

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Aplicações de espectrometria de massas ambiente em
metabolômica clínica**

Thais Pontes Pereira Mendes de Andrade

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz

Goiânia, julho de 2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Thais Pontes Pereira Mendes de Andrade

Título do trabalho: Aplicações de espectrometria de massas ambiente em metabóloma clínica

3. Informações de acesso ao documento:

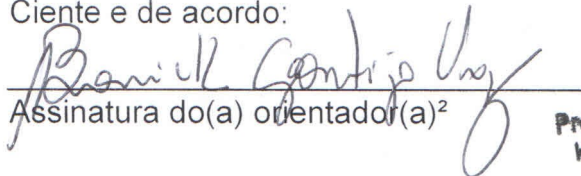
Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Prof. Dr. Borisk Gontijo Vaz
Instituto de Química - UFG
SHAPE 1979370

Data: 15 / 08 / 19

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Aplicações de espectrometria de massas ambiente em metabolômica clínica

Thais Pontes Pereira Mendes de Andrade

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Federal de
Goiás para a obtenção do título de
Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz

Goiânia, julho de 2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Pontes Pereira Mendes de Andrade, Thais
Aplicações de espectrometria de massas ambiente em metabolômica
clínica [manuscrito] / Thais Pontes Pereira Mendes de Andrade. -
2019.
xi, 126 f.

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz .
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2019.
Bibliografia. Apêndice.
Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Espectrometria de massas ambiente. 2. Paper spray ionization.
3. Substrate Electrospray Ionization. 4. Lipidômica. 5. Metabolômica. I. ,
Boniek Gontijo Vaz, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

Ata da Defesa de Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química de Thais Pontes Pereira Mendes de Andrade, aluna regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Químico Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Doutora em Química.

Aos 12 (doze) dias de julho do ano de 2019 (dois mil e dezenove) com início às 14:00 hs (quatorze horas) no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pela Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Química da UFG, composta pelos seguintes doutores: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz, Prof. Dra. Andrea Rodrigues Chaves, Prof. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte, Prof. Dr. Eric de Souza Gil e Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto sob a presidência do primeiro, para julgar a Defesa de Tese de Thais Pontes Pereira Mendes de Andrade intitulada: "Aplicações de espectrometria de massas ambiente em metabolômica clínica". O presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra à candidata para que a mesma fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, a candidata foi argüida pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz: Aprovado
Prof. Dra. Andrea Rodrigues Chaves: Aprovada
Prof. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte: Aprovada
Prof. Dr. Eric de Souza Gil: V
Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto: Aprovado

A seguir, na presença do público e da candidata, o presidente da Banca Examinadora declarou que Thais Pontes Pereira Mendes de Andrade, candidata ao título de Doutora em Química foi: Aprovada (); Reprovada () no exame de qualificação. Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente cumprimentou a candidata e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Themerson Blenner Cavalcante Souza, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora
Goiânia, 12 de julho de 2019.

Boniek Gontijo Vaz
Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz (UFG)

Andrea Rodrigues Chaves
Prof. Dra. Andrea Rodrigues Chaves (UFG)

Gabriela R.M. Duarte
Prof. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (UFG)

Eric de Souza Gil
Prof. Dr. Eric de Souza Gil (UFG)

Mauro Cunha Xavier Pinto
Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto (UFG)



Ao amor da minha vida, meu filho
Théo, aos meus queridos pais e ao
meu amado marido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, acima de tudo, pela oportunidade de crescimento intelectual e moral. A Espiritualidade por me acompanhar durante toda caminhada, me intuindo, amparando e protegendo.

Agradeço ao meu filho Théó, por me apresentar esse amor que transborda, por me mostrar que tenho uma força maior do que imaginava e por me ensinar tanto, todos os dias.

Agradeço aos meus amados pais e amigos, Sandra e Claudstone, com os quais pude contar em todos os momentos de alegria, dificuldade, desânimo e empolgação. Pelo amor incondicional dedicado a mim, por todas as vezes que não me deixaram desistir e pelos sábios ensinamentos. E por fim, pela compreensão nos momentos de ausência e nervosismo. Sem o apoio e incentivo de vocês eu jamais chegaria até aqui. Agradeço, também, aos meus irmãos, Claudstone Junior e Guilherme, pelo incentivo e apoio.

Agradeço a minha família querida, todos os tios e tias, primos e primas, avós e avô, que mesmo muitas vezes ausentes, se fizeram presentes em orações e vibrações positivas para que eu alcançasse meu objetivo.

Agradeço ao meu amor, Fabiano, pelo amor, carinho e compreensão. Obrigada por seu companheirismo ao longo desta jornada. E a toda sua família, pela torcida e vibrações positivas.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Boniek, pela oportunidade maravilhosa de trabalhar nesse laboratório que tanto contribuiu para o meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço ainda, pela orientação, pela confiança em mim depositada, pelo esforço para nos oferecer a melhor estrutura possível e pelo aprendizado diário.

Agradeço aos meus queridos colegas do LaCEM, que fizeram meus dias mais leves e alegres e sempre estiveram dispostos a me auxiliarem.

Ao Instituto de Química e a CAPES.

“Você nasceu no lar que precisava nascer, vestiu o corpo físico que merecia, mora onde melhor Deus te proporcionou, de acordo com o teu adiantamento. Você possui os recursos financeiros coerentes com tuas necessidades, nem mais, nem menos, mas o justo para as tuas lutas terrenas. Seu ambiente de trabalho é o que você elegeu espontaneamente para a sua realização. Teus parentes e amigos são as almas que você mesmo atraiu, com tua própria afinidade... Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

(Chico Xavier)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS	2
1.1 Introdução geral	2
1.1.1 Metabolômica.....	2
1.1.1.1 Metabolômica clínica.....	4
1.1.1.2 Lipidômica.....	8
1.1.1.3 Abordagem direcionada e não direcionada.....	9
1.1.1.3.1 Análise computacional	10
1.1.1.4 Plataformas analíticas em metabolômica.....	12
1.1.2 Espectrometria de massas.....	13
1.1.2.1 Fontes de ionização	15
1.1.2.1.1 ESI - <i>Electrospray ionization</i>	15
1.1.2.2 Espectrometria de massas ambiente	19
1.1.2.2.1 <i>Substrate Electrospray Ionization</i>	20
1.1.2.2.2 PESI – <i>Probe electrospray ionization</i>	23
1.1.2.2.3 PSI - <i>Paper Spray Ionization</i>	27
1.2 JUSTIFICATIVA.....	32
1.3 OBJETIVOS.....	33
1.3.1 Objetivo geral	33
1.3.2 Objetivos específicos	33
2 CAPÍTULO I - Polímero molecularmente impresso (MIP) como substrato para <i>Paper Spray Ionization</i> – MIP-CPS: análise de metabólitos em urina	35
2.1 INTRODUÇÃO	35
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	38
2.2.1 Materiais, Padrões Analíticos e Solventes	38
2.2.2 Síntese da membrana revestida com MIP	38
2.2.3 Análise da urina por MIP-CPS	39
2.2.4 Figuras de mérito da técnica MIP-CPS	41
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
2.4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	49

3	CAPÍTULO II - Abordagem lipidômica não direcionada por <i>Paper Spray Ionization</i> (PSI) para encontrar biomarcadores para o câncer do colo do útero	51
3.1	INTRODUÇÃO	51
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.2.1	Materiais, Padrões Analíticos e Solventes	54
3.2.2	Coleta e preparo das amostras	54
3.2.3	Análise dos plasmas por <i>Paper Spray Ionization</i>	54
3.2.4	Análise computacional dos dados	56
3.2.5	Identificação dos lipídios selecionados pelo modelo	58
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
3.4	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	66
4.1	CAPÍTULO III - Desenvolvimento de uma nova fonte de ionização - ESI grafite- e sua aplicação em metabolômica clínica	68
4.2	INTRODUÇÃO	68
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS	70
4.3.1	Materiais, Padrões Analíticos e Solventes	70
4.3.2	Preparo das amostras	70
4.3.3	Montagem da fonte ESI grafite	71
4.3.4	Avaliação dos parâmetros do ESI grafite	72
4.3.5	Análises com ESI grafite	73
4.3.5.1	Análises de amostras em solução	73
4.3.5.2	Análise quantitativa	73
4.3.5.3	Análises em amostras sólidas	74
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	76
4.4.1	Avaliação dos parâmetros do ESI grafite	76
4.4.2	Análises com ESI grafite de amostras em solução	80
4.4.3	Análise quantitativa com ESI grafite	84
4.4.4	Análises com ESI grafite de amostras sólidas	86
4.5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	91
5	CONCLUSÃO GERAL	93
6	REFERENCIAS	95

7	APÊNDICE	121
8	CURRICULO VITAE	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. A cascata "Ômica" compreende conjuntos de dados complexos que, como uma entidade, descrevem de forma abrangente a resposta de sistemas biológicos a perturbações de doenças, genéticas e ambientais. O metaboloma é o mais preditivo do fenótipo. FONTE: Adaptada de Dettmer; Aronov; Hammock, (2007).....	2
Figura 1.2. Gráfico do número de publicações sobre metabolômica clínica a partir de 2002. FONTE: "Web of Science 'metabolimics' 'clinical'. Análise de resultados".....	5
Figura 1.3. Esquema demonstrativo do fluxo de trabalho nas análises metabolômicas com abordagem direcionada e não direcionada. FONTE: Adaptada de Canuto <i>et al.</i> , (2018)	10
Figura 1.4. Disposição da matriz de dados espectrométricos.	10
Figura 1.5. Ilustração visual das projeções envolvidas no SPA. FONTE: Adaptada de Araújo <i>et al.</i> , (2001).....	12
Figura 1.6. Complexidade química das diferentes ômicas. FONTE: Adaptada de WISHART, (2011)	13
Figura 1.7. Principais componentes do espectrômetro de massas.	14
Figura 1.8. Esquema representativo da ionização por ESI. FONTE: Adaptada de Nanotechnology, (2013)	17
Figura 1.9. "A árvore da ionização" da MS demonstrando as técnicas (marrom) a partir das quais algumas técnicas de AMS (verde) foram desenvolvidas. FONTE: Adaptada de Alberici <i>et al.</i> , (2010)	20
Figura 1.10. Esquema representativo do <i>Substrate Electrospray Ionization</i> . FONTE: Adaptada de Venter <i>et al.</i> , (2013)	21
Figura 1.11. Representação da técnica de PESI-MS. FONTE: Adaptada de Mandal <i>et al.</i> , (2010)	23
Figura 1.12. Representação esquemática da técnica de PSI-MS. FONTE: Adaptada de da Silva <i>et al.</i> , (2019)	28
Figura 2.1. Esquema representativo do funcionamento do MIP. FONTE: Adaptada de Gama; Bottoli, (2017)	36
Figura 2.2. Fluxograma com as etapas da síntese da membrana revestida com MIP.....	39

Figura 2.3. Esquema ilustrativo das análises de urina por MIP-CPS. FONTE: Adaptada de Silva, (2018).....	40
Figura 2.4. Estrutura molecular dos moldes (glicina e epinefrina) e analitos alvo (ácido butírico, sarcosina e dopamina).....	43
Figura 2.5. Gráfico de barras das intensidades de sinal para DA (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$), BA e SA (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) em urina artificial por MIP-CPS e NIP-CPS. (n=3)	44
Figura 2.6. Espectro de massas para dopamina (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) a partir de urina artificial usando (a) MIP-CPS e (b) NIP-CPS, ambos no modo positivo. Espectro de massas para o ácido butírico (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) da urina artificial usando (c) MIP-CPS e (d) NIP-CPS, ambos no modo negativo. Espectros de massas para sarcosina (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) a partir de urina artificial usando (c) MIP-CPS e (d) NIP-CPS, ambos no modo positivo. A dopamina foi detectada como $[\text{M}+\text{H}]^+$ de m/z 154, o ácido butírico como $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 87 e sarcosina como $[\text{M}+\text{H}]^+$ de m/z 90.	44
Figura 2.7. Curvas analíticas para a) DA, b) BA e c) SA da urina artificial por MIP-CPS. (n=3).	46
Figura 2.8. Intensidades de abundância de íons obtidas da DA e suas transições SRM usando MIP-CPS, papel tradicional e ESI na urina humana real.	48
Figura 3.1. Papel filtro cortado triangularmente com a amostra aplicada, pronto para a análise.....	55
Figura 3.2. Análise por Paper Spray Ionization. FONTE: (SILVA, 2018)	55
Figura 3.3. Fluxograma da divisão das amostras em grupo de treinamento e de teste, onde NILM é negativo para lesão intraepitelial ou malignidade (controles saudáveis) e SIL é lesão intraepitelial escamosa (amostra cancerosa).	57
Figura 3.4. Espectros de massas da avaliação do tempo de secagem da amostra utilizando o metanol como solvente de spray analisando plasma por PSI(+)...	60
Figura 3.5. Espectros de massas de PSI (+) de (a) amostra de plasma com câncer e (b) amostra de plasma saudável.....	61
Figura 3.6. Função discriminante iSPA-LDA (DF), onde NILM: negativo para lesão intraepitelial ou malignidade (controles saudáveis) e SIL: lesão intraepitelial escamosa (cancerosa).	63
Figura 3.7. Variáveis selecionadas pelo iSPA-LDA	64
Figura 4.1. Esquema da fonte ESI grafite: (a) posição do grafite e aplicação da amostra/solvente; (b) amostragem do cérebro de camundongo pelo grafite. ..	71

Figura 4.2. Fonte ESI grafite com os ângulos do grafite em relação a entrada do espectrômetro de massas testados.....	72
Figura 4.3. Estrutura das moléculas analisadas por ESI grafite.	73
Figura 4.4. Vista sagital média do cérebro do camundongo demonstrando as áreas analisadas por ESI grafite. FONTE: Adaptada de “ <i>Washington University in St. Louis</i> ”, (2019)	74
Figura 4.5. Foto da coleta de amostra para análise da região do ventrículo do camundongo. O grafite de espessura 0,2 mm foi inserido dentro de uma cânula implantada previamente através de cirurgia.....	74
Figura 4.6. Gráfico de barras das intensidades de sinal obtidas a partir de espectros de massas do ESI grafite no modo positivo de cristal violeta (m/z 373, $[M+H]^+$) a $1000\ \mu\text{g L}^{-1}$ usando diferentes espessuras de grafite. Barras de erro mostram o desvio padrão das medições replicatas ($N = 3$).....	76
Figura 4.7. Imagem de MEV ($\times 1500$) da ponta do grafite.....	77
Figura 4.8. Gráfico de barras dos resultados dos experimentos realizados para avaliação dos parâmetros do ESI grafite utilizando grafite 1,6 mm. Barras de erro mostram o desvio padrão das medições replicatas. ($N=2$).....	78
Figura 4.9. TIC dos experimentos 11, 14 e 28, utilizando $1000\ \mu\text{g.L}^{-1}$ de cristal violeta (m/z 373), onde é possível observar a estabilidade do spray.	79
Figura 4.10. TIC para $1000\ \mu\text{g.L}^{-1}$ de cristal violeta (m/z 373) utilizando ESI tradicional, ESI com agulha e ESI grafite.	80
Figura 4.11. Espectros de massas de ESI grafite full scan obtidos a partir de (a) creatinina em urina sintética a $1400\ \mu\text{g L}^{-1}$, soluções metanólicas de (b) dopamina a $1000\ \mu\text{g L}^{-1}$ (m/z 154 $[M+H]^+$), (c) triptofano a $1000\ \mu\text{g L}^{-1}$ (m/z 205 $[M+H]^+$), (d) cocaína a $100\ \mu\text{g L}^{-1}$ (m/z 304 $[M+H]^+$), (e) levonorgestrel a $1000\ \mu\text{g L}^{-1}$ (m/z 313 $[M+H]^+$), (f) lisozima a $1000\ \mu\text{g L}^{-1}$ ($[M+H]^+$) e (g) ácido butírico a $1000\ \mu\text{g L}^{-1}$ (m/z 87 $[M-H]^-$).....	81
Figura 4.12. a) espectros MS/MS e (b) MS^3 obtidos a partir da análise ESI grafite de creatinina a $1000\ \mu\text{g L}^{-1}$, com as fragmentações características deste analito.	84
Figura 4.13. (a) Curva analítica variando de $100 - 3000\ \mu\text{g L}^{-1}$ para creatinina em urina artificial usando ESI grafite. Barra de erros $n=3$. (b) Espectro ESI grafite - MS/MS em modo positivo de creatinina ($100\ \mu\text{g L}^{-1}$) em amostra de urina artificial.	85

Figura 4.14. Espectro de massas de ESI grafite no modo positivo a partir da análise do cérebro de camundongo.	87
Figura 4.15. Resultados da análise por PCA para amostras de córtex, cerebelo e ventrículo de 5 camundongos fêmeas e 5 machos, com valores acima de 90% de variância explicada. Onde a cor azul representa o ventrículo, a cor verde representa o córtex e a cor vermelha representa o cerebelo.	88
Figura 4.16. Resultado da análise por PCA para amostras de 5 fêmeas e 5 machos da região do cerebelo (onde a cor azul representa as fêmeas e a cor marrom representa os machos).	89
Figura 4.17. Resultado da análise por PCA para amostras de 5 fêmeas e 5 machos da região de córtex (onde a cor vermelha representa as fêmeas e a cor preta representa os machos).....	89
Figura 4.18. Resultado da análise por PCA para amostras de 5 fêmeas e 5 machos região do ventrículo (onde a cor amarela representa as fêmeas e a cor lilás representa os machos).....	89
Figura A 1. a) espectros MS/MS e (b) MS ³ obtidos a partir da análise ESI grafite de COCAÍNA a 100 µg L ⁻¹ , com as fragmentações características deste analito.	121
Figura A 2. (a) espectros MS/MS e (b) MS ³ obtidos a partir da análise ESI grafite de DOPAMINA a 1000 µg L ⁻¹ , com as fragmentações características deste analito.....	122
Figura A 3. (a) espectros MS/MS e (b) MS ³ obtidos a partir da análise ESI grafite de LEVONORGESTREL a 1000 µg L ⁻¹ , com as fragmentações características deste analito.	123
Figura A 4. (a) espectros MS/MS e (b) MS ³ obtidos a partir da análise ESI grafite de TRIPTOFANO a 1000 µg L ⁻¹ , com as fragmentações características deste analito.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Lista de alguns biomarcadores utilizados na prática clínica e sua relevância clínica, bem como a matriz biológica investigada e a técnica analítica utilizada.	7
Tabela 1.2. Alguns dos novos biomarcadores potenciais descobertos nos últimos 3 anos.....	7
Tabela 1.3. Lista de outras técnicas baseadas em <i>Substrate Electrospray Ionization</i> com suas respectivas imagens representativa e referências.	22
Tabela 2.1. Precisão, exatidão e recuperação para DA, BA, SA em urina artificial usando MIP-CPS.....	47
Tabela 3.1. Biomarcadores lipídicos associados à diferenciação de amostras de plasma cancerígeno e saudável identificadas por PSI (+) e iSPA-LDA.....	64
Tabela 4.1. Dados dos experimentos realizados para avaliação dos parâmetros do ESI grafite utilizando grafite 1,6 mm.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AMS	Espectrometria de massas ambiente
APCI	<i>Atmospheric-pressure chemical ionization</i>
API	Ionização à pressão atmosférica
APPI	<i>Atmospheric pressure photoionization</i>
BA	Ácido butírico
CI	<i>Chemical ionization</i>
CRM	<i>Charge residue model</i>
CSF	Fluído cefalorraquidiano
DA	Dopamina
DAPPI	<i>Desorption atmospheric pressure photoionization</i>
DART	<i>Direct analysis in real time</i>
DESI	<i>Desorption elctrospray ionization</i>
DeSSI	<i>Desorption sonic spray ionization</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EI	<i>Electron ionization</i>
FAB	<i>Fast atom bombardment</i>
HMDB	<i>Human metabolome database</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IEM	<i>Ion evaporation model</i>
IS	Padrão interno
iSPA-LDA	<i>Interval-successive projections algorithm linear discriminant analysis</i>
LAESI	<i>Laser abalation electrspray ionization</i>
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem
LC-UV	Cromatografia líquida acoplada ultravioleta
LDA	<i>Linear discriminant analysis</i>
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MeOH	Metanol

MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIP	Polímero molecularmente impresso
MIP-CPS	Polímero molecularmente impresso como substrato para <i>Paper Spray Ionization</i>
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
MS ³	Espectrometria de massas sequencial a terceira
NILM	Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade
NIP	Polímero não impresso
NIP-CPS	Polímero não impresso como substrato para <i>Paper Spray Ionization</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PEEK	Tubulação de polietereetercetona
PESI	<i>Probe electrospray ionization</i>
ppb	Parte por bilhão
PLS-DA	<i>Partial least squares discriminant analysis</i>
POC	<i>Point of care</i>
PSI	<i>Paper Spray Ionization</i>
PSI (+)	<i>Paper Spray Ionization</i> no modo positivo
RMN	Ressonância magnética nuclear
SA	Sarcosina
SIL	Lesão intraepitelial escamosa
SIMS	<i>Secondary-ion mass spectrometry</i>
SPA	<i>Successive projections algorithm</i>
SPA-LDA	<i>Successive projections algorithm linear discriminant analysis</i>
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
SPME	<i>Solid phase microextraction</i>
TIC	Cromatograma de íons totais
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

RESUMO

A maioria dos estudos clínicos de biofluidos na literatura são baseados em plasma/soro e urina, pois são mais facilmente obtidos e considerados representativos do comportamento metabólico geral. Cada um desses fluidos tem uma matriz única, compreendendo diferentes níveis de proteínas e metabólitos. Por isso, é importante otimizar a preparação de amostras e métodos analíticos para alcançar uma cobertura abrangente dos analitos presentes nessas amostras. Nesse contexto, surge a espectrometria de massas ambiente (AMS), que é uma família de técnicas de dessorção e ionização que revolucionaram o modo de obter íons na espectrometria de massas. Essas técnicas compartilham a capacidade de geração de íons na fase gasosa diretamente a partir de amostras não tratadas, reduzindo ou praticamente eliminando a extração de analito e a separação prévia. *Substrate Electrospray Ionization* são técnicas de ionização da AMS, que compreendem, por exemplo, *Paper spray ionization* (PSI) e *Probe electrospray ionization* (PESI). Neste trabalho são propostas duas abordagens analíticas em metabolômica clínica utilizando PSI e, também, o desenvolvimento de um novo *Substrate Electrospray Ionization*. A primeira abordagem trata-se da utilização de um papel recoberto por um polímero molecularmente impresso (MIP) como substrato para o PSI em análise de metabolitos: dopamina, sarcosina e ácido butírico, em urina artificial. Este novo substrato mostrou-se altamente seletivo para os alvos desejados, além de minimizar efeitos de supressão iônica comum no PSI. Além disso, obteve-se curvas de calibração com $R^2 > 0,99$ e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) na faixa de ppb. Ademais, obteve-se sucesso ao utilizar essa técnica para a análise de dopamina em uma amostra real. Na segunda abordagem, utilizou-se PSI combinado com uma abordagem quimiométrica chamada *Interval-successive projections algorithm linear discriminant analysis* (iSPA-LDA) para detectar biomarcadores lipídicos do câncer do colo do útero usando lipídios do plasma sanguíneo sem pré-tratamento. Um total de 86 amostras de plasma sanguíneo de diferentes mulheres foram coletadas, incluindo 37 controles cancerígenos e 49 controles saudáveis, onde 8 lipídios foram encontrados como possíveis biomarcadores com uma precisão geral de 77%. Os resultados obtidos mostram o potencial da PSI associada à análise

multivariada como ferramenta complementar para rastreamento ou diagnóstico do câncer do colo do útero. Trata-se da aplicação do PSI em amostras de plasma numa abordagem lipidômica não-direcionada, com o objetivo de descobrir biomarcadores do câncer de colo do útero. A última abordagem teve o objetivo de utilizar o grafite como substrato para o ESI. Foram avaliados o efeito de voltagem, ângulo da probe e volume da amostra. Ainda foram avaliados a capacidade de ionização de diversos analitos, incluindo uma proteína, e realizados testes de quantificação de creatinina em amostras reais de urina. A técnica ESI grafite foi otimizada e obteve excelente ionização dos analitos, não apresentando supressão iônica. Conseguiu-se determinar a quantidade de creatinina presente nas amostras testadas e todas ficaram dentro dos limites estabelecidos. Além disso, a técnica foi empregada na análise de cérebro de camundongos e através dessas análises combinadas com *Principal Component Analysis* (PCA) foi possível diferenciar diferentes regiões do cérebro e separar as amostras em macho e fêmea. Com isso, a técnica ESI grafite se mostrou muito eficiente para ser utilizada em abordagens metabolômicas.

Palavras-chave: Espectrometria de massas ambiente; *Paper spray ionization*; *Substrate Electrospray Ionization*, Lipidômica; Metabolômica.

ABSTRACT

Most clinical biofluids studies are based on plasma/serum and urine, which are more free and representative models of general metabolism. Each of these fluids has a unique matrix, comprising different levels of proteins and metabolites. Therefore, it is important to optimize sample preparation and analytical methods to achieve comprehensive coverage of the analytes present in these samples. In this context, Ambient Mass Spectrometry (AMS) arises, which is a family of desorption and ionization techniques that have revolutionized the way of obtaining ions in mass spectrometry. These techniques share the ability to generate ions in the gas phase directly from untreated samples, reducing or virtually eliminating analyte extraction and prior separation. Substrate Electrospray Ionization are ionization techniques in AMS, which comprise, for example, Paper spray ionization (PSI) and Probe electrospray ionization (PESI). In this study, two analytical approaches are proposed in clinical metabolomics using PSI and, also, the development of a new Substrate Electrospray Ionization. The first approach is the use of a paper coated by a molecularly printed polymer (MIP) as a substrate for PSI in metabolite analysis: dopamine, sarcosine and butyric acid in artificial urine. This new substrate was highly selective for the desired targets, in addition to minimizing the effects of common ion suppression on PSI. In addition, calibration curves with $R^2 > 0.99$ and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) in the ppb range were obtained. In addition, success was obtained when using this technique for the analysis of dopamine in a real sample. In the second approach, PSI was combined with a chemometric approach called Interval-successive projections algorithm linear discriminant analysis (iSPA-LDA) to detect lipid biomarkers of cervical cancer using unprepared blood plasma lipids. A total of 86 blood plasma samples from different women were collected, including 37 cancer controls and 49 healthy controls, where 8 lipids were found as possible biomarkers with an overall precision of 77%. The results show the potential of PSI associated with multivariate analysis as a complementary tool for the screening or diagnosis of cervical. It is the application of PSI in plasma samples in a non-targeted lipidic approach, with the objective of discovering biomarkers of cervical cancer. The final approach was to use graphite as a substrate for ESI. The effect of voltage, probe angle and sample

volume were evaluated. The ionization capacity of several analytes, including a protein, has also been evaluated, and creatinine quantification tests have been performed on real urine samples. The ESI graphite technique was optimized and obtained excellent ionization of the analytes, not presenting ionic suppression. It was possible to determine the amount of creatinine present in the samples tested and all were within the established limits. In addition, the technique was employed in mouse brain analysis and through these analyzes combined with Principal Component Analysis (PCA) it was possible to differentiate different regions of the brain and separate the samples in male and female. With this, the graphite ESI technique proved very efficient to be used in metabolomic approaches.

Keywords: Ambient mass spectrometry; Paper spray ionization; Substrate Electrospray Ionization, Lipidomics; Metabolomics.

Introdução geral e objetivos

1 INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

1.1 Introdução geral

1.1.1 Metabolômica

As ciências ômicas buscam o entendimento do funcionamento celular dos organismos e suas alterações biológicas. Fazem parte deste conjunto de ciências, a genômica (estudo da alteração dos genes), a transcriptômica (estudo das alterações dos transcritos), a proteômica (estudo das alterações das proteínas) e a metabolômica (estudo das alterações dos metabólitos). (CANUTO *et al.*, 2018)

Metabolômica é um termo recente, introduzido nos anos 2.000 por Dr. Oliver Fiehn e colaboradores. (FIEHN *et al.*, 2000) É, provavelmente, a mais promissora área “ômica”, pois ela se aproxima do ponto final da “cascata ômica” (**Figura 1.1**), fornecendo uma visão abrangente dos processos biológicos e vias metabólicas, portanto o metaboloma é o mais preditivo do fenótipo.

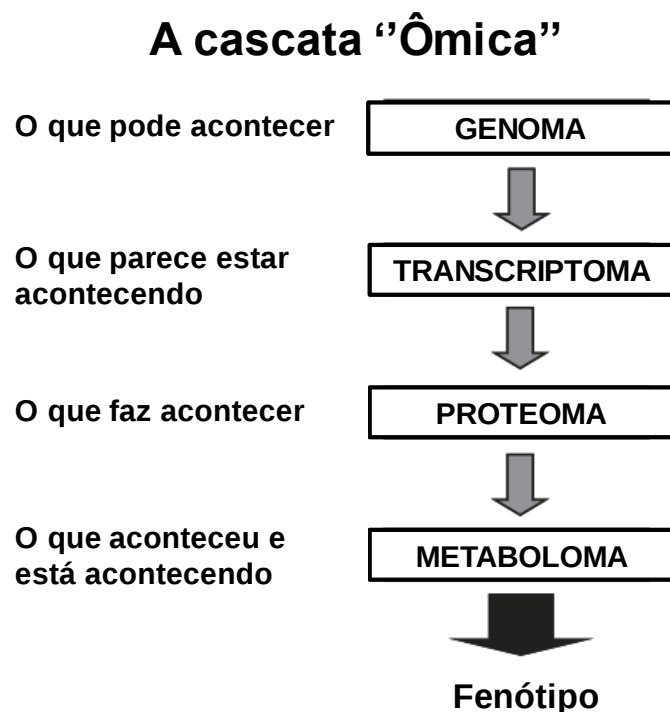


Figura 1.1. A cascata "Ômica" compreende conjuntos de dados complexos que, como uma entidade, descrevem de forma abrangente a resposta de sistemas biológicos a perturbações de doenças, genéticas e ambientais. FONTE: Adaptada de Dettmer; Aronov; Hammock, (2007).

O objetivo geral da metabolômica é determinar os padrões de metabólitos de massa molecular baixa, tipicamente menores que 1500 Da, através da análise qualitativa e quantitativa, e correlacioná-los com o status fisiológico/bioquímico do organismo sob investigação em um momento específico e sob influência específica (por exemplo, o estado de crescimento, doença ou status dietético etc.) e outras questões relacionadas aos fenômenos e mecanismos da vida. (GIKA, 2018; PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012; YULIANA *et al.*, 2011)

Os metabólitos são compostos presentes em amostras biológicas (células, tecidos e fluidos). São quimicamente heterogêneos no que diz respeito às suas propriedades físicas (isto é, polaridade, solubilidade, volatilidade etc.). Essas pequenas moléculas incluem compostos como açúcares, carboidratos, compostos fosforilados, ácidos orgânicos, aminoácidos, ácidos graxos, lipídios, peptídeos, (metabólitos endógenos) vitaminas, minerais, aditivos alimentares, drogas, toxinas, poluentes e praticamente qualquer outro produto químico (de baixo peso molecular) que ingerem, metabolizam, catabolizam ou entram em contato (metabólitos exógenos). (AU, 2018)

Os conceitos da metabolômica têm sido utilizados em diversas áreas, tais como ambiental, (ALIFERIS; CHRYSAYI-TOKOUSBALIDES, 2011; ALIFERIS; JABAJI, 2011; SIMPSON; MCKELVIE, 2009) esporte, (HEANEY; DEIGHTON; SUZUKI, 2017; VAN HALL, 2015; WEINBERGER *et al.*, 2011) nutrição, (FERGUSON *et al.*, 2013; SCALBERT *et al.*, 2014; WISHART, 2008) microbiologia, (BAUERFEIND *et al.*, 2016; STEFANOVIC; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2017; WARNER, 2015) parasitologia, (BALOUZ; AGÜERO; BUSCAGLIA, 2016; KIP *et al.*, 2015; KRUNGKRAI; KRUNGKRAI, 2016) plantas, (DIAS *et al.*, 2013; PARK; SEO; HEGEMAN, 2014; TIAN; LAM; SHUI, 2016) toxicologia forense, (DONALDSON; LAMONT, 2014; HAZARIKA; RUSSELL, 2012; OBERACHER; ARNHARD, 2015), além da área clínica, que é o tema dessa tese.

1.1.1.1 Metabolômica clínica

Estratégias baseadas em metabolômica nos estudos clínicos modernos estão permitindo uma melhor compreensão das condições fisiopatológicas e mecanismos de doença, bem como fornecendo ferramentas inovadoras para novas abordagens diagnósticas e prognósticas. (TOLSTIKOV *et al.*, 2017) Por esta razão, a metabolômica clínica está ganhando reconhecimento como uma ferramenta essencial na medicina.

Um dos objetivos da medicina é projetar estratégias de prevenção de doenças e cuidados clínicos levando em conta a variabilidade individual no ambiente, estilo de vida, genética e fenótipo molecular. As impressões digitais metabólicas alteradas, que são únicas para cada indivíduo, oferecem novos caminhos para entender melhor a biologia dos sistemas, detectar ou identificar riscos potenciais para várias doenças e, finalmente, ajudar a alcançar o objetivo de "medicina personalizada". (CLISH, 2015; HOLMES; WILSON; NICHOLSON, 2008; REYES-GARCÉS; GIONFRIDDO, 2019) Além disso, o fato de a metabolômica fazer uso de uma variedade de amostras biológicas facilmente acessíveis, como sangue, urina, suor, etc., é um aspecto favorável para reduzir custos e tempo de análise, facilitando a aplicação em um grande número de amostras. (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2018)

De fato, mudanças mensuráveis nos níveis de metabólitos ocorrem em resposta tanto a doenças complexas como a desordens menores, e em contraste com o genoma, essas mudanças podem exibir especificidade de tecidos e dinâmica temporal. (CLISH, 2015) Há décadas tem-se utilizado a análise de alguns metabólitos para diagnosticar doenças e causar impacto nos cuidados clínicos, por exemplo, o desenvolvimento de tiras de teste de glicose na década de 1950 para testar diabetes (MIDDLETON; W. J. GRIFFITHS, 1957) ou medir fenilalanina em recém-nascidos para rastrear fenilcetonúria (GUTHRIE; SUSI, 1963). E a cada ano os números de estudos relacionados a metabolômica clínica apresentam um crescimento acelerado (**Figura 1.2**).

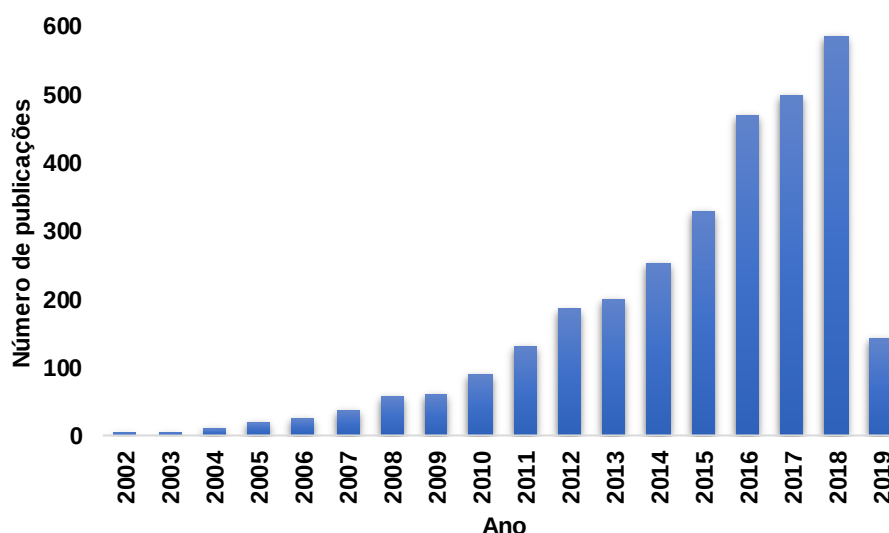


Figura 1.2. Gráfico do número de publicações sobre metabolômica clínica a partir de 2002. FONTE: “*Web of Science ‘metabolimics’ ‘clinical’*”. Análise de resultados”

Em termos gerais, as investigações metabolômicas focadas em doenças humanas podem ser agrupadas em três categorias:

(i) Um grande grupo de investigações está focado na compreensão da base molecular da patogênese de doenças e na identificação de vias metabólicas alteradas. Por exemplo, identificação de alterações no metabolismo causadas pela doença de Alzheimer (EDWARD *et al.*, 2019) e de doenças renais. (CAÑADAS-GARRE *et al.*, 2018)

(ii) O segundo grupo está focado na identificação de biomarcadores de metabólitos para diagnosticar doenças com a mais alta possível sensibilidade e especificidade.

(iii) O terceiro grupo de investigações descreve oportunidades de translação e aplicações em metabolômica. (GOWDA; RAFTERY, 2013)

Esse trabalho abordará o segundo grupo, que foca na identificação e análise de biomarcadores – metabólitos característicos de casos clínicos particulares – que visam auxiliar diagnósticos, prover diretrizes terapêuticas e avaliar a resposta à terapia de doenças específicas. (CANUTO *et al.*, 2018; KADDURAH-DAOUK; KRISTAL; WEINSHILBOUM, 2008)

Em 2001, o *National Institutes of Health* definiu o termo biomarcador como "uma característica objetivamente medida e avaliada como um indicador de

processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica". (PARIKH; VASAN, 2007)

Segundo Luque de Castro e Priego-Capote (2018) os biomarcadores podem ser definidos da seguinte maneira:

- (a) Biomarcadores característicos, que consistem em componentes biológicos mensuráveis (por exemplo, um metabólito ou mais comumente um painel de metabólitos) que podem ser analisados como um biomarcador candidato.
- (b) Biomarcadores como tais ou características indicativas de estados de doença, respostas a tratamentos terapêuticos ou outros estados biológicos relevantes.
- (c) Bioassinaturas ou coleta de características, que juntas definem determinados biomarcadores.
- (d) Biomarcadores de risco que identificam pacientes com probabilidade de desenvolver determinadas doenças.
- (e) Biomarcadores diagnósticos, para detecção do estado inicial da doença, classificação nos subtipos de doença ou caracterização da resposta ao tratamento.
- (f) Biomarcadores prognósticos, para previsão da progressão da doença, predição de recorrência da doença ou identificação de pacientes com probabilidade de responder a um tratamento.

O uso de biomarcadores é importante para direcionar a intervenção terapêutica em termos de quais intervenções dietéticas e de estilo de vida são necessárias, ou se os medicamentos são apropriados ou se a cirurgia é necessária. (TRIVEDI; HOLLYWOOD; GOODACRE, 2017)

Embora já existam diversos biomarcadores valiosos utilizados na prática clínica para diagnosticar doenças, como os dos exemplos da **Tabela 1.1**, há muitos outros biomarcadores esperando para serem descoberto e esta é uma área muito ativa de pesquisa em metabolômica. Nesse sentido, tem sido estudada diversas doenças ou desordens que apresentem metabólitos biomarcadores, como pode ser observado na **Tabela 1.2**.

Tabela 1.1. Lista de alguns biomarcadores utilizados na prática clínica e sua relevância clínica, bem como a matriz biológica investigada e a técnica analítica utilizada.

Biomarcador	Relevância clínica	Matriz biológica	Técnica analítica
Glicose	Diabetes	Urina/soro	Fotométrico
LDL Colesterol	Risco cardiovascular	Soro	Colorimétrico
Ureia	Insuficiência renal	Urina	UV
Ácidos biliares	Insuficiência hepática	Urina/soro	Enzimático/LC-MS
Ácido cítrico	Doenças metabólicas	Plasma/soro	Enzimático
Cortisol	Insuficiência adrenal	Plasma/soro/urina/saliva	LC-MS
Histamina	Alergias	Urina/plasma	Ensaio imunoenzimático
Piruvato	Desordem no metabolismo mitocondrial	Líquido cefalorraquidiano	Espectrofotometria
Lactato	Acidose láctica	Líquido cefalorraquidiano	Fotométrico
Frutosamina	Controle glicêmico	Soro	Colorimétrico

FONTE: Adaptada de Trivedi; Hollywood; Goodacre, (2017)

Tabela 1.2. Algumas novas bioassinaturas potenciais descobertos nos últimos 3 anos.

Doença/desordem	Biomarcador	Publicação
Alzheimer	Colina	(PEÑA-BAUTISTA <i>et al.</i> , 2019)
Autismo	Aminoácidos	(SMITH <i>et al.</i> , 2019)
Esquizofrenia	Valina, triptofano, glutamato, alguns lipídios, vitaminas B6, D e E, entre outros.	(DAVISON <i>et al.</i> , 2018)
Asma	Ácido 2-isopropilmálico, ácido ascórbico, Glutathione, Pirofosfato, ácido maleico, Hipoxantina, Metilnicotinamida, entre outros.	(CHECKLEY <i>et al.</i> , 2016)
Câncer de pulmão	Valina, Cisteína, Leucina, Alanina, Betaína, Serina, entre outros.	(TANG <i>et al.</i> , 2019)
Câncer de laringe	ácido d-pantotênico, ácido palmítico, ácido mirístico, oleamida, esfingalina e fitoesfingosina	(CHEN <i>et al.</i> , 2019)
Câncer de mama	Taurina, asparagina, betaína, xantina, acetilglicina, entre outros.	(JASBI <i>et al.</i> , 2019)
Câncer de ovário	cadeias longas de ceramidas e esfingomielinas.	(KOZAR <i>et al.</i> , 2018)
Câncer pancreático	Histidina, inositol, xylitol, entre outros.	(HIRATA <i>et al.</i> , 2017)
Psoríase	Asparagina, ácido aspártico, isoleucina, fenilalanina, ornitina, prolina, ácido láctico e ureia	(KANG <i>et al.</i> , 2017)
Mal de Parkinson	Ácido valérico, fenilalanina, carnitina, entre outros.	(ZHAO <i>et al.</i> , 2018)
Câncer de esôfago	Ácido oleico, uracil, inosina e colina.	(ZHANG <i>et al.</i> , 2017a)

1.1.1.2 Lipidômica

A lipidômica é um subcampo da metabolômica e foi apresentado pela primeira vez por Han e Gross (HAN; GROSS, 2003). A lipidômica tem sido definida como “a completa caracterização de espécies moleculares lipídicas e de seus papéis biológicos no que diz respeito à expressão de proteínas envolvidas no metabolismo e função lipídica, incluindo a regulação gênica” (ZHAO; CHENG; LIN, 2014)

Os lipídios são componentes cruciais das membranas celulares e das partículas lipídicas, como as lipoproteínas. Eles desempenham muitos papéis essenciais nas funções celulares, incluindo barreiras celulares, matrizes de membrana, sinalização e depósitos de energia. Os lipídios celulares são altamente complexos; isto é, existem dezenas a centenas de milhares de espécies moleculares. Os lipídios celulares também são altamente dinâmicos; isto é, eles estão mudando constantemente com condições fisiológicas, patológicas e ambientais. (YANG; HAN, 2016)

Os lipídios são divididos em oito diferentes categorias, incluindo ácidos graxos, glicerolipídios, glicerofosfolipídios, esfingolipídios, sacarolipídeos, policetídeos, esterol lipídios e prenol lipídios. Cada categoria pode ser ainda subdividida em classes, subclasses e classes de quarto nível. (AU, 2018)

Historicamente, os lipídios são definidos pela solubilidade em solventes não polares, ou pela presença de longas cadeias de hidrocarbonetos; no entanto, nem todos os lipídios satisfazem ambas as definições. Recentemente, pesquisadores tentaram refinar essa definição. Um novo sistema de nomenclatura foi proposto para lipídios baseado na biossíntese lipídica, ou seja, “pequenas moléculas hidrofóbicas ou anfipáticas que podem originar-se total ou parcialmente por condensações de tioésteres à base de carbânions e/ou por condensação de unidades de isopreno baseada em carbocátion”. (ZHAO; CHENG; LIN, 2014)

Nos últimos anos, a lipidômica emergiu como um novo campo na biologia de sistemas e aumentou o interesse no diagnóstico de doenças e descoberta de biomarcadores (obesidade, diabetes, doença de Alzheimer, câncer de pâncreas

etc.), descoberta e desenvolvimento farmacêutico, pesquisa em alimentos e nutrição humana. Essa poderosa abordagem pode revelar características metabólicas únicas de eventos normais, patológicos ou específicos do tratamento. (ZHAO; VAZIRI; LIN, 2015)

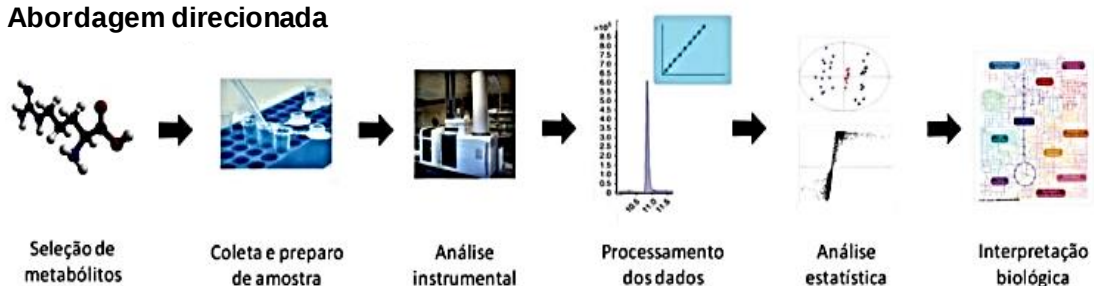
1.1.1.3 Abordagem direcionada e não direcionada

As estratégias para realizar análises metabolômicas são classificadas como abordagem "direcionada" e "não direcionada". Abordagens direcionadas lidam com a medição, detecção e quantificação de um conjunto definido de metabólitos conhecidos que podem pertencer a uma ou mais vias bioquímicas. (GRIFFITHS *et al.*, 2010) A principal desvantagem das abordagens direcionadas é a cobertura limitada do metaboloma, o que aumenta o risco de negligenciar a resposta metabolômica de interesse.

Por outro lado, a abordagem não direcionada é uma abordagem abrangente que tenta caracterizar todos os metabólitos detectáveis em um sistema biológico. É uma ferramenta exploratória capaz de fornecer informações químicas extensivas para descoberta e estudos geradores de hipóteses sobre processos bioquímicos; isso permite a caracterização de alterações através de múltiplas vias e oferece o potencial para determinar novos biomarcadores. No entanto, esta abordagem nunca é realmente imparcial, uma vez que os pesquisadores devem selecionar o modo de ionização que pode melhorar a detecção de algumas substâncias e reduzir a detecção de outras. O efeito desses parâmetros instrumentais na cobertura analítica é pouco relatado na literatura. (JOHNSON; IVANISEVIC; SIUZDAK, 2016; PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012; RIBBENSTEDT; ZIARRUSTA; BENSKIN, 2018)

A **Figura 1.3** ilustra o fluxo de trabalho que deve ser seguido nas análises com abordagem direcionada e não direcionada. Para ambas as abordagens pode ser necessário consultar bancos de dados metabolômicos online que possuem informações sobre *m/z*, estruturas, entre outras. As bases de dados utilizados nesse trabalho foram HMDB (*Human Metabolome Database*) (WISHART *et al.*, 2018) e LIPID MAPS®.

Abordagem direcionada



Abordagem não direcionada

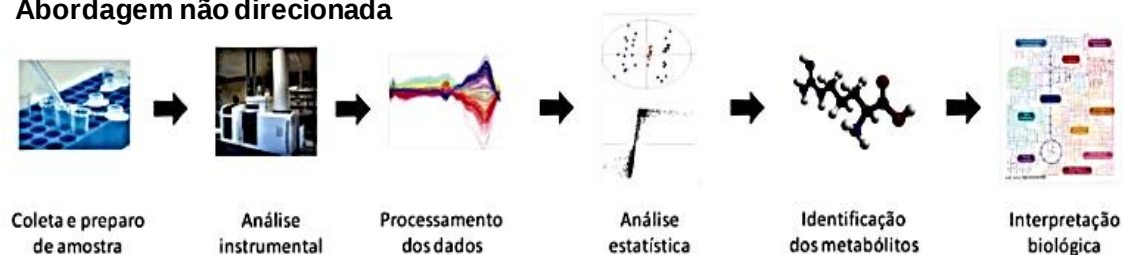


Figura 1.3. Esquema demonstrativo do fluxo de trabalho nas análises metabolômicas com abordagem direcionada e não direcionada. FONTE: Adaptada de Canuto *et al.*, (2018)

1.1.1.3.1 Análise computacional

Estudos não direcionados requerem o uso de ferramentas estatísticas multivariadas capazes de lidar com dados de alta dimensionalidade, com usualmente mais variáveis (características do metabólito) do que quantidade de amostras. Essas ferramentas têm por finalidade a identificação, caracterização e avaliação de diferenças e similaridades entre grupos de amostras e/ou variáveis em diferentes conjuntos de dados, sobretudo os espectrométricos. A **Figura 1.4** apresenta como é montada a matriz para o tratamento dos dados com o propósito de facilitar o entendimento da manipulação das medidas espectrométricas.

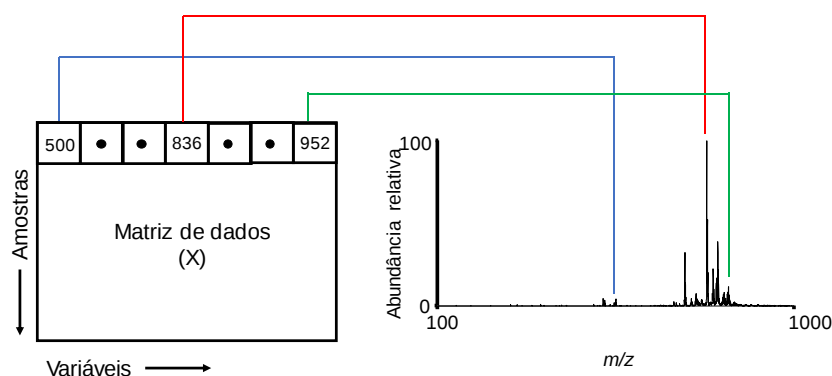


Figura 1.4. Disposição da matriz de dados espectrométricos.

As ferramentas estatísticas podem ser divididas em não-supervisionadas e supervisionadas. Neste trabalho, utilizou-se uma técnica não-supervisionada, a *Principal Component Analysis* (PCA), e duas técnicas supervisionada combinadas, o *Successive Projections Algorithm* (SPA) e *Linear discriminant analysis* (LDA), formando SPA-LDA.

A PCA é uma técnica de análise multivariada não supervisionada amplamente utilizada em estudos biológicos. Essa técnica é usada para reduzir a dimensionalidade dos dados da amostra e gerar uma nova visualização. A redução de dimensionalidade ocorre através de uma transformação linear das variáveis originais, gerando variáveis ortogonais chamadas componentes principais (PC). O primeiro componente principal tem uma maior capacidade de explicar a variância observada nos dados do que o segundo PC, que por sua vez tem uma explicação maior dos dados do que o terceiro PC, e assim por diante. Desta forma, é possível escolher o menor número de componentes principais com a maior variância explicada, para que a dimensionalidade possa ser reduzida com a certeza de que informações importantes das amostras não serão perdidas. A PCA permite a visualização do conjunto de dados em tamanho reduzido, onde a segregação entre as classes pode ser revelada. (SANTOS *et al.*, 2017)

O SPA é uma técnica de seleção de variáveis progressivas. Isso significa que ele começa com uma variável (comprimento de onda ou m/z , por exemplo) e adiciona novas variáveis em cada interação até que um número ideal seja selecionado. Essa técnica utiliza a minimização de multicolinearidade como critério para seleção de variáveis. Para isso, cada variável, representando um vetor durante o SPA, tem uma projeção em um subespaço ortogonal, como mostra a **Figura 1.5**. As variáveis com as maiores projeções (multicolinearidade mínima) são, onde o resultado da interação é o vetor selecionado x_1 . (ARAÚJO *et al.*, 2001)

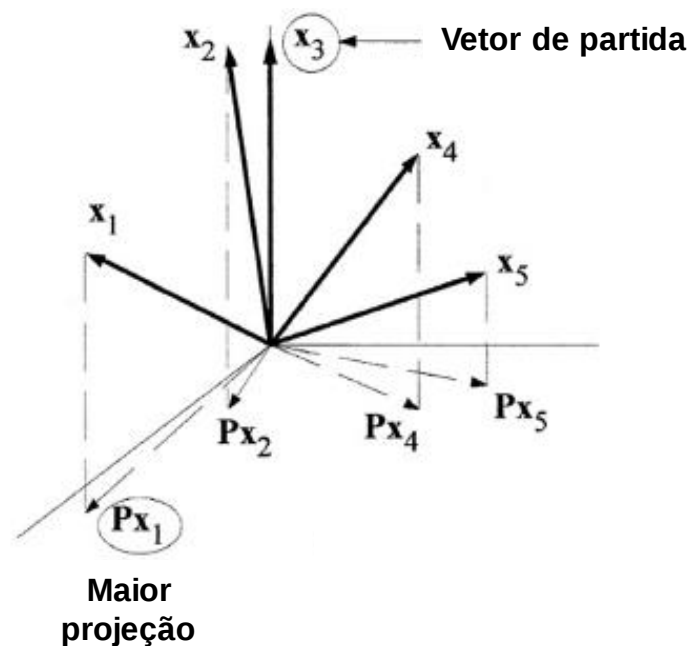


Figura 1.5. Ilustração visual das projeções envolvidas no SPA. FONTE: Adaptada de Araújo *et al.*, (2001)

A LDA é uma técnica de classificação supervisionada amplamente utilizada para discriminação de classe. Ele maximiza a variação entre classes sobre a variação dentro da classe, a fim de criar um limite de decisão linear entre eles. Além disso, a LDA tem seu funcionamento aprimorado quando associado a outros algoritmos de redução de dimensionalidade, como SPA. (KELLY *et al.*, 2011)

1.1.1.4 Plataformas analíticas em metabolômica

Como já foi visto, o metaboloma humano não é ditado apenas por nossos genes. O nosso ambiente (o que comemos, respiramos, bebemos) e a nossa microflora (as bactérias que vivem no nosso trato intestinal) contribuem para o metaboloma. O metaboloma humano é composto de pelo menos 5.000 metabolitos endógenos e até 40.000 metabolitos exógenos. (GREGORIO; NUNZIO; BELLA, 2012; WISHART *et al.*, 2013) A **Figura 1.6** ilustra a complexidade química da metabolômica em comparação com as outras áreas ômicas.

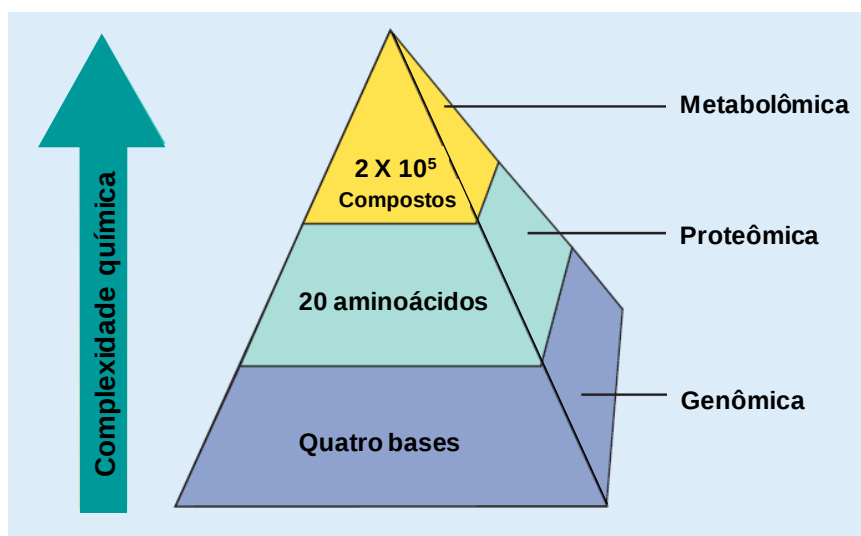


Figura 1.6. Complexidade química das diferentes ômicas. FONTE: Adaptada de WISHART, (2011)

A diversidade de substâncias químicas provenientes das mais variadas fontes presentes no metaboloma humano dificulta sua caracterização e faz com que o perfil metabolômico global seja um desafio analítico.

As plataformas analíticas mais utilizadas em metabolômica são ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*). A MS permite a análise rápida de metabólitos e, devido a sua sensibilidade, fornece uma ampla cobertura do metaboloma. (DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007; HAN *et al.*, 2009)

1.1.2 Espectrometria de massas

A MS é uma técnica analítica emergente nos campos das “ciências ômicas”, incluindo metabolômica, proteômica e lipidômica. A aplicação dessa técnica na área clínica vem atraindo crescente interesse. Entre os motivos desta tendência, estão o fato de que MS é uma ferramenta versátil na análise de misturas complexas, em abordagens direcionadas e não direcionadas, permitindo a identificação de milhares de compostos biologicamente ativos e sua quantificação em níveis traço em várias matrizes. E, também, o fato de seu desempenho analítico ser conhecido pela sua incomparável especificidade. (LEHMANN *et al.*, 2017; NAMIE *et al.*, 2018)

A MS permite discriminar íons de acordo com a massa-sobre-carga (m/z) de cada espécie analisada, fornecendo informações estruturais do analito, enquanto o MS em tandem (MS/MS) pode fornecer informações valiosas para a elucidação ou confirmação da estrutura. Desde os primeiros estudos de J. J. Thomson com medidas de massa dos elétrons, a MS vem sendo desenvolvida e aprimorada para possibilitar a análise de misturas complexas e analitos em níveis de traços. (HOFFMANN; STROOBANT, 2007)

Basicamente, o espectrômetro de massas possui cinco componentes principais: unidade de INTRODUÇÃO DE AMOSTRA; FONTE DE IONIZAÇÃO, onde as moléculas da amostra são convertidas em íons na fase gasosa; os íons são acelerados por um campo eletromagnético e alcançam o ANALISADOR DE MASSAS, onde há separação dos íons de acordo com as respectivas m/z ; via campo elétrico ou magnético, os íons são contados no DETECTOR que converte os íons em sinais elétricos e o SISTEMA DE DADOS registra o sinal, fornecendo o espectro de massas, (HOFFMANN; STROOBANT, 2013) como apresenta a **Figura 1.7**.

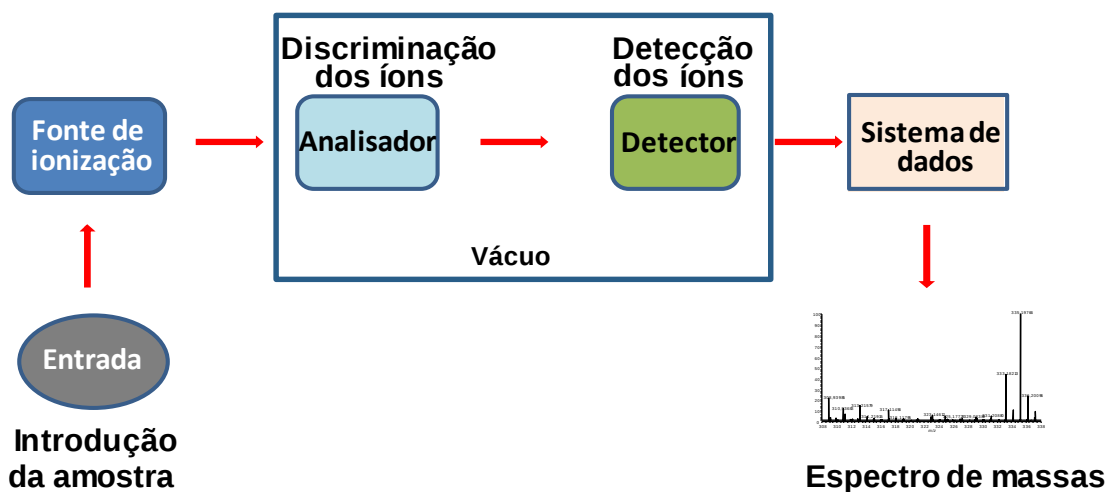


Figura 1.7. Principais componentes do espectrômetro de massas.

O foco deste trabalho será a fonte de ionização. A fonte de ionização desempenha um papel muito importante na MS e está intimamente ligada ao progresso da técnica, pois para lidar com tamanha variedade de átomos, moléculas, matrizes e misturas, a MS precisa promover uma ionização eficiente para gerar íons característicos de cada molécula. Entretanto, nenhum método de ionização universal é capaz de ionizar todos os compostos em matrizes

diferentes. Um método adequado precisa ser usado para compostos específicos porque cada método tem suas vantagens para determinados grupos funcionais orgânicos e estruturas químicas. (ALBERICI *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2019)

1.1.2.1 Fontes de ionização

As fontes de ionização *electron ionization* (EI) e *chemical ionization* (CI) foram as primeiras a serem utilizadas nas análises por MS. Tais técnicas operam sob condições de alto vácuo e exigem que a amostra seja primeiramente volatilizada e depois ionizada. (OUYANG; ZHANG, 2010) Portanto, as duas técnicas são limitadas a moléculas voláteis, de baixa massa molecular e termicamente estáveis.

O desenvolvimento de algumas fontes de ionização por dessorção tornaram possível a ionização de compostos não voláteis, como por exemplo *secondary-ion mass spectrometry* (SIMS), *fast atom bombardment* (FAB), e *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI). (COOKS *et al.*, 2006; PAVIA *et al.*, 2009) Além de possibilitar análise de peptídeos e proteínas, técnicas como MALDI e SIMS tornaram-se os pilares de técnicas de ionização que acessam informação composicional diretamente da superfície da amostra. (BERKEL; PASILIS; OVCHINNIKOVA, 2008)

Apesar de bem estabelecidas, as técnicas de ionização que operam sob condições de vácuo podem tornar laboriosa a forma de introdução de amostras, exigindo maior preparo. (BERKEL; PASILIS; OVCHINNIKOVA, 2008; COOKS *et al.*, 2006) Dessa forma, o surgimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica (API), tais como, *electrospray ionization* (ESI), *atmospheric-pressure chemical ionization* (APCI) e *atmospheric-pressure photoionization* (APPI) causaram uma revolução na espectrometria de massas, possibilitando que os íons sejam gerados de forma mais branda e por estratégias que não necessitam de alto vácuo. (ALBERICI *et al.*, 2010)

1.1.2.1.1 ESI - *Electrospray ionization*

O ESI é uma fonte de ionização importante em laboratórios clínicos, pois ela fornece uma ferramenta sensível, robusta e confiável para estudar amostras

não-voláteis e biomoléculas termicamente lábeis que não são passíveis de análise por outras técnicas convencionais. (HO *et al.*, 2003) Essa fonte foi desenvolvida por John Fenn e colaborador em 1984 (YAMASHITA; FENN, 1984) e ficou mais conhecida em 1989 após a utilização em ionizações de biomoléculas grandes, (FENN *et al.*, 1989) trabalho que rendeu o prêmio Nobel a John Fenn em 2002. ESI é considerada uma fonte de ionização suave, no sentido de que uma quantidade muito pequena de energia residual é retida pelo analito e, geralmente, não ocorre fragmentação após a ionização. Não apenas isso, mas também interações não-covalentes muito fracas são preservadas na fase gasosa. (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012)

A principal característica do ESI que o diferencia das outras técnicas de ionização API é que as espécies são ionizadas ainda em solução, devido a alteração de pH do meio. Íons negativos são formados em pH levemente alcalino devido a remoção de um próton de uma molécula (M) que contenha um sítio ácido, formando um íon $[M-H]^-$ ou em pH levemente ácido, gerando íons $[M+H]^+$ a partir da protonação de moléculas com sítios básicos. A solução iônica é forçada a passar por um fino capilar metálico sob pressão atmosférica. Uma alta tensão é aplicada ($\pm 4,0$ kV) sob o capilar e um contra eletrodo é mantido com potencial elétrico menor induzindo a formação de um forte campo elétrico entre este e o capilar, quando a amostra chega ao final do capilar, é formado um cone com acúmulo de carga na saída (conhecido como cone de Taylor), um gás injetado coaxialmente auxilia na formação do spray. O contra-íon gerado durante a ionização é oxidado (ou reduzido), e formam-se gotículas carregadas. Portanto, o ESI é um método de dessorção de íons em solução para a fase gasosa. (KEBARLE; VERKERK, 2009) A **Figura 1.8** ilustra a ionização pela fonte ESI.

Existem duas propostas para explicar a liberação de íons a partir das gotículas carregadas: o modelo de cargas residuais (CRM, do inglês *charged residue model*,) e o modelo de evaporação dos íons (IEM, do inglês *ion evaporation model*,). De acordo com a teoria do IEM, as cargas de mesmo sinal se aproximam fazendo com que as gotas se dividam. Este fenômeno ocorre até a evaporação total do solvente e é conhecido como explosão Coulômbica. O modelo de CRM descreve que gotículas carregadas saem da ponta do capilar e

à medida que o solvente vai evaporando, o tamanho das gotas vai reduzindo. Isto faz com que a densidade das cargas aumente tornando a repulsão entre as elas maior que a tensão superficial. Este efeito faz com que as gotas se desintegram em gotículas ainda menores. Este processo é repetido até que o solvente seja evaporado por completo, restando apenas os íons da amostra. (AWAD; KHAMIS; EL-ANEED, 2015; KONERMANN *et al.*, 2013)

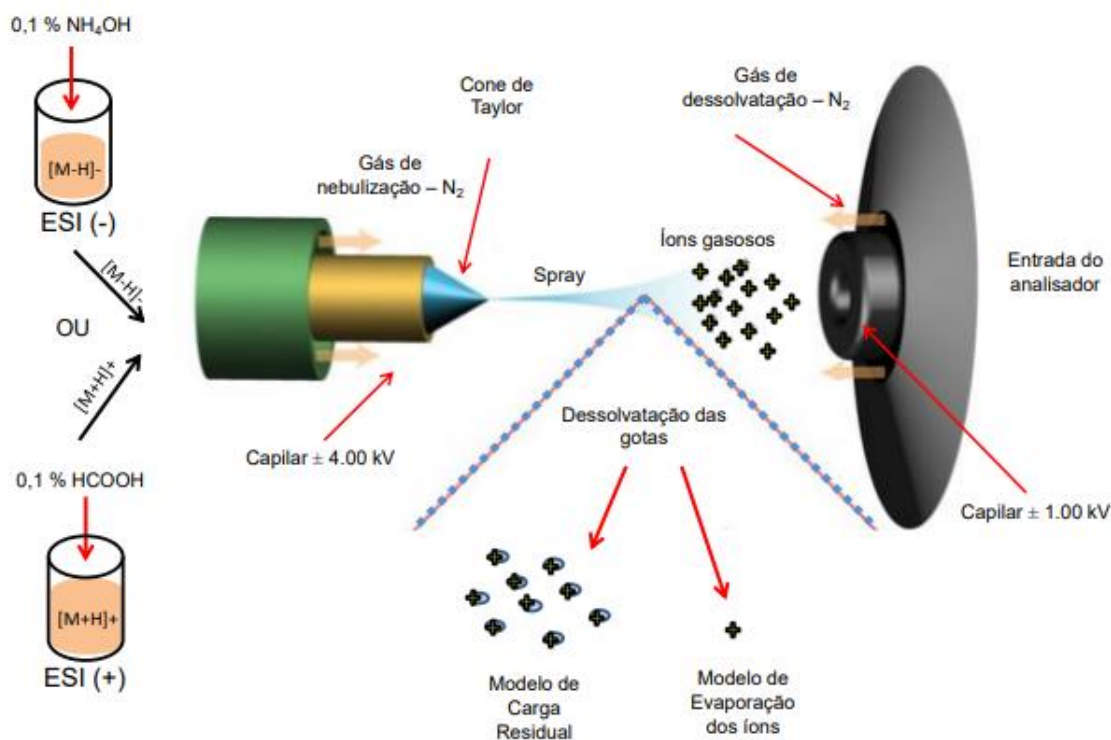


Figura 1.8. Esquema representativo da ionização por ESI. FONTE: Adaptada de Nanotechnology, (2013)

Porém, mesmo com estes avanços que a técnica ESI representou, ela pode apresentar algumas limitações, tais como:

- i) os analitos devem obrigatoriamente possuir características ácidas ou básicas;
- ii) devem ser solúveis nos sistemas de solventes utilizados, tais como metanol, acetonitrila e água;
- iii) o capilar ESI requer um tempo de lavagem para evitar a contaminação de uma amostra anterior. Além disso, o uso de um pequeno capilar carrega o risco de entupimento; (HONG *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2009)

iv) a técnica é suscetível a supressão iônica, que ocorre quando o sinal iônico de uma determinada molécula suprime a ionização de outras moléculas de interesse. Os principais fatores que causam supressão iônica são:

- a. materiais não voláteis (por exemplo, sais, agentes de derivatização, compostos endógenos, fármacos/metabolitos) alteram a eficiência da formação de gotículas ou da evaporação de gotículas, que por sua vez afeta a quantidade de íon carregado na fase gasosa que atinge finalmente o detector;
 - b. A m/z de analitos individuais também são fatores para tornar um composto um candidato à supressão de íons ou fazer um composto uma fonte de supressão de íons para outro. Foi demonstrado que as moléculas com maior massa suprimirão o sinal de moléculas menores;
 - c. analitos mais polares são mais suscetíveis à supressão.
- (ANNESLEY, 2003)

As técnicas API aumentaram a aplicabilidade da espectrometria de massas, no entanto, ainda são necessárias etapas de pré-tratamento da amostra, tais como, a extração do analito a partir de sua matriz, o preparo de soluções em solventes ultrapuros com pH e teores de sais controlados, etapas de extração, separação e derivatização. (ALBERICI *et al.*, 2010)

Todos os problemas relacionados às técnicas de ionização mencionados acima foram estímulos para a criação de fontes de ionização mais versáteis. Dessa forma, surgiram as fontes de ionização ambiente, que constituíram uma segunda revolução na espectrometria de massas ao permitir a ionização direta de analitos em amostras brutas em seu estado nativo, livre de preparação de amostras, para que o processo de análise possa ser realizado em tempo real e possivelmente por usuários não especialistas. (ZHANG *et al.*, 2017c)

1.1.2.2 Espectrometria de massas ambiente

O termo espectrometria de massas ambiente (AMS, do inglês *Ambient Mass Spectrometry*) foi introduzido em 2006 por Cooks e colaboradores. (COOKS *et al.*, 2006) A AMS é constituída por um conjunto de técnicas de ionização que permite a análise de compostos diretamente de seus ambientes naturais utilizando o mínimo ou nenhum preparo de amostras. (HUANG *et al.*, 2010) As técnicas de ionização ambiente seguem 3 princípios:

- i) os íons são gerados e mantidos sob pressão atmosférica antes de serem introduzidos no espectrômetro de massas;
- ii) as amostras não requerem nenhum pré-tratamento, ou mínima preparação;
- iii) os analitos são diretamente dessorvidos/ionizados a partir da superfície da amostra. (HSU; DORRESTEIN, 2015)

Avanços na AMS tiveram um impacto significativo na metabolômica pois permitiram a ionização suave e direta de metabólitos, amostragem de superfície e análise *in situ* em tempo real no ambiente, com pouco ou nenhum preparo de amostra. (CLENDINEN; MONGE; FERNÁNDEZ, 2017)

Embora o termo AMS tenha sido apresentado em 2006, a primeira fonte de ionização ambiente foi desenvolvida em 2004 pelo grupo do Dr. R. Graham Cooks conhecida como *desorption electrospray ionization* (DESI). (TAKÁTS *et al.*, 2004) Logo em seguida, no de 2005, foi desenvolvida a técnica *direct analysis in real time* (DART). (CODY; LARAMÉE; DURST, 2005) Segundo VENTER; NEFLIU; GRAHAM COOKS, (2008), pelo menos 15 novos métodos de AMS foram reportados nos três primeiros anos (2004 a 2007) após o desenvolvimento da DESI, por exemplo, *desorption sonic spray ionization* (DeSSI), *laser ablation electrospray ionization* (LAESI), *desorption atmospheric pressure photoionization* (DAPPI), entre outras.

O desenvolvimento das técnicas empregadas na espectrometria de massas ambiente se deu com base no grande conhecimento acumulado dos métodos clássicos de ionização (ALBERICI *et al.*, 2010). Dessa forma, a maior parte das

técnicas ambientes tem princípios de ionização análogos aos mecanismos apresentados nas fontes de íons já existentes, tais como, ESI, APPI ou CI. (MONGE *et al.*, 2013) Como mostra a **Figura 1.9**.

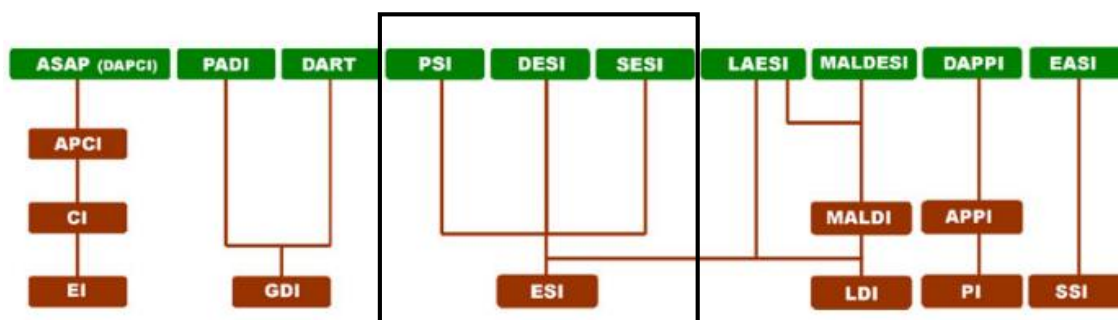


Figura 1.9. “A árvore da ionização” da MS demonstrando as técnicas (marrom) a partir das quais algumas técnicas de AMS (verde) foram desenvolvidas. FONTE: Adaptada de Alberici *et al.*, (2010)

ESI é uma das técnicas de ionização mais comumente adaptadas no desenvolvimento de fontes de ionização ambientes, uma vez que seu mecanismo de ionização permite a extração ou dessorção de moléculas da superfície da amostra. As técnicas AMS que utilizam o mecanismo de ionização da ESI são frequentemente divididas em três categorias distintas: *spray-based extraction*, *direct liquid extraction* e *substrate electrospray*. (FEIDER *et al.*, 2019; LASKIN; LANEKOFF, 2016) Neste trabalho será abordado apenas a categoria do *substrate electrospray*.

1.1.2.2.1 Substrate Electrospray Ionization

Nos últimos anos, foram realizados extensos esforços de pesquisa para ampliar a gama de aplicações do ESI e, também, para superar as limitações inerentes de ESI, já citadas anteriormente. Com isso, houve o desenvolvimento de *Substrate Electrospray Ionization* (ESI com substrato sólido). As técnicas ESI com substrato sólido foram desenvolvidas com sucesso pela substituição do capilar do ESI por vários outros substratos sólidos, incluindo metal, papel, ponta de madeira e materiais biológicos. (HUANG *et al.*, 2018) (**Figura 1.10**)

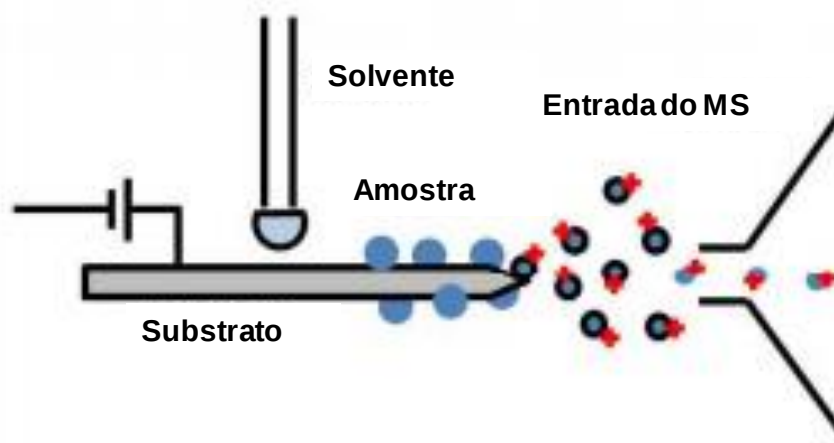


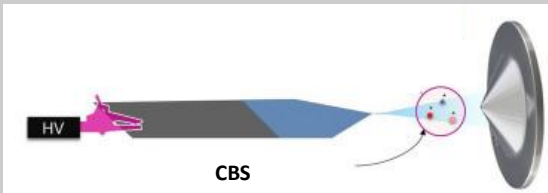
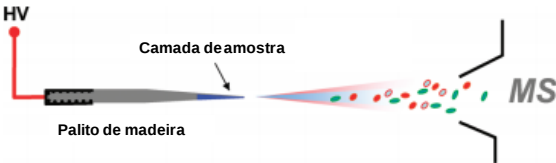
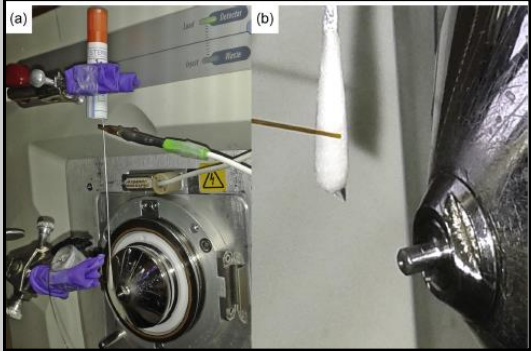
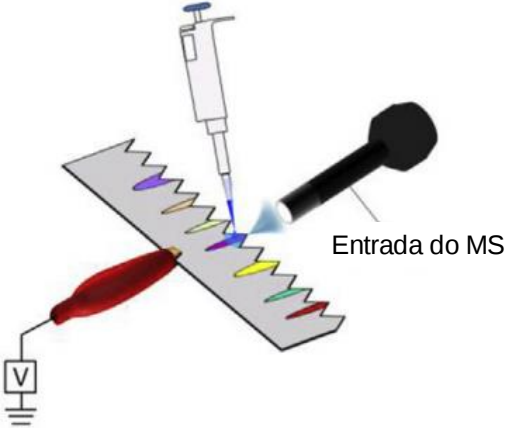
Figura 1.10. Esquema representativo do *Substrate Electrospray Ionization*. FONTE: Adaptada de Venter *et al.*, (2013)

Ao aplicar uma alta tensão ao substrato sólido, gotículas carregadas contendo íons de analitos são produzidas, iniciando uma *electrospray* deles. Íons de analitos também podem ser gerados diretamente a partir de tecidos biológicos sólidos pela aplicação de tensão ionizante no substrato, após a amostragem, e, se necessário, adição de solventes de pulverização. As funções do substrato são (i) manter a solução da amostra e (ii) conduzir a alta tensão para formar o *electrospray*. Como o uso de capilar não está envolvido, a amostragem com estas técnicas é livre de obstrução. A separação de componentes na amostra também é possível quando são aplicados como substratos materiais com propriedades de separação, por exemplo, materiais à base de celulose e meios cromatográficos. (HUANG *et al.*, 2011; SO; HU; YAO, 2014)

Os métodos de ESI com substrato sólido oferecem baixo consumo de amostra e eficiência de ionização a partir de pequenos volumes de amostra. Portanto, esses métodos são especialmente adequados para a análise de amostras biológicas complexas, como urina, fluido oral e plasma sanguíneo. Além disso, as técnicas ESI com substrato sólido envolvem tipicamente procedimento de amostragem rápida, configuração instrumental simples e uso de materiais de baixo custo, permitindo uma análise acessível e eficaz por espectrometria de massas. (SO; HU; YAO, 2014; VENTER *et al.*, 2013)

Existem diversos métodos de ESI com substrato, como pode ser observado na **Tabela 1.3**, que apresenta algumas técnicas baseadas em *Substrate Electrospray Ionization* reportados na literatura nos últimos anos, bem como algumas aplicações e a imagem ilustrativa da técnica.

Tabela 1.3. Lista de algumas técnicas baseadas em *Substrate Electrospray Ionization* com suas respectivas imagens representativa e referências.

Foto ilustrativa da técnica	Nome e referência	Referência de aplicações
	CBS - <i>Coated Blade Spray</i> (GÓMEZ-RÍOS; PAWLISZYN, 2014)	(GÓMEZ-RÍOS <i>et al.</i> , 2018) (TASCON <i>et al.</i> , 2017)
	Wooden-tip electrospray ionization (HU <i>et al.</i> , 2011)	(NG <i>et al.</i> , 2019) (HUANG <i>et al.</i> , 2018)
	Touch Spray ionization (PIRRO <i>et al.</i> , 2015)	(JARMUSCH <i>et al.</i> , 2018) (FEDICK; BAIN, 2017)
	Thin-Layer Chromatography-ESI (HSU <i>et al.</i> , 2003)	(CHENG <i>et al.</i> , 2018, 2019)

Além das técnicas demonstradas na **Tabela 1.3**, ainda foram desenvolvidos nos últimos 2 anos outras técnicas, como *MasSpec Pen*, (ZHANG *et al.*, 2017b) *Sponge spray ionization*, (HECHT *et al.*, 2017) *T-Probe* (LIU *et al.*, 2018a) e *Robotic Surface Analysis (RoSA)* (LI *et al.*, 2018a)

Entretanto, aqui faremos uma revisão mais aprofundada de dois métodos mais consolidados, que são PESI (*Probe Electrospray Ionization*) e PSI (*Paper Spray Ionization*).

1.1.2.2.2 PESI – *Probe electrospray ionization*

O PESI foi desenvolvido por Hiraoka *et al.*, (2007). É constituída de uma agulha (probe) que se move verticalmente. Na posição mais baixa, a agulha permanece em contato com a amostra e ao retornar para a posição mais alta, uma gotícula da solução é formada na ponta desta haste. Neste momento, uma alta tensão DC (~ 3-5 kV) é aplicada na haste, gerando uma diferença de potencial (ddp) entre a haste e a entrada do espectrômetro de massas, formando um campo elétrico, que por sua vez, gera a formação do spray a partir da gota (de forma análoga ao ESI). (**Figura 1.11**). Foram analisados aminoácidos, peptídeos, proteínas e polietilenoglicol (PEG) em soluções e o efeito da adição de sal ou de ácido à solução da amostra foi investigado. Particularmente a alta tolerância a tampões de sal ou amostras “sujas” em geral, é a vantagem principal.

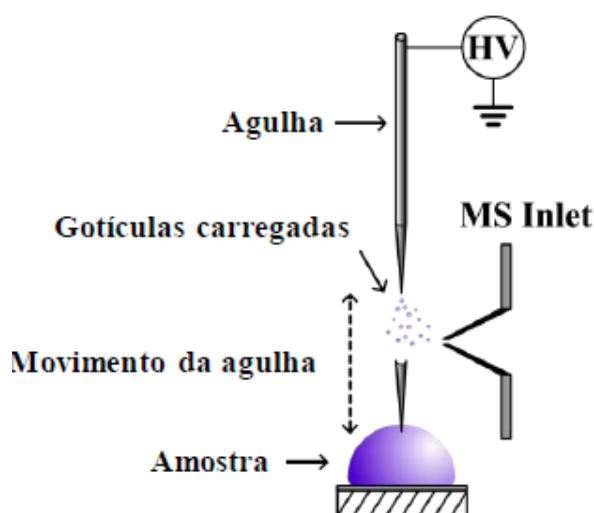


Figura 1.11. Representação da técnica de PESI-MS. FONTE: Adaptada de Mandal *et al.*, (2010)

Posteriormente ao seu desenvolvimento, o grupo de Hiraoka aplicou o método em diversas análises. Em 2008, eles aplicaram o PESI diretamente em amostras biológicas, como urina, cérebro de camundongo, fígado de camundongo, ovo de salmão e frutas (laranja, banana, etc.). Sinais iônicos fortes para quase todas as amostras foram obtidos. Um problema enfrentado pela PESI é que a amostra aderida à agulha não pode ser definida com precisão durante a medição da MS e pode variar de amostra para amostra. (CHEN *et al.*, 2008)

Em 2009, o mesmo grupo demonstrou a eficiência de imageamento da seção de cérebros de ratos usando PESI. (LEE *et al.*, 2009) Estudaram também as propriedades físicas da agulha do PESI em amostras biológicas. (YOSHIMURA *et al.*, 2009) Ainda em 2009, o grupo de Hiraoka aplicaram o PESI para perfis diretos de fitoquímicos em uma seção de um bulbo de tulipa em diferentes regiões, incluindo placa basal, bordas externas e internas de escala, flor em botão e folhas de folhagem. Além de realizarem uma série de experimentos PESI-MS *in vivo*. (YU *et al.*, 2009)

Em 2010, o mesmo grupo, comparou o PESI com nano-ESI na análise de biomoléculas com altas concentrações de sais. (MANDAL *et al.*, 2010) Ainda nesse ano, Yu *et al.*, (2010) utilizaram PESI-MS para monitorar algumas reações biológicas e químicas em tempo real, como desnaturação de proteínas induzidas por ácido, troca de hidrogênio/deutério (HDX) de peptídeos e formação de base de Schiff.

Mandal; Chen; Hiraoka, (2011) testaram a ionização por PESI de analitos com diferentes atividades superficiais, medidos em função do tempo para uma mistura de vários analitos com diferentes valores de atividade superficial. (MANDAL *et al.*, 2011)

O grupo de Hiraoka estudou ainda a aplicação do PESI em diagnósticos clínicos, estudando o efeito do solvente nas análises lipídicas. Examinaram várias combinações de solventes com o objetivo de otimizar as condições de ionização para diagnóstico molecular de tumores malignos por PESI-MS. As condições ideais para o carcinoma de células renais (RCC) foram alcançados usando álcoois. PESI-MS delineou com sucesso a expressão diferencial e

fosfolipídios (PCs) e triacilgliceróis (TAGs) em tecidos não-cancerosos e RCC usando estes sistemas solventes. (MANDAL *et al.*, 2012)

Saha; Mandal; Hiraoka, (2013), relataram a aplicação de PESI para detecção rápida, sensível e direta de metanfetamina, morfina, cocaína e codeína da urina humana, fluido oral e plasma. Usmanov *et al.*, (2015) utilizaram PESI com uma interface de pressão atmosférica descontínua (DAPI). A técnica foi aplicada a três amostras de narcóticos, metanfetamina, morfina e codeína. Os limites de detecção para estes compostos foram de 10 ppb em H₂O/CH₃OH (1/1).

A extração de analitos de células individuais também foi demonstrada usando PESI. (CHEN *et al.*, 2016) Zaitseva *et al.*, (2016) demonstraram a aplicação do PESI à análise endógena de metabolitos do fígado de camundongos, conseguindo detectar 26 metabólitos incluindo aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares. Para investigar sua praticidade, perfis metabólicos de controle e modelo de camundongo por lesão hepática aguda induzida por CCl₄ foram medidos pelo método desenvolvido. Os resultados mostraram uma separação clara dos dois grupos pela análise de componentes principais (PCA) e a taurina foi identificada como a principal contribuição para a separação do grupo. Os resultados foram ainda validados pelo método estabelecido de cromatografia gasosa - MS/MS, demonstrando a utilidade do presente método. Além disso, aplicaram preliminarmente o método à análise em tempo real de um fígado intacto de um camundongo. Conseguiram com sucesso a monitorização das alterações em tempo real de dois intermediários do ciclo de ácido tricarboxílico, o ácido α -cetoglutarico e o ácido fumárico, no fígado imediatamente após a injeção do ácido pirúvico através de um tubo canulado na veia porta.

Hayashi *et al.*, (2017) aplicaram PESI para analisar metabólitos em cérebro de camundongo, onde sua composição lipídica frequentemente interfere na análise do metaboloma baseado na EM. Como um resultado o PESI-MS/MS detectou diretamente 25 metabólitos em um córtex frontal de camundongo e claramente discriminou perfis metabólicos de camundongos com ruptura do metabolismo energético de camundongos controle. PESI-MS/MS também permitiu realizar análises de distribuição local do hipocampo, bem como o córtex

frontal em cada camundongo (n = 5), discriminando suas sutis diferenças metabólicas.

O PESI também foi utilizado para investigar os perfis moleculares de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. A agulha de PESI foi mergulhada em etanol/extrato de água da biópsia ou diretamente tocado no tecido de biópsia para coletar analitos, seguidos de análise no modo positivo e negativo. Análise estatística dos dados coletados em ambas as polaridades produziram precisão preditiva superior a 90% para tecidos cancerosos versus não cancerosos. (ASHIZAWA *et al.*, 2017)

Zaitzu *et al.*, (2018) demonstraram o uso de PESI com agulha semi-automatizada, com diâmetro de ponta de 700 nm. O sistema monitorou com sucesso 8 metabólitos cerebrais relacionados ao metabolismo energético central em um camundongo anestesiado com isoflurano em tempo real com um intervalo de 20 segundos. Além disso, o sistema conseguiu captar a dinâmica do metabolismo energético em um rato administrado canabinóide tipo 1, que é conhecido por perturbar o metabolismo energético do cérebro.

Ninomiya *et al.*, (2018) investigaram as características de PESI para várias agulhas de metal com diferentes condições de ponta, utilizando como parâmetro espectros de massa dependente do tempo de soluções de mistura de citocromo c e colesterol. Para uma mistura de solução de citocromo c e colesterol em ácido fórmico a 0,1%/água (1/1) a uma frequência de movimento de 1 Hz, uma agulha de acupuntura com uma ponta aguçada e titânio de 0,5 mm de diâmetro e agulhas de fio de aço inoxidável deram forte sinais iônicos para citocromo c e sinais iônicos extremamente fracos para colesterol. Quando a frequência baixava e a duração da alta tensão aumentava, as agulhas de titânio e aço inoxidável forneciam sinais de íons de citocromo c e colesterol com altas intensidades bem separadas ao longo do tempo.

Recentemente, Usui *et al.*, (2019) utilizaram o PESI na determinação de glufosinato e glifosato em soro sanguíneo humano. Padrões de herbicidas foram adicionados ao soro humano que foi então submetido a análise (N = 5 por concentração). A análise foi repetida diariamente durante oito dias. O limite de

detecção (LOD) foi de 0,59 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o glufosinato e 0,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o glifosato. O limite de quantificação (LOQ) foi de 1,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos os herbicidas. Os efeitos da matriz foram observados em três concentrações diferentes (entre 95,7% -104% para o glufosinato e entre 90,7%-95,7% para o glifosato). Quando aplicado a amostras tomadas a partir de casos reais de intoxicação (seis amostras para cada herbicida), o presente método deu mesmos valores quantitativos que os obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência convencional com detecção de fluorescência.

Usui *et al.*, (2019b) também utilizaram o PESI na triagem de drogas para acetaminofeno em soro sanguíneo. A curva de calibração foi linear no intervalo de 1,56 – 200 mg mL^{-1} ($r^2 = 0,998$), e o limite de detecção e quantificação foi de 0,37 mg mL^{-1} e 1,56 mg mL^{-1} , respectivamente. A precisão e a exatidão (RSD%) do método estavam dentro de uma faixa aceitável (0,15 e 2,8% e 2,3% e 6,1%, respectivamente) e o efeito da matriz em 3 concentrações (95,1% e 104%) indicou que a PESI-MS/MS é apenas ligeiramente afetado por matrizes. Em casos reais forenses, os valores quantitativos determinados pelo PESI-MS/MS foram quase idênticos aos determinados pelo método de cromatografia líquida MS/MS.

1.1.2.2.3 PSI - Paper Spray Ionization

A forma mais utilizada de *Substrate Electrospray Ionization* é a ionização por *Paper Spray Ionization* (PSI). (FEIDER *et al.*, 2019) A técnica, ilustrada na **Figura 1.12**, foi desenvolvida pelos grupos do Dr. Graham Cooks e Dr. Zheng Ouyang (*Purdue University*, Indiana, EUA) em 2010. A PSI consiste na aplicação de uma alta voltagem (ex., 3-5 kV) em um papel triangular contendo a amostra, que pode ser uma amostra não tratada (ex., sangue, bebidas) ou um extrato. A amostra é depositada no centro do papel e se espalha por efeito de capilaridade. O papel é posicionado próximo à entrada do espectrômetro de massas que também é submetida à uma voltagem com o objetivo de gerar um campo elétrico. Então, um solvente contendo ácido ou base (solvente de *spray*) é aplicado sobre o papel e o campo elétrico induz à formação de um *spray* eletrolítico na ponta do papel. (WANG *et al.*, 2010)

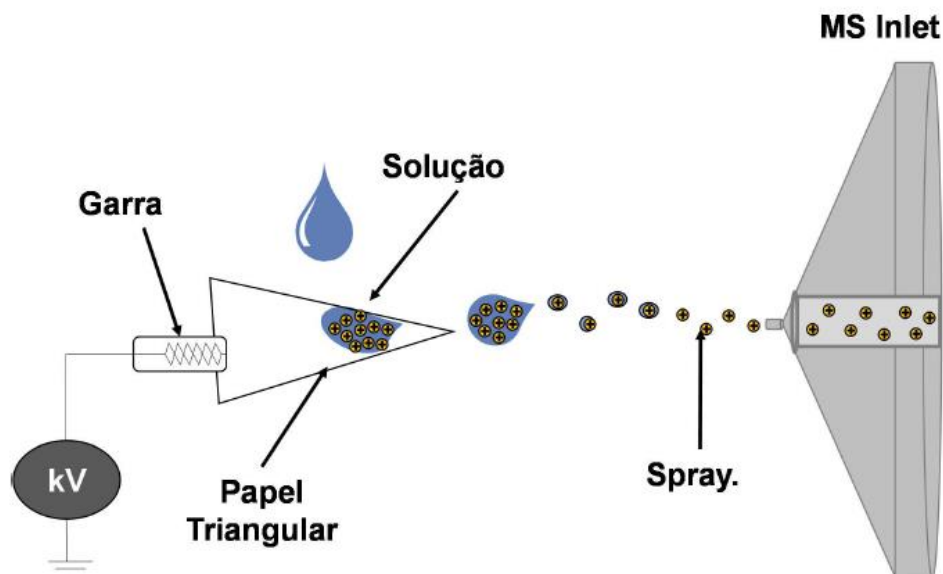


Figura 1.12. Representação esquemática da técnica de PSI-MS. FONTE: Adaptada de da Silva *et al.*, (2019)

As características desse método são análise rápida, baixo custo e alta eficiência. Além disso, em análises por PSI espécies interferentes de matrizes complexas, tais como sais, se fixam ao papel enquanto os analitos solúveis são liberados e analisados, melhorando a sensibilidade e a reprodutibilidade. (FEIDER *et al.*, 2019; ZHI-PING; XIAO-NING; YA-JUN, 2014) Essas características fizeram com que essa técnica se tornasse muito útil e seu desempenho tem sido demonstrado para vários analitos e matrizes.

PSI é uma técnica útil para a ciência e tecnologia de alimentos. Assis *et al.*, (2019) utilizaram PSI e espectroscopia no infravermelho com reflectância total atenuada por transformada de Fourier (ATR-FTIR) para quantificar e caracterizar misturas de cafés Robusta e Arabica. Em diferentes graus de torrefação, foram formuladas 120 misturas de café moído (0,0–33,0%). Utilizando o modelo de análise variada de seleção de preditores ordenados (OPS) permitiu-se a atribuição de algumas das variáveis selecionadas a componentes específicos do café, como trigonelina e ácidos clorogênicos.

Yu *et al.*, (2018) analisaram o ácido benzóico e a vitamina C em refrigerantes (ex., Coca-Cola, Pepsi), suco de laranja, vinagre de maçã e água de coco por PSI-MS. Foram obtidos LODs e limites de quantificação (LOQs) de 0,1 e 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o ácido benzóico e 0,3 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a vitamina C,

respectivamente. A recuperação variou de 91,1 a 106,7% para o ácido benzóico e de 92,6 a 108,2% para a vitamina C. A comparação com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) não mostrou diferença substancial na quantificação do ácido benzóico e vitamina C nas bebidas. Além disso, a PSI-MS tem sido aplicada na análise de resveratrol em vinhos tintos, (DI DONNA *et al.*, 2017) quantificação de corantes em bebidas ilegais, (GUO *et al.*, 2017) identificação de whiskies escoceses falsificados, (TEODORO *et al.*, 2017a) análises de cafeína e outras substâncias em bebidas energéticas. (SNEHA; DULAY; ZARE, 2017)

A química forense tem sido um alvo para aplicações da PSI-MS devido às características de rapidez e simplicidade desta técnica. Yang *et al.*, (2018) utilizaram PSI acoplado com um método de microextração para análises rápidas e no local de traficantes ilícitos do tipo anfetamina, incluindo anfetamina (AM), metanfetamina (MA). e 3,4-metilenodioxo-N-metilanfetamina (MDMA) em amostras biológicas complexas, tais como sangue total e urina bruta. Os parâmetros experimentais incluindo solvente de extração, ciclo de extração, alta voltagem e solvente de pulverização etc., foram todos investigados e as condições otimizadas mostraram uma sensibilidade aumentada de 1-2 ordem de grandezas com PS-MS. O método mostrou boa linearidade, com valores de coeficiente de correlação (R^2) não inferior a 0,9979 para análise de AM, MA e MDMA em sangue total humano e urina em bruto sem pré-tratamentos adicionais da amostra. Os limites de detecção e quantificação foram 0,01 e 0,05 ng mL⁻¹ e 0,05 e 0,2 ng mL⁻¹, respectivamente. Recuperações satisfatórias também foram obtidas, com 74,2 e 94,9% para sangue total e 80,2 e 103,6% para urina em bruto, respectivamente.

Amador *et al.*, (2017) descreveram o uso da PSI-MS para análise direta de tintas de canetas de diferentes marcas de esferográficas, como Bic, Paper Mate, Faber Castell, Pentel, Compactor e Pilot. Os autores diferenciaram as canetas esferográficas de acordo com seus perfis químicos característicos através da análise de PSI-MS combinada com análise multivariada de mínimos quadrados parciais (PLS). Domingos *et al.*, (2017) também analisaram selos contendo 25I-NBOMe, bem como extratos e folhas de canabinóides e determinaram a autenticidade de fitoterápicos por PSI-MS. Ademais, trabalhos recentes relataram o uso da PSI para rastreio de drogas toxicológicas,

(MCKENNA *et al.*, 2018) identificar e quantificar anfetaminas individuais no sangue total, (TEUNISSEN *et al.*, 2017), discriminação entre perfumes autênticos e falsificados. (TEODORO *et al.*, 2017b)

A área clínica também tem se beneficiado do PSI. Chamberlain; Rubio; Garrett, (2019) demonstraram a primeira diferenciação bacteriana em nível de estirpe por PSI com a bactéria intestinal de mamíferos *Oxalobacter formigenes* (Oxf). Esta nova aplicação teve significado clínico promissor, pois pode ser usado para diferenciar entre bactérias patogênicas e seus parentes comensais inofensivos, economizando tempo e dinheiro em diagnósticos clínicos. A análise estatística multivariada seguida do exame das características significativas forneceu um painel de metabólitos exclusivos que poderia servir como potenciais biomarcadores.

Wan *et al.*, (2019) realizaram análise *in situ* de ácidos graxos insaturados em soro humano por PSI no modo negativo. Os limites de detecção (LODs) e limites de quantificação (LOQs) foram na faixa de 0,0178 a 0,0506 μM e 0,0218 a 0,3634 μM para padrão de ácidos graxos insaturados. Sem as preparações de amostra adicionais ou reagentes químicos reativos permite o uso da metodologia para o diagnóstico clínico no local.

PSI também foi usado para quantificar nicotina e cotinina em células culturas após a exposição à fumaça do tabaco para testar aplicabilidade do PSI como ensaio de citotoxicidade *in vitro*. Como os produtos do tabaco não podem ser testados *in vivo*, na prática ensaios *in vitro* são essenciais para avaliar a exposição ao tabaco durante um gama de condições. Usando PSI, LOQs de 79,17 ng mL^{-1} e 10,79 ng mL^{-1} para nicotina e cotinina, respectivamente, em células epiteliais traqueobrônquicas humanas tamponadas com este método foram determinados, exemplificando assim a capacidade de PSI para uso em ensaios de citotoxicidade. (KEATING *et al.*, 2018)

Vandergrift *et al.*, (2018) apresentaram o uso de PSI para a medição direta de fentanil e norfentanil usando uma interface PS personalizada, demonstrando que a posição da ponta do papel e a qualidade podem afetar significativamente os resultados quantitativos. Além disso, observaram calibrações comparáveis

para fentanil e norfentanil (0,5 a 600 ng mL⁻¹) em uma variedade de matrizes complexas (metanol, urina diluída, pasta analgésica). Os limites de detecção para o fentanil foram de 0,049 ng mL⁻¹ (0,4 pg de material total) em metanol, e 0,66 ng mL⁻¹ (5,3 pg de material total) contaminado com uma pasta analgésica. PSI foi comparado com cromatografia líquida-MS para as análises de amostras reais de urina, com resultados satisfatórios.

Ademais, existem vários relatos nos últimos 2 anos mostrando o uso de PSI para análise clínica e drogas em biofluidos. (KENNEDY *et al.*, 2018), (MICHELY; MEYER; MAURER, 2017), (CHIANG; ZHANG; OUYANG, 2018)

Outras aplicações da PSI-MS em diferentes campos da ciência têm sido publicadas recentemente, como por exemplo, no monitoramento de reações e catálises (RESENDE *et al.*, 2017), (BANERJEE; BASHEER; ZARE, 2016) e (SARKAR; SOM; PRADEEP, 2017), na análise de proteínas (LI *et al.*, 2018b) e (ZHANG; GLAROS; MANICKE, 2017), análise de bactérias (WEI *et al.*, 2016), petroleômica (KIM *et al.*, 2018).

1.2 JUSTIFICATIVA

O metaboloma está em constante mudança, muitas questões biológicas só podem ser abordadas se as amostras são analisadas em tempo real, *in situ* e/ou *in vivo*. Além disso, como a metabolômica é um campo muito amplo, existem muitas questões a serem estudadas, existem muitos biomarcadores para serem descobertos, muitas doenças para serem investigadas e, ainda, podem ser desenvolvidas e aplicadas técnicas analíticas diferentes das convencionais que tornem as análises metabolômica mais rápidas e assertivas.

Nesse sentido, foi selecionado como projeto de doutorado o desenvolvimento de novos métodos de análise metabolômica baseados em espectrometria de massas ambiente, assim como, a aplicação de técnicas já existentes, porém nunca utilizadas para esse fim. A abordagem desse tema será realizada nos próximos três capítulos:

No **Capítulo 1**, foi apresentado o uso da técnica PSI com modificação do papel para torná-lo específico na análise, com abordagem direcionada, de biomarcadores em urina de algumas doenças;

No **Capítulo 2**, a partir de uma abordagem não-direcionada, utilizou-se o PSI combinado com análise estatística multivariada, na análise de plasma sanguíneo para encontrar biomarcadores para o câncer do colo do útero;

Por fim, no **Capítulo 3**, foi demonstrado o desenvolvimento de um novo *Substrate Electrospray Ionization* capaz de realizar análises metabolômicas, chamado ESI grafite. A técnica foi utilizada em abordagens direcionadas e não-direcionadas.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver e aplicar técnicas da espectrometria de massas ambiente em análises com abordagens direcionadas e não-direcionadas de metabólitos em diferentes matrizes biológicas, como urina e plasma.

1.3.2 Objetivos específicos

- a) Desenvolver uma técnica de PSI com um papel modificado para analisar com especificidade biomarcadores urinários de Alzheimer, câncer de próstata e coinfeção de bactérias em pacientes com AIDS.
- b) Encontrar biomarcadores para o câncer de colo do útero através da análise do plasma sanguíneo de mulheres doentes e controle utilizando PSI e análise multivariada dos dados (iSPA-LDA).
- c) Desenvolver uma nova técnica de ionização ambiente capaz de realizar análises metabolômicas, denominada ESI grafite, capaz de analisar amostras biológicas complexas, como urina e cérebro de camundongo.

CAPÍTULO I

Polímero molecularmente impresso (MIP) como
substrato para *Paper Spray Ionization* – MIP-CPS:
análise de metabólitos em urina

2 CAPÍTULO I - Polímero molecularmente impresso (MIP) como substrato para *Paper Spray Ionization* – MIP-CPS: análise de metabólitos em urina

2.1 INTRODUÇÃO

Como demonstrado no capítulo anterior, o PSI tem sido amplamente aplicado em análises de matrizes complexas, como plasma e urina. Entretanto, pesquisadores tem desenvolvido novos métodos que combinem todas as características da MS com as características de purificação de amostra, extração ou enriquecimento do analito fornecidos por métodos como *solid-phase extraction* (SPE), (MARÍN-SÁEZ; ROMERO-GONZÁLEZ; GARRIDO FRENICH, 2019) *solid-phase microextraction* (SPME), (VASILJEVIC; SINGH; PAWLISZYN, 2019), *liquid phase microextraction* (LPME), (WANG *et al.*, 2019b) *polymer monolith microextraction* (PMME) (LI *et al.*, 2016) e *slug-flow microextraction* (SFME). (YANG *et al.*, 2018) Essa combinação tem por objetivo: (i) minimizar os efeitos da matriz, pela redução da supressão de íons; (ii) eliminar a variabilidade da amostra, para obter quantificação mais reprodutível mesmo de fontes diferentes e para melhorar a robustez do método; (iii) aumentar a detecção, através da concentração de analito e remoção de interferências das matrizes biológicas; e (iv) limpar as amostras, a fim de aumentar a disponibilidade do instrumento e performance do sistema. (GAMA; BOTTOLI, 2017)

Alguns materiais adsorventes e seletivos podem ser usados como preenchedores de coluna de cartucho para obter SPE para muitos compostos. Uma geração poderosa e inteligente de adsorvente seletivo é representada por polímeros molecularmente impressos (MIPs, do inglês *molecularly imprinted polymers*), estes polímeros inteligentes mimetizam enzimas, pois possuem sítios de reconhecimento molecular específicos para um analito alvo em detrimento de outros compostos e, portanto, são capazes de acomodar e reter moléculas específicas e seus análogos estruturais, como ilustra a **Figura 2.1**. (LIU *et al.*, 2019; NEZHADALI; FEIZY; BEHESHTI, 2015) Suas principais vantagens são o previsível reconhecimento específico, baixo custo, facilidade de preparação, boa estabilidade mecânica/química e reutilização. (VANECKOVA *et al.*, 2019)

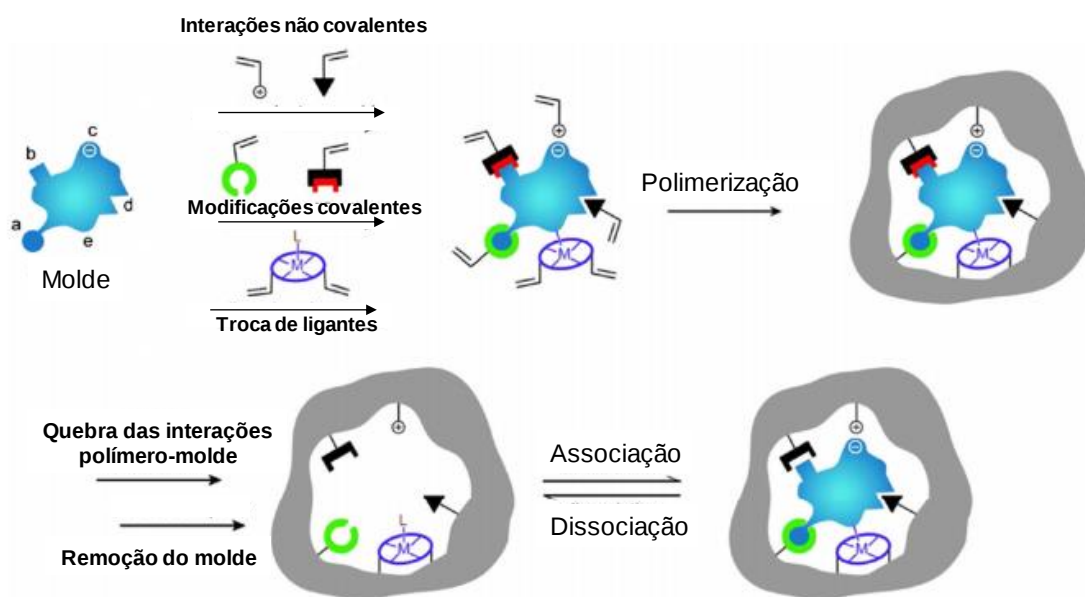


Figura 2.1. Esquema representativo do funcionamento do MIP. FONTE: Adaptada de Gama; Bottoli, (2017)

Recentemente, os MIPs já foram aplicados no campo da AMS, incluindo *Woonden-tip electrospray*, (HUANG *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2019) DESI (HIJAZI; BOTTARO, 2019) e também em PSI. Pereira *et al.*, (2018) relataram o revestimento de membranas de celulose triangular MIP e usou-os como substrato para análise de PSI de diuron e Ácido 2,4-diclorofenoxiacético em maçãs, bananas e uvas. Intensidades mais altas foram alcançadas para os íons gerados pela membrana revestida com MIP do que para os íons gerados pela membrana revestida com um polímero não imprimido (NIP). Tavares *et al.*, (2018) utilizaram MIP-PSI para identificação e quantificação de cocaína no fluido oral. A intensidade do íon cocaína aumentou três vezes usando MIP-PSI em comparação com PSI. Todos os estudos acima demonstraram a viabilidade das técnicas AMS combinadas com MIP para a extração e análise direta de compostos alvo.

Portanto, neste capítulo será abordado o uso do MIP como recobrimento do papel utilizado em PSI em uma abordagem direcionada na análise de metabólitos biomarcadores urinários. A análise de amostras de urina é vantajosa em relação ao plasma, tanto porque a meia-vida biológica é maior, como porque a sua amostragem é menos invasiva. (NACCARATO *et al.*, 2014) Além disso, a urina pode conter informações não apenas do rim e do trato urinário, mas

também de órgãos mais distantes, via plasma obtido por filtração glomerular. (DECRAMER *et al.*, 2008)

Os metabólitos biomarcadores selecionados para este estudo foram a dopamina (DA), o ácido butírico (BA) e a sarcosina (SA). A deficiência de DA está associada com movimento e transtorno neuropsiquiátrico, como a doença de Parkinson, doença de Alzheimer e depressão. (FAIVRE *et al.*, 2019; MEDER *et al.*, 2019) A SA é um biomarcador do câncer de próstata. (HU *et al.*, 2019; JORNET-MARTÍNEZ *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2018) Os níveis urinários de BA no organismo podem indicar coinfeção de bactérias em pacientes com AIDS. (IMAI *et al.*, 2012; KENICHI; KUNIYASU, 2013; STEIN *et al.*, 1997)

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais, Padrões Analíticos e Solventes

O metanol grau HPLC foi adquirido da J. T. Baker (*Phillipsburg*, EUA) e a acetona grau analítico da Scharlab S. L. (*Sentmenat*, Espanha). Para a síntese do MIP, padrão analítico da glicina foi utilizado como molécula molde na análise da sarcosina e ácido butírico e padrão analítico da epinefrina foi utilizado como molécula molde na análise da dopamina. Ainda na síntese do MIP, o ácido metacrílico foi utilizado como monômero funcional, o etileno glicol dimetacrilato como agente de entrecruzamento (todos comprados da Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e a benzofenona como fotoiniciadora (adquirida da Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, Brasil). As membranas de celulose com poros de 0,45 μm , diâmetro de 47 mm e espessura de 160 μm foram adquiridas da Agilent (Santa Clara, EUA).

Para a síntese de urina sintética foram utilizados: 3,333 g L⁻¹ de ureia (CH₄N₂O), 0,050 g L⁻¹ de ácido úrico (C₅H₄N₄O₃), 0,177 g L⁻¹ de creatinina (C₄H₇N₃O), 1,00 g L⁻¹ de cloreto (Cl⁻), 1,00 g L⁻¹ de potássio (K⁺), 0,025 g L⁻¹ de cálcio (Ca⁺), 0,0167 g L⁻¹ de magnésio (Mg²⁺), 0,025 g L⁻¹ de fosfato (PO₄³⁻), 0,300 g L⁻¹ de sulfato (SO₄²⁻), 0,167 g L⁻¹ de sódio (Na⁺), 0,025 g de L⁻¹ amônio (NH₄⁺) e 0,167 g L⁻¹ de carbonato (CO₃²⁻). (DBIRA *et al.*, 2015) A amostra de urina humana foi doada por um voluntário (aceito pelo comitê de ética regional da Universidade Federal de Goiás, nº 056/13). O voluntário que forneceu a amostra deu seu consentimento prévio informado.

2.2.2 Síntese da membrana revestida com MIP

A síntese da membrana revestida com MIP baseou-se em Sergeyeva *et al.*, (2001). A membrana de celulose foi lavada com metanol num aparelho soxhlet durante 4 h e seca à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram embebidas com solução 150 mM de benzofenona em acetona durante 5 min e secas à temperatura ambiente. As membranas triangulares foram transferidas para placas de Petri contendo solução de metanol com 10 mM de glicina ou epinefrina, 50 mM de ácido metacrílico e 150 mM de dimetacrilato de etileno glicol. Estas membranas em solução foram expostas à irradiação UV

(Ultravioleta) com comprimento de onda de 254 nm durante 15 min. Finalmente, os polímeros não inseridos, iniciadores residuais e a molécula molde foram extraídos da membrana com metanol por extração de soxhlet por 5 horas. Posteriormente, as membranas foram cortadas em vários triângulos equiláteros com aproximadamente 1 cm de lado cada. A **Figura 2.2** apresenta o fluxograma com as etapas de preparo da membrana MIP. Um polímero não-impresso (NIP) foi sintetizado de forma semelhante ao MIP, mas sem a molécula molde. O tempo total de preparo do MIP é de aproximadamente 10 horas.

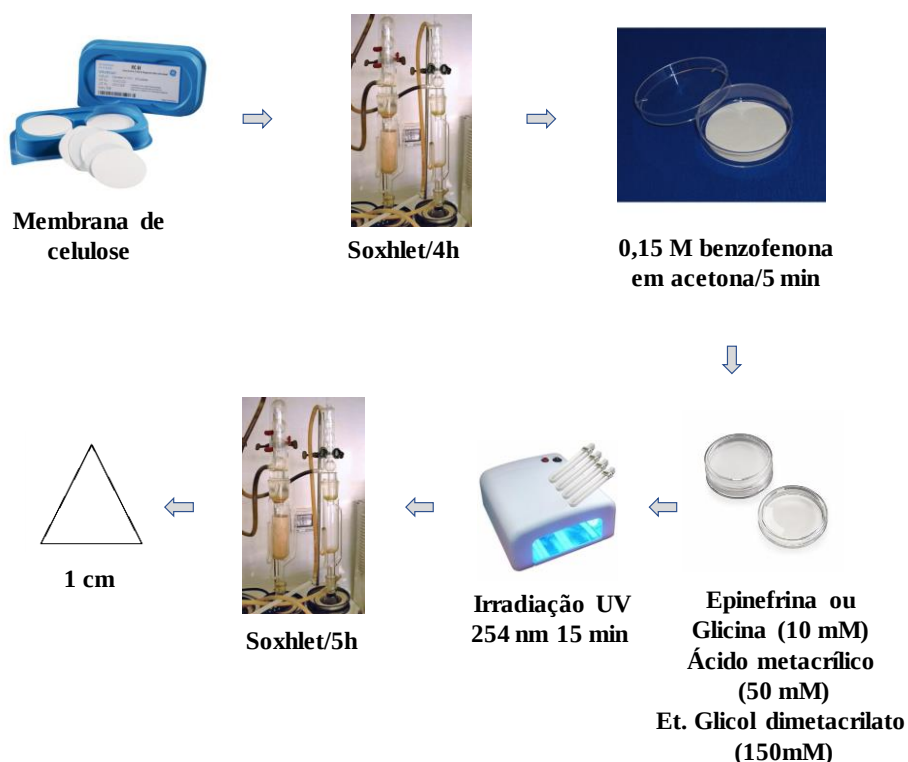


Figura 2.2. Fluxograma com as etapas da síntese da membrana revestida com MIP.

2.2.3 Análise da urina por MIP-CPS

Primeiramente, a técnica foi testada e avaliada em relação as figuras de mérito em urina sintética e posteriormente foi aplicada na análise de urina real. Para análises em urina sintética, a membrana MIP foi mergulhada em um Becker contendo 2 mL de urina sintética com o analito alvo (SA, BA ou DA) e nas análises em urina real a membrana MIP foi mergulhada em um Becker contendo 2 mL de urina real. Posteriormente, foram submetidas a agitação por 5 minutos para captura do analito, depois foi removida e deixada secar. Em seguida, a

membrana MIP foi lavada com água deionizada por 1 min para remover o componente da matriz.

Depois de secar a temperatura ambiente, a membrana MIP foi fixada por um grampo de metal e uma alta tensão foi aplicada. A membrana foi colocada a cerca de 4 mm da entrada de MS. Foi utilizado um volume de 15 μ L de ácido metanol (0,1% de ácido fórmico) como solvente de pulverização para análises no modo de ionização positiva (análise da DA e da SA), e metanol básico (0,1% de hidróxido de amônio) para modo de ionização negativa (análise do BA), como mostra a **Figura 2.3**. O tempo de análise do MIP-CPS é de aproximadamente 1 minuto. Os espectros de massas foram obtidos usando um espectrômetro de massa *Thermo Scientific Q Exactive Hybrid Orbitrap*. Outros parâmetros experimentais utilizados foram: voltagem do spray: 3,5 kV; Temperatura do capilar: 275 °C; S-lente Nível de RF: 50%; Média de 3 micro-scans para cada espectro; Resolução de 70.000; MS/MS: HCD (*Higher Energy Collisional Dissociation*), energia de colisão: 45 eV.

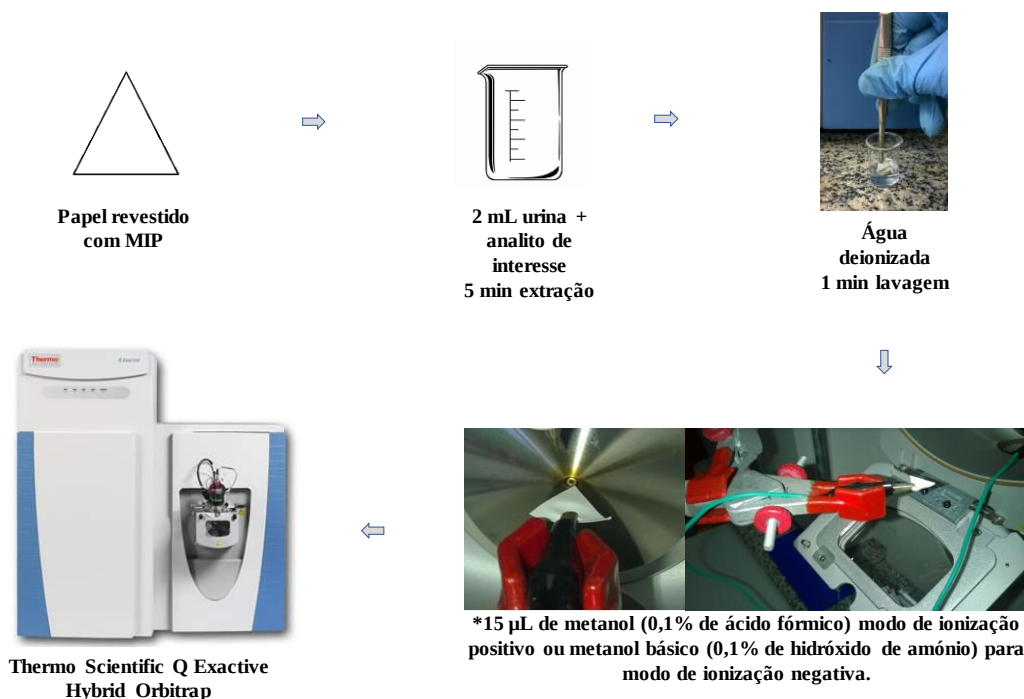


Figura 2.3. Esquema ilustrativo das análises de urina por MIP-CPS. FONTE: Adaptada de Silva, (2018)

2.2.4 Figuras de mérito da técnica MIP-CPS

Para o desempenho analítico da técnica proposta, foram realizadas curvas analíticas e calculados LOD (limite de detecção), LOQ (limite de quantificação), precisão, exatidão e recuperação. Para avaliar a eficiência qualitativa e o efeito de captura específica do analito da membrana MIP, comparou-se a intensidade de sinal dos analitos da membrana MIP com os sinais obtidos utilizando o NIP (membrana sem a molécula molde).

O LOD foi determinado através da equação $S_{\text{blank}} + 3 \times \sigma_{\text{blank}}$ e o LOQ foi calculado por $S_{\text{blank}} + 10 \times \sigma_{\text{blank}}$, onde S_{blank} é a média do sinal do branco, e σ_{blank} é o desvio padrão de 10 replicatas do branco. (DAMON *et al.*, 2016) Os testes de exatidão e precisão foram realizados intra-dia ($n = 5$) e inter-dia ($n = 3$) utilizando concentrações de 20, 900 e 1800 mg L⁻¹ para DA e 12, 56 e 100 mg L⁻¹ para BA e SA. A exatidão foi obtida pela fórmula $E = [(AC - NC)/NC] \times 100$, onde E é o erro relativo, expresso em unidades percentuais, AC é a concentração analisada e NC é a concentração nominal. A precisão foi calculada pela seguinte equação: $CV = (SD/AC) \times 100$, em que CV é o coeficiente de variação, expresso em unidades percentuais, e SD é o desvio padrão. O teste de recuperação foi realizado fortificando as amostras com as mesmas concentrações da exatidão e precisão, e foi obtida pela equação $[(AC - OC)/NC] \times 100$, onde OC é a concentração original. (ANVISA, 2003, 2012)

Na construção das curvas analíticas, os padrões analíticos foram dissolvidos na urina sintética para obter as concentrações 10, 250, 500, 700, 1000, 1250, 1500 e 2000 µg L⁻¹ de DA, 12, 23, 34, 56, 67, 78, 90 e 100 µg L⁻¹ de BA e 12, 23, 34, 45, 56, 67, 90 e 100 µg L⁻¹ de SA. A curva analítica da DA foi medida a partir das intensidades dos íons do produto no processo de fragmentação característica da DA (m/z 154 → 137 e m/z 154 → 119) (MS/MS) e as curvas de calibração da SA e do BA foram construídas utilizando a intensidade do íon característico de cada um (SA m/z 90 e BA m/z 87), pois devido a faixa de massa do equipamento (limitada a m/z 50), não foi possível obter os fragmentos destes analitos. As análises foram realizadas em triplicata.

Depois que a técnica MIP-CPS foi testada e avaliada em urina sintética, a técnica foi aplicada para quantificação de DA em urina real. Para isso a urina foi diluída 60 vezes.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente trabalho, utilizou-se como molécula molde a glicina na síntese dos MIPs para análises de SA e BA e epinefrina na síntese dos MIPs para análises de DA, pois são moléculas da mesma classe. Rotineiramente, em experimentos de MIP, o composto alvo é escolhido como molécula modelo. Aqui, usamos uma abordagem diferente e menos comum, usada principalmente quando o objetivo é quantificar analitos em baixas concentrações. A não utilização da mesma molécula como molde e analito evita resultados falso-positivos causados por remanescentes do molde no MIP. Tal abordagem substitui o composto alvo por uma molécula estruturalmente relacionada, que é, na medida do possível, semelhante ao analito em termos de tamanho e grupos químicos. (SPELTINI *et al.*, 2017) (**Figura 2.4**)

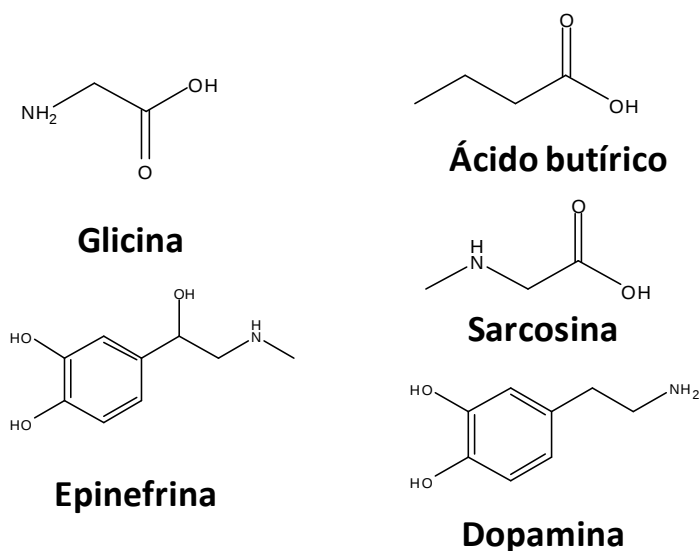


Figura 2.4. Estrutura molecular dos moldes (glicina e epinefrina) e analitos alvo (ácido butírico, sarcosina e dopamina).

Para comparar a seletividade do MIP-CPS com o NIP-CPS, foram realizadas análises de ambos, separadamente. A resposta de cada analito avaliado com MIP e NIP estão ilustrados na **Figura 2.5**, que apresenta os gráficos de barras das intensidades de sinal obtidos a partir dos espectros de massas (**Figura 2.6**) de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de DA, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de BA e SA em urina artificial. Como esperado, os analitos são principalmente extraídos e ionizados pelo MIP-CPS, devido aos seus locais de ligação específicos. No NIP-CPS ocorre interações inespecíficas do polímero ou mesmo da membrana de celulose

com os analitos, por isso apresenta baixa intensidade. Pode-se observar que em todos os casos o MIP-CPS aumenta a intensidade de cada sinal de analito com pelo menos uma ordem de grandeza a mais do que NIP-CPS. Para SA, note que nenhuma intensidade foi identificada em NIP-CPS.

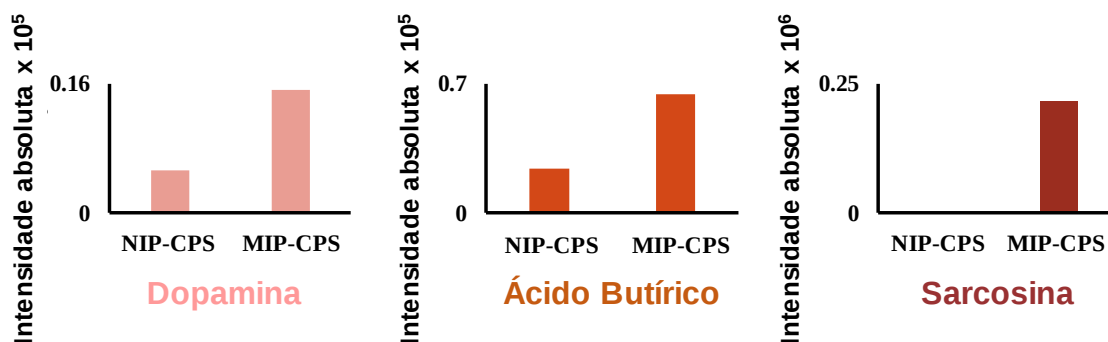


Figura 2.5. Gráfico de barras das intensidades de sinal para DA (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$), BA e SA (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) em urina artificial por MIP-CPS e NIP-CPS. (n=3)

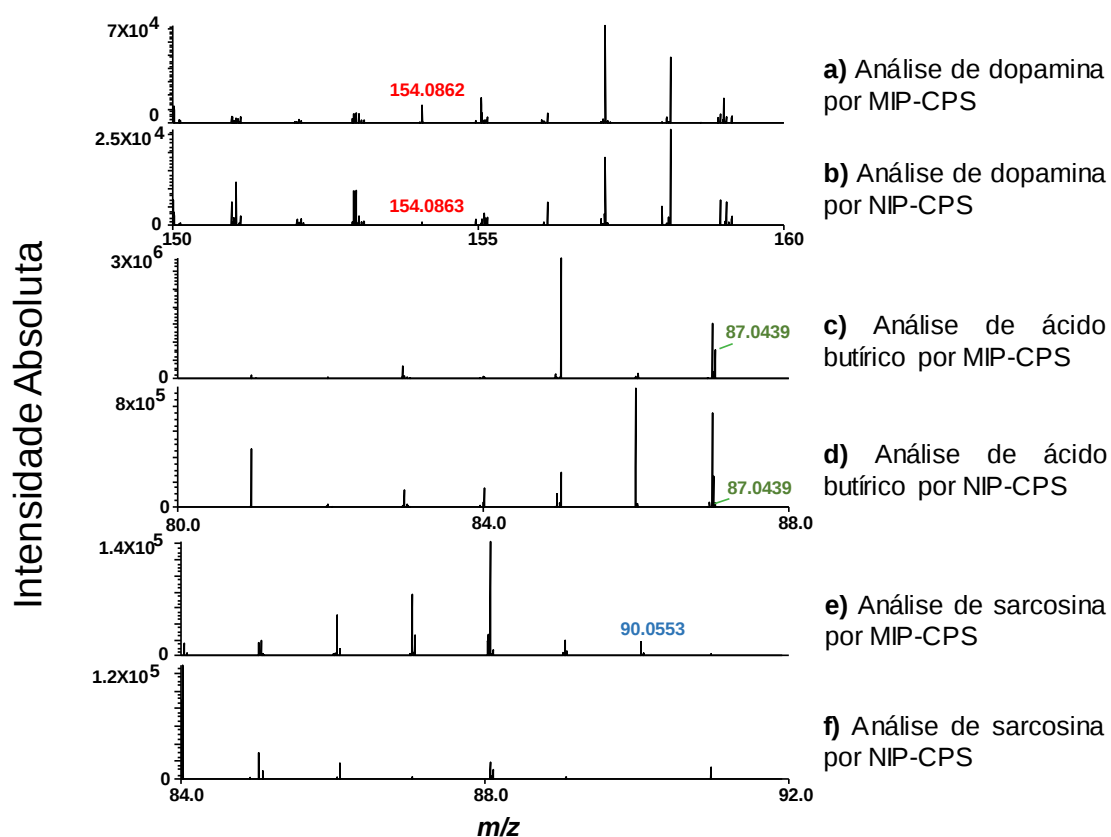


Figura 2.6. Espectro de massas para dopamina (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) a partir de urina artificial usando (a) MIP-CPS e (b) NIP-CPS, ambos no modo positivo. Espectro de massas para o ácido butírico (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) da urina artificial usando (c) MIP-CPS e (d) NIP-CPS, ambos no modo negativo. Espectros de massas para sarcosina (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) a partir de urina artificial usando (e) MIP-CPS e (f) NIP-CPS, ambos no modo positivo. A dopamina foi

detectada como $[M+H]^+$ de m/z 154, o ácido butírico como $[M-H]^-$ de m/z 87 e sarcosina como $[M+H]^+$ de m/z 90.

Normalmente, análises quantitativas por MS são realizadas utilizando padrão interno (IS), geralmente compostos deuterados, para evitar erros que possam ocorrer devido à supressão de íons causada por componentes da matriz. Entretanto, os IS podem ser muito caros ou indisponíveis. Esforços para encontrar resultados analíticos satisfatórios sem o uso de IS foram demonstrados em vários trabalhos usando técnicas de MS e MIP (PEREIRA *et al.*, 2018; SORRIBES-SORIANO *et al.*, 2018; TAVARES *et al.*, 2018). Com isso, o presente trabalho pode contribuir com as tentativas de evitar o uso de padrões internos em determinadas análises.

As curvas analíticas de BA e SA variaram de 12-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e DA de 10-2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e foram plotadas como concentração versus intensidade do sinal. Esses intervalos foram escolhidos de acordo com a concentração de cada analito presente no corpo humano. A linearidade (R^2) para todos os analitos estudados foi de $R^2 > 0,99$. O LOD e LOQ para DA foram 0,24 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$; para BA foram 0,5 pg L^{-1} e 1,8 pg L^{-1} e para SA foram 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, como mostra a **Figura 2.7**. Os resultados foram na ordem ppb (parte por bilhão) para DA e SA e em ppt (parte por trilhão) para BA, mostrando que o método estudado juntamente com o equipamento utilizado apresentou alta sensibilidade. Hu *et al.*, (2019) criaram um biosensor de sarcosina para analisar urina e obtiveram um LOD de 4,4 $\mu\text{g L}^{-1}$. Liu *et al.*, (2018) utilizaram um biosensor de dopamina em análises de plasma e obtiveram LOD de 2,45 $\mu\text{g L}^{-1}$. Zhang *et al.*, (2012) usaram MIP acoplado com eletroforese para analisar catecolaminas na urina e obtiveram LOD na ordem de 1,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para dopamina. Desta forma, os resultados da análise usando o MIP-CPS mostrou desempenho superior e trouxe um recurso de alta sensibilidade para espectrometria de massas.

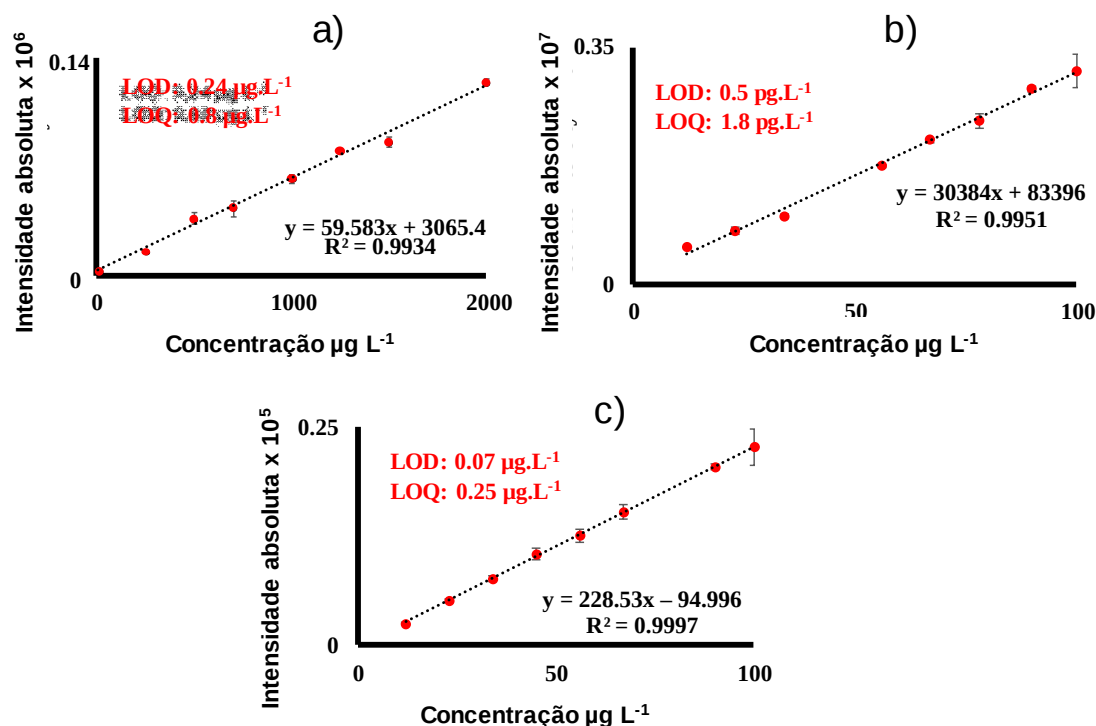


Figura 2.7. Curvas analíticas para a) DA, b) BA e c) SA da urina artificial por MIP-CPS. (n=3).

A precisão, exatidão e recuperação foram avaliadas através de três níveis de concentração: baixo, médio e alto. Os dados das figuras de mérito para a MIP-CPS estão resumidos na **Tabela 2.1**. Para DA, a precisão inter e entre-dias variou de 1,2 a 14,8 % e a exatidão variou de 0,6 a 14,7 %. Para BA, a precisão inter e entre-dias variou de 1,0 a 8,4% e a exatidão variou de -2,1 a 15%. Para SA, a precisão inter e entre-dias variou de 4,2 a 8,1% e a exatidão variou de 0,8 a 5,3%. Os maiores valores de precisão e exatidão foram obtidos para as concentrações mais baixas, onde valores de até 15% são esperados, segundo a ANVISA, (2017).

Ainda segundo a ANVISA, (2017), são desejáveis valores de recuperação próximos a 100%, porém valores entre 80 e 120% também são aceitáveis. Neste trabalho foram obtidas recuperações entre 95,6 a 115%. Estes resultados foram similares aos relatados por Peñuela-pinto *et al.*, (2017) em seu estudo da determinação seletiva de clenbuterol em urina por polímero molecularmente impresso por espectrometria de massas, onde obtiveram valores de recuperação próximos de 100% e valores de precisão inferiores a 15%. Corroborando com os

valores obtidos pela aplicação do MIP-CPS em uma matriz complexa como a urina.

Tabela 2.1. Precisão, exatidão e recuperação para DA, BA, SA em urina artificial usando MIP-CPS.

		<i>Entre-dias (n=3)</i>			<i>Inter-dias (n=5)</i>		
Dopamina	Concentração nominal (ug L ⁻¹)	20	900	1800	20	900	1800
	Concentração analisada (ug L ⁻¹)	21,1	1019,1	2029,1	23,9	935,7	1810,0
	Precisão (CV%)	1,2	4,2	3,4	14,8	8,1	5,8
	Exatidão (E%)	14,7	2,0	1,3	14,6	4,0	0,6
	Recuperação %	114,7	102,0	101,3	114,6	104,0	100,6
Ácido Butírico	Concentração nominal (ug L ⁻¹)	12	56	100	12	56	100
	Concentração analisada (ug L ⁻¹)	14,6	53,9	97,9	15,4	54,5	97,9
	Precisão (CV%)	8,4	3,7	5,9	1,0	2,3	7,1
	Exatidão (E%)	15,0	3,7	2,7	13,5	-2,6	-2,1
	Recuperação %	115,0	103,7	102,7	113,5	97,4	97,9
Sarcosina	Concentração nominal (ug L ⁻¹)	12	56	100	12	56	100
	Concentração analisada (ug L ⁻¹)	11,4	57,9	104,4	11,5	56,5	100,8
	Precisão (CV%)	7,6	4,6	5,2	4,2	5,6	8,1
	Exatidão (E%)	5,3	-3,4	-4,4	-4,0	0,8	0,8
	Recuperação %	105,3	96,6	95,6	96	100,8	100,8

Para obter uma melhor compreensão do desempenho do MIP-CPS, a sua capacidade de ionização foi comparada com o paper spray tradicional e ESI na determinação da dopamina em uma amostra real de urina. A **Figura 2.8** ilustra a abundância de íons da dopamina [M+H]⁺ de *m/z* 154 e a abundância de íons de sua fragmentação: *m/z* 154 → 137 (perda de NH₃) e *m/z* 154 → 119 (perda de NH₃+H₂O). Nota-se que o MIP-CPS fornece a maior magnitude para a abundância de íons da dopamina e suas transições, seguidas pelo papel tradicional. A detecção da dopamina no paper spray tradicional se deve a interação com o papel. A dopamina não foi detectada usando ESI. O MIP-CPS extrai eficientemente a dopamina da urina eliminando íons indesejados que podem causar supressão iônica.

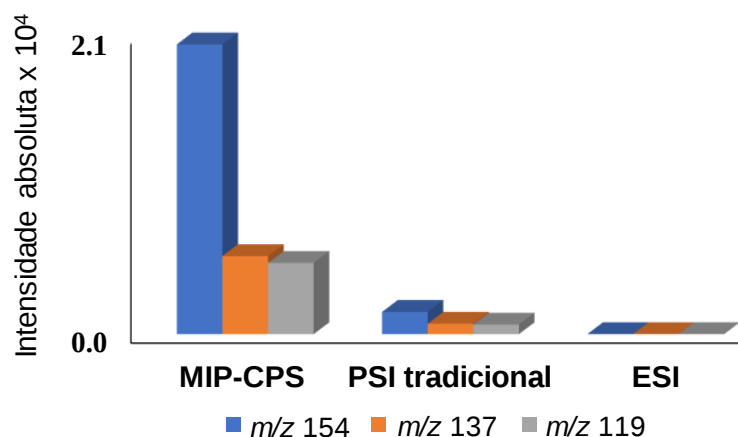


Figura 2.8. Intensidades de abundância de íons obtidas da DA e suas transições SRM usando MIP-CPS, papel tradicional e ESI na urina humana real.

De forma rotineira, a dopamina na urina é medida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica ou HPLC acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Os dois métodos requerem extração de Catecolaminas (dopamina, epinefrina, norepinefrina etc.) antes da análise. Em tais ensaios, a análise é realizada utilizando a urina coletada por um período de 24 h, e a faixa de concentração considerada normal de dopamina é de 51-645 $\mu\text{g}/24 \text{ h}$. (HASANZADEH; SHADJOU; GUARDIA, 2017) O método MIP-CPS foi aplicado para determinar a quantidade de dopamina em uma amostra de urina humana real e encontrou-se 31,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (desvio padrão 5,98%, $n=3$). Na aplicação do método MIP-CPS não se utilizou a urina coletada durante 24 h e mesmo utilizando uma menor quantidade de amostra, o método foi capaz de quantificar a dopamina.

2.4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Em resumo, esse capítulo apresentou a combinação de MIP com PS-MS para obter um método interessante e promissor para análise de metabolitos em uma mistura complexa, como a urina, por espectrometria de massas, chamado MIP-CPS. Avaliou-se o desempenho analítico do método proposto, através da construção de curvas analíticas de três metabolitos (dopamina, ácido butírico e sarcosina), o qual apresentou parâmetros analíticos dentro do estabelecido pela ANVISA, possibilitando o uso do método para detectar e quantificar metabólitos em urina com boa especificidade, confiabilidade e precisão.

O método foi aplicado na análise de dopamina em uma amostra de urina real e foi capaz de quantificá-la. O MIP-CPS facilitaria as análises de metabolitos em urina pois permite que o analito seja extraído no local de origem e enviado, de forma simples e barata, visto que é um papel, para o laboratório que irá realizar a análise. Permitindo, com isso, que amostras de lugares longínquos e sem acesso à tecnologia possam ser analisadas.

A característica proeminente do MIP-CPS é a de extrair uma molécula alvo de uma matriz complexa, como urina, e gerar íons de maneira simples e rápida, sem perder sensibilidade. Enquanto análises por HPLC levam de 20 a 50 minutos, gastam solventes orgânicos e necessitam de preparo de amostras, as análises por MIP-CPS fornecem uma resposta analítica confiável em 1 minuto, não necessitando de preparo de amostras.

Um artigo contendo parte dos resultados apresentados neste Capítulo foi publicado (DOI: 10.1039/c7ay01648d) no periódico *Analytical Methods*.

Como perspectivas futuras, o MIP-CPS deve ser testado em relação a sua reutilização, o que baratearia ainda mais a técnica. Também, pode-se testar o tempo máximo entre a extração do analito na matriz e a análise. Isso seria interessante pois permitiria que lugares onde não possuem espectrômetros de massas, enviasse a membrana já com o analito extraído para laboratórios capacitados, porém de forma simples, já que é um papel que não ocupa muito volume. Além disso, pode-se testar a aplicação da técnica na análise de outros metabólitos e em outras matrizes, como o plasma, por exemplo.

CAPÍTULO II

Abordagem lipidômica não direcionada por *Paper Spray Ionization* (PSI) para encontrar biomarcadores para o câncer do colo do útero

3 CAPÍTULO II - Abordagem lipidômica não direcionada por *Paper Spray Ionization* (PSI) para encontrar biomarcadores para o câncer do colo do útero

3.1 INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero (câncer cervical) é o quarto câncer mais frequentemente diagnosticado entre mulheres no mundo, o que torna necessário o rastreamento cervical adequado. (VU *et al.*, 2018) O principal objetivo do rastreamento cervical é reduzir a incidência de câncer cervical, reduzindo a prevalência de doenças pré-invasivas que se tornarão câncer invasivo do colo do útero. (COX; SNEYD, 2018)

O protocolo de rastreamento ideal para o câncer do colo do útero identifica lesões cervicais em um momento em que o tratamento é potencialmente curativo, limitando o potencial de sobretratamento. Historicamente, o teste com um exame de Papanicolaou, mais tecnicamente referido como citologia, tem sido o método de rastreio primário mais difundido e eficaz. Os programas de triagem citológica são a razão pela qual os locais com altos recursos tiveram reduções significativas na incidência e na mortalidade por câncer do colo do útero. (JEMAL; WARD; THUN, 2010) No entanto, evidências crescentes sugerem que a citologia não é um método perfeito, já que esse método é muito subjetivo e sua sensibilidade a lesões pré-cancerosas de alto grau está entre 51% e 53%. (CUZICK *et al.*, 2006; RIZZO; FELDMAN, 2018)

Nesse contexto, novas metodologias que possam complementar ou até melhorar os protocolos atuais são muito bem-vindas na pesquisa clínica e biomédica. Com o objetivo de possibilitar o diagnóstico precoce do câncer, técnicas rápidas, sensíveis e de baixo custo estão emergindo como promissoras alternativas para a análise de fluidos biológicos como soro/plasma e urina, que podem ser facilmente obtidos de pacientes e refletem a condição fisiopatológica dos indivíduos. Uma vez que *Paper Spray ionization* - PSI é uma técnica adequada para analisar amostras complexas, esta técnica poderia ser usada como um método alternativo de triagem para classificar lesões cancerígenas do

colo do útero a partir de biofluidos, como o plasma sanguíneo. Uma maneira de realizar essa triagem é avaliar o perfil lipídico plasmático. (GILES *et al.*, 2018)

Os lipídios são os metabólitos mais abundantes na circulação e são partes integrantes da estrutura e função das células. Suas alterações estão relacionadas à gravidade e desfecho das doenças. Os avanços tecnológicos nas modernas plataformas lipidômicas baseadas em MS permitiram a identificação e quantificação de uma grande variedade de lipídios. Esses avanços fornecem oportunidades para expandir as capacidades de diagnóstico por meio de esforços de descoberta de biomarcadores, identificar novas alterações nos caminhos envolvidos e, potencialmente, identificar alvos passíveis de intervenção. (AFSHINNIA *et al.*, 2018)

Considerando a complexidade dos dados e o excesso de variáveis que podem ser extraídas na análise lipídica pela MS, é necessário o uso de análise multivariada dos dados. Isto pode ser realizado por uma combinação de seleção de características, onde apenas características espectrais quimicamente relevantes do espectro MS são selecionadas, e classificação multivariada, onde as amostras são atribuídas a grupos pré-estabelecidos com base em suas características químicas. Um algoritmo popular para seleção e classificação de características é o algoritmo *Successive projections algorithm linear discriminant analysis* (SPA-LDA), onde o espectro MS original é reduzido a menos características selecionadas seguidas de um classificador discriminante linear aplicado a essas características.

As principais vantagens são que o SPA-LDA reduz a multi-colinearidade de dados, eliminando informações redundantes do espectro MS, e é um método determinístico, isto é, sempre fornece o mesmo resultado independentemente de quantas vezes o algoritmo é executado. A principal desvantagem do SPA-LDA é seu tempo de processamento, em particular para conjuntos de dados maiores, como dados baseados em MS. Para superar este problema, o SPA-LDA pode ser aplicado em pequenos intervalos de valores m/z , sendo, portanto, chamado de *interval-successive projections algorithm linear discriminant analysis* (iSPA-LDA). (DE ARAÚJO GOMES *et al.*, 2013).

Neste capítulo, o PSI foi utilizado juntamente com iSPA-LDA para detectar biomarcadores de lipídios do câncer cervical usando lipidômica do plasma sanguíneo sem pré-tratamento.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais, Padrões Analíticos e Solventes

Metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) grau HPLC e ácido fórmico foram adquiridos da J. T. Baker (New Jersey, USA). Papel filtro Whatman #1 (poros de 11 mm) foram adquiridos de Whatman International Ltd. (Maidstone, England).

3.2.2 Coleta e preparo das amostras

Foram adquiridas amostras de sangue de mulheres voluntárias, residentes no estado do Rio Grande do Norte (Brasil), que frequentam a Maternidade Escola Januário Cicco (MEJC) do Sistema Único de Saúde para consultas de triagem de patologia cervical e serviços de referência para colposcopia no período de julho de 2014 a março de 2016. O Comitê de Ética Institucional Pesquisa Humana do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) (Brasil) aprovou este estudo (protocolo nº 526/11) e obteve-se consentimento de todas as voluntárias. Além disso, todos os métodos neste estudo foram realizados de acordo com as diretrizes aprovadas. Vale mencionar que este trabalho contou com a colaboração do Prof. Dr. Kássio M. G. Lima, do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Um total de 86 amostras de sangue de diferentes mulheres foram coletadas por punção venosa em tubos contendo o anticoagulante EDTA e duas horas após a coleta de sangue, o plasma foi separado por gradiente de densidade e alíquotas do plasma foram transferidas para tubos criogênicos e armazenadas a -80 ° C até a análise.

3.2.3 Análise dos plasmas por *Paper Spray Ionization*

Um volume de 10 µL de amostra de plasma foi adicionado ao papel filtro cortado em formato triangular (lados de 1 cm) sem qualquer pré-tratamento da amostra (**Figura 3.1**). O papel triangular foi posicionado a cerca de 4 mm da entrada do MS. Então, uma alta voltagem de 3,5 kV foi aplicada na base de cada papel triangular previamente molhado com 20 µL de solvente de spray com 0,1% de ácido fórmico (**Figura 3.2**).



Figura 3.1. Papel filtro cortado triangularmente com a amostra aplicada, pronto para a análise.

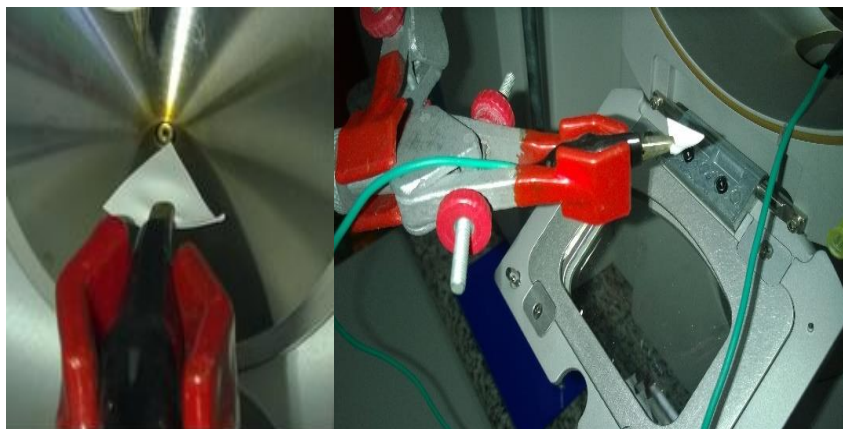


Figura 3.2. Análise por *Paper Spray Ionization*. FONTE: (SILVA, 2018)

Foram testados diferentes tempos de secagem do plasma adicionado ao papel: 0 min, 5 min, 30 min, 1 h e 6 h. Os seguintes sistemas de solventes de spray foram avaliados: MeOH; MeOH/H₂O (50:50); MeOH/H₂O (70:30); ACN; ACN/H₂O (50:50); e ACN/H₂O (70:30).

Após a seleção do melhor tempo de secagem e do solvente de spray, as análises foram realizadas em modo de ionização positiva utilizando o espectrômetro de massas LCQ XL[™] *Ion Trap* (Thermo Scientific, San Jose, EUA). Outros parâmetros utilizados foram: voltagem do spray: 3,5 kV; Temperatura do capilar: 275 °C; S-lente Nível de RF: 50%; faixa de varredura: 100-1000 *m/z*.

3.2.4 Análise computacional dos dados

Os espectros de massas resultante das análises foram transformados em arquivos .txt usando o pacote de *software Xcalibur Analysis* (versão 2.0, *Service Release 2, Thermo Electron Corporation*). A análise dos dados foi realizada no ambiente MATLAB® versão R2014b (*MathWorks Inc., Natick, EUA*) onde os dados dos espectros foram corrigidos por uma rotina feita em laboratório para garantir que todos os espectros de massas tivessem o mesmo tamanho e que todos os picos estivessem alinhados. Posteriormente, a normalização foi aplicada para que a soma dos quadrados de cada linha (espectro) fosse igual a 1.

Antes da modelagem, as amostras foram divididas em dois grupos: Treinamento (~70%, n= 60 amostras [35 NILM e 25 SIL] e Teste (~ 30%, n = 26 amostras [14 NILM e 12 SIL]) (**Figura 3.3**) utilizando o algoritmo de seleção de amostras de Kennard-Stone (KENNARD; STONE, 1969), que seleciona as amostras de maior variabilidade para esse conjunto de dados para serem as de treinamento. Onde NILM é negativo para lesão intraepitelial ou malignidade (controles saudáveis) e SIL é lesão intraepitelial escamosa (amostra cancerosa). A quantidade de amostras de treinamento é maior que as de teste para contemplar a maior variabilidade dos dados. Os dados de treinamento foram utilizados para construção e otimização de modelos, enquanto os dados de teste para avaliação final do modelo.

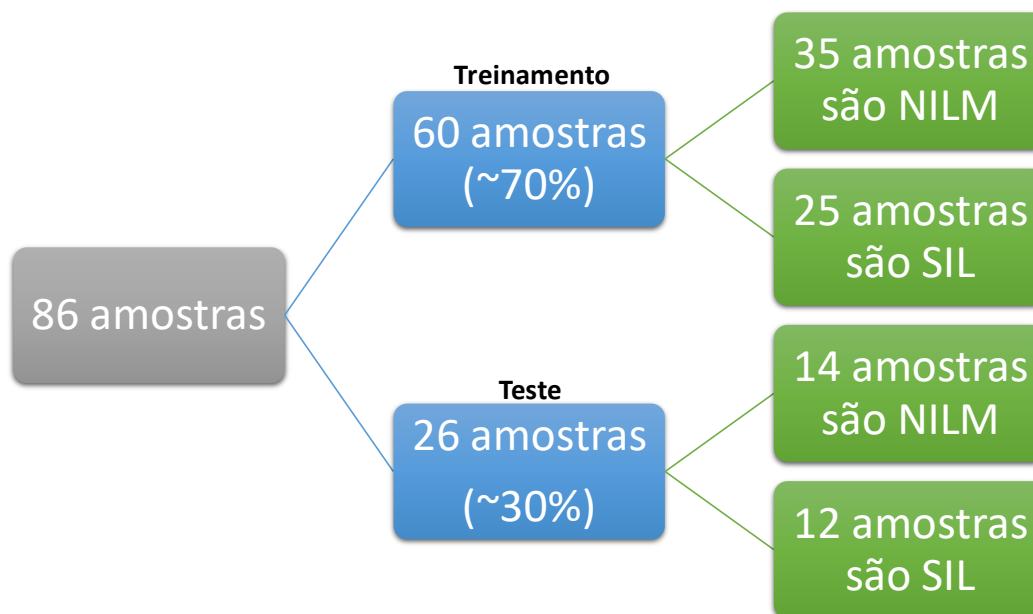


Figura 3.3. Fluxograma da divisão das amostras em grupo de treinamento e de teste, onde NILM é negativo para lesão intraepitelial ou malignidade (controles saudáveis) e SIL é lesão intraepitelial escamosa (amostra cancerosa).

Cada espectro tinha um tamanho final de 7.040 m/z variando de 100,20000 a 999,90000 m/z . O iSPA-LDA foi aplicado em intervalos de 7 janelas, onde os intervalos de 1 a 6 tiveram tamanhos de 1006 m/z , enquanto o intervalo 7 teve tamanho de 1004 m/z . No iSPA-LDA, um algoritmo de projeções sucessivas (SPA) é aplicado ao conjunto de treinamento, reduzindo o intervalo de dados pré-processados a um pequeno número de variáveis ortogonais (ou seja, valores m/z). Isto é feito minimizando a multi-colinearidade dos dados de acordo com o mínimo do risco médio de erro de classificação (COSTA *et al.*, 2016).

O desempenho do modelo foi avaliado por meio da Exatidão (número total de amostras corretamente classificadas considerando verdadeiros e falsos negativos); Sensibilidade (proporção de testes positivos corretamente identificados), Especificidade (proporção de testes negativos corretamente identificados), Valor Preditivo Positivo (VPP, número de testes positivos que são verdadeiros positivos); Valor Preditivo Negativo (VPN, número de testes negativos que são verdadeiros negativos); e Precisão (capacidade do modelo de classificação de não incluir amostras de outras classes na classe considerada)

(BALLABIO; CONSONNI, 2013; MORAIS; LIMA, 2017). Esses parâmetros são calculados da seguinte maneira:

$$\text{Exatidão}(\%) = \left(\frac{TP+TN}{TP+FP+TN+FN} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Sensibilidade}(\%) = \left(\frac{TP}{TP+FN} \right) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Especificidade}(\%) = \left(\frac{TN}{TN+FP} \right) \times 100 \quad (3)$$

$$\text{VPP}(\%) = \left(\frac{TP}{TP+FP} \right) \times 100 \quad (4)$$

$$\text{VPN}(\%) = \left(\frac{TN}{TN+FN} \right) \times 100 \quad (5)$$

$$\text{Precisão}(\%) = \left(\frac{TP}{n} \right) \times 100 \quad (6)$$

onde TP significa verdadeiros positivos; TN para negativos verdadeiros; FP para falsos positivos; FN para falsos negativos; e n para o número total de amostras atribuídas à classe de interesse.

3.2.5 Identificação dos lipídios selecionados pelo modelo

Para identificar os lipídios selecionados pelo modelo nas amostras de plasma, empregou-se um espectrômetro de massas de alta resolução, o *Q Exactive™* (Thermo Scientific, San Jose, EUA). Os parâmetros utilizados foram: resolução: 140.000; voltagem do spray: 3,5 kV; temperatura do capilar: 275 C°; S-lente Nível de RF: 50%. As análises foram realizadas em triplicata.

As estruturas químicas das variáveis selecionadas pelo iSPA-LDA foram propostas com base no banco de dados LIPID MAPS® *Lipidomic Gateway* seguindo o seguinte caminho: 'Resources' → 'Tools' → 'Multiple Lipid Classes' → 'Search LMSD for curated and/or computationally-generated lipids'.

Para confirmar a identificação, foram realizados experimentos de MS/MS de cada lipídio utilizando o espectrômetro de massas micrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para avaliar as condições de análise de PSI, foram avaliados diferentes tempos de secagem do plasma no papel antes da análise de MS, incluindo 0, 5 min, 30 min, 1 h e 6 h. Observou-se que não houve diferença significativa no tempo de secagem, portanto O tempo 0 (aplicação de plasma e posterior análise de MS sem secagem) foi escolhido pois está diretamente ligado à necessidade de análises rápidas na triagem cervical, já que os analitos plasmáticos adequados são obtidos em segundos. Outro parâmetro PSI avaliado foi o solvente de pulverização. Diferentes sistemas de solventes foram testados, tais como MeOH, MeOH/H₂O (50:50), MeOH/H₂O (70:30), ACN, ACN/H₂O (50:50) e ACN/H₂O (70:30). O solvente de pulverização de MeOH forneceu íons no modo positivo com intensidades mais elevadas do que os outros sistemas de solvente (**Figura 3.4**).

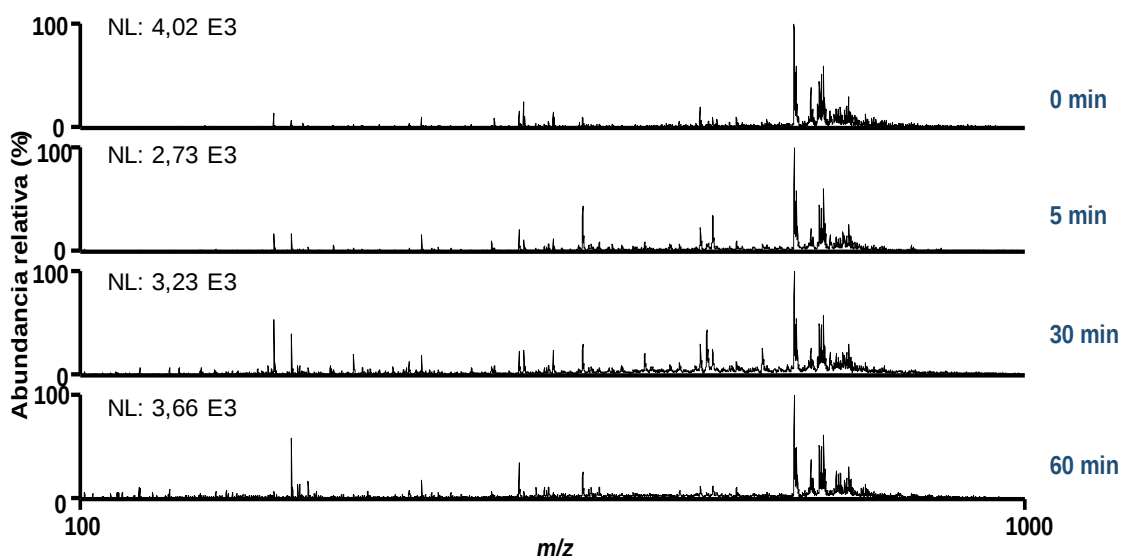


Figura 3.4. Espectros de massas da avaliação do tempo de secagem da amostra utilizando o metanol como solvente de spray analisando plasma por PSI(+).

Após a avaliação, PSI foi empregado para discriminar as 37 amostras de câncer e 49 amostras de plasma saudável. A **Figura 3.5a** mostra um espectro de massas de uma amostra cancerosa e a **Figura 3.5b** mostra um espectro de massas de uma amostra saudável, ambos utilizando PSI. Na região de massa alta ($m/z > 500$), os espectros de massas foram dominados por lipídios tanto nas amostras cancerígenas quanto nas saudáveis.

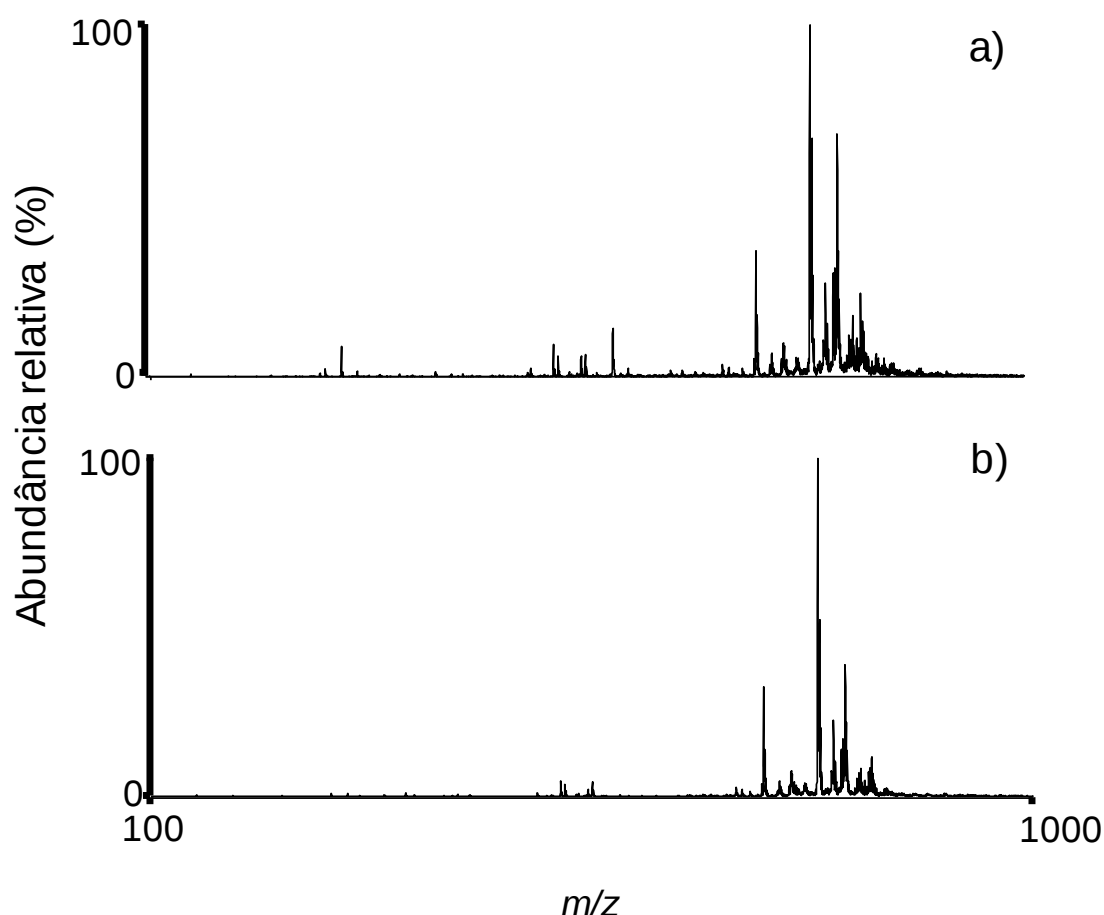


Figura 3.5. Espectros de massas de PSI (+) de (a) amostra de plasma com câncer e (b) amostra de plasma saudável.

Todas as 86 amostras apresentaram espectro de massas com perfis lipídicos semelhantes, por isso foi necessária aplicar uma análise computacional dos dados para encontrar marcadores lipídicos que diferenciem as amostras com câncer das amostras saudáveis e que foram mascarados pela grande quantidade de informação.

Considerando a complexidade dos dados e o excesso de variáveis que podem ser extraídas na análise lipídica pela MS, é necessário o uso de técnicas quimiométricas para o tratamento dos dados. Isto pode ser realizado por uma combinação de seleção de características, onde apenas informações espectrais quimicamente relevantes do espectro MS são selecionadas, e classificação multivariada, onde as amostras são atribuídas a grupos pré-estabelecidos com base em suas características químicas. Com isso utilizou-se o algoritmo iSPA-LDA para separar as amostras doentes das amostras saudáveis

A Exatidão (número total de amostras corretamente classificadas considerando verdadeiros e falsos negativos) da classificação de iSPA-LDA para discriminar NILM (negativo para lesão intraepitelial ou malignidade (controles saudáveis)) e SIL (lesão intraepitelial escamosa (cancerosa)) com base nos espectros de PSI(+) foi igual a 77%, valor justo considerando o diagnóstico clínico, pois como classificação geral foi encontrado um erro <25%.

O VPP (número de testes positivos que são verdadeiros positivos) e o VPN (número de testes negativos que são verdadeiros negativos) foram, respectivamente, iguais a 80% e 75%, respectivamente, indicando que as amostras de câncer são melhor classificadas do que as amostras de controle saudáveis, o que sugere um potencial desse modelo para detecção de câncer.

O iSPA-LDA apresentou sensibilidade (proporção de testes positivos corretamente identificados) de 86%. Embora esse algoritmo tenha apresentado especificidade (proporção de testes negativos corretamente identificados) de 67%, que é relativamente baixa, esse valor está acima do padrão para diagnóstico de lesões pré-cancerosas de alto grau (51%-53%) (RIZZO; FELDMAN, 2018). Além disso, a precisão para as amostras NILM foi de 75%, enquanto para SIL é de 80%, indicando uma baixa probabilidade de classificação errada, em particular para amostras com câncer.

A **Figura 3.6** ilustra as previsões das amostras de plasma estudadas pelo modelo. Observou-se nessa figura que no conjunto teste, 5 amostras foram erroneamente classificadas, justificando os valores de exatidão, sensibilidade, precisão obtidos pelo iSPA-LDA.

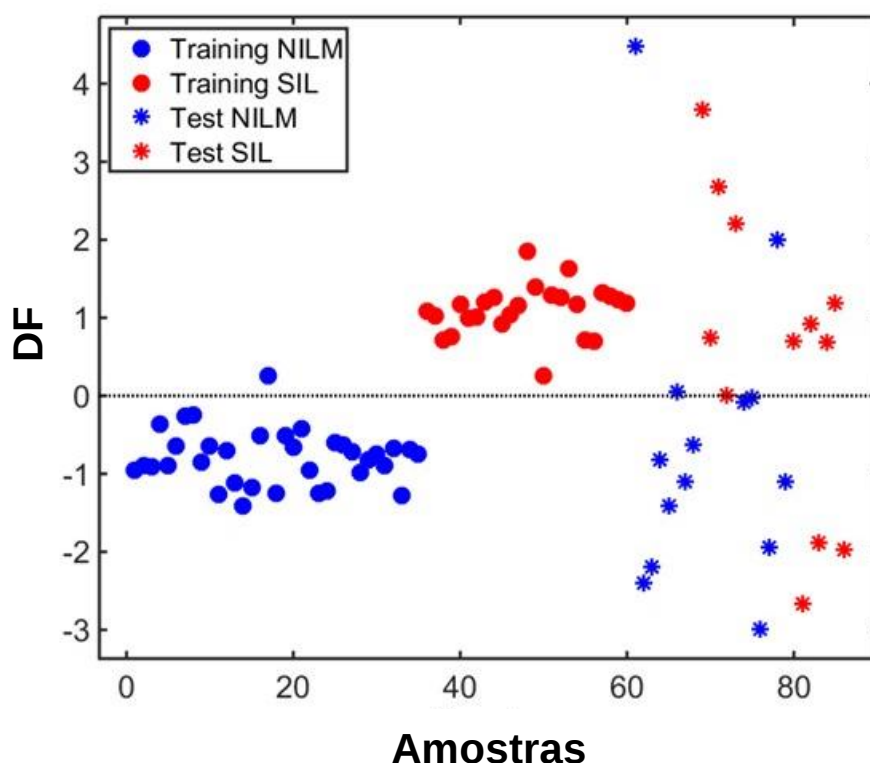


Figura 3.6. Função discriminante iSPA-LDA (DF), onde NILM: negativo para lesão intraepitelial ou malignidade (controles saudáveis) e SIL: lesão intraepitelial escamosa (cancerosa).

Outros algoritmos de classificação foram testados, mas com desempenho de diagnóstico mais fraco. Por exemplo, usando análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), a precisão, sensibilidade e especificidade foram encontradas em 54%, 36% e 67%, respectivamente. Portanto, o iSPA-LDA obteve o melhor desempenho dentre os algoritmos de classificação aplicados a este conjunto de dados.

Após a avaliação do desempenho do modelo, o algoritmo iSPA-LDA foi aplicado para selecionar as variáveis (valores de m/z) que diferenciam as amostras doentes e saudáveis. O iSPA-LDA selecionou um total de 54 variáveis (**Figura 3.7**); no entanto, apenas 8 tinham uma estrutura lipídica relevante bioquimicamente correspondente no banco de dados. A **Tabela 3.1** mostra os valores de m/z para estes 8 íons com suas fórmulas moleculares, as transições nos experimentos MS/MS, os nomes dos lipídios.

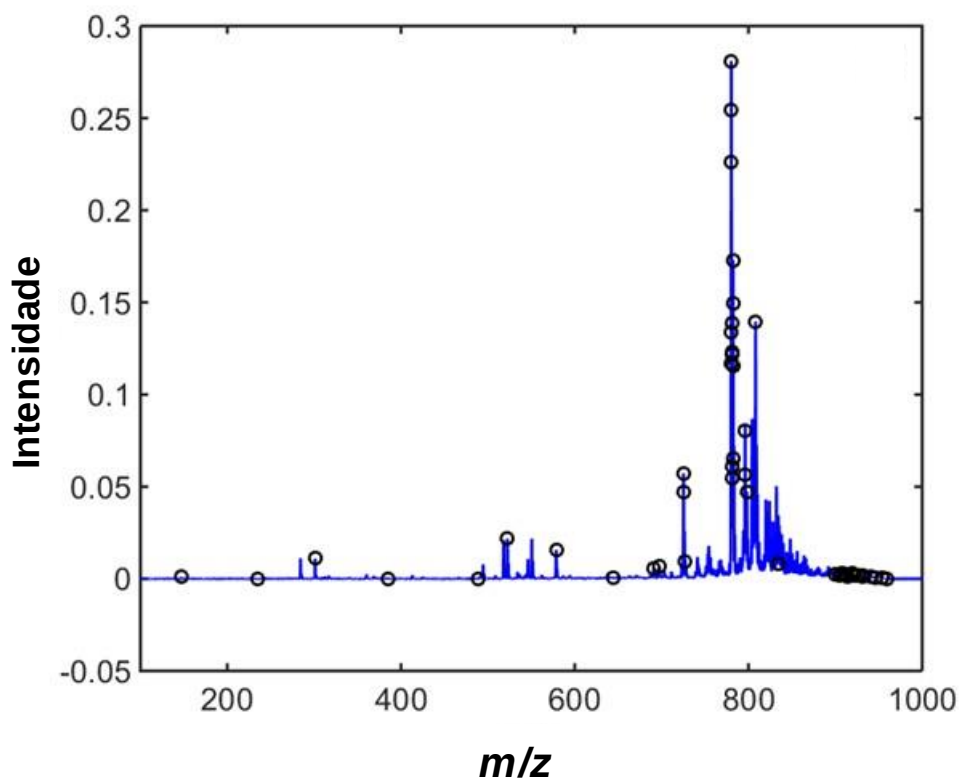


Figura 3.7. Variáveis selecionadas pelo iSPA-LDA

Tabela 3.1. Biomarcadores lipídicos associados à diferenciação de amostras de plasma cancerígeno e saudável identificadas por PSI (+) e iSPA-LDA.

<i>m/z</i>	Erro**	MS ²	Fórmula molecular	Lipídio	A*
579,29260	- 0,475	579,3→532,9	[C ₂₇ H ₄₇ O ₁₁ P + H] ⁺	PKODiA-PA	C
725,55609	-0,973	725,5→666,5	[C ₃₉ H ₇₉ N ₂ O ₆ P + Na] ⁺	SM(d18:1/16:0)	C
780,55094	-0,559	780,5→721,5	[C ₄₂ H ₈₀ NO ₈ P + Na] ⁺	PC(16:0/18:2)	C
782,56679	-0,302	782,6→723,5	[C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P + Na] ⁺	PC(16:0/18:1)	C
796,52325	-0,846	796,3→737,4	[C ₄₀ H ₇₇ NO ₁₂ S + H] ⁺	C16(OH) Sulfatídeo	C
798,54034	-0,590	798,5→184,0	[C ₄₅ H ₇₈ NO ₇ P + Na] ⁺	PE(P-18:0/22:6)	H
808,58489	-0,237	808,5→749,5	[C ₄₆ H ₈₂ NO ₈ P + H] ⁺	PC(16:0/22:5)	H
834,59847	0,173	835,5→769,5	[C ₄₆ H ₈₆ NO ₈ P + Na] ⁺	PC(18:0/20:3)	H

**Erro em ppm. *A= amostra; C = câncer; H = saudável.

Duas classes lipídicas foram encontradas, os glicerofosfolipídios e os esfingolipídeos. Esses lipídios são componentes da membrana celular e lipoproteínas e estão envolvidos em processos biológicos, como inflamação e diferenciação celular (GLASS; OLEFSKY, 2012; MASOODI *et al.*, 2015).

O íon m/z 579 foi atribuído a PKODiA-PA, um glicerofosfolípido oxidado associado a imunidade (HAZEN, 2008). O m/z 725, SM (d18:1/16:0), é uma esfingomielina, que é encontrada em concentrações particularmente elevadas nas membranas das células nervosas e dos glóbulos vermelhos (MILHAS; CLARKE; HANNUN, 2010). Os íons m/z 780, 782, 808 e 834 foram atribuídos ao PC(16:0/18:2), PC(16:0/18:1), PC(16:0/22:5) e PC(18:0/20:3), respectivamente, são fosforilcolinas, os principais lipídios estruturais da membrana plasmática (POLLARD *et al.*, 2016). O íon m/z 796, C16(OH) sulfatide, é um Sulfatideo. Os Sulfatideos são sulfoglicosolípidos aniônicos encontrados principalmente nas membranas plasmáticas das células. Foram notificadas aumento nas concentrações de sulfatideos em pacientes com carcinoma renais, no adenocarcinoma do cólon e no pulmão, e câncer de ovário (MIRZAIAN; KRAMER; POORTHUIS, 2015). O m/z 798, identificado como PE(P-18:0/22:6), um lipídio que já foi relacionado a síndrome do ovário policístico (MORAN *et al.*, 2017). Então, foi possível observar que os lipídios C16(OH) sulfatide e PE(P-18:0/22:6) já foram associados a doenças no sistema reprodutor feminino.

Portanto, o uso estratégico do PSI associado a iSPA-LDA foi determinante para alcançar um nível de exatidão que permite utilizar esta metodologia para efeito de comparação com o exame citopatológico tradicional, evitando a subjetividade interna deste exame.

3.4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo evidencia a possibilidade de inserção de uma nova metodologia capaz de explorar uma maior quantidade de dados médicos por espectrometria de massas ambiente combinada com classificação multivariada, sendo uma alternativa promissora à classificação de plasma sanguíneo de mulheres NILM e SIL com base em uma abordagem lipidômica não direcionada, auxiliando no diagnóstico precoce do câncer do colo do útero e maior chance de cura para os indivíduos.

A metodologia experimental foi definida escolhendo 0 min como melhor tempo de secagem e utilizando metanol como sistema de solvente. A metodologia se mostrou simples, rápida e com o mínimo preparo da amostra, sendo a amostra praticamente injetada diretamente no espectrômetro de massas. Apesar da complexidade natural exibida pelos lipídios em organismos biológicos, a análise multivariada foi capaz de extrair informações significativas dos dados da espectrometria de massas permitindo classificar corretamente as amostras analisadas.

O algoritmo iSPA-LDA foi aplicado aos dados de espectros de massas, gerando uma precisão de classificação de 77% para o diagnóstico de câncer. Os principais biomarcadores lipídicos selecionados pela iSPA-LDA associados à diferenciação das amostras foram os lipídios da classe glicerofosfolipídios e os esfingolipídios na faixa entre 579 e 835 m/z , sendo que dois lipídios já foram relacionados na literatura a doenças no sistema reprodutor feminino.

Como perspectivas futuras, pode-se utilizar essa metodologia descrita juntamente com as análises citopatológicas em um grupo maior de amostra para que com isso haja um ganho na precisão do método. Ainda, é possível utilizar a técnica PSI com análise multivariada apresentada aqui, para detectar biomarcadores de outras doenças.

CAPÍTULO III

Desenvolvimento de uma nova fonte de ionização -
ESI grafite- e sua aplicação em metabolômica clínica

4.1 CAPÍTULO III - Desenvolvimento de uma nova fonte de ionização - ESI grafite- e sua aplicação em metabolômica clínica

4.2 INTRODUÇÃO

Como exposto no capítulo 1, diferentes materiais têm sido usados como substrato para o *Substrate Electrospray Ionization*. Neste trabalho, utilizou-se grafite de lapiseira como nova sonda de amostragem e emissor de ESI. O grafite de lapiseira já tem sido largamente utilizado como eletrodo em eletroanálises. (BULEANDRA *et al.*, 2019; NAGARAJAN *et al.*, 2019; VISHNU; BADHULIKA, 2019). Esse material tem tido ampla atenção devido ao seu carbono hibridizado sp^2 que apresenta boa adsorção, condutividade, facilidade de preparação e propriedades de modificação da superfície. (PURUSHOTHAMA *et al.*, 2018)

Cerca de 4% do grafite mundial é usado para produzir lápis, consistindo em pó fino de grafite numa matriz inorgânica (resina) ou orgânica (argila ou um polímero elevado, por exemplo, celulose). Os grafites de lapiseira contêm grafite (~65%), argila (~30%) e um ligante (cera, resinas ou alto polímero. (DAVID; POPA; BULEANDRA, 2017) Kariuki, (2012) mostrou que a argila adicionada no grafite de lapiseira tem uma influência importante na química (por exemplo, troca iônica) e nas propriedades estruturais (por exemplo, grau de desordem e morfologia da superfície).

As hastes de grafite que comumente são usadas como recargas de lapiseiras, estão prontamente disponíveis a um preço significativamente baixo em todo o mundo (uma média de 1 USD por 24 unidades no Brasil). O recurso renovável das hastes de grafite precisa ser considerado, pois a ponta usada em uma análise pode ser facilmente removida e outras pontas podem ser criadas a partir de uma única haste. Do ponto de vista da química verde, um pequeno material de uma haste de grafite pode ser usado como emissor ESI, e pode ser prontamente descartado após o uso. (KAWDE; BAIG; SAJID, 2016) Além disso, os grafites têm uma superfície rugosa que permite o enriquecimento efetivo da solução da amostra na ponta. (LIN; LOW; CHUANG, 2016) Outras características significativas das hastes de grafite são alta condutividade elétrica, excelente rigidez mecânica, disponibilidade em grande escala, facilidade de

manutenção, portabilidade, fácil manuseio, fácil funcionalização, baixa toxicidade e inércia química (DAVID; POPA; BULEANDRA, 2017; KAWDE; BAIG; SAJID, 2016; LI *et al.*, 2012).

Nesse sentido, foi desenvolvido um método de *Substrate Electrospray Ionization* utilizando grafite. O método foi otimizado e empregado para a análise de uma variedade de compostos, incluindo drogas ilícitas, hormônios, aminoácidos, proteínas, biomarcadores para diagnóstico clínico e determinação direta de lipídeos cerebrais de camundongos e seu uso potencial para análise de distribuição local do cérebro.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Materiais, Padrões Analíticos e Solventes

Metanol grau HPLC, hidróxido de amônio e ácido fórmico foram adquiridos de J. T. Baker (Phillipsburg, EUA). Os padrões analíticos de cristal violeta, dopamina, levonorgestrel, creatinina, triptofano, ácido butírico, cocaína e lisozima foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Grafites de lapiseira (Faber Castell®) de diferentes espessuras (0,2; 0,5; 0,7; 0,9; 1,6 mm) foram adquiridas de um supermercado local (Goiânia, Brasil).

Amostras de urina (aceitas pelo comitê de ética regional da Universidade Federal de Goiás, protocolo 056/13) foram fornecidas por voluntários que não haviam sido expostos a nenhum medicamento por pelo menos 72 horas.

Utilizou-se camundongos Swiss machos, pesando de 40 a 50 g com 10 a 12 semanas de idade. Os animais foram cedidos pelas Instituições de Puericultura do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (ICB-UFG), Goiânia, Goiás, Brasil. Os animais foram mantidos em ciclo de 12 horas de luz, a 25°C, com acesso livre a água e alimentos. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFG (Protocolo nº 44/18). Como tal, todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais, reduzir o número de animais utilizados.

4.3.2 Preparo das amostras

Soluções estoque de dopamina, levonorgestrel, cristal violeta, triptofano, ácido butírico, cocaína e lisozima foram preparadas em metanol na concentração de 1 mg mL⁻¹. A creatinina foi preparada em urina sintética (DBIRA *et al.*, 2015) a 1 mg mL⁻¹. Posteriormente, alíquotas das soluções estoque foram diluídas nas mesmas matrizes, a fim de obter as concentrações desejadas, acidificadas (ácido fórmico 0,1%) ou basificadas (hidróxido de amônio 0,1%), conforme o modo de leitura, modo positivo ou negativo, respectivamente.

O cérebro de camundongo foi analisado *in-vivo* ou imediatamente após o descongelamento, dependendo da análise. Para realizar a análise da urina real ela foi diluída 60 vezes.

4.3.3 Montagem da fonte ESI grafite

O grafite foi preso por um clipe de metal ligado a uma fonte de alimentação de alta tensão. A ponta do grafite foi posicionada a aproximadamente 5 mm da entrada do espectrômetro de massas. As amostras em solução foram gotejadas na ponta de grafite usando uma tubulação de polietere tercetona (PEEK) conectada a uma seringa contendo a amostra (**Figura 4.1a**). Para a análise do cérebro do camundongo, determinadas regiões, escolhidas previamente de acordo com o interesse, foram perfuradas pela ponta do grafite (**Figura 4.1b**) para coletar uma quantidade de amostra e, posteriormente o grafite preso pelo clipe de metal foi posicionado em frente ao espectrômetro de massas e foi gotejado solvente de pulverização (metanol com 0,1% de ácido fórmico) na ponta de grafite utilizando a tubagem PEEK e a seringa. Uma alta voltagem foi aplicada na haste de grafite, gerando íons na fase gasosa para análise de MS.

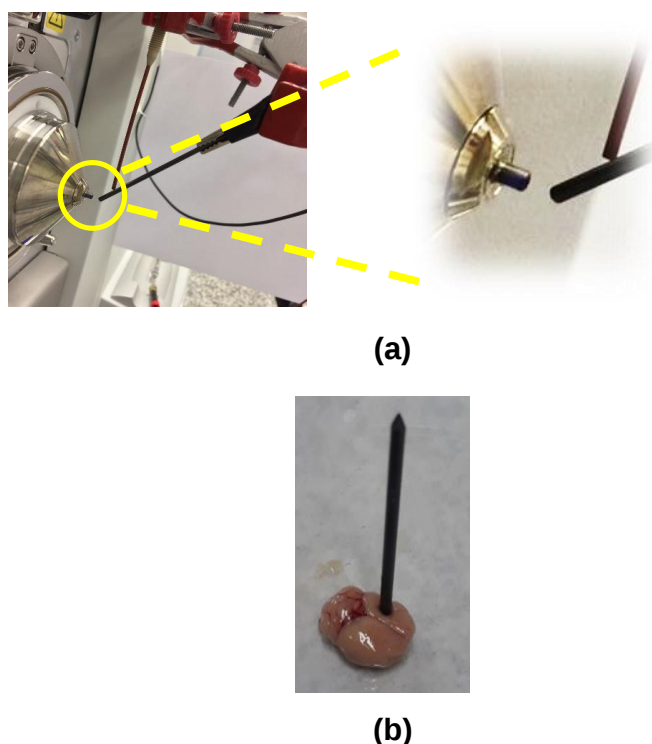


Figura 4.1. Esquema da fonte ESI grafite: (a) posição do grafite e aplicação da amostra/solvente; (b) amostragem do cérebro de camundongo pelo grafite.

O ESI grafite foi utilizado em um espectrômetro de massas *Ion trap* 3D (LCQ Fleet TM, Thermo Scientific TM). Todas as análises foram realizadas com a temperatura capilar ajustada a 250 °C, voltagem capilar a 40 V, voltagem da lente do tubo a 50 V e energia de colisão a 25 eV. Os espectros de massas foram

adquiridos em triplicatas usando o *software Thermo Tune Plus* no modo de exploração contínua por um minuto com uma taxa de aquisição de 0,5 varreduras por segundo. O tempo de análise é de 1 minuto.

4.3.4 Avaliação dos parâmetros do ESI grafite

Inicialmente, a espessura do grafite foi avaliada de forma univariada, variando de 0,5 a 1,6 mm para determinar qual espessura proporciona um melhor desempenho, utilizando uma solução de cristal violeta (m/z 373, $[M+H]^+$) a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ em metanol. Para essa avaliação, a voltagem aplicada ao grafite foi de 3,5 kV, o ângulo do grafite em relação ao espectrômetro de massas foi de 180° e o fluxo da amostra gotejada foi de $5 \mu\text{L min}^{-1}$, esses fatores foram definidos de acordo com o estudo de HU *et al.*, (2018).

Posteriormente, três parâmetros da análise por ESI grafite foram avaliados de forma multivariada a fim de se obter a melhor relação (estabilidade de spray)/(intensidade do íon), que foram: voltagem aplicada ao grafite (2, 3, 4 e 5 kV), ângulo do grafite em relação a entrada do espectrômetro de massas (90° , 135° e 180°) (**Figura 4.2**) e fluxo da amostra gotejada (5 , 10 e $15 \mu\text{L min}^{-1}$). Todos esses parâmetros foram otimizados usando uma solução de cristal violeta a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ em metanol.

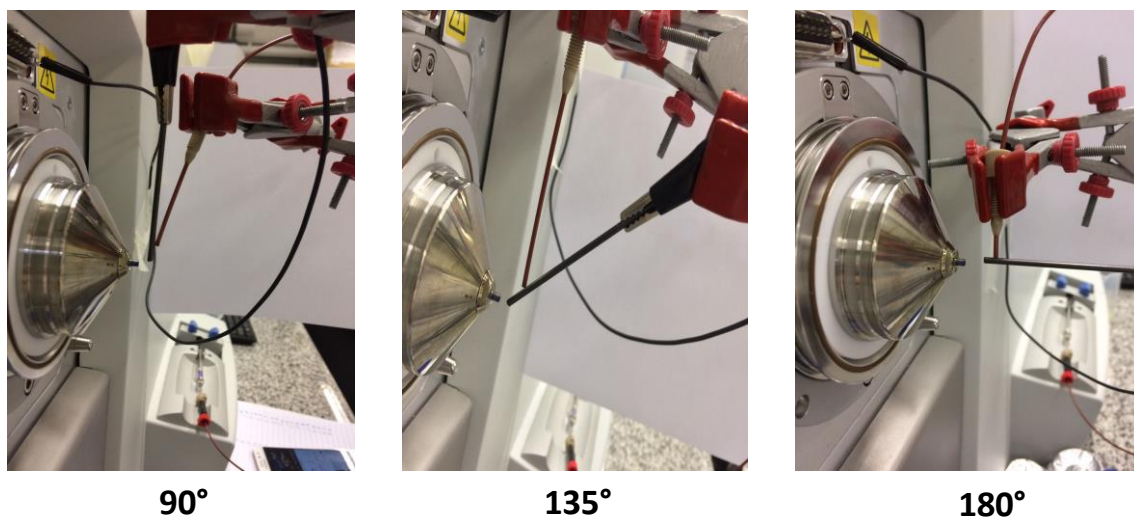


Figura 4.2. Fonte ESI grafite com os ângulos do grafite em relação a entrada do espectrômetro de massas testados.

4.3.5 Análises com ESI grafite

4.3.5.1 Análises de amostras em solução

Foram testadas a capacidade de ionização de moléculas de diferentes massas e polaridades por ESI grafite, incluindo: dopamina a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, levonorgestrel a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, triptofano a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, ácido butírico a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, cocaína a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, creatinina a 1400 $\mu\text{g L}^{-1}$ e lisozima a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (**Figura 4.3**). Experimentos de MS^3 foram realizados para a confirmação da identificação de cada molécula.

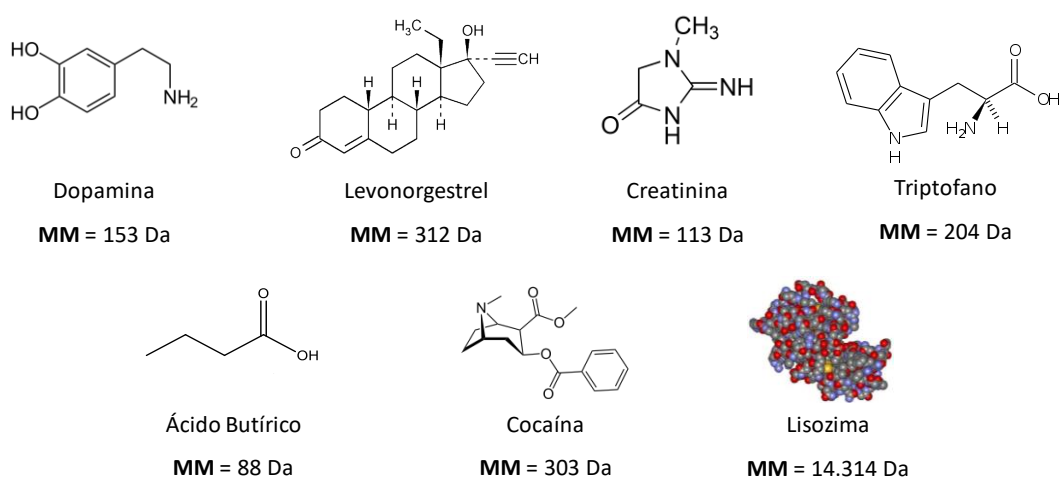


Figura 4.3. Estrutura das moléculas analisadas por ESI grafite.

4.3.5.2 Análise quantitativa

Posteriormente, para avaliar o desempenho analítico do ESI grafite, foi construída uma curva analítica e calculados LOD (limite de detecção) e LOQ (limite de quantificação) da creatinina em urina artificial. O LOD foi determinado através da equação $S_{\text{blank}} + 3 \times \sigma_{\text{blank}}$ e o LOQ foi calculado por $S_{\text{blank}} + 10 \times \sigma_{\text{blank}}$, onde S_{blank} é a média do sinal do branco, e σ_{blank} é o desvio padrão de 10 replicatas do branco (DAMON *et al.*, 2016). A curva analítica da creatina foi construída nas concentrações de 100, 700, 1400, 2200 e 3000 $\mu\text{g L}^{-1}$, a partir das intensidades do íon do produto no processo de fragmentação característica da creatinina (m/z 114 $\rightarrow$ 86) (MS/MS). E ainda, foram realizadas análises de determinação de creatinina em 3 amostras de urina reais. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.3.5.3 Análises em amostras sólidas

Finalmente, para testar a capacidade de análise em amostras sólidas, o ESI grafite foi utilizado na análise de cérebros de camundongos e foi verificado seu uso potencial para análise de distribuição local do cérebro. Foram analisadas as regiões do córtex, do cerebelo e do ventrículo (**Figura 4.4**) em 5 camundongos fêmeas e em 5 machos. Na análise da região do ventrículo a amostra foi coletada em ratos *in-vivo* (**Figura 4.5**).

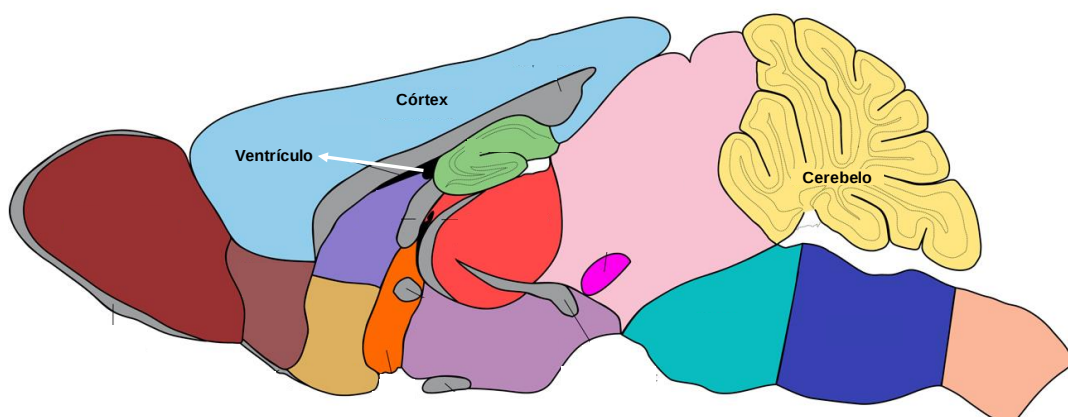


Figura 4.4. Vista sagital média do cérebro do camundongo demonstrando as áreas analisadas por ESI grafite. FONTE: Adaptada de “Washington University in St. Louis”, (2019)

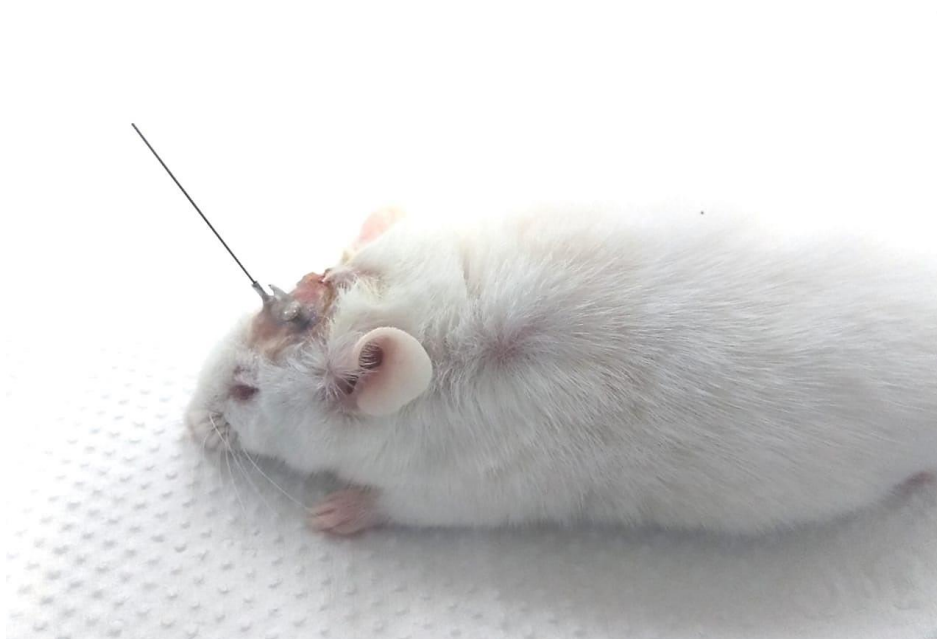


Figura 4.5. Foto da coleta de amostra para análise da região do ventrículo do camundongo. O grafite de espessura 0,2 mm foi inserido dentro de uma cânula implantada previamente através de cirurgia.

Após as análises, os dados obtidos foram tratados utilizando análise estatística multivariada por *Principal Component Analysis* (PCA), para avaliar a potencialidade da técnica na classificação de indivíduos macho e fêmea e, ainda, na distinção de 3 regiões do cérebro (córtex, cerebelo e ventrículo).

A análise computacional incluindo importação e pré-processamento de dados, bem como a construção do modelo multivariado (PCA) foi executado dentro do ambiente MATLAB® R2010a (*MathWorks Inc, Natick, MA, EUA*) usando o PLS Toolbox versão 7.9.3 (*Eigenvector Research, Inc., USA*) e rotinas. Inicialmente, foram agrupados todos os espectros em uma matriz de dados regular, ou seja, amostras nas intensidades de linhas e m/z nas colunas, foi necessário criar um vetor comum de valores m/z , já que cada amostra tinha seu próprio espectro de massa (com valores diferentes de m/z). Assim, foi utilizada uma rotina computacional para garantir que todos os espectros de massas tivessem o mesmo tamanho, então a matriz de dados de dimensões 30×15249 foi cortada apresentando dimensões finais de 30×1501 . Depois disso, a matriz foi corrigida a linha base e normalizado para que a soma dos quadrados de cada linha (amostra) fosse igual a 1.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.4.1 Avaliação dos parâmetros do ESI grafite

Um experimento inicial foi realizado para determinar qual espessura de grafite fornece o desempenho mais apropriado. As intensidades do íon do cristal violeta (m/z 373, $[M+H]^+$) foram plotadas como um gráfico de barras (**Figura 4.6**).

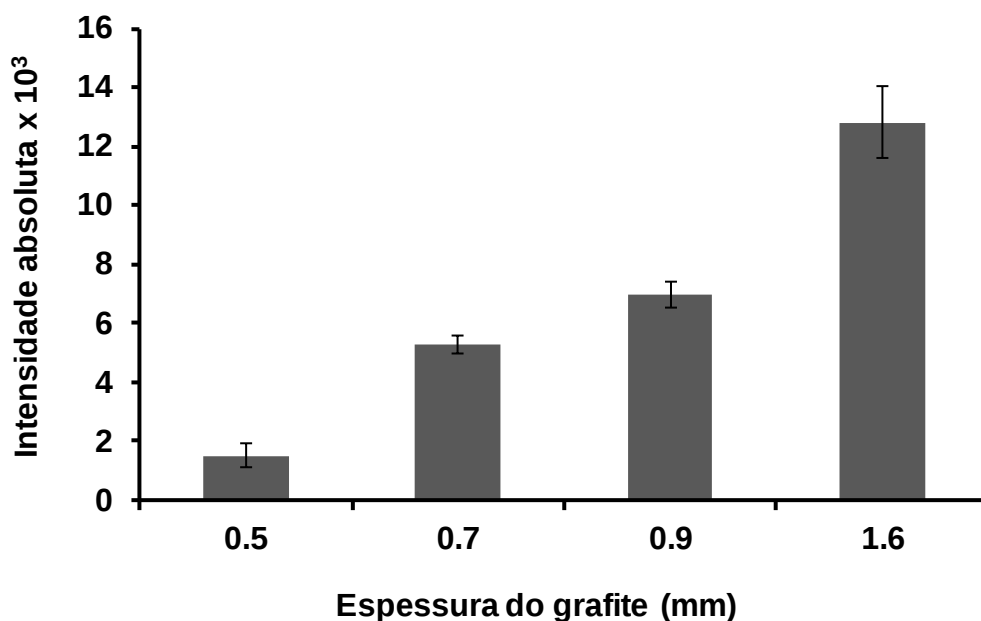


Figura 4.6. Gráfico de barras das intensidades de sinal obtidas a partir de espectros de massas do ESI grafite no modo positivo de cristal violeta (m/z 373, $[M+H]^+$) a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ usando diferentes espessuras de grafite. Barras de erro mostram o desvio padrão das medições replicatas ($N = 3$).

O grafite mais espesso apresentou a maior intensidade, devido à sua capacidade de transportar mais amostra. Como o grafite atua como um condutor de amostras líquidas do tubo PEEK para eletropulverização, os grafites mais finos têm uma menor superfície de contato com a amostra o que leva a perdas de compostos antes mesmo de entrar na fase gasosa.

Para investigar a morfologia e microestrutura da superfície do grafite, realizou-se uma análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da ponta de grafite de 1,6 mm (**Figura 4.7**). A partir do MEV, foi possível notar que o grafite apresenta uma superfície formada por flocos com formas irregulares e tamanhos micrométricos. A morfologia das superfícies condutoras do grafite está

relacionada à rugosidade destes materiais. Moléculas podem ser adsorvidas na superfície áspera do condutor (ROMANOWSKI, S., WOJTCZAK, 1997). Portanto, isso corrobora com a teoria de que o grafite mais espesso tem uma maior área de superfície de contato e é capaz de adsorver maior quantidade de amostra.

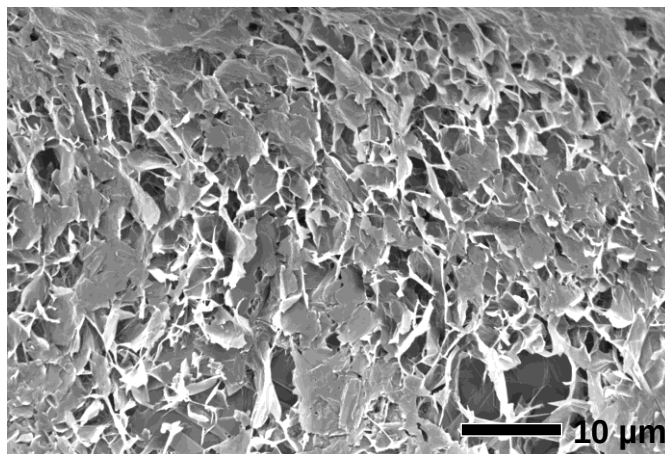


Figura 4.7. Imagem de MEV (x 1500) da ponta do grafite.

Então, como o grafite de 1,6 mm forneceu o sinal de íon mais intenso, ele foi selecionado para análises por ESI grafite. Entretanto, nas análises de camundongo *in-vivo* utilizou-se o grafite 0,2 mm pois era a única espessura capaz de entrar na cânula inserida para realizar a coleta da amostra.

Após a escolha da espessura do grafite, foram avaliados a voltagem aplicada ao grafite, o ângulo do grafite em relação a entrada do espectrômetro de massas e o fluxo da amostra gotejada. Os experimentos foram realizados de forma multivariada. As combinações dos fatores e níveis, bem como a intensidade do íon de cada experimento podem ser observadas na **Tabela 4.1**.

Analisando a **Figura 4.8**, pode-se observar que os experimentos 11, 14 e 28 proporcionaram maior intensidade do íon dentre os outros experimentos. Entretanto, como foi avaliada a melhor relação (estabilidade de spray)/(intensidade do íon), o experimento 14 foi o que apresentou melhor resultado. Isso pode ser visto na **Figura 4.9**, que apresenta o cromatograma de íons totais (TIC) para os experimentos 11, 14 e 28 e demonstram a estabilidade do spray, em 1 minuto, de cada experimento.

Tabela 4.1. Dados dos experimentos realizados para avaliação dos parâmetros do ESI grafite utilizando grafite 1,6 mm.

Experimento	Voltagem (kV)	Ângulo (°)	Fluxo (µL min ⁻¹)	Intensidade
1	2	90	5	6.25
2	2	90	10	1535.95
3	2	90	15	0
4	2	135	5	0
5	2	135	10	190842.9
6	2	135	15	125628.85
7	2	180	5	196285.4
8	2	180	10	462399.2
9	2	180	15	40075.3
10	3	90	5	356156
11	3	90	10	695848.5
12	3	90	15	544396.35
13	3	135	5	319247.35
14	3	135	10	728847.85
15	3	135	15	391274.25
16	3	180	5	328.85
17	3	180	10	498076.1
18	3	180	15	70908.35
19	4	90	5	592838.2
20	4	90	10	300490.45
21	4	90	15	347140.7
22	4	135	5	597834.2
23	4	135	10	332986.2
24	4	135	15	412320.9
25	4	180	5	574666.3
26	4	180	10	151167.1
27	4	180	15	175066.05
28	5	90	5	637053.6
29	5	90	10	172732.1
30	5	90	15	311436.7
31	5	135	5	313662.25
32	5	135	10	220203.95
33	5	135	15	0
34	5	180	5	94173.4
35	5	180	10	102696.6
36	5	180	15	16243.05

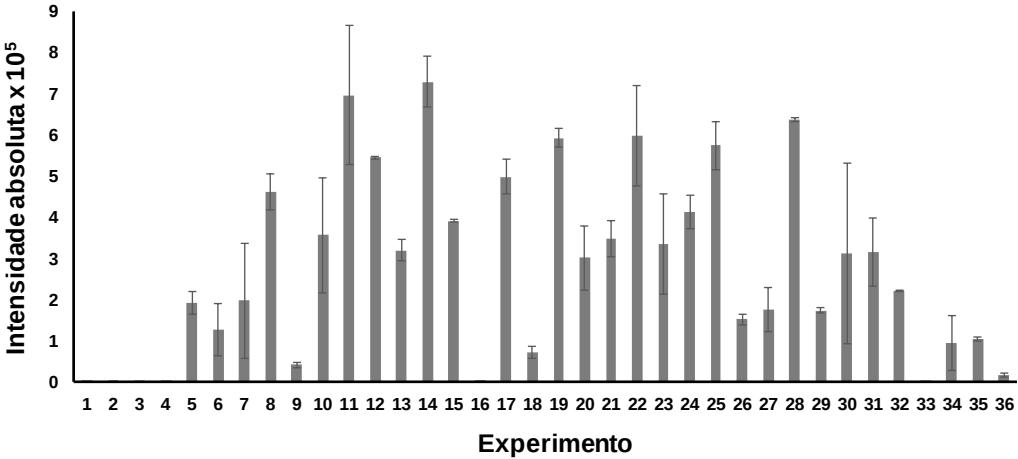


Figura 4.8. Gráfico de barras dos resultados dos experimentos realizados para avaliação dos parâmetros do ESI grafite utilizando grafite 1,6 mm. Barras de erro mostram o desvio padrão das medições replicatas. (N=2)

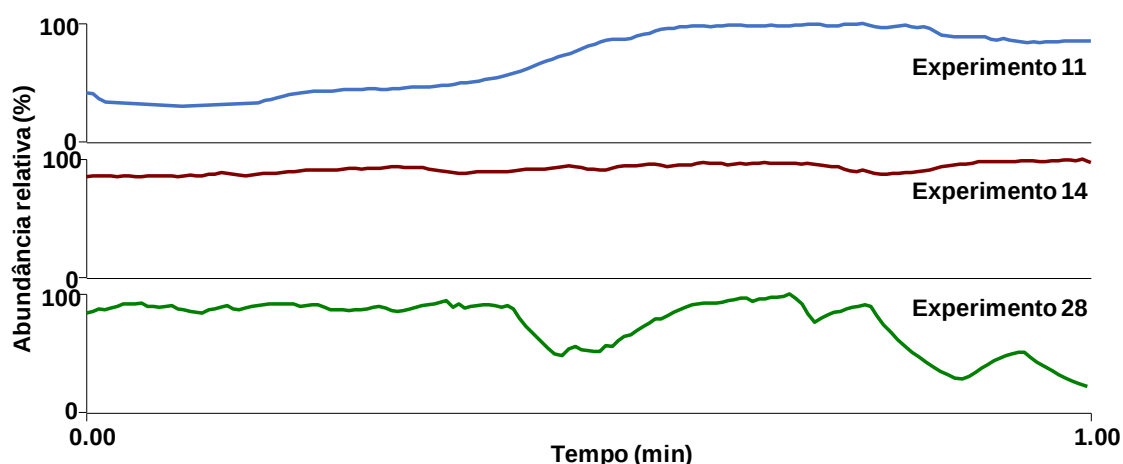


Figura 4.9. TIC dos experimentos 11, 14 e 28, utilizando $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cristal violeta (m/z 373), onde é possível observar a estabilidade do spray.

Portanto, uma vez que sinais iônicos estáveis e alta quantidade de íons do analito são desejados para análises quantitativas e reprodutíveis (MATHUR *et al.*, 2019; URBAN, 2019), as condições do experimento 14, onde se utiliza a voltagem 3 kV, o ângulo do grafite de 135° e o fluxo da amostra gotejada de $10 \mu\text{L min}^{-1}$, foram selecionadas para as análises futuras.

CECH; ENKE, (2001) em seus estudos sobre as implicações práticas dos fundamentos de ionização por ESI tradicional, observaram que voltagens medianas proporciona um cone de Taylor estável e uma geração ordenada de gotas carregadas. Na região de voltagem mais alta, vários cones e jatos aparecem e a ejeção de gotas muda rapidamente para direções fora do eixo. Na baixa voltagem, o cone de Taylor se forma brevemente, ejeta um fluxo de gotículas e colapsa em ciclos. Isso foi exatamente o que se observou nos experimentos realizados com ESI grafite.

Constatou-se ainda, que quando se utilizou o fluxo de $5 \mu\text{L min}^{-1}$ ocorria quedas do sinal iônico e o fluxo de $15 \mu\text{L min}^{-1}$ resultou no desperdício da amostra devido ao derramamento da amostra. RESCHKE; TIMPERMAN, (2011) estudaram a influência da interação do fluxo e da voltagem do ESI tradicional e chegaram à conclusão de que a intensidade do íon aumenta conforme as taxas de fluxo aumentam, mas o aumento na intensidade do sinal é menos do que diretamente proporcional à quantidade de amostra consumida. Portanto, fluxos intermediários permitem boas intensidades do íon sem desperdício de amostra.

Com o objetivo de comparar a eficiência de ionização de ESI grafite com técnicas convencionais, o ESI utilizando agulha de aço inoxidável e o ESI tradicional que utiliza capilar foram empregados para análise de uma solução de cristal violeta ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$). A **Figura 4.10** mostra os TICs obtidos com as três técnicas.

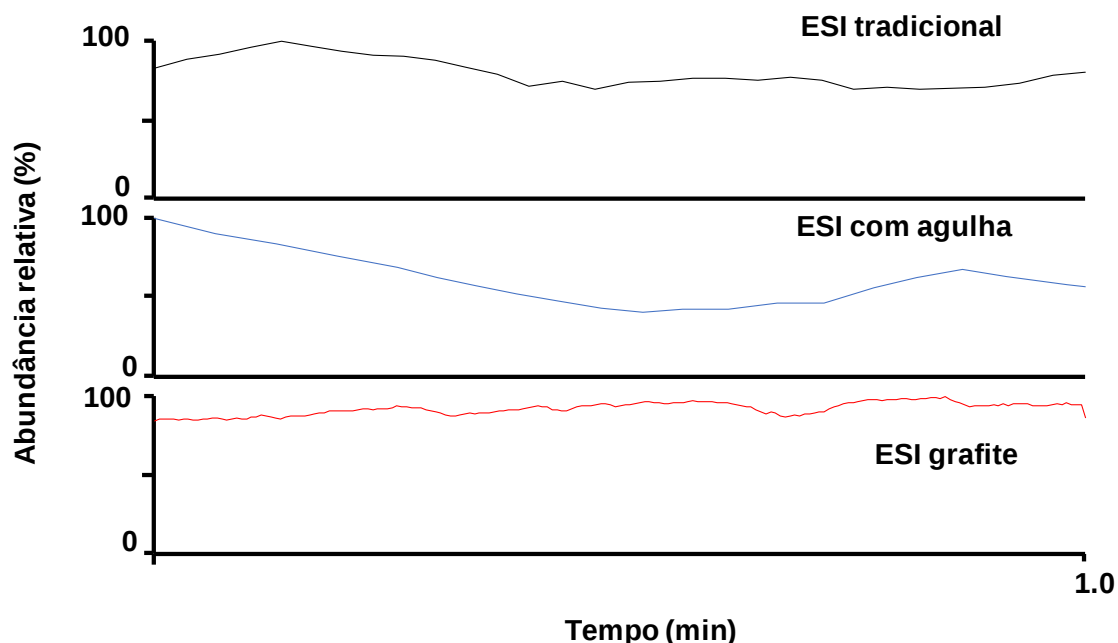


Figura 4.10. TIC para $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cristal violeta (m/z 373) utilizando ESI tradicional, ESI com agulha e ESI grafite.

Embora todas as técnicas tenham demonstrado resultados semelhantes, foram observadas variações na estabilidade do spray e diminuição da intensidade dos íons no ESI com agulha de aço inoxidável. Assim, o ESI grafite pode ser utilizado em análises que são normalmente realizadas por ESI tradicional evitando os seus problemas inerentes, já mencionados anteriormente.

4.4.2 Análises com ESI grafite de amostras em solução

Foi utilizada uma variedade de analitos para testar a capacidade de ionização do ESI grafite. A **Figura 4.11** apresenta os espectros de massas adquiridos em uma faixa de massa de 50-2000 obtidos a partir de soluções metanólicas de cinco moléculas pequenas, uma proteína e da creatinina em urina sintética.

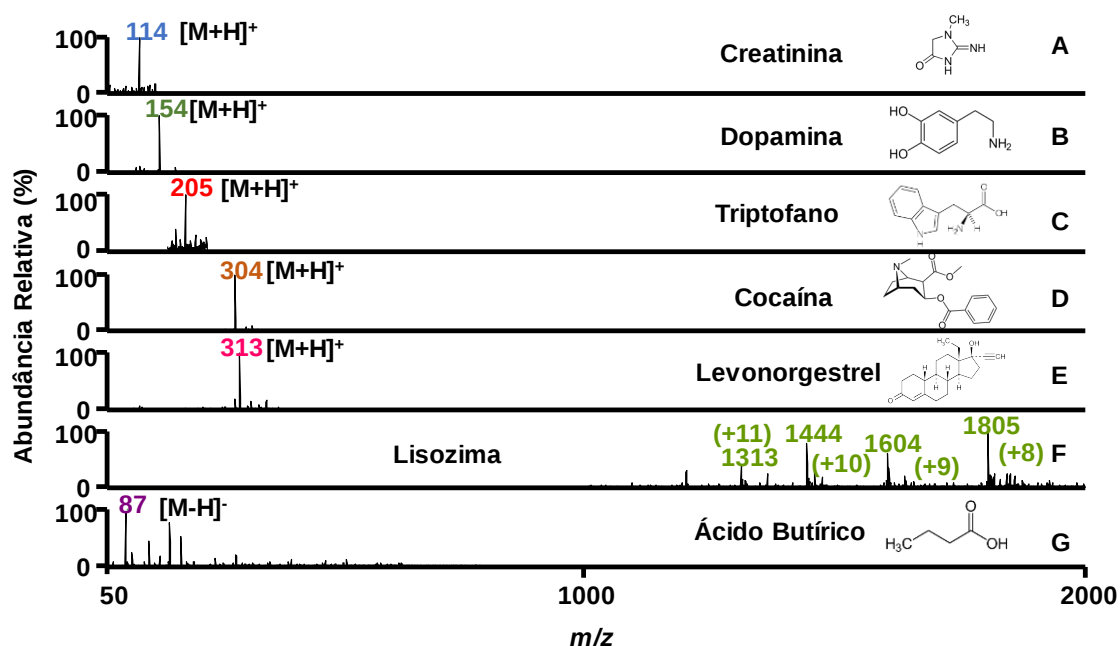


Figura 4.11. Espectros de massas de ESI grafite *full scan* obtidos a partir de (a) creatinina em urina sintética a $1400 \mu\text{g L}^{-1}$, soluções metanólicas de (b) dopamina a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (m/z 154 $[\text{M}+\text{H}]^+$), (c) triptofano a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (m/z 205 $[\text{M}+\text{H}]^+$), (d) cocaína a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (m/z 304 $[\text{M}+\text{H}]^+$), (e) levonorgestrel a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (m/z 313 $[\text{M}+\text{H}]^+$), (f) lisozima a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e (g) ácido butírico a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (m/z 87 $[\text{M}-\text{H}]^-$).

No modo positivo, foram detectados como picos predominantes os íons na forma protonada e, em intensidades menores, foram detectados os adutos de sódio ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) e potássio ($[\text{M}+\text{K}]^+$), o que é comum em técnicas ambiente. Isso também é observado no espectro da creatinina em urina sintética (**Figura 4.11a**), onde o meio é rico em sais, e mesmo assim não houve supressão iônica.

Em cada análise, foram detectadas as moléculas da dopamina (m/z 154 $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 176 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; m/z 192 $[\text{M}+\text{K}]^+$) (**Figura 4.11b**), triptofano (m/z 205 $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 227 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; m/z 243 $[\text{M}+\text{K}]^+$) (**Figura 4.11c**), da cocaína (m/z 304 $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 326 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; m/z 342 $[\text{M}+\text{K}]^+$) (**Figura 4.11d**) e do levonorgestrel (m/z 313 $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 335 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 351 $[\text{M}+\text{K}]^+$) (**Figura 4.11e**).

A análise da lisozima (**Figura 4.11f**) apresentou íons com um estado de carga centrada em +8, com uma distribuição de carga estreita, indicando a manutenção da estrutura nativa da proteína durante o processo de ionização. Este resultado revela a suavidade da ionização do ESI grafite e sua aplicabilidade para análise de macromoléculas como proteína. Além disso, o

perfil da proteína analisada é consistente com estudos anteriores sobre a análise da solução de lisozima preparada com ácido fórmico por ESI-MS (DUARTE *et al.*, 2016; LEE; KIM, 2015).

Existe uma tendência para a ocorrência de descarga corona quando se utiliza o ESI tradicional no modo negativo, tornando a análise nesse modo mais desafiadora do que no modo positivo. A descarga corona, que é uma descarga elétrica da ponta capilar, resulta na ionização química do analito gasoso e das moléculas de solvente que estão presentes ao redor do capilar ESI. O espectro de massas obtido durante a descarga corona é frequentemente caracterizado por quantidades significativas de ruídos (devido as moléculas de solvente ionizadas) e pouca estabilidade (CECH; ENKE, 2001). Portanto, no ESI tradicional, análises do modo negativo requerem componentes especiais (como o uso de diferentes solventes) que suprimam a descarga corona e facilitem a produção de íons negativos estáveis.

O espectro de massas no modo negativo do ácido butírico (m/z 87 $[M-H]^-$) (**Figura 4.11g**) por ESI grafite demonstrou a molécula desprotonada como pico de maior intensidade, apresentando pouco ruído. Demonstrando que o ESI grafite possibilita análises no modo negativo de soluções metanólicas sem problemas e sem usar nenhum outro artifício.

A característica de MS em série (MS/MS ou MS³) de um espectrômetro de massas desempenha um papel essencial na análise direta de amostras complexas sem pré-tratamento ou separação cromatográfica. Padrões característicos de fragmentação correspondentes às informações estruturais do analito são úteis para confirmar sua identidade química. Como o ESI grafite é uma técnica de MS ambiente simples e barata, ele tende a ser usado fora de laboratórios para permitir análises MS em ambientes externos, acoplando a técnica de ionização a espectrômetros de massas portáteis. Esses instrumentos geralmente têm analisadores de massas de baixa resolução, o que torna a análise de MS/MS desejável para obter uma análise de alta especificidade sem a necessidade de um equipamento de ultra-alta ou alta resolução de massas. (DA SILVA *et al.*, 2019)

Como o ESI grafite foi usado para análise quantitativa, MS/MS do analito é muito importante para melhorar a sensibilidade pela eliminação do ruído químico na análise direta de misturas complexas (COOKS; BUSCH; GLISH, 1983). Aqui, utilizamos o método ESI grafite para análises de MS/MS e MS³ da dopamina, cocaína, levonorgestrel, triptofano e creatinina. A **Figura 4.12** apresenta os espectros de massas dos experimentos MS/MS e MS³ da creatinina. No experimento de MS/MS (**Figura 4.12a**), houve uma perda de CO, entretanto, apenas por essa perda não seria possível comprovar com certeza que seja a creatinina. Com a realização de MS³ (**Figura 4.12b**) observa-se a perda de CH₂N₂, característico da creatinina, comprovando sua identidade (HOU *et al.*, 2012).

Os espectros de massas dos experimentos MS/MS e MS³ da dopamina, cocaína, levonorgestrel, triptofano podem ser encontrados nas **Figura A 1** a **Figura A 4** do Apêndice, apresentando resultados detalhados sobre as perdas de cadeia e vias de fragmentação características de cada molécula. Não foi possível realizar esses experimentos para o ácido butírico, devido a sua massa baixa e nem para a lisozima, devido a sua complexidade.

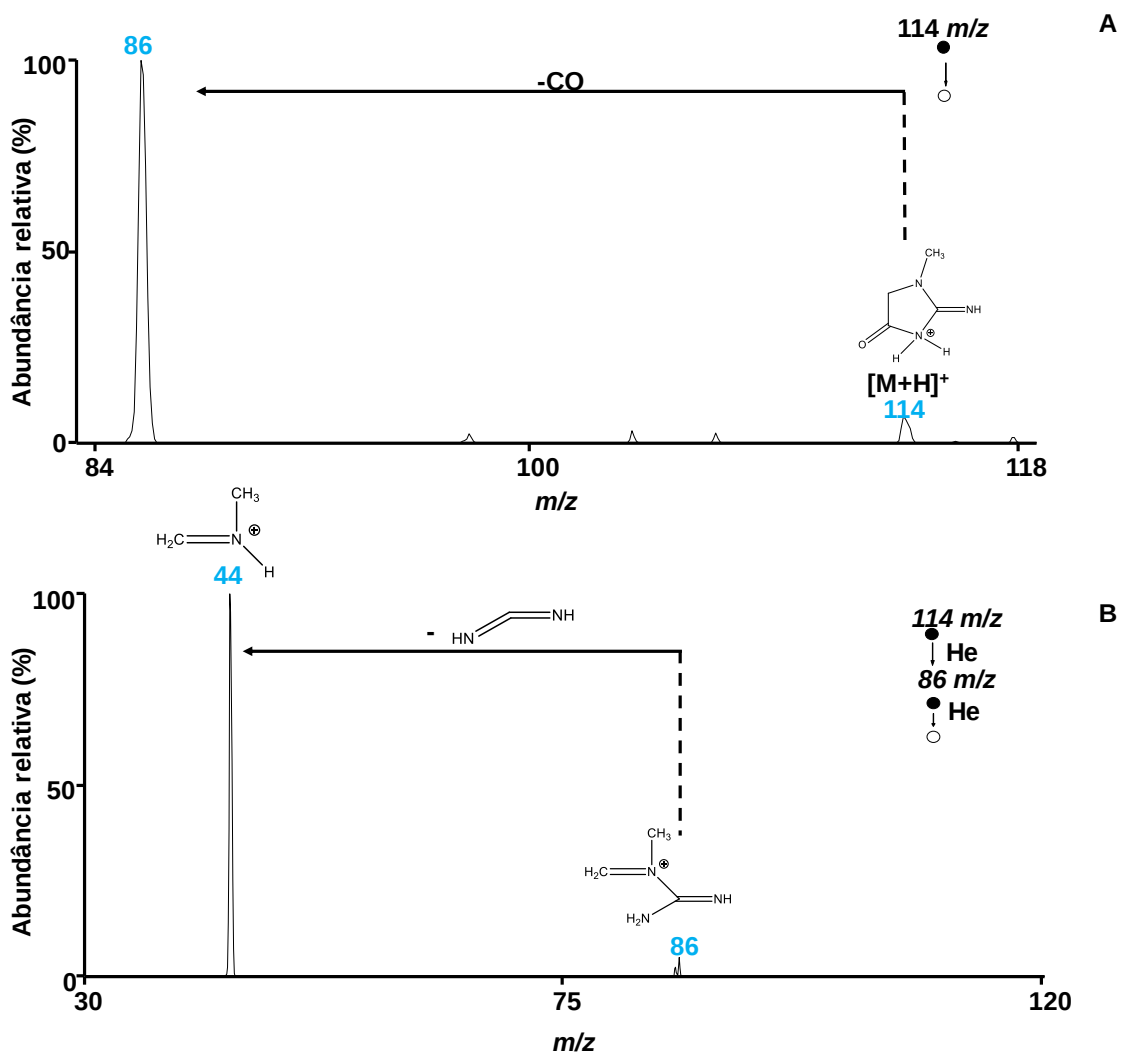


Figura 4.12. a) espectros MS/MS e (b) MS³ obtidos a partir da análise ESI grafite de creatinina a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, com as fragmentações características deste analito.

Isso mostra que o ESI grafite consegue analisar analitos de diferentes características, nos diferentes modos de ionização. Todos esses resultados fornecem evidências de que o método ESI grafite tem ampla aplicabilidade analítica.

4.4.3 Análise quantitativa com ESI grafite

O desempenho quantitativo do ESI grafite foi avaliado pela análise da creatinina em urina artificial. A curva analítica (**Figura 4.13a**) foi construída pelo monitoramento da intensidade do íon de maior intensidade na transição de m/z 114 $\rightarrow$ 86 (perda de CO) de acordo com a concentração de creatinina na amostra de urina sintética, como mostrado na **Figura 4.13b**.

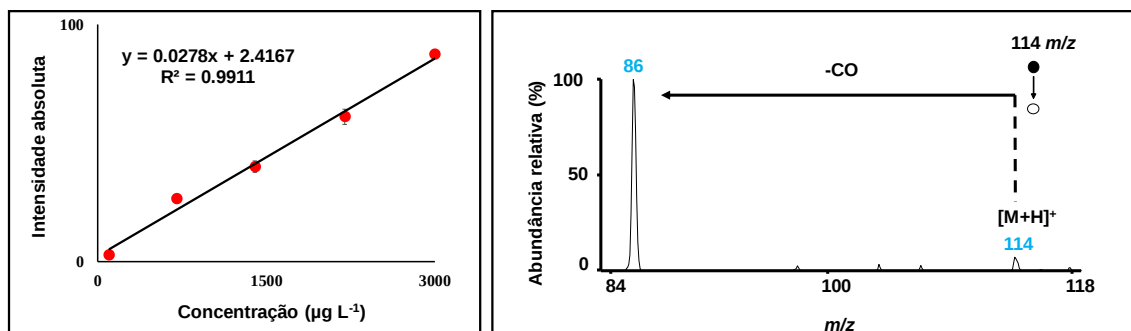


Figura 4.13. (a) Curva analítica variando de 100 - 3000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para creatinina em urina artificial usando ESI grafite. Barra de erros $n=3$. (b) Espectro ESI grafite - MS/MS em modo positivo de creatinina (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) em amostra de urina artificial.

Obteve-se uma curva de calibração com concentrações que variaram de 100 a 3000 $\mu\text{g L}^{-1}$, com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9911 (**Figura 4.13a**). O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram 6,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 20,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Apesar dos resultados analíticos serem satisfatórios, não foi utilizado um padrão interno (IS). DEVENPORT *et al.*, (2014) utilizaram IS deuterado na determinação de creatinina em urina por espectrometria de massas ambiente e obtiveram linearidade de $R^2 = 0,986$. A linearidade obtida por ESI grafite, sem o uso de IS, foi de $R^2 = 0,9911$. Esse dado colabora com os esforços para encontrar resultados analíticos satisfatórios sem o uso de IS utilizando técnicas de MS ambiente (WANG *et al.*, 2019a; ZHANG *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2016). Além disso, como o método ESI grafite tem o potencial de ser utilizado para análises em campo devido à sua simplicidade e baixo custo, a introdução de um IS aumentará a complexidade da operação.

Como a creatinina é um biomarcador para o diagnóstico clínico, ela tem sido amplamente analisada na urina por técnicas analíticas tradicionais e não tradicionais. FERNANDES *et al.*, (2019) analisaram os níveis de creatinina na urina humana por LC-UV e detectaram valores variando de 3900 a 18200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. ZUO *et al.*, (2011) em seus estudos utilizando cromatografia de interação hidrofílica encontraram valores de 728-1480 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de creatinina em urina humana. Além disso, o grupo de Hiraoka utilizou ESI-MS com uma sonda de agulha de metal para detecção direta de creatinina em amostras de urina (CHEN *et al.*, 2008; YOSHIMURA *et al.*, 2009). Portanto, empregou-se o método

ESI grafite para a determinação de creatinina em amostras de urina humana, fornecidas por voluntários. Três amostras diferentes foram analisadas e as concentrações de creatinina encontradas foram de 841, 979 e 1149 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esses dados mostram que o método ESI grafite tem potencial para ser empregado no diagnóstico clínico através da determinação de creatinina em urina.

4.4.4 Análises com ESI grafite de amostras sólidas

O cérebro contém uma incrível mistura de lipídios e tem sido um foco para os químicos lipídicos desde que o colesterol cerebral se tornou o primeiro composto orgânico a ser purificado (cristalizado) em 1834. Ele continuou a atrair atenção, já que tanto doenças genéticas quanto doenças neurodegenerativas comuns como esclerose, leucodistrofias, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, glioblastomas e doença de Alzheimer têm sido associados a distúrbios no conteúdo lipídico cerebral. (DAWSON, 2015)

Tendo em vista a importância da distribuição lipídica no cérebro, o método atual, ESI grafite, foi empregado para a determinação direta do perfil lipídico do tecido do cérebro de camundongos. A **Figura 4.14** mostra um espectro de massas obtido a partir da análise ESI grafite no modo positivo da região do lobo parietal esquerdo de um cérebro de camundongo. O espectro de massas apresentou sinais iônicos fortes na região m/z 700-900, o que é consistente com um perfil lipídico. A análise MS/MS dos íons mais intensos revelou as transições de m/z 756 $\rightarrow$ 697, 772 $\rightarrow$ 713, 782 $\rightarrow$ 723 e 798 $\rightarrow$ 739 que correspondem a uma perda neutra de trimetilamina $[\text{N}(\text{CH}_3)_3]$ (59 Da), que é um íon do fragmento de diagnóstico para fosfatidilcolina (PC), uma classe de fosfolipídios contendo colina como um grupo de cabeça. (SHANTA *et al.*, 2012) Os íons de m/z 756 e m/z 772 foram identificados como PC(32:0) com adutos de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e potássio $[\text{M}+\text{K}]^+$, respectivamente, e os m/z 782 e m/z 798 como PC(34:1) sodiado e potassiado, respectivamente. (JACKSON; WANG; WOODS, 2005a; SHANTA *et al.*, 2012) Assim, estes resultados demonstram a capacidade do método ESI grafite para detectar com sucesso um perfil lipídico numa amostra complexa sem qualquer pré-tratamento da amostra.

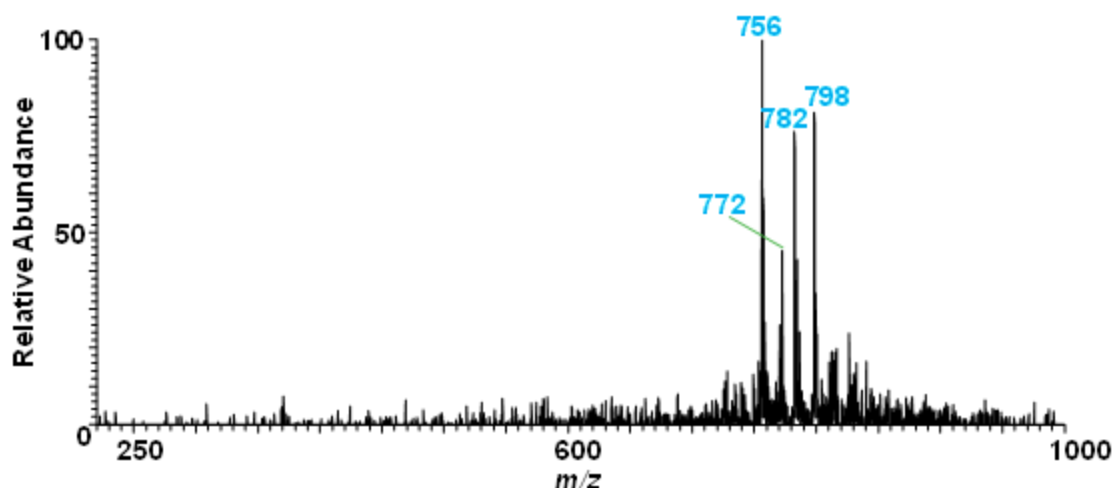


Figura 4.14. Espectro de massas de ESI grafite no modo positivo a partir da análise do cérebro de camundongo.

Além disso, o ESI grafite possibilitou a análise *in-vivo* da região ventricular do cérebro de rato. Essa região é responsável por produzir o chamado líquido cefalorraquidiano (CSF). (OLSTAD *et al.*, 2019) Alterações no conteúdo do CSF ocorrem na maioria das condições patológicas do sistema nervoso central. Em uma visão clássica, a função do líquido cefalorraquidiano é drenar resíduos e fatores prejudiciais derivados de doenças do parênquima cerebral. (ILLES, 2017) Por isso, esse monitoramento *in-vivo* que o ESI grafite foi capaz de realizar é de extrema importância, uma vez que podem ser observadas mudanças em tempo real, a partir da ingestão de algum medicamento ou droga, por exemplo.

Após a verificação da capacidade de analisar o perfil lipídico do cérebro, o método ESI grafite foi utilizado para verificar a capacidade de diferenciação de regiões do cérebro a partir do perfil lipídico. As regiões do córtex e cerebelo foram claramente separadas da região ventricular, como pode ser observado na **Figura 4.15**, mostrando que apresentam perfis lipídicos diferentes. Isto é bem condizente, uma vez que a região do córtex e do cerebelo é composta de tecido e a região ventricular é composta apenas por um líquido, o CSF.

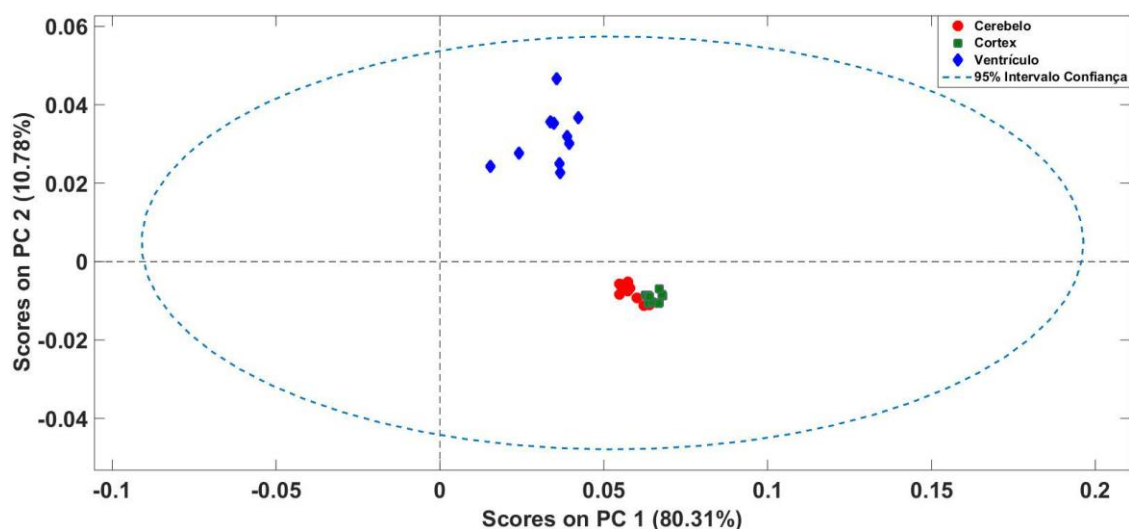


Figura 4.15. Resultados da análise por PCA para amostras de córtex, cerebelo e ventrículo de 5 camundongos fêmeas e 5 machos, com valores acima de 90% de variância explicada. Onde a cor azul representa o ventrículo, a cor verde representa o córtex e a cor vermelha representa o cerebelo.

Os valores de m/z que mais contribuíram para a separação por PCA foram os de m/z 782 e m/z 798, identificados como o lipídio PC (34:1) sodiado e potassiado. Martínez-Gardeazabal *et al.*, (2017), estudaram a distribuição lipídica em cérebro de ratos por imageamento utilizando MALDI e observaram que esse lipídio estava distribuído em todo o cérebro de ratos, indicando sua presença significativa na maioria dos tipos de membranas celulares. Além, disso Jackson; Wang; Woods, (2005a) realizaram uma caracterização estrutural *in situ* da região do córtex e detectaram esse lipídio como o mais abundante nessa região. E os mesmos pesquisadores, em outro estudo, observaram que esse lipídio também é o mais abundante no cerebelo. (JACKSON; WANG; WOODS, 2005b) Isso justifica a separação entre cerebelo e córtex não ser tão eficiente, uma vez que esse lipídio é comum as duas regiões.

Também se utilizou o ESI grafite para diferenciação entre indivíduos macho e fêmea a partir do perfil lipídico das diferentes regiões do cérebro. A **Figura 4.16**, **Figura 4.17** e **Figura 4.18** apresentam os resultados da análise por PCA para diferenciação entre indivíduos macho e fêmea, observadas em cada região do cérebro estudada.

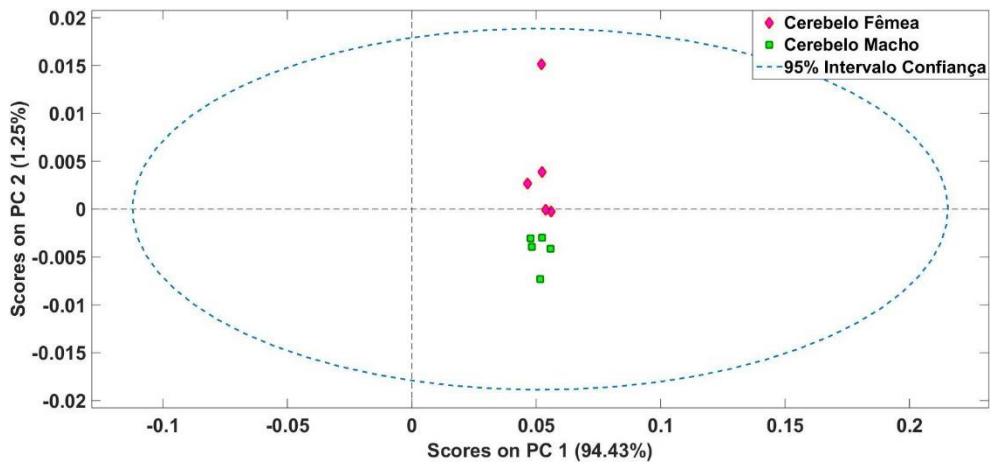


Figura 4.16. Resultado da análise por PCA para amostras de 5 fêmeas e 5 machos da região do cerebelo (onde a cor azul representa as fêmeas e a cor marrom representa os machos).

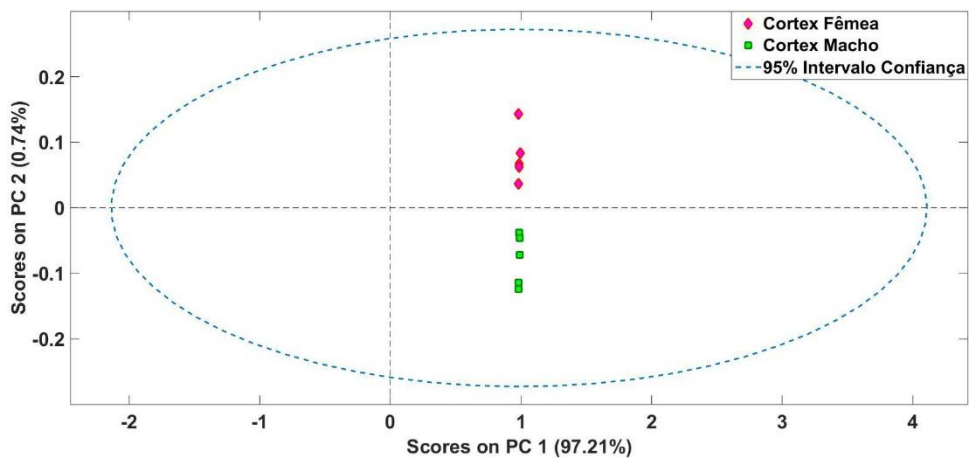


Figura 4.17. Resultado da análise por PCA para amostras de 5 fêmeas e 5 machos da região de córtex (onde a cor vermelha representa as fêmeas e a cor preta representa os machos).

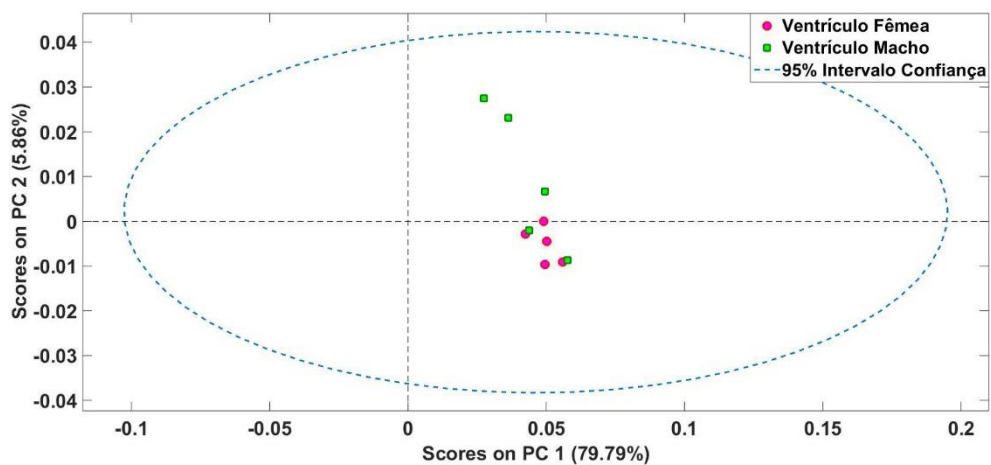


Figura 4.18. Resultado da análise por PCA para amostras de 5 fêmeas e 5 machos região do ventrículo (onde a cor amarela representa as fêmeas e a cor lilás representa os machos).

Observa-se que houve uma clara separação entre os indivíduos quando se analisou o córtex e o cerebelo. Entretanto, a análise do ventrículo não forneceu uma boa separação. Esses resultados podem colaborar com outros pesquisadores que estudam a diferença de funcionamento do cérebro em indivíduos machos e fêmeas frente a diversos estímulos, por exemplo, a diferença de comportamento de stress entre machos e fêmeas (YIN *et al.*, 2019) ou a diferença de efeitos de drogas em machos e fêmeas (SHBIRO *et al.*, 2019), a diferença dos efeitos de exercícios físicos.(SALAMA; ATTIA; ABDELRAZEK, 2019). Esses dados também abrem caminho para diferenciação cerebral de machos e fêmeas em análises forenses, como por exemplo na identificação de restos mortais.

4.5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Em resumo, esse capítulo descreveu o desenvolvimento de um novo método de ionização, o ESI grafite, em que se utiliza o grafite como um gerador de spray. O grafite usado no método é de baixo custo, disponível comercialmente, fácil de manusear, possui alta condutividade elétrica, superfície porosa que permite a adesão eficaz da solução da amostra e, assim, aquisição de sinais iônicos duráveis; renovável e ecologicamente correto.

Alguns parâmetros importantes para o método ESI grafite foram otimizados, como a espessura (1,6 mm), o ângulo do grafite em relação a entrada do espectrômetro de massas (135°), a taxa de fluxo de amostra ou solvente ($10 \mu\text{L min}^{-1}$) e a voltagem aplicada ao grafite (3 kV). A configuração ESI grafite otimizada demonstrou desempenho em termos de estabilidade do spray e intensidade de íons semelhante ao ESI convencional.

O ESI grafite foi utilizado para a análise de uma ampla gama de moléculas tais como ácido butírico, cocaína, dopamina, levonorgestrel e triptofano. Não foram detectados picos de massa interferentes significativos e os íons analitos predominantes foram verificados no espectro de massas. Além disso, o método forneceu uma distribuição de estado de carga estreita para a análise de proteínas, o que indica uma conservação da estrutura da biomolécula nativa durante o processo de ionização.

Análises quantitativas de creatinina em amostras de urina demonstraram resultados concordantes com técnicas analíticas tradicionais, e foram encontrados valores de LOD e LOQ em uma faixa de ppb. Não é sugerido que o método ESI grafite substituirá os métodos de cromatografia convencional para análise quantitativa; em vez disso, espera-se simplesmente que a triagem preliminar seja facilitada usando um método mais rápido e mais barato.

O método também foi utilizado na análise *in vitro* e *in vivo* do cérebro de camundongos, evidenciando que o ESI grafite pode ser usado para a rápida análise de lipídios sem qualquer pré-tratamento da amostra. Devido as propriedades finas e duras da ponta do grafite, é possível a amostragem de

locais específicos em amostras sólidas, como por exemplo, cantos e pequenas aberturas.

Portanto, o método ESI grafite tem a vantagem de não exigir etapas laboriosas de preparação de amostras antes da análise instrumental e ainda realizar análises de amostras sólidas.

Como perspectivas futuras, será investigado no LaCEM o uso do ESI grafite para monitoramento em tempo real de analitos de interesse em cérebro de camundongos vivos.

Como a aplicação prática para análises de amostras biológicas é viável, é necessário em trabalhos futuros, estudos mais detalhados de quantificação de analitos, realizando uma validação do método e comparando-o com métodos tradicionais, como HPLC. Além disso, pode-se testar a eficiência de ionização para uma gama maior de analitos, com massas maiores e com moléculas mais complexas. Outra possibilidade, seria modificar a superfície do grafite a fim de torná-lo mais seletivo e específico para determinados analitos.

5 CONCLUSÃO GERAL

Diante da necessidade de desenvolver metodologias analíticas simples e precisas, visando aplicações no *point-of-care* (locais de cuidados), neste trabalho foram propostas técnicas que podem ser utilizadas como plataformas alternativas em análises clínicas, além de abrir possibilidades de encontrar novos biomarcadores de doenças, facilitando o diagnóstico e tratamento.

A combinação de MIP e PSI-MS proporcionou a obtenção de um novo método, o MIP-CPS. As técnicas foram acopladas para fornecer uma superfície quimicamente seletiva e permitir uma análise específica de metabolitos urinários, como o ácido butírico, a dopamina e a sarcosina. Além disso, MIP-CPS foi um método relativamente rápido de ser preparado, pois a membrana MIP foi produzida em algumas horas e a análise por PSI realizada em segundos. O método apresentou um desempenho analítico satisfatório, uma vez que forneceu curvas de calibração lineares e LODs e LOQs em baixas concentrações, além de apresentar valores de precisão e exatidão abaixo de 20%.

O PSI foi utilizado em conjunto com a análise multivariada na busca de biomarcadores para o câncer cervical. A metodologia experimental foi avaliada e encontrou-se as melhores condições. As técnicas combinadas permitiram à classificação de plasma sanguíneo de mulheres NILM e SIL com base em uma abordagem lipidômica não direcionada, auxiliando no diagnóstico precoce do câncer do colo do útero e maior chance de cura para os indivíduos. O algoritmo iSPA-LDA foi aplicado aos dados de espectros de massas, gerando uma precisão de classificação de 77% para o diagnóstico de câncer. E encontrou-se biomarcadores lipídicos associados à diferenciação de classes, sendo que dois lipídios já foram relacionados na literatura a doenças no sistema reprodutor feminino.

Por fim, desenvolveu-se um novo método de *Substrate Electrospray Ionization*, chamado ESI grafite. Sua capacidade de ionização foi testada para diversos analitos, incluindo análises em urina e cérebro de camundongo. O método foi avaliado e encontrou-se as melhores condições de operação. O ESI grafite permitiu a quantificação de creatinina em urina. Além disso, o método

permitiu uma análise de distribuição local do cérebro, separando regiões específicas, além de separar indivíduos fêmea e macho. Portanto, o método se mostrou vantajoso por não exigir etapas laboriosas de preparação de amostras antes da análise instrumental e ainda realizar análises de amostras sólidas.

6 REFERENCIAS

AFSHINNIA, F. *et al.* Lipidomics and Biomarker Discovery in Kidney Disease. **Seminars in Nephrology**, v. 38, n. 2, p. 127–141, 2018.

ALBERICI, R. M. *et al.* Ambient mass spectrometry: Bringing MS into the “real world”. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 265–294, 2010.

ALIFERIS, K. A.; CHRYSAYI-TOKOUSBALIDES, M. Metabolomics in pesticide research and development: Review and future perspectives. **Metabolomics**, v. 7, n. 1, p. 35–53, 2011.

ALIFERIS, K. A.; JABAJI, S. Metabolomics - A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, n. 2, p. 105–117, 2011.

AMADOR, V. S. *et al.* Paper Spray Mass Spectrometry for the Forensic Analysis of Black Ballpoint Pen Inks. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 28, n. 9, p. 1965–1976, 2017.

ANNESLEY, T. M. Ion suppression in mass spectrometry. **Clinical chemistry**, v. 49, n. 7, p. 1041–4, 2003.

ANVISA. **RESOLUÇÃO – RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003.**

ANVISA. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012.**

ANVISA. **RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017.**

ARAÚJO, M. C. U. *et al.* The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 57, n. 2, p. 65–73, 2001.

ASHIZAWA, K. *et al.* Construction of mass spectra database and diagnosis algorithm for head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 75, p. 111–119, 2017.

ASSIS, C. *et al.* Combining mid infrared spectroscopy and paper spray mass spectrometry in a data fusion model to predict the composition of coffee blends.

Food Chemistry, v. 281, p. 71–77, 2019.

AU, A. Metabolomics and Lipidomics of Ischemic Stroke. In: **Advances in Clinical Chemistry**. 1. ed. Elsevier Inc., 2018. v. 85p. 31–69.

AWAD, H.; KHAMIS, M. M.; EL-ANEED, A. Mass spectrometry, review of the basics: Ionization. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 50, n. 2, p. 158–175, 2015.

BALLABIO, D.; CONSONNI, V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. **Analytical Methods**, v. 5, n. 16, p. 3790, 2013.

BALOUZ, V.; AGÜERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Chagas Disease Diagnostic Applications. In: **Advances in Parasitology**. v. 97p. 1–45.

BANERJEE, S.; BASHEER, C.; ZARE, R. N. A Study of Heterogeneous Catalysis by Nanoparticle-Embedded Paper-Spray Ionization Mass Spectrometry. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 55, n. 41, p. 12807–12811, 2016.

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1–40, 2012.

BAUERFEIND, S. *et al.* Omics Approaches for the Study of Adaptive Immunity to *Staphylococcus aureus* and the Selection of Vaccine Candidates. **Proteomes**, v. 4, n. 1, p. 11, 2016.

BERKEL, G. J. VAN; PASILIS, S. P.; OVCHINNIKOVA, O. Established and emerging atmospheric pressure surface sampling/ionization techniques for mass spectrometry. **Journal of mass spectrometry**, v. 43, p. 1161–1180, 2008.

BULEANDRA, M. *et al.* Electrochemical behavior study of some selected phenylurea herbicides at activated pencil graphite electrode. Electrooxidation of linuron and monolinuron. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 1109–1116, 2019.

CAÑADAS-GARRE, M. *et al.* Proteomic and metabolomic approaches in the search for biomarkers in chronic kidney disease. **Journal of Proteomics journal**,

2018.

CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.

CECH, N. B.; ENKE, C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, n. 6, p. 362–387, 2001.

CHAMBERLAIN, C. A.; RUBIO, V. Y.; GARRETT, T. J. Strain-Level Differentiation of Bacteria by Paper Spray Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 8, p. 4964–4968, 2019.

CHECKLEY, W. *et al.* Identifying biomarkers for asthma diagnosis using targeted metabolomics approaches. **Respiratory Medicine**, v. 121, p. 59–66, 2016.

CHEN, F. *et al.* Single-Cell Analysis Using Drop-on-Demand Inkjet Printing and Probe Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 8, p. 4354–4360, 2016.

CHEN, J. *et al.* Urinary metabolomics for discovering metabolic biomarkers of laryngeal cancer using UPLC-QTOF/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 167, p. 83–89, 2019.

CHEN, L. C. *et al.* Application of probe electrospray to direct ambient analysis of biological samples. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 2366–2374, 2008.

CHENG, S. C. *et al.* Thin layer chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry for characterizing herbal compounds. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 434, p. 264–271, 2018.

CHENG, S. C. *et al.* Simple interface for scanning chemical compounds on developed thin layer chromatography plates using electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 1049, p. 1–9, 2019.

CHIANG, S.; ZHANG, W.; OUYANG, Z. Paper spray ionization mass spectrometry: recent advances and clinical applications. **Expert Review of**

Proteomics, v. 15, n. 10, p. 781–789, 2018.

CLENDINEN, C. S.; MONGE, M. E.; FERNÁNDEZ, F. M. Ambient mass spectrometry in metabolomics. **Analyst**, v. 142, n. 17, p. 3101–3117, 2017.

CLISH, C. B. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. **Molecular Case Studies**, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2015.

CODY, R. B.; LARAMÉE, J. A.; DURST, H. D. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 8, p. 2297–2302, 2005.

COOKS, R. G. *et al.* Ambient mass spectrometry. **Science**, v. 311, n. 5767, p. 1566–1570, 2006.

COOKS, R. G.; BUSCH, K. L.; GLISH, G. L. Mass spectrometry: Analytical capabilities and potentials. **Science**, v. 222, n. 4621, p. 273–291, 1983.

COSTA, F. S. L. *et al.* Attenuated total reflection Fourier transform-infrared (ATR-FTIR) spectroscopy as a new technology for discrimination between: *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Analytical Methods**, v. 8, n. 39, p. 7107–7115, 2016.

COX, B.; SNEYD, M. J. HPV screening, invasive cervical cancer and screening policy in Australia. **Journal of the American Society of Cytopathology**, v. 7, n. 6, p. 292–299, 2018.

CUZICK, J. *et al.* Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 5, p. 1095–1101, 2006.

DA SILVA, L. C. *et al.* Paper spray ionization and portable mass spectrometers: A review. **Analytical Methods**, v. 11, n. 8, p. 999–1013, 2019.

DAMON, D. E. *et al.* Direct Biofluid Analysis Using Hydrophobic Paper Spray Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 1878–1884, 2016.

DAVID, I. G.; POPA, D.-E.; BULEANDRA, M. Pencil Graphite Electrodes: A

Versatile Tool in Electroanalysis. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2017, n. Cv, p. 1–22, 2017.

DAVISON, J. *et al.* A systematic review of metabolite biomarkers of schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 195, p. 32–50, 2018.

DAWSON, G. Measuring brain lipids. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 8, p. 1026–1039, 2015.

DBIRA, S. *et al.* The electrolytic treatment of synthetic urine using DSA electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 744, p. 62–68, 2015.

DE ARAÚJO GOMES, A. *et al.* The successive projections algorithm for interval selection in PLS. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 202–208, 2013.

DE, H. E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. Third Edit ed. Wiley, 2013.

DECRAMER, S. *et al.* Urine in Clinical Proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, n. 10, p. 1850–1862, 2008.

DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, p. 51– 78, 2007.

DEVENPORT, N. A. *et al.* Direct determination of urinary creatinine by reactive-thermal desorption-extractive electrospray-ion mobility-tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 1, p. 357–361, 2014.

DI DONNA, L. *et al.* Rapid assay of resveratrol in red wine by paper spray tandem mass spectrometry and isotope dilution. **Food Chemistry**, v. 229, p. 354–357, 2017.

DIAS, D. A. *et al.* Metabolomics and its use in ecology. **Austral Ecology**, v. 38, n. 6, p. 713–720, 2013.

DOMINGOS, E. *et al.* Paper spray ionization mass spectrometry applied to forensic chemistry-drugs of abuse, inks and questioned documents. **Analytical Methods**, v. 9, n. 30, p. 4400–4409, 2017.

DONALDSON, A. E.; LAMONT, I. L. Estimation of post-mortem interval using biochemical markers. **Australian Journal of Forensic Sciences**, v. 46, n. 1, p. 8–26, 2014.

DUARTE, L. C. *et al.* 3D printing of microfluidic devices for paper-assisted direct spray ionization mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 8, n. 3, p. 496–503, 2016.

EDWARD, H. *et al.* Diet and biomarkers of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **Neurobiology of Aging**, v. 76, p. 45-52, 2019.

FAIVRE, F. *et al.* The hidden side of Parkinson's disease: Studying pain, anxiety and depression in animal models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 96, p. 335–352, 2019.

FEDICK, P. W.; BAIN, R. M. Swab touch spray mass spectrometry for rapid analysis of organic gunshot residue from human hand and various surfaces using commercial and fieldable mass spectrometry systems. **Forensic Chemistry**, v. 5, p. 53–57, 2017.

FEIDER, C. L. *et al.* Ambient Ionization Mass Spectrometry: Recent Developments and Applications. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 7, p. 4266–4290, 2019.

FENN, J. B. *et al.* Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 1989.

FERGUSON, L. R. *et al.* Transcriptomics to study the effect of a Mediterranean-inspired diet on inflammation in Crohn's disease patients. **Human Genomics**, v. 7, n. 1, p. 24, 2013.

FERNANDES, A. *et al.* Graphene Oxides Coated Paper as a Substrate to Paper Spray Ionization Mass Spectrometry for Creatinine Determination in Urine Samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 5, p. 1074–1081, 2019.

FIEHN, O. *et al.* Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature**

Biotechnology, v. 18, p. 1157–1161, 2000.

GAMA, M. R.; BOTTOLI, C. B. G. Molecularly imprinted polymers for bioanalytical sample preparation. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1043, p. 107–121, 2017.

GIKA, H. G. **Metabolomics : An Analytical Perspective**. 3. ed. Elsevier Inc., 2018.

GILES, C. *et al.* Contemporary lipidomic analytics: opportunities and pitfalls. **Progress in Lipid Research**, v. 71, p. 86–100, 2018.

GLASS, C. K.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 5, p. 635–645, 2012.

GÓMEZ-RÍOS, G. A. *et al.* Rapid determination of immunosuppressive drug concentrations in whole blood by coated blade spray-tandem mass spectrometry (CBS-MS/MS). **Analytica Chimica Acta**, v. 999, p. 69–75, 2018.

GÓMEZ-RÍOS, G. A.; PAWLISZYN, J. Development of coated blade spray ionization mass spectrometry for the quantitation of target analytes present in complex matrices. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 52, p. 14503–14507, 2014.

GOWDA, G. A. N.; RAFTERY, D. Biomarker Discovery and Translation in Metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, n. 3, p. 227–240, 2013.

GREGORIO, C. DE; NUNZIO, D. DI; BELLA, G. DI. Athlete's Heart and Left Heart Disease Cesare. **Panminerva Medica**, v. 54, n. 1, p. 39–44, 2012.

GRIFFITHS, W. J. *et al.* Targeted metabolomics for biomarker discovery. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 32, p. 5426–5445, 2010.

GUO, T. *et al.* Paper spray ionization mass spectrometry for rapid quantification of illegal beverage dyes. **Analytical Methods**, v. 9, n. 44, p. 6273–6279, 2017.

GUTHRIE, R.; SUSI, A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. **Pediatrics**, v. 32, p.

338–343, 1963.

HAN, J. *et al.* Mass spectrometry-based technologies for high-throughput metabolomics. **Bioanalysis**, v. 1, n. 9, p. 1665–1684, 2009.

HAN, X.; GROSS, R. W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 6, p. 1071–1079, 2003.

HASANZADEH, M.; SHADJOU, N.; GUARDIA, M. DE LA. Current advancement in electrochemical analysis of neurotransmitters in biological fluids. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 86, p. 107–121, 2017.

HAYASHI, Y. *et al.* Intact metabolite profiling of mouse brain by probe electrospray ionization/triple quadrupole tandem mass spectrometry (PESI/MS/MS) and its potential use for local distribution analysis of the brain. **Analytica Chimica Acta**, v. 983, p. 160–165, 2017.

HAZARIKA, P.; RUSSELL, D. A. Advances in fingerprint analysis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 15, p. 3524–3531, 2012.

HAZEN, S. L. Oxidized Phospholipids as Endogenous Pattern Recognition Ligands in Innate Immunity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 23, p. 15527–15531, 2008.

HEANEY, L. M.; DEIGHTON, K.; SUZUKI, T. Non-targeted metabolomics in sport and exercise science. **Journal of Sports Sciences**, v. 00, n. 00, p. 1–9, 2017.

HECHT, M. *et al.* Sponge sprayreaching new dimensions of direct sampling and analysis by MS. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 21, p. 11592–11597, 2017.

HIJAZI, H. Y.; BOTTARO, C. S. Analysis of thiophenes in seawater: Molecularly imprinted polymer thin-film extraction with desorption electrospray ionization mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 443, p. 9–15, 2019.

HIRAOKA, K. *et al.* Development of probe electrospray using a solid needle. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 3139–3144, 2007.

HIRATA, Y. *et al.* Identification of highly sensitive biomarkers that can aid the early detection of pancreatic cancer using GC/MS/MS-based targeted metabolomics. **Clinica Chimica Acta**, v. 468, p. 98–104, 2017.

HO, C. *et al.* Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. **Clin Biochem Rev**, v. 24, p. 3–12, 2003.

HOLMES, E.; WILSON, I. D.; NICHOLSON, J. K. Metabolic Phenotyping in Health and Disease. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 714–717, 2008.

HONG, C. M. *et al.* Generating electrospray from solutions predeposited on a copper wire. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 13, n. 1, p. 21–25, 1999.

HOU, H. *et al.* LC-MS-MS measurements of urinary creatinine and the application of creatinine normalization technique on cotinine in smokers' 24 hour urine. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 1, n. 1, 2012.

HSU, C. C.; DORRESTEIN, P. C. Visualizing life with ambient mass spectrometry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 31, p. 24–34, 2015.

HSU, F. L. *et al.* Interfaces to connect thin-layer chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 10, p. 2493–2498, 2003.

HU, B. *et al.* Electrospray ionization using wooden tips. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 21, p. 8201–8207, 2011.

HU, B. *et al.* Surface-Modified Wooden-Tip Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Enhanced Detection of Analytes in Complex Samples. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 3, p. 1759–1766, 2018.

HU, J. *et al.* A novel and sensitive sarcosine biosensor based on organic electrochemical transistor. **Electrochimica Acta**, v. 307, p. 100–106, 2019.

HUANG, M. *et al.* Ambient Ionization Mass Spectrometry. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 43–65, 2010.

HUANG, M. Z. *et al.* Ambient ionization mass spectrometry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 702, n. 1, p. 1–15, 2011.

HUANG, Y. *et al.* Rapid and sensitive detection of trace malachite green and its metabolite in aquatic products using molecularly imprinted polymer-coated wooden-tip electrospray ionization mass spectrometry. **RSC Advances**, v. 7, n. 82, p. 52091–52100, 2017.

HUANG, Z. *et al.* Analytical Properties of Electrospray Ionization Mass Spectrometry with Solid Substrates and Nonpolar Solvents. **Analytica Chimica Acta**, v. 1050, p. 105-112, 2018.

ILLES, S. More than a drainage fluid: the role of CSF in signaling in the brain and other effects on brain tissue. In: **Handbook of Clinical Neurology**. 1. ed. Elsevier B.V., 2017. v. 146p. 3–20.

IMAI, K. *et al.* Reactivation of latent HIV-1 by a wide variety of butyric acid-producing bacteria. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 15, p. 2583–2592, 2012.

JACKSON, S. N.; WANG, H. Y. J.; WOODS, A. S. In situ structural characterization of phosphatidylcholines in brain tissue using MALDI-MS/MS. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, n. 12, p. 2052–2056, 2005a.

JACKSON, S. N.; WANG, H. Y. J.; WOODS, A. S. Direct profiling of lipid distribution in brain tissue using MALDI-TOFMS. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 14, p. 4523–4527, 2005b.

JARMUSCH, A. K. *et al.* Direct ion generation from swabs. **Talanta**, v. 184, p. 356–363, 2018.

JASBI, P. *et al.* Breast cancer detection using targeted plasma metabolomics. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1105, n. 2018, p. 26–37, 2019.

JEMAL, A.; WARD, E.; THUN, M. Declining death rates reflect progress against

cancer. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. 1–10, 2010.

JOHNSON, C. H.; IVANISEVIC, J.; SIUZDAK, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 17, n. 7, p. 451–9, 2016.

JORNET-MARTÍNEZ, N. *et al.* Towards sarcosine determination in urine for prostatic carcinoma detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 287, p. 380–389, 2019.

KADDURAH-DAOUK, R.; KRISTAL, B. S.; WEINSHILBOUM, R. M. Metabolomics: A Global Biochemical Approach to Drug Response and Disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 653–683, 2008.

KANG, H. *et al.* Exploration of candidate biomarkers for human psoriasis based on gas chromatography-mass spectrometry serum metabolomics. **British Journal of Dermatology**, v. 176, n. 3, p. 713–722, 2017.

KARIUKI, J. K. An Electrochemical and Spectroscopic Characterization of Pencil Graphite Electrodes. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 159, n. 9, p. H747–H751, 2012.

KAWDE, A. N.; BAIG, N.; SAJID, M. Graphite pencil electrodes as electrochemical sensors for environmental analysis: A review of features, developments, and applications. **RSC Advances**, v. 6, n. 94, p. 91325–91340, 2016.

KEATING, J. E. *et al.* Paper spray mass spectrometry for high-throughput quantification of nicotine and cotinine. **Analytical Methods**, v. 10, n. 1, p. 46–50, 2018.

KEBARLE, P.; VERKERK, U. H. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, p. 898–917, 2009.

KELLY, J. G. *et al.* Biospectroscopy to metabolically profile biomolecular

structure: A multistage approach linking computational analysis with biomarkers. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 4, p. 1437–1448, 2011.

KENICHI, I.; KUNIYASU, O. Effect of microbial coinfection with HIV-1 and butyric acid-producing anaerobic bacteria on AIDS progression. **Journal of Oral Biosciences**, v. 55, n. 2, p. 55–60, 2013.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Technometrics Computer Aided Design of Experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137–148, 1969.

KENNEDY, J. H. *et al.* Rapid analysis of fentanyl and other novel psychoactive substances in substance use disorder patient urine using paper spray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 32, n. 15, p. 1280–1286, 2018.

KIM, D. *et al.* Estimating degree of degradation of spilled oils based on relative abundance of aromatic compounds observed by paper spray ionization mass spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 359, p. 421–428, 2018.

KIP, A. E. *et al.* Systematic review of biomarkers to monitor therapeutic response in leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 1–14, 2015.

KONERMANN, L. *et al.* Unraveling the mechanism of electrospray ionization. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 2–9, 2013.

KOZAR, N. *et al.* Metabolomic profiling suggests long chain ceramides and sphingomyelins as a possible diagnostic biomarker of epithelial ovarian cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 481, p. 108–114, 2018.

KRUNGKRAI, S. R.; KRUNGKRAI, J. Insights into the pyrimidine biosynthetic pathway of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* as chemotherapeutic target. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 525–534, 2016.

KUMAR, P. *et al.* Construction and application of amperometric sarcosine biosensor based on SOxNPs/AuE for determination of prostate cancer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 122, p. 140–146, 2018.

LASKIN, J.; LANEKOFF, I. Ambient Mass Spectrometry Imaging Using Direct Liquid Extraction Techniques. **Anal Chem**, v. 88, n. 1, p. 52–73, 2016.

LEE, C. C. *et al.* Ambient imaging mass spectrometry by electrospray ionization using solid needle as sampling probe. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 44, n. 10, p. 1469–1477, 2009.

LEE, J. W.; KIM, H. I. Solvent-induced structural transitions of lysozyme in an electrospray ionization source. **Analyst**, v. 140, n. 10, p. 3573–3580, 2015.

LEHMANN, S. *et al.* Clinical mass spectrometry proteomics (cMSP) for medical laboratory: What does the future hold? **Clinica Chimica Acta**, v. 467, p. 51-58, 2017.

LI, A. *et al.* Robotic Surface Analysis Mass Spectrometry (RoSA-MS) of Three-Dimensional Objects. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 6, p. 3981–3986, 2018a.

LI, H. *et al.* Carbon nanodots: Synthesis, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 46, p. 24230–24253, 2012.

LI, J. *et al.* Polystyrene-impregnated paper substrates for direct mass spectrometric analysis of proteins and peptides in complex matrices. **Analytical Methods**, v. 10, n. 24, p. 2803–2811, 2018b.

LI, X. *et al.* Monolith dip-it: A bifunctional device for improving the sensitivity of direct analysis in real time mass spectrometry. **Analyst**, v. 141, n. 16, p. 4947–4952, 2016.

LIN, K. Y.; LOW, G. H.; CHUANG, I. L. Effects of electrode surface roughness on motional heating of trapped ions. **Physical Review A**, v. 94, n. 1, p. 1–11, 2016.

LIU, R. *et al.* T-Probe: An Integrated Microscale Device for Online in Situ Single Cell Analysis and Metabolic Profiling Using Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 18, p. 11078–11085, 2018a.

LIU, Y. *et al.* Sensitive analysis of trace macrolide antibiotics in complex food samples by ambient mass spectrometry with molecularly imprinted polymer-coated wooden tips. **Talanta**, v. 204, p. 238–247, 2019.

LIU, Z. *et al.* Electrochemical sensor integrated microfluidic device for sensitive and simultaneous quantification of dopamine and 5-hydroxytryptamine. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 273, p. 873–883, 2018b.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. The analytical process to search for metabolomics biomarkers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 341–349, 2018.

MANDAL, M. K. *et al.* Detection of biomolecules from solutions with high concentration of salts using probe electrospray and nano-electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 2, n. 12, p. 1905–1912, 2010.

MANDAL, M. K. *et al.* Detection of protein from detergent solutions by probe electrospray ionization mass spectrometry (PESI-MS). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 46, n. 10, p. 967–975, 2011.

MANDAL, M. K. *et al.* Application of probe electrospray ionization mass spectrometry (PESI-MS) to clinical diagnosis: Solvent effect on lipid analysis. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 23, n. 11, p. 2043–2047, 2012.

MANDAL, M. K.; CHEN, L. C.; HIRAOKA, K. Sequential and exhaustive ionization of analytes with different surface activity by probe electrospray ionization. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 22, n. 9, p. 1493–1500, 2011.

MARÍN-SÁEZ, J.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; GARRIDO FRENICH, A. Reliable determination of tropane alkaloids in cereal based baby foods coupling on-line SPE to mass spectrometry avoiding chromatographic step. **Food Chemistry**, v. 275, p. 746–753, 2019.

MARTÍNEZ-GARDEAZABAL, J. *et al.* Lipid mapping of the rat brain for models of disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1859, n. 9, p. 1548–1557, 2017.

MASOODI, M. *et al.* Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of**

Lipids, v. 1851, n. 4, p. 503–518, 2015.

MATHUR, A. *et al.* Use of ESI-MS for semi-quantitative estimation of inactive precursor in no-carrier-added ¹³¹I- meta-Iodobenzylguanidine radiopharmaceutical preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 165, p. 261–267, 2019.

MCKENNA, J. *et al.* Toxicological drug screening using paper spray high-resolution tandem mass spectrometry (HR-MS/MS). **Journal of Analytical Toxicology**, v. 42, n. 5, p. 300–310, 2018.

MEDER, D. *et al.* The role of dopamine in the brain - lessons learned from Parkinson's disease. **NeuroImage**, v. 190, p. 79–93, 2019.

MICHELY, J. A.; MEYER, M. R.; MAURER, H. H. Paper Spray Ionization Coupled to High Resolution Tandem Mass Spectrometry for Comprehensive Urine Drug Testing in Comparison to Liquid Chromatography-Coupled Techniques after Urine Precipitation or Dried Urine Spot Workup. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 21, p. 11779–11786, 2017.

MIDDLETON, J. E.; W. J. Griffiths. rapid colorimetric micro-method for estimating glucose in blood and c.s.f. using glucose oxidase. **British Medical Journal**, p. 1525–1527, 1957.

MILHAS, D.; CLARKE, C. J.; HANNUN, Y. A. Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: Implications for bioactive sphingolipids. **FEBS Letters**, v. 584, n. 9, p. 1887–1894, 2010.

MIRZAIAN, M.; KRAMER, G.; POORTHUIS, B. J. H. M. Quantification of sulfatides and lysosulfatides in tissues and body fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 4, p. 936–943, 2015.

MONGE, M. E. *et al.* Mass Spectrometry: Recent Advances in Direct Open Air Surface Sampling/Ionization. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2269–2308, 2013.

MORAIS, C. L. M.; LIMA, K. M. G. Comparing unfolded and two-dimensional discriminant analysis and support vector machines for classification of EEM data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 170, p. 1–12, 2017.

MORAN, L. J. *et al.* The association of the lipidomic profile with features of polycystic ovary syndrome. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 59, n. 1, p. 93–104, 2017.

NACCARATO, A. *et al.* Development of a simple and rapid solid phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method for the analysis of dopamine, serotonin and norepinephrine in human urine. **Analytica chimica acta**, v. 810, p. 17–24, 2014.

NAGARAJAN, S. *et al.* Electrochemical fabrication of reusable pencil graphite electrodes for highly sensitive, selective and simultaneous determination of hydroquinone and catechol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 846, p. 113–156, 2019.

NAMIE, J. *et al.* Main strategies, analytical trends and challenges in LC-MS and ambient mass spectrometry e based metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 108, p. 278–295, 2018.

NANOTECHNOLOGY, S. **Electrospray**. Disponível em: <<https://nanotechnologiesolutions.wordpress.com/>>. Acesso em: 30 maio 2019.

NEZHADALI, A.; FEIZY, J.; BEHESHTI, H. R. A Molecularly Imprinted Polymer for the Selective Extraction and Determination of Fenvalerate from Food Samples Using High-Performance Liquid Chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 5, p. 1225–1237, 2015.

NG, T. T. *et al.* Rapid detection and quantitation of drugs-of-abuse by wooden-tip electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 2, p. 428–438, 2019.

NINOMIYA, S. *et al.* Probe electrospray ionization of mixture solutions using metal needles with different tip conditions. **Surface and Interface Analysis**, p. 1–5, 2018.

OBERACHER, H.; ARNHARD, K. Compound identification in forensic toxicological analysis with untargeted LC-MS-based techniques. **Bioanalysis**, v. 7, n. 21, p. 2825–2840, 2015.

OLSTAD, E. W. *et al.* Ciliary Beating Compartmentalizes Cerebrospinal Fluid Flow in the Brain and Regulates Ventricular Development. **Current Biology**, v. 29, n. 2, p. 229- 241.e6, 2019.

OUYANG, Z.; ZHANG, X. Ambient mass spectrometry. **Analyst**, v. 135, p. 659–660, 2010.

PARIKH, N. I.; VASAN, R. S. Assessing the clinical utility of biomarkers in medicine. **Biomarkers in Medicine**, v. 1, n. 3, p. 419–436, 2007.

PARK, S.; SEO, Y. S.; HEGEMAN, A. D. Plant metabolomics for plant chemical responses to belowground community change by climate change. **Journal of Plant Biology**, v. 57, n. 3, p. 137–149, 2014.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 263-269, 2012.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introduction to Spectroscopy**. 4th edition. Cengage Learning, 2009.

PEÑA-BAUTISTA, C. *et al.* Plasma metabolomics in early Alzheimer's disease patients diagnosed with amyloid biomarker. **Journal of Proteomics**, v. 200, p. 144–152, 2019.

PEÑUELA-PINTO, O. *et al.* Selective determination of clenbuterol residues in urine by molecular imprinted polymer—Ion mobility spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 62–67, 2017.

PEREIRA, I. *et al.* Molecularly imprinted polymer (MIP) membrane assisted direct spray ionization mass spectrometry for agrochemicals screening in foodstuffs. **Talanta**, v. 178, p. 507–514, 2018.

PIRRO, V. *et al.* Direct drug analysis from oral fluid using medical swab touch

spray mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 861, p. 47–54, 2015.

POLLARD, T. *et al.* **Cell Biology**. 3rd Edition. Elsevier, 2016.

PURUSHOTHAMA, H. T. *et al.* Pencil graphite electrode as an electrochemical sensor for the voltammetric determination of chlorpromazine. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 3, n. 2, p. 161–166, 2018.

RESCHKE, B. R.; TIMPERMAN, A. T. A study of electrospray ionization emitters with differing geometries with respect to flow rate and electrospray voltage. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 22, n. 12, p. 2115–2124, 2011.

RESENDE, S. F. *et al.* On-surface photocatalytic degradation of methylene blue: In situ monitoring by paper spray ionization mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 418, p. 107–111, 2017.

REYES-GARCÉS, N.; GIONFRIDDO, E. Recent developments and applications of solid phase microextraction as a sample preparation approach for mass-spectrometry-based metabolomics and lipidomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 113, p. 172-181, 2019.

RIBBENSTEDT, A.; ZIARRUSTA, H.; BENSKIN, J. P. Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, p. 1–18, 2018.

RIZZO, A. E.; FELDMAN, S. Update on primary HPV screening for cervical cancer prevention. **Current Problems in Cancer**, v. 42, n. 5, p. 507–520, 2018.

ROMANOWSKI, S., WOJTCZAK, L. Electrode Surface Roughness. In: **Green Functions in Electrochemistry**. First ed. New York: Springer Netherlands, 1997. p. 217–249.

SAHA, S.; MANDAL, M. K.; HIRAOKA, K. Direct detection of trace level illicit drugs in human body fluids by probe electrospray ionization mass spectrometry (PESI-MS). **Analytical Methods**, v. 5, n. 18, p. 4731–4738, 2013.

SALAMA, O. A.; ATTIA, M. M.; ABDELRAZEK, M. A. S. Modulatory effects of

swimming exercise against malathion induced neurotoxicity in male and female rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 157, p. 13–18, 2019.

SANTOS, M. C. D. *et al.* Spectroscopy with computational analysis in virological studies: A decade (2006–2016). **Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 244–256, 2017.

SARKAR, D.; SOM, A.; PRADEEP, T. Catalytic Paper Spray Ionization Mass Spectrometry with Metal Nanotubes and the Detection of 2,4,6-Trinitrotoluene. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 21, p. 11378–11382, 2017.

SCALBERT, A. *et al.* Narrative Review The food metabolome : a window over dietary exposure. **The American Journal of Clinical Nutrition**, p. 1286–1308, 2014.

SERGEYEVA, T. A. *et al.* Molecularly imprinted polymer membranes for substance-selective solid-phase extraction from water by surface photo-grafting polymerization. **Journal of Chromatography A**, v. 907, n. 1–2, p. 89–99, 2001.

SHANTA, S. R. *et al.* Global changes in phospholipids identified by MALDI MS in rats with focal cerebral ischemia. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 9, p. 1823–1831, 2012.

SHBIRO, L. *et al.* Effects of cannabidiol in males and females in two different rat models of depression. **Physiology and Behavior**, v. 201, p. 59–63, 2019.

SILVA, Igor Pereira da. **Espectrometria de massas ambiente: novas abordagens para análise de pesticidas em alimentos**. 2018. 114 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018. Disponível em: <<http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/9246>>. Acesso em: 29 abr. 2019.

SIMPSON, M. J.; MCKELVIE, J. R. Environmental metabolomics: New insights into earthworm ecotoxicity and contaminant bioavailability in soil. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 1, p. 137–149, 2009.

SMITH, A. M. *et al.* Amino Acid Dysregulation Metabotypes: Potential Biomarkers

for Diagnosis and Individualized Treatment for Subtypes of Autism Spectrum Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 85, n. 4, p. 345–354, 2019.

SNEHA, M.; DULAY, M. T.; ZARE, R. N. Introducing mass spectrometry to first-year undergraduates: Analysis of caffeine and other components in energy drinks using paper-spray mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 418, p. 156–161, 2017.

SO, P.-K.; HU, B.; YAO, Z.-P. Electrospray Ionization on Solid Substrates. **Mass Spectrometry**, v. 3, n. Special_Issue, p. S0028–S0028, 2014.

SORRIBES-SORIANO, A. *et al.* Magnetic molecularly imprinted polymers for the selective determination of cocaine by ion mobility spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1545, p. 22–31, 2018.

SPELTINI, A. *et al.* Newest applications of molecularly imprinted polymers for extraction of contaminants from environmental and food matrices: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 974, p. 1–26, 2017.

STEFANOVIC, E.; FITZGERALD, G.; MCAULIFFE, O. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. **Food Microbiology**, v. 61, p. 33–49, 2017.

STEIN, T. P. *et al.* Weight loss, the gut and the inflammatory response in AIDS patients. **Cytokine**, v. 9, n. 2, p. 143–147, 1997.

STOKVIS, E.; ROSING, H.; BEIJNEN, J. H. Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: Necessity or not? **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 3, p. 401–407, 2005.

TAKÁTS, Z. *et al.* Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 471–473, 2004.

TANG, Y. *et al.* Metabolomics workflow for lung cancer: Discovery of biomarkers. **Clinica Chimica Acta**, v. 495, p. 436–445, 2019.

TASCON, M. *et al.* High-Throughput Screening and Quantitation of Target

Compounds in Biofluids by Coated Blade Spray-Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 16, p. 8421–8428, 2017.

TAVARES, L. S. *et al.* Paper Spray Tandem Mass Spectrometry Based on Molecularly Imprinted Polymer Substrate for Cocaine Analysis in Oral Fluid. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 29, n. 3, p. 566–572, 2018.

TEODORO, J. A. R. *et al.* Paper spray mass spectrometry and chemometric tools for a fast and reliable identification of counterfeit blended Scottish whiskies. **Food Chemistry**, v. 237, p. 1058–1064, 2017a.

TEODORO, J. A. R. *et al.* Forensic discrimination between authentic and counterfeit perfumes using paper spray mass spectrometry and multivariate supervised classification. **Analytical Methods**, v. 9, n. 34, p. 4979–4987, 2017b.

TEUNISSEN, S. F. *et al.* Novel Selectivity-Based Forensic Toxicological Validation of a Paper Spray Mass Spectrometry Method for the Quantitative Determination of Eight Amphetamines in Whole Blood. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 28, n. 12, p. 2665–2676, 2017.

TIAN, H.; LAM, S. M.; SHUI, G. Metabolomics, a powerful tool for agricultural research. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, 2016.

TOLSTIKOV, V. *et al.* Clinical metabolomics: a pivotal tool for companion diagnostic development and precision medicine. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 5, p. 411–413, 2017.

TRIVEDI, D. K.; HOLLYWOOD, K. A.; GOODACRE, R. Metabolomics for the masses: The future of metabolomics in a personalized world. **New Horizons in Translational Medicine**, v. 3, n. 6, p. 294–305, 2017.

URBAN, P. L. Quantitative mass spectrometry: An overview. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2079, p. 261–267, 2019.

USMANOV, D. T. *et al.* Probe electrospray ionization mass spectrometry with

discontinuous atmospheric pressure interface. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 21, n. 3, p. 327–334, 2015.

USUI, K. *et al.* Application of probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry to ultra-rapid determination of glufosinate and glyphosate in human serum. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 174, p. 175-181, 2019a.

USUI, K. *et al.* An ultra-rapid drug screening method for acetaminophen in blood serum based on probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Food and Drug Analysis**, n. xxxx, 2019b.

VAN HALL, G. The Physiological Regulation of Skeletal Muscle Fatty Acid Supply and Oxidation During Moderate-Intensity Exercise. **Sports Medicine**, v. 45, p. 23–32, 2015.

VANDERGRIFF, G. W. *et al.* Paper spray mass spectrometry for the direct, semi-quantitative measurement of fentanyl and norfentanyl in complex matrices. **Clinical Biochemistry**, v. 54, n. 2017, p. 106–111, 2018.

VANECKOVA, T. *et al.* Molecularly imprinted polymers coupled to mass spectrometric detection for metallothionein sensing. **Talanta**, v. 198, p. 224–229, 2019.

VASILJEVIC, T.; SINGH, V.; PAWLISZYN, J. Miniaturized SPME tips directly coupled to mass spectrometry for targeted determination and untargeted profiling of small samples. **Talanta**, v. 199, p. 689–697, 2019.

VENTER, A.; NEFLIU, M.; GRAHAM COOKS, R. Ambient desorption ionization mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 284–290, 2008.

VENTER, A. R. *et al.* Mechanisms of real-time , proximal sample processing during ambient ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 1, p . 233-249, 2013.

VISHNU, N.; BADHULIKA, S. Single step grown MoS₂ on pencil graphite as an

electrochemical sensor for guanine and adenine: A novel and low cost electrode for DNA studies. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 124–125, p. 122–128, 2019.

VU, M. *et al.* Cervical cancer worldwide. **Current Problems in Cancer**, v. 42, n. 5, p. 457–465, 2018.

WAN, L. *et al.* In situ analysis of unsaturated fatty acids in human serum by negative-ion paper spray mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 1075, p. 120-127, 2019.

WANG, H. *et al.* Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 5, p. 877–880, 2010.

WANG, H. *et al.* Screening of antimicrobials in animal-derived foods with desorption corona beam ionization (DCBI) mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 272, p. 411–417, 2019a.

WANG, X. *et al.* Rapid liquid-phase microextraction of analytes from complex samples on superwetting porous silicon for onsite SALDI-MS analysis. **Talanta**, v. 198, p. 63–70, 2019b.

WARNER, D. F. Mycobacterium tuberculosis metabolism. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 4, 2015.

Washington University in St. Louis. Disponível em: <<https://sites.wustl.edu/animalsurgerycore/>>. Acesso em: 05 junho 2019.

Web of Science “metabolimics” “clinical”. Análise de resultados. Disponível em:

<[www.https://apps.webofknowledge.com/Search.do?product=WOS&SID=8AXF7oiyhKVcCFubaol&search_mode=GeneralSearch&prID=7a463947-f4cd-4ae0-bcc0-ad9984d650e0](https://apps.webofknowledge.com/Search.do?product=WOS&SID=8AXF7oiyhKVcCFubaol&search_mode=GeneralSearch&prID=7a463947-f4cd-4ae0-bcc0-ad9984d650e0)>. Acesso em: 25 abril 2019.

WEI, P. *et al.* Analysis of bacteria using zero volt paper spray. **Analytical Methods**, v. 8, n. 8, p. 1770–1773, 2016.

WEINBERGER, K. M. *et al.* Profiling the human response to physical exercise: a computational strategy for the identification and kinetic analysis of metabolic biomarkers. **Journal of Clinical Bioinformatics**, v. 1, n. 1, p. 34, 2011.

WISHART, D. S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, n. 9, p. 482–493, 2008.

WISHART, D. S. Advances in metabolite identification. **Bioanalysis**, v. 3, n. 15, p. 1769–82, 2011.

WISHART, D. S. *et al.* HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 801–807, 2013.

WISHART, D. S. *et al.* HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D608–D617, 2018.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. **Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 20, p. 4451–4459, 1984.

YANG, K.; HAN, X. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 11, p. 954–969, 2016.

YANG, Y. *et al.* Rapid and on-site analysis of amphetamine-type illicit drugs in whole blood and raw urine by slug-flow microextraction coupled with paper spray mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 1032, p. 75–82, 2018.

YIN, W. *et al.* Repeated social defeat in female mice induces anxiety-like behavior associated with enhanced myelopoiesis and increased monocyte accumulation in the brain. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 78, n. November 2018, p. 131–142, 2019.

YOSHIMURA, K. *et al.* Physical properties of the probe electrospray ionization (PESI) needle applied to the biological samples. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 44, n. 6, p. 978–985, 2009.

YU, M. *et al.* Rapid analysis of benzoic acid and vitamin C in beverages by paper spray mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 268, p. 411–415, 2018.

YU, Z. *et al.* Direct Profiling of Phytochemicals in Tulip Tissues and In Vivo Monitoring of the Change of Carbohydrate Content in Tulip Bulbs by Probe Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n. 12, p. 2304–2311, 2009.

YU, Z. *et al.* Real-time reaction monitoring by probe electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 1507–1513, 2010.

YULIANA, N. D. *et al.* Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 2, p. 157–169, 2011.

ZAITSU, K. *et al.* Intact Endogenous Metabolite Analysis of Mice Liver by Probe Electrospray Ionization/Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry and Its Preliminary Application to in Vivo Real-Time Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 7, p. 3556–3561, 2016.

ZAITSU, K. *et al.* In Vivo Real-Time Monitoring System Using Probe Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry for Metabolites in Mouse Brain. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 7, p. 4695-4701, 2018.

ZHANG, C.; GLAROS, T.; MANICKE, N. E. Targeted Protein Detection Using an All-in-One Mass Spectrometry Cartridge. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 32, p. 10996–10999, 2017.

ZHANG, H. *et al.* Metabolomic profiling reveals potential biomarkers in esophageal cancer progression using liquid chromatography-mass spectrometry platform. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 491, n. 1, p. 119–125, 2017a.

ZHANG, J. *et al.* Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 406, p. eaan3968, 2017b.

ZHANG, M. *et al.* Membrane Electrospray Ionization for Direct Ultrasensitive Biomarker Quantitation in Biofluids Using Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 6, p. 3123–3128, 2015.

ZHANG, W. *et al.* Ambient ionization and miniature mass spectrometry systems for disease diagnosis and therapeutic monitoring. **Theranostics**, v. 7, n. 12, p. 2968–2981, 2017c.

ZHANG, X. *et al.* Molecularly imprinted solid phase microextraction fiber for trace analysis of catecholamines in urine and serum samples by capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 99, p. 270–276, 2012.

ZHAO, H. *et al.* Potential biomarkers of Parkinson's disease revealed by plasma metabolic profiling. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1081–1082, p. 101–108, 2018.

ZHAO, Y.; VAZIRI, N. D.; LIN, R. Lipidomics : New Insight Into Kidney Disease. In: **Advances in Clinical Chemistry**. 1. ed. Elsevier Inc., 2015. v. 68p. 153–175.

ZHAO, Y. Y.; CHENG, X. LONG; LIN, R. C. Lipidomics Applications for Discovering Biomarkers of Diseases in Clinical Chemistry. In: **International Review of Cell and Molecular Biology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 313p. 1–26.

ZHI-PING, Z.; XIAO-NING, L.; YA-JUN, Z. Ambient Ionization-Paper Spray Ionization and Its Application. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 145–152, 2014.

ZHOU, Z. *et al.* Nanotip Ambient Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 10, p. 5542–5548, 2016.

ZUO, Y. *et al.* Determination of uric acid and creatinine in human urine using hydrophilic interaction chromatography. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1707–1710, 2011.

7 APÊNDICE

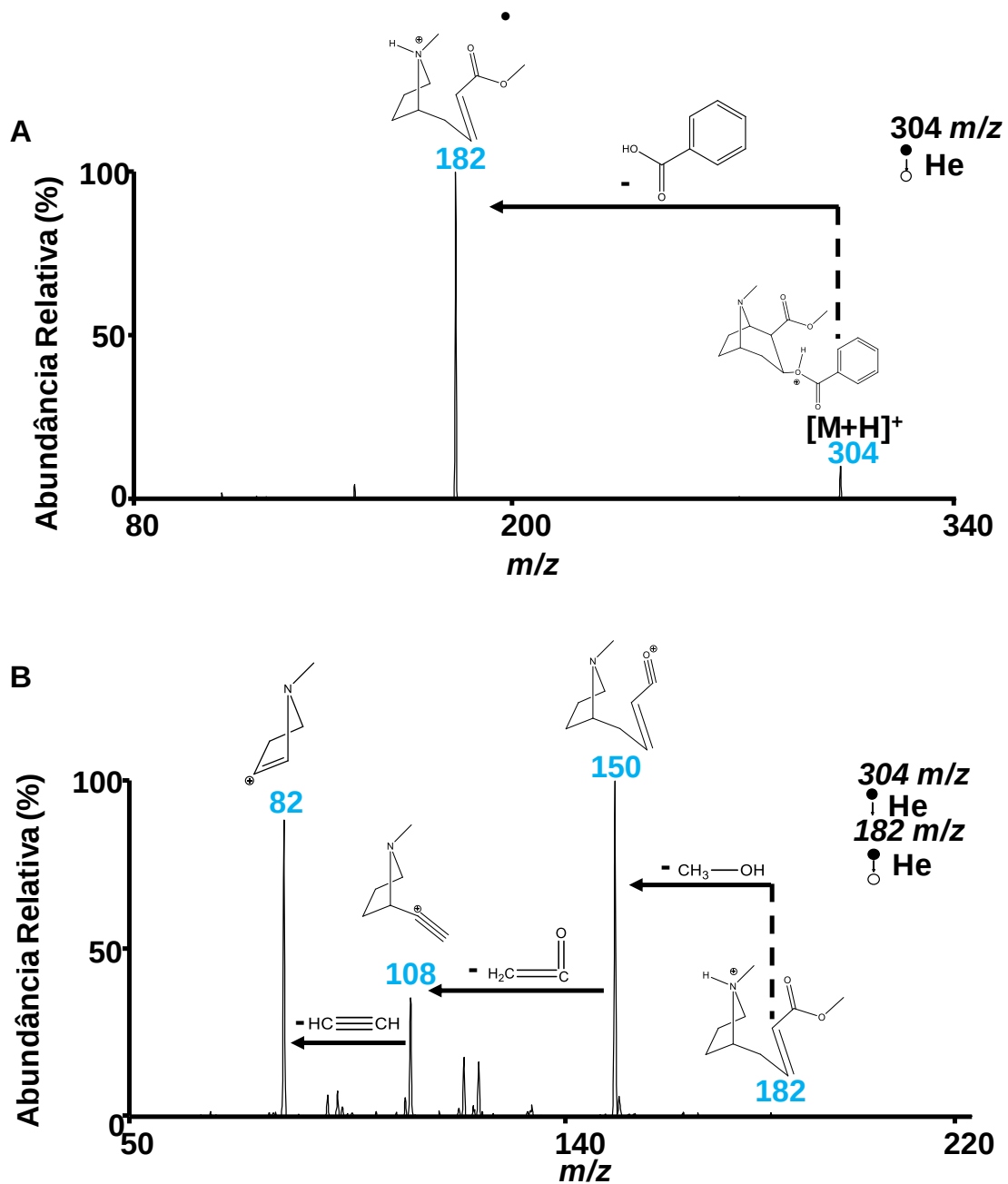


Figura A 1. a) espectros MS/MS e (b) MS³ obtidos a partir da análise ESI grafite de COCAÍNA a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, com as fragmentações características deste analito.

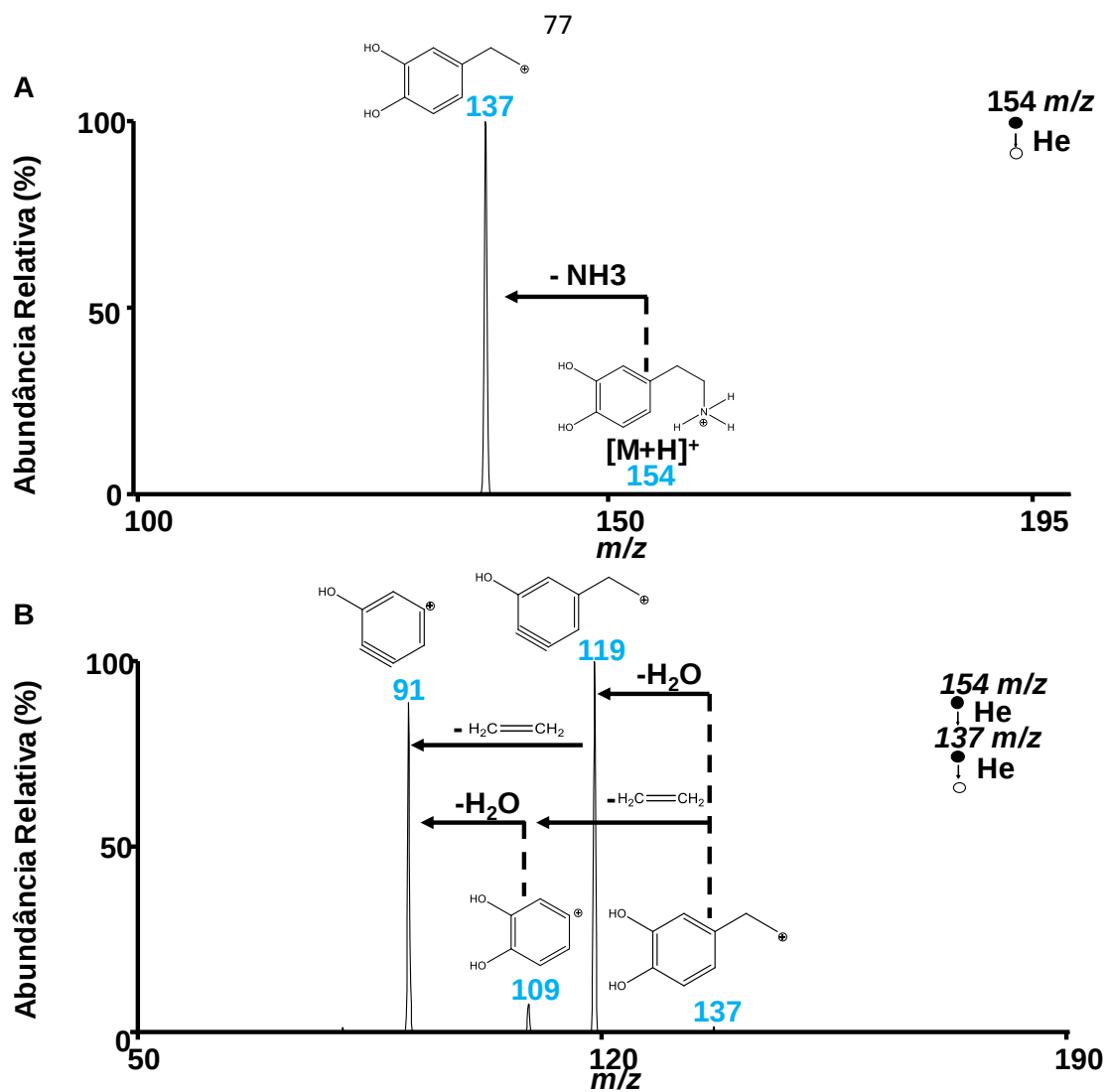


Figura A 2. (a) espectros MS/MS e (b) MS³ obtidos a partir da análise ESI grafite de DOPAMINA a 1000 µg L⁻¹, com as fragmentações características deste analito.

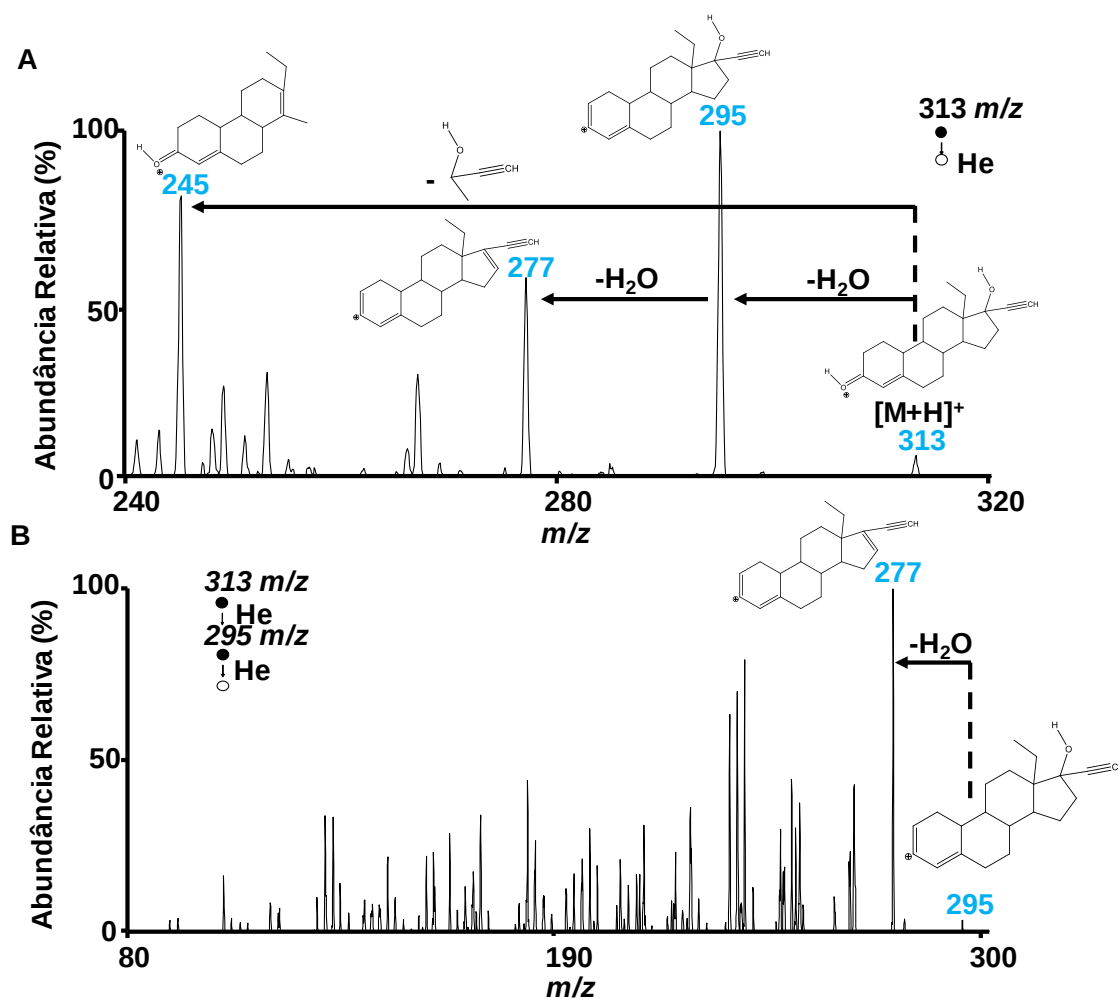


Figura A 3. (a) espectros MS/MS e (b) MS³ obtidos a partir da análise ESI grafite de LEVONORGESTREL a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, com as fragmentações características deste analito.

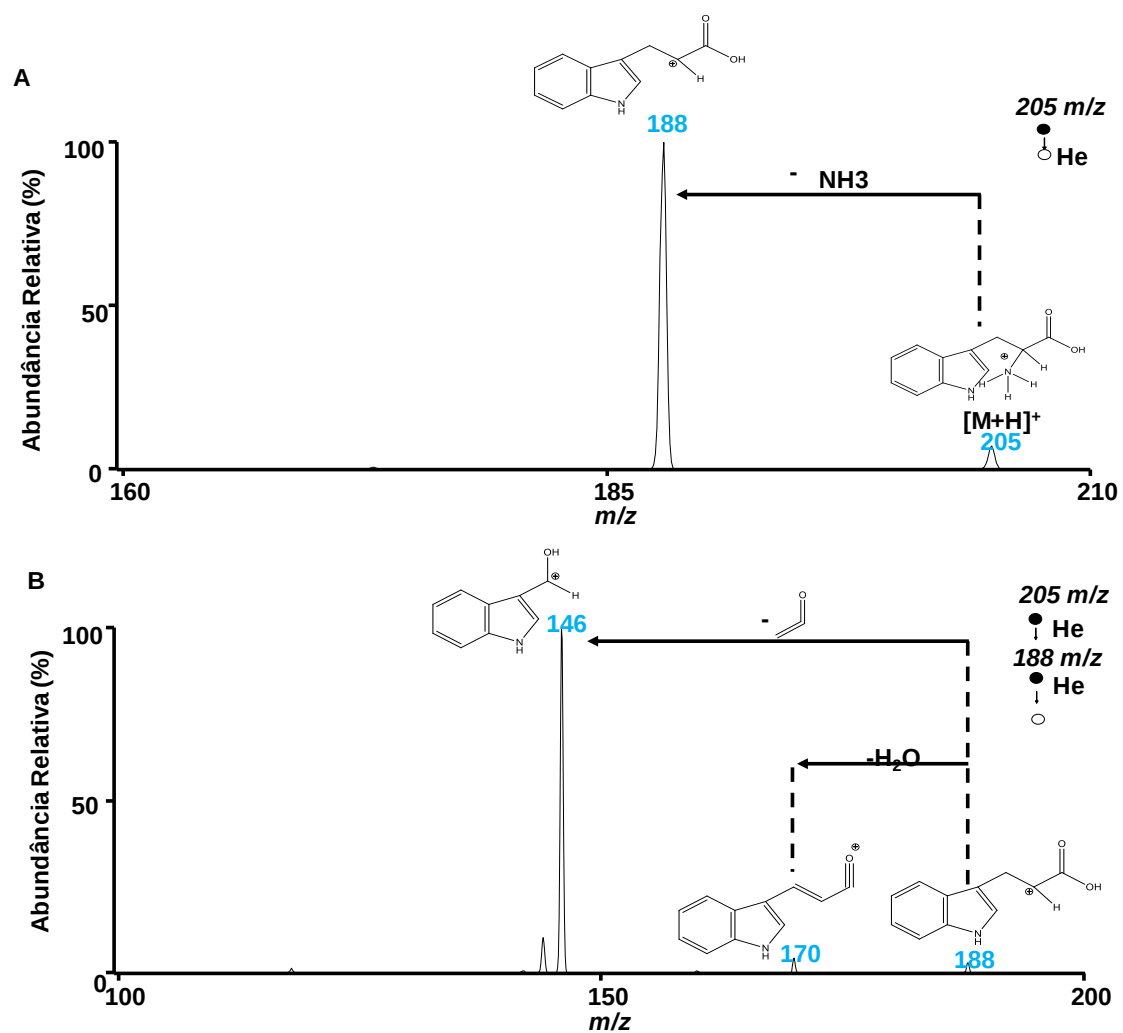


Figura A 4. (a) espectros MS/MS e (b) MS³ obtidos a partir da análise ESI gráfito de TRIPTOFANO a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, com as fragmentações características deste analito.

8 CURRICULO VITAE

8.1 Informações Pessoais

Nome Completo: Thais Pontes Pereira Mendes de Andrade

Endereço Eletrônico: thaisppmendes@gmail.com

Naturalidade: Goiânia – GO

Data de Nascimento: 04/02/1990

Filiação: Sandra Pontes Pereira Mendes

Claudstone dos Reis Mendes

8.2 Formação Acadêmica

Doutorado em Química	Instituto de Química Universidade Federal de Goiás	2015-2019
Mestrado em Química	Instituto de Química Universidade Federal de Goiás	2012-2014
Bacharelado em Química	Instituto de Química Universidade Federal de Goiás	2008-2012

8.3 Prêmios

1- Quarta colocada no **IV PRÊMIO SBPC/GO DE POPULARIZAÇÃO DA CIÊNCIA 2017**, Área de conhecimento: Ciências Exatas e da Terra. Thais Pontes Pereira Mendes de Andrade, Andréa Rodrigues Chaves, Igor Pereira da Silva, Boniek Gontijo Vaz. Desenvolvimento de um método rápido e simples para determinação de biomarcadores de doenças na urina por espectrometria de massas ambiente.

8.4 Artigos Publicados

MENDES, THAIS P. P.; PEREIRA, IGOR; FERREIRA, MARCELLA RODRIGUES; CHAVES, ANDRÉA RODRIGUES; VAZ, BONIEK GONTIJO. Molecularly imprinted polymer-coated paper as a substrate for highly sensitive analysis using paper spray mass spectrometry: quantification of metabolites in urine. *Analytical Methods*, v. 9, p. 6117-6123, 2017.

NEVES, ANA C.O., MORAIS, CAMILO L.M., MENDES, THAIS P.P., VAZ, BONIEK G, LIMA, KÁSSIO M.G. Mass spectrometry and multivariate analysis to classify cervical intraepithelial neoplasia from blood plasma: An untargeted lipidomic study. *Scientific Reports*, v. 8, p. 1-10, 2018.

8.5 Artigos submetidos

MENDES, THAIS P.P., NEVES, ANA C.O., MORAIS, CAMILO L.M., MARTIN, FRANCIS L., PEREIRA, IGOR, DE LIMA, LEOMIR A.S., VAZ, BONIEK G, LIMA, KÁSSIO M.G. An untargeted lipidomic approach by paper spray ionization mass spectrometry to classify cervical cancer. *Scientific Reports*, SUBMETIDO.

MENDES, THAIS P.P., PEREIRA, IGOR, LÓBON, GERMAN S., DE LIMA, LEOMIR A.S., VAZ, BONIEK G. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using Pencil Graphite.