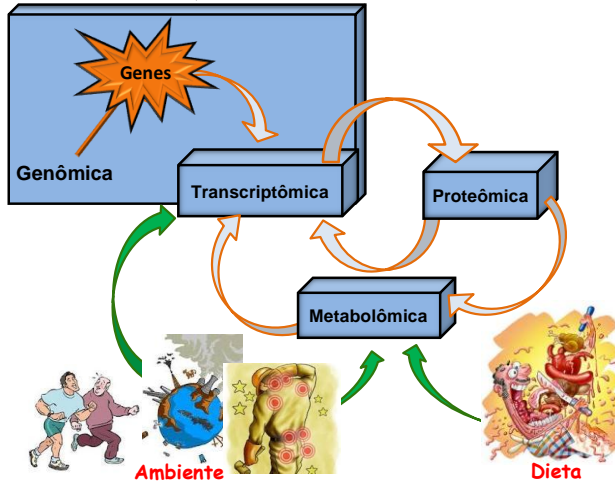
Nestes termos a genômica e a transcriptômica examinam o complemento genético e a expressão genética, respectivamente. Já a proteômica, envolve a análise da síntese de proteínas e sinalizadores celulares, a metabolômica é análise

completa e quantitativa de todos os metabólitos em um sistema biológico (Fiehn, 2002).

As alterações na expressão genética, e ou, nas proteínas estão sujeitos a serem controladas por mecanismos complexos, e o resultado final destas alterações são ocasionadas nos níveis dos metabólitos. Estes metabólitos com massa molar < 1500 Daltons por sua vez, intervêm nos processos celulares e revelam assim, como está funcionando o metabolismo de um órgão específico ou de um ser vivo (van Ravenzwaay, *et al.* 2007). A presença ou ausência, bem como a concentração relativa entre metabólitos como, por exemplo: açúcares, lipídeos, aminoácidos, entre outros podem ser indicadores de estados de uma doença ou predisposições a ela.

Ao mesmo tempo em que a metabolômica estuda um complexo meio, onde a interação entre genes e meio externo (genômica, transcriptômica e proteômica) altera sua natureza (Figura 5), seu enfoque possibilita o entendimento dos processos sem hipóteses prévias, fato de os metabólitos serem o produto final dos processos bioquímicos nos seres vivos.

Figura 5. Relação entre as ômicas e fatores externos. Adaptada de (Nicholson, *et al.* 2007).



A metabolômica, assim, se dedica ao estudo das pequenas moléculas envolvidas em processos bioquímicos proporcionando grande quantidade de informações sobre o estado e funcionamento do sistema vivo em questão, tanto pelos efeitos causados pelas alterações da expressão gênica como pelas alterações ambientais (poluição, estresse, atividade física) e de alimentação (dieta) (Ordovas, 2009). Encontra-se sua aplicação nas áreas de doenças humanas, descoberta de fármacos, análises de plantas, nutrição humana entre outros (Cevallos-Cevallos, *et al.* 2009).

1.5.2 Origem da metabolômica

A ideia de que fluidos biológicos refletem a saúde de um indivíduo já existe há muito tempo. Antigos médicos chineses utilizavam formigas para a avaliação da urina de pacientes para detectar se a urina continha doses elevadas de glicose e, conseqüentemente, detectar a diabetes (Nicholson, 2008).

O conceito de que os indivíduos podem ter um "perfil metabólico", que poderia ser refletido na composição de seus fluidos biológicos foi introduzido por Roger Williams no final dos anos 1940, onde usaram cromatografia em papel para sugerir que os padrões metabólicos característicos na urina e saliva estavam associados a doenças tais como a esquizofrenia (Tyagi, *et al.* 2010).

No entanto, foi somente através de avanços tecnológicos nas décadas de 1960 e 1970 que se tornou possível quantitativamente (que até então era qualitativa) a medida de perfis metabólicos (Preti, 2005). O termo abrangente de "perfil metabólico" foi introduzido por Horning em 1971 depois de terem demonstrado que GC-MS poderia ser utilizado para medir os compostos presentes na urina humana e em extratos de tecido.

Os grupos de Horning juntamente com o de Pauling e Arthur Robinson lideraram o desenvolvimento de métodos de GC-MS para monitorar os metabólitos presentes na urina ao longo dos anos 1970. Simultaneamente, a espectroscopia de NMR, a qual foi descoberta em 1940, também estava proporcionando rápidos avanços em tecnologia e na década de 1980 foi suficientemente sensível para identificar metabólitos em amostras biológicas sem alterá-las.

A metabolômica baseada em NMR foi desenvolvida primeiramente no laboratório de Jeremy Nicholson no Birkbeck College, Universidade de Londres, e mais tarde no Imperial College em Londres. Em 1984, Nicholson mostrou que a espectroscopia de ^1H NMR poderia potencialmente ser usada para diagnóstico da diabetes mellitus, e mais tarde foi pioneiro na aplicação de métodos de reconhecimento por padrões para dados de espectroscopia de NMR. Em 23 de janeiro de 2007, o Human Metabolome Project (HMP), liderado pelo Dr. David Wishart, da Universidade de Alberta, no Canadá, concluiu o primeiro esboço do que seria o metaboloma humano, consistindo de um banco de dados de, aproximadamente 2500 meta-

bólitos, 1200 drogas e 3500 componentes alimentares (Wishart, *et al.* 2007).

1.5.3 Conceitos

1.5.3.1 Metaboloma

Refere-se ao conjunto completo de pequenas moléculas, metabólitos (tal como intermediários metabólicos, hormônios e outras moléculas de sinalização e metabólitos secundários) encontrados dentro de uma amostra biológica, assim como, de um único organismo (Griffin, 2008; Pearson, 2007). O termo foi cunhado em analogia com transcriptômica e a proteômica. Como o transcriptoma e o proteoma, o metaboloma é dinâmico, mudando de segundo a segundo. Embora o metaboloma possa ser definido prontamente o suficiente, de momento não é possível analisar toda a gama de metabólitos por um único método analítico.

1.5.3.2 Metabolômica

Metabo“n”ômica foi definida por Jeremy Nicholson em 1999 como, “a medida quantitativa da resposta dinâmica e multiparamétrica da resposta de um ser vivo a estímulo fisiopatológicos ou a uma modificação genética” (Nicholson, *et al.* 2007). No entanto, o termo metabo“l”ômica foi introduzido por Oliver Fiehn em 2001 e definido como a “análise completa e quantitativa de todos os metabólitos” em um sistema biológico (Fiehn, 2002).

Ainda que apresentem algumas diferenças conceituais, os termos metabonômica e metabolômica são usados indistintamente no meio científico. A metabolômica é o termo mais utilizado, onde está voltada ao estudo dos metabólitos presentes em uma amostra biológica, assim como sua dinâmica,

composição, interação e resposta a alguma intervenção ou alteração ao seu redor, em células, fluidos e tecidos biológicos (Oresic, 2009).

1.5.3.3 Metabólito

Os metabólitos são os intermediários e os produtos do metabolismo. Dentro do contexto da metabolômica, um metabólito é geralmente definido como qualquer molécula de menos de 1 kDa de massa molar (Bentley, 1999). No entanto, existem exceções dependendo da amostra e do método de detecção. Por exemplo, macromoléculas, tais como lipoproteínas e albumina são detectadas baseando-se em estudos metabolômicos com NMR em plasma sanguíneo (Nordstrom, *et al.* 2006).

Dependendo da amostra abordada em metabolômica os metabólitos são diferenciados como:

Plantas: É comum referir-se a metabólitos "primários" e "secundários". Um metabólito primário está diretamente envolvido no crescimento, desenvolvimento normal, e reprodução. Um metabólito secundário não é diretamente envolvido em tais processos, mas geralmente tem importante função ecológica, como por exemplo, antibióticos e pigmentos (Crockford, *et al.* 2008).

Humanos: É mais comum para descrever metabólitos como estando endógenos (produzidos pelo organismo hospedeiro), ou exógenos (Nicholson 2006). Metabólitos de substâncias estranhas, tais como drogas são denominadas xenometabólitos (Nicholson, *et al.* 1999).

1.5.4 Tecnologias analíticas

Devido à grande variedade de características químicas que os metabólitos apresentam como massa molar, solubilidade e polaridade, uma única técnica analítica ainda não é sufi-

ciente para medida de todos os metabólitos simultaneamente. Frente a esta situação, atualmente grandes avanços vem sendo alcançados no que se refere às plataformas analíticas aplicadas em metabolômica (Putri, *et al.* 2013), conforme descrito nos itens abaixo.

1.5.4.1 Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

NMR é a ferramenta analítica mais usada desde a última década em metabolômica. A maior vantagem do uso de NMR está associada ao fato de ser uma técnica não invasiva e independe da prévia separação dos analitos, além de as amostras poderem ser recuperadas para futuras análises em outras técnicas de separação como cromatografia gasosa e cromatografia líquida acopladas a espectrômetro de massas (GC-MS e LC-MS). A preparação da amostra para análise por NMR é relativamente simples e fácil, conferindo especial utilidade para a caracterização de metabólitos de maneira a não alterar os fluidos biológicos (por exemplo, meio de cultura contendo organismos) (Nakanishi, *et al.* 2011) e em amostras de semi-sólidos ou sólidos (por exemplo, células intactas ou tecidos) (Andronesi, *et al.* 2008). A principal desvantagem de NMR é a sua baixa sensibilidade.

1.5.4.2 GC-MS

As vantagens da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é a alta capacidade de picos, excelente repetibilidade de tempos de retenção (t_R), e disponibilidade de bibliotecas de espectros de massas disponíveis como da *National Institute of Standards and Technology* (NIST) (Tsugawa, *et al.* 2011), que permitem identificação de compostos sem o uso de padrões.

Um dos mais recentes avanços no sistema de GC é o desenvolvimento de sistema de cromatografia bidimensional com espectrometria de massas (GCxGC-MS). Este sistema proporciona um significativo aumento na capacidade de produção, bem como em resolução e sensibilidade, comparado com GC-MS (Lee, *et al.* 2001).

A desvantagem de GC-MS é a necessidade de derivatização de analitos quando os alvos são compostos não-voláteis, como é o caso de metabólitos hidrofílicos de baixa massa molar (açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, etc).

1.5.4.3 LC-MS

A análise de uma grande variedade de metabólitos, variando de alta à baixa massa molar e de hidrofílicos à hidrofóbicos, pode ser realizada por seleção adequada da coluna e fase móvel em LC-MS. A ionização por electrospray (ESI), em geral é o método de ionização em LC-MS, podendo ionizar a maioria dos compostos orgânicos de origem biológica (Whitehouse, *et al.* 1985).

No passado, LC-MS foi considerada insatisfatória para a análise de metabólitos hidrofílicos. No entanto, nos últimos anos, a análise simultânea destes metabólitos (aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos nucleicos, etc) tem sido conseguida usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tendo grupos (pentafluorophenyl)propyl ligados à sílica como fase estacionária sem qualquer derivação dos analitos (Yoshida, Mizukoshi *et al.* 2007). Além disso, açúcares, álcoois de açúcar e açúcares fosfatados foram analisados com sucesso usando separação em colunas que possuem na fase estacionária compostos zwitteriônicos covalentemente ligados à sílica porosa em associação à cromatografia de interação hidrofílica (ZIC-HILIC) (Antonio, *et al.* 2008).

O lançamento da cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC) pela Waters Corporation, (EUA), em 2004,

desempenhou um grande avanço para técnica de LC aplicada à estudos metabólicos baseados em MS (Plumb, *et al.* 2004). Foram alcançadas melhorias em colunas mais resistentes a altas pressões e bombas com pressão máxima de 100 MPa. Tendo como resultados análises mais rápidas, melhoria na sensibilidade e aumento na capacidade de obtenção de picos.

Apesar destas melhorias significativas nas técnicas de LC, a capacidade de obtenção de pico e a estabilidade ainda não são suficientes para a análise simultânea de metabólitos hidrofílicos. Existindo espaço para melhorias nesta área de pesquisa.

1.5.4.4 CE-MS

A eletroforese capilar com espectrometria de massa (CE-MS) foi aplicada para metabolômica pelo grupo de Tomita e Soga em 2000. Desenvolveram um método para a detecção de aminoácidos sem derivatização, bem como um sistema para análise de metabólitos intermediários do sistema glicolítico, via das pentoses-fosfato, ciclo do ácido cítrico, etc. Ácidos carboxílicos e os fosforilados, sacarídeos fosforilados, nucleotídios, nicotinamida, e coenzimas flavin-adenina da glicólise e vias do ciclo do ácido tricarboxílico também foram analisados com êxito (Soga, 2000).

A técnica de CE-MS é superior em comparação com HPLC-MS em termos de capacidade de separação (Izumi, *et al.* 2009).

No entanto, a baixa repetibilidade representa a maior desvantagem de CE-MS, o que é principalmente causada pela variação no tempo de migração (t_M), já que é facilmente influenciado pelas mudanças de temperatura, variações do fluxo eletrosmótico (EOF) bem como as dificuldades inerentes ao interfaciamento da saída do CE com a entrada no MS.

1.5.4.5 SFC-MS

Apesar de metabólitos hidrofílicos serem alvos comuns de análise em metabolômica, os lipídeos aparecem como um alvo atraente dado por recentes pesquisas que revelaram que lipídeos atuam como moléculas de sinalização em vários fenômenos biológicos (Serhan, 2005). A cromatografia em fluido supercrítico (SFC), que tem características de ambos GC e HPLC, é uma técnica de separação de alto rendimento e alta resolução usando fluido supercrítico como fase móvel. Quando acoplado com espectrometria de massa (SFC-MS) pode ser utilizado para a análise de metabólitos termicamente instáveis e elevado ponto de ebulição, os quais são difíceis de analisar por GC-MS.

SFC-MS foi aplicado para a análise de vários tipos de lipídeos, incluindo fosfolipídeos, glicolipídeos, lipídeos neutros e esfingolipídeos. Recentemente, Matsubara e colaboradores (2009) estabeleceram um método não dirigido de alta velocidade e de alta resolução para uma mistura de carotenóides usando SFC-MS (Matsubara, *et al.* 2009). Uma desvantagem é o alto consumo de fase móvel por análise repercutindo em altos custos.

1.5.4.6 MALDI-MS

A ionização/dessorção de matriz assistida por laser (MALDI) acoplada a detector de massas (MALDI-MS) oferece baixa seletividade porque, ao contrário de LC-MS, o analito não é separado por cromatografia. Embora o tempo-de-voe (ToF-MS) tem sido usado em MALDI-MS, esta combinação não é suficiente para melhorar significativamente a seletividade de MALDI-MS (Becher, *et al.* 2008).

O pobre desempenho quantitativo, baixa repetibilidade e interferência de ionização pela matriz são pontos importantes a serem resolvidos para adequada aplicação de MALDI-

MS. Esta técnica foi primeiramente utilizada para a identificação de elevado peso moléculas com alta massa molar, tais como proteínas (Vaidyanathan, *et al.* 2006).

1.5.5 Estratégias de análise metabolômica

Dentro das análises metabolômicas, distintas estratégias podem ser adotadas como ferramenta de diagnóstico para caracterizar as respostas metabólicas (Cevallos-Cevallos, *et al.* 2009; Jankevics, *et al.* 2009):

1.5.5.1 Análise dirigida (Metabolite targeted analysis)

Análise de um ou vários metabólitos individuais, tipicamente centrados em uma ou mais rotas metabólicas de interesse. Um enfoque metabolômico dirigido normalmente é impulsionado por uma questão bioquímica específica ou hipótese que motiva a investigação de uma via particular. Aplicada para estudar o efeito principal de qualquer alteração diretamente, como por exemplo, uma mutação genética. Normalmente requer alto nível de purificação e extração seletiva dos metabólitos.

1.5.5.2 Análise não dirigida (Metabolic Fingerprinting)

Compreende obter uma comparação global de um grande número de metabólitos ou classe destes (lipídeos, aminoácidos, etc.) pela análise multivariada dos perfis ou espectros gerados para cada indivíduo. Cada um desses perfis é considerado como uma impressão digital da amostra, permitindo estabelecer relações de semelhança ou não entre os indivíduos (amostras) que se está avaliando.

1.5.6 Fluxo de trabalho não dirigido em metabolômica

1.5.6.1 Desenho de experimento em metabolômica

A primeira etapa para realização de um experimento metabolômico consiste em determinar o número de metabólitos que serão medidos. Em alguns casos há o interesse por examinar uma classe definida, chamada assim de uma abordagem de análise dirigida. Em outros casos, a abordagem não dirigida, ou melhor, a busca da maior quantidade de metabólitos como possíveis para serem medidos é preferível (Gary J. Patti, 2012). Esta última abordagem é em geral preferível como um experimento de varredura e busca de qual(is) classe(s) de metabólitos podem ser avaliados posteriormente em uma análise dirigida.

Na abordagem não dirigida a pergunta a ser respondida é: Quais são os metabólitos que discriminam amostras de um grupo problema de outro grupo controle?

Uma abordagem não dirigida em metabolômica pode ser efetuada através da aplicação das técnicas de NMR e espectrometria de massas. No entanto, quando MS está acoplada a técnicas de separação como GC, HPLC ou CE, se alcança a detecção do maior número de metabólitos. Por exemplo, na aplicação de LC-MS (Figura 14) milhares de sinais em um cromatograma são rotineiramente detectados a partir de amostras biológicas (Wikoff, *et al.* 2009; Oscar Yanes, 2010).

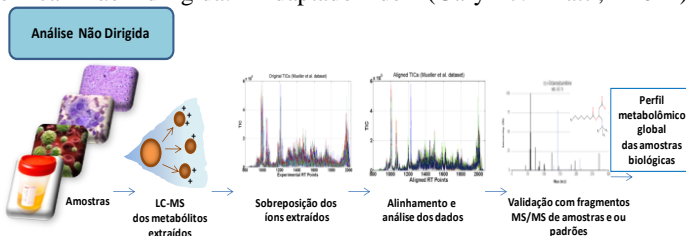
Cada um destes sinais em um cromatograma é referido como um “*molecular feature*” (definido por *Agilent Technology*), uma tradução aproximada seria “*entidade molecular*”. Esta entidade molecular é correspondente a um íon detectado com uma única relação massa/carga (m/z), pela média do tempo de retenção (t_R) (Gary J. Patti, 2012) e intensidade do sinal em cada amostra analisada. Uma entidade molecular será assim denominada até que seja definitivamente identificada por meio de avaliação com padrões analíticos, por fragmentos

de MS/MS em amostras e, ou comparação com bases de dados. A partir de então, será denominado metabólito.

Em contraste com os resultados da análise metabolômica dirigida (mais específica), os dados da abordagem não dirigida são excessivamente complexos, na ordem de *gigabytes*, por exemplo, com uso de instrumentos de espectrometria de alta resolução. A inspeção manual de milhares de picos detectados é impraticável e complicado por desvios experimentais, entre os quais podemos citar os desvios de tempo de retenção de amostra para amostra, devido à degradação das colunas, pequenas flutuações em temperatura e do pH da fase móvel, e outras variações para a técnica de LC.

Embora estes desafios para tratamentos de dados em metabolômica são os maiores obstáculos para interpretar os dados de perfis em análise não dirigida, têm sido feitos grandes progressos na última década, com o desenvolvimento de diferentes *softwares* que permitem alinhar perfis, filtrar, remover o ruído que possa interferir nos sinais analíticos. Neste contexto, o fluxo básico adotado em análise metabolômica não dirigida pode ser melhor exemplificado pela Figura 6 utilizando como técnica analítica LC-MS.

Figura 6. Fluxo de trabalho em uma abordagem de Análise metabolômica não dirigida. Adaptado de (Gary J. Patti, 2012).



No fluxo de trabalho de análise metabolômica não dirigida, os metabólitos são isolados pela primeira vez a partir de amostras biológicas (tecidos, células, plasma ou urina) e

subsequentemente analisadas em sistema LC-MS. Depois da aquisição dos dados, os resultados são processados usando *software* de bioinformática, que realizam o alinhamento de tempo de retenção e identificam os picos que estão mudando entre os dois grupos de amostras medidas. Os valores de m/z para os picos de interesse são pesquisados nas bases de dados de metabólitos para obter identificações putativas (considerado verdadeiro até o momento da identificação com padrões ou análise por MS/MS das amostras). As identificações putativas são então confirmadas comparando dados de (MS/MS) e tempo de retenção com os padrões analíticos. Os resultados finais de uma abordagem não dirigida em metabolômica são globais e os dados podem ser correlacionados para entendimento do metabolismo ou os efeitos causados sobre uma via metabólica específica (Gary J. Patti 2012).

Após definida a abordagem metabolômica que será dada ao estudo (dirigida ou não dirigida) inicia-se o processo de geração de dados, compreendendo pré-tratamento de amostra e medição analítica.

1.5.6.2 Preparo de amostra

Recentemente, vários métodos de preparação de amostra têm sido aplicados em amostras clínicas (plasma, urina, etc) com o objetivo de aumentar a quantidade global de metabólitos. Os pré-tratamentos mais aplicados incluem: precipitação com solvente orgânico, extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE) (Michopoulos, *et al.* 2009).

Em plasma o principal interferente é a presença de proteínas. Polson *et al.* (2003) compararam a eficácia de quatro categorias de técnicas de remoção de proteínas (solvente orgânico, ácido, sal e metal) em plasma para estudos de LC-MS. A acetoneitrila foi definida como sendo mais eficiente entre os solventes com 93,2 % de remoção de proteínas biológica em

comparação com 88,6 % de etanol e 88,7 % em metanol. Embora melhoras na remoção de proteínas que resultaram na melhoria da extração tenham sido apontadas, nenhum estudo de recuperação de metabólitos foi avaliado (Polson, *et al.* 2003).

Em estudo de preparação de amostras de plasma humano por meio de precipitação de proteínas para UPLC – ToF/MS, Bruce e colaboradores (2009) avaliaram quatro solventes (metanol, etanol, acetonitrila e acetona) e suas composições. Duas composições de solvente foram consideradas "ideal" na preparação de plasma para análise do perfil metabólico global: MeOH/EtOH (1:1,v/v) e MeOH/ACN/acetona (1:1:1,v/v/v), adicionado ao plasma (relação 4:1, para volume total de 400 µL) tendo em consideração o número de entidade moleculares extraídos, a qualidade/reprodutibilidade dos dados, e prolongamento do tempo de vida da coluna cromatográfica (Bruce, *et al.* 2009; Yang, *et al.* 2013).

Estudo recente desenvolvido por Yang, Y. e colaboradores (2013) tratou de otimizar um método de extração LLE usando metil *tert*-butil éter (MTBE) e SPE combinados para o plasma e compararam com extração tradicional pela precipitação com metanol ou com metanol/etanol (1:1) tradicional usando adição de padrões internos como controles. Os resultados apontam que em geral, 1851 metabólitos podem ser detectados quando a precipitação com metanol foi utilizada com valores de % CV menores de 30%. Em comparação com a extração MeOH/EtOH (1:1), a quantidade de metabólitos aumentou para 2073. Separação de lipídeos de metabólitos hidrofílicos por MTBE aumentou a cobertura para 3.125 metabólitos (1828 lipídeos além de 1297 compostos hidrofílicos). O método de MTBE-SPE combinado aumentou a cobertura de metabólitos para 3806, apresentando vantagens como: baixa interferência por proteínas, baixa supressão iônica, melhor resolução e separação dos picos, além de dados altamente reprodutíveis. Os autores concluem que o método é demorado,

no entanto, preparo de amostra usando MTBE-SPE resulta em maior número e classes de metabólitos extraídos quando comparado com precipitação usando metanol. Eles foram capazes apenas de comparar os métodos de extração utilizando o mesmo método de processamento de dados e incapazes de realizar comparação direta com os métodos já publicados com precipitação com metanol pelo ser diferente, resultando assim, em menor número de metabólitos significativos estatisticamente. Em resumo, os métodos de extração usando MTBE e MTBE – SPE são apropriados para varredura do metaboloma for o interesse e mais abrangente para lipídeos e suas classes (Yang, Cruickshank *et al.* 2013).

1.5.6.3 Aquisição e análise de dados

Dependendo da plataforma analítica aplicada em um estudo metabolômico as etapas de reprocessamento, pré-tratamento e tratamento dos dados; bem como a revisão dos resultados são diferentes. Isto se deve ao tipo de plataforma analítica aplicada como NMR e técnicas de separação com detector de MS, e de acordo com os *softwares* de bioinformática aplicados, por exemplo: XCMS (licença gratuita) e Mass Profiler Professional (MPP), Gene Spring (ambos com licença paga). Todas as etapas serão abordadas no que segue, para tanto, centrado nas etapas de tratamento de dados quando da aplicação das plataformas analíticas de LC-MS e CE-MS utilizando *softwares* das empresas *Agilent Technologies* e SIMCA-P+ (12.0.1, Umetrics).

1.5.6.4 Reprocessamento de dados (Data re-processing)

Consiste na extração das entidades moleculares “*molecular feature*” a partir dos dados brutos “*raw data*” (gerados pela plataforma analítica aplicada) e seu alinhamento “*alignment*” mediante a aplicação de algoritmos.

1.5.6.5 Criação do conjunto de dados (Data set creation)

A primeira etapa consiste na criação do conjunto de dados através de algoritmo de deconvolução que realiza a extração das entidades moleculares “*Molecular Feature Extraction – MFE*” utilizando *software* MassHunter Qualitative Analysis (B.03.00, Agilent). O objetivo é a identificação da existência de isótopos (^{13}C , ^{15}N , ^{37}Cl ,...), formação de adutos ($+\text{Na}^+$, $+\text{K}^+$, $+\text{HCOO}^-$, $+\text{NH}_4^+$...), dímeros ($((2\text{M}+\text{H})^+$, $(2\text{M}+\text{Na})^+$,...), íons com múltiplas cargas ($(\text{M}+\text{nH})^{\text{n}+}$,...) e perda de espécies neutras (H_2O , NH_3 , identificando assim, íons co-eluídos que façam parte de uma única característica molecular. E por fim, agrupar os sinais em um único valor definido para todas as m/z dos íons correspondentes ao mesmo composto, possibilitando a atribuição da sua massa com maior exatidão possível. A abundância do composto é atribuído como a soma do volume para cada íon/pico relacionado.

A perda de fragmentos neutros é útil para identificação de compostos instáveis (frágeis). Sinais de alta intensidade se dão normalmente por íons protonados ($[\text{M} + \text{H}]^+$), no entanto, diferentes adutos não afetam a altura do pico, mas podem alterar o volume do pico.

A seleção apropriada do estado de carga ajuda a evitar agrupamentos isotópicos indesejados ao mesmo tempo em que se evita a perda de informação. Para metabólitos de baixa massa molecular devem ser definidos com carga +1, enquanto que para lipídeos +2 (Kind, 2010).

1.5.6.6 Alinhamento (Alignment)

Para realizar a comparação entre as amostras através das informações obtidas pelo MFE se faz necessário o alinhamento dos picos. Este alinhamento se realiza com base na relação m/z , tempo de retenção e semelhança entre todas as

amostras avaliadas. Para tanto, dois parâmetros importantes a serem ajustados são os limites de t_R e massa para o composto em alinhamento. O tamanho destes limites depende da técnica aplicada, bem como parâmetros analíticos como o tempo de análise sendo ajustados de acordo com dados experimentais.

1.5.6.7 Pré-tratamento de dados (Data pre-treatment)

A variação metabólica das amostras pode afetar significativamente a análise estatística dos dados e produzir artefatos estatisticamente significativos, fato que prejudica a interpretação adequada levando a dados falsos. O pré - tratamento dos dados é a correção ou pelo menos a redução de alguns desses aspectos (Idborg, *et al.* 2005). A análise multivariada (MVA) que se aplica comumente avalia as relações possíveis dentro das amostras mediante testes de variância dos dados, o primeiro que se deve tomar em conta é a estimativa e correção adequada da variância (Axelson, 2012).

As mais frequentes ferramentas aplicadas em estudos metabolômicos para pré-tratamento de dados são normalização, centrado, escalonamentos e transformação dos dados (Boccard, *et al.* 2010).

1.5.6.7.1 Normalização

A normalização das amostras se faz necessária para minimizar as diferenças na detecção entre as amostras resultantes da variação da concentração e o limite de detecção. Normalmente quando se realizam estudos metabolômicos com urina efeitos de diluição são observados em virtude da dependência da quantidade de urina excretada e as concentrações dos metabólitos contidos, causando discrepâncias de amostra para amostra. É particularmente importante para dados metabolômicos conseguindo resultados de diferenças metabólicas

reais, e não devido a diferenças na detecção, que inclui tanto o número de massas detectadas, assim como as suas intensidades (Godzien, *et al.* 2013).

1.5.6.7.2 Centrado

Este pre-tratamento calcula o valor médio de cada coluna da matriz de dados (referente à abundância das entidades moleculares para todas as amostras) e desconta este valor da coluna, deslocando os eixos do sistema de coordenadas para o centróide dos dados. Este procedimento faz com que cada amostra exiba somente as diferenças que possuem com relação à média de todos os dados originais. O centrado se aplica em combinação com todos os métodos de escalonamento (van den Berg, *et al.* 2006).

1.5.6.7.3 Escalonamento (Scaling)

O objetivo é de ajustar as diferenças nos níveis de concentração dos metabólitos que se originam a partir de diferenças na abundância média. A seguir são descritos alguns dos tipos de escalonamentos aplicados em metabolômica que utilizam medidas de dispersão dos dados como fator de escala:

1.5.6.7.4 Unidade de Variância – UV (Autoscaling)*

Este tipo de escalonamento utiliza o desvio padrão (SD) como fator de escala. Depois de escalado por UV*, todos os metabólitos têm $SD = 1$ e por tanto, os dados são analisados com base em correlações ao invés de covariâncias, como é o caso do centrado.

1.5.6.7.5 Pareto (Par-scaling)

Utiliza a raiz quadrada do desvio padrão como fator de escala. Em consequência os metabólitos com grandes varia-

ções (mais dominantes) às vezes são suprimidos em comparação como os de pouca variação. No entanto, os dados não são adimensionais como no caso do escalonamento por unidade de variância. Esta característica do escalonamento com Pareto traz a vantagem de privilegiar metabólitos com pequenas variações entre grupos de estudo, o que muitas vezes é o objetivo do estudo que se propõe.

1.5.6.7.6 Transformação dos dados(Data transforming)

O objetivo de transformação de dados consiste em reduzir a influência de potenciais “*outliers*”, e transformar a matriz de dados para uma distribuição mais do tipo Gaussiana (Fiehn, 2007). É crucial para dados obtidos de um conjunto de dados pequeno, onde o número de replicatas dentro dos grupos também o são. Além disso, a transformação aumenta o peso dos metabólitos de baixa intensidade e comprime a extremidade superior da escala de medição (Morgenthal, 2007). A transformação logarítmica é muito aplicada para este fim (Godzien, *et al.* 2013).

1.5.7 Tratamento de dados (Data treatment)

1.5.7.1 Filtragem de dados (Data filtering)

O tratamento dos dados inclui duas etapas fundamentais de filtragem de dados, que podem ser resumidas como um filtro por presença “*Filter by presence*” aplicado antes do filtro por significância “*Filter by significance*”. O filtro de presença é realizado pelo filtro de aplicação por bandeiras “*Filter by Flags (FbF)*”, onde um marcador que se atribui uma intensidade (volume) indica se a entidade molecular foi detectada em uma amostra em particular.

Por exemplo, em um estudo metabólico têm-se dois grupos de amostras, um tratado com um medicamento e outro

controle com 10 amostras em cada grupo. O interesse é avaliar apenas os compostos que aparecem em um dos grupos e não no outro. Para tanto, se realiza um FbF com marcador igual a 100 (volume), significa dizer que dentre as amostras um metabólito passará pelo filtro se estiver presente em 100 % das amostras de pelo menos um dos grupos em comparação, caso contrário será descartado. Filtragem por significância é realizada com base tanto em análise estatística univariada (UVA) como em análise estatística multivariada (MVA).

1.5.7.2 Valores em falta (Missing values)

A prática aponta que uma matriz de dados apresenta grande quantidade de valores em falta, ou seja, células em branco. Estes valores em falta são referentes por exemplo a sinais irreprodutíveis, baixa concentração na amostra, problemas com ionização, efeito de matriz e ruídos. Ainda, valores em falta influenciam no tratamento e avaliação estatística, sendo que a redução do número de células vazias (na matriz de dados) se torna essencial. Algumas práticas podem ser tomadas para reduzir tais riscos, como: ignorar estas células da matriz de dados, preencher com um valor numérico, por exemplo a unidade.

1.5.8 Análise estatística (Statistical analysis)

A análise estatística em metabolômica está dirigida essencialmente para identificação das diferenças de tratamentos (métodos supervisionados) ou ao descobrimento de padrões “*patterns*” (métodos não supervisionados), em um grande conjunto de dados processados previamente (Hendriks, *et al.* 2011).

Normalmente são aplicados dois tipos principais de análise estatística: univariada (UV*) e análise multivariada

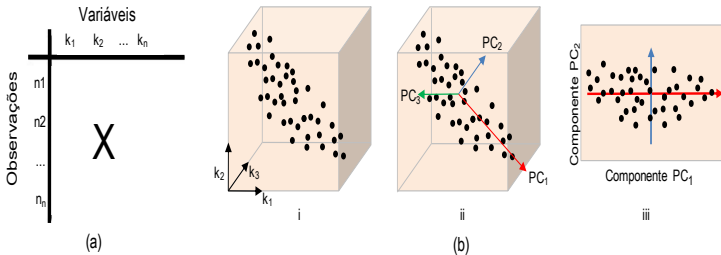
(MVA). UVA avalia a significância estatística de cada pico/variável separadamente, enquanto MVA considera a combinação dos efeitos de várias variáveis (Zhou, *et al.* 2012).

Para análises univariadas, *teste t* de Student pode ser aplicado e para multivariada, Análise de Componentes Principais (PCA), Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) e Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Estruturas Latentes (OPLS-DA).

1.5.8.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

Análise de Componentes Principais (PCA) é um método não supervisionado que faz com que seja possível obter uma visão geral das informações em grandes conjuntos de dados (Trygg, *et al.* 2007). PCA é usado para revelar *outliers*, tendências e observações de agrupamentos nos dados. Ele baseia-se numa matriz de dados (X), que contém as linhas de n (observações) e k colunas (variáveis). As observações podem, por exemplo, ser de diferentes amostras. As variáveis podem ser as medições como os dados de MS (Figura 7a). A matriz X pode ser visualizada como um espaço dimensional, onde cada k observação é representada por um ponto e o eixo Y representa as variáveis mostrado na Figura 7b.

Figura 7. (a) A matriz de dados usado em PCA com n linhas (observações) e k colunas (As variáveis). (b) Ilustração do PCA. (I) Os dados da matriz X visualizados no espaço 3D. (ii) Três componentes principais para os dados. (iii) Projeção dos dados para os primeiros dois PCs como um gráfico de dispersão. Figura adaptada de (Kavraki 29 julho 2013).



O objetivo da PCA consiste em extrair e exibir a variação em um conjunto de dados multivariados com um "plano" de menor dimensão. Isto é feito com a ajuda de uma série de vetores ortogonais chamados componentes principais, que é uma combinação linear das variáveis originais e independentes entre si. O primeiro componente principal (PC1) é uma linha no espaço tridimensional k , que descreve a maior variação no grupo de pontos. Ele passa através da origem e tem uma direção que aproxima os dados no melhor sentido dos mínimos quadrados (Figura 7b ii). Cada observação é projetada em PC1 para obter um valor ao longo de coordenadas. O valor da coordenada é chamado de "score".

A segunda componente principal (PC2) modela a segunda maior variação e é ortogonal ao PC1. Todas as observações são projetadas sobre o plano formado por PC1 e PC2, os valores de coordenadas dos pontos de dados neste novo sistema de coordenada são os "scores" para o primeiro e segundo componentes principais. Um modelo PCA consiste de tantos componentes principais sejam necessários para descre-

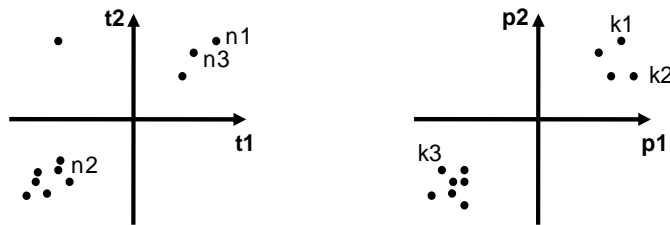
ver a variação num conjunto de dados. Todos os componentes principais são mutuamente ortogonais entre si.

Dada a representação vetorial do PCA, um vetor *score* (t) é um vetor contendo todas as pontuações “scores” para um componente principal.

Um gráfico de dispersão “*scatter plot*” de dois vetores *score* (por exemplo t_1 and t_2) fornecem uma visão geral de todas as observações no conjunto de dados e pode ser visto na Figura 7 b iii. Ela pode revelar agrupamentos, tendências e *outliers*.

Análogo aos *scores*, os vetores de carga (p) “loading vectors” definem uma relação entre as variáveis do conjunto de dados, informações sobre qual indivíduo dos x -variáveis são os mais influentes para descrever as pontuações “*scores*” e causando por exemplo o agrupamento dos dados. Um gráfico de dispersão de carga (Figura 8b) fornece uma visão geral das variáveis.

Figura 8. (a) Exemplo de um gráfico de dispersão de pontos “*score plot*” e (b) Exemplo de um gráfico de dispersão de carga “*loading-plot*”.



(a) Score plot

(b) Loading plot

Observações com propriedades semelhantes são agrupadas no “*score plot*”, por exemplo, amostras n_1 e n_3 (Figura 8a). Variáveis que contribuem com informações semelhantes são agrupados juntos, eles estão correlacionados. Isto é mostrado na Figura 8b, onde k_1 e k_2 são correlacionados positi-

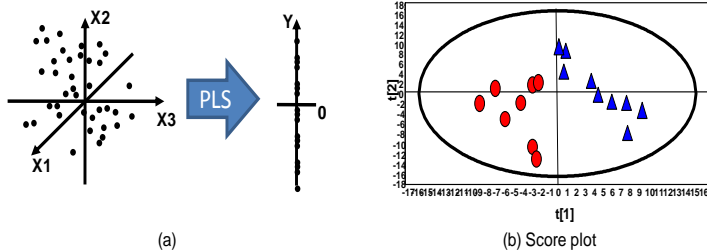
vamente ao passo que k1 e k3 são correlacionados negativamente. A variável tem forte impacto sobre o modelo, quanto mais longe da origem se situa no *loading plot*. As posições nos *score* e *loading plots* são correspondentes. Isto significa que, por exemplo, os k2 são variáveis que estão aumentadas na amostra n1 (Trygg, *et al.* 2007).

1.5.8.2 Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)

É um método por projeções para estruturas latentes, sendo uma extensão da regressão da PCA. A PCA sendo um método não supervisionado que descreve toda a variação entre amostras independentemente do tipo de amostra, enquanto que o PLS-DA é um método supervisionado, ou seja, o pesquisador utiliza do conhecimento prévio acerca das amostras classificando-as em classes (tratadas e controles; distinção entre gêneros, etc...) definindo assim a variável resposta. Dessa forma o PLS-DA está focado em descrever variações entre diferentes grupos de amostras pela conexão das informações em dois blocos de variáveis: X e Y. A matriz X, contendo dados analíticos das amostras e a matriz Y contendo as informações qualitativas em relação à observação (classificação das amostras). A PLS-DA é usada para extrair informações entre X e Y, isto é, quais variáveis em X que são importantes para predizer Y. Os componentes principais, ou componentes PLS, devem maximizar a covariância dos dados entre X e Y e também maximizar a variância em X.

As observações podem ser representadas graficamente, a cada observação corresponde a um ponto no espaço X e um ponto no espaço Y (Figura 9a). O objetivo de PLS é descrever a relação entre a posição das observações nos espaços X e Y.

Figura 9. PLS. (a) observações podem ser vistas como dois grupos de pontos, no espaço predictor (X) e um na resposta do espaço (Y); (b) Score plot, separação em dois grupos de acordo com as variáveis X relevantes em consideração às classes de Y.



O primeiro componente de PLS é um vetor no espaço X, que se aproxima ao grupo de pontos em X e bem covaria com o vetor Y. A projeção de cada observação para o componente PLS dá um “score”, $t[i]$. O score do vetor $t[i]$ reflete as informações nas X-variáveis que é de relevância para modelar e prever a variável resposta Y (Figura 9b).

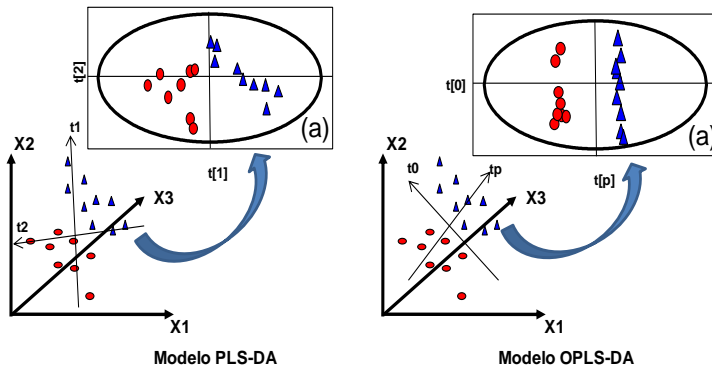
Um componente PLS nem sempre é suficiente para modelar os dados. O segundo componente PLS é uma linha no espaço X, que passa pela origem e é ortogonal ao primeiro componente. A direção do segundo componente melhora a descrição dos dados de X e fornece melhor covariação para os resíduos de Y remanescentes da primeira componente (Trygg, *et al.* 2007).

O objetivo final do PLS-DA é encontrar as variações relevantes na matriz de observações, X que apresentem o máximo de covariância com as classes, Y. PLS-DA proporciona um método gráfico de fácil compreensão para identificar as observações (metabólitos) que fazem a separação entre as classes e a significância estatística do resultado.

1.5.8.3 Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Estruturas Latentes (OPLS-DA)

OPLS-DA se trata de uma modificação do método de PLS baseado na separação sistemática dos dados em duas componentes: Um que é linearmente relacionado com Y e outro que não está relacionada (ortogonal) com Y, o ruído. Esta separação reduz a complexidade e facilita a interpretação do modelo, já que a variação entre classes se pode inferir a partir da componente preditiva, X e a variação dentro das classes se pode deduzir dos componentes ortogonais (Trygg, 2002).

Figura 10. Ilustração geométrica entre modelos de PLS-DA e OPLS-DA. (a) Visualização em duas dimensões. Adaptado de (Wiklund, Johansson *et al.* 2008).



Uma ilustração geométrica da diferença entre PLS-DA e OPLS-DA pode ser vista na Figura 10. O modelo de OPLS-DA é rotacionado de modo que a variação entre classes (diferenças entre triângulos e círculos) esteja na componente de previsão t_p e a variação dentro da classe é visto na primeira componente ortogonal Y, para componente t_0 (Wiklund, *et al.* 2008).

1.5.9 Modos de visualização

1.5.9.1 Estrutura única e compartilhada (Shered and Unique Structure)

A estrutura única e compartilhada, *SUS-plot*, é utilizada para comparar dois ou mais modelos em PLS ou OPLS-DA. O interesse é encontrar compostos compartilhados, bem como únicos entre um conjunto de diferentes modelos. No *SUS-plot*, a correlação da componente prevenida, $\text{Corr} [t_p, X]$, de cada modelo é plotada uma contra outra para o caso de OPLS-DA, por exemplo, (Wiklund, *et al.* 2008).

1.5.10 Revisão dos resultados

Em um fluxo de trabalho de metabolômica o processo de revisão de resultados deve ser contínuo e após cada etapa. A validação pode ser categorizada como: validação analítica dedicada a revisão dos resultados e procedimentos analíticos; validação quimiométrica dedicada a avaliação da qualidade e reprodutibilidade dos resultados estatísticos; validação biológica constituindo o conhecimento e confirmação dos metabólitos. Esta última é importante em essencial quando do descobrimento de biomarcadores de doenças ou processos que deverá ser estabelecida de maneira criteriosa e extensiva, realizada preferencialmente em estudos dirigidos, posterior à estudos não dirigidos, caso que não será abordado na presente tese.

1.5.10.1 Validação analítica

A primeira etapa é a verificação visual das análises, inspecionando as curvas de pressão das análises em LC e as correntes nas análises de CE. Posteriormente os cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos para cada amostra analisada.

Então os dados reprocessados (depois de MFE) são examinados de acordo com o número de entidades moleculares extraídas por amostra e seus sinais totais (MSTS). Esta representação gráfica e ou numérica pode dar informações sobre alterações nos sinais, ou qualquer interrupção durante a medição.

Os controles de qualidade do inglês “*Quality Control*” (QC) das amostras que em geral são obtidos pela mistura de volumes iguais correspondentes a todas as amostras a serem analisadas e que devem ser analisadas entre análise das amostras aproximadamente a cada 5 amostras. A análise de QC avalia a estabilidade e desempenho do sistema analítico (Gika, *et al.* 2008).

Dado que os QCs são teoricamente idênticos às amostras biológicas e induzem a mesma variação que ocorre entre amostras, dessa forma, qualquer desvio significativo observado ao longo dos QCs reflete perfeitamente qualquer perturbação ou variação analítica durante o preparo de amostras e ou etapas da análise (Dunn, *et al.* 2011).

O agrupamento ou difusão das amostras de QC em um modelo de PCA proporcionam uma maneira gráfica de observar a estabilidade do sistema e seu rendimento. Existem dois métodos para apresentar e avaliar os QC em modelos de PCA, o primeiro considera todos os sinais (variáveis) nas amostras sem um filtro prévio (nos *raw data*), e o segundo se refere ao uso de um filtro prévio (devido a valores em falta, ou de baixa detectabilidade que causam ruído) antes de realizar a PCA. Primeiramente, todas as entidades que tiverem sido detectadas em menos de 50 % das amostras de QC são removidas de todas as amostras e em seguida todas as entidades com desvio padrão relativo (RSD %) menores de 30 % serão também descartadas (Dunn, *et al.* 2011).

1.5.10.2 Validação estatística

A qualidade dos modelos gerados é verificada pelos R^2 e Q^2 como primeiro passo na validação do modelo. R^2 , o qual explica a variância, dá informações sobre a qualidade de ajuste, enquanto Q^2 , que prevê a variância, fornece informações sobre a previsibilidade do modelo. A desproporção entre estes dois valores fornece o primeiro aviso de que o modelo pode ter sido formado por superajuste. Para assegurar que o modelo é robusto para diagnósticos, R^2 e Q^2 devem ser altos e não variarem entre si mais do que 0,2-0,3.

Modelos obtidos podem também ser validados usando várias ferramentas disponíveis entre os quais validação cruzada, do inglês “*cross validation*” (Hastie, 2005) e permutação do inglês “*permutation*” (Efron, 1993). O teste de permutação é apropriado para grandes conjuntos de dados com mais de 50 amostras por grupo. Por outro lado validação cruzada é o método mais suficiente para conjuntos de dados de médio e pequeno contendo menos que 50 amostras (Kos, Lohninger *et al.* 2003). A validação cruzada se realiza utilizando 1/3 dos dados e os prevendo com base nos modelos de PLS-DA por exemplo (Ciborowski, *et al.* 2012).

1.5.10.2.1 Detecção de outliers

Os *outliers* são dados que não concordam com a grande maioria. Podem ser classificados em dois tipos: *outliers* biológicos e analíticos. Os de cunho biológico refletem a diferença de uma amostra particular frente às demais, especial cuidado deve ser tomado se esta variação é aleatória ou induzida.

Outliers biológicos de cunho aleatório, muitas vezes contêm informações valiosas sobre o processo ao qual se investiga e deve ser mantido para análise posterior. *Outliers*, devido à variação biológica induzida deve ser removido por-

que diminuem a variação significativamente e a homogeneidade do grupo afetando tanto as avaliações estatísticas UVA e MVA. *Outliers* analíticos aparecem devido a diferentes tipos de problemas e distúrbios no processo analítico como: amostragem, armazenamento, tratamento da amostra, separação analítica e detecção.

Por isso, é necessário conhecer as amostras, e em particular o planejamento do experimento metabolômico para diferenciar a origem dos *outliers*. Além disso, cada decisão de remover um *outlier* no conjunto de dados tem de ser justificada (Baumgartner, *et al.* 2011).

1.5.11 Interpretação biológica

A interpretação biológica dos dados metabolômicos ou de qualquer outra ciência *ômica* compete à etapa mais trabalhosa do estudo. Por exemplo, após todas as etapas do fluxo de trabalho e identificação das entidades moleculares (MFE) nos metabólitos “reais” por análise de MS/MS nas amostras e comparação com base de dados, ou ainda avaliação com padrões analíticos e comparação com os espectros de MS/MS obtidos das amostras, a dificuldade é integralizar o maior número de metabólitos identificados com uma via metabólica específica e sua porcentagem de variação. Esta porcentagem de variação é a responsável pelas diferenças entre os grupos e que por seguinte devem relacionar-se com o objeto do estudo metabolômico (efeito de dieta, ação de fármaco sempre comparado a grupo controle).

Para identificação dos metabólitos das até então denominadas entidades moleculares, são utilizados alguns *sites* de bases de dados que auxiliam como primeira etapa. Entre as bases de dados destaca-se o “*Metabolite and Tandem Mass Database (METLIN)*” (Smith, *et al.* 2005), que oferece informações obtidas por MS e atualmente inclui mais de 60.000 compostos com detalhada informação e alta resolução em

MS/MS para mais de 10.000 metabólitos. Outras bases de dados que facilitam a obtenção de informações sobre metabólitos são: “*Mass Translator into Pathways (MassTRIX)*” e “*Metabolites and Pathways Strategy (LIPIDMAPS)*”.

A interpretação biológica se faz pela utilização de inúmeros *sites* disponíveis na atualidade, que proporcionam aos usuários conjuntos de compostos químicos e suas relações com o metabolismo e vias metabólicas em geral. Algumas dessas bases de dados públicas como: “*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)*”, “*Human Metabolome Database (HMDB)*”, “*PubChem*” entre outras, podem ser utilizadas gratuitamente. Além de conterem informações sobre as vias às quais implicam um certo metabólito, proporcionam informações como ação farmacológica, doenças, função biológica ou química. Na Tabela 4 pode ser encontrado um apanhado geral dos *sites* utilizados para identificação e de buscadores e base de dados aplicados na interpretação biológica de dados em metabolômica e demais ciências ômicas.

Tabela 4. Sites de base de dados para busca e identificação de metabólitos aplicados na interpretação biológica em metabolômica.

Nome	Acesso
METLIN	http://metlin.scripps.edu/metabo_search_alt2.php
MassTRIX	http://metabolomics.helmholtz-muenchen.de/masstrix2/
LIPIDMAPS	http://www.lipidmaps.org/
KEGG	http://www.genome.jp/kegg/
HMDB	http://www.hmdb.ca/
PubChem	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

1.5.12 Aplicação em Nutrigenômica

O primeiro trabalho realizado com intervenção na dieta para avaliar as modificações bioquímicas ocorridas por medidas metabolômicas foram realizadas por Solanky, K. S. e colaboradores em 2003. Seus resultados mostraram que iso-

flavonas da soja induzem mudanças nos componentes do plasma de mulheres saudáveis na pré-menopausa em condições ambientais controladas. No entanto, os perfis bioquímicos do plasma mostraram grande variabilidade em cada sujeito, indicando a forte influência de fatores genéticos, idade, estado de saúde, dieta e estilo de vida (Solanky, *et al.* 2003).

Outros pesquisadores exploram a metabolômica para estudar atividade biológica de componentes de dietas. Os efeitos da catequina, presente em muitos frutos foi examinado em experimentos com ratos em uma dieta rica em lipídeos (Fardet, *et al.* 2008). Os resultados indicaram que a dieta hiperlipídica enriquecida com catequina não apresentou efeitos significativos sobre o estresse oxidativo induzido nos tecidos hepático e cardíaco. Em contrapartida foi capaz de normalizar as perturbações metabólicas observadas pela análise metabolômica da urina dos ratos.

Estudos realizados com antocianinas *in vivo* (modelo animal), mostraram efeitos sobre hiperglicemia e resistência a insulina (Sasaki, *et al.* 2007), bem como obesidade em ratas ovariectomizadas (Kaume, *et al.* 2012) Em ambos os estudos foram administradas dietas enriquecidas com cianidina -3-glicosídeo (C3G). Os resultados indicaram reduzidos níveis de glicose e reforçamento a sensibilidade a insulina nas cobaias tratadas com concentração de 2 g de C3G por quilograma de ração. Sobre obesidade os efeitos no ganho de peso e melhora no processo inflamatório associado ao procedimento de ovariectomia menopausa-induzida foi constatado em ratas tratadas com 10 % (m/m), ou seja, 0,5911 g de C3G por quilograma de ração. Neste último caso foi administrado um extrato seco de amora preta e os resultados podem estar sujeitos a efeitos individuais ou sinérgicos entre outros componentes fenólicos (derivados de quercetina, elagiotaninos e outras antocianinas em menor concentração).

O único trabalho reportado até o momento que trata do estudo metabolômico com efeitos na saúde mediados por

extratos de berry foi realizado por Yang e colaboradores (2011) estudaram o efeito de cianidina-3-galactosídeo, antocianina majoritária do extrato de mirtilo (blueberry) em ratas em idade avançada. Analisando plasma e cérebro pela técnica de ^1H RMN, constataram que tanto uma dieta enriquecida com extrato de blueberry e outra somente com cianidina-3-galactosídeo induzem alterações similares em ambos tecidos biológicos avaliados. (Yang, *et al.* 2011)

Até o presente momento, não há estudos dos possíveis efeitos metabólicos, causados pela administração de um extrato de amora-preta, cuja antocianina majoritária é a cianidina-3-glicosídeo sobre a hiperlipidemia e diabetes tipo 2.

As principais vantagens relativas que tornam a metabolômica mais atrativa para estudo sobre diabetes frente às outras tecnologias ‘ômicas’ são: (Bain, *et al.* 2009)

1) As estimativas variam, mas segundo a base de dados do *The Human Metabolome Database (HMDB)*-(Database-Canada 2012) contempla uma lista de 7900 metabólitos, significativamente menor do que a estimativa de 25.000 genes, 100.000 transcrições e 1.000.000 de proteínas. Situação que facilita o entendimento das rotas metabólicas, ou agregaria a esta base possíveis novos metabólitos identificados.

2) Metabolômica mede fenótipos químicos que são o resultado líquido da variabilidade genômica, transcriptômica, proteômica e, portanto, proporcionando um perfil mais integrado do estado biológico.

3) Metabolômica é, em teoria, uma ferramenta precisa de mecanismos mais exigentes de ação e possíveis efeitos toxicológicos de terapias de droga.

1.6 Hiperlipidemia e diabetes tipo 2

Os lipídeos são transportados na corrente sanguínea na forma de complexos com proteínas, denominados de lipoproteínas (Lusis, 2008). As lipoproteínas apresentam um núcleo hidrofóbico compostos de ésteres de colesterol e triglicéridos (TGs) e revestimento hidrofílico, constituído de colesterol não esterificado ou livre, fosfolipídeos e apolipoproteínas, esta última regula e controla o metabolismo da lipoproteína e o transporte lipídico (Hegele, 2009). As principais lipoproteínas transportadoras de colesterol no plasma são as lipoproteínas de baixa densidade (LDLs - Low-density lipoproteins), estas são insolúveis contendo um anel esteroidal no núcleo, um grupo hidroxila e uma dupla ligação no anel esteroidal (Grundy, 1990).

Níveis aumentados de lipídeos circulantes na corrente sanguínea são causados por alterações metabólicas, estas alterações são denominadas de hiperlipidemias. Podem ser classificadas em hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperlipidemia mista (Imes, 2012).

Hipercolesterolemia: Os indivíduos apresentam altos níveis de LDL sanguíneo e xantomas (deposição de material amarelado rico em colesterol nos tendões e outras partes do corpo). Causada por mutação múltipla de genes.

Hipertrigliceridemia: Muitas vezes não é expressa na infância e pode permanecer assintomática, ou manifestar-se devido a outros fatores, como excessivo consumo de álcool, obesidade, diabetes do tipo 2 ou hipotireoidismo (Kolovou, *et al.* 2009).

Hiperlipidemia mista: É o distúrbio mais comum de lipoproteínas, com prevalência de 1-2% nas populações ocidentais (Genest, 2003; Shoulders, *et al.* 2004). São indivíduos que apresentam vários padrões de hiperlipidemia, incluindo hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e níveis

elevados de apolipoproteína (Kolovou, *et al.* 2009). Está presente em 10-20 % dos indivíduos com doença arterial coronariana e está associada com doença arterial periférica.

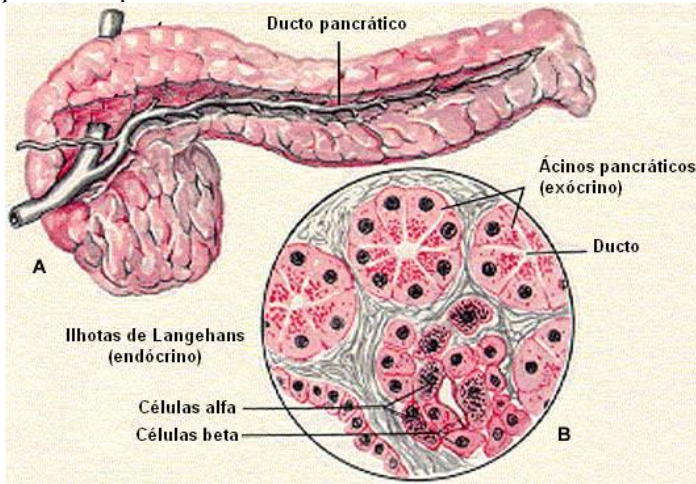
A diabetes mellitus é um transtorno crônico de base genética, caracterizada por hiperglicemia além de causar alterações no metabolismo dos lipídeos e das proteínas como consequência da diminuição ou ausência absoluta da ação do hormônio insulina. Afeta todos os órgãos, mas especialmente coração, rins, retina a circulação cerebral e periférica (Figueroa, 1995). A diabetes é classificada em dois tipos:

A diabetes mellitus (DM), insulino dependente (ID) ou do tipo 1, é devida a secreção inadequada de insulina das células beta pancreáticas (Figura 11) porque este tipo de diabetes apresenta-se pela destruição destas células. Seus sintomas aparecem geralmente antes dos 30 anos com início súbito e ocasionar a necessidade rápida de administração de insulina (Oliver, 1994).

A Diabetes Mellitus não insulino dependente (NID) ou do tipo 2, se deve a falta de resposta dos tecidos frente a ação da insulina circulante (resistência à insulina). Desenvolve-se em geral em pessoas obesas, maiores de 40 anos e prevalece em pessoas hipertensas ou hiperlipidêmicas. Sua manifestação é às vezes silenciosa e pode ser controlada com dieta ou com agentes hipoglicêmicos, não requerendo insulina, ainda que em casos incontroláveis seja administrada (Figueroa, 1995).

As classificações diabetes tipo 1 e 2 são sugeridos pela Associação Americana de Diabetes preferivelmente aos outros acrônimos (Bjelland, *et al.* 2002).

Figura 11. Fisiologia básica do pâncreas. Legenda: (A) Pâncreas, (B) Ilhotas de Langerhans (ou ilhotas pancreáticas), são os locais de produção de dois hormônios, insulina (hormônio hipoglicemiante - facilita o ingresso da glicose existente no sangue em diversos tipos de células, principalmente as musculares e as do fígado, onde são armazenadas como glicogênio) produzidas pelas células β . E glucagon (hormônio hiperglicemiante - responsável pela hidrólise do glicogênio hepático, o que leva à liberação de glicose para o sangue) produzidas pelas células α .



A diabetes Tipo 2 está se tornando uma epidemia global. A Federação Internacional de Diabetes estima que mais de 245 milhões de pessoas em todo o mundo têm diabetes e 380 milhões de pessoas terão a doença em 20 anos. O aumento da prevalência está associado com obesidade, o envelhecimento da população e o sedentarismo (Zimmet, *et al.* 2001). Nos estágios iniciais da DM2, as células β -pancreáticas podem compensar a resistência à insulina segregando mais insulina. As células beta, quando já não podem secretar insulina sufici-

ente para compensar a resistência à insulina, o estado intolerância à glicose é alcançado, levando a hiperglicemia.

A resistência à insulina ocorre no fígado com o aumento de produção de glicose e prejudicando o metabolismo do glicogênio no músculo com a diminuição da absorção de glicose; No tecido adiposo com o aumento da lipólise para aumentar os níveis em circulação de ácidos graxos livres (FFA). O aumento de glicose e FFAs circulantes causam lipotoxicidade e glicotoxicidade para as células, o que aumentam mais a resistência à insulina no músculo e no fígado e diminuem a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas já prejudicadas, levando a quadros de diabetes mais graves. Tendo em vista que a DM2 é uma desordem complexa do metabolismo deficiente, resistência à insulina, e disfunção das células beta, são necessários novos medicamentos para tratar as patologias subjacentes da DM2 e para melhorar o perfil metabólico geral (Yang, 2008).

Os estudos metabolômicos sobre obesidade e diabetes visam à identificação de biomarcadores ou alteração daqueles que devem encontrar-se em determinados níveis. Espera-se com estes estudos no futuro próximo diagnosticar precocemente a doença, prever o comportamento e evolução do caso clínico, ou ambos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Conceber, caracterizar os flavonóides e avaliar os efeitos do extrato de amora preta (*Rubus fruticosus var. Lochness*), como promotor da saúde de cobaias submetidas à uma dieta hiperlipídica mediante análises metabolômicas em plasma sanguíneo.

2.3 Específicos

Da produção do extrato:

- Otimizar a extração de antocianinas e flavonóides totais da amora preta, aplicando planejamento de experimentos;
- Realizar experimentos com solventes (metanol e etanol);
- Efetuar medidas de flavonóides e antocianinas totais pelo método espectrofotométrico como resposta ao planejamento de extração;
- Acompanhar o grau de degradabilidade e influência dos fatores avaliados no planejamento de experimentos sobre a conservação do extrato quando mantido estocado a – 20 °C por período de estocagem de até 120 dias;
- Definir a melhor condição de extração, onde se obtenha os maiores teores de antocianinas e flavonóides totais, associados à condição de maior estabilidade frente à conservação do extrato;

Da caracterização química do extrato administrado:

- Realizar medidas do perfil de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – (UV e MS/MS) do extrato administrado aos animais;
- Desenvolver e validar uma metodologia de extração e análise por eletroforese capilar (CE - UV) para determinação de flavonóides no extrato;

Das análises metabolômicas em plasma:

- Administrar o extrato de amora em ratos machos e fêmeas, divididos em três grupos para cada gênero de acordo com as dietas: dieta padrão (comercial), dieta cafeteria (hiperlipídica) e dieta cafeteria + extrato de amora;
- Medir o perfil de ácidos graxos livres das dietas às quais os ratos receberam pela técnica de cromatografia gasosa (GC-FID);
- Realizar análise metabolômica (análise não dirigida) no plasma dos ratos por cromatografia líquida acoplada a detector de massas (UPLC – ESI – QtoF/MS);
- Identificar mediante base de dados metabolômicos e/ou espectros de MS/MS dos metabólitos no plasma que diferenciem ratos tratados de não tratados com extrato, bem como, os que diferenciem os tratados com dieta hiperlipídica frente os que receberam dieta padrão;
- Verificar se há diferenças metabólicas no plasma dos ratos e se o extrato de amora apresenta efeitos benéficos sobre hiperlipidemia e diabetes tipo 2 pela comparação dos tratados frente os não tratados com extrato de amora;

3 Otimização da extração de antocianinas e flavonóides totais de amora preta

3.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1.1 Características das amostras de *Rubus fruticosus*

Os frutos de amora preta do gênero *rubus fruticosus* da variedade Lochness foram coletadas nos períodos de julho a novembro de 2010 e 2011, respectivamente, sempre em estado de maturação máximo. Após coletadas, as amostras foram enviadas ao laboratório de Biologia Vegetal da Universidad CEU San Pablo – Madrid – Espanha pela própria empresa produtora: Companhia Agrícola El Bosque, SLL (Lucena del Puerto, Huelva, España) que gentilmente cedeu as amostras.

As plantas que dão origem aos frutos foram cultivadas em estufas e cresceram no “ciclo de inverno”, ou seja, período de frio artificial, onde as plantas são mantidas em câmaras frigoríficas para promover o ciclo de produção das plantas em duas frutificações anuais.

3.1.2 Pré-preparo e estocagem das amoras

Ao chegarem ao laboratório, as amoras foram imediatamente congeladas e mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em freezer até serem processadas. A primeira etapa do processamento foi realizar a trituração dos frutos inteiros com mixer comercial (Braun Multiquick5) em meio de nitrogênio líquido até obtenção de um pó. As amoras pulverizadas foram mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.3. Otimização do procedimento de extração de compostos bioativos utilizando planejamento fatorial fracionário com ponto central do tipo 2_n^{4-1}

A otimização da extração dos compostos bioativos de amora foi objeto de estudo, por existirem inúmeras variáveis

no processo que podem influenciar na qualidade do extrato, ou seja, na quantidade de compostos, bem como no grau de estabilidade com o passar do tempo. Para tanto, a otimização multivariada foi escolhida como ferramenta.

Foi aplicado o planejamento fatorial fracionário com ponto central do tipo 2_{IV}^{4-1} , primeiramente para avaliar a significância das variáveis, bem como, as interações entre elas. As variáveis investigadas foram: temperatura, tempo de sonicação, porcentagem de solvente orgânico e proporção de ácido clorídrico. Os limites de mínimo e máximo para as variáveis foram baseados nas metodologias de extração destacadas na Tabela 3. Foram realizados dois planejamentos distintos de acordo com o solvente orgânico empregado, metanol ou etanol.

As variáveis investigadas e os níveis correspondentes são apresentados na Tabela 5. Todas as variáveis foram avaliadas em dois níveis, um baixo (denotado por -1) e um alto (denotado por 1). O ponto central (denotado por 0) foi realizado em triplicata para estimativa da variância experimental e averiguação da perda de linearidade entre os níveis para cada variável.

Foram realizados 8 experimentos, ou seja, oito extratos em diferentes condições, e triplicata do ponto central. As respostas geradas para cada condição foram tratadas em planilhas de cálculo usando *software Microsoft Excel*.

O planejamento fatorial do tipo 2_{IV}^{4-1} aplicado para as quatro variáveis envolvidas, bem como, a combinação dos níveis das variáveis está apresentado na Tabela 6.

Tabela 5. Variáveis e níveis investigados no planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1} .

Identificação	Variáveis	Níveis		
		-1	0	1
T	Temperatura de sonicação (°C)	4	25	48
t	Tempo de sonicação (min)	5	17,5	30
S*	Solvente extrator (% v/v)	30	65	100
Ac	Ácido clorídrico (% m/v)	0	0,1	0,2

* Solventes utilizados metanol e etanol.

Tabela 6. Combinação das variáveis do planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1} .

Ensaio	Temperatura de sonicação (°C); (T)	Tempo de sonicação (min); (t)	Solvente extrator (% v/v); (S)	Ácido clorídrico (% m/v); (Ac)
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
Pc₁	0	0	0	0
Pc₂	0	0	0	0
Pc₃	0	0	0	0

3.1.4 Determinação de antocianinas totais

A quantificação de antocianinas totais foi realizada pelo método de pH diferencial proposto por Giusti (2001). Neste método 0,5 mL de extrato foi diluído 1:14 em solução de pH 1,0 (0,2 mol L⁻¹ HCl) e em pH 4,5 solução acetato de sódio (1 mol L⁻¹), respectivamente. Após repouso de 15 minutos em ausência de luz as absorvâncias foram medidas em λ_{510} e λ_{700} nm respectivamente, para cada pH em espectrofotômetro de UV visível da marca Shimadzu 300.. As absorvâncias foram medidas e os resultados expressos em: miligramas equivalentes de cianidina - 3 - glicosídeo por 100 gramas de massa de amora íntegra, ou seja, (mg_{eq.} C3G / 100 g). A absorvância (A) para as amostras foram calculadas de acordo com a aplicação da Equação 1 e posteriormente as concentrações foram então calculadas aplicando a lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon bc$). A absorvidade molar (ϵ) foi determinada experimentalmente utilizando padrão de C3G.

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde A é a absorvância da amostra diluída, A_{510} média da absorvância medida em λ_{510} , e A_{700} média das absorvâncias medidas em λ_{700} .

3.1.5 Determinação de flavonóides totais

A determinação de flavonóides foi realizada de acordo com (Zhishen, *et al.* 1999), com a modificação de que o resultado foi expresso em gramas de epicatequina por quilograma de amora íntegra, ou seja, (g_{eq.} epicatequina / kg). Foi transferido 1 mL do extrato para tubo de aproximadamente 10 mL, seguido de adição de 4 mL de água deionizada (Milli-Q system, Milli-pore, Bedford, MA, USA) e 300 μ L de solução 5 % (m/v) de NaNO₂ deixando em repouso por 5 minutos.

Posteriormente, foram adicionados 300 μL de solução aquosa 10 % de AlCl_3 (m/v), deixado em repouso por 5 minutos e adicionado 2 mL de solução 1 mol L^{-1} de NaOH. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro de UV visível da marca Shimadzu 300 em comprimento de onda de 510 nm. A quantificação nas amostras foi realizada pela construção de curva de calibração usando epicatequina como padrão.

3.1.6 Otimização do processo de extração

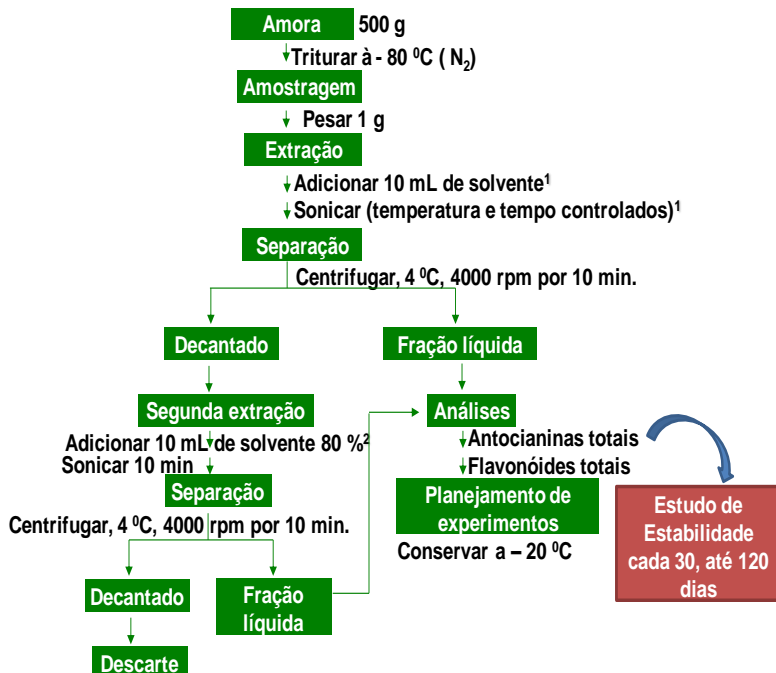
O procedimento que foi adotado para preparação dos extratos no estudo da extração pode ser mais bem exemplificado no fluxograma da Figura 12.

Após análises de antocianinas e flavonóides totais os resultados foram tratados e as amostras conservadas em congelador a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. A cada trinta dias foram refeitas as análises dos planejamentos para cada solvente testado a fim de avaliar a melhor condição de extração que fosse mais estável à degradação em período de até 120 dias de conservação.

3.1.7 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando o *software Statgraphics Centurion*. As diferenças de médias foram analisadas pelo teste de menor diferença significativa de Fisher's (LSD) (SAS Institute Inc.,1999). Todos os valores foram expressos em média \pm desvio padrão (SD), a diferença foi considerada significativa com $p < 0,05$.

Figura 12. Fluxograma do procedimento aplicado para estudo da extração.



¹ Composição do solvente extrator, temperatura e tempo de sonicação de acordo com dados das Tabelas 5 e 6. ² Solvente extrator utilizado foi MeOH ou EtOH dependendo do planejamento.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Otimização da extração de compostos bioativos da amora preta

Inúmeros trabalhos descrevem diferentes formas de preparação de extratos de amoras e outros frutos para determinação de antocianinas e componentes fenólicos. No entanto, em sua maioria apontam a temperatura e o pH como principais fatores responsáveis pela degradação dos componentes bioativos (Chen, *et al.* 2007).

Todas as formas de avaliação dos fatores que afetam a extração e possivelmente a estabilidade dos extratos foram realizadas de forma univariada, ou seja, avaliando uma das variáveis e mantendo as demais constantes. Este procedimento é válido pecando apenas na incapacidade de observar os efeitos que as variáveis em conjunto causam no processo de extração. X. Li e colaboradores (2011) utilizaram planejamento de experimentos para avaliação da melhor condição de extração de antocianinas e flavonóides em cana – de – açúcar e confirmam a relevância deste tipo de planejamento para tal avaliação (Li, *et al.* 2011).

Os resultados para a otimização da condição de extração do extrato de amora preta serão abordados em separado devido à utilização dos solventes metanol e etanol.

Vale salientar desde já, que a modelagem matemática para construção de uma superfície de resposta para determinar a melhor combinação dos fatores das variáveis avaliadas não foi possível. Assim, a discussão dos resultados, e a escolha da melhor condição de extração basearam-se naquela que fosse mais estável e mantivesse os maiores teores de antocianinas e flavonóides totais, durante o tempo de estocagem de 120 dias à -20 °C.

Todos os dados das Figuras 13 à 20 estão apresentados como a média, mais ou menos o desvio padrão. O desvio pa-

drão foi calculado à partir dos resultados da triplicata do ponto central e extrapolado para cada condição de extração (1 – 8) no seu respectivo tempo de estocagem, isto é, média \pm SD ($Pc_1 - Pc_3$). As letras diferentes (a,b,c,d,e...) indicam diferenças significativas entre tempos de estocagens para a mesma combinação dos fatores na extração, ou condição de extração de acordo com teste de diferença mínima significativa de Fisher's (LSD) ($p < 0,05$).

3.2.1.1 *Otimização usando metanol como solvente extrator*

A cada 30 até 120 dias de estocagem à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ dos extratos preparados, foram realizadas medidas de antocianinas e flavonóides totais.

Os resultados são mostrados em pares de figuras, ou seja, duas para antocianinas totais e duas para flavonóides totais. Os pares de Figuras são idênticos, apenas foram duplicadas para mostrar as diferenças estatísticas quando avaliado o efeito do tempo de estocagem para uma mesma combinação dos fatores na extração (por ex. Figura 13) e para a avaliação estatística das diferenças entre as diferentes combinações dos fatores, ou seja, diferenças entre os ensaios (1 – 8) (por ex. Figura 14).

Os resultados para antocianinas totais não mostraram diferenças estatísticas significativas com 95% de confiança para a maioria das condições de extração avaliadas (Figura 13). Estes dados demonstram que os extratos metanólicos de amora permanecem estáveis depois de 120 dias a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ de estocagem. Em outro estudo também não foram observadas variações de concentrações de antocianinas em estocagem a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ por 90 dias (Dai, *et al.* 2009).

Frente a estas observações, foi possível verificar se havia diferenças significativas entre as diferentes condições de extração independentemente do tempo de estocagem (Figura 14).

Figura 13. Avaliação quanto ao teor de antocianinas totais dentro de uma mesma condição de extração no decorrer do tempo de estocagem de até 120 dias à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. F-ratio = 0,17 – 4,20.

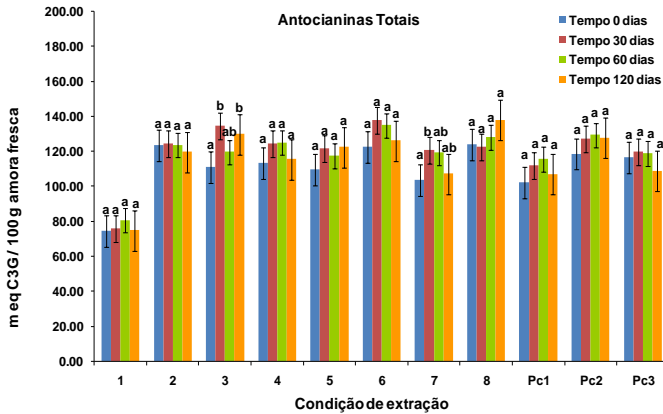
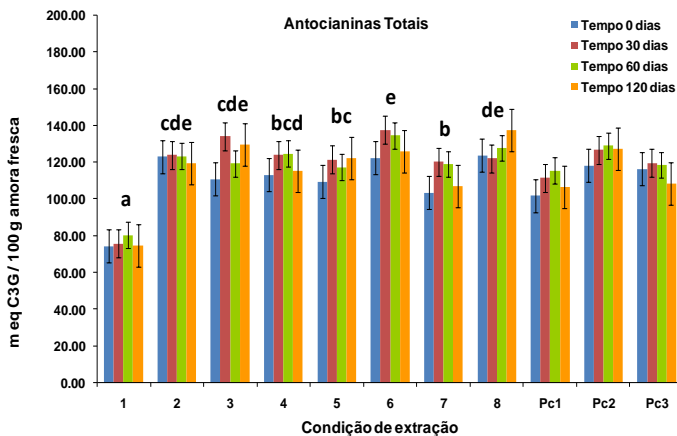


Figura 14. Avaliação quanto ao teor de antocianinas totais com relação as diferentes condições de extração. F = 25,63.



O valor de F, que neste caso é igual a 25,63, é uma estimativa da proporção entre os grupos para a estimativa dentro do grupo. Uma vez que o valor P do teste F é inferior a 0,05, existe uma diferença estatisticamente significativa entre a média dos valores de C3G de uma condição de extração para outra ao nível de confiança de 95 %.

Esta constatação de diferenças entre as condições de extração foi verificada pela aplicação do teste de *Levene's*. Este, testa a hipótese nula de que os desvios padrões dos valores de C3G dentro de cada uma das 8 condições de extração são o mesmo. De particular interesse é o valor P. Uma vez que o valor P é inferior a 0,05, existe uma diferença estatisticamente significativa entre os desvios padrão ao nível de confiança de 95 %. Isso viola um dos pressupostos importantes subjacentes à análise de variância e invalidará a maioria dos testes estatísticos padrão. Segundo o teste de *Levene's* foi realizada comparação dos desvios padrões para cada par de amostras. Os pares com p-valor abaixo de 0,05, indicam uma diferença estatisticamente significativa entre os dois sigmas no nível de significância de 5 %. Foram encontradas diferenças significativas apenas entre as condições de extração **2/3** e as condições **2/7** com valores de $P = 0,0252$ e $0,0460$, respectivamente. No entanto, as condições de extração **2**, **3** e **7** não representam as condições com as maiores concentrações de antocianinas totais.

Observa-se que os níveis mais elevados de teores de antocianinas totais são dados pelas condições **6** ($130,22 \pm 7,11$) e **8** ($127,93 \pm 6,90$), onde foram utilizados 100% de metanol como solvente extrator.

Diferentemente aos teores de antocianinas totais, os teores de flavonóides totais oscilaram com o período de estocagem (Figura 15) e com respeito às diferentes condições de extração (Figura 16).

Figura 15. Avaliação quanto ao teor de flavonóides totais dentro de uma mesma condição de extração no decorrer do tempo de estocagem à - 20 °C. F-ratio = 3,83 – 57,73.

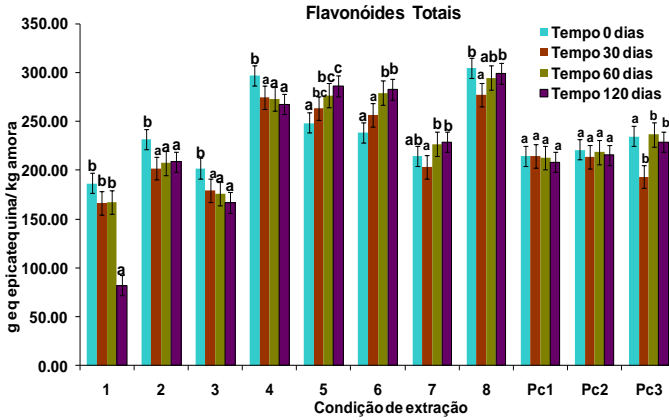
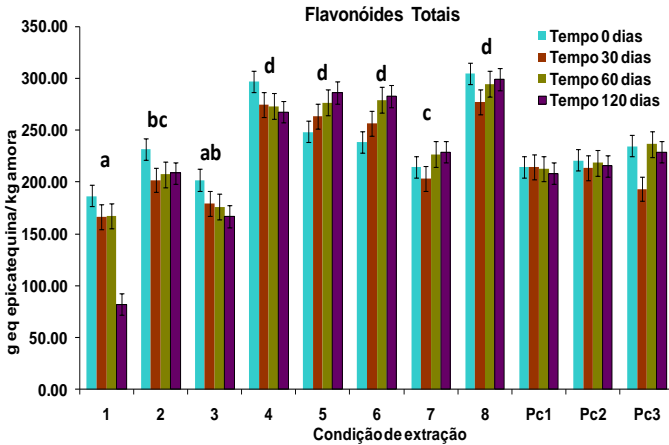


Figura 16. Avaliação quanto ao teor de flavonóides totais com relação as diferentes condições de extração. F ratio = 22,17.



Na Figura 15 observa-se tendência à diminuição nas concentrações de flavonóides totais nas condições de extração **1 a 4**, as quais foram realizadas com menores percentuais de metanol, 30 % (v/v), provavelmente devido à degradação dos flavonóides. Comportamento oposto foi verificado nas condições **5 a 7**, com virtual aumento nos teores de flavonóides totais nas extrações realizadas com 100 % (v/v) de metanol.

Os resultados mostrados na Figura 16, apontam as condições **4, 5, 6 e 8** como de maiores teores extraídos de flavonóides totais, além de não apresentarem diferenças significativas nas médias das determinações com relação ao tipo de extração.

Dado que o teor de flavonóides totais foi o parâmetro químico medido que mais oscilou frente as diferentes condições de extração e ao período de armazenamento, foi então adotada uma estratégia de avaliação multivariada. A abordagem multivariada aplicada no presente caso foi um planejamento fatorial fracionário do tipo 2_{IV}^{4-1} (quarta ordem) com triplicata no ponto central com a relação (I = 1234). Este tipo de planejamento fracionário é interessante em virtude de que os efeitos principais são confundidos com os de interação de segunda ordem (baixa significância), porém, não sendo confundidos com as interações de primeira ordem.

Para observar os efeitos de todas as variáveis frente as mudanças na extração e as condições de armazenamento, utilizou-se o seguinte fator de resposta (FR) dado pela Equação 2. Na Tabela 7 são apresentadas a matriz e as respostas para cada condição experimental.

FR = Flavonóides totais em 120 dias - Flavonóides totais em 0 dias
(Equação 2)

Tabela 7. Matriz do fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1} com níveis experimentais e respostas.

Ordem	x_1	x_2	x_3	$x_4(123)$	x_1x_2	x_1x_3	x_1x_4	FR
1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-104,7770
2	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-23,1219
3	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-35,1689
4	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-29,2224
5	-1	-1	1	1	1	-1	-1	37,7352
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	44,0572
7	-1	1	1	-1	-1	-1	1	14,1606
8	1	1	1	1	1	1	1	-5,9266
Pc₁	0	0	0	0	0	0	0	-6,2245
Pc₂	0	0	0	0	0	0	0	-5,4065
Pc₃	0	0	0	0	0	0	0	-6,0497

x_1 - Temperatura de sonicação (°C): (-1): 4; (0): 22; (+1): 44

x_2 - Tempo de sonicação (min): (-1): 5; (0): 17,5; (+1): 30

x_3 - Solvente extrator (% v/v): (-1): 30; (0): 65; (+1): 100

x_4 - Ácido clorídrico (% m/v): (-1): 0; (0): 0,1; (+1): 0,2

Os resultados obtidos utilizando-se o MeOH como solvente extrator apontam a condição de nível baixo para todos os fatores **1** (-1,-1,-1,-1), como sendo o de baixo percentual extraído. Ao passo que o nível alto para todos os fatores **8** (1,1,1,1), como sendo o de menor variação ocasionado pelo tempo de estocagem. Contudo, vale a pena ressaltar que a condição **5** (-1,-1,1,1) e **6** (1,-1,1,-1) são um tanto quanto interessantes, pois as diferenças com relação ao tempo de estocagem são bem próximos, já observado na Figura 16 como duas das condições de maior percentual de extração. A condição **6** (1,-1,1,-1) apresenta tempo de sonicação de apenas cinco minutos e ausência de HCl, enquanto que a condição **5** (-1,-1,1,1) apresenta temperatura de extração de 4 °C e 0,2 % de

HCl. Em outras palavras, tendo em consideração a diminuição no tempo de preparo do extrato, ambas as condições são interessantes. No entanto, a ausência de HCl e a dificuldade prática em manter um sistema refrigerado a 4 °C durante o processo de extração tornam a condição **6** (1,-1,1,-1) a mais adequada para o presente processo de extração.

Tabela 8. Resultado para o planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1} .

Fator	Efeito	p-valor
M	-10,90	0.0001
x_1	18,46	0.0003
x_2	-2,513	0.014
x_3	70,58	0.00002
$x_4(123)$	12,32	0.0006
x_1x_2	-25,53	0.0001
x_1x_3	-25,34	0.0001
x_1x_4	-34,27	0.00008

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, todas as variáveis foram significativas no intervalo de 95% de confiança ($p\text{-valor} > 0,05$). Do ponto de vista geral, os efeitos positivos dados para temperatura, $x_1 = 18,46$ e proporção do solvente extrator $x_3 = 70,58$ sinalizam que, em média, o percentual de extração tenderá a aumentar ao se trabalhar nos níveis altos destas variáveis. Já um efeito negativo para tempo de sonicação $x_2 = -2,513$ aponta melhoras na extração quando este fator se encontra no nível mais baixo. Os efeitos de interação $x_1x_2 = -25,53$ e $x_1x_3 = -25,34$ corroboram com estas afirmações. Apesar do efeito principal positivo dado pela variável $x_4 = 12,32$ para percentual de HCl, a variável de interação $x_1x_4 = -34,27$ apresenta maior influência (efeito) sobre o processo estudado, dessa forma mantida em seu nível mais

baixo favorece maiores teores de flavonóides totais extraídos, bem como maior estabilidade.

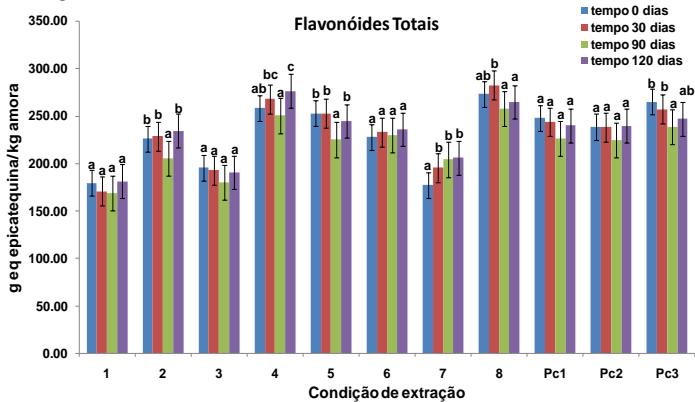
Em resumo, a aplicação do planejamento fatorial 2_{IV}^{4-1} , realizado apenas com os valores de flavonóides totais aponta a condição de extração **6** (1,-1,1,-1), como a mais adequada (ideal) para preparação de um extrato de amora preta utilizando metanol como solvente. Por fim, a obtenção de um extrato estável com maiores teores de antocianinas e flavonóides totais é estabelecida pelas condições de: temperatura de sonicação, 48 °C; tempo de sonicação, 5 min; porcentagem de metanol de 100% v/v e ausência de HCl.

3.2.1.2 Otimização usando etanol como solvente extrator

Da mesma maneira em que os resultados foram mostrados para a otimização do extrato de amora usando metanol, os resultados aplicando etanol como solvente são mostrados em pares de figuras. Isto é, duas para antocianinas totais e duas para flavonóides totais. Os pares de Figuras são idênticos, apenas foram duplicadas para mostrar as diferenças estatísticas quando avaliado o efeito do tempo de estocagem para uma mesma combinação dos fatores na extração (por ex. Figura 17) e para a avaliação estatística das diferenças entre as diferentes combinações dos fatores, ou seja, diferenças entre os ensaios (**1 – 8**) (por ex. Figura 18).

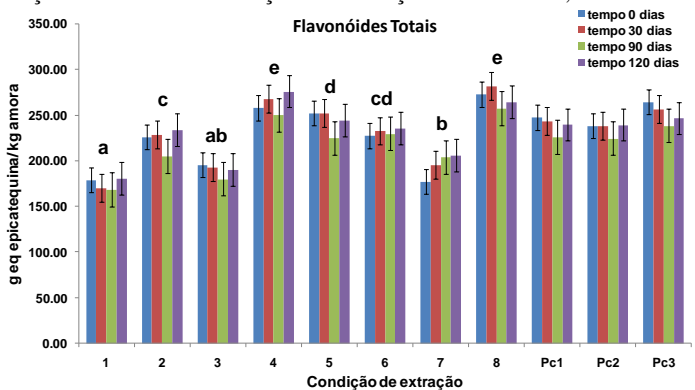
Na Figura 17, para extração usando etanol pode ser observado comportamento oposto ao observado com a realização da extração utilizando metanol como solvente. Onde para etanol os teores de flavonóides totais, mostraram-se praticamente estáveis com o passar dos 120 dias de estocagem à - 20 °C.

Figura 17. Avaliação quanto ao teor de flavonóides totais dentro de uma mesma condição de extração no decorrer do tempo de estocagem à - 20 °C. F-ratio = 0,50 – 6,80.



Já na Figura 18 são mostradas as diferenças estatísticas entre as diferentes condições de extração. Os resultados demonstram que as melhores condições para a extração, onde tem-se os maiores teores de flavonóides totais são as condições **4** (1,1,-1,-1) e **8** (1,1,1,1).

Figura 18. Avaliação quanto ao teor de flavonóides totais com relação as diferentes condições de extração. F-ratio = 45,57.



Quanto aos teores de antocianinas totais (Figura 19), observa-se tendência ao aumento nas concentrações na maioria das condições de extração (**1 – 7**). Este aumento está provavelmente associado à degradação (hidrólise) de taninos condensados (proantocianidinas). As ligações químicas entre as subunidades monoméricas nas proantocianidinas são ácidos-lábies, ou seja, a hidrólise ácida em meios alcoólicos produz antocianidinas. Em um tanino composto apenas dos monômeros (+)-catequina e (-)-epicatequina, o único produto resultante da hidrólise será cianidina (Wollgast, 2000). Ainda, o mesmo comportamento é observado para a triplicata do ponto central (**Pc₁ – Pc₃**), demonstrando que esta tendência está associada ao tempo de estocagem e não a um erro experimental.

A abordagem multivariada não foi aplicada no presente caso de extração usando etanol como solvente extrator, devido aos resultados mostrados na Figura 20. Onde as condições de extração que apresentaram maiores teores de antocianinas totais com diferença estatisticamente significativa com 95% de confiança, foram: **2, 5 e 8**.

Tendo em vista os resultados para os teores de flavonóides e antocianinas totais, a condição **8**, onde todos os fatores estão no nível mais alto contempla a condição “ideal” de extração usando etanol como solvente. Dessa forma, a condição ideal para obtenção de um extrato estável com maiores teores de antocianinas e flavonóides totais é estabelecida pelas condições de: temperatura de sonicação, 48 °C; tempo de sonicação, 30 min; 100% v/v de EtOH e HCl, 0,2 % m/v.

O estudo de otimização da extração para amora preta usando MeOH e EtOH foi realizado sugerindo aplicações futuras. A escolha das condições e tipo de solvente para extração pode ser escolhida visando a menor toxicidade do etanol, ou a praticidade e custeio para extrato feito com metanol.

O extrato administrado aos animais foi produzido de maneira diferente e independente do discutido até o presente

momento neste trabalho. Mais detalhes nos capítulos que se-
guem.

Figura 19. Avaliação quanto ao teor de antocianinas totais dentro de uma mesma condição de extração no decorrer do tempo de estocagem à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. F-ratio = 2,10 – 49,10;

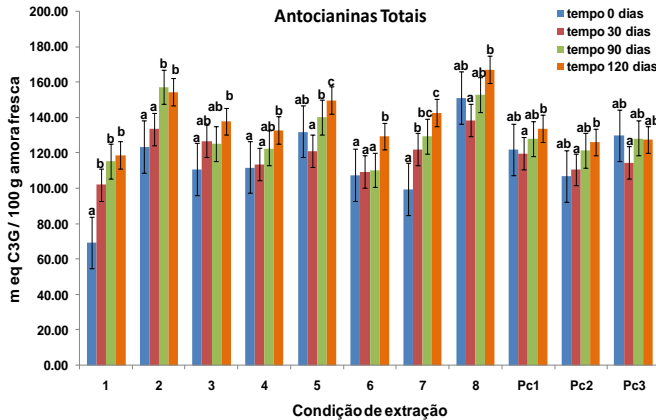
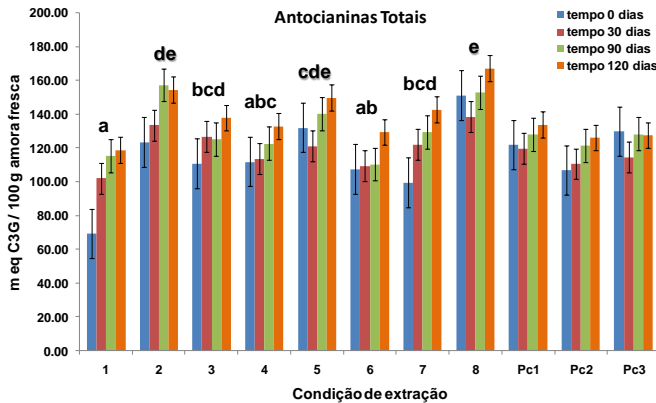


Figura 20. Avaliação quanto ao teor de antocianinas totais com relação as diferentes condições de extração. F = 4,90.



4 Caracterização química do extrato de amora preta para aplicação em estudo metabolômico

4.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1.1 Preparo do extrato de amora preta para estudo metabólico

As amoras que estavam estocadas à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (seção 3.1.2) foram utilizadas para preparação do extrato de amora preta. Primeiramente foi obtido um sólido após a liofilização dos frutos em liofilizador (Telstar, modelo Cryodos) durante 48 horas à temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e vácuo de 10^{-2} mbar. As amoras secas foram pulverizadas com mixer doméstico (Braun Multiquick5), e extraiu-se com MeOH a 80% (1:9 m/v) em ultrassom (Selecta 50 Hz.) durante 5 min. O extrato metanólico foi centrifugado a 3.500 rpm durante 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, o metanol foi completamente removido em rota- evaporador e o resíduo foi considerado como o extrato. Este procedimento foi realizado inúmeras vezes até obtenção de aproximadamente 400 mL de extrato final, que foi utilizado para preparar a dieta dos animais para estudo metabólico. Alíquotas deste extrato foram empregadas na determinação de antocianinas por HPLC e flavonóides livres por CE.

4.1.2 Caracterização química do extrato

O extrato de amora produzido foi caracterizado quanto aos teores de flavonóides antes de ser adicionado à dieta hiperlipídica para administração aos ratos. Os flavonóides determinados foram as antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção de UV e ESI-MS/MS, além do conteúdo de flavonóides livres, por eletroforese capilar com detecção de UV – Vis.

4.1.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – ESI-MS/MS)

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Acetonitrila e ácido fórmico (50%) da marca J. T. Baker (São Paulo, SP, Brasil) e Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil), respectivamente. Água desionizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) foi utilizada para preparo das soluções.

Para confirmação do perfil de antocianinas do extrato de amora administrado aos ratos foi utilizado o cromatógrafo líquido (série 1200, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). A separação foi realizada em coluna C18 Shim-pack XR-ODS (30 mm, 2.0 mm DI, 2,2 μm tamanho de partícula) Shimadzu. Várias etapas de gradiente dos solventes A (H_2O + 0,1% de ácido fórmico) e B (95:5 de ACN/ H_2O), foi aplicado. O gradiente iniciou-se com composição de fase móvel em 95% de A que foi reduzido linearmente a 5% até 25 minutos, mantido constante em 5% de A durante 5 minutos, e depois aumentada para 95% de A e re-equilibrado o sistema durante 10 minutos. Em todos os casos, o volume de injeção foi de 2 μL . A temperatura da coluna foi de 35 $^\circ\text{C}$. O sistema LC foi acoplado a um espectrômetro de massa consistindo de um híbrido triploquadrupolo/ion trap linear espectrômetro de massa QTrap 3200 (*Applied Biosystems/MDS Sciex*, Concord, Canadá). O *software Analyst* versão 1.5.1 foi utilizado para aquisição e tratamento dos dados para o LC-MS/MS. O espectrômetro de massas foi otimizado nos modos positivo e negativo de ESI por infusão de uma solução de polipropilenoglicol. Os experimentos foram realizados usando a fonte *TurboIonSprayTM* (*electrospray ESI*) no modo íon positivo (+ESI). A agulha capilar foi mantida a +4500 V. Os parâmetros para MS/MS foram: cortina de gás, 10 psi; temperatura, 400 $^\circ\text{C}$, gás 1, 45 psi; gás 2, 45 psi; gás CAD, médio.

4.1.2.1.1 Preparo da amostra para LC-MS/MS

Duas alíquotas de 200 mg do extrato de amora foram dissolvidas em 1 mL de água desionizada e as soluções foram sonicadas durante 20 minutos e centrifugadas (14000 rpm durante 2 min). Em seguida, foram diluídas (cem vezes) e injetadas no equipamento de LC-MS/MS.

4.1.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - UV)

Os extratos (amostras) foram passados em filtros de nylon de 0,45 µm e injetados no equipamento de HPLC – UV da marca Beckman, LC - 125 provido de um auto amostrador. Este equipamento possui bomba binária e detector de arranjo de diodos. A separação das antocianinas foi realizada em coluna C18 da marca Thermo Hypersil ODS de dimensões (100 mm x 4 mm; 3 µm de tamanho de partícula), acoplada a uma pré-coluna da mesma empresa de dimensões (10 mm x 4 mm e 5 µm de tamanho de partícula) a separação se procedeu a temperatura ambiente (20 °C). As fases móveis utilizadas foram A - acetonitrila e B - solução aquosa de ácido fosfórico 4 % (v/v). O fluxo de eluente foi constante em 1 mL min⁻¹, para tempo total de análise de 45 minutos por corrida em gradiente de separação de 0 – 31 min., 8 – 22 % A; 31 – 36 min. 22 – 8 % A e 36 – 45 min., 8 % de A. O volume de amostra injetada foi de 10 µL. A detecção acompanhada em 520 nm. O procedimento foi baseado em (Burdulis 2008) com modificações.

Foi construída curva de calibração para as seguintes antocianinas preparadas em metanol: cianidina – 3 – glicosídeo, cloreto de cianidina, cloreto de malvidina, cloreto de delphinidina, peonidina – 3 – O – glicosídeo, cloreto de perlagonidina, malvidina – 3 – galactosídeo e cianidina-3-galactosídeo. Os dados de tempos de retenção e espectros de

UV associados à análise por HPLC-ESI/MS/MS foram utilizados para confirmar as estruturas das antocianinas no extrato de amora.

4.1.2.3 *Electroforese capilar (CE-DAD)*

4.1.2.3.1 *Reagentes e soluções*

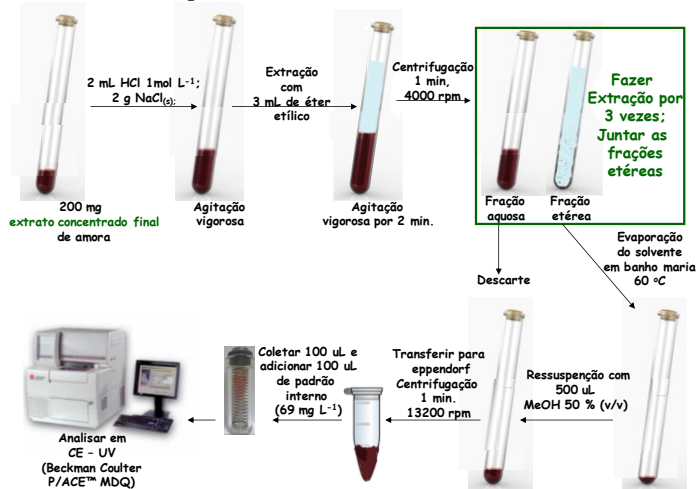
Todos os reagentes foram de grau analítico, os solventes foram de pureza cromatográfica e água desionizada foi utilizada para preparo de soluções (sistema Milli-Q). O metanol e o ácido clorídrico foram de Prolabo (Leuven, Bélgica), éter dietílico da marca Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha), hidróxido de sódio e cloreto de sódio da marca Panreac (Barcelona, Espanha). Os padrões (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, quercetina, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido protocatechuico, cianidina-3-glicosídeo foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha), ácido 4-hidroxibenzóico foi utilizado como padrão interno (IS), adquiridos de Sigma Aldrich. Todos os padrões foram preparados em concentração de 1000 mg L⁻¹ em metanol; (+)-catequina e (-)-epicatequina em 1602 mg L⁻¹ e 1917 mg L⁻¹, respectivamente. Todos foram armazenados a -18 ° C até à sua utilização. As soluções de trabalho contendo cada analito foram preparadas por diluição com água desionizada (1:9 v/v) das soluções estoque. O eletrólito de corrida (BGE) para análise foi composto de 40 mmol L⁻¹ de dodecilsulfato de sódio (SDS), 30 mmol L⁻¹ de ácido fosfórico (H₃PO₄) e 0,1% (v/v) de trietilamina (TEA) (Merck, Darmstadt, Alemanha) preparados diariamente a partir de soluções estoque de concentração 100 mmol L⁻¹ e de TEA (1% v/v). A separação ocorreu em pH 2,3.

4.1.2.3.2 *Extração dos flavonóides livres*

A extração de flavonóides livres adotada neste trabalho é baseada em Sosulski, *et al.* (1982) e Fukuji, *et al.* (2010)

com modificações. Foram pesados 200 mg do extrato final produzido segundo *sessão 4.1.1*. O extrato foi dissolvido em 2 mL de ácido clorídrico (1 mol L⁻¹) para isolamento das antocianinas (cátion flavílium) e saturou-se com 2 g de NaCl. A mistura foi homogeneizada vigorosamente. Para a extração dos flavonóides, 3 mL de éter dietílico foram adicionados e depois agitado vigorosamente por 2 min, a mistura foi centrifugada a 4000 rpm durante 1 min a 4 °C, a extração foi repetida três vezes e as três frações orgânicas foram combinadas e evaporadas em banho de água a 60 °C. O resíduo seco foi resuspenso em 500 µL de MeOH:H₂O (1:1 v/v), sonificado durante 1 min e centrifugado a 13200 rpm durante 1 min. Antes da injeção no CE, 100 µL de padrão interno (IS) ácido 4-hidroxibenzoico (69 mg L⁻¹) foi adicionado (1:1 v/v) com a amostra para volume final de 200 µL. O procedimento de extração pode ser melhor visualizado na Figura 21.

Figura 21. Procedimento de extração de flavonóides livres do extrato de amora preta.



4.1.2.3.3 Instrumentação

Todos os experimentos foram realizados em um sistema de eletroforese capilar (modelo P/ACE 5510, Beckman Instruments, Fullerton, CA, EUA), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), fixado em 200 nm, mantida a 25 °C com um dispositivo de controle de temperatura e fornecido com um *software* Beckman P/ACE SystemGold® para aquisição e tratamento de dados.

4.1.2.3.3.1 Condições de separação

As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (0,5 psi durante 10 s, 1 psi = 6,8927 kPa) e o sistema foi operado em polaridade invertida de -15 kV. Um capilar de sílica fundida sem revestimento (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), com dimensões de 30,5 cm de comprimento total, 20,5 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo foi utilizado. Novos capilares foram condicionados por lavagem de 20 psi de pressão com 1 mol L⁻¹ de NaOH (30 min.), seguido por lavagem de água desionizada (30 min.) No início de cada dia, o capilar foi condicionado por lavagens à 20 psi de pressão com 1 mol L⁻¹ de NaOH (5 min), água desionizada (5 min) seguido de solução de eletrólito BGE (15 min.) Entre as corridas, o capilar foi reconicionado com BGE (1 min. por a 20 psi). No final do dia, o capilar foi lavado com 1 mol L⁻¹ de solução de NaOH e água desionizada, 5 min cada a 20 psi.

4.1.2.3.4 Validação de método

4.1.2.3.4.1 Curva de calibração, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Para os estudos de otimização e curvas de calibração, soluções padrão em seis concentrações diferentes 26,7 - 160,2

a mg L^{-1} de (+)-catequina e 31,9 - 191,7 mg L^{-1} de (-) epicatequina foram preparadas por diluição apropriada em água desionizada, o padrão interno (IS) foi adicionado (69 mg L^{-1}) antes da análise por eletroforese capilar. A preparação e a injeção de padrões em cada nível de concentração foram realizadas em triplicata e as curvas de calibração foram construídas por meio do método dos mínimos quadrados. O LOD e LOQ foram calculados com base na curva de parâmetro de avaliação ($3,3 \times$ e $10 \times$ desvio padrão do intercepto/coeficiente angular da curva de calibração, respectivamente).

4.1.2.3.4.2 *Precisão*

A precisão intra-ensaio e instrumental do método foi estabelecido através de 7 injeções consecutivas de uma mesma amostra. Precisão intermediária (precisão inter-dia) foi avaliada através de seis injeções de uma solução padrão, em três dias diferentes. Os resultados foram expressos como a porcentagem de desvio padrão relativa (RSD%).

4.1.2.3.4.3 *Exatidão (Recuperação)*

Exatidão, expressa como a porcentagem de recuperação, foi avaliada a extração com éter dietílico para os flavonóides. Cerca de 1,0 g das mesmas amostras em pó de amora foi pesado e submetido a extração de metanol, e levados até à secura. Em seguida, as amostras foram misturadas com 200 μL da solução padrão preparada em metanol: água (1:1) em três diferentes concentrações, precisamente 53,4; 106,8 e 160,2 mg L^{-1} de (+)-catequina e 127,8; 156,7 e 191,7 mg L^{-1} para (-)-epicatequina. A mistura foi agitada vigorosamente e o procedimento de extração dos flavonóides com éter dietílico foi aplicado. Este procedimento foi realizado em duas repetições de preparação. As áreas dos picos obtidos foram comparadas com a análise de soluções padrão nas mesmas concentrações e o rendimento de extração foi calculado.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – ESI/MS/MS)

Existe uma variedade de métodos para a caracterização de antocianinas na literatura científica. As metodologias empregando a técnica de cromatografia líquida de alta performance em fase reversa com colunas C18 destaca-se das demais. De acordo com Valls, Millán *et al.* (2009), para este tipo de colunas a ordem de eluição é devido ao número de grupos hidroxila e o seu grau de metoxilação (delfinidina < cianidina < petunidina < pelargonidina < peonidina < malvidina), juntamente com o número de glicosídeos e o seu padrão de acilação (diglicosídeos < monoglicosídeos < acetilglicosídeos < cafeoil glicosídeos < coumaroil-glicosídeos)(Valls, *et al.* 2009).

Os resíduos de antocianinas foram avaliados através de monitoramento de reações múltiplas (MRM), como descrito por Valls, *et al.* (2009) e Tian, *et al.* (2005). Outros parâmetros para o ESI-MS/MS estão listadas na Tabela 9.

Tabela 9. Transições MRM de antocianinas e suas energias de fragmentação (Valls, *et al.* 2009).

Identificação	M ⁺ (m/z)	M ⁺ - X (m/z)	DP	EP	CEP	CE	CXP
Cy-3-rutinosídeo	595	287	66	3	27	69	4
Dp-3-(6-acetil)- glicosídeo	507	303	21	4	24	25	4
Dp-3-galactosídeo	465	303	26	9	23	17	4
Dp-3-glicosídeo	465	303	26	9	23	31	4
Cy-3-galactosídeo	449	287	36	8	22	19	4
Cy-3-glicosídeo	449	287	21	4	22	13	6
Dp-3-arabinosídeo	435	303	36	8	22	27	4
Cy-3-arabinosídeo	419	287	66	4	21	41	4

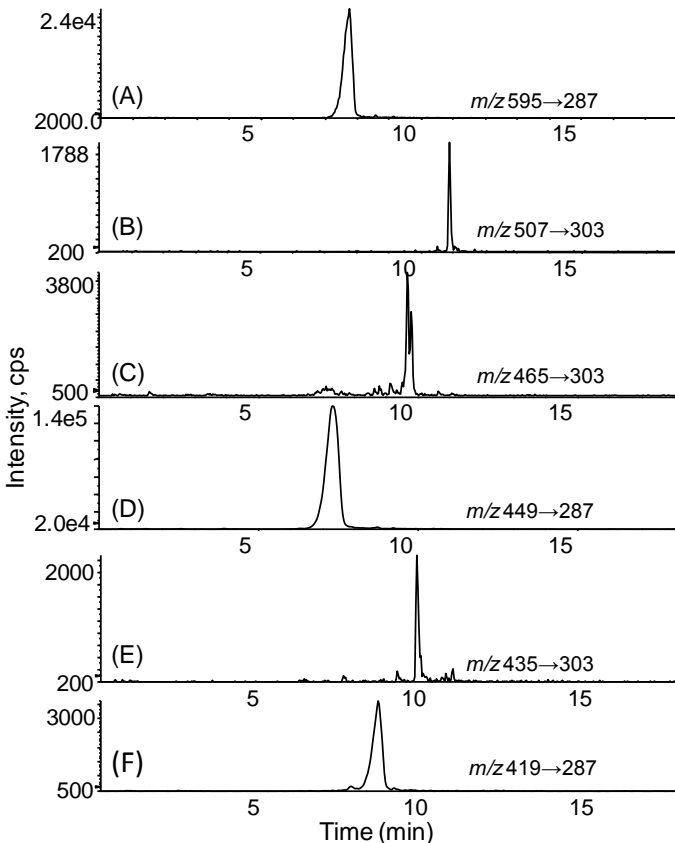
Dp: delfinidina; Cy: cianidina. Legenda: M⁺, íon molecular; M⁺ - X, íon fragmento; DP, potencial de dessolvatação; EP, potencial de entrada; CEP, potencial de entrada da célula de colisão; CE, energia de colisão; CXP, potencial de saída da célula de colisão.

Os extratos de amora-preta apresentaram padrão de fragmentação relacionado com cianidinas, assim como os que dizem respeito às delfinidinas. Ambas antocianinas podem possuir monossacarídeos como substituintes, entre eles a glicose, galactose e arabinose.

Níveis de peonidina e pelargonidinas foram encontrados em amora da variedade Lochness como a relatada por Lee, *et al.* (2012). Já no presente estudo evidencia-se que tais antocianinas não foram detectadas. A Figura 22 mostra os cromatogramas obtidos por análise de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Pode-se observar vários picos que representam um padrão de fragmentação específico. No entanto, as inferências apresentadas neste estudo são atribuídas com base em outros estudos que já identificaram os mesmos com-

postos em diferentes extratos de frutos da família berry, como framboesa preta, framboesa vermelha, mirtilo e uvas (Tian, *et al.* 2005; Seeram, *et al.* 2006). Desta forma, o pico apresentado na Fig. 22 (A) pode ser relacionado com cianidina-3-rutinosídeo e respectivo cátion aglicona cianidina (m/z 595 \rightarrow 287). A Fig. 22 (B) mostra pico com uma transição de (m/z 507 \rightarrow 303), atribuído à delfinidina-3-(6-acetil)-glicosídeo e sua delfinidina aglicona. O pico do cromatograma da Fig. 22 (C) pode ser relacionado com delfinidina-3-galactosídeo ou delfinidina-3-glicosídeo (m/z 465 \rightarrow 303), pelo fato de antocianinas galactosídeos e glicosídeos da mesma espécie de antocianinas tais como delfinidina exibem mesma massa molecular e idêntica estrutura, fato este que impossibilita diferenciar estes isômeros de antocianinas utilizando análise de MRM. Pelas mesmas razões, a Fig. 22 (D) apresenta o mesmo em relação ao caso cianidina-3-galactosídeo e cianidina-3-glicosídeo (m/z 449 \rightarrow 287). Nos cromatogramas das Figs. 22 (E) e (F) apresentam o padrão de fragmentação associados à delfinidina-3-arabinosídeo (m/z 435 \rightarrow 303) e cianidina-3-arabinosídeo (m/z 419 \rightarrow 287), respectivamente, isto é corroborado por ordem de eluição citada por (Tian, *et al.* 2005), no qual o arabinosídeos eluem após galactosídeos e glicosídeos.

Figura 22. Perfil de análise por LC-ESI/MS/MS de antocianinas em extrato de amora preta usando monitoramento de reações múltiplas (MRM). Separação em coluna C18 (30 mm, 2,0 mm DI, 2,2 μm tamanho de partícula), temperatura 35 $^{\circ}\text{C}$; injeção da amostra de 2 μL . Ionização (*electrospray ESI*) no modo íon positivo (+ESI); Parâmetros para MS/MS: cortina de gás, 10 psi; temperatura, 400 $^{\circ}\text{C}$, gás 1, 45 psi; gás 2, 45 psi; gás CAD, médio. Legenda: (A) m/z 595 \rightarrow 287 para cianidina-3-rutinosídeo; (B) m/z 507 \rightarrow 303 para delfinidina-3-(6-acetil)-glicosídeo; (C) m/z 465 \rightarrow 303 para delfinidina-3-galactosídeo ou delfinidina-3-glicosídeo; (D) m/z 449 \rightarrow 287 para cianidina-3-galactosídeo ou cianidina-3-glicosídeo; (E) m/z 435 \rightarrow 303 para delfinidina-3-arabinosídeo; (F) m/z 419 \rightarrow 287 para cianidina-3-arabinosídeo.



As análises por LC-ESI-MS/MS dos extratos de amora preta demonstraram a presença majoritária das antocianinas derivadas de cianidina e delphinidinas. Observando os cromatogramas da Figura 22 percebe-se a maior intensidade de sinal dado pela Fig 22 (D) referente à cianidina-3-galactosídeo e ou cianidina-3-glicosídeo, seguidos por Fig 22 (A) referente à cianidina-3-rutinosídeo. As antocianinas derivadas de delphinidinas estão presentes no extrato em menores concentrações.

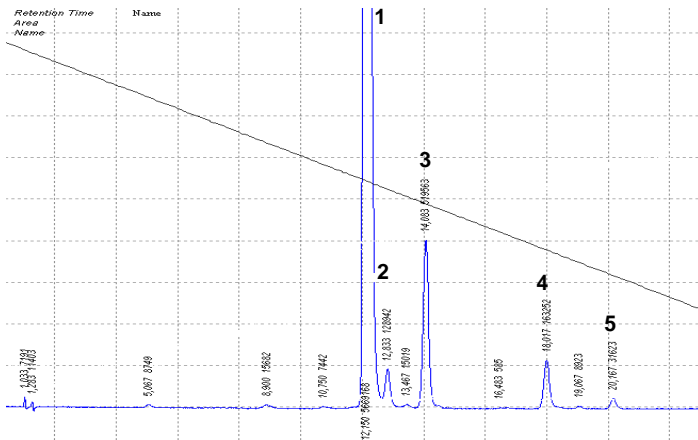
A observação descrita acima da não identificação da antocianina majoritária do extrato de amora preta motivou a busca de alternativa analítica por HPLC-UV, para verificar qual é a cianidina majoritária do extrato (Fig 22 (D)) cianidina-3-galactosídeo ou cianidina-3-glicosídeo.

4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - UV)

De acordo com método de separação de Burdulis (2008), as amostras metanólicas de extratos de amora preta foram analisadas no sistema de HPLC com detector de UV. Em um primeiro momento foram identificados a quantidade de picos cromatográficos referentes às antocianinas presentes no extrato, mostrados na Figura 23.

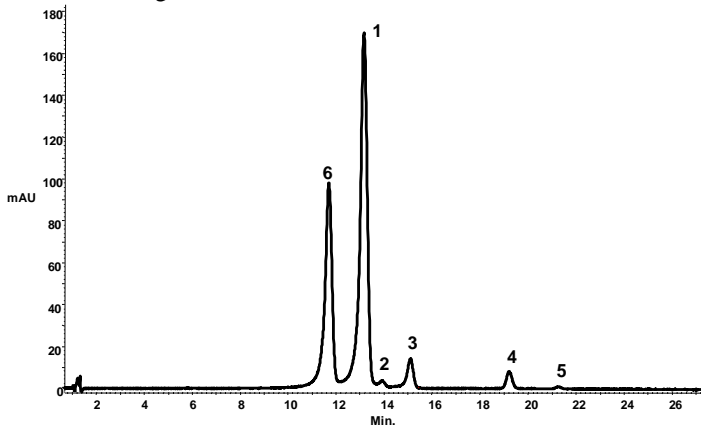
Os padrões analíticos de cianidina – 3 – glicosídeo, cloreto de cianidina, cloreto de malvidina, cloreto de delphinidina, peonidina – 3 – *O* – glicosídeo, cloreto de perlagonidina e malvidina – 3 – galactosídeo foram analisados pelo presente método de separação. No entanto, apenas cianidina – 3 – glicosídeo [Figura 23, pico (1)] foi identificada como uma das antocianinas presentes no extrato. Esta confirmação está sustentada através da comparação do tempo de retenção, espectro de UV-vis e subsequente pela adição do padrão na amostra. Os picos 2 a 5 não foram passíveis de identificação.

Figura 23. Cromatograma representativo da identificação da quantidade de picos cromatográficos referentes às antocianinas no extrato de amora-preta. A separação foi realizada em coluna C18 de dimensões (100 mm x 4 mm; 3 µm de tamanho de partícula), acoplada a uma pré-coluna da mesma empresa de dimensões (10 mm x 4 mm e 5 µm de tamanho de partícula), temperatura de 20 °C; volume de injeção, 10 µL e detecção em 520 nm. Legenda: (1) cianidiana-3-glicosídeo, (2-5) antocianinas não identificadas.



As análises por LC-ESI/MS/MS demonstraram a impossibilidade de diferenciação entre cianidina – 3 – glicosídeo e cianidina – 3 – galactosídeo devido ao perfil de fragmentação ser idêntico. Para diferenciar ambas cianidinas o padrão de cianidina – 3 – galactosídeo foi analisado, sendo adicionado na amostra de extrato de amora, Figura 24.

Figura 24. Cromatograma da adição de padrão de cianidina – 3 – galactosídeo no extrato de amora-preta. A separação realizada em coluna C18 de dimensões (100 mm x 4 mm; 3 µm de tamanho de partícula), acoplada a uma pré-coluna da mesma empresa de dimensões (10 mm x 4 mm e 5 µm de tamanho de partícula), temperatura de 20 °C; volume de injeção, 10 µL e detecção, 520 nm. Legenda: (1) cianidiana – 3 - glicosídeo; (2-5) antocianinas não identificadas; (6) cianidina – 3 – galactosídeo.



De acordo com o cromatograma da Figura 24, pode-se perceber a clara diferenciação entre as cianidinas – 3 – glicosídeo (1) com tempo de retenção de 13,16 min da galactosídeo (6), com tempo de retenção de 11,69 min.

A adição de padrão de cianidina – 3 – galactosídeo à amostra confirma a cianidina – 3 – glicosídeo como sendo a antocianina majoritária no extrato de amora preta. Em estudos da variedade *Lochness* de *Rubus fruticosus*, Fan-Chiang e Wrolstad (2005) identificaram cinco antocianinas em amoras de diferentes procedências, constatando como majoritária cianidina - 3 – glicosídeo (90,4 – 92,8 %), e em ordem decrescente cianidina – 3 - rutinosídeo (3,8 - 5,2 %), cianidina – 3 - xilosídeo (3,1 – 3,6 %), cianidina – 3 - malonilglicosídeo

(traços – 0,7 %) e cianidina – 3 - dioxialilglicosídeo (traços). (Fan-Chiang, 2005).

Com base no descrito e confirmado acima, foi realizada a quantificação do conteúdo da antocianina majoritária através da construção de curva de calibração com cianidina – 3 – glicosídeo. A medida foi realizada em 5 extratos metanólicos preparados independentemente e analisados em duplicata no sistema HPLC-UV. A quantificação nos extratos mostrou concentração média de $1032,0 \pm 2,3 \text{ mg L}^{-1}$ de cianidina – 3 – glicosídeo.

4.2.3 Eletroforese capilar (CE-DAD)

4.2.3.1 Desenvolvimento do método

Com o objetivo de melhorar a separação e quantificar as catequinas presentes, um método de cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) por eletroforese capilar em meio ácido. O método foi desenvolvido, nas seguintes etapas:

(a) Um primeiro estudo preliminar de separação foi realizado em pH elevado, com BGE preparado utilizando tetraborato de sódio (STB). A Figura 25 mostra a separação de uma mistura de padrões fenólico em que a maioria dos compostos são separados com exceção de (+)-catequina e (-)-epicatequina (condições de CE mostradas na legenda da Figura 25). Extratos metanólicos e mistura de soluções padrões foram diluídos em água antes da injeção no CE. No entanto, o teor de outros compostos na matriz de amostras de amora, tais como, antocianinas e taninos dificultaram a separação e identificação dos flavonóides presentes. Quando as amostras foram misturadas com uma solução de padrões (Fig. 25, B), a (+)-catequina e (-)-epicatequina (Fig. 25 pico 1 e 2) foram identificados. Os compostos 8, 10 e 11 (Fig. 25, C) estavam presentes em amostras de amora e a identificação não foi possível com os padrões avaliados. Rutina (pico 3) co-migrou

com o pico 8, no entanto, o espectro de UV não correlaciona com o do padrão de rutina. O pico 9 foi identificado como uma antocianina devido ao espectro de UV e à sua resposta frente adição padrão com cianidina-3-glicosídeo (antocianina majoritária quantificada no extrato). Esta identificação concorda com os resultados obtidos por Fan-Chiang, (2005), em que cinco antocianinas foram identificadas por HPLC, com detecção por UV-visível, espectroscopia de massa (ESI-MS), em extratos de *Rubus fruticosus* var. *Lochness* de diferentes origens, demonstrando que cianidina - 3 - glicosídeo (90,4 - 92,8 %) foi a mais abundante, e em ordem decrescente cianidina - 3 - rutinosídeo (3,8 - 5,2 %), cianidina - 3 - xilosídeo (3,1 - 3,6 %), cianidina - 3 - malonilglicosídeo (traço - 0,7 %) e cianidina - 3 - dioxialilglicosídeo (traço).

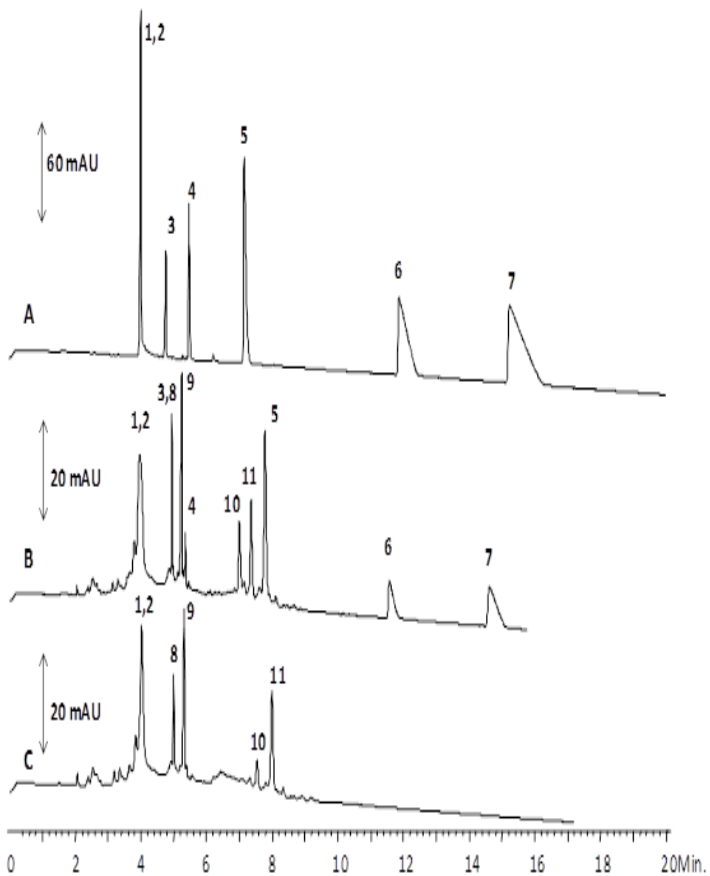
(b) Em contraste com a solução livre CE, (MEKC) permite a separação de analitos carregados e neutros na mesma análise. Quando a concentração de surfactantes, no presente estudo o SDS, permanecer acima da concentração micelar crítica (CMC), as micelas se apresentam como uma "pseudofase estacionária". Os analitos sofrem assim, partição entre as micelas (fase hidrofóbica) e o tampão (fase hidrofílica). No caso de (+)-catequina e (-)-epicatequina o principal mecanismo de separação baseia-se também nas diferenças em suas lipofilicidades (Zehrmann, *et al.* 2010).

(c) O pH baixo aplicado para extração e separação eletroforética foram usados para melhorar a estabilidade das catequinas (Herrero, *et al.* 2010). Estudos anteriores também relataram uma boa separação dos compostos polifenólicos em valores muito baixos de pH, utilizando o tensoativo aniônico de dodecilsulfato de sódio (SDS), por MEKC (Rodriguez-Delgado, *et al.* 2002).

(d) O procedimento de extração aplicado em condições ácidas (ácido clorídrico a 1 mol L^{-1}) favorece a eliminação de antocianinas presentes na amostra por deslocar o equilíbrio favoravelmente à formação do cátion flavílium, uma vez que

em pH ácido esta é a espécie predominante (Castañeda-Ovando, *et al.* 2009). As catequinas são neutras a este pH (pKa 8,0-9,5) e, portanto, a transferência destes compostos mais hidrofóbicos para a fase de éter dietílico é favorecida (López, *et al.* 2011).

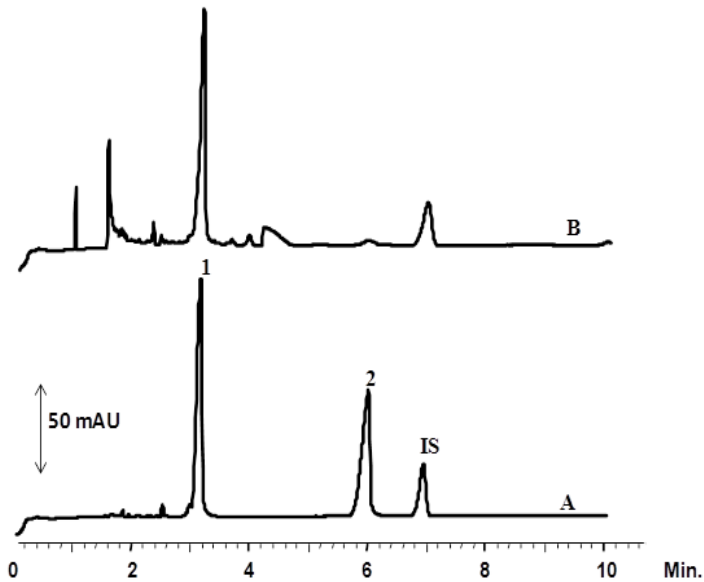
Figura 25. Eletroferograma no método de pH elevado. A separação de uma mistura de sete padrões de compostos fenólicos de 100 mg L^{-1} , (A); Adição de padrões na amostra de amora preta (50 mg L^{-1}), (B); Extrato metanólico de amora diluído em água (1:1, v / v), (C). Composição do Eletrólito (BGE): 20 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio a pH de 9,2 e metanol 30% (v/v). Condições de análise: capilar de sílica, $L_{\text{tot}} = 38,5 \text{ cm}$, $L_{\text{det}} = 28,5 \text{ cm}$, $50 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno; 0,5 psi, 10 s de injeção hidrodinâmica; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; +30 kV de tensão aplicada, detecção direta em 200 nm. Legenda: (+)-catequina e (-)-epicatequina (1,2), rutina (3), quercetina (4), ácido ferúlico (5), ácido gálico (6), ácido protocatechuico (7), cianidina- 3-glicosídeo (9) e não identificados (8,10 e 11).



A (+)-catequina e (-)-epicatequina foram identificadas como os flavonóides livres predominantes na amora preta. O procedimento de extração com solvente orgânico foi aplicado para soluções padrão e amostras de amora (Figura 26, A e B,

respectivamente) para validar os métodos de extração e separação MEKC.

Figura 26. Solução padrão, 50 mg L⁻¹ (A) e amostra de amora de extração orgânica (B). Legenda: (-)-epicatequina (1), (+)-catequina (2) e ácido 4-hidroxibenzoico, 69 mg L⁻¹, (IS). Composição do BGE: ácido fosfórico, 30 mmol L⁻¹; SDS, 40 mmol L⁻¹ e TEA, 0,1% (v/v) a pH 2,3. Condições analíticas: capilar de sílica não revestido, L_{tot} = 30,5 cm, L_{det} = 20,5 cm, 50 µm de diâmetro interno; 0,5 psi; 10 s de injeção hidrodinâmica; 25 °C; -15 kV tensão aplicada, detecção direta em 200 nm. Tempo de análise total, 10 min.



Em estudo realizado por Jacques e colaboradores (2010), foi avaliado o conteúdo de compostos fenólicos da amora-preta (*Rubus fruticosus*) variedade Tupy, onde, além do conteúdo de antocianinas totais, realizaram identificação e quantificação de outros fenólicos, dentre os quais: ácido hidróxibenzoico (0,0144 mg 100 g⁻¹), ácido gálico (350,490 mg

100 g⁻¹), quercetina (20,230 mg 100 g⁻¹), ácido cafeico (15,400 mg 100 g⁻¹), ácido ferúlico (35,700 mg 100 g⁻¹) e epicatequina (120,179 mg 100 g⁻¹). Foi demonstrado que o ácido gálico foi o ácido fenólico majoritário na amora-preta seguido pelo flavanol epicatequina (Jacques, 2010).

As discrepâncias entre os compostos majoritários encontrados em amora-preta podem estar associadas às diferenças nas cultivares, já que esses autores utilizaram amora-preta *Rubus fruticosus* da variedade Tupy. O ácido gálico na variedade Lochness (presente estudo), se estivesse em quantidades apreciáveis seria passível de detecção no teste preliminar realizado em separação por CE em pH alto, ver condições na Figura 25.

4.2.3.2 Validação do método

Todos os parâmetros de validação relevantes (linearidade, seletividade e precisão) estão resumidos na Tabela 10. A faixa linear da curva de calibração de 31,9 - 191,7 mg L⁻¹ foi estabelecida para (-)-epicatequina e 26,7 - 160,2 mg L⁻¹ para (+)-catequina, com $R^2 \geq 0,9979$. Os valores de LOD e LOQ para este método foram 2,2 e 6,7 mg L⁻¹, 10,4 e 31,3 mg L⁻¹ para (-)-epicatequina e (+)-catequina, respectivamente, obtidas a partir da curva de calibração externa realizada de acordo com a extração com dietil éter.

Os resultados para avaliação da precisão instrumental mostraram-se adequados com valores de RSD de área dos picos e no tempo de migração de 4,70% e 3,94%, respectivamente, estes foram determinados, com uma mistura de padrões e com amostras. Para a precisão inter-ensaio, os valores de RSD foram inferiores a 10% para a área e o tempo migração. Os valores de RSD mostraram-se adequados para este método de acordo com a complexidade das amostras, o método de extração e determinação.

A seletividade foi estudada através do método de adição de padrão à amostra adicionados em volume de 200 μ L preparados com mistura MeOH:água (1:1). Para excluir interferências da amostra na análise, o padrão foi adicionado em três níveis diferentes de concentração e os valores foram comparados com os de recuperação (Tabela 10). Com base nesta comparação, pôde-se constatar baixa interferência uma vez que os valores de recuperação variaram entre 107,5 e 116,5 % para (-)-epicatequina, e entre 116,3 e 127,9% para (+)-catequina. Dessa forma, não há necessidade de utilizar a adição de padrão para quantificação de cada amostra, uma vez que a curva de calibração construída com soluções padrões passando pelo processo de extração com solvente orgânico mostrou-se válida.

Tabela 10. Parâmetros de validação do método.

Parâmetros	Analito	
	(-)-epicatequina	(+)-catequina
Faixa linear (mg L ⁻¹)	31,9 – 191,7	26,7 – 160,2
Intercepto (L mg ⁻¹)	- 0,1720 ± 0,0044	-0,1821 ± 0,0269
Coefficiente angular	0,0065 ± 0,0006	0,0086 ± 0,0005
Coefficiente de determinação ^(a)	0,9998	0,9976
LOD (mg L ⁻¹) ^(b)	2,2	10,4
LOQ (mg L ⁻¹) ^(b)	6,7	31,4
Precisão Instrumental, RSD (%) – área do pico ^(c)	2,82 ^(h) / 2,55 ⁽ⁱ⁾	4,70 ^(h) / 1,65 ⁽ⁱ⁾
Precisão Instrumental, RSD (%) – tempo de migração ^(c)	2,65 ^(h) / 3,94 ⁽ⁱ⁾	3,61 ^(h) / 2,09 ⁽ⁱ⁾
Precisão Intra-ensaio, RSD (%) – área do pico ^(c)	2,33 ^(h) / 4,80 ⁽ⁱ⁾	4,05 ^(h) / 3,58 ⁽ⁱ⁾
Precisão Intra-ensaio, RSD (%) – tempo de migração ^(c)	1,64 ^(h) / 1,09 ⁽ⁱ⁾	0,96 ^(h) / 2,80 ⁽ⁱ⁾
Precisão Inter-ensaio, RSD (%) – área do pico ^(c)	4,26 ^(h) / 5,17 ⁽ⁱ⁾	3,19 ^(h) / 5,03 ⁽ⁱ⁾
Precisão Inter-ensaio, RSD (%) – tempo de migração ^(c)	2,01 ^(h) / 5,25 ⁽ⁱ⁾	5,52 ^(h) / 8,91 ⁽ⁱ⁾
Recuperação ^(d, e) (% de 127,8 mg L ⁻¹) ^(f) (% de 53,4 mg L ⁻¹) ^(g)	116,5	116,3
Recuperação ^(d, e) (% de 156,7 mg L ⁻¹) ^(f) (% de 106,8 mg L ⁻¹) ^(g)	109,5	127,9
Recuperação ^(d, e) (% de 191,7 mg L ⁻¹) ^(f) (% de 160,2 mg L ⁻¹) ^(g)	107,5	121,0
Quantificação no extrato de amora (mg L ⁻¹) ⁽ⁱ⁾	498,66 ± 7,51 (1,51 %) ^(k)	<LOQ

^(a)(R²) para valores de n = 6, cada ponto da curva medidos em triplicata, após procedimento de extração com éter dietílico. ^(b)LOD = (3.3 x s) / S, LOQ = (10 x s) / S. Onde s é o desvio padrão do intercepto e S é o coeficiente angular da equação da curva de calibração. ^(c)RSD = (P/ \bar{u}) x 100; onde P é o desvio padrão relativo e \bar{u} é a média aritmética das razões da área do analito dividido pelo padrão interno, ou a média aritmética dos valores de tempo de migração. RSD para precisão instrumental (n = 7), precisão Intra-ensaio (n = 7)

e precisão Inter-ensaio ($n = 6$). ^(d)Recuperação usando aproximadamente 200 mg de extrato de amora aplicando o procedimento de extração com éter etílico proposto para determinação de (+)-catequina e (-)-epicatequina. ^(e)Resultados das médias de duplicata de preparação e determinação em triplicata para cada nível adicionado. ^(f)Concentração de (-)-epicatequina padrão adicionado. ^(g)Concentração de (+)-catequina padrão adicionado. ^(h)Valores correspondentes à determinação no extrato de amora (amostra). ⁽ⁱ⁾Valores correspondentes à determinação na mistura de padrões. ^(j)Quantificação realizada com ($n = 5$) de extração e determinação em duplicata. ^(k)Coefficiente de variação médio.

Foram preparados 5 extratos de amora preta, seguido da realização da extração sólido-líquido com éter dietílico e determinação em duplicata dos flavonóides livres de acordo com o método proposto por eletroforese capilar. Epicatequina foi identificada e quantificada nos extratos preparados com concentração de $498,66 \pm 7,51 \text{ mg L}^{-1}$ considerando o extrato líquido original com coeficiente de variação médio de 1,51 %. Os teores de catequina apresentaram-se inferiores ao limite de quantificação (LOQ) do método, no entanto, não podemos descartar sua presença em níveis traços $< 10,4 \text{ mg L}^{-1}$ dado pelo limite de detecção (LOD) do método.

**5 Análises metabolômicas por UPLC- ESI – QtoF/MS em
plasma de ratos e efeitos sobre hiperlipidemia**

5.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

5.1.1 Desenho experimental de aplicação nas cobaias

Foram utilizados 60 ratos procedentes do Biotério da Universidade San Pablo - CEU, sendo 30 machos e 30 fêmeas da linhagem *Sprague Dawley*. Ao longo do experimento, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 animais por gaiola) em condições controladas (22 ± 2 °C, $55 \pm 10\%$ de umidade relativa e ciclo constante claro/escuro de 12 h, com ventilação contínua). Os ratos foram alimentados com uma dieta de pelete padrão (Harlan, Global Diet 2014, Madison, MI) (Tabela 11), durante 5 dias. Após este período de ambientação dos animais, eles foram atribuídos aleatoriamente à um dos três grupos de tratamento dietético: os grupos padrão (Std, foram mantidos com dieta padrão, ao passo que os outros dois foram mantidos com a dieta de cafeteria (Caf). A composição e conteúdo calórico das dietas são apresentados nas Tabelas 12 e 13. Metade dos animais do grupo de dieta Caf foi suplementada com 13 g de extrato de amora/100 g, denominado de grupo cafeteria + extrato de amora (CafR), enquanto a outra metade foi suplementada com 13 g de água/100 g (grupo cafeteria). As dietas Caf e CafR foram armazenadas a -20 °C até o uso. Os ratos tiveram acesso livre à dieta e a água.

Tabela 11. Composição da dieta pelete padrão (Std).

Ingredientes	%(m/m)
Carboidratos	64,0
Lipídeos (extrato etéreo)	4,0
Proteínas bruta	14,5
Fibras brutas	4,5
Cinzas	4,7

Tabela 12. Composição das dietas por 100 g.

Ingredientes	Dieta Std	Dieta Caf	Dieta CafR
Peletes padrão ¹	100	23	23
Leite condensado ²	-	35	35
Açúcar ³	-	7	7
Muffins ⁴	-	6	6
Croissants ⁵	-	6	6
Leite em pó ⁶	-	15	15
Gordura suína ⁷	-	8	8
Água	-	13	-
Extrato de amora	-	-	13

¹Harlan, Global Diet 2014, Madison, MI; ²Nestlé, Barcelona; ³Azucarera, Madrid; ⁴Panrico SA, Barcelona; ⁵Bimbo, Barcelona; ⁶Central lechera Asturiana, Asturias; ⁷El Pozo, Murcia.

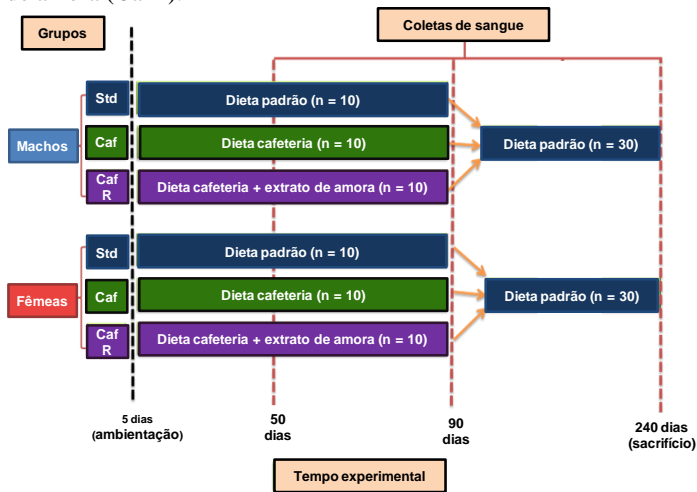
Tabela 13. Conteúdo calórico das dietas padrão (Std), cafeteria (Caf) e cafeteria + extrato de amora (CafR) por 100 g de dieta.

Ingredientes	Dieta Std (kcal)	Dieta Caf (kcal)	Dieta CafR (kcal)
Peletes padrão	310,0	71,3	71,3
Leite condensado	-	175,0	175,0
Açúcar	-	28,0	28,0
Muffins	-	27,3	27,3
Croissants	-	27,2	27,2
Leite em pó	-	73,5	73,5
Gordura suína	-	72,0	72,0
<i>Extrato de amora</i>	-	0	0
Total (kcal/100g)	310,0	474,3	474,3

A Figura 27 mostra o desenho experimental adotado para tratamento com dietas e coleta de sangue para avaliação metabólica. Após o período de ambientação dos animais de 5 dias, estes foram alimentados com as respectivas dietas por período total de 90 dias. Após os 90 dias, todos os grupos

receberam a dieta padrão (Std) até 240 dias quando foram sacrificados por decapitação. O período de 90 dias foi estabelecido como limite máximo de alimentação com as dietas baseando-se na idade dos animais (fase adulta), simulando assim os efeitos de uma dieta hiperlipídica em humanos até a idade adulta. Após os 90 dias, os animais receberam dieta Std, para observar se os animais que receberam as dietas de Caf e CafR poderiam estar sofrendo efeitos da dieta hiperlipídica e suplementada com extrato de amora preta até o final da vida (considerado como tempo experimental de 240 dias).

Figura 27. Desenho experimental para avaliação dos efeitos metabólicos de dietas em cobaias. Legenda: Fêmeas (F), Machos (M) e respectivas dietas: padrão (Std), cafeteria (Caf) e cafeteria + extrato de amora (CafR).



A coleta de sangue para extração do plasma para análise metabólica foi realizada através de um pequeno corte na cauda dos animais e aproximadamente 200 μL de sangue coletado em frascos de 2 mL. Posteriormente foram adiciona-

dos 25 μL de solução anti-coagulante de EDTA (1 g L^{-1}), seguido de evaporação da água, em estufa (37 °C). A mistura foi centrifugada à 3000 rpm durante 30 min a 40 °C e coletou-se aproximadamente 100 μL do plasma que foi armazenado a -80 °C até o dia da análise. Entre os passos de extração do plasma, as amostras foram conservadas em banho de gelo.

O delineamento da experimentação animal, grupos de dieta e todos os experimentos foram aprovados pelo *Comité Ético para la Investigación con Animales de la Facultad de Farmacia de la Universidad San Pablo – CEU*, e eles estão de acordo com o Tratado de Amesterdã e legislação espanhola (RD 223/1988).

5.1.2 Extrato de amora preta

O extrato de amora preta foi obtido de acordo com o descrito na *seção 4.1.1*. Os aproximadamente 400 mL do extrato final obtido foi utilizado para preparar a dieta dos animais para o grupo dieta cafeteria + extrato de amora (CafR) no estudo metabólico.

5.1.3 Perfil de ácidos graxos das dietas

Para a análise do perfil de ácidos graxos nas dietas, o ácido nonadecenóico (19:1) (Sigma Chemical Co.), foi utilizado como padrão interno para alíquotas de cada dieta, que foram utilizadas para a extração e purificação dos lipídios (Folch, *et al.* 1957). O extrato final de lipídeos foi evaporado até a secura sob vácuo e o resíduo ressuspenso em metanol/tolueno (4:1) e submetido a metanólise na presença de 200 μL de cloreto de acetila (CH_3COCl) a 80 °C durante 2,5 h (Amusquivar, 2011). Os ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAME) foram separados e quantificados em sistema CG-FID da Perkin-Elmer (Autosystem; Norwalk, Connecticut) utilizando coluna capilar Omegawax de dimensões 30 m x 0,25

mm (Supelco, Bellefonte, PA). Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste, e os tempos de retenção dos FAMES foram comparados com padrões (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). A quantificação dos ácidos graxos nas amostras foi realizada como uma função das áreas dos picos correspondentes em comparação com o padrão interno.

5.1.4 Análises metabolômicas por UPLC-ESI-QToF/MS

5.1.4.1 Reagentes

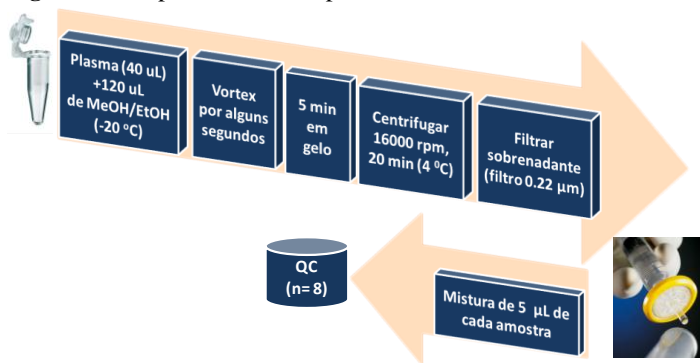
Todos os solventes orgânicos foram de grau LC-MS como metanol e acetonitrila e grau analítico para ácido fórmico e etanol, todos obtidos de Fluka Analytical (Sigma – AldrichChemie GmbH, Steinheim, Germany). Água ultrapura da Milli-Q plus 185 system (Millipore, Billerica, MA, USA) foi utilizada para preparação dos componentes aquosos da fase móvel para separação cromatográfica.

5.1.4.2 Preparação da amostra de plasma

No total, 157 amostras de plasma foram preparadas e analisadas em ambas as polaridades de ESI. As amostras de plasma foram descongeladas à temperatura ambiente em banho de gelo. Para remover proteínas das amostras 3 volumes (120 μ L) da mistura MeOH/EtOH 1:1 (v/v) arrefecida com gelo foram adicionados para cada amostra de plasma (40 μ L), misturado e incubado sobre gelo por 5 min. Após, foram misturadas em vórtex por alguns segundos e centrifugadas a 16000 rpm, 4 °C durante 20 minutos (centrífuga Eppendorf 5415R). O sobrenadante foi coletado e filtrado através de um filtro de nylon de 0,22 μ m diretamente no frasco para análise no sistema UPLC-ESI-QToF/MS (50 μ L de amostra, aproximadamente).

Os controles de qualidade (QC), no total de oito ($n = 8$) replicatas foram preparados pela mistura de volumes iguais de todas as amostras após processo de desproteínização das amostras. O volume foi de ($5 \mu\text{L}$) de cada amostra de plasma. As amostras de QC foram injetadas no início das análises e a cada seis injeções das amostras para avaliar a estabilidade e desempenho do sistema (Gika, *et al.* 2008). A etapa do preparo das amostras pode ser visualizada na Figura 28.

Figura 28. Preparo de amostra para análise metabolômica.



5.1.4.3 Instrumentação UPLC – ESI-QToF/MS

As análises de plasma para um fluxo de trabalho de análise não dirigida em metabolômica foram realizadas utilizando o sistema UPLC (Agilent 1290 Infinity Sistema LC) consistindo de um desgaseificador, duas bombas binárias e auto-amostrador termostatizado ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) acoplado com o sistema Q-ToF-MS (6550 iFunnel, Agilent Technologies). As amostras de plasma foram injetadas em volume de $0,5 \mu\text{L}$ em coluna de fase reversa Zorbax Extend C18 ($2,1 \times 50 \text{ mm}$, $1,8 \mu\text{m}$, Agilent Technologies) termostatizada em $60 \text{ }^\circ\text{C}$. A composição das fases móveis foi: A - água com $0,1\%$ (v/v) de

ácido fórmico e B - ACN, com 0,1% de (v/v) de ácido fórmico. O gradiente de separação com vazão constante de 0,6 mL min⁻¹ foi iniciada a 5% da fase B até ao primeiro minuto, subindo para 80% 1-7 min., depois para 100% em 7-11,5 min e voltando a 5% da fase B de 12 a 15 min (re-equilíbrio do sistema). As amostras foram analisadas em ambos os modos de ionização por eletrospray, positiva (+)ESI e negativo (-)ESI, em análises separadas para MS e para MS/MS, operados, respectivamente, no modo de varredura completa 50 - 1000 *m/z* para positivo e 50 - 1100 *m/z* para o modo negativo. Os dados foram coletados no modo centroide a uma taxa de 1,0 espectros por segundo (2 GHz). A voltagem do capilar foi ajustada para 3 kV para o modo de ionização positivo e negativo; voltagem do fragmentador foi ajustado em 175 V para positivo e 250 V para o modo de ionização negativo, a vazão de fluxo de gás de secagem foi de 12 L min⁻¹ a 250 °C e gás nebulizador em 52 psi. Para garantir a precisão de massa, a calibração interna contínua foi realizada durante as análises pelo sistema de calibragem automática utilizando um fluxo de duplo-jato de ionização por electrospray de solução de calibração, que compreende massas de referência para *m/z* 121,050873 (purina) e *m/z* 922,009798 (HP-0921, hexaquis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoxi)phosphazine) para modo de íon positivo e *m/z* 112,985587 (trifluoroacetato de amônio) e *m/z* 1033,988109 (HP-0921) para modo íon negativo. As amostras foram injetadas em ordem aleatória em dois ensaios (para o modo de íons positivos e negativos). No início de cada experimento, uma sequência de 10 injeções das amostras de QC foi utilizada para condicionamento da coluna antes das análises das amostras propriamente ditas.

5.1.4.4 Tratamento de dados e análise estatística

O *software* MassHunter Workstation LC-MS Data Acquisition, versão B.05.00 (Agilent Technologies) foi utilizado para controle e aquisição dos dados. O reprocessamento de todos os dados obtidos por UPLC-ESI-QToF/MS foi realizado pela aplicação do *software* MassHunter Qualitative Analysis B.03.00 (Agilent Technologies). Os arquivos de dados resultantes foram “limpos” quanto a ruídos da linha base e íons não relacionados pela ferramenta de extração das entidades moleculares (Molecular Feature Extraction – MFE) que utiliza algoritmo baseado na medida da massa e características cromatográficas como: especificação do possível estado de carga (+2 para lipídeos), agrupamento isotópico ou presença de dímeros e adutos [(+ESI): $+H^+$, $-H^+$, H_2O e (-ESI): $+H^+$, $-H^+$, $+HCOO^-$, H_2O]. Após o reprocessamento dos dados foram gerados arquivos em formato (.cef files) para cada amostra.

A segunda etapa do reprocessamento dos dados deu-se utilizando os arquivos em formato (.cef). Onde, cada composto é descrito por uma única massa exata (m/z), tempo de retenção (t_R) e abundância. Os arquivos de dados foram tratados no *software* MassProfiler Professional (MPP), versão B.12.1 (Agilent Technologies). Para comparar os dados entre as amostras, o alinhamento de picos deve ser realizado. O alinhamento foi realizado com base nas semelhanças de m/z e t_R dentro das amostras e, por conseguinte esforço especial deve ser tomado para ajustar corretamente a janela de t_R e massa para o composto em alinhamento. No presente estudo a janela de t_R para o alinhamento foi ajustada entre 0,6 – 12,5 minutos dos cromatogramas. Os parâmetros de variação estabelecidos para alinhamento de um mesmo composto em diferentes amostras foram de 0,1% para t_R e 20 ppm para a massa. O alinhamento foi realizado, restringindo o número de íons e estados de carga definidos anteriormente durante a extração

dos MFE. Ao final, obtem-se os dados alinhados e arquivos em formato (.txt) para posterior utilização em *softwares* como MS Excel (Microsoft Office 2007) e SIMCA-P+ 12.0 (Umetrics, Umea, Sweden).

A etapa de pré-tratamento dos dados foi realizada através da aplicação do *software* SIMCA-P+ 12.0 (Umetrics, Umea, Sweden), onde os dados em formato (.txt) foram submetidos à transformação dos dados para reduzir a influência de potenciais *outliers*. Para tanto, foi aplicada a transformação logarítmica. Conjuntamente, o escalonamento dos dados é desejável para ajustar a importância atribuída às abundâncias dos dados na adequação do modelo matemático. Dessa, forma o escalonamento aplicado foi o de Pareto.

A etapa de tratamentos dos dados foi realizada primeiramente pela aplicação de um filtro de presença pela aplicação de *Filter by flags* (FbF). O tratamento dos dados, tanto filtros e análise estatística foram realizados para cada gênero e comparação entre dietas separadamente: i) Caf vs Std – efeitos da dieta hiperlipídica; ii) CafR vs Caf – potencial efeito nutracêutico do extrato de amora. Foi aplicado FbF um filtro de 100, ou seja, que os compostos estivessem presentes em 100 % das amostras de pelo menos em uma das dietas em comparação. FbF foi realizado no *software* MPP. A análise estatística univariada (UVA) e multivariada (MVA) foi realizada após o FbF para cada comparação separadamente: i) Para UVA o teste *t* ($p < 0,05$), assumindo variância desigual teste *t* de Welch's utilizando *software* MPP; ii) Para MVA foram aplicados PCA, PLS-DA e OPLS-DA foram realizados utilizando SIMCA P + 12,0 (Umetrics, Umea, Suécia).

Para a validação analítica foram verificadas as curvas de pressão das análises em LC e posteriormente os cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos para cada amostra analisada. Então os dados reprocessados (depois de MFE) foram examinados de acordo com o número de características extraídas por amostra e seus sinais totais (MSTS). As amostras e os

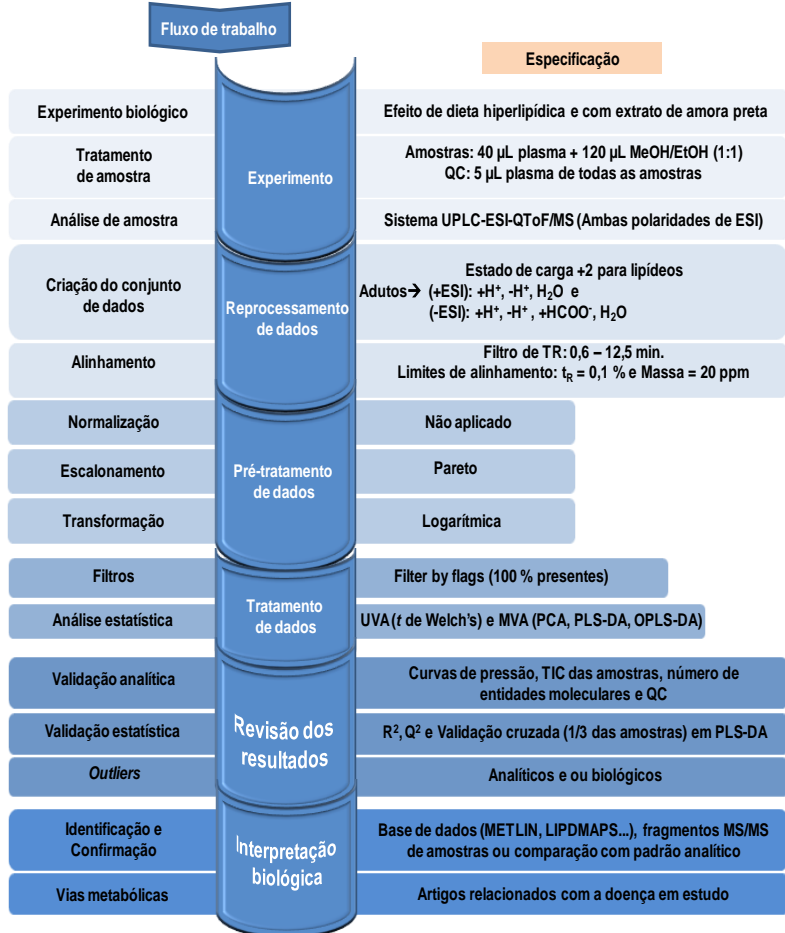
controles de qualidade (QC) das amostras foram avaliados separadamente. Quanto à validação estatística, esta foi verificada pelos valores das qualidades do moldeos R^2 (variância, qualidade do modelo) e Q^2 (preditor da variância, previsibilidade do modelo) verificados para todas as avaliações MVA de PCA, PLS-DA e OPLS-DA. A validação cruzada foi realizada para os modelos de PLS-DA, onde 1/3 das amostras foram utilizadas para a previsão. A verificação de *outliers* foi realizada desde a validação analítica até a estatística por serem possíveis a presença do tipo analítico ou biológico.

A identificação putativa dos metabólitos foi realizada utilizando a massa exata das entidades moleculares “*molecular features*” significativos estatisticamente extraídos dos modelos de OPLS-DA para cada caso de comparação. Para tanto, foram utilizadas as bases de dados *online* de METLIN (<http://metlin.scripps.edu>). A confirmação dos metabólitos foi realizada por análise de LC-MS/MS usando QToF (6550 system, Agilent Technologies) com as mesmas condições cromatográficas das amostras. Os íons a serem confirmados foram alvo de fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID) em função da massa exata previamente determinada e do tempo de retenção. A comparação da estrutura do composto proposto com os fragmentos obtidos, bem como comparação de tempo de retenção e distribuição isotópica foram efetuadas por comparação com padrões analíticos quando disponíveis comercialmente. Caso contrário, com a massa exata e a distribuição isotópica na amostra os *softwares* MassHunter molecular Structure Correlator versão B.05.00 (Agilent Technologies) e ChemSketch, MS Fragmenter (ACD/Labs) foram utilizados para elucidar a estrutura química dos metabólitos sempre tendo como base os dados de identificação pelas base de dados de METLIN (<http://metlin.scripps.edu>), HMDB (<http://hmdb.ca>), KEGG (<http://genome.jp/kegg>) e LipidMaps (<http://lipidmaps.org>) para levar a uma confirmação definitiva dos metabólitos.

A correlação e interpretação dos metabólitos com rotas metabólicas específicas, bem como sua atuação no organismo e sua correlação com determinadas enfermidades foi realizada através de pesquisa em livros e artigos científicos especializados.

Na Figura 29 pode ser visualizado um resumo das etapas de fluxo de trabalho aplicado para análise metabolômica por UPLC-ESI-QToF/MS em estudo com plasma de ratos na avaliação dos possíveis efeitos nutracêuticos de dieta hiperlipídica com extrato de amora preta.

Figura 29. Fluxo de trabalho simplificado para estudo metabolômico aplicado no presente estudo.



5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em um estudo metabolômico, as etapas do fluxo de trabalho (Figura 29), não são necessariamente lineares. Por exemplo, a etapa de “Revisão dos Resultados” deve ocorrer como parte das outras etapas para averiguar a qualidade dos dados antes do processamento dos dados, identificando, desde o princípio, potenciais *outliers*. Desta maneira, a revisão dos resultados acontece periodicamente durante todo o fluxo de trabalho (Godzien, *et al.* 2013).

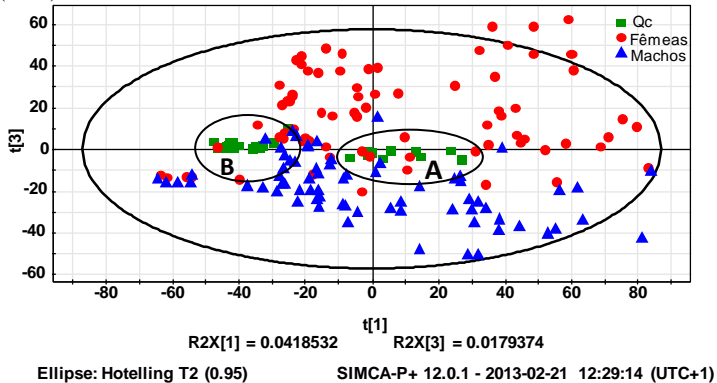
5.2.1 Validação analítica e detecção de outliers

Todas as 157 amostras mais as amostras de QC foram analisadas primeiramente em polaridade positiva e posteriormente em negativa de ESI, sendo os dados tratados e processados nesta mesma ordem. A preparação das amostras foi a mesma para ambas as polaridades de análise. Assim, a identificação de *outliers* biológicos e/ou analíticos como amostras hemolisadas, se verificadas em uma polaridade estas podem ser descartadas automaticamente na outra. Esta verificação deve ocorrer antes da sequência das etapas de tratamentos dos dados. Dessa forma, nesta seção serão mostrados resultados de validação focados na polaridade positiva, e quando pertinente serão abordados os resultados em polaridade negativa de ESI.

A primeira etapa de avaliação dos resultados aconteceu logo após o reprocessamento dos dados, quando as entidades moleculares após serem alinhadas (parâmetros de criação do conjunto de dados e alinhamento ver Figura 29) todas as amostras juntas foram levadas ao *software* SIMCA-P+ 12.0 (Umetrics, Umea, Sweden) e a verificação dos QC na forma de PCA foi realizada, ou seja, validação analítica de performance do equipamento. A Figura 30 mostra a PCA de todas as 173 amostras incluindo os QC. Levando em consideração

os tempos de tratamento com dieta (50, 90 e 240 dias) associado a três tipos de dieta (Std, Caf, CafR) para dois gêneros obtém-se no total 19 grupamentos esperados para os dados na PCA.

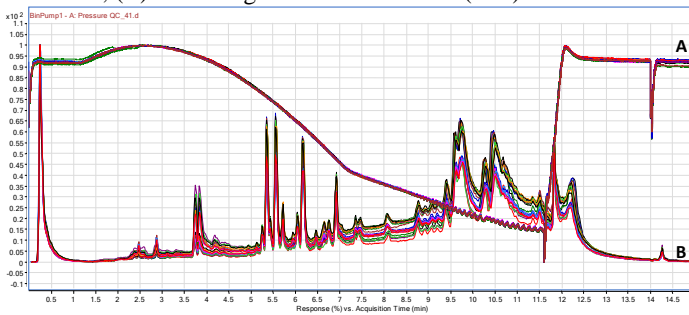
Figura 30. PCA-X sem transformação dos dados e escalonamento em unidade de variância (UV*) para todas as amostras mais QC no modo positivo de ESI. As simbologias das amostras foram coloridas manualmente para melhor observação. Legenda: (A) Amostras de QC analisadas antes das sequências de amostras; (B) Amostras de QC analisadas intercaladas com as amostras. Elipse Hotelling's T^2 (0.95).



O PCA de todas as amostras demonstrou o agrupamento das amostras de QC em dois grupos (Figura 30, A e B). Foram verificados, então, a sequência das análises em LC e constatado que o grupamento A se referia a todos os QC analisados antes da sequência das amostras. Estes QC foram utilizados para equilibrar o sistema analítico. Já o grupamento B são os QC analisados intercaladamente às amostras, e que sim representam a realidade do sistema analítico. As curvas de pressão e os cromatogramas de íons totais (TIC) para os QCs (Figura 31) foram verificados nos dados originais sem qual-

quer reprocessamento. Não foram verificadas oscilações nas curvas de pressão (Figura 31, A) nas separações analíticas. No entanto, os perfis cromatográficos apresentaram clara diferenciação melhor observada nos t_R compreendidos entre 8 – 13 minutos (Figura 31, B). Assim, as amostras de QC do agrupamento A foram eliminadas da matriz de dados após o alinhamento. Além do mais, o agrupamento das amostras dos QCs (Figura 30, B) indica a qualidade do sistema analítico e do preparo das amostras.

Figura 31. Sobreposição das 25 análises de QC realizadas em polaridade positiva de ESI. Legenda: (A) Curvas de pressão da bomba de fase móvel; (B) Cromatogramas de íons totais (TIC).



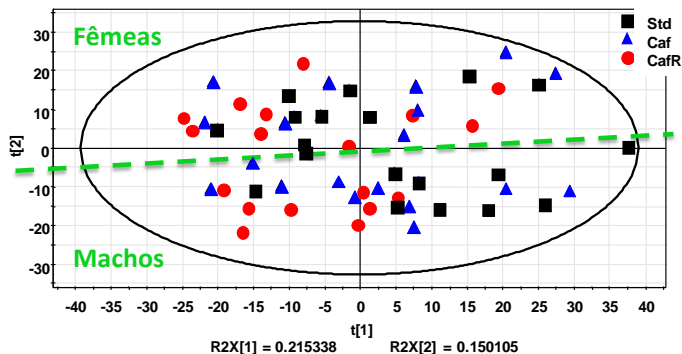
O esperado em PCA, uma análise não supervisionada, é o agrupamento das amostras de acordo com as entidades moleculares presentes em um dos grupos; aumentada e ou diminuída no(s) outros, como consequência dos tratamentos efetuados, no presente caso com respeito à dieta. Como foi possível observar na Figura 30, a característica predominante na separação das amostras deu-se quanto ao gênero dos animais. A separação na PCA quanto ao gênero, justifica que as próximas etapas do tratamento de dados realizaram-se diferenciando as amostras de acordo com o gênero, como segue abaixo.

Apesar de em metabolômica a coleta, tratamento de amostra e análises analíticas serem uma etapa relativamente

simples, mas crucial, os dados obtidos neste estudo para três tempos experimentais com três diferentes dietas, gerou uma quantidade de dados (matrizes de dados) gigantescos e impraticáveis de serem tratados em tempo hábil para atender aos objetivos da presente tese. Dessa forma, a partir da premissa da diferenciação metabólica quanto ao gênero e de que os QC se agruparam de maneira espontânea na PCA, foi estabelecido que a sequência do fluxo de trabalho fosse realizada apenas com as amostras do tempo experimental de 90 dias. A escolha do tempo experimental tem correlação com o fato de que os animais tomaram as dietas estabelecidas até esta data.

Dada a necessidade de separação do estudo pelo gênero e para o tempo de tratamento com dietas de 90 dias, os dados reprocessados, ou seja, a matriz de dados contendo as entidades moleculares somente para estas amostras foram novamente alinhadas. O resultado do tratamento em PCA pode ser visualizado na Figura 32, onde a separação por gênero é novamente comprovada dado pela componente t[2].

Figura 32. PCA-X sem transformação dos dados e escalonamento em unidade de variância (UV*) para todas as amostras no tempo de 90 dias de tratamento com dietas no modo de positivo de ESI. As simbologias das amostras foram coloridas manualmente para melhor observação. Legenda: Dieta padrão – Std, Dieta cafeteria – Caf e Cafeteria + extrato de amora – CafR. Elipse Hotelling's T^2 (0.95).



Ellipse: Hotelling T2 (0.95)

SIMCA-P+ 12.0.1 - 2013-02-21 15:01:37 (UTC+1)

A presença de amostras *outliers* não foi verificada na primeira avaliação da PCA, desta forma todas as amostras foram mantidas na matriz de dados.

5.2.2 Pré - tratamento e tratamento dos dados

A matriz de dados contendo as entidades moleculares de somente as amostras de 90 dias foi novamente submetida ao alinhamento sem presença das amostras de QC. Para tanto foi usando o *software* MPP e o número de entidades moleculares alinhados foi verificado. Subsequentemente, ao alinhamento, estas foram submetidas ao filtro de presença (*Filter by Flags – FbF*) de volume igual a 100, ou seja, passaram pelo filtro apenas as entidades moleculares presentes em um dos grupos de avaliação. A etapa de filtragem das entidades moleculares foi realizada comparando para cada gênero os três tratamentos com dieta administrados: Std vs Caf vs CafR, haja visto que nesta etapa se faz necessária a atribuição das classes das amostras, ou seja, dieta padrão (Std), cafeteria (Caf) e cafeteria + extrato de amora (CafR).

Centenas ou mesmo milhares de diferentes metabólitos presentes em variadas concentrações tornam vital a escolha adequada do método para a escala em pré-tratamento dos

dados. O escalonamento por unidade de variância (UV*), também chamado “*autoscaling*”, utiliza o desvio padrão como um fator de escala, enquanto que a escala de Pareto, utiliza a raiz quadrada do desvio padrão. Após a aplicação da escala de UV* todas as variáveis são igualmente importantes enquanto que Pareto reduz a importância dos valores altos e aumenta o peso de valores médios sem aumentar o ruído de linha de base.

A transformação de dados reduz a variação dentro do grupo, enfatizando as diferenças entre os grupos. O Intervalo Hotelling's T^2 , que mostra a distância a partir da origem, no plano do modelo (espaço de pontuação) para cada observação, obtidos por ambos os conjuntos de dados, confirmam a capacidade de transformação para reduzir a influência de *outliers* e as diferenças entre os valores grandes e pequenos dos dados. O limite da elipse de Hotelling's T^2 limites definido como T^2 critic (95%), indicam que o cruzamento desta linha por uma amostra terá probabilidade inferior a 5 % que pertença ao grupo designado (Eriksson, 2006). Além disso, a transformação melhora o poder de previsibilidade do modelo que é confirmado pelo valor Q^2 significativamente maior para os dados transformados (Godzien, *et al.* 2013).

Os MFE após filtragem por presença foram tratados no *software* SIMCA-P+ 12.0 (Umetrics, Umea, Sweden) e após testes, a transformação logarítmica e o escalonamento do tipo Pareto foram escolhidos como os mais adequados para diminuição dos potenciais *outliers* e para privilegiar metabólitos de baixa intensidade de sinal. As Figuras 33 e 34 mostram as PCAs para os tempos de tratamento de 90 dias.

Figura 33. PCA com transformação logarítmica e escalonamento Pareto para as amostras de plasma de ratos machos em ambas polaridades de ESI. As simbologias das amostras foram coloridas manualmente para melhor observação. Legenda: dieta padrão – Std, dieta cafeteria – Caf e cafeteria + extrato de amora – CafR; Elipse Hoteling's T^2 (0.95).

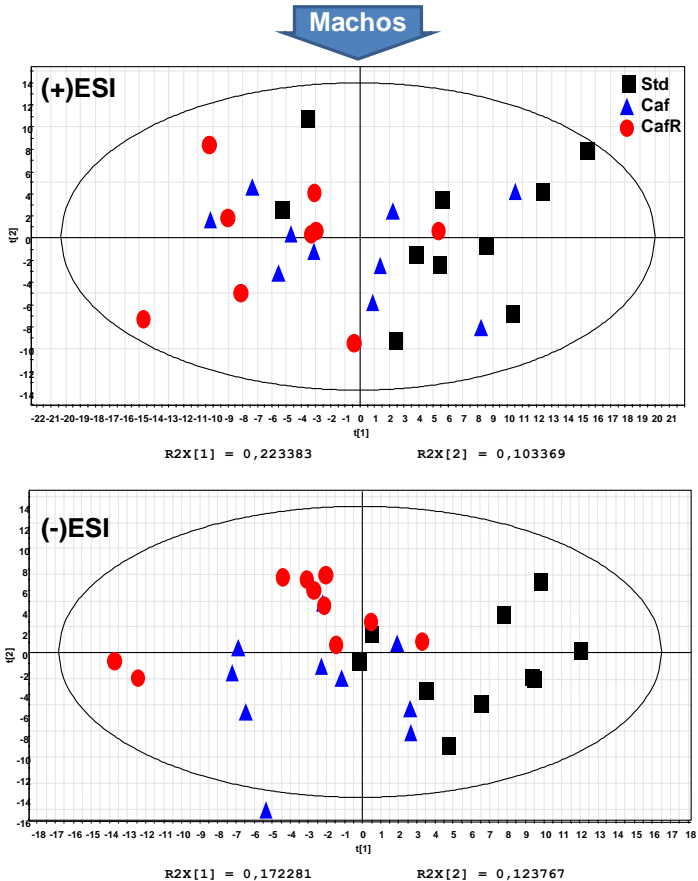
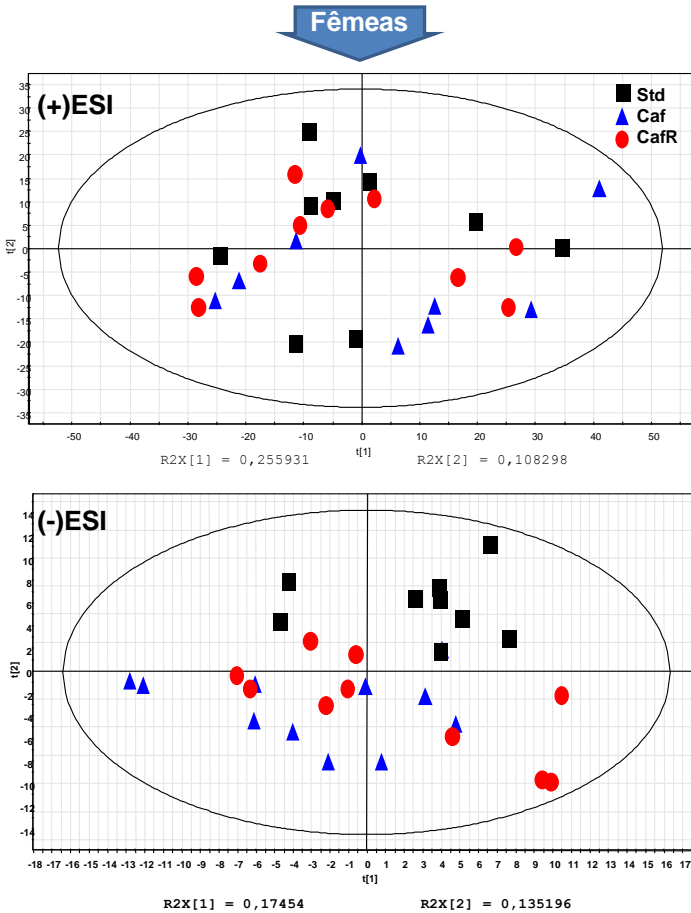


Figura 34. PCA com transformação logarítmica e escalonamento Pareto para as amostras de plasma de ratos fêmeas em ambas polaridade de ESI. As simbologias das amostras foram coloridas manualmente para melhor observação. Legenda: dieta padrão – Std, dieta cafeteria – Caf e cafeteria + extrato de amora – CafR; Elipse Hoteling's T^2 (0.95).



Independentemente do gênero dos animais espera-se que na PCA ocorra a aglomeração espontânea das amostras de acordo com o tratamento com as dietas. Esta tendência pode ser claramente observada nas Figuras 33 e 34 para polaridades negativo de ESI.

A PCA para as amostras de machos em polaridade negativa de ESI (Figura 33), mostra uma única amostra do grupo de cafeteria com potencialidade a ser um *outlier* por apresentar-se fora da elipse de Hotelling. No entanto, verificando a similaridade do perfil cromatográfico da amostra em questão e a curva de pressão da bomba de LC em comparação com as demais amostras, bem como o aspecto da amostra (não hemolisada), esta não foi descartada da matriz de dados por não caracterizá-la como um *outlier* analítico.

Os parâmetros de qualidade dos modelos de PCA (Tabela 14) foram verificados quanto aos valores de R^2 e Q^2 para duas componentes. Os valores mostrados na Tabela 14 são cumulativos, ou seja, a soma das contribuições da primeira e da segunda componentes, simbolizados como (cum). Observam-se valores positivos tanto para a variância da qualidade do plote (R^2) quanto para a variância da predição do modelo (Q^2).

Tabela 14. Parâmetros de qualidade dos modelos de PCA.

		R^2 (cum)	Q^2 (cum)
Machos	(+ESI)	0,33	0,18
	(-ESI)	0,30	0,14
Fêmeas	(+ESI)	0,36	0,22
	(-ESI)	0,31	0,14

Os resultados a partir de um modelo de PCA indicam tendências sistemáticas nos dados, ou seja, de agrupamento, tendências temporais, etc. No entanto, desvio instrumental e outras variações experimentais ocasionalmente desviam o

foco de um modelo de PCA para variação sistemática não relacionada com a questão científica de interesse. Nesses casos, há a necessidade de métodos que fazem uso de qualquer informação à priori, para recentrar a análise para os objetivos estudados através da utilização de, por exemplo, PLS ou O-PLS. Esta informação a priori, por exemplo, atribuir a que grupo pertence cada amostra, constitui um dado extra na matriz de dados, na qual as colunas indicam a informação da amostra. A vantagem do OPLS em comparação com o PLS é que o modelo é rotacionado de modo que a separação das classes é encontrada na primeira componente preditiva, $tp[1]$, também referida como a variação correlacionada, e a variação não relacionada para a separação das classes é vista na componente ortogonal $t_0[1]$ também conhecido como a variação não correlacionada. Esta separação dada pelas componentes preditiva e ortogonal facilita a interpretação do modelo (Wiklund, *et al.* 2008).

Observado a qualidade dos modelos da PCA e a ausência de *outliers*, a matriz de dados foi novamente submetida ao *software* MPP (Agilent Technologies) para realização de análise estatística. Da mesma maneira que na etapa de filtragem dos MFE, a avaliação estatística foi performada em pares de comparação para cada gênero: Caf vs Std e CafR vs Caf, especificamente, dieta padrão (Std), cafeteria (Caf) e cafeteria + extrato de amora (CafR).

Um exemplo da redução da quantidade de MFE para modelagem é apresentado na Tabela 15. Os MFE estatisticamente significativos após realização do teste *t* não emparelhado ($p < 0,05$), assumindo variância desigual teste *t* de Welch's.

Tabela 15. Efeitos na redução do número de características moleculares estatisticamente significativas após aplicação do filtro de presença (FbF) e teste *t* para cada comparação em termos de dieta.

		Caf vs Std ^a	CafR vs Caf ^a
Machos	Todos os MFE	51789	
	FbF	1458	1358
	<i>t</i> - test	402	258
Fêmeas	Todos os MFE	47949	
	FbF	1420	1319
	<i>t</i> - test	379	183

^a Para modo negativo de ESI.

A análise estatística foi realizada para duas comparações de dietas: Caf vs Std e CafR vs Caf para cada gênero independentemente. Entidades moleculares – MFE que passaram pelo filtro de FbF, e foram significativas estatisticamente após aplicação do teste *t* e MVA foram utilizados na matriz de dados para construção dos modelos. Para a UVA, o teste *t* de Student ($p < 0,05$) foi realizado utilizando o *software* MPP, assumindo variância desigual (teste *t* de Welch 's).

Na sequência, os dados foram avaliados de maneira supervisionada pela modelagem em PLS-DA e OPLS-DA. As Figuras 35 e 36 mostram os modelos de PLS-DA e OPLS-DA para machos e fêmeas, respectivamente. Estes modelos foram realizados com a matriz de dados extraída do MPP após a avaliação estatística univariada, ou seja, apenas com os MFE estatisticamente significativos para cada comparação das dietas em seus respectivos pares. A Tabela 16 mostra o resumo dos parâmetros de qualidade para os modelos gerados, onde os valores de R^2 e Q^2 são apresentados em percentual.

Figura 35. Modelos de PLS-DA e OPLS-DA para comparações de dietas em machos para ambos os modos de ionização em electrospray. Legenda: dieta padrão (■); cafeteria (▲); cafeteria + extrato de amora (●). Elipse Hotelling's T^2 (0.95).

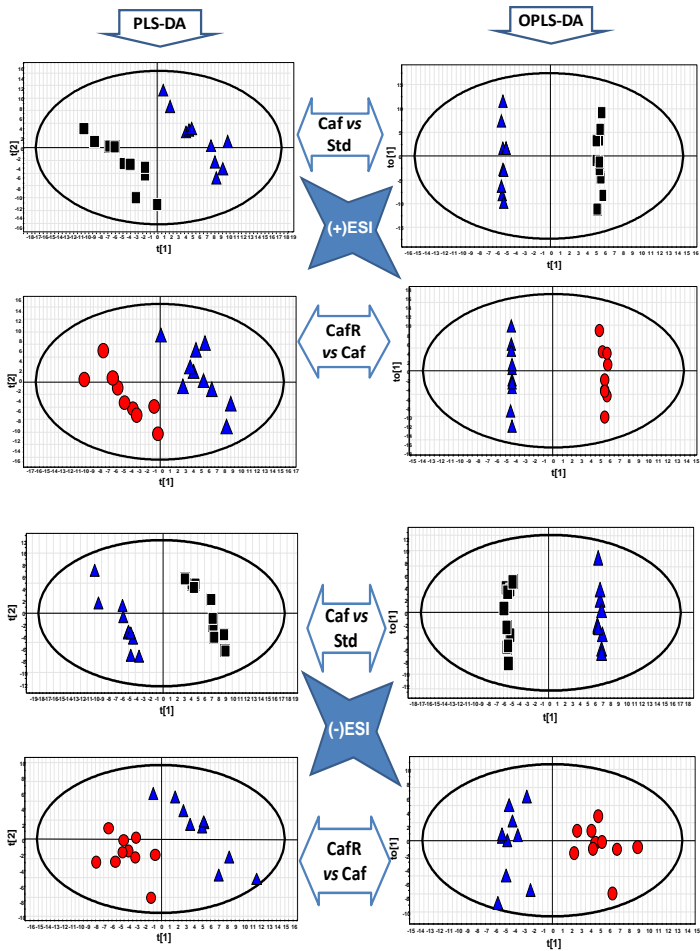


Figura 36. Modelos de PLS-DA e OPLS-DA para comparações de dietas em fêmeas para ambos os modos de ionização em eletrospray. Legenda: dieta padrão (■); cafeteria (▲); cafeteria + extrato de amora (●). Elipse Hotelling's T^2 (0.95).

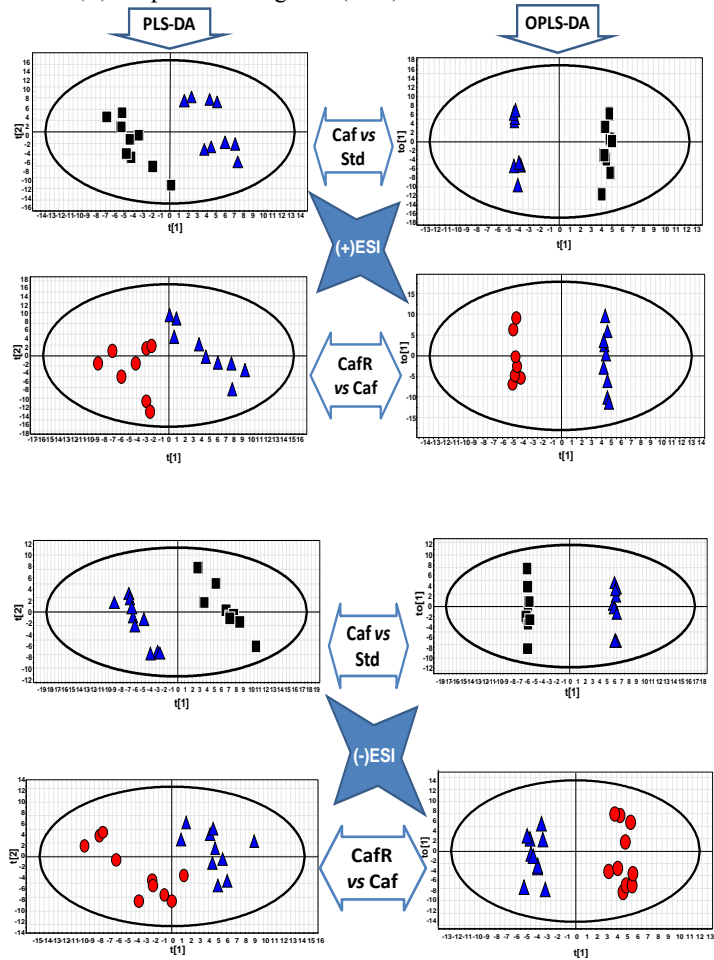


Tabela 16. Resumo dos parâmetros de qualidade para os modelos de PLS-DA e OPLS-DA, onde os valores de R^2 e Q^2 são apresentados em percentual.

<i>Gênero</i>	<i>ESI</i>	<i>Modelo</i>	<i>Caf vs Std</i>		<i>CafR vs Caf</i>	
			R^2Y^a	Q^2Y^b	R^2Y^a	Q^2Y^b
Machos	+	PLS-DA	98,8	85,6	98,4	68,1
		OPLS-DA	99,7	82,3	99,8	76,3
	-	PLS-DA	99,7	92,3	98,5	40,0
		OPLS-DA	99,6	90,4	71,4	43,4
Fêmeas	+	PLS-DA	98,2	53,1	98,9	66,6
		OPLS-DA	99,6	70,2	99,7	55,9
	-	PLS-DA	99,6	95,1	97,6	51,5
		OPLS-DA	99,9	92,8	67,2	32,9

^a Soma da variação em Y(cum) para três componentes em PLS-DA e para variação em Y para OPLS-DA, que se explica pelo modelo;

^b Qualidade da previsão cumulativa para três componentes para PLS-DA e para uma componente em OPLS-DA.

Quanto aos valores dos parâmetros de qualidade dos modelos supõe-se que para dados químicos os valores aceitáveis são $R^2 \geq 0,8$ (80 %) e $Q^2 \geq 0,5$ (50 %), enquanto que para os dados biológicos estes valores são menos restritivos: $R^2 > 0,7$ (70 %) e $Q^2 > 0,4$ (40 %) (Jiménez-Contreras, 2009), os quais também são aceitáveis para os dados metabolômicos. O único caso alheio a esta especificação é constatado no modelo de OPLS-DA, (- ESI) em fêmeas da comparação CafR vs Caf. No entanto, desde que a diferença entre R^2 e Q^2 não seja muito grande e o modelo criado passe a validação, estes parâmetros não precisam ser tão estritamente seguidos (Godzien, *et al.* 2013).

Considerando a qualidade dos modelos gerados e avaliados pela estatística MVA. Os modos de visualização de SUS – plot foram construídos à partir dos modelos de OPLS-DA no *software* SIMCA-P + (12.0.1 Umetrics). Os p-valores para o modelo multivariado foram calculados através de ANOVA para selecionar as variáveis (possíveis metabólitos) estatisticamente significativos com valores ($p < 0,05$) para cada grupo de separação à partir dos modelos de OPLS-DA (Eriksson, 2006).

A lista de MFE estatisticamente significativos tanto por UVA como MVA que conferiram a separação entre os grupos nos modelos de OPLS-DA dados pela componente $t[1]$, foram extraídos de forma independente. Esta lista foi gerada no formato de extensão (.exl) para MS Excel e desta forma puderam ser separadas as informações de t_R da informação da massa exata do possível metabólito, iniciando, assim, o processo de identificação dos metabólitos pelas bases de dados.

5.2.3 Identificação dos metabólitos

As massas exatas selecionadas nos modelos de OPLS-DA foram então pesquisadas nas bases de dados de METLIN (<http://metlin.scripps.edu>). Posterior a esta pesquisa, os dados sofreram triagem rigorosa onde foram eliminados compostos sintéticos, fármacos, pesticidas etc. Uma segunda etapa de triagem foi realizada eliminando metabólitos onde o CV% nas amostras de QC apresentaram-se maiores que 30%. Ainda, dada a possibilidade de presença de isômeros entre as listas pesquisadas e para assegurar a exatidão na identificação dos metabólitos, foram realizadas análises de MS/MS de padrões analíticos quando disponíveis, e das amostras na polaridade de ESI pertinente. No caso das análises MS/MS nas amostras a distribuição isotópica dos metabólitos na amostra foi utilizada para identificação. Vale salientar o extensivo trabalho que

exige esta etapa de identificação dos metabólitos, tratando-se da que mais tempo de dedicação exige. Nas Tabelas 17 a 20 estão todos os metabólitos identificados e confirmados para as comparações de dietas para os diferentes gêneros.

Tabela 17. Metabólitos identificados e alterações para efeitos da dieta de cafeteria sobre a padrão em machos.

Metabólito	Massa	t _R (min)	CV em QC (%)	p-valor	Regulação em Caf	
					(%)	Alteração
Ácido palmítico	256,2402	5,56	6,06	0,000	-19,70	↓
Ácido linoléico	280,2402	7,04	7,68	0,001	-41,15	↓
Ácido oléico	282,2559	5,25	11,55	0,000	90,57	↑
Ácido hidroxitetraicosanóico	384,3603	9,62	13,48	0,022	-15,04	↓
Octadecatrien-1-ol	264,2447	7,47	15,55	0,009	50,10	↑
Ácido taurolítocólico 3-glucaronídeo	659,3339	5,60	12,41	0,010	34,48	↑
Colina	103,0993	5,36	14,72	0,036	-14,97	↓
Fosfocolina	183,0659	5,44	9,61	0,000	-27,46	↓
Esfingosina-1-fosfato	379,2490	4,90	12,74	0,031	-18,67	↓
Palmitoil carnitina (C _{16:0})	399,3365	5,13	9,58	0,006	58,27	↑
Oleil carnitina (C _{18:1})	425,3508	5,25	10,08	0,000	151,41	↑
Linoleil carnitina (C _{18:2})	423,3359	4,96	11,38	0,019	-23,22	↓
PC(O-16:2)	477,3201	5,56	10,47	0,000	-27,17	↓
PC(21:0 (CHO))	593,3693	5,90	8,013	0,001	-37,64	↓
PC(32:2)	729,5315	8,92	21,11	0,020	-33,51	↓
PC(35:4)	767,5446	9,20	12,49	0,003	-39,72	↓
PC(36:4)	781,5595	9,61	8,53	0,000	-29,08	↓
PC(36:5)	779,5427	9,77	21,96	0,008	-25,78	↓
PC(38:5)	807,5738	11,84	14,99	0,007	65,48	↑
PC(38:7)	803,5403	9,22	20,65	0,004	-43,57	↓

LPC(15:0)	481,3180	5,26	7,82	0,047	-18,88	↓
LPC(O-16:0)	481,3533	5,74	8,95	0,001	-22,37	↓
LPC(16:0)	495,3339	12,02	17,03	0,003	-24,93	↓
LPC(O-18:0)sn1	509,3844	6,36	6,37	0,002	24,59	↑
LPC(18:3)	517,3169	5,09	5,04	0,001	-28,86	↓
LPC(20:0)	551,3955	6,78	5,64	0,000	-41,38	↓
LPC(20:1)	549,3808	6,29	6,68	0,013	-28,20	↓
LPC(20:2)	547,3679	5,90	6,62	0,001	-40,00	↓
LPC(22:4)	571,3629	5,82	6,35	0,000	-54,10	↓
LPC(22:5)	569,3485	5,66	7,39	0,036	-41,25	↓
LPC(24:1)	607,4568	8,06	9,66	0,000	-32,68	↓
PE(38:5)	765,5242	6,26	16,37	0,031	-21,34	↓
PE(38:6)	763,5139	9,43	13,46	0,018	68,12	↑
LPE(16:0)	453,2850	5,42	9,09	0,002	-15,62	↓
LPE(18:0)	481,3168	6,02	9,99	0,004	24,39	↑
LPE(18:1)	479,3012	11,95	23,36	0,025	-31,68	↓
LPE(19:0)	495,3325	5,86	7,44	0,000	-31,73	↓
LPE(20:4)	501,2855	5,33	5,74	0,015	27,32	↑
LPE(22:1)	535,3638	6,28	8,08	0,015	-26,25	↓
LPE(22:4)	529,3168	5,36	8,79	0,029	-21,05	↓
LPA(16:0)	410,2390	5,56	8,49	0,027	-10,92	↓
LPI(18:2)	596,2886	6,51	10,63	0,041	-32,09	↓
LPS(20:2)	549,3067	6,13	11,84	0,006	22,00	↑

Tabela 18. Metabólitos identificados e alterações para efeitos da dieta de cafeteria + extrato de amora sobre a cafeteria em machos.

Metabólito	Massa	t _R (min)	CV em QC (%)	p- valor	Regulação em CafR	
					(%)	Alte- ração
Linoleamida	279,2555	5,33	12	0,007	132,90	↑
Ácido oxo-heneicosanóico	340,2968	6,15	10,89	0,006	34,69	↑
Palmitoil carnitina (C16:0)	399,3365	5,13	9,58	0,042	-28,27	↓
Oleil carnitina (C18:1)	425,3508	5,25	10,08	0,021	-32,25	↓
Linoleil carnitina (C18:2)	423,3359	4,96	11,38	0,033	-20,61	↓
Esfingosina-1-fosfato	379,2471	4,90	9,00	0,023	74,76	↑
1-fosfatidil-mio-inositol	390,0563	1,36	32,34	0,029	-44,55	↓
PC(35:4)	767,5446	9,20	12,49	0,022	61,76	↑
PC(36:4)	781,5595	9,61	8,43	0,009	23,75	↑
PC(36:5)	779,5443	8,92	18,2	0,005	175,68	↑
PC(36:6)	777,5314	8,62	22,97	0,003	92,12	↑
PC(42:7)	859,6044	10,30	28,46	0,016	103,03	↑
LPC(16:0)	509,3844	6,36	6,37	0,019	-19,18	↓
LPC(O-16:0)	481,3533	5,74	8,95	0,039	-18,48	↓
LPC(17:0)	509,3503	5,87	6,26	0,050	-12,67	↓
LPC(18:0)	523,3635	6,17	3,9	0,047	-8,97	↓
LPC(18:1)	507,3695	5,89	7,96	0,021	-19,94	↓
LPC(20:3)	545,3473	6,06	21,55	0,002	-26,82	↓
PE(38:5)	765,5256	9,36	12,22	0,002	87,10	↑
PE(38:6)	763,5139	9,43	13,45	0,001	109,13	↑
LPE(16:0)	453,2855	5,53	8,13	0,003	35,84	↑
LPE(18:0)	481,3168	6,02	9,99	0,006	39,68	↑
LPE(20:1)	507,3325	6,26	24,09	0,048	50,76	↑

LPE(20:4)	501,2855	5,33	5,74	0,016	40,87	↑
LPE(22:4)	529,3168	5,36	8,79	0,044	17,42	↑
LPE(22:6)	525,2798	5,33	5,75	0,003	44,96	↑
LPS(21:0)	567,3536	5,72	8,04	0,049	20,39	↑
LPS(22:0)	581,3693	6,00	10,3	0,008	43,59	↑
LPI(16:0)	572,2962	7,02	13,82	0,010	108,55	↑
LPI(18:2)	596,2886	6,51	10,63	0,010	84,99	↑
LPI(20:4)	620,2833	6,32	16,62	0,006	61,30	↑
CerP(d18:1/8:0)	505,3531	6,17	9,74	0,044	-14,53	↓

Tabela 19. Metabólitos identificados e alterações para efeitos da dieta de cafeteria sobre a padrão em fêmeas.

Metabólito	Massa	t _R (min)	CV em QC	p - valor	Regulação em Caf	
					(%)	Alteração
Ácido oléico (C_{18:1})	282,2558	5,26	11,56	0,003	48,34	↑
Fosfocoline	183,0671	6,06	15,95	0,034	27,34	↑
Tetradecanoil carnitina (C_{14:0})	371,3042	4,63	12,82	0,000	55,65	↑
Palmitoil carniti- na (C_{16:0})	399,3356	5,13	9,58	0,011	55,35	↑
Esteraroil carniti- na (C_{18:0})	427,3652	5,59	7,67	0,000	129,81	↑
Linoleil carnitina (C_{18:2})	423,3349	4,96	11,38	0,046	-34,35	↓
PC(O-12:0/2:0)	467,3007	4,83	7,41	0,031	45,80	↑
PC(21:0 (CHO))	593,3752	5,90	8,01	0,002	-44,06	↓
PC(22:6/18:3)	827,5442	9,09	17,63	0,029	-29,92	↓
PC(36:5)	779,5456	9,77	21,96	0,028	-27,49	↓
PC(42:7)	859,6035	10,30	28,46	0,017	-37,54	↓
PC(O-18:1)	507,3678	6,35	9,89	0,036	35,83	↑

PC(36:4)	781,5606	9,62	8,43	0,025	-22,18	↓
PC(40:3)	839,6161	9,62	8,54	0,007	-25,12	↓
LPA(16:0)	410,2452	5,56	8,50	0,018	-12,29	↓
LPC(14:0)	467,3018	4,95	6,79	0,027	46,11	↑
LPC(16:1)	479,3329	5,74	18,04	0,044	31,01	↑
LPC(18:0)	523,3664	6,17	3,90	0,033	13,71	↑
LPC(20:0)	551,3947	6,78	5,64	0,043	-22,37	↓
LPC(20:1)	549,3786	6,29	6,03	0,043	-24,55	↓
LPC(20:2)	547,3637	5,90	6,62	0,006	-43,71	↓
LPC(22:4)	571,3601	6,29	14,95	0,030	-24,54	↓
LPC(22:5)	569,3443	5,90	13,42	0,007	-36,65	↓
LPC(24:0)	607,4573	8,06	9,65	0,006	-34,12	↓
LPC(O-18:0/0:0) sn2	509,3482	5,65	11,33	0,010	57,92	↑
LPE(18:1)	479,3057	5,14	7,44	0,003	-32,57	↓
LPE(18:2)	477,2909	5,32	7,84	0,006	-35,92	↓
LPE(20:0)	509,3536	6,17	5,29	0,045	11,70	↑
LPE(22:1)	535,368	6,28	8,08	0,000	-29,27	↓
LPE(22:4)	529,3231	5,36	14,57	0,022	-15,45	↓
PS(19:0/22:4)	853,5697	6,25	16,83	0,020	81,37	↑
LPS(19:0)	539,3279	5,14	8,39	0,003	-33,75	↓
SM(d18:1/14:0)	674,5359	7,97	7,78	0,000	277,83	↑
Amida palmítica	255,257	4,03	17,08	0,046	9,12	↑
CerP(d18:1/8:0)	505,3545	6,17	9,74	0,031	29,29	↑
dihidroxi-colestanol taurina	541,3415	5,56	4,35	0,002	-15,76	↓
trihidroxi-colestanol taurina	557,3391	4,03	13,86	0,000	-41,55	↓

Tabela 20. Metabólitos identificados e alterações para efeitos da dieta de cafeteria + extrato de amora sobre a cafeteria em fêmeas.

Metabólito	Mass	t _R (min)	CV em QC (%)	p- valor	Regulação em	
					(%)	Alteração
Ácido oléico	282,2565	5,72	8,14	0,034	17,34	↑
LPC(O-16:1)	479,3329	5,74	18,04	0,024	-25,47	↓
LPC(18:0)	523,3664	6,17	3,90	0,012	-7,44	↓
LPE(18:1)	479,3051	5,69	6,93	0,037	29,04	↑
LPE(P-16:0)	453,2870	4,95	7,25	0,049	25,93	↑
LPE(18:2)	477,2909	5,32	7,83	0,039	39,58	↑
LPE(20:1)	507,3359	5,72	7,58	0,035	19,36	↑
PS(O-20:0/19:1)	817,6276	10,56	19,72	0,028	26,79	↑
LPS(21:0)	567,3614	5,72	8,04	0,037	18,69	↑
CerP(d18:1/8:0)	505,3545	6,17	9,74	0,018	-16,03	↓

Legenda: Fosfatidilcolina (PC), Lisofosfatidilcolina (LPC), Fosfatidiletanolamina (PE), Lisofatidiletanolamina (LPE), Lisofosfatidilinositol (LPI), Fosfatidilserina (PS), Lisofosfatidilserina (LPS), Ácido lisofosfatídico (LPA), Esfingomielina (SM) e Ceramida (CerP).

No presente estudo, foram investigados os metabólitos em plasma de ratos tratados com dietas ricas em gordura (hiperlipídica) e adicionada de extrato de amora preta utilizando UPLC-Q-TOF-MS como plataforma analítica para as análises metabômicas no período de tratamento de 90 dias. Os perfis metabólicos dos ratos tratados com dieta hiperlipídica foram comparados com os tratados com dieta padrão (não obesos), isto é, Caf vs Std a fim de avaliar as alterações metabólicas ocasionadas com a ingestão de altos níveis lipídicos. A segunda comparação aborda os efeitos metabólicos causados pela ingestão de dieta hiperlipídica adicionada de extrato de amora preta com relação à dieta hiperlipídica, isto é, CafR vs Caf com

o propósito de averiguar os efeitos ocasionados pela ingestão do extrato de amora.

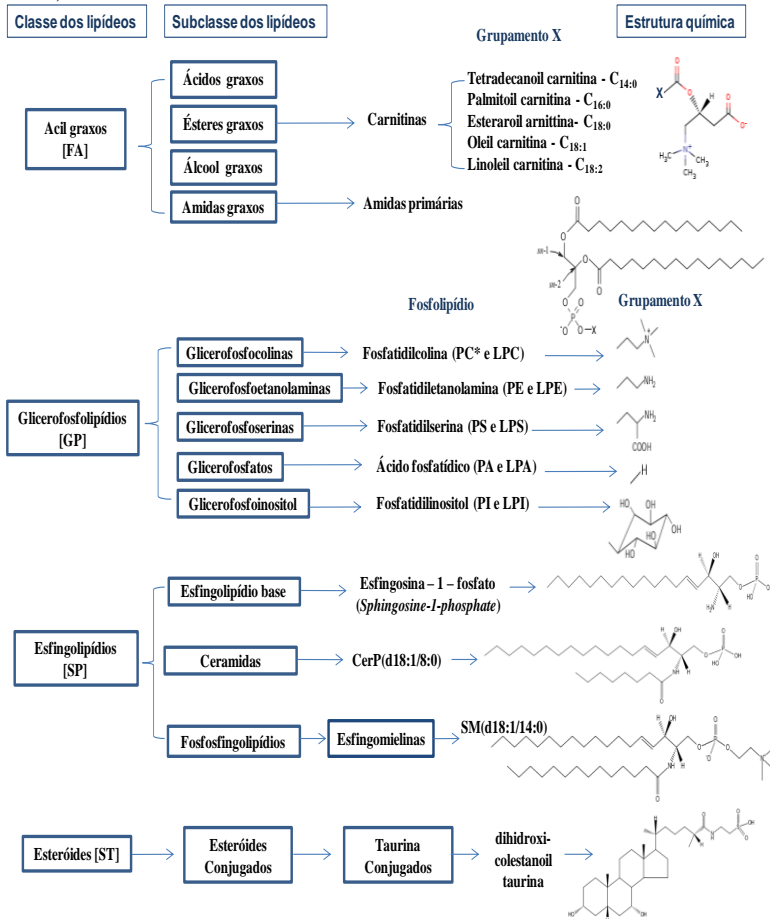
Alguns dos metabólitos identificados estão associados à ingestão das dietas gordas cunhado pelo perfil lipídico da dieta que receberam e relacionados com processos inflamatórios associados à lipotoxicidade e riscos de doenças cardiovasculares e seus efeitos. Estas alterações metabólicas foram as contribuintes para diferenciação entre os animais que receberam dieta hiperlipídica e padrão, bem como os efeitos causados pelo extrato da amora preta sobre a hiperlipídica sem extrato.

Foram considerados significativos os metabólitos identificados com valores de ($p < 0,05$).

No geral a identificação dos metabólitos que compuseram as amostras e apresentaram diferenciação entre os grupos de tratamento com dietas são da classe dos lipídeos, fato associado à plataforma analítica aplicada de LC. Resumidamente lipídeos do subgrupo dos: acil graxos, glicerofosfolipídeos (PC, PE, PS, PA e PI) e lisoglicerofosfolipídeos (LPC, LPE, LPS, LPA e LPI), esfingolipídeos (ceramidas e esfingomielinas) e esteróis conjugados foram identificados. Na Figura 37 são mostrados um resumo das subclasses dos lipídeos identificados para todas as comparações, bem como informações à respeito das estruturas químicas.

Figura 37. As carnitinas são nomeadas de acordo com a quantidade de carbonos e insaturações na posição (X) do esqueleto base. A classe dos fosfolipídeos é definida pela natureza da base nitrogenada ou do poliálcool esterificado ao grupo fosfato (X). A distribuição de espécies dentro de qualquer classe de fosfolípido é determinada pelos substitutos de acil graxos nas posições sn-1 e sn-2 do esqueleto de glicerol. O dipalmitoil mostrado aqui seria designado PC(16:0/16:0) ou PC(32:0) se X fosse colina. Se o ácido araquidônico fosse esterificado na posição sn-2 da molécula seria designada PC(16:0/20:4) ou PC(36:4). Um lisofosfolípido (LPL) refere-se a qualquer fosfolípido que falte uma das suas duas cadeias de O-acil.

LPLs possuem uma função álcool livre em qualquer posição sn-1 ou sn-2. As LPLs são por exemplo produtos da reação enzimática da fosfolipase tipo A sobre fosfolipídeos. No caso de o fosfolipídeo PC(16:0/16:0) sofrer reação enzimática na posição sn-2, passaria a chamar-se LPC(16:0). Fontes: LIPIDMAPS, METLIN, (Postle 2008).



*5.2.3.1 Efeitos da dieta de cafeteria frente à padrão
(Caf vs Std)*

Quanto as considerações de alterações metabólicas no plasma de ratos alimentados com dieta de cafeteria versus aqueles tratados com dieta padrão (Caf vs Std, Tabelas 17 e 19), foi verificado que as acilcarnitinas de ácidos graxos saturados (C16:0 (58,27%)) e [(C14:0 (55,65%), C16:0 (55,35%) e C18:0 (129,81%)] estão aumentadas respectivamente para machos e fêmeas, enquanto que a do ácido graxo poli-insaturado (C18:2 (n-6)) está diminuído, respectivamente (-23,22% e -34,35%) para machos e fêmeas. Mudança similar é visto nos ácidos graxos, onde o insaturado (oléico, C18:1 (n-9)) aparece aumentado para ambos gêneros, como reflexo, é observado o aumento de oleil carnitina (C18:1 (n-9)) (151,41 %) em machos. Ainda quanto aos ácidos graxos, o saturado (palmítico, C16:0) e poli-insaturado (linoléico, C18:2 (n-6)) estão diminuídos em machos. Estas alterações associadas às acilcarnitinas, bem como aos ácidos graxos estão ligados em parte ao perfil dos ácidos graxos da dieta que receberam (Tabela 21), onde se observam maiores quantidades de ácidos graxos (C14:0, C16:0, C18:0 e C18:1(n-9)) na dieta de cafeteria – Caf frente a padrão – Std, ao passo que C18:2 (n-6) não apresenta diferença significativa entre dietas. Outros derivados lipídicos foram identificados e apresentaram aumento com relação a dieta padrão: octadecatrien-1-ol (+50,10 %) e ácido taurolitocólico (+34,48 %) para machos e amida palmítica (9,12 %) para fêmeas.

Tabela 21. Perfil de ácidos graxos das dietas (mg g⁻¹).

Ácidos graxos	Std ^a	CaI ^a	CaIR ^a
C14:0	0,07±0,03	4,80±0,10	4,81±0,02
C16:0	4,26±0,39	34,91±0,62	32,71±0,78
C18:0	0,69±0,09	15,96±0,27	14,10±0,17
Soma saturados	5,33±0,53	56,67±1,00	52,55±0,89
C18:1(n-9)	6,03±0,60	46,13±0,69	41,18±0,65
C18:2(n-6)	15,74±1,2	17,39±0,26	16,69±0,71
C18:3(n-6)	0,02±0,00	0,09±0,00	0,08±0,00
C22:5(n-6)	0,24±0,08	0,16±0,03	0,23±0,03
C20:4(n-6)	n.d.	n.d.	n.d.
Soma n-6	16,02±1,2	17,90±0,24	17,29±0,76
C18:3(n-3)	1,03±0,10	1,34±0,02	1,26±0,02
C20:5(n-3)	0,02±0,00	0,13±0,02	0,12±0,00
C22:5(n-3)	0,11±0,08	0,20±0,01	0,18±0,02
Soma n-3	1,16±0,17	1,74±0,03	1,60±0,03

^aValores correspondentes a média ± RSD de triplicata.

Predominantemente os glicerofosfolipídeos (PC* e PE) e lisoglicerofosfolipídeos (LPC, LPE, LPI, LPS e LPA) apareceram diminuídos no plasma de ratos alimentados com a dieta de cafeteria, em comparação com os alimentados com dieta padrão independentemente ao gênero dos animais. Ainda, diminuídos aparecem os metabólitos colina (-14,97%) e fosfocolina (-27,46 %) em machos, com exceções de fosfocolina (+27,34 %) e esfingolípido como ceramida CerP (d18:1/8:0) (+29,29%) e esfingomielina SM(d18:1/14:0) (+277,83 %) aumentadas em fêmeas. Apenas em machos foi verificada diminuição em esfingosina-1-fosfato (-18,67 %). Em fêmeas verificou-se diminuição nos ácidos biliares conjugados com taurina di- e trihidroxi-colestanol taurina (-15,76 % e -41,55 %, respectivamente).

5.2.3.2 Efeitos da dieta de cafeteria + extrato de amora frente à cafeteria (CafR vs Caf)

Referente às alterações metabólicas no plasma de ratos alimentados com dieta de cafeteria + extrato de amora frente aqueles tratados com dieta de cafeteria (CafR vs Caf, Tabelas 18 e 20), verifica-se em machos que as acilcarnitinas de ácido graxo saturado (C16:0) e insaturados (C18:1 e C18:2) estão diminuídas em mais de 20 %. Mudança oposta é observada nos ácidos graxos e derivados, como ácido oxoheneicosanóico (+34,69%) e linoleamida (+132,90 %) em machos e do insaturado (oléico, C18:1 (n-9)) (+17,34%) aumentado em fêmeas. Para fêmeas não foram observadas alterações nas acilcarnitinas, ao passo que ácido oléico apresentou-se ainda mais elevado em plasma em comparação com a dieta de cafeteria sozinha.

Sem exceção todos os glicerofosfolipídeos (PC* e PE), bem como os lisoglicerofosfolipídeos (LPE, LPI e LPS) estão aumentados em machos tratados com dieta suplementada com amora. Para fêmeas observa-se aumento em liso- e fosfatidilserinas (LPS e PS) e todas as lisofosfatidiletanolaminas (LPE), acima de 19 % para estas últimas. Todas as lisofosfatidilcolinas (LPC) apresentaram alterações negativas independentemente do gênero.

Quanto aos esfingolipídeos observa-se diminuição em ceramida CerP (d18:1/8:0) em proporções de (-14,53 % e -16,03 %), respectivamente em machos e fêmeas. Em machos foi verificado ainda, aumento em esfingosina-1-fosfato (+74,76 %) contrariamente ao observado pela dieta de cafeteria frente à padrão.

As alterações nos metabólitos observadas aqui estão possivelmente associadas aos efeitos do extrato de amora administrado concomitantemente à dieta hiperlipídica de cafeteria.

5.2.4 Bases bioquímicas e interpretação biológica

A L-carnitina desempenha papel central no metabolismo de energia, uma vez que permite o transporte de ácidos graxos de cadeia longa na forma de ésteres de carnitina (acilcarnitinas) através da membrana mitocondrial interna, envolvida na produção de energia nas células (Bieber, 1988). Via este papel fisiológico fundamental, carnitina tem uma influência sobre o metabolismo de lípidos. Além disso, a carnitina é importante no metabolismo de carboidratos, uma vez que aumenta a utilização de glicose nos tecidos periféricos e da sensibilidade das células à insulina (Proulx *et al.* 1997; Ferrannini, *et al.* 1988).

A acumulação de acilcarnitinas especificamente saturadas foi encontrado no plasma de ratos alimentados com dieta de cafeteria, indicando ineficiência da β -oxidação de lipídeos (Makowski, *al.* 2009; Koves, *et al.* 2008), que, juntamente com o aumento da disponibilidade destes ácidos graxos na dieta, estariam contribuindo para o incremento destes ácidos graxos no plasma.

Em amostras de plasma de mulheres africanas com DM2, foram observados incrementos de acilcarnitinas de cadeia curta (C6, C8 e C10) e cadeia longa (C14 e C18:1). Quanto as carnitinas de cadeia longa, Mihalik *et al* (2010) observaram altos níveis de acilcarnitinas (C14:1, C16, C18 e C18:1) em estudo com pacientes com DM2 (Mihalik, *et al.* 2010).

Os níveis de linoleil carnitina C18:2 observados diminuídos nos ratos das dietas de Caf (machos e fêmeas) e CafR (machos) concordam com o encontrado em estudo humano, realizado por Bene, *et al* (2013), onde foi observado diminuição em homens e mulheres com diabetes tipo 1 e 2 e síndrome metabólica frente ao grupo controle.

Fosfatidilcolina (PC*) é um importante fosfolípídeo componente de membranas celulares, lipoproteínas hepáticas

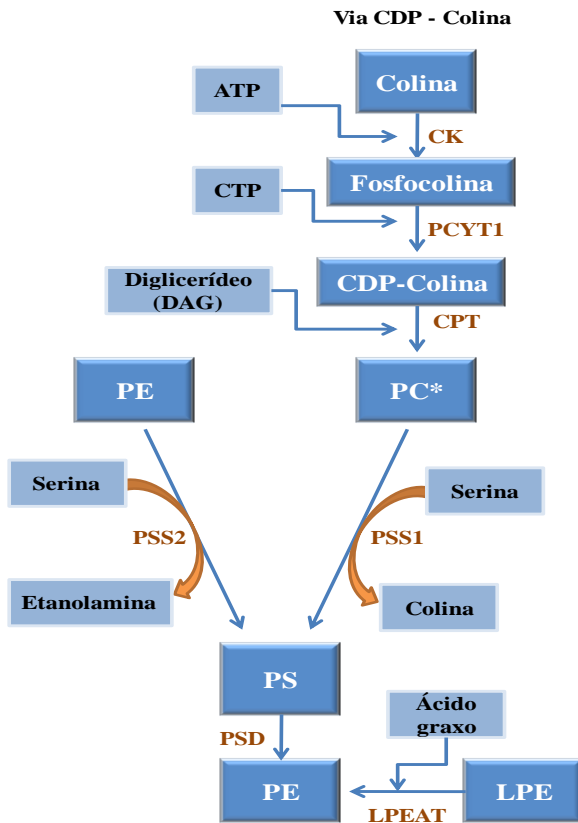
e biliares sendo frequentemente utilizado nas vias de sinalização de células. No presente estudo os níveis diminuídos de PC* e PE em machos e fêmeas tratados com dieta hiperlipídica induzem a tendência de uma acumulação de triacilgliceróis no fígado e uma diminuição da secreção de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), resultando em hepatosteatosis pela síntese de PC* prejudicada (Hartz, *et al.* 2006). Fosfatidiletanolaminas (PE) são consideradas a segunda mais abundante. Em células eucarióticas, PE e fosfatidilserinas (PS) compreendem aproximadamente 20% e 3-15%, respectivamente, do total de fosfolípidos. As PS e PE são aminofosfolípídeos da membrana relacionadas metabolicamente. Em células de mamíferos, PS é necessária para a segmentação e função de várias proteínas de sinalização intracelular. PE desempenha papel importante no coração uma vez que uma diminuição do conteúdo de PE causa dano celular após isquemia, é ainda o substrato fosfolípídico para a enzima hepática N-metiltransferase que fornece cerca de 1/3 do PC* no fígado e precursor para síntese de receptores de canabinóides no cérebro. Verificou-se ainda seu papel na regulação da fusão de membranas do complexo de Golgi em mitose celular (Vance, 2013). PS é sintetizada em células de mamíferos por duas distintas PS sintases, onde há a troca de colina ou etanolamina da PC* e PE, respectivamente por serina (Figura 38).

Em machos tratados com dieta de cafeteria, observa-se diminuição em colina (-14,97%) e fosfocolina (-27,46%), fato que justifica em partes os baixos níveis da maioria dos PC*s (C21:0, C36:4, C36:5, C40:3, C40:9 e C42:7) em machos e (C16:2, C21:0, C32:2, C35:4, C36:4, C36:5 e C38:7) em fêmeas. Não se descarta a interferência no restante da via biossintética de PE e PS, dados pela diminuição na maioria das LPEs relacionadas via ação da enzima liso-PE aciltransferase (LPEAT). Em fêmeas fosfocolina (+27,34 %) aparece aumentada frente à dieta padrão, demonstrando possível aumento na ação da enzima colina quinase (CK) com incremento no gasto

energético (ATP). No entanto, os níveis da maioria dos PC*s mostraram-se diminuídos evidenciando assim, distúrbios na via CDP-colina.

Kim e colaboradores associaram a obesidade com a distintas alterações no sangue e perfil lipídico hepático, incluindo fosfolídeos e ácidos graxos, que foram os metabólitos mais abundantes no sangue e fígado. Em comparação com ratos magros, PC* total e níveis de ácidos graxos foram elevadas em ratos obesos e as mudanças nos níveis de LPC dependiam das cadeias de ácidos graxos. Vários estudos sugerem que a acumulação de gordura é aliviado por tratamento com PC*, apesar de que a relação entre os níveis de PC*s e obesidade não seja clara (Kim, *et al.* 2011). Os autores destacam em seu estudo a diminuição nos níveis de LPC e LPE em sangue e fígado ratos obesos resultados condizentes com estudos realizados em outros estudos em animais e humanos.

Figura 38. Via biossintética em células de mamíferos correlacionando PC*, PE e PS. A rota metabólica CDP – colina inicia pela fosforilação da colina pela ação da enzima colina quinase (CK) produzindo fosfocolina seguido pela produção de CDP-colina mediada por colina citidililtransferase (PCYT1). O final da reação nesta rota é executada sobre CDP-colina: 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase pela ação de colina fosfato transferase (CPT) para formar fosfatidilcolina (PC*). Fosfatidilserina (PS) é sintetizada por reações de troca de bases cálcio-dependentes entre um fosfolípido e L-serina. A enzima PS-sintase-1 (PSS1) catalisa a troca de colina em fosfatidilcolina (PC*) por serina, ao passo que PSS2 catalisa a troca de etanolamina na fosfatidiletanolamina (PE) por serina. A rota CDP- etanolamina para produção de PE não está apresentada, mais detalhes ver (Pavlovic, 2013). PE pode ainda ser produzida na mitocôndria pela descarboxilação de PS pela ação da enzima PS-descarboxilase (PSD). Além disso, a PE pode ser sintetizada pela esterificação de um ácido graxo (FA) em um lisofosfatidiletanolamina (LPE) pela ação da enzima liso-PE aciltransferase (LPEAT). Adaptado de (Vance, 2013 ; Pavlovic, 2013).



Quanto aos níveis de LPC na dieta de cafeteria, em machos aparece aumentado LPC (C-O18:0) e 10 LPCs diminuídos (C15:0, C16:0, C-O16:0, C18:3, C20:0, C20:1, C20:2, C22:4, C22:5 e C14:1). Em fêmeas aparecem aumentados 4 LPCs (C14:0, C16:1, C18:0 e C-O18:0) e diminuídas 6 LPCs (C20:0, C20:1, C20:2, C22:4, C22:5, e C24:0).

Observação oposta foi verificada em machos tratados com extrato de amora frente à dieta de cafeteria, onde os ní-

veis de 5 PC*s (35:4, 36:4, 36:5, 36:6 e 42:7), e dois PEs (38:5 e 38:6) e LPEs (C16:0, C18:0, C20:1, C20:4, C22:4 e C22:6) além de LPSs (C21:0 e C22:0) estão aumentados enquanto 6 LPCs (C16:0, C-O16:0, C17:0, C18:0, C18:1 e C20:3) estão diminuídos. Para fêmeas observamos diminuição de LPCs (C16:1 e C18:0) e o aumento em LPEs (P-16:0, C18:1, C18:2 e C20:1), PS (O-20:0/19:1) e LPS (C21:0).

Análise em soro para estudo metabolômico de obesidade induzida em ratos machos C57BL/6 com dieta rica em gordura identificou a presença e aumento de 11 LPCs (com presença de C14:0, C15:0, C16:0, C16:1, C17:1, C18:1, C18:2, C19:0, C20:1, C20:4), e 2 LPEs (C18:2, C20:4) apresentados diminuídos frente o grupo controle. Os autores indicam alta relevância de distinção entre os grupos de tratamento de dieta com alto teor gordura frente a padrão em PLS-DA sendo dado pelos LPCs contendo (C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2) (Kim, *et al.* 2011). Os resultados observados para machos no presente estudo apontam situação inversa ao encontrado por Kim e colaboradores (2011) quanto à tendência no aumento dos LPCs em machos tratados com dieta de cafeteria, bem como, observamos aumento em LPE (C20:4) um dos LPEs identificado pelos autores. Quando tratados com extrato de amora observou-se o aumento em LPE (C20:4) e diminuição ainda maior dos LPCs (C15:0, C16:0 e C20:1), concordando com efeitos benéficos do extrato de amora frente a obesidade em machos. Já para fêmeas LPCs (C14:0, C16:1 e C18:0) aumentados e LPE (C18:2) diminuída em (-35,92%) concordam com os autores como marcadores de obesidade induzida por dieta nas fêmeas tratadas com dieta de cafeteria. O grupo de fêmeas quando suplementado com extrato de amora apresentaram aumento em LPE (C16:0, C18:1 e C18:2) de 39,58 % para o último e diminuição de LPCs (O-16:1 e C18:0) concordando com os autores.

Estudo em plasma humano, Ha, C-Y. e colaboradores (2012) identificaram 19 metabólitos incluindo, amino ácidos

(leucina, lisina e fenilalanina), 8 acilcarnitinas (C3:0, C8:0, C10:0, C16:0, C17:0, C18:1 e C18:2), 6 LPCs (C14:0, C16:1, C18:3, C20:5 e C22:6) e 3 LPEs (C18:1, C18:2 e C22:6) aumentados em homens com DM2 frente a controle (Ha, *et al.* 2012).

Em outra investigação realizado em humanos na região de Postdam (Alemanha), foram estudados metabólitos marcadores de DM2 em 800 indivíduos com incidência de diabetes tipo 2 e 2.282 indivíduos do grupo controle com idades entre 35 – 65 anos. Em análise metabolômica dirigida em soro foram identificados aumento nas concentrações de hexose, fenilalanina e PC*s (C32:1, C36:1, C38:3 e C40:5) e diminuição nas concentrações de glicina, esfingomielina (C16:1), acilalquil-fosfatidilcolinas (C34:3, C40:6, C42:5, C44:4 e C44:5) e LPC (18:2). Os autores afirmam que estes metabólitos podem funcionar como preditores da DM2 do seu estudo.

Correlacionando os resultados do presente estudo em ratos, com o modelo humano em Postdam evidencia-se que o tratamento concomitante do extrato de amora com a dieta hiperlipídica aumentou os níveis de PC* que contém ácidos graxos de cadeia longa e maior número de insaturações. As PC*s que contém ácidos graxos com menor número de carbonos e ligações duplas foram positivamente associado com o risco de diabetes tipo 2, ao contrário daqueles com um maior número de carbonos e ligações duplas (Floegel, *et al.* 2013). Ainda, associados a diminuição dos níveis de LPC pode-se dizer que em machos o extrato de amora diminui metabólitos associados com inflamação e identificados como marcadores oxidativos (Ha, *et al.* 2012). Em fêmeas, observamos aumentos em LPC (C14:0 e C16:1) em cafeteria e LPC (C16:1) está diminuída na dieta suplementada com amora, no entanto, as LPEs (C18:1 e C18:2) apresentaram-se aumentadas, resultados contrários do benefícios do extrato de amora é verificado, onde aparentemente o processo de inflamação é acentuado.

Especial atenção é dada aos esfingolipídeos, devido não só por serem altamente correlacionados com o grau de obesidade, mas também implicados na etiologia de várias doenças. Estão relacionados com dois fatores deletérios (lipotoxicidade e inflamação) muitas vezes associados à obesidade com risco em desenvolvimento de outras doenças: cardiovasculares (hipertensão, aterosclerose e cardiomiopatias) e diabetes tipo 2.

A lipotoxicidade refere-se à deposição ectópica de gordura nos tecidos não destinados como locais de armazenamento de lipídeos. Além disso, a inflamação, definida por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e aumento da presença e atividade de monócitos/macrófagos, também está presente na obesidade. Estes dois fatores aparentemente distintos na obesidade, lipotoxicidade e inflamação, partilham um grau de linearidade que pode alterar a perspectiva sobre o mecanismo de complicações induzida por inflamação em várias doenças (Bikman, 2012).

O metabolismo de ceramidas em tecidos magros e obesos apresenta-se alterado em modelos de roedores e humanos, mostrando aumento nos níveis de ceramida em músculo esquelético, fígado, e no hipotálamo. Além disso, em paralelo com a mudança de estado inflamatório, com perda de peso, uma redução da massa de gordura está associado a uma redução no tecido e os níveis circulantes de ceramida (Amati, *et al.* 2011).

A presença de várias citocinas pró-inflamatórias resultam em acúmulo de ceramida, ativando a enzima esfingomielinase (SMase), que media a conversão de esfingomielina a ceramida. Considerando-se que a esfingomielina é lípidio dominante na membrana, o seu papel como fonte de ceramida é potencialmente enorme. Recentemente, Holland e colaboradores (2010) demonstraram que os receptores de adiponectina (proteína inibitória de processos inflamatórios) possuem atividade ceramidase, resultando na degradação de ceramida para formar esfingosina. A esfingosina, por sua vez, é fosforilada

por esfingosina-quinase (SK), formando esfingosina-1-fosfato (S1P). Dos vários destinos metabólicos disponível para ceramida, a desacilação e fosforilação (através de ceramidase e esfingosina-quinase, respectivamente) para formar S1P é intrigante na medida em que a ceramida e S1P exercem ações completamente diferentes e até mesmo antagônicas. Em contraste com a ceramida, foi mostrado repetidamente que S1P promove a sobrevivência e crescimento das células, mesmo diretamente antagonizar ceramida. Isto porque, foi mostrado que S1P atua reduzindo a síntese de ceramida através da inibição da atividade enzimática *de novo*. Curiosamente, S1P pode ser um mediador importante do perfil anti-inflamatório nas adiponectinas. S1P demonstrou também inibir ações de citocinas pró-inflamatórias e regular a expressão do gene relacionado com a inflamação (Amati, *et al.* 2011). A Figura 39 mostra a relação biossintética simplificada correlacionando os esfingolípídeos aqui discutidos.

Figura 39. Vários esfingolipídeos provocam resultados deletérios metabolicamente semelhantes à ceramida. No entanto, apenas a formação de ceramida (no presente esquema representado apenas com outros esfingolipídeos de interesse no presente estudo) foi demonstrada que podem mediar distúrbios induzidos por inflamação. A inibição das enzimas indicadas convida aos resultados descritos. Legenda: esfingosina - 1 - fosfato (S1P), esfingomielinase sintase (SMS), esfingomielinase (SMase) e esfingosina quinase (SK). Adaptado de (Bikman, 2012).

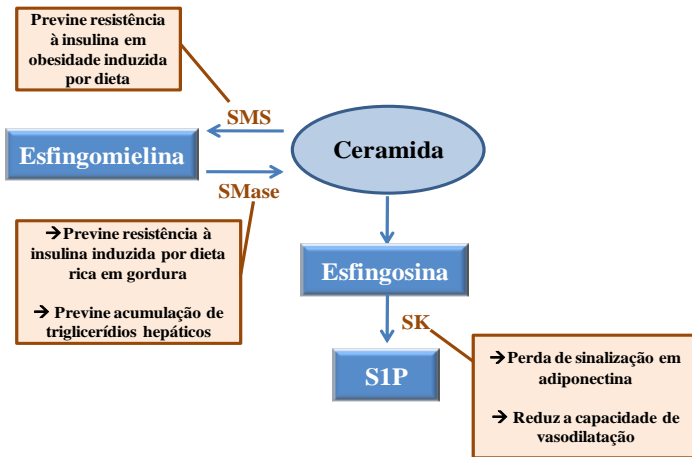


Tabela 22. Alterações metabólicas em esfingolipídeos.

	Machos ^a		Fêmeas ^a	
	<i>Caf</i>	<i>CafR</i>	<i>Caf</i>	<i>CafR</i>
Esfingosina - 1 - fosfato (S1P)	↓ (-18,67)	↑ (74,76)	-	-
Ceramida CerP(d18:1/8:0)	-	↓ (-14,53)	↑ (29,29)	↓ (-16,03)
Esfingomielina SM(d18:1/14:0)	-	-	↑ (277,83)	-

^a Valores em percentual de alteração. Para *Caf* com relação à dieta padrão e *CafR* com relação a dieta de cafeteria.

De acordo com a Figura 39 e os resultados observados no presente estudo Tabela 22 quando da desativação das enzimas envolvidas no processo de biossíntese de ceramida seriam esperados a diminuição nos níveis de S1P ocasionando perdas de sinalização em adiponectinas, proteínas importantes na melhora de processos inflamatórios, bem como redução da capacidade de vasodilatação. Este efeito poderia ser esperado em machos tratados com dieta de cafeteria, onde posteriormente os níveis de S1P aumentados em (74,76%) na dieta com presença de extrato de amora estaria melhorando a sinalização do processo inflamatório ocasionado pela dieta hiperlipídica. Ainda, esfingomiélinina presente apenas em fêmeas tratadas com dieta de cafeteria apresentou-se significativamente aumentada (277,83 %) frente à dieta padrão, demonstrando que espera-se efeitos deletérios quanto a resistência à insulina em obesidade induzida por dieta, ao passo que baixos níveis de ceramidas previnem a resistência à insulina induzida por dieta gorda, bem como a acumulação de triglicérides hepáticos. Pode-se observar este comportamento em ambos os gêneros com diminuição em ceramida nos animais tratados com extrato de amora.

Vale salientar que metabólitos intracelulares, resultantes do metabolismo de FFA (acil-Coa, diacilglicerol e ceramidas) e do triglicerol são considerados tóxicos por promoverem insulino-resistência pela diminuição da ativação da via de sinalização da insulina e de múltiplas etapas do metabolismo da glicose (Belfort, *et al.* 2005).

Quanto aos esteróis foram identificados em machos aumento em ácido 3-glucaronídeo taurolitocólico (34,48 %) e em fêmeas diminuídos di e trihidroxi-colestanol taurina (-15,76 % e -14,55 %, respectivamente) nas dietas de cafeteria frente a padrão. Recentemente Swann *et al.* (2011) revelaram que em ratos livres de germes e tratados com antibióticos exibiram menor diversidade de ácidos biliares e um grande aumento nos ácidos biliares conjugados com taurina, confir-

mando papel da microflora intestinal na regulação do conjunto de ácidos biliares (Swann, *et al.* 2011). Estes estudos sugerem que a perturbação da microflora intestinal pode ser a base algumas das alterações metabólicas em diabetes, assim como o risco de diabetes (Lu, *et al.* 2013).

5.2.5 Modos de visualização SUS-plot

O modo de visualização de SUS-plot pode ser aplicado anteriormente a identificação de metabólitos, utilizando os modelos de OPLS-DA no tratamento dos dados com o objetivo de simplificar a identificação de potenciais biomarcadores no estudo, e ainda para diferenciar metabólitos específicos. No presente estudo, sejam estes metabólitos específicos da dieta ou do gênero dos animais. No SUS-plot, a correlação da componente de previsão, Corr (tp, X), de cada modelo foi plotada uma contra outra, onde cada ponto do SUS-plot representa um possível metabólito. Os metabólitos que se encontrem entre as duas últimas elipses são os específicos de cada variável, no presente caso a dieta ou ao gênero (Wiklund, *et al.* 2008).

De acordo com os parâmetros de qualidade dos modelos conjuntos de OPLS-DA [Figuras 40 e 41 (A)], observa-se que as componentes t[1] e t[2] separam e apresentam praticamente pesos equivalentes para separação das amostras entre dietas e gênero dos animais, respectivamente para Caf vs Std e CafR vs Caf. Nos respectivos SUS-plot [Figuras 40 e 41 (B)], verifica-se a presença de metabólitos específicos (pontos coloridos) para dieta e gênero na comparação Caf vs Std. Estes metabólitos foram identificados como ácido palmítico e PC(21:0 CHO) para machos, LPC(18:0) para dieta padrão. Fêmeas com LPC(O-18:0) e SM(d18:1/14:0), sendo este último específico de fêmeas em dieta de cafeteria (identificado no gráfico de SUS-plot da Figura 40 (B) como ponto verde entre fêmeas e cafeteria).

Figura 40. Comparação entre os OPLS-DAs para machos e fêmeas da comparação Caf vs Std, (A). SUS-plot para comparação Caf vs Std para machos e fêmeas, (B).

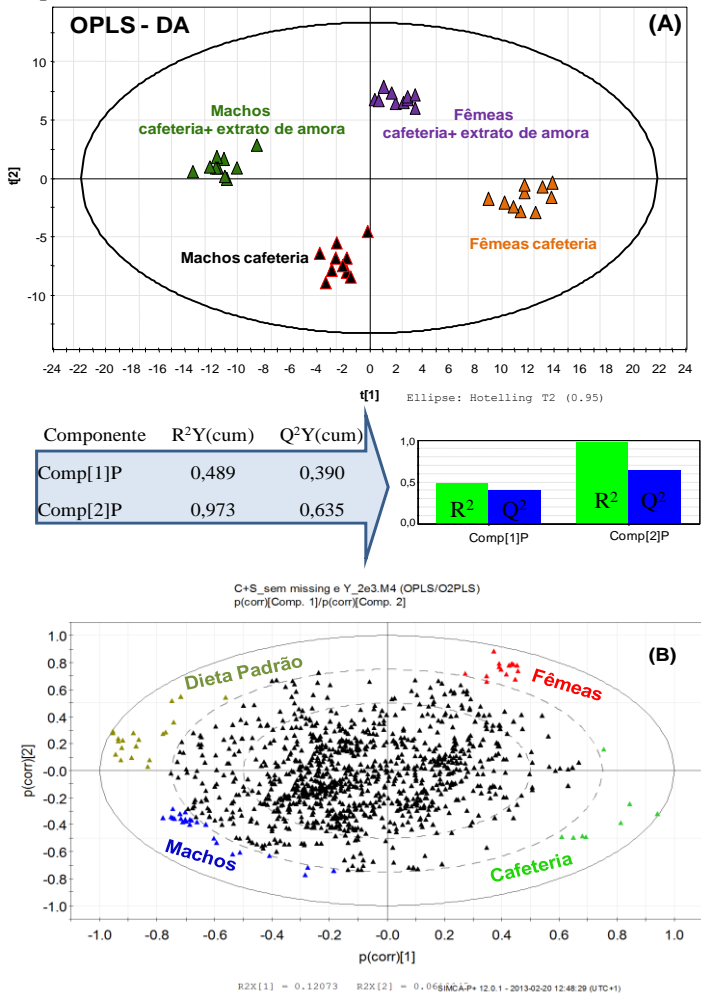
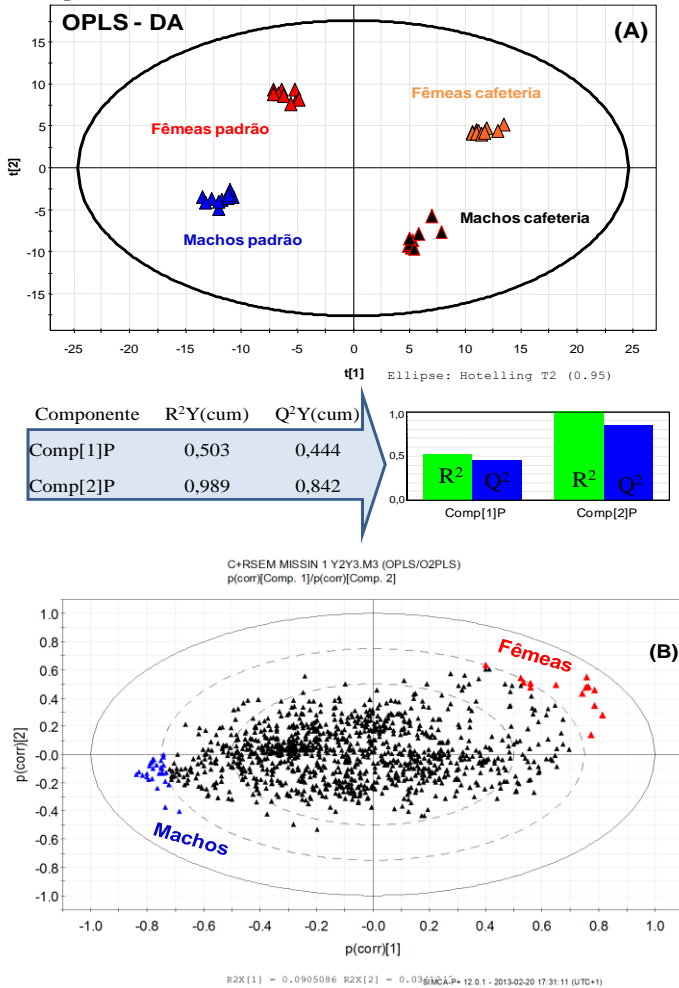


Figura 41. Comparação entre os OPLS-DAs para machos e fêmeas da comparação CafR vs Caf, (A). SUS-plot para comparação CafR vs Caf para machos e fêmeas, (B).



Para a comparação de dietas de cafeteria suplementada com extrato de amora a primeira constatação é a ausência de metabólitos específicos que diferenciem a suplementação. Fato que concorda com a também ausência destes metabólitos oriundos da amora identificados e discutidos anteriormente. Apenas observa-se variação em metabólitos relacionados com a dieta hiperlipídica. Especificamente quanto ao gênero dos animais verificou-se a presença e identificação de apenas um metabólito LPS(22:0) em machos e LPE(20:0) em fêmeas, demonstrando a importância da realização do tratamento dos dados diferenciando em gêneros, bem como, indícios de ação diferenciada do extrato de amora quanto ao gênero dos animais.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A extração utilizando metanol como etanol podem ser aplicados na preparação do extrato de amora com variações no parâmetros de extração sem perda significativa da qualidade dos flavonóides e antocianinas totais após período de conservação de 120 dias a -20°C . A pertinência do uso de metanol ou etanol se fundamentam na possibilidade de no futuro realizar-se novos estudos metabolômicos com modelos animais ou humanos.

Além da caracterização química do extrato, o método por CE-UV foi validado para a extração, identificação e quantificação de catequinas em amostras de amora, fornecendo a evidência de que epicatequina é o flavonóide livre de concentração predominante na espécie *Rubus fruticosus*, identificado e quantificado pela primeira vez na variedade Lochness.

Os estudos metabolômicos realizados sobre amostras de plasma em animais tratados com dieta hiperlipídica e suplementada com extrato de amora preta levaram as seguintes observações:

(i) Os altos níveis de acilcarnitinas detectados em animais tratados com dieta de cafeteria demonstram efeitos negativos no processo de beta oxidação lipídica. Enquanto os baixos níveis de PC* e LPC apontam para insuficiência na via biossintética CDP-colina. Estas evidências podem levar a acúmulo de triglicerídeos no fígado levando a um estado de obesidade. A administração do extrato de amora concomitante a dieta de cafeteria aumentou os níveis de PC* e diminuíram ainda mais os de LPC em plasma de machos indicando efeitos de melhora sobre o processo de obesidade. Ainda, os resultados observados para linoleil carnitina C18:2 no presente estudo também concordam com o encontrado em estudo humano,

onde foi observado diminuição em homens e mulheres com diabetes tipo 1 e 2 e síndrome metabólica frente ao grupo controle.

(ii) Os resultados observados para machos apontaram aumento dos LPCs nos tratados com dieta de cafeteria, bem como em LPE (C20:4). Quando tratados com extrato de amora observou-se o aumento em LPE (C20:4) e diminuição ainda maior dos LPCs (C15:0, C16:0 e C20:1), concordando com efeitos benéficos do extrato de amora frente a obesidade e inflamação. Já para fêmeas tratadas com dieta de cafeteria, LPCs (C14:0, C16:1 e C18:0) aumentadas e LPE (C18:2) diminuída são consideradas marcadores de obesidade induzida por dieta. O grupo de fêmeas suplementado com extrato de amora apresentaram aumento em LPE (C16:0, C18:1 e C18:2) e diminuição de LPCs (O-16:1 e C18:0) concordando com efeitos benéficos do extrato sobre obesidade.

(iii) Quanto aos esfingolipídeos, o extrato de amora parece reduzir os níveis de ceramidas em plasma, mostrando evidências em perda de massa lipídica dos tecido, ou seja, relacionando amora positivamente com efeitos anti-obesidade. O aumento de esfingosina – 1 – fosfato em machos é outro indício da melhora no processo inflamatório ocasionado pela administração da dieta hiperlipídica.

Os resultados mostram que a suplementação com extrato de amora na dieta hiperlipídica parece melhorar o quadro de obesidade, tendo em vista que esta é um dos principais fatores associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, resistência à insulina e consequentemente assim, apresenta potencial para retardar o desenvolvimento de DM2.

Não foram identificados biomarcadores para a suplementação com extrato de amora, no entanto, identificou-se apenas um metabólito específico ao gênero dos animais,

LPS(22:0) em machos e LPE(20:0) em fêmeas, mas nenhum metabólito específico de dieta.

Tendo em vista que os resultados expostos aqui são referentes à avaliação dos metabólitos em plasma dos animais coletados com 90 dias de tratamento com dietas, as amostras de plasma coletadas no tempo de 240 dias seriam interessantes de serem tratadas, averiguando assim, o efeito em longo prazo nos animais que deixaram de receber a suplementação de amora e dieta hiperlipídica.

Uma atribuição mais completa das alterações metabólicas ocasionadas pela administração de extrato de amora como promotor de melhora em quadro de obesidade e DM2 é factível pela utilização de uma única plataforma analítica, no presente caso cromatografia líquida. Outros metabólitos associados ao ciclo do ácido cítrico crucial no entendimento do estresse oxidativo poderiam ter sido avaliados pelas técnicas de cromatografia gasosa e complementados por eletroforese capilar. Ainda, um estudo proteômico concomitante seria interessante para avaliação das proteínas e enzimas ativadas ou não pela administração das dietas, enriquecendo a qualidade dos resultados e entendimento concreto das vias metabólicas envolvidas.

7 REFERÊNCIAS

Acosta-Montoya, Ó., F. Vaillant, S. Cozzano, C. Mertz, A. M. Pérez and M. V. Castro (2010). "Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages." Food Chemistry **119**(4): 1497-1501.

Amusquivar, E., Schiffner, S., Herrera, E. (2011). "Evaluation of two methods for plasma fatty acid analysis by GC." Eur. J. Lipid Sci. Technol. **113**: 711–716.

Andersen, O. M. (1985). "Chromatographic separation of anthocyanins in cowberry (lingonberry) *Vaccinium vitis-idaea* L." J. Food Science **50**: 1230-1232.

Andersen, Ø. M. J., M. (2006). The Anthocyanins. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. O. M. M. Andersen, K. R. Boca Raton - FL, Taylor & Group, LLC: 472-537.

Andronesi, O. C., K. D. Blekas, D. Mintzopoulos, L. Astrakas, P. M. Black and A. A. Tzika (2008). "Molecular classification of brain tumor biopsies using solid-state magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy and robust classifiers." Int J Oncol **33**(5): 1017-1025.

Antonio, C., T. Larson, A. Gilday, I. Graham, E. Bergstrom and J. Thomas-Oates (2008). "Hydrophilic interaction chromatography/electrospray mass spectrometry analysis of carbohydrate-related metabolites from *Arabidopsis thaliana* leaf tissue." Rapid Commun Mass Spectrom **22**(9): 1399-1407.

Awika, J. M., L. W. Rooney and R. D. Waniska (2005). "Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties." Food Chemistry **90**(1–2): 293-301.

Axelsson, D. E. (2012). Data Preprocessing for Chemometric and Metabonomic Analysis, Createspace, USA.

Bain, J. R., R. D. Stevens, B. R. Wenner, O. Ilkayeva, D. M. Muoio and C. B. Newgard (2009). "Metabolomics applied to diabetes research: moving from information to knowledge." Diabetes **58**(11): 2429-2443.

Basterra-Gortari, F. J., M. Bes-Rastrollo, M. Segui-Gomez, L. Forga, J. A. Martinez and M. A. Martinez-Gonzalez (2007). "[Trends in obesity, diabetes mellitus, hypertension and hypercholesterolemia in Spain (1997-2003)]." Med Clin (Barc) **129**(11): 405-408.

Baumgartner, C., M. Osl, M. Netzer and D. Baumgartner (2011). "Bioinformatic-driven search for metabolic biomarkers in disease." J Clin Bioinforma **1**(1): 2.

Becher, J., A. Muck, A. Mithofer, A. Svatos and W. Boland (2008). "Negative ion mode matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometric analysis of oligosaccharides using halide adducts and 9-aminoacridine matrix." Rapid Commun Mass Spectrom **22**(8): 1153-1158.

Beecher, G. R. (2003). "Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake." J Nutr **133**(10): 3248S-3254S.

Bentley, R. (1999). "Secondary metabolite biosynthesis: the first century." Crit Rev Biotechnol **19**(1): 1-40.

Bjelland, S., P. Bray, N. Gupta and R. Hirscht (2002). "Dentists, diabetes and periodontitis." Aust Dent J **47**(3): 202-207; quiz 272.

Boccard, J., J. L. Veuthey and S. Rudaz (2010). "Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling." J Sep Sci **33**(3): 290-304.

Braguinsky, J. (2002). "[Obesity prevalence in Latin America]." An Sist Sanit Navar **25 Suppl 1**: 109-115.

Bridle, P. and C. García-Viguera (1997). "Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC." Food Chemistry **59**(2): 299-304.

Bruce, S. J., I. Tavazzi, V. Parisod, S. Rezzi, S. Kochhar and P. A. Guy (2009). "Investigation of human blood plasma sample preparation for performing metabolomics using ultrahigh performance liquid chromatography/mass spectrometry." Anal Chem **81**(9): 3285-3296.

Brunzell, J. D., M. Davidson, C. D. Furberg, R. B. Goldberg, B. V. Howard, J. H. Stein, J. L. Witztum, A. American Diabetes and F. American College of Cardiology (2008). "Lipoprotein management in patients with cardiometabolic risk: consensus statement from the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation." Diabetes Care **31**(4): 811-822.

Burdulis, D. J., V. Milasius, A. Jakstas, V. Ivanauskas, L. (2008). "Method Development for determination of anthocyanidin content in Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits." J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. **31**: 850-864.

- Cacace, J. E. and G. Mazza (2003). "Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries." Journal of Food Engineering **59**(4): 379-389.
- Can, N. O. A., G. Atkosar, Z. (2012). "Rapid determination of free anthocyanins in foodstuffs using high performance liquid chromatography." Food Chemistry **130**(4): 1082-1089.
- Canada, A. a. A.-F. (2012). "Agriculture and Agri-Food Canada." Retrieved 30 mai. 2012, 2012, from www.agr.gc.ca.
- Castañeda-Ovando, A., M. d. L. Pacheco-Hernández, M. E. Páez-Hernández, J. A. Rodríguez and C. A. Galán-Vidal (2009). "Chemical studies of anthocyanins: A review." Food Chemistry **113**(4): 859-871.
- Cerón, I. X., J. C. Higuera and C. A. Cardona (2012). "Design and analysis of antioxidant compounds from Andes Berry fruits (*Rubus glaucus* Benth) using an enhanced-fluidity liquid extraction process with CO₂ and ethanol." The Journal of Supercritical Fluids **62**(0): 96-101.
- Cevallos-Cevallos, J. M., J. I. Reyes-De-Corcuera, E. Etxeberria, M. D. Danyluk and G. E. Rodrick (2009). "Metabolomic analysis in food science: a review." Trends in Food Science & Technology **20**(11–12): 557-566.
- Chen, F., Y. Sun, G. Zhao, X. Liao, X. Hu, J. Wu and Z. Wang (2007). "Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry." Ultrasonics Sonochemistry **14**(6): 767-778.

Ciborowski, M., J. Teul, J. L. Martin-Ventura, J. Egido and C. Barbas (2012). "Metabolomics with LC-QTOF-MS permits the prediction of disease stage in aortic abdominal aneurysm based on plasma metabolic fingerprint." PLoS One **7**(2): e31982.

Clifford, M. N. (2000). "Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden." Journal of the Science of Food and Agriculture **80**(7): 1063-1072.

Crockford, D. J., A. D. Maher, K. R. Ahmadi, A. Barrett, R. S. Plumb, I. D. Wilson and J. K. Nicholson (2008). "¹H NMR and UPLC-MS(E) statistical heterospectroscopy: characterization of drug metabolites (xenometabolome) in epidemiological studies." Anal Chem **80**(18): 6835-6844.

Cuevas-Rodríguez, E. O., G. G. Yousef, P. A. García-Saucedo, J. López-Medina, O. Paredes-López and M. A. Lila (2010). "Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in wild and domesticated Mexican blackberries (*Rubus* spp.)." J Agric Food Chem **58**(12): 7458-7464.

da Costa, C. T., B. C. Nelson, S. A. Margolis and H. Derek (1998). "Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis." Journal of Chromatography A **799**(1–2): 321-327.

Dai, J., A. Gupte, L. Gates and R. J. Mumper (2009). "A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms." Food and Chemical Toxicology **47**(4): 837-847.

Database-Canada, H. M. P. H. M. (2012). "Human Metabolome Project: Human Metabolome Database-Canada." Retrieved 30 mai., 2012.

Denev, P., M. Ciz, G. Ambrozova, A. Lojek, I. Yanakieva and M. Kratchanova (2010). "Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties." Food Chemistry **123**(4): 1055-1061.

Dey, P. M. H., J. B. (1993). Plant phenolics methods in plant biochemistry. London, Academic Press Limited.

Donner, H., L. Gao and G. Mazza (1997). "Separation and characterization of simple and malonylated anthocyanins in red onions, *Allium cepa* L." Food Research International **30**(8): 637-643.

Dunn, W. B., D. Broadhurst, P. Begley, E. Zelena, S. Francis-McIntyre, N. Anderson, M. Brown, J. D. Knowles, A. Halsall, J. N. Haselden, A. W. Nicholls, I. D. Wilson, D. B. Kell and R. Goodacre (2011). "Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry." Nat Protoc **6**(7): 1060-1083.

Efron, B., Tibshirani, R., (1993). An Introduction to the Bootstrap, Chapman & Hall.

Ehala, S., M. Vaher and M. Kaljurand (2005). "Characterization of phenolic profiles of Northern European berries by capillary electrophoresis and determination of their antioxidant activity." J Agric Food Chem **53**(16): 6484-6490.

Evaristo Jiménez-Contreras, D. T.-S., Rafael Bailón-Moreno, Rosario Ruiz-Baños, Emilio Delgado López-Cózar (2009).

"Response Surface Methodology and its application in evaluating scientific activity." Scientometrics **79**: 201-218.

Faber, J. H., D. Malmudin, H. Toft, A. D. Maher, D. Crockford, E. Holmes, J. K. Nicholson, M. E. Dumas and D. Baunsgaard (2007). "Metabonomics in diabetes research." J Diabetes Sci Technol **1**(4): 549-557.

Fan-Chiang, H.-J. and R. E. Wrolstad (2005). "Anthocyanin Pigment Composition of Blackberries." Journal of Food Science **70**(3): C198-C202.

Fardet, A., R. Llorach, J. F. Martin, C. Besson, B. Lyan, E. Pujos-Guillot and A. Scalbert (2008). "A liquid chromatography-quadrupole time-of-flight (LC-QTOF)-based metabolomic approach reveals new metabolic effects of catechin in rats fed high-fat diets." J Proteome Res **7**(6): 2388-2398.

Fiehn, O. (2002). "Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes." Plant Mol Biol **48**(1-2): 155-171.

Fiehn, O., Kind, T., (2007). Metabolomics, Humana Press.

Figuerola, D. R., E. (1995). Diabete mellitus. En. Farreras, Rozman. Medicina interna. Madrid España, Madrid Mosby-Doyma libros.

Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.

Franiak-Pietryga, I., M. Koter-Michalak, M. Broncel, P. Duchnowicz and J. Chojnowska-Jeziarska (2009). "Anti-inflammatory and hypolipemic effects in vitro of simvastatin comparing to epicatechin in patients with type-2

hypercholesterolemia." Food and Chemical Toxicology **47**(2): 393-397.

Fukuji, T. S., F. G. Tonin and M. F. Tavares (2010). "Optimization of a method for determination of phenolic acids in exotic fruits by capillary electrophoresis." J Pharm Biomed Anal **51**(2): 430-438.

Gary J. Patti, O. Y. a. G. S. (2012). "Metabolomics: the apogee of the omics trilogy " NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY **13**: 263-269.

Genest, J. (2003). "Lipoprotein disorders and cardiovascular risk." J Inherit Metab Dis **26**(2-3): 267-287.

Gika, H. G., E. Macpherson, G. A. Theodoridis and I. D. Wilson (2008). "Evaluation of the repeatability of ultra-performance liquid chromatography-TOF-MS for global metabolic profiling of human urine samples." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **871**(2): 299-305.

Giusti. M. M. Wrolstad, R. E. (2001). "Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy."

Godzien, J., M. Ciborowski, S. Angulo and C. Barbas (2013). "From numbers to a biological sense: how the strategy chosen for metabolomics data treatment may affect final results. A practical example based on urine fingerprints obtained by LC-MS." Electrophoresis.

Gorbatsova, J., T. Lougas, R. Vokk and M. Kaljurand (2007). "Comparison of the contents of various antioxidants of sea buckthorn berries using." Electrophoresis **28**(22): 4136-4142.

Gould, K. S. L., C. (2006). Flavonoids Functions in Plants. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. O. M. M. Andersen, K. R. Boca Raton - FL, LLC, Taylor & Francis Group: 397-441.

Griffin, J. L. and A. Vidal-Puig (2008). "Current challenges in metabolomics for diabetes research: a vital functional genomic tool or just a ploy for gaining funding?" Physiol Genomics **34**(1): 1-5.

Grundty, S. M. (1990). Cholesterol and atherosclerosis: Diagnosis and treatment. Philadelphia, PA, J. B. Lippincott Company.

Harborne, J. B. and C. A. Williams (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." Phytochemistry **55**(6): 481-504.

Hastie, T., Tibshirani, R., Friedman, J., Franklin, J., (2005). "The Mathematical Intelligencer." **27**: 83-85.

Hegele, R. A. (2009). "Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications." Nat Rev Genet **10**(2): 109-121.

Hendriks, M. M. W. B., F. A. v. Eeuwijk, R. H. Jellema, J. A. Westerhuis, T. H. Reijmers, H. C. J. Hoefsloot and A. K. Smilde (2011). "Data-processing strategies for metabolomics studies." TrAC Trends in Analytical Chemistry **30**(10): 1685-1698.

Heredia, F. J., E. M. Francia-Aricha, J. C. Rivas-Gonzalo, I. M. Vicario and C. Santos-Buelga (1998). "Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes—I. pH effect." Food Chemistry **63**(4): 491-498.

Howard, L. R., R. L. Prior, R. Liyanage and J. O. Lay (2012). "Processing and Storage Effect on Berry Polyphenols: Challenges and Implications for Bioactive Properties." J Agric Food Chem.

Hurtado-Fernandez, E., M. Gomez-Romero, A. Carrasco-Pancorbo and A. Fernandez-Gutierrez (2010). "Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material." J Pharm Biomed Anal **53**(5): 1130-1160.

Häkkinen, S., M. Heinonen, S. Kärenlampi, H. Mykkänen, J. Ruuskanen and R. Törrönen (1999). "Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries." Food Research International **32**(5): 345-353.

Idborg, H., L. Zamani, P. O. Edlund, I. Schuppe-Koistinen and S. P. Jacobsson (2005). "Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS Part 2. Data pretreatment methods for handling of complex data." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **828**(1-2): 14-20.

IDF, I. D. F.-. (2011). "Annual Report 2011." Retrieved 30 mai., 2012, from www.idf.org/publications/annual-report-2011.

Ignat, I., I. Volf and V. I. Popa (2011). "A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables." Food Chemistry **126**(4): 1821-1835.

Imes, C. C. and M. A. Austin (2012). "Low-Density Lipoprotein Cholesterol, Apolipoprotein B, and Risk of Coronary Heart Disease: From Familial Hyperlipidemia to Genomics." Biol Res Nurs.

Izumi, Y., A. Okazawa, T. Bamba, A. Kobayashi and E. Fukusaki (2009). "Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry." Anal Chim Acta **648**(2): 215-225.

Jacques, A. C., Pertuzatti, P.B., Barcia, M. T., Zambiasi, R. C., Chim, J. F. (2010). "ESTABILIDADE DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM POLPA CONGELADA DE AMORA-PRETA (*Rubus fruticosus*) cv.TUPY." Quim. Nova **33**(8): 1720-1725.

Jankevics, A., E. Liepinsh, E. Liepinsh, R. Vilskersts, S. Grinberga, O. Pugovics and M. Dambrova (2009). "Metabolomic studies of experimental diabetic urine samples by 1H NMR spectroscopy and LC/MS method." Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems **97**(1): 11-17.

Jepson, R. G. C., J. C. (2005). The American heritage science dictionary. North America, Houghton Mifflin Company.

Jordheim, M., K. H. Enerstvedt and O. M. Andersen (2011). "Identification of cyanidin 3-O-beta-(6"-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl)glucoside) and other anthocyanins from wild and cultivated blackberries." J Agric Food Chem **59**(13): 7436-7440.

Kapasakalidis, P. G., R. A. Rastall and M. H. Gordon (2006). "Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues." J Agric Food Chem **54**(11): 4016-4021.

Kaume, L., W. C. Gilbert, C. Brownmiller, L. R. Howard and L. Devareddy (2012). "Cyanidin 3-O- β -d-glucoside-rich

blackberries modulate hepatic gene expression, and anti-obesity effects in ovariectomized rats." Journal of Functional Foods **4**(2): 480-488.

Kavraki, L. E. (29 julho 2013) "Dimensionality reduction methods for molecular motion."

Kim, H. K. and R. Verpoorte (2010). "Sample preparation for plant metabolomics." Phytochem Anal **21**(1): 4-13.

Kimura, H., S. Ogawa, T. Akihiro and K. Yokota (2011). "Structural analysis of A-type or B-type highly polymeric proanthocyanidins by thiolytic degradation and the implication in their inhibitory effects on pancreatic lipase." Journal of Chromatography A **1218**(42): 7704-7712.

Kind, T. and O. Fiehn (2010). "Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry." Bioanal Rev **2**(1-4): 23-60.

Kipping, R. R., R. Jago and D. A. Lawlor (2008). "Obesity in children. Part 1: Epidemiology, measurement, risk factors, and screening." BMJ **337**: a1824.

Kipping, R. R., R. Jago and D. A. Lawlor (2008). "Obesity in children. Part 2: Prevention and management." BMJ **337**: a1848.

Kolovou, G. D., K. K. Anagnostopoulou, P. M. Kostakou, H. Bilianou and D. P. Mikhailidis (2009). "Primary and secondary hypertriglyceridaemia." Curr Drug Targets **10**(4): 336-343.

Kong, J.-M., L.-S. Chia, N.-K. Goh, T.-F. Chia and R. Brouillard (2003). "Analysis and biological activities of anthocyanins." Phytochemistry **64**(5): 923-933.

- Kos, G., H. Lohninger and R. Krska (2003). "Validation of chemometric models for the determination of deoxynivalenol on maize by mid-infrared spectroscopy." *Mycotoxin Res* **19**(2): 149-153.
- Lee, A. L., K. D. Bartle and A. C. Lewis (2001). "A Model of Peak Amplitude Enhancement in Orthogonal Two-Dimensional Gas Chromatography." *Analytical Chemistry* **73**(6): 1330-1335.
- Lee, J., M. Dossett and C. E. Finn (2012). "Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing." *Food Chemistry* **130**(4): 785-796.
- Lee, J., C. E. Finn and R. E. Wrolstad (2004). "Comparison of anthocyanin pigment and other phenolic compounds of *Vaccinium membranaceum* and *Vaccinium ovatum* native to the Pacific Northwest of North America." *J Agric Food Chem* **52**(23): 7039-7044.
- Li, X., H. Song, S. Yao, C. Jia, Y. Yang and W. Zhu (2011). "Quantitative analysis and recovery optimisation of flavonoids and anthocyanins in sugar-making process of sugarcane industry." *Food Chemistry* **125**(1): 150-157.
- Lorenzi, H. B., L. Lacerda, M. Sartori, S. (2006). *Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura*. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Lusis, A. J. and P. Pajukanta (2008). A treasure trove for lipoprotein biology. *Nat Genet*. United States. **40**: 129-130.
- Maatta-Riihinen, K. R., A. Kamal-Eldin and A. R. Torronen (2004). "Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae)." *J Agric Food Chem* **52**(20): 6178-6187.

Mathers, C. D., T. Boerma and D. Ma Fat (2009). "Global and regional causes of death." Br Med Bull **92**: 7-32.

Matsubara, A., T. Bamba, H. Ishida, E. Fukusaki and K. Hirata (2009). "Highly sensitive and accurate profiling of carotenoids by supercritical fluid chromatography coupled with mass spectrometry." J Sep Sci **32**(9): 1459-1464.

Merken, H. M. and G. R. Beecher (2000). "Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review." J Agric Food Chem **48**(3): 577-599.

Mertz, C., V. Cheynier, Z. Gunata and P. Brat (2007). "Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry." J Agric Food Chem **55**(21): 8616-8624.

Michopoulos, F., L. Lai, H. Gika, G. Theodoridis and I. Wilson (2009). "UPLC-MS-based analysis of human plasma for metabolomics using solvent precipitation or solid phase extraction." J Proteome Res **8**(4): 2114-2121.

Middleton, E. (1998). "Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function." Adv Exp Med Biol **439**: 175-182.

Monagas, M., J. E. Quintanilla-López, C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé and R. Lebrón-Aguilar (2010). "MALDI-TOF MS analysis of plant proanthocyanidins." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **51**(2): 358-372.

Monteiro, J. M., U. P. d. Albuquerque, E. d. L. Araújo and E. L. C. d. Amorim (2005). "Taninos: uma abordagem da química à ecologia." Química Nova **28**: 892-896.

Morgenthal, K., Wienkoop, S., Wolschin, F., Weckwerth, W. (2007). Metabolomics, Humana Press

Nakanishi, Y., S. Fukuda, E. Chikayama, Y. Kimura, H. Ohno and J. Kikuchi (2011). "Dynamic omics approach identifies nutrition-mediated microbial interactions." J Proteome Res **10**(2): 824-836.

Nicholson, J. K. (2006). Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. Mol Syst Biol. England. **2**: 52.

Nicholson, J. K., E. Holmes and J. C. Lindon (2007). Chapter 1 - Metabonomics and Metabolomics Techniques and Their Applications in Mammalian Systems. The Handbook of Metabonomics and Metabolomics. C. L. John, J. K. N. Jeremy K. Nicholson and Elaine HolmesA2 - John C. Lindon and H. Elaine. Amsterdam, Elsevier Science B.V.: 1-33.

Nicholson, J. K. and J. C. Lindon (2008). Systems biology: Metabonomics. Nature. England. **455**: 1054-1056.

Nicholson, J. K., J. C. Lindon and E. Holmes (1999). "Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data." Xenobiotica **29**(11): 1181-1189.

Nordstrom, A., G. O'Maille, C. Qin and G. Siuzdak (2006). "Nonlinear data alignment for UPLC-MS and HPLC-MS based metabolomics: quantitative analysis of endogenous and exogenous metabolites in human serum." Anal Chem **78**(10): 3289-3295.

Ogden, C. L., S. Z. Yanovski, M. D. Carroll and K. M. Flegal (2007). "The epidemiology of obesity." Gastroenterology **132**(6): 2087-2102.

Oliver, R. C. and T. Tervonen (1994). "Diabetes--a risk factor for periodontitis in adults?" J Periodontol **65**(5 Suppl): 530-538.

Ordovas, J. M. (2009). "[Integrating environment and disease into "omic" analysis]." Rev Esp Cardiol **62 Suppl 2**: 17-22.

Oresic, M. (2009). "Metabolomics, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction." Nutr Metab Cardiovasc Dis **19**(11): 816-824.

Oscar Yanes, J. C., Diana M Wong, Gary J Patti, Antonio Sanchez-Ruiz, H Paul Benton, Sunia A Trauger, Caroline Despons, Sheng Ding, Gary Siuzdak (2010). "Metabolomic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation." Nat Chem Biol. **6**(6): 411-417.

Paredes-López, O., M. L. Cervantes-Ceja, M. Vigna-Pérez and T. Hernández-Pérez (2010). "Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life--a review." Plant Foods Hum Nutr **65**(3): 299-308.

Pearson, H. (2007). Meet the human metabolome. Nature. England. **446**: 8.

Plumb, R., J. Castro-Perez, J. Granger, I. Beattie, K. Joncour and A. Wright (2004). "Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **18**(19): 2331-2337.

Polson, C., P. Sarkar, B. Incledon, V. Raguvaran and R. Grant (2003). "Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **785**(2): 263-275.

Poulev, A., J. M. O'Neal, S. Logendra, R. B. Pouleva, V. Timeva, A. S. Garvey, D. Gleba, I. S. Jenkins, B. T. Halpern, R. Kneer, G. M. Cragg and I. Raskin (2003). "Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery." J Med Chem **46**(12): 2542-2547.

Preti, G. (2005). "Metabolomics comes of age?" The Scientist **19**(11): 8.

Prince, P. S. (2011). "A biochemical, electrocardiographic, electrophoretic, histopathological and in vitro study on the protective effects of (-)epicatechin in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats." Eur J Pharmacol **671**(1-3): 95-101.

Puiggròs, F., R. Solà, C. Bladé, M.-J. Salvadó and L. Arola (2011). "Nutritional biomarkers and foodomic methodologies for qualitative and quantitative analysis of bioactive ingredients in dietary intervention studies." Journal of Chromatography A **1218**(42): 7399-7414.

Putri, S. P., S. Yamamoto, H. Tsugawa and E. Fukusaki (2013). "Current metabolomics: Technological advances." Journal of Bioscience and Bioengineering **116**(1): 9-16.

Quine, S. D. and P. S. Raghu (2005). "Effects of (-)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin-induced diabetic liver, kidney and heart." Pharmacol Rep **57**(5): 610-615.

Rao, A. V. and D. M. Snyder (2010). "Raspberries and human health: a review." J Agric Food Chem **58**(7): 3871-3883.

Samaras, K. and L. V. Campbell (2000). "Increasing incidence of type 2 diabetes in the third millennium: is abdominal fat the central issue?" Diabetes Care **23**(4): 441-442.

Sasaki, R., N. Nishimura, H. Hoshino, Y. Isa, M. Kadowaki, T. Ichi, A. Tanaka, S. Nishiumi, I. Fukuda, H. Ashida, F. Horio and T. Tsuda (2007). "Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice." Biochem Pharmacol **74**(11): 1619-1627.

Schmidt, C. W. (2004). "Metabolomics: what's happening downstream of DNA." Environ Health Perspect **112**(7): A410-415.

Seeram, N. P. "Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects." (J. Agric Food Chem. 56: 627-629).

Seeram, N. P. (2008). "Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects." J. Agric Food Chem. **13**(56): 627-629.

Seeram, N. P., L. S. Adams, Y. Zhang, R. Lee, D. Sand, H. S. Scheuller and D. Heber (2006). "Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro." J Agric Food Chem **54**(25): 9329-9339.

Serhan, C. N. (2005). "Mediator lipidomics." Prostaglandins Other Lipid Mediat **77**(1-4): 4-14.

- Shoulders, C. C., E. L. Jones and R. P. Naoumova (2004). "Genetics of familial combined hyperlipidemia and risk of coronary heart disease." Hum Mol Genet **13 Spec No 1**: R149-160.
- Smith, C. A., G. O'Maille, E. J. Want, C. Qin, S. A. Trauger, T. R. Brandon, D. E. Custodio, R. Abagyan and G. Siuzdak (2005). "METLIN: a metabolite mass spectral database." Ther Drug Monit **27**(6): 747-751.
- Soga, T. and D. N. Heiger (2000). "Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry." Anal Chem **72**(6): 1236-1241.
- Solanky, K. S., N. J. C. Bailey, B. M. Beckwith-Hall, A. Davis, S. Bingham, E. Holmes, J. K. Nicholson and A. Cassidy (2003). "Application of biofluid 1H nuclear magnetic resonance-based metabonomic techniques for the analysis of the biochemical effects of dietary isoflavones on human plasma profile." Analytical Biochemistry **323**(2): 197-204.
- Sosulski, F., K. Krygier and L. Hogge (1982). "Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. ." J. Agric. Food Chem. **30**(2): 337-340.
- Stintzing, F. C., A. S. Stintzing, R. Carle and R. E. Wrolstad (2002). "A novel zwitterionic anthocyanin from evergreen blackberry (*Rubus laciniatus* Willd.)." J Agric Food Chem **50**(2): 396-399.
- Tian, Q., M. M. Giusti, G. D. Stoner and S. J. Schwartz (2005). "Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursor-ion analysis, product-ion analysis, common-neutral-loss analysis, and

selected reaction monitoring." Journal of Chromatography A **1091**(1–2): 72-82.

Tiwari, B. K., A. Patras, N. Brunton, P. J. Cullen and C. P. O'Donnell (2010). "Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice." Ultrasonics Sonochemistry **17**(3): 598-604.

Trygg, J., E. Holmes and T. Lundstedt (2007). "Chemometrics in metabonomics." J Proteome Res **6**(2): 469-479.

Trygg, J. and S. Wold (2002). "Orthogonal projections to latent structures (O-PLS)." Journal of Chemometrics **16**(3): 119-128.

Tsanova-Savova, S., F. Ribarova and M. Gerova (2005). "(+)-Catechin and (–)-epicatechin in Bulgarian fruits." Journal of Food Composition and Analysis **18**(7): 691-698.

Tsugawa, H., Y. Tsujimoto, M. Arita, T. Bamba and E. Fukusaki (2011). "GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA)." BMC Bioinformatics **12**: 131.

Tyagi, S., U. Singh, T. Kalra and K. Munjal (2010). "APPLICATIONS OF METABOLOMICS - A SYSTEMATIC STUDY OF THE UNIQUE CHEMICAL FINGERPRINTS: AN OVERVIEW." International Journal of Pharmaceutical Sciences Review & Research **3**(1): 83-86.

Vaidyanathan, S., S. Gaskell and R. Goodacre (2006). "Matrix-suppressed laser desorption/ionisation mass spectrometry and its suitability for metabolome analyses." Rapid Commun Mass Spectrom **20**(8): 1192-1198.

van den Berg, R. A., H. C. Hoefsloot, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde and M. J. van der Werf (2006). "Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data." BMC Genomics **7**: 142.

van Ravenzwaay, B., G. C.-P. Cunha, E. Leibold, R. Looser, W. Mellert, A. Prokoudine, T. Walk and J. Wiemer (2007). "The use of metabolomics for the discovery of new biomarkers of effect." Toxicology Letters **172**(1–2): 21-28.

Vatai, T., M. Škerget and Ž. Knez (2009). "Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide." Journal of Food Engineering **90**(2): 246-254.

Vilkhun, K. M., R. Simons, L. Bates, D. (2008). "Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - a review." Innov. Food Sci. Em. Technol. **9**: 161-169.

Wang, J., W. Kalt and P. Sporns (2000). "Comparison between HPLC and MALDI-TOF MS analysis of anthocyanins in highbush blueberries." J Agric Food Chem **48**(8): 3330-3335.

Watson, D. J. B., A. A. Bushway, R. J. (2004). "Separation of peonidin and cyanidin, two anthocyanidins, in cranberries by capillary electrophoresis." J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. **27**: 113-121.

Whitehouse, C. M., R. N. Dreyer, M. Yamashita and J. B. Fenn (1985). "Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers." Anal Chem **57**(3): 675-679.

Wiklund, S., E. Johansson, L. Sjöström, E. J. Mellerowicz, U. Edlund, J. P. Shockcor, J. Gottfries, T. Moritz and J. Trygg (2008). "Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models." Anal Chem **80**(1): 115-122.

Wikoff, W. R., A. T. Anfora, J. Liu, P. G. Schultz, S. A. Lesley, E. C. Peters and G. Siuzdak (2009). "Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(10): 3698-3703.

Wishart, D. S., D. Tzur, C. Knox, R. Eisner, A. C. Guo, N. Young, D. Cheng, K. Jewell, D. Arndt, S. Sawhney, C. Fung, L. Nikolai, M. Lewis, M. A. Coutouly, I. Forsythe, P. Tang, S. Shrivastava, K. Jeroncic, P. Stothard, G. Amegbey, D. Block, D. D. Hau, J. Wagner, J. Miniaci, M. Clements, M. Gebremedhin, N. Guo, Y. Zhang, G. E. Duggan, G. D. Macinnis, A. M. Weljie, R. Dowlatabadi, F. Bamforth, D. Clive, R. Greiner, L. Li, T. Marrie, B. D. Sykes, H. J. Vogel and L. Querengesser (2007). "HMDB: the Human Metabolome Database." Nucleic Acids Res **35**(Database issue): D521-526.

Yanagida, A., T. Shoji and Y. Shibusawa (2003). "Separation of proanthocyanidins by degree of polymerization by means of size-exclusion chromatography and related techniques." J Biochem Biophys Methods **56**(1-3): 311-322.

Yang, H., W. Pang, H. Lu, D. Cheng, X. Yan, Y. Cheng and Y. Jiang (2011). "Comparison of metabolic profiling of cyanidin-3-O-galactoside and extracts from blueberry in aged mice." J Agric Food Chem **59**(5): 2069-2076.

Yang, Y., C. Cruickshank, M. Armstrong, S. Mahaffey, R. Reisdorph and N. Reisdorph (2013). "New sample preparation approach for mass spectrometry-based profiling of plasma results in improved coverage of metabolome." J Chromatogr A.

Yoshida, H., T. Mizukoshi, K. Hirayama and H. Miyano (2007). "Comprehensive analytical method for the determination of hydrophilic metabolites by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry." J Agric Food Chem **55**(3): 551-560.

Zhishen, J., T. Mengcheng and W. Jianming (1999). "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals." Food Chemistry **64**(4): 555-559.

Zhou, B., J. Wang and H. W. Ransom (2012). "MetaboSearch: tool for mass-based metabolite identification using multiple databases." PLoS One **7**(6): e40096.

Amati, F., J. J. Dube, E. Alvarez-Carnero, M. M. Edreira, P. Chomentowski, P. M. Coen, G. E. Switzer, P. E. Bickel, M. Stefanovic-Racic, F. G. Toledo and B. H. Goodpaster (2011). "Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes?" Diabetes **60**(10): 2588-2597.

Belfort, R., L. Mandarino, S. Kashyap, K. Wirfel, T. Pratipanawatr, R. Berria, R. A. Defronzo and K. Cusi (2005). "Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling." Diabetes **54**(6): 1640-1648.

Bene, J., M. Marton, M. Mohas, Z. Bagosi, Z. Bujtor, T. Oroszlan, B. Gasztonyi, I. Wittmann and B. Melegh (2013). "Similarities in serum acylcarnitine patterns in type 1 and type 2 diabetes mellitus and in metabolic syndrome." Ann Nutr Metab **62**(1): 80-85.

Bieber, L. L. (1988). "Carnitine." Annu Rev Biochem **57**: 261-283.

Bikman, B. T. (2012). "A role for sphingolipids in the pathophysiology of obesity-induced inflammation." Cell Mol Life Sci **69**(13): 2135-2146.

Ferrannini, E., G. Buzzigoli, S. Bevilacqua, C. Boni, D. Del Chiaro, M. Oleggini, L. Brandi and F. Maccari (1988). "Interaction of carnitine with insulin-stimulated glucose metabolism in humans." Am J Physiol **255**(6 Pt 1): E946-952.

Floegel, A., N. Stefan, Z. Yu, K. Muhlenbruch, D. Drogan, H. G. Joost, A. Fritsche, H. U. Haring, M. Hrabe de Angelis, A. Peters, M. Roden, C. Prehn, R. Wang-Sattler, T. Illig, M. B. Schulze, J. Adamski, H. Boeing and T. Pischon (2013). "Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach." Diabetes **62**(2): 639-648.

Ha, C. Y., J. Y. Kim, J. K. Paik, O. Y. Kim, Y. H. Paik, E. J. Lee and J. H. Lee (2012). "The association of specific metabolites of lipid metabolism with markers of oxidative stress, inflammation and arterial stiffness in men with newly diagnosed type 2 diabetes." Clin Endocrinol (Oxf) **76**(5): 674-682.

Hartz, C. S., K. M. Nieman, R. L. Jacobs, D. E. Vance and K. L. Schalinske (2006). "Hepatic phosphatidylethanolamine N-methyltransferase expression is increased in diabetic rats." J Nutr **136**(12): 3005-3009.

Herrero, M., C. Simo, V. Garcia-Canas, S. Fanali and A. Cifuentes (2010). "Chiral capillary electrophoresis in food analysis." Electrophoresis **31**(13): 2106-2114.

Kim, H. J., J. H. Kim, S. Noh, H. J. Hur, M. J. Sung, J. T. Hwang, J. H. Park, H. J. Yang, M. S. Kim, D. Y. Kwon and S. H. Yoon (2011). "Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice." J Proteome Res **10**(2): 722-731.

Koves, T. R., J. R. Ussher, R. C. Noland, D. Slentz, M. Mosedale, O. Ilkayeva, J. Bain, R. Stevens, J. R. Dyck, C. B. Newgard, G. D. Lopaschuk and D. M. Muoio (2008). "Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance." Cell Metab **7**(1): 45-56.

Lu, J., G. Xie and W. Jia (2013). "Metabolomics in human type 2 diabetes research." Front Med **7**(1): 4-13.

López, M. d. M. C., J. M. L. Vilariño, M. V. G. Rodríguez and L. F. B. Losada (2011). "Development, validation and application of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography method for routine analysis of catechins, quercetin and thymol in natural samples." Microchemical Journal **99**(2): 461-469.

Makowski, L., R. C. Noland, T. R. Koves, W. Xing, O. R. Ilkayeva, M. J. Muehlbauer, R. D. Stevens and D. M. Muoio (2009). "Metabolic profiling of PPARalpha-/- mice reveals defects in carnitine and amino acid homeostasis that are partially reversed by oral carnitine supplementation." Faseb j **23**(2): 586-604.

Mihalik, S. J., B. H. Goodpaster, D. E. Kelley, D. H. Chace, J. Vockley, F. G. Toledo and J. P. DeLany (2010). "Increased levels of plasma acylcarnitines in obesity and type 2 diabetes and identification of a marker of glucolipototoxicity." Obesity (Silver Spring) **18**(9): 1695-1700.

Pavlovic, Z. and M. Bakovic (2013). "Regulation of Phosphatidylethanolamine Homeostasis—The Critical Role of CTP:Phosphoethanolamine Cytidylyltransferase (Pcyt2)." Int J Mol Sci **14**(2): 2529-2550.

Postle, A. D. (2008). Phospholipid Profiling. Metabolomics, Metabonomics and Metabolite Profiling. W. J. Griffiths. Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry: 317.

Proulx, F., J. Lacroix, I. A. Qureshi, D. Nadeau, M. Gauthier and M. Lambert (1997). "Acquired carnitine abnormalities in critically ill children." Eur J Pediatr **156**(11): 864-869.

- Rodriguez-Delgado, M. A., F. J. Garcia-Montelongo and A. Cifuentes (2002). "Ultrafast sodium dodecyl sulfate micellar electrokinetic chromatography with very acidic running buffers." Anal Chem **74**(1): 257-260.
- Swann, J. R., E. J. Want, F. M. Geier, K. Spagou, I. D. Wilson, J. E. Sidaway, J. K. Nicholson and E. Holmes (2011). "Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments." Proc Natl Acad Sci U S A **108 Suppl 1**: 4523-4530.
- Vance, J. E. and G. Tasseva (2013). "Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells." Biochim Biophys Acta **1831**(3): 543-554.
- Yang, R. and J. M. Trevillyan (2008). "c-Jun N-terminal kinase pathways in diabetes." Int J Biochem Cell Biol **40**(12): 2702-2706.
- Zehrmann, N., C. Zidorn and M. Ganzera (2010). "Analysis of rare flavonoid C-glycosides in *Celtis australis* L. by micellar electrokinetic chromatography." J Pharm Biomed Anal **51**(5): 1165-1168.
- Zimmet, P., K. G. Alberti and J. Shaw (2001). "Global and societal implications of the diabetes epidemic." Nature **414**(6865): 782-787.
- Wollgast, J. ; E. Anklam (2000). "Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification." Food Research International **33**(6): 423-447.