



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARIANA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Riani Luísa Salvio

DETERMINAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS DO CICLO DO ÁCIDO TRICARBOXÍLICO
EM URINA DE SERES HUMANOS POR ELETROFORESE CAPILAR

Florianópolis – SC

2024

Riani Luísa Salvio

DETERMINAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS DO CICLO DO ÁCIDO TRICARBOXÍLICO
EM URINA DE SERES HUMANOS POR ELETROFORESE CAPILAR

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina como um requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química na área de Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Gustavo A. Micke

Florianópolis - SC

2024

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

Salvio, Riani Luísa

Determinação dos intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico em urina de seres humanos por eletroforese capilar / Riani Luísa Salvio ; orientador, Gustavo Amadeu Micke, 2024.

95 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Química. 2. Metabolômica. 3. Eletroforese capilar. 4. Ciclo do ácido tricarbóxico. 5. Ácido orgânicos. I. Micke, Gustavo Amadeu. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Riani Luísa Salvio

Determinação dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico em urina de seres humanos por eletroforese capilar

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Marcone Augusto Leal de Oliveira, Dr.
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof^a. Cristiane Luisa Jost, Dr^a.
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Marcel Piovezan, Dr.
Instituto Federal de Santa Catarina - IFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Química.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Gustavo Amadeu Micke, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2024.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por ter me capacitado, dado força e permitido chegar até aqui.

À minha família, meus pais José e Zuleide e meu irmão Rodrigo, pelo amor incondicional, por toda a ajuda e por sempre me incentivarem e apoiarem meus sonhos.

Aos meus amigos do LabECC, Camila, Rafa, Mayara, Carol, Samantha, Victor, Dalila, Felipe, Vini, Tizzi, Marquinhos (Vinícius), Maria, Damasceno, Kheyti e Alysson, por tudo que vocês me ensinaram, ajudaram e, acima de tudo, pela amizade. Obrigada pelas companhias no trabalho e nos momentos de descontração, pelas trilhas, cafés, comemorações e todos os incontáveis motivos que sempre encontramos para estarmos juntos. Obrigada por todas as vezes que me ouviram reclamar e chorar, por cada palavra de apoio e incentivo, cada abraço e cada risada. Vocês ajudaram a superar esse período tão difícil que é a pós-graduação.

Ao professor Dr. Gustavo Amadeu Micke pela orientação e todos os ensinamentos no decorrer do doutorado e desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dra. Alexandra Latini e ao mestrando Hugo Tolentino do Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo do Departamento de Bioquímica da UFSC, e ao Dr. Marcelo F. Ronsoni do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC) pelo auxílio com as amostras e a parte bioquímica deste trabalho.

À UFSC e ao programa de Pós-graduação em Química.

Ao CNPq, ao INCT catálise e a CAPES pelo apoio financeiro.

“Em tempos assim você aprende a viver de novo.”

(Times Like These – Foo Fighters)

RESUMO

O ciclo do ácido tricarboxílico é fundamental para a produção de energia no corpo humano e, portanto, é importante manter seu equilíbrio. Perturbações no ciclo podem ser refletidas nas concentrações de seus intermediários. A metabolômica busca determinar essas concentrações para ajudar a identificar fenótipos de doenças e elucidar o mecanismo e progressão de diferentes condições de saúde. A abordagem metabolômica pode ser *untargeted* (global) ou *targeted* (dirigida). A metabolômica global visa avaliar o maior número de metabólitos possíveis de uma matriz biológica, enquanto a metabolômica dirigida tem como objetivo avaliar metabólitos ou vias metabólicas específicos. Neste trabalho, foi utilizada a metabolômica dirigida para avaliar o ciclo do ácido tricarboxílico. Foi desenvolvido um método para a determinação dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (ácidos α -cetoglutárico, cítrico, fumárico, láctico, málico e succínico) por eletroforese capilar de zona com detector UV-Vis. O eletrólito utilizado foi composto por 24 mmol L⁻¹ de ácido 2,6-piridinocarboxílico, 76 mmol L⁻¹ de β -alanina e 4 mmol L⁻¹ de hidróxido de hexadeciltrimetilamônio (CTAOH) em pH = 4. As separações foram realizadas em um capilar de sílica fundida com comprimento total de 100 cm e diâmetro interno de 75 μ m. A injeção das amostras foi feita por injeção hidrodinâmica (100 mBar 5 s⁻¹) e a detecção foi realizada no modo indireto em 290 nm. O método foi validado e apresentou linearidade adequada ($R^2 > 0,9922$) para todos os analitos. Os limites de detecção obtidos foram 0,24 – 1,84 mg L⁻¹ e de quantificação, 0,74 – 5,57 mg L⁻¹. O método foi aplicado para determinar os ácidos em amostras de urina de pacientes afetados por obesidade antes de serem submetidos a cirurgia bariátrica e um ano após a cirurgia. Os ácidos cítrico, láctico, málico e α -cetoglutárico foram quantificados nas amostras. Para avaliar se as mudanças nas concentrações dos ácidos eram decorrentes de mudanças metabólicas resultantes da cirurgia, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA). Não houve diferença entre os grupos de amostras, indicando que não ocorreram mudanças significativas no ciclo no intervalo de coleta estudado. No entanto, os dados obtidos sugerem que o método pode ser usado para quantificar os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico em urina de seres humanos.

Palavras-chave: ciclo do ácido tricarboxílico; ácidos orgânicos; eletroforese capilar; metabolômica; análise de componentes principais.

ABSTRACT

The tricarboxylic acid cycle is essential to energy production in the human body and, therefore, it is important to maintain its homeostasis. Disturbances in the cycle may be reflected in the concentrations of its intermediates. Metabolomics aims to determine the concentrations of these intermediates to help identify disease phenotypes and elucidate the mechanism and progression of different health conditions. The analysis approach can be untargeted or targeted. Untargeted metabolomics provides an analysis of the maximum number of molecules in a biological matrix, while targeted metabolomics evaluates specific metabolites or metabolic pathways. In this work, targeted metabolomics was applied to evaluate the tricarboxylic acid cycle. It was developed a method for the determination of the tricarboxylic cycle intermediates (α -ketoglutaric, citric, fumaric, lactic, malic, and succinic acids) by capillary zone electrophoresis equipped with a UV-Vis detector. The background electrolyte consisted of 24 mmol L⁻¹ 2,6-pyridine carboxylic acid, 76 mmol L⁻¹ β -alanine, and 4 mmol L⁻¹ hexadecyltrimethylammonium hydroxide (CTAOH) (pH 4). The separations were carried out in a fused-silica capillary of 100 cm total length and 75 μ m of internal diameter. The injection mode used was hydrodynamic (100 mBar 5 s⁻¹) and the detection was carried out in indirect mode at 290 nm. The method was validated and showed an appropriate linearity ($R^2 > 0,9922$) for all the analytes. The limits of detection obtained ranged from 0,24 to 1,84 mg L⁻¹ and the limits of quantification, from 0,74 to 5,57 mg L⁻¹. The method was applied to determine the acids in urine samples from patients affected by obesity before being submitted to bariatric surgery and one year after the surgery. Citric, lactic, malic, and α -ketoglutaric acids were quantified in the analyzed samples. To evaluate if the variation in the concentration of the acids was due to the surgery, a principal component analysis (PCA) was carried out. There was no difference between the two sets of samples, indicating that no significant changes happened in the cycle during the period evaluated in this study. However, the obtained data indicate that the method can be used to quantify the tricarboxylic acid cycle intermediates in human urine.

Keywords: tricarboxylic acid cycle; organic acids; capillary electrophoresis; metabolomics; principal component analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo do ácido tricarboxílico. As estruturas dos ácidos orgânicos envolvidos no processo estão apresentadas.....	20
Figura 2 - Representação de um instrumento de eletroforese capilar com detecção por espectrometria de UV/Vis.	33
Figura 3 - Representação do fluxo eletroosmótico.....	36
Figura 4 - Representação da agregação de moléculas de surfactante que ocorre na superfície do capilar. Surfactante com uma cauda hidrofóbica formando uma micela (a); surfactante com duas caudas hidrofóbicas formando uma dupla camada (b).....	40
Figura 5 - Representação da inversão do fluxo eletroosmótico utilizando o um surfactante como inversor defluxo no eletrólito, levando a formação de micelas na parede do capilar...	41
Figura 6 - Curvas de mobilidade efetiva versus pH dos analitos ácido α -cetoglutárico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido málico e ácido succínico, do padrão interno ácido cloroacético e dos componentes do eletrólito de corrida β -alanina e ácido 2,6-piridinocarboxílico (PDC).	53
Figura 7 - Eletroferograma de uma solução contendo todos os padrões dos ácidos orgânicos em uma concentração de 55 mg L ⁻¹ , e padrão interno em uma concentração de 30 mg mL ⁻¹ , obtido utilizando o método desenvolvido por CZE. Condições experimentais: BGE, 24 mmol L ⁻¹ de PDC, 76 mmol L ⁻¹ de β -alanina e 4 mmol L ⁻¹ de CTAOH (pH 4); capilar de sílica, 100 cm de comprimento total (91,5 cm efetivo), 75 μ m de diâmetro interno; injeção 100 mBar 5 s ⁻¹ ; -30 kV; temperatura 20 °C; detecção indireta em 290 nm. Sinais: ácido cloroacético (padrão interno) (1), ácido fumárico (2); ácido α -cetoglutárico (3); ácido málico (4); ácido cítrico (5); ácido láctico (6); ácido succínico (7).....	54
Figura 8 - Eletroferograma obtido com uma análise de amostra de urina utilizando o método desenvolvido. A amostra apresentada foi de um indivíduo afetado por obesidade um ano após ser submetido a cirurgia bariátrica. Condições experimentais: BGE, 24 mmol L ⁻¹ de PDC, 76 mmol L ⁻¹ de β -alanina e 4 mmol L ⁻¹ de CTAOH (pH 4); capilar de sílica, 100 cm de comprimento total (91,5 cm efetivo), 75 μ m de diâmetro interno; injeção 100 mBar 5 s ⁻¹ ; -30 kV; temperatura 20 °C; detecção indireta em 290 nm. Sinais e suas concentrações: ácido cloroacético (padrão interno) (1), 30 mg L ⁻¹ ; fosfato (2), não quantificado; ácido málico (3), 10,50 mg L ⁻¹ ; ácido cítrico (4), 128,03 mg L ⁻¹ ; ácido láctico (5), 14,09 mg L ⁻¹ . *Interferentes não identificados.....	62

Figura 9 - Gráfico de <i>scores</i> da análise de PCA referente as 32 amostras de urina analisadas utilizando o método validado por CZE. As concentrações dos ácidos orgânicos em cada amostra foram corrigidas pela concentração de creatinina. (Pos, amostras coletadas um ano após a cirurgia bariátrica; Pre, amostras coletadas antes da cirurgia bariátrica; PC, componente principal).	65
Figura 10 - Cromatograma de uma solução contendo padrões dos ácidos α -cetoglutárico, cítrico, fumárico, málico e succínico em uma concentração de 5 mg L ⁻¹ em acetonitrila 50 % utilizando a coluna Atalntis HILIC Silica (30 mm x 2,1 mm 3 μ m). Condições experimentais: fase móvel, acetonitrila 70 % e tampão formiato de amônio 8 mmol L ⁻¹ (pH = 3) 30 % em modo isocrático; fluxo, 500 μ L min ⁻¹ ; volume de injeção, 5 μ L; temperatura da coluna, 20 °C; detecção por espectrometria de massas no modo de negativo por monitoramento de reações múltiplas.	86
Figura 11 - Cromatograma de uma solução contendo padrões dos ácidos α -cetoglutárico, cítrico, fumárico, málico e succínico em uma concentração de 5 mg L ⁻¹ em acetonitrila 50 % utilizando a coluna FRULIC-N (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m). Condições experimentais: fase móvel, acetonitrila 70 % e tampão formiato de amônio 8 mmol L ⁻¹ (pH = 3) 30 % em modo isocrático; fluxo, 500 μ L min ⁻¹ ; volume de injeção, 5 μ L; temperatura da coluna, 20 °C; detecção por espectrometria de massas no modo negativo por monitoramento de reações múltiplas. Sinais e seus tempos de retenção (t_r): ácido succínio, t_r = 4,31 min (1); ácido fumárico, t_r = 8,84 min (2); ácido málico, t_r = 8,96 min (2); ácido α -cetoglutárico t_r = 9,72 min (3).	87
Figura 12 - Cromatograma de uma solução contendo padrões dos ácidos α -cetoglutárico, cítrico, fumárico, málico e succínico em uma concentração de 5 mg L ⁻¹ em acetonitrila 50 % utilizando a coluna ZIC-HILIC (150 mm x 4,6 mm, 3,5 μ m). Condições experimentais: fase móvel, acetonitrila 70 % e tampão formiato de amônio 8 mmol L ⁻¹ (pH = 3) 30 % em modo isocrático; fluxo, 500 μ L min ⁻¹ ; volume de injeção, 5 μ L; temperatura da coluna, 20 °C; detecção por espectrometria de massas no modo de negativo por monitoramento de reações múltiplas. Sinais e seus tempos de retenção (t_r): ácido succínio, t_r = 3,85 min (1); ácido fumárico, t_r = 5,38 min (2); ácido málico, t_r = 5,78 min (3); ácido α -cetoglutárico t_r = 5,83 min (3).	88
Figura 13 - Cromatograma de uma solução contendo padrões dos ácidos α -cetoglutárico, cítrico, fumárico, málico e succínico em uma concentração de 5 mg L ⁻¹ em acetonitrila 50 % utilizando a coluna ZIC-HILIC (150 mm x 4,6 mm, 3,5 μ m). Condições experimentais: fase	

móvel, acetonitrila 70 % e acetato de amônio (pH = 7) 30 % em modo isocrático; fluxo, 500 $\mu\text{L min}^{-1}$; volume de injeção, 10 μL ; temperatura da coluna, 45 $^{\circ}\text{C}$; detecção por espectrometria de massas no modo de negativo por monitoramento de reações múltiplas. Sinais e seus tempos de retenção (t_r): ácido oxaloacético, $t_r = 3,06$ min (1); ácido α -cetoglutarico, $t_r = 4,33$ min (2); ácido succínico, $t_r = 4,88$ min (3); ácido málico, $t_r = 5,20$ min (4); ácido fumárico, $t_r = 5,27$ min (5); ácido cítrico, $t_r = 5,91$ min (6). 89

Figura 14 - Curvas de mobilidade efetiva versus pH dos analitos ácido α -cetoglutarico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido málico, ácido oxaloacético, ácido pirúvico e ácido succínico, e dos componentes do eletrólito de corrida β -alanina e ácido ftálico..... 92

Figura 15 - Eletroferograma de uma solução contendo todos os padrões dos ácidos orgânicos em uma concentração de 25 mg L^{-1} , e padrão interno em uma concentração de 25 mg mL^{-1} , obtido utilizando o método desenvolvido por CZE. Condições experimentais: BGE, 10 mmol L^{-1} de ácido ftálico, 45 mmol L^{-1} de β -alanina (pH 4); capilar de sílica, 65 cm de comprimento total (56,5 cm efetivo), 75 μm de diâmetro interno; injeção 50 mBar 5 s^{-1} ; -30 kV; temperatura 20 $^{\circ}\text{C}$; detecção indireta em 210 nm. Sinais não identificados..... 93

Figura 16 - Eletroferograma de uma solução contendo todos os padrões dos ácidos orgânicos em uma concentração de 25 mg L^{-1} , e padrão interno em uma concentração de 25 mg mL^{-1} , obtido utilizando o método desenvolvido por CZE. Condições experimentais: BGE, 10 mmol L^{-1} de ácido ftálico, 20 mmol L^{-1} de β -alanina (pH 3,5); capilar de sílica, 75 cm de comprimento total (66,5 cm efetivo), 75 μm de diâmetro interno; injeção 50 mBar 5 s^{-1} ; -30 kV; temperatura 20 $^{\circ}\text{C}$; detecção indireta em 210 nm. Sinais não identificados..... 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos desenvolvidos para determinar ácidos orgânicos por eletroforese capilar com detecção por UV-Vis.	44
Tabela 2 - Conformidade do sistema obtida pelos coeficientes de variação de dez injeções consecutivas de uma solução contendo os padrões de todos os analitos com padrão interno em concentração igual ao ponto central da curva.....	55
Tabela 3 - Parâmetros de mérito para as curvas analíticas dos ácidos orgânicos.....	57
Tabela 4 - Avaliação do efeito de matriz utilizando o teste <i>t</i> para verificar se as inclinações das curvas de calibração em solução padrão e as preparadas em amostra não diferem significativamente.....	58
Tabela 5 - Valores de precisão intra e inter-ensaio, avaliado em três níveis de concentração utilizando soluções padrão de cada analito.....	60
Tabela 6 - Valores de recuperação dos ácidos orgânicos obtidos em três níveis de concentração adicionado as matrizes de urina de seres humanos com o desvio padrão de cada medida.	61
Tabela 7 - Resultados da quantificação dos intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico para amostras de urina de pacientes com obesidade antes de serem submetidos a cirurgia bariátrica e um ano após a cirurgia pelo método proposto por eletroforese capilar de zona com detector de arranjo de diodos.....	63
Tabela 8 - Transições de <i>m/z</i> selecionadas para monitoramento no espectrômetro de massas.	83
Tabela 9 - Matriz do planejamento fatorial 2 ² realizado para selecionar as melhores condições de separação nas três colunas avaliadas.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AOAC *International* - Associação de Colaboração Analítica Internacional, do inglês *Association of Analytical Collaboration International*
- ASMBS - Sociedade Americana de Cirurgia Bariátrica e Metabólica, do inglês *American Society for Metabolic and Bariatric Surgery*
- BGE – Eletrólito de corrida, do inglês *Background Electrolyte*
- CE - Eletroforese Capilar, do inglês *Capillary Electrophoresis*
- CE2 – Energia de Colisão, do inglês *Collision Energy*
- CEC – Cromatografia Eletrocínética, do inglês *Capillary Electrochromatography*
- CEP – Potencial de Entrada na Célula de Colisão, do inglês *Collision Cell Entrance Potential*
- CITP - Isotacoforese Capilar, do inglês *Capillary Isotachopheresis*
- CTAB - Brometo de hexadeciltrimetilamônio, do inglês *Cetyltrimethylammonium Bromide*
- CTAOH - Hidróxido de hexadeciltrimetilamônio, do inglês *Cetyltrimethylammonium Hydroxide*
- CV – Coeficiente de variação
- CXP – Potencial da Célula de Saída, do inglês *Collision Cell Exit Potential*
- CZE – Eletroforese capilar de zona, do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*
- DAD – Detector de arranjo de diodos, do inglês *Diode Array Detector*
- DDAB - Brometo de Didodecildimetilamônio, do inglês *Didecyldimethylammonium Bromide*
- DODAB - Brometo de Dioctadecildimetilamônio do inglês *Dimethyldioctadecylammonium Bromide*
- DP – Potencial de Desagregação, do inglês *Declustering Potential*
- EOF – Fluxo eletrosmótico, do inglês *Electroosmotic Flow*
- EP – Potencial de Entrada, do inglês *Entrance Potential*
- ESI - Ionização por Electrospray, do inglês *Electrospray Ionization*
- FSCE - Eletroforese Capilar em Solução Livre, do inglês *Free Solution Capillary Electrophoresis*
- GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
- HILIC - Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica, do inglês *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*
- HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IFSO - Federação Internacional para a Cirurgia da Obesidade e Distúrbios Metabólicos, do inglês *International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders*

IMC – Índice de Massa Corporal

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LOD - Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

MECK - Cromatografia Eletrocinética Micelar, do inglês *Micellar Electrokinetic Chromatography*

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MS - Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

m/z – razão massa/carga

NMR - Ressonância Magnética Nuclear, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PC – Componente Principal, do inglês *Principal Component*

PCA - Análise de Componentes Principais, do inglês *Principal Components Analysis*

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês *Reactive Oxygen Species*

RP - Fase Reversa, do inglês *Reversed Phase*

SAQQ – Sal de Quitosana Quaternizada

SMIL - Sucessivas Múltiplas Camadas Iônicas, do inglês *Successive Multiple Ionic-Polymer Layers*

TOF - Tempo de voo, do inglês *Time Of Flight*

TTAOH - Hidróxido de Tetradeciltrimetilamônio, do inglês *Tetradecyltrimethylammonium Hydroxide*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. CICLO DO ÁCIDO TRICARBOXÍLICO	19
2.2. OBESIDADE	22
2.2.1. Cirurgia bariátrica.....	24
2.3. METABOLÔMICA	26
2.3.1. Estratégias de análises metabolômicas	28
2.3.2. Plataformas analíticas	28
2.3.2.1. Uso de cromatografia líquida em análises metabolômicas.....	30
2.3.2.2. Uso de eletroforese capilar em análises metabolômicas	31
2.4. ELETROFORESE CAPILAR.....	32
2.4.1. Fluxo eletrosmótico	36
2.4.2. Capilares revestidos e a inversão do fluxo eletrosmótico	37
2.5. DETERMINAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS DO CICLO DO ÁCIDO TRICARBOXÍLICO	41
3. OBJETIVOS.....	46
3.1. OBJETIVO GERAL.....	46
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1. INSTRUMENTAÇÃO	47
4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	47
4.3. ANÁLISES POR ELETROFORESE CAPILAR.....	47
4.4. PREPARO DE AMOSTRAS	48
4.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	48
4.5.1. Conformidade do sistema	49
4.5.2. Linearidade e efeito de matriz	49

4.5.3. Limites de detecção e quantificação	49
4.5.4. Precisão.....	49
4.5.5. Exatidão	50
4.6. ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.....	52
5.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	55
5.2.1. Conformidade do sistema	55
5.2.2. Linearidade e efeito de matriz	56
5.2.3. Limites de detecção e quantificação	59
5.2.4. Precisão.....	59
5.2.5. Exatidão	60
5.3. ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS	61
6. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE A - Desenvolvimento de um método por LC-MS/MS para determinação dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico	82
APÊNDICE B - Desenvolvimento do método por CZE usando capilares revestidos com SAQQ para inversão de fluxo.....	91

1. INTRODUÇÃO

O ciclo do ácido tricarboxílico exerce um papel fundamental no metabolismo de energia e, portanto, é importante manter sua homeostase. Esse equilíbrio pode ser afetado por diversas condições de saúde, incluindo doenças como câncer, diabetes, obesidade e problemas renais. Perturbações no ciclo são refletidas nas concentrações de seus intermediários. Entender a dinâmica do ciclo em um metabolismo afetado por alguma disfunção pode ajudar a compreender o mecanismo por trás do surgimento e progressão de diversas doenças (Choi, Son e Baek, 2021; Martínez-Reyes e Chandel, 2020). Logo, é importante desenvolver métodos capazes de determinar e quantificar esses intermediários.

A obesidade é um distúrbio metabólico que está relacionado a problemas de saúde como resistência à insulina, problemas cardiovasculares, diabetes e doenças renais. Seu desenvolvimento envolve a adaptação do corpo a hábitos alimentares não saudáveis associados ao sedentarismo, além de desregulação hormonal, fatores genéticos e estresse. O aumento do peso é acompanhado de uma hipertrofia do tecido adiposo e a resposta do sistema imunológico é uma inflamação crônica de baixo grau. No entanto, o mecanismo que desencadeia esse processo inflamatório ainda não foi completamente compreendido (Abu Bakar *et al.*, 2015; Kawai, Autieri e Scalia, 2021). Atualmente, a forma mais eficaz para o tratamento da obesidade é a cirurgia bariátrica, que além de proporcionar uma perda significativa de peso, também reduz a incidência de comorbidades. A perda de peso é mais acentuada no primeiro ano após a cirurgia, mas seus efeitos benéficos se mantem a longo prazo (Hsu e Farrell, 2023; Yurcisin, Gaddor e DeMaria, 2009).

Devido a importância de entender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e tratamento da obesidade, técnicas analíticas têm sido amplamente aplicadas nas pesquisas relacionadas a saúde humana. Os metabólitos podem ser analisados em fluidos biológicos, células e tecidos, por exemplo. Os metabólitos de uma célula podem ser quantificados e identificados por análises metabolômicas. A análise metabolômica utiliza técnicas como cromatografia gasosa, cromatografia líquida e eletroforese capilar acopladas à espectrometria de massas, para mensurar os metabólitos de células, tecidos ou fluidos biológicos. O perfil metabólico permite a compreensão de processos complexos e a definição do fenótipo químico do ser humano, conferindo à metabolômica um potencial único de definir biomarcadores capazes de prever a incidência, severidade e progressão de doenças e evidenciar possíveis anormalidades (Newgard, 2017). A abordagem pode ser feita no modo *untargeted* (global) ou *targeted* (dirigida). Na primeira, o objetivo da análise é identificar um padrão de mudança

através da determinação do maior número possível de metabólitos. Na abordagem dirigida, já se tem conhecimento de quais analitos ou vias metabólicas serão avaliadas, ou seja, as análises já são direcionadas por uma hipótese (Álvarez-Sánchez, Priego-Capote e Castro, 2010; Patti, Yanes e Siuzdak, 2012). Portanto, neste trabalho, foi utilizada a metabolômica dirigida para avaliar a dinâmica do ciclo do ácido tricarboxílico em pacientes afetados por obesidade.

Os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico são ácidos orgânicos de baixa massa molecular (Tůma, Samcová e Štulík, 2011). No geral, a primeira escolha para determiná-los é por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (Denkert *et al.*, 2008; Vincent *et al.*, 2017). Entretanto, essa análise requer que os analitos sejam voláteis e, para isso, os ácidos orgânicos precisam passar por uma etapa de derivatização. Além de tornar o trabalho mais laborioso, essa etapa está sujeita a perda de analitos no processo. A principal alternativa é a cromatografia líquida por interação hidrofílica, que é particularmente adequada por permitir a análise de compostos polares hidrofílicos, os quais não são retidos em colunas de fase reversa, e também substâncias carregadas. Além disso, é facilmente acoplada a espectrometria de massas, fornecendo métodos eficientes quando acoplada a um triplo-quadrupolo (Dong *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2018). Apesar da eficiência, esses instrumentos são caros para adquirir e manter, além de exigirem o uso de grandes quantidades de solventes tóxicos e gerarem um grande volume de resíduos. Uma excelente opção a essas técnicas é a eletroforese capilar. Esta requer pequenas quantidades de amostra, o que é ideal para amostras biológicas. Além disso, utiliza pouco ou nenhum solvente orgânico e gera uma quantidade pequena de resíduos, apresentando-se como uma técnica potencialmente mais verde.

Quando se trata da análise de ânions por eletroforese capilar, um dos desafios encontrados é o uso de inversores de fluxo. Capilares revestidos apresentam bons resultados (Barbas *et al.*, 2002; Dolník e Dolníková, 1995; García *et al.*, 1998; Saavedra e Barbas, 2003), mas seu preparo é longo, envolve uso de solventes e é necessário regenerar o revestimento periodicamente. Além disso, alguns métodos já desenvolvidos utilizam solvente orgânico (Markuszewski *et al.*, 2003) ou agentes complexantes (Moreno, Campoy e Barroso, 2001; Moreno, Jurado e Barroso, 2003) para melhorar a separação dos analitos. Outro ponto crítico em eletroforese é o modo de injeção da amostra. Alguns métodos utilizam injeção eletrocínética (Gao *et al.*, 2007), que é menos reprodutível.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um novo método para determinação dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico em urina de seres

humanos utilizando eletroforese capilar. Os ácidos determinados foram os ácidos α -cetoglutárico, cítrico, fumárico, láctico, málico e succínico. Para demonstrar a aplicabilidade do método, foram utilizadas amostras de urina de indivíduos afetados por obesidade submetidos a cirurgia bariátrica. As amostras foram coletadas no dia em que os pacientes foram submetidos à cirurgia e um ano após a cirurgia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão, será abordada a obesidade, suas alterações metabólicas e sua relação com o ciclo do ácido tricarboxílico. Serão descritas também análises metabolômicas e como elas podem ajudar a elucidar os mecanismos envolvidos na obesidade. Em seguida, serão abordadas as técnicas analíticas que podem ser usadas para este fim e as vantagens que a eletroforese capilar pode oferecer para essas análises.

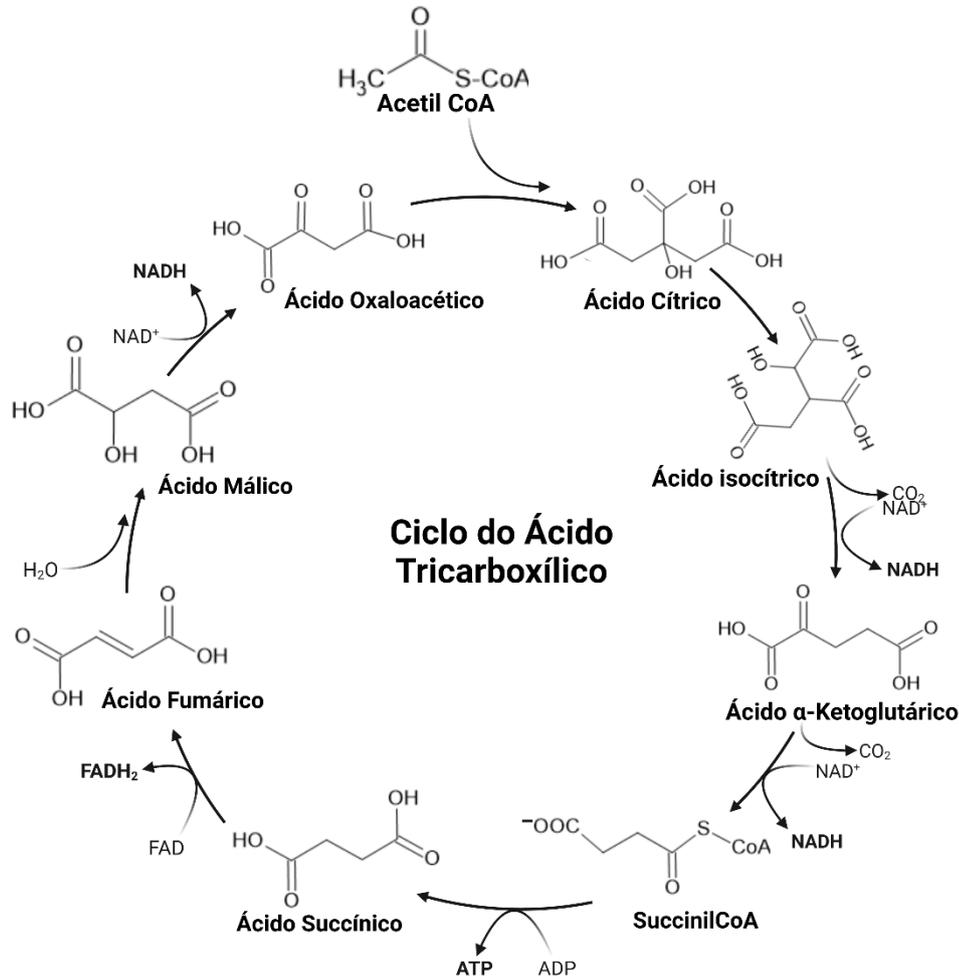
2.1. CICLO DO ÁCIDO TRICARBOXÍLICO

O ciclo do ácido tricarboxílico compreende uma série de reações químicas que envolve a conversão de citrato a isocitrato, α -cetoglutarato, succinil-CoA, succinato, fumarato, malato e oxaloacetato (Figura 1). Essas reações ocorrem dentro da mitocôndria, uma organela responsável pela produção de energia em células eucarióticas (Ryan, Frezza e O'Neill, 2021). As mitocôndrias estão envolvidas em uma variedade de processos celulares, incluindo respiração celular, sinalização de cálcio e apoptose. Disfunções na mitocôndria já foram relacionadas a várias doenças, incluindo distúrbios metabólicos, doenças degenerativas e câncer (Choi, Son e Baek, 2021).

O ciclo do ácido tricarboxílico é a principal via para oxidação aeróbica de ácidos graxos, carboidratos e aminoácidos que são metabolizados a acetil-CoA antes de entrarem no ciclo. Uma via metabólica alternativa pode ser ativada quando alguma enzima não desempenha sua função adequadamente. Consequentemente, ocorrem alterações nas concentrações dos intermediários, que podem ser refletidas no sangue e na urina (Tůma, Samcová e Štulík, 2011).

O ciclo é central para o metabolismo de energia e é conectado simultaneamente com outros metabolismos, portanto manter sua atividade é essencial para a homeostase. Os intermediários também servem como substratos para reações que acontecem fora da mitocôndria. Assim, quando estes intermediários são removidos do ciclo, eles precisam ser repostos para que o ciclo mantenha sua função contínua em um processo conhecido como anaplerose. O ciclo pode ser estimulado ou desacelerado de acordo com a demanda de energia do organismo (Inigo, Deja e Burgess, 2021; Martínez-Reyes e Chandel, 2020; Owen, Kalhan e Hanson, 2002).

Figura 1 - Ciclo do ácido tricarboxílico. As estruturas dos ácidos orgânicos envolvidos no processo estão apresentadas.



Fonte: adaptado de (Markuszewski *et al.*, 2003)

Os ácidos orgânicos são fundamentais para várias vias metabólicas e estão envolvidos em processos fisiológicos e patofisiológicos. Como eles são capazes de refletir a atividade das principais vias metabólicas, apresentam a possibilidade de serem utilizados para avaliação da condição de saúde do indivíduo, incluindo a resposta a intervenções terapêuticas (Yu *et al.*, 2020). Devido a importância do ciclo no metabolismo central da mitocôndria, os intermediários apresentam um potencial como biomarcadores para diferentes condições de saúde, fornecendo informações sobre o metabolismo celular e ajudando a identificar novos alvos para intervenções terapêuticas em doenças metabólicas.

Vários estudos mostraram que variações nas concentrações dos metabólitos do ciclo do ácido tricarboxílico podem ser relacionadas a condições de saúde. Análises por cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) acoplada a espectrometria de massas

tandem (MS/MS) mostraram que as concentrações de ácido fumárico aumentaram, e as concentrações dos ácidos succínico, α -cetoglutárico e isocítrico diminuíram em células de câncer de próstata, sugerindo que estes ácidos estão entre os metabólitos envolvidos na reprogramação metabólica que ocorre em células de câncer (Dong *et al.*, 2022). Para avaliar o efeito de mudanças na dieta em indivíduos afetados por obesidade, foram realizadas análises metabolômicas em plasma por cromatografia gasosa (GC) com detecção por MS/MS, que indicaram um aumento da concentração dos ácidos cítrico, fumárico e isocítrico (Vincent *et al.*, 2017). Análises metabolômicas de tecido de câncer colorretal por GC utilizando MS por tempo de voo (TOF) mostraram que os metabólitos envolvidos no ciclo do ácido tricarboxílico foram encontrados em concentrações menores quando comparados com amostras de colón normais (Denkert *et al.*, 2008). Além disso, variações nas concentrações dos metabólitos do ciclo do ácido tricarboxílico também foram associadas ao risco de diabetes tipo 2 (Guasch-Ferré *et al.*, 2020), um risco elevado de arritmia (Bulló *et al.*, 2021) e a tumorigênese, sendo considerados, nesse caso, oncometabólitos (Sciacovelli e Frezza, 2016).

Em análises de urina, foi detectada uma relação entre os metabólitos do ciclo do ácido tricarboxílico e a progressão de doenças renais (Liu *et al.*, 2018; Lunyera *et al.*, 2022). Os rins desempenham a importante função no organismo de filtrar o sangue para eliminar resíduos, além de regular o equilíbrio entre fluidos e eletrólitos, reabsorver nutrientes e manter a homeostase ácido-base. Para exercer todas essas funções, estes órgãos apresentam um gasto energético elevado. Para atender a essa alta demanda por energia, os rins possuem uma grande quantidade de mitocôndrias. Logo, manter a homeostase das mitocôndrias é crucial para o bom funcionamento dos rins. Consequentemente, alterações mitocondriais podem refletir problemas renais (Bhargava e Schnellmann, 2017). Disfunções nas mitocôndrias já foram associadas a doença renal crônica. Baixos níveis dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico na urina foram detectados em pacientes com função renal prejudicada e isto pode ser um potencial indicador de diminuição da função renal nos primeiros estágios de doença renal crônica (Lunyera *et al.*, 2022). Essas mudanças nas concentrações podem indicar uma ineficiência do ciclo do ácido tricarboxílico. Uma das possíveis consequências de tal ineficiência é a inibição da glicólise, que pode resultar em níveis elevados de glicose, uma característica da resistência à insulina e da obesidade. A hiperglicemia crônica representa um fator de alto risco no desenvolvimento da nefropatia relacionada a obesidade (Li *et al.*, 2013). Portanto, monitorar os níveis destes metabólitos é crucial.

A mitocôndria exerce um papel essencial no metabolismo de energia e disfunções em sua dinâmica sinalizam respostas a diferentes condições metabólicas. Um metabolismo

desregulado é uma característica comum de doenças metabólicas como obesidade e diabetes, e também de problemas como câncer e doenças renais. Portanto, é importante estudar a variação da dinâmica mitocondrial em diferentes contextos metabólicos para explorar como o organismo responde sob essas diferentes condições (Diepen *et al.*, 2017).

2.2. OBESIDADE

Em 2016, somente no Brasil, 22,30 % da população adulta sofria com obesidade. No mundo todo, 13 % da população era acometida por essa doença (Abarca-Gómez *et al.*, 2017). A projeção para 2030 é que esse número aumente para 17 %, chegando a um total de mais de 1 bilhão de adultos com obesidade. A estimativa para o Brasil é que a obesidade atinja 30 % da população adulta do país. A obesidade é um fator de risco para várias outras doenças como diabetes, câncer e problemas cardiovasculares. Além dos prejuízos causados à saúde física do indivíduo, também pode afetar sua saúde mental, visto que pessoas com obesidade podem sofrer com o estigma da doença. A obesidade é uma doença crônica que é determinada por uma variedade de fatores, como fatores genéticos, biológicos, culturais e econômicos. Portanto, sua prevenção e tratamento são críticos, uma vez que representa um problema de saúde pública (World Obesity Federation, 2022).

Quanto aos seus aspectos biológicos, a obesidade é um dos distúrbios metabólicos mais comuns que afeta a população mundial, juntamente com o diabetes tipo 2. Este distúrbio é uma adaptação no corpo devido ao consumo excessivo de calorias, que está associado a hábitos alimentares não saudáveis, e ao sedentarismo. Além disso, seu desenvolvimento também envolve interações complexas entre fatores genéticos, desregulação hormonal e estresse (Abu Bakar *et al.*, 2015).

A obesidade é uma doença complexa, definida como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta um risco à saúde. A classificação da obesidade é feita pelo índice de massa corporal (IMC). O cálculo do IMC é feito dividindo o peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), um IMC acima de 25 kg m⁻² é considerado acima do peso e acima de 30 kg m⁻² é considerado obesidade (World Health Organization, 2000). Suas características clínicas incluem dislipidemia, hiperinsulinemia, estresse oxidativo e hipertensão (Abu Bakar *et al.*, 2015). Conseqüentemente, comorbidades como doenças cardiovasculares, resistência à insulina e o desenvolvimento de diabetes tipo 2 estão relacionados a obesidade (González-Muniesa *et al.*, 2017; Scherer e Hill, 2016; Włodarczyk e Nowicka, 2019).

No entanto, a obesidade não pode ser considerada simplesmente como sendo resultado de um desequilíbrio entre calorias ingeridas e calorias gastas. O aumento de peso e a obesidade causam uma mudança no fenótipo do tecido adiposo. A hipertrofia do tecido adiposo faz com que este receba menos oxigênio e irrigação de vasos sanguíneos, passando a ter um perfil inflamatório. A resposta do sistema imune a essa inflamação é a liberação de macrófagos e citocinas pró-inflamatórias no tecido. Essa resposta inflamatória é persistente, ou seja, crônica, e de baixo grau. A infiltração de células inflamatórias no tecido adiposo hipertrofiado causa uma disfunção nos adipócitos e disfunções metabólicas. Em geral, esse quadro é associado a um consumo alimentar excessivo, que por sua vez eleva a glicemia sanguínea. Conseqüentemente, uma maior secreção de insulina é exigida, favorecendo, assim, o desenvolvimento de resistência à insulina a longo prazo (Kawai, Autieri e Scalia, 2021).

Este estado pro-inflamatório leva a alterações no metabolismo de lipídios e glicose (Diepen *et al.*, 2017; Osborn e Olefsky, 2012). Um fluxo elevado de ácidos graxos para dentro da mitocôndria pode exceder a capacidade mitocondrial de oxidar esses ácidos graxos, resultando em um acúmulo anormal de espécies de oxigênio reativas (ROS) dentro das células, afetando genes e proteínas metabólicas. Os mecanismos envolvidos no processo para alcançar a adaptação metabólica são destrutivos e induzem danos celulares. Essa produção aumentada de ROS também contribui para inflamação, afetando as vias de resistência à insulina (Abu Bakar *et al.*, 2015; Devallance *et al.*, 2019).

Logo, existe uma forte relação entre a inflamação do tecido adiposo e resistência à insulina, pré-diabetes, diabetes tipo 2 e obesidade. Entretanto, ainda não foi possível determinar como esse processo inflamatório é desencadeado. Assim como também não foi possível esclarecer como o equilíbrio entre as citocinas pró- e anti-inflamatórias determina se o tecido adiposo hipertrofiado irá desenvolver ou não essa inflamação disfuncional que prejudica sua atividade metabólica. A resposta integrada do organismo humano dificulta isolar a contribuição do mecanismo de inflamação do tecido adiposo para as complicações da obesidade. Terapias anti-inflamatórias já foram testadas e falharam ao tentar corrigir o processo inflamatório que ocorre na obesidade. Ainda existem mecanismos que não foram completamente compreendidos, deixando ainda questionamentos e obstáculos terapêuticos (Kawai, Autieri e Scalia, 2021).

O succinato, um dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, foi apresentado como uma possível conexão entre o estresse metabólico e a ativação de sinais inflamatórios. Sob estresse oxidativo, alterações no funcionamento do ciclo levam a mitocôndria a liberar succinato no citosol e, posteriormente, no meio extracelular. No tecido adiposo, a liberação de

succinato é induzida sob condições de distúrbio metabólico, como hiperglicemia e hipoxia. A via de sinalização do succinato está envolvida na migração de macrófagos para o tecido adiposo. O succinato e seu receptor foram, portanto, identificados como percussores da inflamação induzida pela obesidade, sendo um importante contribuinte para a migração de macrófagos para o tecido adiposo (Diepen *et al.*, 2017).

Além do ácido succínico, a expressão de ácido láctico também é alterada no músculo de pessoas afetadas pela obesidade. O ácido láctico é produzido pela glicólise anaeróbica quando a produção de energia por via aeróbica é diminuída. No tecido muscular esquelético de pessoas saudáveis, a oxidação de substrato na mitocôndria fornece a maior parte da energia necessária e a produção de ácido láctico é mínima. A produção de ácido láctico aumenta quando o gasto energético aumenta, durante um exercício por exemplo, ou pela redução da produção de energia por via aeróbica. Em indivíduos com obesidade, níveis elevados de ácido láctico no músculo levaram a conclusão de que a quantidade de substrato para oxidação aeróbica é reduzida, sugerindo uma baixa oxidação de glicose e ácidos graxos (De-Cleva *et al.*, 2021; Jones *et al.*, 2019).

O processo de inflamação não é o único fator envolvido no desenvolvimento de doenças metabólicas, estas também já foram associadas a mutações em genes mitocondriais. A expressão reduzida do gene *Mfn2*, por exemplo, reduz a fosforilação oxidativa e prejudica a fusão de mitocôndrias no músculo esquelético. Esse gene possui um papel crucial na regulação da sinalização de insulina e na homeostase da glicose e está, portanto, associado a obesidade e ao diabetes tipo 2 (Dai e Jiang, 2019).

Embora muitos estudos já tenham sido feitos nessa área, ainda existem muitos mecanismos que não foram completamente compreendidos. Portanto, entender a dinâmica dos metabólitos do ciclo do ácido tricarboxílico na presença de obesidade pode ajudar a esclarecer as interações complexas que existem por trás do surgimento e desenvolvimento dessas doenças. A concentração desses metabólitos pode ser medida em fluidos corporais, como sangue e urina, ou até mesmo em células e tecidos específicos. O estudo desses metabólitos faz parte da metabolômica, uma área que tem se desenvolvido muito nos últimos anos nas pesquisas relacionadas à saúde.

2.2.1. Cirurgia bariátrica

A cirurgia bariátrica é um procedimento utilizado para o tratamento da obesidade e comorbidades a ela relacionadas. O procedimento envolve a redução física do tamanho do

estômago com o objetivo de diminuir a ingestão de alimentos e a absorção de calorias. Em alguns casos ocorre também uma redução da absorção de nutrientes. Existem diferentes tipos de cirurgia, sendo as mais comuns a cirurgia bariátrica *sleeve*, o *bypass* gástrico (ou *bypass* em Y de Reoux) e o *duodenal switch* (ou derivação biliopancreática por *duodenal switch*) (Hsu e Farrell, 2023).

A cirurgia é indicada para pacientes que não obtiveram sucesso com tratamentos não cirúrgicos para a perda de peso. Segundo as diretrizes da Sociedade Americana de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (ASMBS) e da Federação Internacional para a Cirurgia da Obesidade e Distúrbios Metabólicos (IFSO), estão aptos a serem submetidos à cirurgia bariátrica indivíduos com IMC igual ou superior a 35 kg m^{-2} ou com IMC igual ou superior a 30 kg m^{-2} com comorbidades (Hsu e Farrell, 2023; Yurcisin, Gaddor e DeMaria, 2009).

Atualmente, este é o melhor tratamento para a obesidade, contribuindo para a perda de peso eficaz e duradoura, principalmente para os indivíduos que não conseguiram manter a perda de peso por um longo período por meio de outros tratamentos. A perda de peso pós-cirurgia é maior nos primeiros dois anos, sendo mais acentuada nos primeiros 6 a 12 meses. Alguns cirurgiões definem o sucesso da cirurgia pela redução do IMC ($< 35 \text{ kg m}^{-2}$), enquanto outros definem pela perda de peso excessivo ($\geq 40\%$). Um fator muito importante a ser considerado para avaliar o sucesso da cirurgia é a remissão de comorbidades (Yurcisin, Gaddor e DeMaria, 2009).

A perda de peso tem um impacto significativo na redução de doenças e da mortalidade relacionadas a obesidade, apresentando impactos favoráveis em quase todas as comorbidades (Hsu e Farrell, 2023). Um dos maiores benefícios da cirurgia bariátrica é o controle do diabetes tipo 2 e de outros distúrbios metabólicos. A cirurgia tem a capacidade de causar a remissão do diabetes em 75-80 % dos pacientes submetidos a cirurgia que possuem a doença (Yurcisin, Gaddor e DeMaria, 2009). Estudos mostraram taxas de remissão de 44 % no primeiro ano após a cirurgia e 75% após dois anos de cirurgia (O'Brien, 2015). Em outro estudo, 37,5% dos pacientes submetidos a cirurgia gástrica *bypass* apresentaram remissão após três meses de cirurgia. Após 12 meses, esse número aumentou para 75%, e a remissão permaneceu estável por pelo menos dois anos (Runkel *et al.*, 2011).

Os resultados da cirurgia também apontam uma melhora nos quadros de hipertensão. No período de um ano, a remissão da hipertensão foi observada em 50% dos casos avaliados. Existem menos evidências de remissão de hipertensão a médio prazo (3-5 anos) e longo prazo (mais de 5 anos) quando comparado aos estudos envolvendo outras comorbidades, como o diabetes. Além disso, o período de perda de peso máxima é nos primeiros 12 meses. Após

esse período é comum o ganho de peso e uma piora no quadro metabólico. No entanto, a cirurgia bariátrica ainda apresenta mais resultados benéficos a médio e longo prazo do que os tratamentos convencionais (Climent *et al.*, 2021).

Como resultado da cirurgia, os pacientes têm um aumento da qualidade de vida, uma melhora da autoimagem e uma redução da necessidade do uso de medicamentos prescritos. Com uma diminuição significativa do peso e das comorbidades, os riscos de mortalidade relacionados a obesidade diminuem significativamente (Hsu e Farrell, 2023).

2.3. METABOLÔMICA

A metabolômica consiste em uma análise abrangente de todo o metaboloma (todos os metabólitos mensuráveis de massa molecular até 1500 Da) sob uma condição específica, que tem como objetivo identificar e quantificar estes metabólitos (Hollywood, Brison e Goodacre, 2006; Newgard, 2017).

A palavra “metabolismo” é derivada do antigo grego “metabole”, que significa “mudança”. Esta mudança é medida a nível molecular e fornece uma visão integrada da bioquímica do organismo. O metabolismo é caracterizado por uma rede complexa de interações entre compostos de natureza altamente diversa. Este é sensível a sinais internos, como fatores genéticos e hormonais, e fatores externos, que envolvem principalmente o estilo de vida, podendo incluir desde alimentação e prática de atividades físicas até o uso de medicamentos, dentre outros fatores aos quais o ser humano é exposto. O metabolismo responde a essas mudanças integrando as alterações do ambiente com sinais intracelulares de modo a manter a homeostase do corpo. Essa resposta é refletida como mudanças na concentração de metabólitos, que podem ser associadas a processos fisiológicos específicos. Logo, além de catalisar reações e realizar transformações de energia para sustentar as atividades celulares, o metabolismo também é uma das principais fontes de informação celular. Assim, a metabolômica revela a identidade metabólica pessoal e os metabólitos encontrados em uma matriz biológica são como uma impressão digital química deixada por um determinado processo celular. (Sévin *et al.*, 2015; Suárez *et al.*, 2017; Syggelou *et al.*, 2012; Tokarz *et al.*, 2017).

Apesar da flexibilidade em curto prazo, o metaboloma humano é relativamente estável por meses e anos e, portanto, alterações de perfis são capazes de refletir uma doença. A falta desse equilíbrio é uma das razões por trás do início das principais doenças que afetam a população. Como essa variação ocorre de modo mais rápido que a expressão proteica, perfis

metabólicos são capazes de representar não somente a peculiaridade de um organismo, mas também permite a rápida exploração da adaptação de organismos vivos ao ambiente (Boccard e Rudaz, 2017; Suárez *et al.*, 2017; Tokarz *et al.*, 2017).

Os processos celulares são interconectados e, por isso, o fluxo de informação não é unidirecional. Isto implica que uma alteração genética não necessariamente será traduzida em um fenótipo específico no organismo. Quando se trata de doenças, além da predisposição genética, fatores ambientais também influenciam e podem determinar o desenvolvimento ou não da doença. Nesse contexto, a metabolômica surge como a ferramenta mais adequada para avaliar a condição bioquímica de um organismo, uma vez que as concentrações dos metabólitos integram informações de origem endógena (genética) e exógena (ambiente). Essa visão integrada da metabolômica torna ela interessante para prever o impacto de intervenções terapêuticas específicas, obter conhecimento sobre a causa de doenças ou ainda para identificar biomarcadores (Hollywood, Brison e Goodacre, 2006; Newgard, 2017; Tokarz *et al.*, 2017).

Sabe-se que todas as células estão em comunicação constante com os fluidos do corpo e são suscetíveis a variações. Essa comunicação ajuda os metabólitos a tornarem-se parte de um processo dinâmico em que são liberados das células para os fluidos ou capturados dos fluidos pelas células. Logo, as mudanças bioquímicas que ocorrem dentro das células e órgãos são refletidas nos fluidos (Syggelou *et al.*, 2012)

A área de determinação do fenótipo metabólico passou por um forte crescimento devido aos avanços significativos nas plataformas analíticas utilizadas. O uso dessas tecnologias ricas em informações para determinação de metabólitos em matrizes como sangue, tecidos e urina é combinado com análises estatísticas sofisticadas. A combinação do grande número de dados gerado e de análise multivariada permite que a informação fenotípica resultante seja avaliada e usada para a descoberta de potenciais biomarcadores e fornece descrições abrangentes do estado bioquímico do organismo sob estudo. Consequentemente, a metabolômica encontra aplicações principalmente na medicina, relacionada a estudos sobre biomarcadores para diagnóstico de doenças, toxicidade ou eficácia de medicamentos, e tratamentos médicos personalizados (Begou *et al.*, 2017; Gika *et al.*, 2014).

A metabolômica tem contribuído para a compreensão de diversas doenças em nível molecular. Inúmeros trabalhos têm sido publicados e doenças como câncer, diabetes tipo 2, e doenças cardiovasculares têm sido extensivamente estudadas (Canuto *et al.*, 2018). Também na área da saúde, as análises metabolômicas contribuem para relacionar alimentos ou a dieta e o estilo de vida de um indivíduo com sua saúde (Esko *et al.*, 2017; Misra *et al.*, 2019; Mung e

Li, 2019). Do mesmo modo, também é uma ferramenta útil para auxiliar na elucidação de mecanismos associados à prática de exercícios físicos e sua relação com a saúde e também com doenças (Bally *et al.*, 2017; Kuhl *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2012; Saoi *et al.*, 2019). Outra importante aplicação da metabolômica é o estudo do mecanismo de ação de fármacos e a avaliação da eficiência de tratamentos (Bhattacharyya *et al.*, 2019).

2.3.1. Estratégias de análises metabolômicas

As análises metabolômicas são realizadas com o objetivo de comparar duas condições biológicas e, portanto, devem ser realizadas sempre comparando grupos. Um grupo é submetido a algum estímulo externo (grupo teste), enquanto o outro é constituído por indivíduos não alterados (grupo controle). Os estímulos podem ser os mais diversos, incluindo exemplos como alterações na dieta, presença de alguma doença, alterações genéticas, uso de medicamentos e outras intervenções terapêuticas. (Canuto *et al.*, 2018).

Existem dois tipos de abordagens metabolômicas e elas são classificadas de acordo com o objetivo do estudo: análises *untargeted* (global) e *targeted* (dirigida). A análise global visa determinar simultaneamente a maior quantidade possível de metabólitos de uma amostra biológica. O objetivo desta análise é obter informações qualitativas para comparar padrões, “assinaturas” ou “impressões digitais”, de metabólitos que mudem em resposta a um estímulo externo. Assim, essa abordagem é mais adequada para identificar metabólitos que mudem em resposta a manipulação de um sistema biológico do que quantificar um metabólito conhecido (Álvarez-Sánchez, Priego-Capote e Castro, 2010; Newgard, 2017; Patti, Yanes e Siuzdak, 2012).

Já a metabolômica dirigida refere-se a uma abordagem que visa avaliar qualitativa e quantitativamente um único metabólito ou um grupo de metabólitos pré-selecionados. Neste caso, uma lista específica de metabólitos é analisada, focando em uma ou mais vias metabólicas de interesse relacionadas. A abordagem dirigida é comumente direcionada por uma questão bioquímica específica ou uma hipótese que motiva a investigação de uma via em particular (Álvarez-Sánchez, Priego-Capote e Castro, 2010; Patti, Yanes e Siuzdak, 2012).

2.3.2. Plataformas analíticas

Os instrumentos utilizados para as análises dependem do tipo de abordagem que será utilizada. Para a análise global, procura-se sempre a técnica capaz de cobrir a faixa mais

ampla de metabólitos da matriz que será avaliada. Cobrir a complexidade do metaboloma é um desafio, uma vez que nenhuma metodologia existente é capaz de fornecer, em uma única separação, análises abrangentes para toda a diversidade de estruturas químicas dos metabólitos de uma amostra (Chaleckis *et al.*, 2019).

Muitos estudos utilizam ressonância magnética nuclear (NMR) de hidrogênio para análise metabolômica global (Ali *et al.*, 2016; Malatji *et al.*, 2017). Porém, as técnicas mais utilizadas são as baseadas em MS, por oferecerem análises com elevada seletividade e sensibilidade. Quando combinada com técnicas de separação, a complexidade do espectro de massas é reduzida devido à separação dos metabólitos por tempo, aumentando a cobertura metabólica (Gika *et al.*, 2014; Mastrangelo *et al.*, 2015; Toraño, Ramautar e Jong, 2019; Wang *et al.*, 2011).

Todas as técnicas de separação têm suas vantagens e limitações. Cada uma é apropriada para a análise de metabólitos diferentes e requer um preparo de amostra diferente (Zhang *et al.*, 2012). A técnica mais utilizada para determinação tanto de compostos polares como apolares é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada ao MS, seguida de eletroforese capilar (CE) com detecção por MS, e GC-MS. (Ciocan-Cartita *et al.*, 2019; Gika *et al.*, 2019; Issaq *et al.*, 2009).

A HPLC-MS utilizando fase reversa (RP) é a principal plataforma analítica para análise global por cobrir uma faixa mais ampla de analitos, além de ser compatível com a análise de amostras aquosas, como urina e plasma. A HPLC acoplada a MS de alta resolução é uma das técnicas mais utilizadas (Wang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2014). No entanto, para metabólitos polares, opta-se por utilizar a HILIC, uma vez que esta permite a análise de compostos que eluem com o tempo morto da coluna em RP (Dunn *et al.*, 2011; Gika *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2019; Narath *et al.*, 2016; Servià *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2018; Zhong *et al.*, 2016). A técnica de CE-MS é utilizada para a análise de metabólitos polares com carga, enquanto GC-MS é mais utilizada para a análise de metabólitos voláteis, ou aqueles que podem se tornar voláteis por meio de derivatização química (Begou *et al.*, 2017). O ideal é utilizar mais de uma técnica, uma vez que o uso de multiplataformas analíticas permite uma abrangência maior de metabólitos (Ciocan-Cartita *et al.*, 2019; Gika *et al.*, 2019; Issaq *et al.*, 2009).

Para a metabolômica dirigida, a técnica é escolhida de acordo com a classe de metabólitos que será analisada. Para essas análises, os metabólitos pré-selecionados são quantificados por meio de métodos desenvolvidos e validados com padrões para a determinação específica desses analitos.

2.3.2.1. *Uso de cromatografia líquida em análises metabolômicas*

As separações em fase líquida têm se tornado ferramentas indispensáveis para a determinação de moléculas pequenas em uma ampla variedade de aplicações. Quando combinadas com MS, permitem uma cobertura estendida do metaboloma e a investigação de biomarcadores. A LC-MS com ionização por electrospray (ESI) nos modos de ionização positivo e negativo representa a principal plataforma para análises de metabolômica global (Peña-Bautista *et al.*, 2019; Zelena *et al.*, 2009; Zhang, Yu e Liu, 2019).

A RPLC usando gradiente de eluição é um dos modos de separação mais utilizado para caracterização e análise do metaboloma por ser compatível com a análise de amostras aquosas. A separação em RP cobre uma grande parte do metaboloma, tendo sido utilizada para análises de amostras biológicas como urina (Kim *et al.*, 2019), plasma (Peña-Bautista *et al.*, 2019; Servià *et al.*, 2019), soro sanguíneo (Narath *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019; Zhang, Yu e Liu, 2019) e saliva (Zhong *et al.*, 2016).

A LC-MS é particularmente adequada para a determinação do perfil de compostos menos polares e não carregados, como açúcares, ácidos graxos, esteróis, esteroides e ácidos biliares (Kok, Somsen e Jong, 2014). No entanto, esta técnica apresenta limitações na análise de espécies iônicas e polares devido a pouca retenção destas moléculas. Isto significa que muitos metabólitos primários, como aminoácidos, aminas, ácidos orgânicos e carboidratos polares, não podem ser efetivamente analisados por RPLC. Estes metabólitos são extremamente importantes porque estão envolvidos em várias vias e fluxos bioquímicos. Nestes casos, a primeira escolha de separação geralmente é HILIC. Separações por HILIC, diferente da RP, usam fases móveis preparadas com concentrações elevadas de solvente, como acetonitrila, com retenção modificada pela adição de água e sais tampão. Quando comparada a fase normal convencional da cromatografia, a vantagem da HILIC, que é semelhante, é sua grande tolerância a amostras que contenham água, como urina e plasma. Quando combinada com a MS fornece separações complementares àquelas obtidas por RPLC-MS, uma vez que os analitos que eluem primeiro em RP geralmente são bem retidos em HILIC. Isto permite a análise dos vários metabólitos primários mencionados anteriormente. Como resultado, HILIC tem sido cada vez mais usada para perfil metabólico (Christou *et al.*, 2014; Narath *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2018; Zhong *et al.*, 2016).

Quando comparada a GC, a LC não é limitada a separação de compostos voláteis termicamente estáveis. Como resultado, HPLC-MS pode ser utilizada para analisar uma faixa

mais ampla de analitos do que GC-MS e é mais adequada para metabolômica global e na pesquisa de biomarcadores de doenças. Sistemas GC são mais acessíveis e preferidos para metabolômica dirigida (Issaq *et al.*, 2009).

2.3.2.2. *Uso de eletroforese capilar em análises metabolômicas*

Grande parte dos metabólitos endógenos presentes em amostras biológicas são altamente polares e iônicos e, portanto, a CE é uma técnica de separação muito atrativa para a determinação do perfil metabólico destas amostras. Acoplada a MS constitui uma técnica analítica sensível que pode ser utilizada tanto para a metabolômica dirigida (Cieslarova *et al.*, 2019; MacLennan *et al.*, 2018), como global (Dibattista *et al.*, 2018; Pont *et al.*, 2016).

A CE tem sido aplicada a análises de metabólitos em uma ampla variedade de amostras biológicas, pois é adequada para a análise seletiva de compostos polares e carregados em urina (Cieslarova *et al.*, 2019; MacLennan *et al.*, 2018; Yamamoto *et al.*, 2019), plasma (Cala *et al.*, 2018; Kuehnbaum *et al.*, 2015; Pont *et al.*, 2016), soro sanguíneo (Kira *et al.*, 2019), tecido (Saoi *et al.*, 2019) e células (Mastrangelo, Annalaura *et al.*, 2016).

A técnica de CE é complementar a outras metodologias analíticas porque é capaz de detectar metabólitos ionizáveis que não podem ser determinados por GC ou LC (Cala *et al.*, 2018; Mastrangelo, A *et al.*, 2016). O uso de multiplataformas analíticas em metabolômica, incluindo CE, é cada vez mais popular. Em um estudo comparativo, análises de urina por LC-TOF-MS detectaram cerca de dez vezes mais compostos que análises por CE-TOF-MS. No entanto, os compostos determinados por CE-MS não foram retidos no sistema de RP-LC e eluíram com o tempo morto da coluna. Além disso, os compostos discriminantes determinados por CE-TOF-MS tinham valores de m/z entre 100 e 150, enquanto mais de 95% dos compostos discriminantes encontrados com LC-TOF-MS tinham valores de m/z superiores a 150. Estes resultados evidenciam que os dois métodos de separação fornecem informações metabólicas complementares e, portanto, uma cobertura maior dos metabólitos é obtida utilizando as duas técnicas em conjunto. Além disso, também se torna evidente que CE é capaz de detectar analitos que não podem ser analisados por LC ou GC (Ramautar *et al.*, 2011).

2.4. ELETROFORESE CAPILAR

A CE é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis em solução sob a influência de um campo elétrico. A técnica ainda é dividida em diferentes modos de separação, que pode ser selecionado de acordo com os analitos e a amostra que serão analisados. A Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC) utiliza surfactantes no eletrólito de corrida (BGE) de modo a induzir a formação de micelas, permitindo que moléculas neutras também possam ser analisadas por CE. A Cromatografia Eletrocínética (CEC) utiliza capilares preenchidos com fases estacionárias sólidas, podendo ser considerada um híbrido de CE e HPLC. A Isotacoforese Capilar (CITP) utiliza um sistema heterogêneo para as análises, isto é, composto por dois BGEs com mobilidades diferentes. A Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE), também conhecida como Eletroforese Capilar de Zona (CZE), é o modo mais utilizado. Ela recebe este nome devido a formação de zonas discretas de analitos, as quais migram com velocidades diferentes (Gummadi e Kandula, 2020).

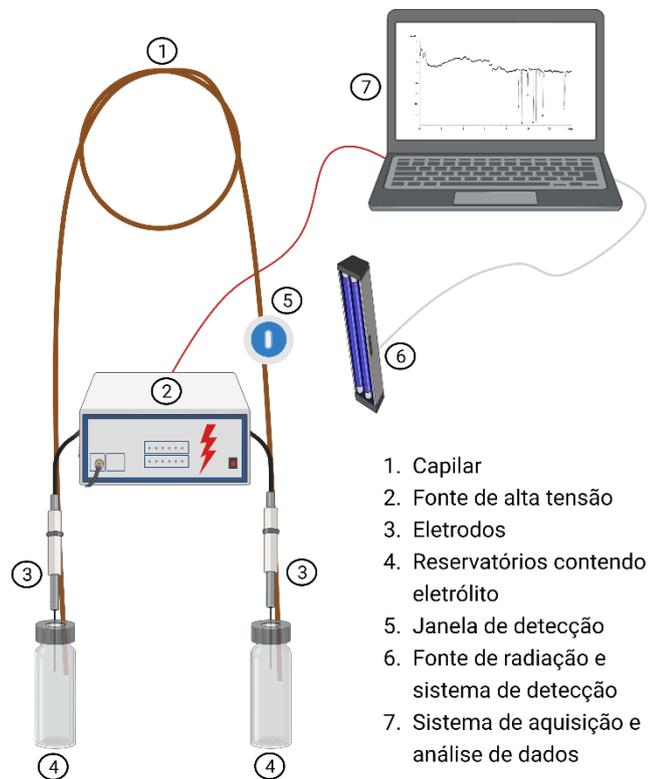
A CZE é muito utilizada devido a sua simplicidade. Seu mecanismo de separação é baseado nas diferentes razões carga/massa dos analitos, que faz com que eles migrem em direção ao ânodo ou ao cátodo, dependendo da sua carga. Por isso é fundamental que o eletrólito apresente capacidade tamponante e o campo elétrico seja mantido constante em toda a extensão do capilar. Logo, é essencial otimizar parâmetros do eletrólito como pH, força iônica e, caso seja utilizado, a concentração de modificadores de fluxo (Gummadi e Kandula, 2020).

Análises por CZE possuem aplicações diversificadas, como análises químicas, farmacêuticas, genéticas, clínicas, ambientais e de alimentos (Piñero, Bauza e Arce, 2011). A CZE tem sido muito utilizada na análise de pequenos íons e moléculas em amostras biológicas. Análises de urina, sêrum e plasma já são amplamente realizadas, uma vez que essas matrizes são as principais escolhas para análises clínicas, toxicológicas e forense. Essa aplicação tem se expandido para análise de outros fluidos biológicos como leite materno, suor, saliva, líquido amniótico e fluido cefalorraquidiano (Kartsova, Makeeva e Bessonova, 2020).

O sistema para análises por CZE consiste basicamente em uma fonte de alta tensão (0 – 30 kV), um sistema de introdução de amostra, um tubo capilar, um detector e um sistema para aquisição e análise de dados (Figura 2). O capilar utilizado é de sílica fundida com diâmetro interno de até 200 μm e é revestido externamente por um polímero que oferece

resistência, como por exemplo poliimida ou poliacrilato. As extremidades do capilar são mergulhadas em reservatórios contendo BGE. Cada reservatório acomoda também um eletrodo, e estes são conectados a fonte de alta tensão. Inicialmente, o capilar é preenchido com o BGE selecionado para as análises. Quando a fonte de alta tensão é ligada e uma voltagem é aplicada, os eletrodos são responsáveis por induzir um campo elétrico. O capilar preenchido com BGE mantém o contato elétrico, funcionando como um canal onde ocorre a migração dos analitos com mobilidade eletroforética determinada por sua carga e massa. Por fim, os analitos passam pelo detector e a informação é coletada e armazenada por um sistema de aquisição e análise de dados. Alguns instrumentos ainda possuem um sistema de controle de temperatura. Isso é importante pois com o aumento da temperatura, a viscosidade do eletrólito diminui, interferindo diretamente na mobilidade eletroforética e, conseqüentemente, na separação dos analitos da amostra (Gummadi e Kandula, 2020; Landers, 2007; Spudeit, Dolzan e Micke, 2012).

Figura 2 - Representação de um instrumento de eletroforese capilar com detecção por espectrometria de UV/Vis.



Fonte: adaptado de (Landers, 2007)

Podem ser usados diferentes tipos de detectores em CZE, como fluorescência, detectores eletroquímicos, espectômetro de massas e detectores baseados na medida da absorvância no UV/Vis, como o detector de arranjo de diodos (DAD). A escolha do detector depende das características dos analitos e a seletividade, sensibilidade e capacidade de quantificação dos analitos necessárias para as análises. O detector mais utilizado é o UV/Vis no modo direto. Este é adequado para analitos que absorvem na região do ultravioleta e/ou visível. Para esses analitos, o BGE deve ser constituído de compostos que não apresentem absorção nessa região (Spudeit, Dolzan e Micke, 2012). No entanto, moléculas inorgânicas e ânions orgânicos de baixa massa molecular não apresentam absorção na região do UV/Vis ou apresentam absorção pouco intensa. Nesses casos, utiliza-se a detecção indireta. Para isso, adiciona-se uma espécie que absorva no UV/Vis ao BGE. Quando a espécie que não absorve no UV/Vis passa pelo detector, esta desloca o cromóforo do BGE, resultando em uma queda de sinal, que é registrada como um sinal negativo (Doble, Macka e Haddad, 2000; Jager e Tavares, 2001). A vantagem da detecção indireta é que esta permite que analitos que não absorvem na região do UV/Vis sejam analisados com um detector comumente utilizado de maneira simples e prática, sem a necessidade de investimento em novos detectores.

A introdução da amostra no capilar pode ser feita de duas maneiras, por injeção hidrodinâmica ou eletrocinética. Na injeção hidrodinâmica, o capilar é inserido no reservatório mais distante do detector, denominado *inlet*, o qual contém a amostra. Pode-se aplicar uma pressão neste reservatório para que a amostra seja introduzida no capilar, ou aplicar vácuo no reservatório posicionado no lado oposto, denominado *outlet*. Nesse tipo de injeção, o volume de amostra inserido no capilar depende do tamanho do capilar, da viscosidade da amostra e da pressão aplicada (Spudeit, Dolzan e Micke, 2012).

No modo de injeção eletrocinética, uma extremidade do capilar é inserida no reservatório que contém a amostra (*inlet*) e a outra extremidade, em um reservatório contendo o BGE (*outlet*). É aplicada então uma voltagem baixa por alguns segundos para que a amostra seja inserida no capilar. Nesse caso, a quantidade de amostra inserida no capilar depende principalmente da mobilidade dos analitos que compõem a amostra e do fluxo eletrosmótico (EOF). Portanto, esse tipo de injeção pode não representar quantitativamente os componentes de uma amostra. Porém, pode ser vantajoso fazer uso desta quando o analito de interesse está em uma concentração baixa na amostra, mas possui uma mobilidade eletroforética muito maior que os outros constituintes dessa amostra (Landers, 2007).

Quando se compara os dois tipos de injeção, a injeção hidrodinâmica apresenta a vantagem de ser menos suscetível a erros de medida que a injeção eletrocinética. Isso porque

na injeção eletrocinética ocorre a discriminação de íons, uma vez que a quantidade de amostra inserida no capilar é função da mobilidade dos analitos. Ou seja, íons com mobilidades elevadas são introduzidos no capilar em uma proporção maior que íons que apresentam mobilidades menores (viés de mobilidade). Na injeção hidrodinâmica não existe essa discriminação de íons. O único parâmetro que influencia essa injeção é a quantidade de analito na amostra, fazendo com que esse tipo de injeção seja representativo da concentração de analito. Isso confere uma maior repetibilidade a injeção hidrodinâmica (Krivácsy *et al.*, 1999).

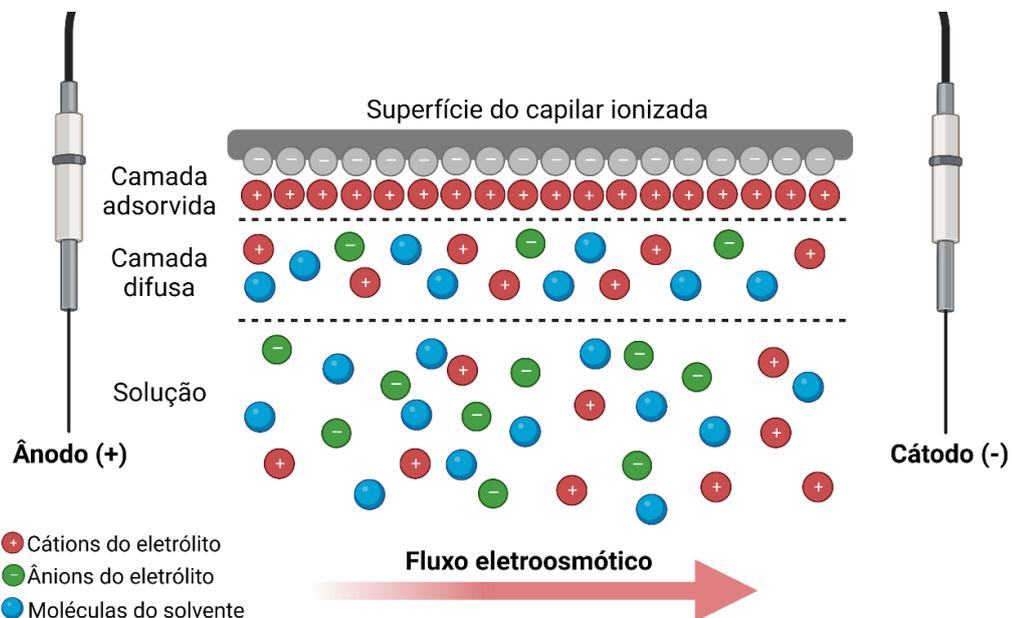
O uso de capilares oferece algumas vantagens a técnica de eletroforese. Como a relação entre a superfície interna do capilar e o seu volume é elevada, o calor gerado pela passagem da corrente elétrica é dissipado (efeito Joule). Isso permite que as separações sejam realizadas aplicando-se voltagens de 30 kV enquanto o ambiente externo ao capilar é mantido a temperatura ambiente. Além disso, o capilar apresenta uma alta resistência elétrica, possibilitando o uso de campos elétricos elevados ($100\text{-}1000\text{ V cm}^{-1}$), o que resulta em tempos de análise curtos e separações eficientes. Outra vantagem em relação as dimensões do capilar são as quantidades de amostra e de BGE necessárias para as análises. Os capilares utilizados variam, em geral, de 20 a 100 cm. Devido a essas dimensões pequenas, o volume total do capilar é da faixa de mililitros. Levando em consideração a mesma regra que se usa em cromatografia de que o volume de amostra deve ser 1-5 % do volume total do capilar, o volume de amostra a ser introduzido no capilar é na faixa de nanolitros. Por isso, as análises por CZE exigem pequenas quantidades de amostra e geram pequenos volumes de resíduo (Landers, 2007; Spudeit, Dolzan e Micke, 2012).

Por serem feitos de sílica fundida, os capilares são frágeis. Portanto, são revestidos por poliimida de modo a garantir resistência e flexibilidade a estes. No entanto, quando se utiliza um detector DAD, este polímero pode interferir na detecção uma vez que este material absorve luz em determinados comprimentos de onda. Logo, é necessário fazer uma “janela de detecção”. Esta é feita pela remoção do recobrimento de poliimida pela aplicação de calor e é feita em um comprimento específico do capilar (Spudeit, Dolzan e Micke, 2012). A janela é alinhada com o centro óptico do detector. O capilar é posicionado dentro de um dispositivo denominado cassete, que protege a janela de detecção e permite que o capilar seja inserido no instrumento (Queiroz e Jardim, 2001).

2.4.1. Fluxo eletroosmótico

O uso de capilares de sílica confere uma peculiaridade muito importante à técnica, o EOF, que é resultado da interação entre a solução e a superfície interna do capilar. Os grupos silanóis presentes na parede do capilar possuem caráter ácido e, por isso, quando em contato com a solução de BGE são ionizados, fazendo com que a parede do capilar fique com uma carga negativa. A fração de grupos silanóis ionizada é determinada pelo pH do BGE utilizado. A carga negativa formada na superfície do capilar atrai as espécies catiônicas do eletrólito. Ocorre então a formação de uma dupla camada positiva próxima a parede do capilar. Esta dupla camada é essencialmente estática. À medida que a distância da parede do capilar aumenta, a densidade dessa camada formada diminui, e a camada mais distante da superfície é difusa. Quando um campo elétrico é aplicado, os cátions dessa camada difusa migram em direção ao cátodo (polo negativo), que é onde está o detector. Nesse movimento, toda a solução que está dentro do capilar é levada em direção ao cátodo, resultando na formação do EOF (Figura 3). O fluxo em direção ao cátodo (fluxo catódico) é considerado o fluxo normal (Landers, 2007).

Figura 3 - Representação do fluxo eletroosmótico.



Fonte: adaptado de (Landers, 2007)

O EOF atua como a bomba em HPLC, e impulsiona todas as moléculas em direção ao cátodo. Assim, cátions, ânions e moléculas neutras são levados ao detector e podem ser

determinados em uma única corrida. A separação é determinada pelas diferenças nas mobilidades eletroforéticas dos analitos. No caso de moléculas neutras, se houver mais de uma, não haverá distinção entre elas, sairão todas juntamente com o fluxo. Considerando um EOF adequado, as respectivas mobilidades eletroforéticas dos analitos levam a formação de zonas discretas para cada analito quando estes passam pelo detector. Se o EOF for baixo, pode ocorrer a difusão da zona do analito, o que pode acarretar o alargamento do pico. Em casos de EOF muito baixo, alguns analitos podem demorar muito tempo para chegar ao detector, aumentando consideravelmente o tempo de análise (Landers, 2007).

No caso dos ânions, se suas mobilidades eletroforéticas forem menores que as do EOF, eles serão levados pelo EOF até o detector. No entanto, muitos ânions possuem uma mobilidade muito semelhante ou muito elevada em relação a mobilidade do EOF. Nesses casos, os ânions migram mais rápido que o fluxo, porém na direção contrária (em direção ao ânodo). Logo, eles não podem ser detectados na configuração normal, com o detector posicionado no cátodo. Uma solução seria inverter a polaridade da injeção, realizando a injeção da amostra no cátodo, de modo que a detecção ocorra no ânodo. Porém, deste modo a separação ocorreria no modo contra-EOF e seria muito demorada, podendo ocasionar o alargamento dos picos. Além disso, somente ânions com mobilidade maior que o EOF poderiam ser detectados. A melhor alternativa para a análise de ânions é a inversão do EOF. A inversão de carga na superfície do capilar permite que os ânions migrem na mesma direção que o EOF (modo co-EOF), garantindo que todos os ânions sejam detectados e análises mais rápidas (Melanson, Baryla e Lucy, 2001; Tavares, Colombara e Massao, 1997).

2.4.2. Capilares revestidos e a inversão do fluxo eletroosmótico

A inversão do fluxo é feita revestindo internamente os capilares. O uso desses revestimentos é uma prática comum, sendo muito utilizada tanto para inversão de fluxo como para eliminar a interação entre analitos e interferentes com a parede no capilar, principalmente na análise de proteínas. Devido a carga negativa formada na parede dos capilares de sílica, pode ocorrer a adsorção desses analitos, resultando no alargamento de picos e instabilidade do EOF. O polímero adsorvido bloqueia a maioria dos pontos de adsorção e a proteína não desloca o polímero adsorvido nem adsorve neste. O revestimento pode ser permanente, semipermanente ou dinâmico. Todos os tipos de revestimento apresentam excelentes resultados e são adequados para prevenir a adsorção de proteínas e para controle do EOF (Baryla *et al.*, 2001; Shulman *et al.*, 2017).

O revestimento permanente ocorre pela ligação covalente com polímeros, podendo ser feito utilizando polímeros ou moléculas ligadas a algum dos grupos funcionais da sílica. Os grupos silanóis podem ser derivatizados utilizando reagentes polares organosilanos, como trimetilclorosilano, γ -metacriloxipropiltrimetoxisilano. Para fazer o revestimento com polímero é necessário primeiro derivatizar a superfície do capilar para que o revestimento possa ser fixado na parede deste. Alguns exemplos de polímeros neutros utilizados são poli(acrilamida), álcool polivinílico e óxido de polietileno. Esse tipo de procedimento é longo, envolvendo várias etapas, reações lentas, condições como temperaturas elevadas, uso de solventes tóxicos, além de não ser muito reprodutível (Doherty *et al.*, 2003; Melanson, Baryla e Lucy, 2001). Além disso, o recobrimento pode ser instável em determinadas faixas de pH, resultando em uma baixa reprodutibilidade. Em pH elevado, por exemplo, pode ocorrer a hidrólise reversível do oxigênio silil, resultando em uma redução da eficácia do revestimento à medida que o capilar é utilizado (Tavares, 1997).

O revestimento semipermanente é obtido lavando-se o capilar com uma solução contendo o polímero, que é adsorvido na parede do capilar, de modo que o aditivo não precisa estar presente no BGE. Este tipo de revestimento é simples de preparar, no entanto é necessário que seja regenerado periodicamente (Shulman *et al.*, 2017). A vantagem deste é a simplicidade da formação e a possibilidade de regeneração do revestimento. Os polímeros utilizados para este fim podem ser neutros, carregados positivamente ou negativamente. Neste último caso, o polímero neutro é adsorvido na superfície de uma camada de polímero catiônico (Lucy, MacDonald e Gulcev, 2008). O álcool polivinílico e o óxido de polietileno, usados como revestimentos permanentes, também podem ser usados como polímeros neutros para modificação da parede do capilar por adsorção (Doherty *et al.*, 2003).

Polímeros carregados podem afetar tanto a magnitude como o sinal do potencial zeta na interface entre a camada polimérica e a solução, influenciando assim a magnitude e direção do EOF. Para a utilização de polímeros aniônicos com o intuito de gerar uma superfície carregada negativamente, utiliza-se uma técnica chamada sucessivas múltiplas camadas iônicas (SMIL). Para isto, são utilizadas camadas intercaladas de polímeros com cargas opostas, resultando em camadas de cargas alternadas. Primeiro é depositada uma camada de polímero catiônico na superfície de sílica. Em seguida, um polímero aniônico, como dextran sulfato ou polivinilsulfonato, é depositado sobre o polímero catiônico para formar uma superfície polimérica carregada negativamente. Assim como ocorre com os capilares não revestidos, o fluxo é catódico. No entanto, é independente na faixa de pH de 2 a 11,

permitindo análises em pH ácido na presença de EOF, o que não seria possível utilizando capilares não revestidos (Doherty *et al.*, 2003).

Os polímeros catiônicos, por sua vez, são capazes de inverter o fluxo, resultando no denominado fluxo anódico (do cátodo para o ânodo). Como a superfície do capilar de sílica já é carregada negativamente, a camada de polímero catiônico pode ser fortemente adsorvida. Uma superfície carregada positivamente permite a análise de proteínas básicas e outros analitos com cargas positivas que não poderiam ser analisados em um capilar sem revestimento com uma superfície carregada negativamente. Exemplos de polímeros catiônicos utilizados são polietilenoimina, polibreno e quitosana (Doherty *et al.*, 2003).

A quitosana ((1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glucan) é um polímero hidrofílico obtido pela desacetilação do carboidrato quitina. Ela já foi utilizada tanto como revestimento dinâmico como polímero catiônico para revestimento estático do capilar na análise de proteínas básicas (Doherty *et al.*, 2003). Entretanto, em pH alcalino, a quitosana sofre desprotonação. Uma opção a ela é o sal de quitosana quaternizada (SAQQ), um derivado que apresenta mais grupos com carga positiva e mais estáveis, além de a molécula ser mais hidrofílica. Isso torna a molécula solúvel em toda a faixa de pH (Ma *et al.*, 2007).

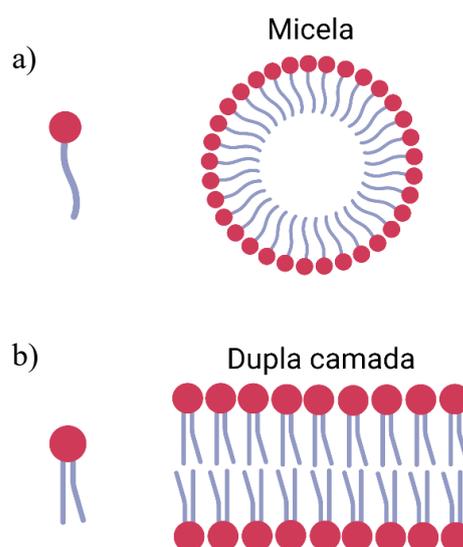
O procedimento para o revestimento do capilar é simples, basta realizar uma lavagem do capilar com uma solução polimérica de SAQQ. A presença de grupos amino protonados e grupos amino quaternizados na cadeia do SAQQ acarretam uma mudança de carga na parede, que passa a ser positiva, resultando numa inversão do EOF. O fluxo é invertido em toda a faixa de pH, sendo mais intenso na faixa de pH de 2,0 a 4,7. Com o aumento do pH, ocorre a protonação/desprotonação dos grupos amino residuais. Como consequência, a intensidade do fluxo em pH elevado é reduzida, mas este permanece anódico (Vitali, 2012).

Para a obtenção do revestimento dinâmico, adiciona-se um surfactante ao BGE. As moléculas do surfactante adsorvem na superfície do capilar, alterando a carga negativa na superfície e impedindo que os grupos silanóis entrem em contato com a solução (Barylá *et al.*, 2001). Podem ser utilizadas várias classes de surfactantes: aniônicos, catiônicos, zwitterionicos e não iônicos. Os surfactantes consistem em uma cabeça polar e uma cadeia de hidrocarboneto apolar (Mohabbati e Westerlund, 2006). Os aditivos mais utilizados para controlar o EOF na análise de ânions por CE são os surfactantes catiônicos. Exemplos de surfactantes catiônicos incluem o brometo de cetrimônio (CTAB), o brometo de didodecildimetilamônio (DDAB) e o brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB). O CTAB apresenta apenas uma cadeia de hidrocarbonetos apolar, já o DDAB e o DODAB

possuem duas cadeias apolares em suas estruturas (Shulman *et al.*, 2017; Tavares, Colombara e Massao, 1997).

Estes surfactantes atuam mudando a carga da superfície do capilar, e, portanto, invertem o fluxo. Os surfactantes são atraídos pela parede do capilar de sílica que se encontra carregada negativamente. A agregação das moléculas de surfactante ocorre na superfície de sílica, conferindo a esta uma carga positiva. O surfactante DDAB agrega-se formando uma dupla camada (Figura 4). No caso do CTAB, a agregação das moléculas de surfactante na superfície do capilar leva a formação de micelas (Doherty *et al.*, 2003; Melanson, Baryla e Lucy, 2001).

Figura 4 - Representação da agregação de moléculas de surfactante que ocorre na superfície do capilar. Surfactante com uma cauda hidrofóbica formando uma micela (a); surfactante com duas caudas hidrofóbicas formando uma dupla camada (b).

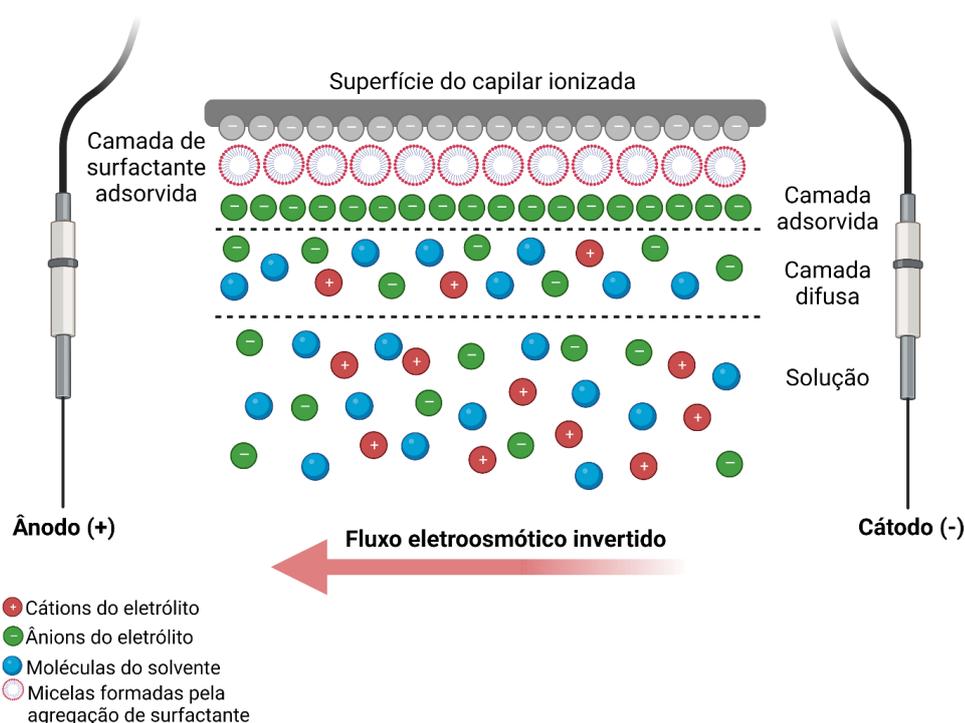


Fonte: adaptado de (Melanson, Baryla e Lucy, 2001).

Essa agregação de moléculas ocorre antes da formação de micelas na solução. As cabeças carregadas positivamente das moléculas do surfactante são atraídas pelas paredes com carga negativa do capilar e são adsorvidas devido as interações eletrostáticas que ocorrem entre as cargas opostas. À medida que a concentração de surfactante aumenta, a distância entre as moléculas adsorvidas na superfície diminui, até o ponto em que as caudas de hidrocarbonetos das moléculas de surfactante adsorvidas na superfície começam a interagir e formar agregados. O excesso de cargas leva então a formação de micelas. As caudas de hidrocarbonetos hidrofóbicas do surfactante se associam no centro da micela, maximizando a interação entre as moléculas e diminuindo a interação com a água. As cabeças catiônicas das

moléculas de surfactante ficam voltadas para fora, conferindo uma carga positiva a superfície do capilar. A dupla camada elétrica formada agora é, então, constituída por cargas negativas (Figura 5). Logo, quando um campo elétrico é aplicado, parte dos ânions presentes na camada difusa migram em direção ao ânodo, levando consigo a solução, o que resulta na inversão do EOF (Lucy, MacDonald e Gulcev, 2008; Melanson, Baryla e Lucy, 2001; Tavares, 1997).

Figura 5 - Representação da inversão do fluxo eletroosmótico utilizando o um surfactante como inversor de fluxo no eletrólito, levando a formação de micelas na parede do capilar.



Fonte: elaborado pelo autor

2.5. DETERMINAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS DO CICLO DO ÁCIDO TRICARBOXÍLICO

Os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico são ácidos orgânicos de baixa massa molecular que contêm um ou mais grupos carboxila e podem conter ainda em sua cadeia grupos hidroxila ou cetona (Tůma, Samcová e Štulík, 2011). De modo geral, a principal escolha para a determinação desses metabólitos é GC-MS. Esta técnica é muito utilizada para determinação dos metabólitos não só do ciclo do ácido tricarboxílico, mas também da glicólise, do ciclo da ureia e também para a análise de aminoácidos (metabólitos primários) (Lubes e Goodarzi, 2018; Xu *et al.*, 2019). Essa preferência ocorre devido as suas características como robustez, seletividade, reprodutibilidade e elevadas sensibilidade e

resolução. Além disso, apresenta a vantagem de possuir bibliotecas espectrais disponíveis comercialmente (Shao e Le, 2019).

A técnica de GC-MS já foi utilizada para determinação de ácidos orgânicos em urina (Christou *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2020), tecido gástrico (Hur *et al.*, 2014) e no soro sanguíneo (Ali *et al.*, 2016; Calderón-Santiago *et al.*, 2013; Seymour *et al.*, 2014). No entanto, esse analitos não são voláteis e, para que possam ser analisados por GC, as amostras necessitam passar por uma etapa de derivatização, o que consome tempo e aumenta a probabilidade de erros por perda de analitos durante o processo (Beale *et al.*, 2018; Kuehnbaum e Britz-McKibbin, 2013; Misra *et al.*, 2019; Miyagawa e Bamba, 2019; Tang *et al.*, 2016).

Para evitar o processo de derivatização, muitos trabalhos utilizam HPLC-MS/MS para determinar esses metabólitos. A HPLC usando RP e gradiente de eluição é um dos modos de separação mais utilizado por ser compatível com a análise de amostras aquosas (Dunn *et al.*, 2011; Gika *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2019; Servià *et al.*, 2019). Já foram desenvolvidos métodos para determinação dos intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico em diferentes matrizes biológicas, como mitocôndrias, células (Fiori *et al.*, 2018), tecidos e fluidos corporais, como plasma e urina (Kadhi, Al *et al.*, 2017). Entretanto, análises cromatográficas utilizando RP apresentam limitações, uma vez que os ácidos carboxílicos alifáticos são polares e por isso são pouco retidos na coluna. Além disso, espécies presentes na matriz da amostra podem levar a supressão de íons, diminuindo a confiabilidade da quantificação. Nesses casos, pode-se adotar um preparo de amostras diferente, como condensação aldol, por exemplo, para melhorar a separação (Fan *et al.*, 2021). Outra opção, ainda, é a cromatografia por troca iônica (Lu *et al.*, 2003; Nozal *et al.*, 2003). No entanto, neste modo, muitos dos reagentes adicionados a fase móvel não são voláteis e, portanto, não são compatíveis com MS (Gao *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2007).

Uma alternativa são os métodos que usam HILIC, uma vez que esta é adequada para determinar compostos altamente hidrofílicos que são muito polares para serem retidos por colunas RP. Além disso, HILIC também permite a análise de substâncias carregadas, como a cromatografia de íons. Quando combinada com MS/MS, é capaz de fornecer métodos seletivos para a determinação de moléculas altamente hidrofílicas. Outra vantagem importante é a facilidade de acoplamento com a espectrometria de massas, principalmente no modo de ionização por electrospray (ESI) (Buszewski e Noga, 2012; Gika *et al.*, 2012; Michopoulos *et al.*, 2014; Narath *et al.*, 2016; Silva, Bottoli e Collins, 2016; Virgiliou *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2018; Zhong *et al.*, 2016).

Análises de metabolômica dirigida para determinação de ácidos orgânicos já foram realizadas por HILIC-MS/MS em diferentes matrizes biológicas. A técnica já foi empregada para avaliar os metabólitos envolvidos no ciclo do ácido tricarboxílico e vias relacionadas em células cancerígenas (Dong *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2018) e urina (Huang *et al.*, 2012).

Apesar de sua excelente performance, os instrumentos de HILIC-MS/MS são caros para adquirir e manter, além disso, uma grande quantidade de solventes tóxicos é utilizada. Uma alternativa mais simples e mais barata é a CE. Metabólitos polares e que podem ser ionizados podem ser determinados por CE de maneira eficiente, uma vez que a técnica permite a análise tanto de metabólitos catiônicos como aniônicos. É o caso de metabólitos como compostos fosforilados, aminoácidos, intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico e do ciclo da ureia, nucleotídeos e nucleosídeos. Isto é, a CE é capaz de detectar metabólitos ionizáveis que não podem ser determinados por GC ou HPLC (Zhang *et al.*, 2016). As vantagens dessa técnica incluem separações relativamente rápidas e altamente eficientes com o mínimo de preparo de amostra, uso de quantidades pequenas de solvente e produção mínima de resíduos de solventes orgânicos, constituindo uma técnica verde. Estas características, junto com a necessidade de pequenas quantidades de amostra, fazem da CE uma técnica particularmente adequada para a análise de amostras biológicas com volume limitado (Barbas, Moraes e Villaseñor, 2011; Issaq *et al.*, 2009; Ramautar *et al.*, 2011).

Os ácidos orgânicos também são importantes constituintes de alimentos. Eles são antioxidantes e tem uma grande influência nas características organolépticas de alimentos e bebidas, como sabor, aroma e cor. Além disso, estão envolvidos na estabilidade e no controle microbiológico de produtos, podendo ser indicadores da qualidade destes. Os ácidos orgânicos são naturalmente encontrados em frutas, vegetais, sucos, café, chá e vinho (Robles *et al.*, 2019). Devido a sua grande importância, métodos por CE já foram desenvolvidos para determinação dos ácidos cítrico, fumárico, láctico, málico e succínico em amostras de café (Galli e Barbas, 2004), vinho (Saavedra e Barbas, 2003) e outras amostras derivadas de uva, como mosto, conhaque e vinagre (Moreno, Campoy e Barroso, 2001; Moreno, Jurado e Barroso, 2003). Estes analitos, além de outros ácidos orgânicos, como acético, fórmico, oxálico, pirúvico, tartárico e aspártico, também foram determinados em raízes e caules de planta (Vaz *et al.*, 2012). As características destes métodos em relação ao pH escolhido para as análises, o inversor de fluxo utilizado, e os modos de injeção e detecção estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Métodos desenvolvidos para determinar ácidos orgânicos por eletroforese capilar com detecção por UV-Vis.

Amostra	pH	Inversor de fluxo	Injeção	Deteção	Referência
Café	6,25	Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)	Hidrodinâmica	Direta	(Galli e Barbas, 2004)
Vinho	7,5	Poliacrilamida (revestimento interno)	Hidrodinâmica	Direta	(Saavedra e Barbas, 2003)
Vinho, mosto, conhaque e vinagre	9,3	Hidróxido de tetradeciltrimetilamônio (TTAOH)	Hidrostática	Direta	(Moreno, Campoy e Barroso, 2001; Moreno, Jurado e Barroso, 2003)
Sangue	3,8	Poliacrilamida (revestimento interno)	Hidrodinâmica	Indireta	(Dolník e Dolníková, 1995)
Urina	6,0	Poliacrilamida (revestimento interno)	Hidrodinâmica	Direta	(Coral Barbas et al., 2002; García et al., 1998)
Urina	10,0	Surfactante catiônico (CIA OFM Anion-BT)	Hidrostática	Direta	(Shirao <i>et al.</i> , 1994)
Folhas e raízes de <i>Brachiaria brizantha</i>	3,4	CTAB	Hidrodinâmica	Indireta	(Vaz <i>et al.</i> , 2012)
Extrato celular de bactérias	5,65	-	Eletrocínética	Direta	(Gao <i>et al.</i> , 2007)
Extrato celular de bactérias	3,5	CTAB	Eletrocínética	Indireta	(Markuszewski <i>et al.</i> , 2003)

Fonte: elaborado pelo autor

1 Além de amostras de alimentos, também já foram desenvolvidos métodos para
2 determinação de ácidos orgânicos no extrato celular de bactérias (Gao *et al.*, 2007;
3 Markuszewski *et al.*, 2003). A CE também tem sido aplicada a análises de metabólitos em
4 uma ampla variedade de amostras biológicas, pois é adequada para a análise seletiva de
5 compostos polares e carregados em urina, plasma, soro sanguíneo e tecido. Métodos por CE já
6 foram desenvolvidos para análise de ácidos orgânicos em soro sanguíneo (Dolník e
7 Dolníková, 1995) e urina (Coral Barbas *et al.*, 2002; García *et al.*, 1998; Shirao *et al.*, 1994).

8 Como apresentado, os métodos existentes por CE são laboriosos, muitas vezes
9 utilizando capilares com revestimento estático, injeção eletrocinética, que é menos
10 reprodutível, ou ainda aditivos e preparos de amostra que acrescentam etapas ao processo,
11 tornando o método mais propenso a erros. Neste contexto, surge a necessidade de
12 desenvolvimento de um método por CE mais simples para determinação dos intermediários
13 do ciclo ácido tricarboxílico em urina de seres humanos. Além disso, CE apresenta-se como a
14 técnica ideal para desenvolvimento de métodos para análises de metabolômica dirigida para
15 auxiliar no estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da obesidade e nas
16 possíveis alterações metabólicas decorrentes da cirurgia bariátrica. Portanto, este trabalho teve
17 o objetivo de preencher esta lacuna desenvolvendo um método por CE para a determinação
18 dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico em urina de seres humanos afetados por
19 obesidade submetidos a cirurgia bariátrica. Ainda, o intuito foi avaliar os resultados obtidos
20 dessa análise metabolômica dirigida para ajudar a esclarecer as alterações bioquímicas
21 decorrentes da obesidade.

22

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método para determinação e quantificação dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico por eletroforese capilar de zona com detector de arranjo de diodos para realizar análises de metabolômica dirigida em urina de seres humanos afetados por obesidade submetidos a cirurgia bariátrica de modo a auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da obesidade

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Escolher os componentes do eletrólito de corrida e suas concentrações para as análises por eletroforese capilar;
- Otimizar os parâmetros instrumentais do método;
- Validar o método proposto de acordo com as diretrizes de órgãos reguladores para linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, e efeito de matriz;
- Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras de urina de pacientes afetados por obesidade antes e após serem submetidos a cirurgia bariátrica;
- Realizar uma análise de componentes principais para avaliar as variações das concentrações dos analitos nas amostras.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. INSTRUMENTAÇÃO

Para as análises por eletroforese capilar, todos os experimentos foram realizados utilizando um equipamento de CE modelo 7100 da Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD). Para o controle, processamento e aquisição dos dados foi utilizado o *software ChemStation*.

4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura com resistividade mínima de 18.2 M Ω cm (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.). Os padrões de ácidos α -cetoglutárico, cítrico, fumárico, láctico, málico, oxaloacético, pirúvico, succínico, e cloroacético e os reagentes ácido 2,6-pyridinocarboxílico (PDC), β -alanina, hidróxido de hexadeciltrimetilamônio (CTAOH) e ácido ftálico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.). Todos os padrões possuíam grau de pureza de 99%, com exceção do ácido láctico, cuja pureza era de 85-90%. Foram preparadas soluções estoque de cada analito em uma concentração de 1000 mg L⁻¹ dissolvendo cada analito em água ultrapura e 50 % metanol e armazenadas a 4 °C até as análises.

4.3. ANÁLISES POR ELETROFORESE CAPILAR

As separações foram realizadas em um capilar de sílica fundida revestido externamente com poliimida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, U.S.A.) com 100 cm de comprimento total (91,5 cm de comprimento efetivo x 75 μ m diâmetro interno e 375 μ m de diâmetro externo). O eletrólito utilizado para as separações foi composto por 24 mmol L⁻¹ de PDC, 76 mmol L⁻¹ de β -alanina e 4 mmol L⁻¹ CTAOH (pH 4). O eletrólito foi preparado pesando diretamente cada um dos reagentes. Antes das análises, o capilar foi condicionado com NaOH 1 mol L⁻¹ (5 min), seguido de limpeza com água ultrapura (5 min), e BGE (5 min). Entre as corridas, o capilar foi lavado com o BGE por 1 min. As amostras foram injetadas com injeção hidrodinâmica (100 mBar 5 s⁻¹). A temperatura do capilar foi mantida a 20 °C, a voltagem aplicada foi 30 kV, com polaridade negativa na injeção, e os analitos foram

1 identificados com detecção indireta em 290 nm. Após as análises, o capilar era guardado com
2 suas extremidades posicionadas dentro de reservatórios contendo água para evitar o
3 entupimento do capilar.

4 5 4.4. PREPARO DE AMOSTRAS

6
7 Todas as análises utilizando amostras de seres humanos foram realizadas sob as
8 diretrizes do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (CAAE
9 19792013.5.0000.0121) da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil. O
10 consentimento dos participantes foi obtido de acordo com a Declaração de Helsinque

11 A coleta de amostras foi realizada sob a supervisão dos profissionais do Serviço de
12 Endocrinologia do Hospital Universitário da UFSC, Polydoro Ernani de São Thiago. As
13 amostras de urina foram coletadas de participantes afetados por obesidade grau II com
14 comorbidades associadas ou obesidade grau III que eram elegíveis para cirurgia bariátrica. As
15 coletas foram realizadas horas antes da cirurgia e um ano depois. Após a coleta, as amostras
16 de urina foram imediatamente congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantidas nesta temperatura até o preparo
17 das amostras para análise.

18 Para a precipitação de proteínas, alíquotas de 400 μL de urina foram transferidas para
19 tubos de vidro aos quais foram adicionados 800 μL de uma solução fria de
20 acetonitrila:metanol em uma proporção 2:1. As amostras foram agitadas em vórtex por 10 s e
21 centrifugadas a 2000 x g por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi coletado e transferido para
22 frascos de vidro, os quais foram congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes das análises, as amostras foram
23 descongeladas a temperatura ambiente e diluídas com ácido cloroacético (padrão interno),
24 cuja concentração final foi 30 mg L^{-1} . As amostras foram transferidas para frascos para
25 análise por CZE-DAD. Os ácidos orgânicos foram identificados individualmente nos
26 eletroferogramas pela fortificação das amostras biológicas com soluções padrão individuais
27 de cada ácido orgânico.

28 29 4.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

30
31 Para a validação do método, os parâmetros avaliados foram conformidade do sistema,
32 linearidade, precisão intra e inter dia, efeito de matriz e exatidão. A validação foi realizada
33 com base nas diretrizes da AOAC Internacional (AOAC, 2016) e do INMETRO (2020).

34

1 **4.5.1. Conformidade do sistema**

2
3 A conformidade do sistema foi avaliada por dez injeções consecutivas de uma solução
4 padrão. Foi calculado o coeficiente de variação (CV) da média das áreas dos picos e dos
5 tempos de migração, ambos corrigidos pelo padrão interno, de todos os analitos.

6 7 **4.5.2. Linearidade e efeito de matriz**

8
9 A linearidade foi avaliada por meio de curvas de calibração. Para o ácido cítrico, a
10 curva foi preparada em sete concentrações, com triplicatas independentes em cada
11 concentração, e a faixa linear foi de 10 a 300 mg L⁻¹. Para os demais analitos, as curvas foram
12 preparadas em seis concentrações, também com três replicatas independentes em cada
13 concentração, e a faixa linear avaliada foi de 5 a 55 mg L⁻¹ para cada analito. O método dos
14 mínimos quadrados ordinários foi aplicado e foram avaliados os coeficientes de determinação
15 (R²) e a significância estatística da regressão foi avaliada aplicando-se os testes F e valor *p*. A
16 presença de *outliers* foi avaliada aplicando-se o teste de Grubbs. A distribuição normal dos
17 resíduos foi avaliada aplicando-se os testes Shapiro-Wilk e valor *p*. (Augusto, Andrade, J. C.
18 De e Custodio, 2000; Cassiano *et al.*, 2009; Pimentel e Neto, B. D. B., 1996).

19 O efeito de matriz foi avaliado comparando os coeficientes angulares das curvas
20 obtidas em solução padrão com as curvas por adição de padrão. Foi aplicado o teste *t* para
21 confirmar a presença ou não de efeito de matriz (INMETRO, 2020).

22 23 **4.5.3. Limites de detecção e quantificação**

24
25 O método utilizado para determinar os limites de detecção e quantificação foi através
26 da relação sinal/ruído da linha base, obtida das soluções de padrão dos analitos. O limite de
27 detecção (LOD) foi determinado como três vezes a relação sinal ruído e o limite de
28 quantificação (LOQ) dez vezes a relação sinal/ruído.

29 30 **4.5.4. Precisão**

31
32 A repetibilidade (precisão intra-dia) foi avaliada pela injeção de soluções padrão dos
33 analitos em três concentrações diferentes. Foram realizadas três triplicatas independentes.

1 Para a precisão intermediária (precisão inter-dia) o mesmo processo foi repetido durante três
2 dias não consecutivos. Os resultados foram expressos como CV.

3 4 **4.5.5. Exatidão**

5
6 A exatidão foi avaliada pela medida da recuperação de três amostras fortificadas em
7 três níveis de concentração da faixa linear da curva de calibração, para cada analito. Todas as
8 medidas foram realizadas em triplicata. A recuperação foi calculada conforme a equação 1:

$$9 \quad Rec (\%) = \frac{C_{amostra\ fortificada} - C_{amostra\ não\ fortificada}}{C_{adicionada}} \times 100 \quad (1)$$

10
11
12 Os resultados foram expressos como a média da recuperação das replicatas
13 independentes em cada concentração e o desvio padrão das replicatas foi calculado.

14 15 **4.6. ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS**

16
17 O método foi aplicado para a análise de amostras de urina de pacientes com obesidade
18 submetidos a cirurgia bariátrica. As amostras foram coletadas no dia da cirurgia e um ano
19 após a cirurgia. Foram analisadas, no total, 36 amostras. No entanto, algumas amostras não
20 possuíam a informação da concentração de creatinina, não sendo possível corrigir a
21 concentração dos analitos na amostra pelo conteúdo de creatinina. Além disso, nem todas as
22 amostras foram entregues em pares do mesmo indivíduo de antes e após a cirurgia. As
23 amostras que não possuíam tais informações não foram incluídas na análise de componentes
24 principais (PCA) descrita a seguir. Permaneceram, então, um total de 32 amostras de urina de
25 16 indivíduos afetados por obesidade. Os resultados foram expressos como μg de cada ácido
26 orgânico por mg de creatinina em cada amostra. Fatores como o horário da coleta, a
27 concentração e o fluxo da urina podem afetar a diluição da urina e, conseqüentemente, as
28 concentrações dos ácidos. Portanto, é necessário corrigir essas possíveis diferenças. A
29 excreção de creatinina é constante em cada indivíduo, por isso os resultados das
30 concentrações de analitos da urina foram expressos em razão da concentração de creatinina
31 (Tang, Toh e Teo, 2015; Waikar, Sabbisetti e Bonventre, 2010).

1
2
3
4
5
6
7

Para verificar se as diferentes concentrações de ácidos orgânicos determinadas nas amostras eram suficientes para classificar os dois grupos de amostras, foi realizada uma análise de PCA. Esta análise foi realizada utilizando o *R Statistical Software* (R Core Team, 2022), um ambiente de desenvolvimento integrado de código aberto em R. O pacote em R utilizado para as análises foi o *factoextra* (Kassambara e Mundt, 2020).

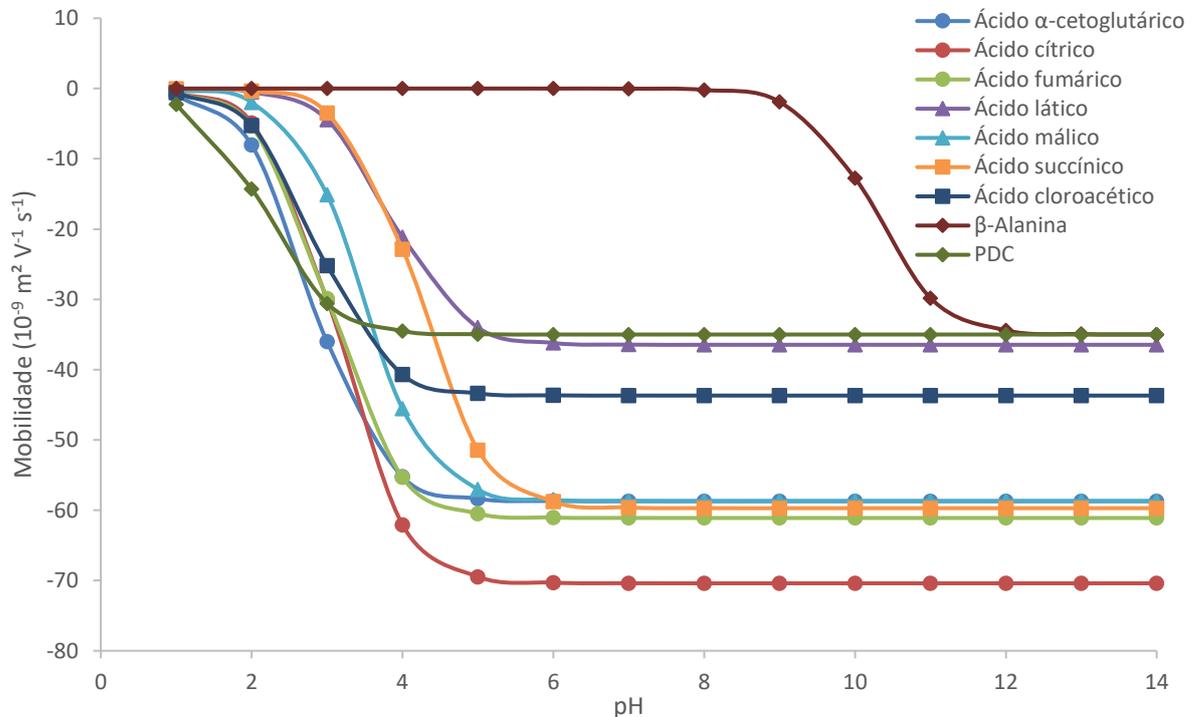
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão descritos o desenvolvimento, a validação e os resultados obtidos com o método por CZE utilizando inversor de fluxo dinâmico. No entanto, antes do desenvolvimento deste, foram testados outros métodos para determinação dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. A primeira tentativa foi utilizando LC-MS/MS. Em seguida, optou-se por utilizar GC-MS. Por fim, buscou-se desenvolver um método por CZE utilizando capilares revestido com SAQQ. Os resultados obtidos com estes métodos não foram satisfatórios e, portanto, o desenvolvimento e os resultados destes estão apresentados nos Âpendices A e B.

5.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

Para o desenvolvimento do método, inicialmente foi selecionado o pH adequado para o eletrólito. Para isso, foi construído um gráfico de mobilidade vs pH (Figura 6) para todos os analitos avaliados usando o pKa e os dados de mobilidade eletroforética obtidos da base de dados compilada por Hirokawa (1983). O padrão interno escolhido foi o ácido cloroacético, devido a sua ausência em amostras de urina humana. Sua mobilidade efetiva foi avaliada junto com a mobilidade dos analitos para a otimização do eletrólito. Na faixa de pH entre 3 e 4 as diferenças de mobilidade são maximizadas, mostrando que essa era a região promissora para a otimização. Portanto, o pH selecionado foi 4.

1 **Figura 6** - Curvas de mobilidade efetiva versus pH dos analitos ácido α -cetoglutárico, ácido
 2 cítrico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido málico e ácido succínico, do padrão interno ácido
 3 cloroacético e dos componentes do eletrólito de corrida β -alanina e ácido 2,6-
 4 pridinocarboxílico (PDC).

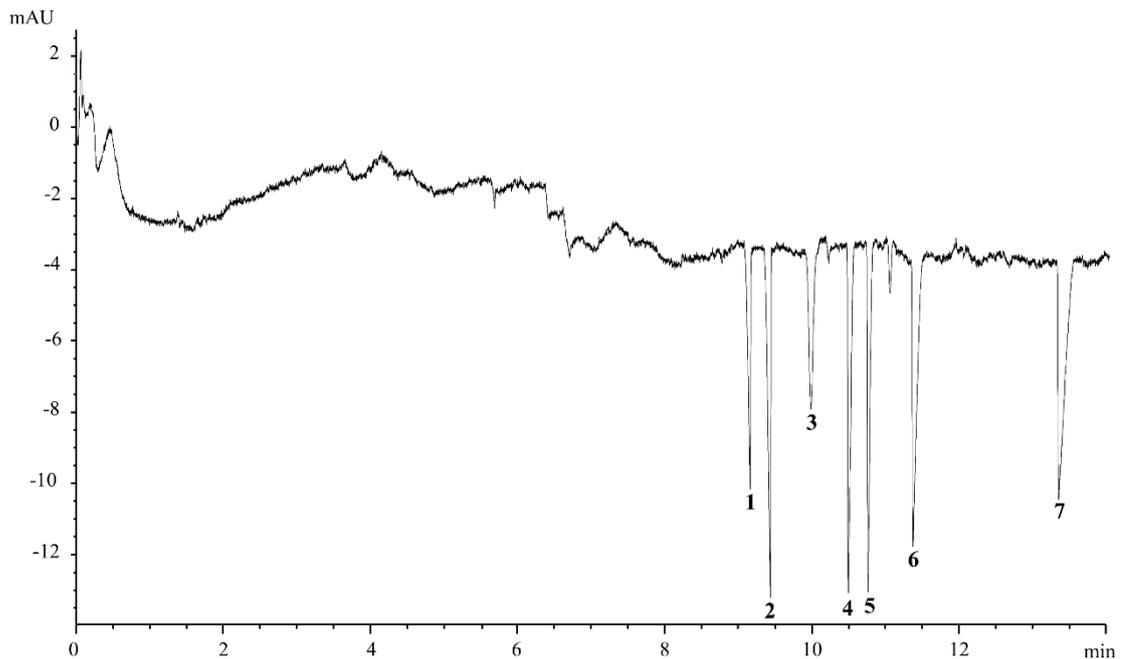


5
6 Fonte: elaborado pelo autor

7
8 Em seguida, foram selecionados os componentes apropriados para o eletrólito. Na
 9 determinação de ânions por CZE, o co-íon deve ter uma mobilidade próxima a mobilidade da
 10 maioria dos analitos para minimizar a distorção dos picos (Doble, Macka e Haddad, 2000;
 11 Gebauer, Beckers e Boček, 2002). Como os analitos não absorvem ou absorvem pouco no
 12 espectro UV, também é necessário que o ânion selecionado seja um cromóforo, para que a
 13 detecção indireta seja possível de ser realizada. Além disso, é necessário que a capacidade
 14 tamponante seja adequada para reduzir as variações de pH. Levando em consideração essas
 15 características, o PDC foi selecionado como co-íon, um cromóforo que permite a detecção
 16 indireta em 290 nm. Sua mobilidade também está apresentada na Figura 6. No pH
 17 selecionado, sua mobilidade efetiva é próxima a média das mobilidades dos analitos. Para
 18 fornecer a capacidade tamponante necessária para o eletrólito, a β -alanina foi selecionada
 19 como contra-íon. Como os ácidos orgânicos são ânions pequenos, foi necessário usar um
 20 inversor de fluxo de modo a se obter um tempo de corrida aceitável. Neste caso, optou-se por
 21 utilizar o surfactante catiônico CTAOH, um inversor de fluxo dinâmico.

1 A urina possui uma condutividade elétrica alta ($>20 \text{ mS cm}^{-1}$) devido ao seu conteúdo
 2 elevado de cloreto de sódio. Isto pode causar um alargamento da zona da amostra, o que
 3 resulta no alargamento dos picos (Santoro *et al.*, 2020; Tûma *et al.*, 2013). Para evitar este
 4 problema, foi utilizada uma concentração elevada de PDC (24 mmol L^{-1}). Essa concentração
 5 de PDC no BGE garantiu uma capacidade tamponante maior e melhorou a separação,
 6 permitindo que as amostras fossem diluídas e injetadas diretamente no sistema de CE, sem
 7 um preparo de amostra mais laborioso. A separação de uma solução de padrões está
 8 apresentada na Figura 7.

9
 10 **Figura 7** - Eletroferograma de uma solução contendo todos os padrões dos ácidos orgânicos
 11 em uma concentração de 55 mg L^{-1} , e padrão interno em uma concentração de 30 mg mL^{-1} ,
 12 obtido utilizando o método desenvolvido por CZE. Condições experimentais: BGE, 24 mmol
 13 L^{-1} de PDC, 76 mmol L^{-1} de β -alanina e 4 mmol L^{-1} de CTAOH (pH 4); capilar de sílica, 100
 14 cm de comprimento total ($91,5 \text{ cm}$ efetivo), $75 \mu\text{m}$ de diâmetro interno; injeção
 15 $100 \text{ mBar } 5 \text{ s}^{-1}$; -30 kV ; temperatura $20 \text{ }^\circ\text{C}$; detecção indireta em 290 nm . Sinais: ácido
 16 cloroacético (padrão interno) (1), ácido fumárico (2); ácido α -cetoglutárico (3); ácido málico
 17 (4); ácido cítrico (5); ácido lático (6); ácido succínico (7).



Fonte: elaborado pelo autor

5.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

5.2.1. Conformidade do sistema

Para avaliar a precisão instrumental, foram realizadas dez injeções consecutivas de uma mistura contendo todos os padrões em uma concentração igual a 25 mg L⁻¹. O CV foi calculado pela equação 2:

$$CV = \frac{D}{M} \times 100 \quad (2)$$

em que D é o desvio padrão absoluto e M é a média aritmética das razões de áreas da substância a analisar pela área do padrão interno ou média aritmética do tempo de migração. Os CV obtidos para as áreas dos analitos corrigidas pela área do padrão ficaram entre 1,69 e 5,09 %. Para os tempos de migração corrigidos, o CV para todos os analitos foi menor que 0,13 % (Tabela 2).

Tabela 2 - Conformidade do sistema obtida pelos coeficientes de variação de dez injeções consecutivas de uma solução contendo os padrões de todos os analitos com padrão interno em concentração igual ao ponto central da curva.

Analito	Coeficiente de variação (%)	
	Área	Tempo
Ácido α -cetoglutárico	5,10	0,03
Ácido cítrico	2,93	0,04
Ácido fumárico	1,96	0,01
Ácido láctico	1,93	0,06
Ácido málico	2,67	0,04
Ácido succínico	1,69	0,12

Fonte: elaborado pelo autor

Segundo a AOAC (2016), os valores de CV devem ser menores que 11 % para amostras cujas concentrações estejam na ordem de mg L⁻¹. Logo, os resultados obtidos mostraram que o instrumento estava adequado, possibilitando dar continuidade para a validação e as análises.

5.2.2. Linearidade e efeito de matriz

Foram construídas curvas de calibração dos seis analitos e a concentração do padrão interno foi mantida constante. As curvas foram preparadas em triplicata. Para a avaliação destas, primeiro foram gerados gráficos de regressão linear para cada um dos analitos relacionando a razão da área do analito pela área do padrão interno, e a concentração do analito. Os resultados estão apresentados na Tabela 3. Os coeficientes de determinação obtidos para todos os analitos foram maiores que 0,9973, sendo considerados adequados. Foi aplicado o teste de Grubbs e verificou-se que não houve a presença de outliers.

Foi avaliada também a significância estatística da regressão. Essa avaliação é realizada para verificar se os coeficientes dos modelos matemáticos propostos para cada analito são diferentes de zero. Para isto, utiliza-se o teste F. Considerando um modelo de regressão linear simples, como as curvas obtidas (equação 3):

$$y = \beta_1 x + \beta_0 \quad (3)$$

observa-se que se β_1 for igual a zero, os valores de y não se alteram de acordo com as variações de x . Nesse caso, significa dizer que os valores de área (y) não se alteram em função das variações das concentrações (x). Isto implica dizer que não existe uma associação entre as variáveis. Para verificar essa premissa, aplica-se um teste de hipóteses. A hipótese nula do teste F é que os coeficientes são iguais a zero e a razão entre a variância da regressão e a variância dos resíduos segue uma distribuição F (Neto, Scarminio e Bruns, 2010). A decisão de rejeitar ou não a hipótese nula depende do nível de significância escolhido. Para este trabalho, o nível de significância utilizado foi $\alpha = 0,05$. Isso significa que para valores p menores que 0,05 a hipótese nula foi rejeitada, indicando que os coeficientes são diferentes de zero e existe uma associação entre as variáveis (Martinez, 2015).

Os resultados do teste F e o valor p para todos os analitos estão apresentados na Tabela 3. Como é possível observar, os valores obtidos para o teste F foram todos acima de 1481,3 e os respectivos valores p , menores que 0,05. Esses resultados indicam que a hipótese nula deve ser rejeitada. Portanto, os coeficientes dos modelos matemáticos propostos para cada analito foram estatisticamente significativos, e os modelos puderam ser utilizados para calcular a concentração de cada analito nas amostras.

Tabela 3 - Parâmetros de mérito para as curvas analíticas dos ácidos orgânicos.

Analito	Faixa linear (mg L ⁻¹)	Coeficiente de determinação (R ²)	Equação da regressão	Significância estatística da regressão		Distribuição normal dos resíduos		LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
				Teste F	Valor <i>p</i> ^c	Teste de Shapiro-Wilk	Valor <i>p</i> ^c		
Ácido α - cetoglutárico	5-55 ^a	0,9973	0,02233x + 0,01612	1481,3	$2,72 \times 10^{-6}$	0,9379	0,6421	3,34	1,10
Ácido cítrico	10-300 ^b	0,9987	0,02236x – 0,06613	3857,5	$2,05 \times 10^{-8}$	0,9362	0,6045	0,67	0,22
Ácido fumárico	5-55 ^a	0,9998	0,03432x + 0,009242	16718	$2,15 \times 10^{-8}$	0,8814	0,2756	0,74	0,24
Ácido láctico	5-55 ^a	0,9990	0,04177x + 0,04523	4164,6	$3,45 \times 10^{-7}$	0,9612	0,8291	2,38	0,79
Ácido málico	5-55 ^a	0,9990	0,0349x + 0,008977	4098,5	$3,57 \times 10^{-7}$	0,948	0,7239	1,03	0,34
Ácido succínico	5-55 ^a	0,9989	0,05374x + 0,04622	3728,4	$4,31 \times 10^{-7}$	0,9391	0,6518	1,94	0,64

^aCurvas de calibração com seis níveis de concentração. ^bCurvas de calibração com sete níveis de concentração. A área de todos os analitos foi corrigida pela área do padrão interno. Todos os pontos foram preparados em triplicata. ^cNível de significância estatística $\alpha = 0,05$

Fonte: elaborado pelo autor

Foi avaliado também se os resíduos dos modelos matemáticos em relação aos dados experimentais seguem uma distribuição normal. Para esta avaliação foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk com um nível de significância $\alpha = 0,05$. A premissa deste teste é de que os resíduos seguem uma distribuição normal. Neste caso, o valor p obtido para o teste deve ser maior que 0,05 e a hipótese nula deve ser aceita. Os valores obtidos para o teste de Shapiro-Wilk foram todos próximos a unidade e o valor p foi maior que 0,05 para todos os analitos (Tabela 3), indicando que os resíduos seguem uma distribuição normal (Augusto, Andrade, J. C. de e Custodio, 2000; Pimentel e Neto, B. de B., 1996).

Logo, pode-se concluir que os modelos matemáticos obtidos para os analitos foram lineares nas faixas de trabalho propostas e foram adequados para calcular as respectivas concentrações dos analitos nas amostras.

Para avaliar o efeito de matriz, foram comparadas as inclinações das curvas de calibração em solução padrão com as curvas de calibração preparadas em amostra de urina. Todas as curvas foram preparadas em triplicata. As comparações foram realizadas utilizando o teste t . A avaliação do teste foi feita pelo valor p . A hipótese nula deste teste é que as médias são iguais. Valores de média iguais indicam que não existe efeito de matriz, enquanto médias diferentes indicam a presença do efeito de matriz. Valores p maiores que 0,05 levam a aceitação da hipótese nula, indicando que as médias não diferem significativamente e, portanto, não existe efeito de matriz (INMETRO, 2020). Os resultados deste teste estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Avaliação do efeito de matriz utilizando o teste t para verificar se as inclinações das curvas de calibração em solução padrão e as preparadas em amostra não diferem significativamente.

Analito	Teste t	Valor p^*
Ácido α -cetoglutárico	0,4376	0,6842
Ácido cítrico	1,9395	0,1245
Ácido fumárico	0,3865	0,7188
Ácido láctico	0,4448	0,6795
Ácido málico	5,9395	0,0040
Ácido succínico	0,4682	0,6640

* $p < 0,05$ indica que as médias diferem significativamente e existe efeito de matriz

Fonte: elaborado pelo autor

1 O único analito que apresentou efeito de matriz foi o ácido málico e por isso foi
2 utilizada a curva feita em matriz (equação 4) para quantificá-lo nas amostras:

$$y = 0,02355 x + 0,06098 \quad (4)$$

4 O R² obtido para a curva em matriz foi igual a 0,9922. Foram realizados também o
5 teste F para verificar a significância estatística da regressão e o teste de Shapiro-Wilk para
6 verificar se os resíduos seguem uma distribuição normal, assim como nas demais curvas. O
7 valor obtido para o teste F foi 381,7 (valor $p = 2,93 \times 10^{-4}$) e para o teste de Shapiro-Wilk, W
8 = 0,978 (valor $p = 0,7213$), indicando que o modelo matemático obtido em matriz foi linear
9 na faixa de trabalho e pôde ser utilizado para calcular as concentrações de ácido málico nas
10 amostras.

12 **5.2.3. Limites de detecção e quantificação**

14 O LOD e o LOQ foram obtidos pela razão sinal/ruído. Os valores obtidos para LOD
15 ficaram entre 0,05 e 0,34 mg L⁻¹ e os valores obtidos para LOQ, entre 0,16 e 1,05 mg L⁻¹
16 (Tabela 3).

18 **5.2.4. Precisão**

20 Para avaliar a precisão do método foram utilizadas soluções padrão dos ácidos α -
21 cetoglutárico, cítrico, fumárico, láctico, málico e succínico em 3 níveis de concentração. Os
22 resultados obtidos estão na Tabela 5.

23 Para a precisão intra-dia, os CV obtidos foram menores que 7 % para as áreas
24 corrigidas pela área do padrão interno, e menos de 1 % para os tempos de migração para todos
25 os analitos. Para a precisão inter-dia, todos os analitos apresentaram CV menor que 11 % para
26 as áreas dos picos e menor que 1 % para os tempos de migração. Ambas as precisões foram
27 consideradas satisfatórias, uma vez que estes valores estão de acordo com o recomendado
28 pela AOAC (2016).

1 **Tabela 5** - Valores de precisão intra e inter-ensaio, avaliado em três níveis de concentração
 2 utilizando soluções padrão de cada analito.

Analito	Concentração (mg L ⁻¹)	Precisão (CV, %)		Precisão (CV, %)	
		Área do pico		Tempo de migração	
		Intra-dia	Inter-dia	Intra-dia	Inter-dia
Ácido α - cetoglutárico	5	6,88	9,06	0,14	0,24
	25	6,75	10,61	0,02	0,16
	55	2,05	7,13	0,09	0,92
Ácido cítrico	10	4,30	5,17	0,25	0,50
	150	6,97	5,99	0,08	0,50
	300	2,81	8,78	0,19	0,55
Ácido fumárico	5	5,31	3,90	0,06	0,09
	25	6,27	8,61	0,04	0,11
	55	1,77	3,61	0,05	0,12
Ácido láctico	5	6,54	10,51	0,45	0,44
	25	3,00	10,47	0,36	0,60
	55	1,78	7,49	0,25	1,09
Ácido málico	5	1,26	9,38	0,24	0,36
	25	1,81	6,88	0,24	0,12
	55	0,79	9,34	0,15	0,97
Ácido succínico	5	7,09	9,81	0,82	1,04
	25	3,47	6,48	0,72	0,97
	55	2,11	7,98	0,47	1,12

3 Fonte: elaborado pelo autor

6 5.2.5. Exatidão

7
 8 A exatidão foi avaliada pela recuperação de uma quantidade conhecida de todos os
 9 padrões adicionada em três concentrações diferentes em amostras de urina. A Tabela 6
 10 apresenta os resultados de recuperação para todos os analitos e as concentrações de padrões
 11 adicionados nas matrizes.

12
 13

Tabela 6 - Valores de recuperação dos ácidos orgânicos obtidos em três níveis de concentração adicionado as matrizes de urina de seres humanos com o desvio padrão de cada medida.

Analito	Concentração (mg L⁻¹)	Recuperação (%) ± SD
Ácido α-cetoglutárico	25	99,03 ± 14,49
	35	96,15 ± 10,99
	45	102,47 ± 7,96
Ácido cítrico	50	114,52 ± 16,41
	150	104,68 ± 3,01
	300	104,94 ± 1,50
Ácido fumárico	25	106,02 ± 17,32
	35	99,14 ± 17,31
	45	99,58 ± 8,69
Ácido láctico	25	104,23 ± 20,05
	35	98,41 ± 16,29
	45	97,58 ± 8,11
Ácido málico	25	87,33 ± 24,80
	35	90,54 ± 16,13
	45	93,88 ± 8,68
Ácido succínico	25	105,61 ± 27,73
	35	95,46 ± 5,94
	45	101,22 ± 15,51

Fonte: elaborado pelo autor

As recuperações obtidas para todos os analitos avaliados variaram de 87 % a 114 %. Com exceção da recuperação de 114 % obtida para o ácido cítrico na concentração de 50 mg L⁻¹, os valores foram considerados aceitáveis, uma vez que estão de acordo com a AOAC (2016), que estipula que os valores de recuperação sejam entre 80 e 110 %.

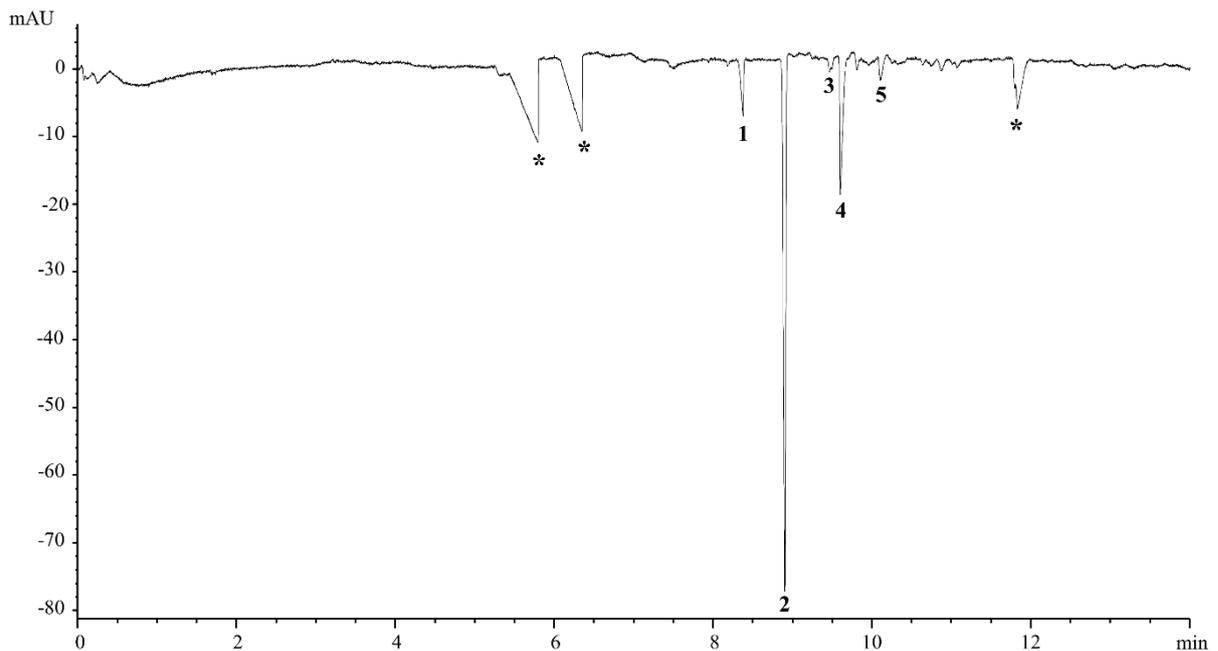
5.3. ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS

Para verificar a aplicabilidade do método desenvolvido, foram analisadas amostras de urina de indivíduos afetados por obesidade submetidos a cirurgia bariátrica para quantificar os intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico (Figura 8). Para confirmar que os sinais obtidos nas análises eram referentes aos analitos, os ácidos orgânicos foram identificados nos eletroferogramas pela fortificação de amostras biológicas com soluções padrão individuais

1 dos ácidos. O fosfato foi identificado em todas as amostras, mas não foi quantificado por não
 2 ser de interesse para este trabalho. As concentrações dos analitos em cada amostra foram
 3 calculadas usando os modelos matemáticos obtidos com as curvas de calibração. As
 4 concentrações dos ácidos foram então corrigidas pela concentração de creatinina por mL de
 5 urina e os resultados foram expressos como μg de analito por mg de creatinina. Os resultados
 6 obtidos estão apresentados na Tabela 7.

7

8 **Figura 8** - Eletroferograma obtido com uma análise de amostra de urina utilizando o método
 9 desenvolvido. A amostra apresentada foi de um indivíduo afetado por obesidade um ano após
 10 ser submetido a cirurgia bariátrica. Condições experimentais: BGE, 24 mmol L^{-1} de PDC, 76
 11 mmol L^{-1} de β -alanina e 4 mmol L^{-1} de CTAOH (pH 4); capilar de sílica, 100 cm de
 12 comprimento total (91,5 cm efetivo), $75 \mu\text{m}$ de diâmetro interno; injeção 100 mBar 5 s^{-1} ; -30
 13 kV; temperatura $20 \text{ }^\circ\text{C}$; detecção indireta em 290 nm. Sinais e suas concentrações: ácido
 14 cloroacético (padrão interno) (1), 30 mg L^{-1} ; fosfato (2), não quantificado; ácido málico (3),
 15 $10,50 \text{ mg L}^{-1}$; ácido cítrico (4), $128,03 \text{ mg L}^{-1}$; ácido lático (5), $14,09 \text{ mg L}^{-1}$. *Interferentes
 16 não identificados.



Fonte: elaborado pelo autor

17

18

19

20

21

22

23

24

25

Tabela 7 - Resultados da quantificação dos intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico para amostras de urina de pacientes com obesidade antes de serem submetidos a cirurgia bariátrica e um ano após a cirurgia pelo método proposto por eletroforese capilar de zona com detector de arranjo de diodos.

Paciente	Período	Concentrações dos analitos ($\mu\text{g mg}^{-1}$)*		
		Ácido cítrico	Ácido láctico	Ácido málico
1	Pré-cirurgia	72,06	18,61	<LOD
	Pós-cirurgia	207,34	22,10	26,48
2	Pré-cirurgia	236,37	17,86	9,03
	Pós-cirurgia	270,48	17,68	8,40
3	Pré-cirurgia	316,35	61,42	18,68
	Pós-cirurgia	139,22	16,01	6,85
4	Pré-cirurgia	188,77	19,88	22,90
	Pós-cirurgia	22,84	26,84	7,48
5	Pré-cirurgia	36,54	13,41	8,58
	Pós-cirurgia	102,35	24,84	<LOD
6	Pré-cirurgia	105,40	<LOD	<LOD
	Pós-cirurgia	96,79	26,61	<LOD
7	Pré-cirurgia	67,38	6,13	5,50
	Pós-cirurgia	70,07	58,30	<LOD
8	Pré-cirurgia	<LOD	14,50	<LOD
	Pós-cirurgia	127,19	36,96	15,07
9	Pré-cirurgia	88,33	13,38	18,43
	Pós-cirurgia	392,48	43,19	32,17
10	Pré-cirurgia	87,60	12,16	15,96
	Pós-cirurgia	88,53	22,22	<LOD
11	Pré-cirurgia	152,43	40,35	<LOD
	Pós-cirurgia	68,11	27,95	<LOD
12	Pré-cirurgia	32,77	11,75	<LOD
	Pós-cirurgia	92,04	54,82	<LOD
13	Pré-cirurgia	166,31	31,63	27,13
	Pós-cirurgia	38,57	20,60	<LOD
14	Pré-cirurgia	60,46	35,51	14,11
	Pós-cirurgia	<LOD	15,53	<LOD
15	Pré-cirurgia	429,08	75,64	<LOD
	Pós-cirurgia	115,81	35,87	16,32
16	Pré-cirurgia	283,02	47,73	<LOD
	Pós-cirurgia	97,84	37,49	<LOD

*concentrações dos ácidos corrigidas pela concentração de creatinina (μg de analito por mg de creatinina)

Fonte: elaborado pelo autor.

O ácido α -cetoglutárico foi detectado somente em duas amostras, ambas do mesmo paciente. As concentrações encontradas foram de $0,0752 \text{ mg mL}^{-1}$ para a amostra coletada antes da cirurgia bariátrica e $0,0637 \text{ mg mL}^{-1}$ para a amostra coletada um ano após a cirurgia. Como não foi obtida a informação da concentração de creatinina em uma dessas amostras,

1 ambas não fizeram parte da análise de PCA descrita posteriormente. O ácido α -cetoglutárico é
2 difícil de detectar devido a sua instabilidade e sensibilidade ao pH. Este pode ser instável sob
3 as condições de preparo de amostra e, conseqüentemente, pode sofrer descarboxilação (Kadhi,
4 Al *et al.*, 2017).

5 Os ácidos fumárico e succínico não foram detectados em nenhuma das amostras
6 analisadas. Estes dois ácidos, juntamente com o ácido α -cetoglutárico, raramente são
7 detectados, independente da matriz que está sendo analisada. Métodos usando CZE com
8 detecção por UV não foram capazes de detectá-los em células de bactérias (Gao *et al.*, 2007;
9 Markuszewski *et al.*, 2003), também não foi possível detectá-los em plasma e urina usando
10 métodos por LC com detector por fluorescência (Kubota *et al.*, 2005) e com detecção por UV
11 (Shurubor *et al.*, 2016). Mesmo quando estão presentes nas amostras, as concentrações destes
12 são baixas. Um método utilizando LC com detector de condutividade foi capaz de detectar
13 estes analitos, mas não foi possível quantificá-los devido as baixas concentrações (Lu *et al.*,
14 2003). Em análises de vinho por CZE com detector UV, os ácidos fumárico e succínico
15 também foram determinados em concentrações menores em relação aos outros ácidos
16 (Moreno, Jurado e Barroso, 2003). Isto também ocorreu com amostras de soro sanguíneo e
17 urina analisadas por CZE com detector UV, em que os ácidos fumárico e α -cetoglutárico
18 apresentaram as menores concentrações (Barbas *et al.*, 2002; García *et al.*, 1998). Quanto aos
19 outros ácidos, um método utilizando LC-MS/MS foi capaz de quantificar os ácidos fumárico e
20 succínico em soro sanguíneo, células e tecido. Estes apresentaram concentrações menores em
21 relação aos demais ácidos do ciclo do ácido tricarboxílico sendo analisados (Rathod *et al.*,
22 2020). Os ácidos fumárico, succínico e α -cetoglutárico também foram determinados por
23 HILIC-MS/MS em células pulmonares cancerígenas e as concentrações encontradas também
24 foram as menores quando comparadas com as concentrações dos demais ácidos analisados
25 (Zhang *et al.*, 2018). As baixas concentrações destes metabólitos podem ser devido ao
26 elevado fluxo metabólico (Yamamoto *et al.*, 2021).

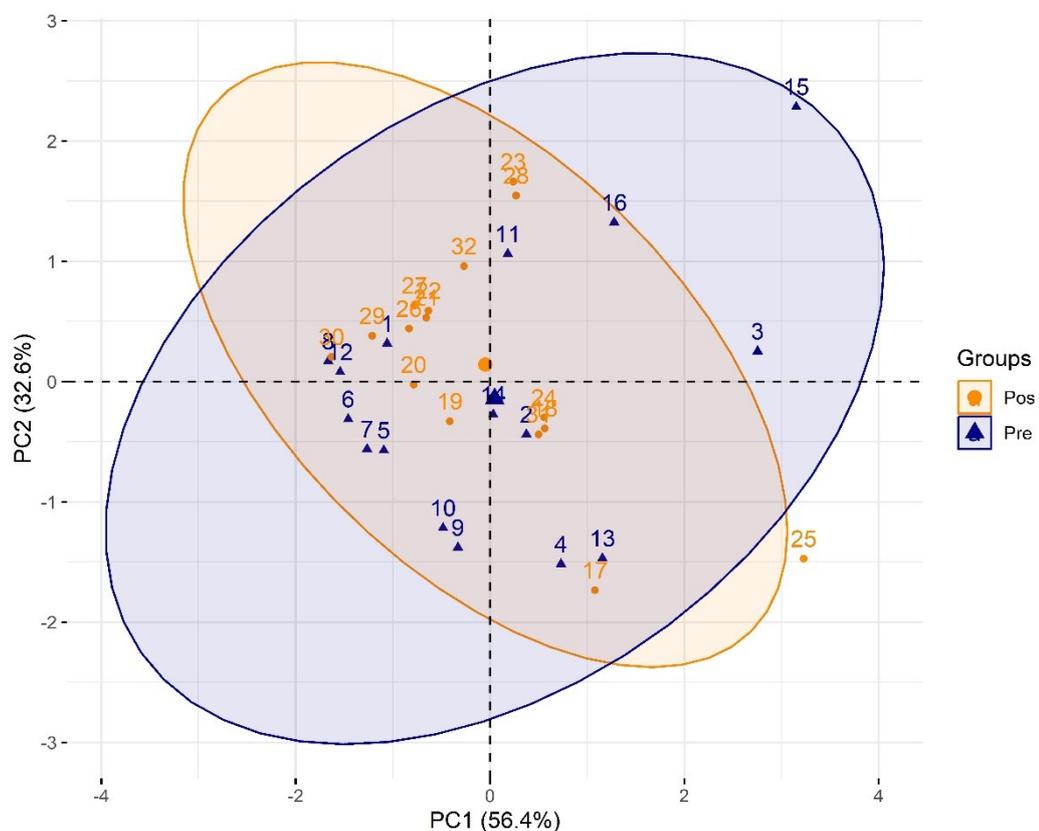
27 Com o método desenvolvido neste trabalho foi possível detectar e quantificar estes
28 analitos em baixas concentrações nas soluções padrão. Portanto, considerou-se que estes
29 metabólitos não puderam ser quantificados porque suas concentrações estão abaixo do LOQ
30 ou devido a sua instabilidade.

31 As concentrações de ácido láctico variaram de 11,8 a 75,6 $\mu\text{g mg}^{-1}$, e as concentrações
32 de ácido málico ficaram na faixa de 5,5 a 32,2 $\mu\text{g mg}^{-1}$. O ácido cítrico foi o analito que
33 apresentou as maiores concentrações nas amostras, variando de 22,8 a 42,9 $\mu\text{g mg}^{-1}$. Para
34 avaliar se as diferentes concentrações dos ácidos cítrico, láctico e málico encontradas nas

1 amostras foram devido a mudanças metabólicas relacionadas a cirurgia bariátrica, foi
 2 realizada uma análise de PCA. O *scores plot* mostra o percentual da variação explicada pela
 3 primeira componente principal (PC1) e da segunda componente principal (PC2) (Figura 9).
 4 As duas componentes principais explicaram 89 % da variância total. No entanto, o PCA não
 5 classificou as amostras de acordo com o período em que elas foram coletadas. Portanto, as
 6 diferenças nas concentrações dos analitos entre os dois conjuntos de amostras não foram
 7 expressivas de modo que pudessem ser separadas. Logo, nenhum dos ácidos pode ser usado
 8 para distinguir os dois conjuntos de amostras. A variação das concentrações dos ácidos pode
 9 ser um resultado apenas da variabilidade biológica entre os indivíduos devido a diferenças
 10 gerais no metabolismo, que são associadas a fatores genéticos e nutricionais (Denkert *et al.*,
 11 2008).

12

13 **Figura 9** - Gráfico de *scores* da análise de PCA referente as 32 amostras de urina analisadas
 14 utilizando o método validado por CZE. As concentrações dos ácidos orgânicos em cada
 15 amostra foram corrigidas pela concentração de creatinina. (Pos, amostras coletadas um ano
 16 após a cirurgia bariátrica; Pre, amostras coletadas antes da cirurgia bariátrica; PC,
 17 componente principal).



18

19

20

Fonte: elaborado pelo autor

1 Os metabólitos presentes na urina são bons indicadores da função dos rins enquanto o
2 estado do sistema como um todo pode ser refletido nos metabólitos presentes no soro
3 sanguíneo (Li *et al.*, 2013). Análises de urina associadas a análises do soro sanguíneo
4 poderiam fornecer um entendimento melhor das mudanças metabólicas envolvidas na
5 obesidade. Além disso, neste estudo não foi avaliado nenhum grupo controle para verificar se
6 havia alguma diferença na concentração de metabólitos entre indivíduos saudáveis e
7 indivíduos afetados pela obesidade.

8 Como a maior perda de peso resultante da cirurgia bariátrica ocorre nos primeiros 6 a
9 12 meses após a cirurgia, o intervalo de coleta das amostras escolhido foi considerado
10 adequado para verificar mudanças metabólicas. No entanto, não foi fornecida nenhuma
11 informação sobre os pacientes como sexo, idade e existência de outras comorbidades. Estas
12 informações são extremamente importantes e relacioná-las com a PCA possibilitaria fazer
13 uma avaliação mais eficiente dos resultados. Portanto, não foi possível obter informações
14 mais conclusivas a respeito de possíveis mudanças acarretadas ao ciclo em decorrência da
15 cirurgia. Apesar disso, o método desenvolvido e validado permitiu a análise simultânea de
16 cinco dos intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico e do ácido láctico, mostrando sua
17 eficiência em quantificar estes metabólitos em urina de seres humanos.

18 O ácido cítrico apresentou as maiores concentrações nas amostras analisadas. A sua
19 concentração no sangue e na urina indica o status da atividade do ciclo do ácido
20 tricarbóxico, uma vez que não existe nenhuma eliminação extra-renal conhecida e a ingestão
21 via oral tem pouca influência (Hallan *et al.*, 2017). Logo, as concentrações determinadas são
22 referentes ao ciclo do ácido tricarbóxico e o método para ser utilizado para outros estudos
23 que busquem avaliar as concentrações deste ácido.

24 Os rins possuem uma grande quantidade de mitocôndrias e, portanto, disfunções na
25 homeostase mitocondrial podem levar a uma redução da produção de energia, resultando em
26 falhas na função renal. Assim, anormalidades do ciclo detectadas na urina podem ser úteis
27 para estudar o desenvolvimento e a progressão de diferentes condições de saúde,
28 principalmente de doenças relacionadas aos rins (Liu *et al.*, 2018; Lunyera *et al.*, 2022).

29 Um dos problemas renais mais comuns que afetam a população é o cálculo renal,
30 conhecido popularmente como pedra nos rins. O ácido cítrico desempenha um papel
31 importante no desenvolvimento do cálculo renal e sua concentração na urina pode ser útil no
32 diagnóstico precoce da doença. Portanto, os seus níveis podem ser utilizados para diagnóstico,
33 sendo que níveis baixos indicam o risco de desenvolvimento da doença, enquanto níveis

1 maiores sugerem que não há risco de formação de cálculo renal (Khaskhali, Bhanger e Khand,
2 1996; Petrarulo *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2022).

3 A baixa eliminação de metabólitos do ciclo do ácido tricarboxílico também já foi
4 associada a doença renal crônica (Hallan *et al.*, 2017). Estes metabólitos também mostraram
5 potencial para serem biomarcadores nos primeiros estágios da nefropatia diabética (Liu *et al.*,
6 2018; Lunyera *et al.*, 2022).

7 Neste trabalho foi apresentado um método capaz de quantificar esses intermediários e
8 que pode ser aplicado em várias pesquisas na área da saúde. Quando comparado com outros
9 métodos na literatura que utilizaram CZE para detectar os intermediários do ácido
10 tricarboxílico, o método apresentado possui a vantagem de utilizar injeção hidrodinâmica. A
11 injeção eletrocinética muitas vezes utilizada é discriminativa, uma vez que depende da
12 mobilidade dos analitos. Quando comparadas, a precisão e a exatidão da injeção
13 hidrodinâmica não são afetadas pelas condições experimentais. Logo, apresenta melhor
14 repetibilidade e é menos suscetível a erros de medida, tornando-a mais adequada para análises
15 quantitativas. Além disso, o método apresentado oferece um preparo de amostra simples,
16 tornando-o menos laborioso e menos suscetível a perda de analitos. Comparando com os
17 métodos que analisaram amostra alimentícias e amostras biológicas, o método desenvolvido
18 neste trabalho apresenta a vantagem de se ser capaz de separar todos os analitos utilizando um
19 surfactante catiônico como inversor de fluxo, sem a necessidade de realizar um procedimento
20 de revestimento de capilar. Também não foi necessário o uso de nenhum aditivo para
21 melhorar o perfil dos picos obtidos, como agentes complexantes ou solventes orgânicos.
22 Portanto, o método proposto apresenta-se como uma alternativa interessante para a
23 determinação dos ácidos α -cetoglutárico, cítrico, fumárico, láctico, málico e succínico por
24 CZE-DAD e aplicações em análises de metabolômica dirigida.

25

26

27

28

29

30

31

6. CONCLUSÃO

O método de CZE desenvolvido foi validado e apresentou resultados adequados para os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação de acordo com os órgãos reguladores. Estes resultados confirmam a eficácia do método na determinação dos ácidos α -cetoglutárico, cítrico, fumárico, láctico, málico e succínico em amostras de urina humana. Dos ácidos analisados, o único que apresentou efeito de matriz foi o ácido málico.

O método desenvolvido foi capaz de separar seis ácidos orgânicos utilizando um inversor de fluxo dinâmico e com injeção hidrodinâmica, além de requerer um preparo de amostra relativamente simples. Tais características conferem ao método uma boa reprodutibilidade e o tornam menos laborioso, apresentando-se como um método viável para a determinação dos ácidos α -cetoglutárico, cítrico, fumárico, láctico, málico e succínico em urina.

Na análise de amostras de urina de indivíduos afetados por obesidade antes e após serem submetidos a cirurgia bariátrica foi possível quantificar os ácidos cítrico, láctico, málico e α -cetoglutárico. A análise de PCA mostrou que as variações nas concentrações dos ácidos avaliados não foram suficientes para diferenciar os dois conjuntos de amostras, indicando que não houve uma alteração significativa nos intermediários do ciclo nesse período.

A determinação dos ácidos orgânicos nas amostras comprova a aplicabilidade do método para a análise de urina de seres humanos. O método mostrou-se eficaz e pode ser empregado em outras áreas de pesquisas metabolômicas que envolvam a determinação destes ácidos e sua relação com a saúde humana. Além disso, o método demonstra o potencial de ser adaptado para análises de outras amostras biológicas. Devido a importância destes analitos para a indústria alimentícia, o método também apresenta a possibilidade de ser utilizado em amostras de alimentos.

REFERÊNCIAS

- 1
2
- 3 ABARCA-GÓMEZ, L. *et al.* Worldwide trends in body-mass index, underweight,
4 overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based
5 measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. **Lancet**, v. 390, n.
6 10113, p. 2627–2642, dez. 2017.
- 7 ABU BAKAR, M. H. *et al.* Metabolomics - the complementary field in systems biology: a
8 review on obesity and type 2 diabetes. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 7, p. 1742–1774, 1
9 jul. 2015.
- 10 ALI, S. E. *et al.* A comparative metabolomics approach reveals early biomarkers for
11 metabolic response to acute myocardial infarction. **Science Reports**, v. 6, p. 36359, 2016.
- 12 ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B.; PRIEGO-CAPOTE, F.; CASTRO, M. D. L. DE. Metabolomics
13 analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation.
14 **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 111–119, 2010.
- 15 AOAC. **AOAC-guidelinesAppendix F: Guidelines for standard method performance**
16 **requirements. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical**
17 **Chemists.**, 2016.
- 18 AUGUSTO, F.; ANDRADE, J. C. DE; CUSTODIO, R. Faixa Linear de Uma Curva de
19 Calibração. **Chemkeys**, v. 3, p. 1–8, 2000.
- 20 BALLY, L. *et al.* A metabolomics approach to uncover effects of different exercise
21 modalities in type 1 diabetes. **Metabolomics**, v. 13, n. 7, p. 78, 2017.
- 22 BARBAS, C. *et al.* Evaluation of filter paper collection of urine samples for detection and
23 measurement of organic acidurias by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography**
24 **B**, v. 780, p. 73–82, 2002.
- 25 BARBAS, C.; MORAES, E. P.; VILLASEÑOR, A. Capillary electrophoresis as a
26 metabolomics tool for non-targeted fingerprinting of biological samples. **Journal of**
27 **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 25 jun. 2011.
- 28 BARYLA, N. E. *et al.* Characterization of surfactant coatings in capillary electrophoresis by
29 atomic force microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 19, p. 4558–4565, 1 out. 2001.
- 30 BEALE, D. J. *et al.* Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-
31 based research. **Metabolomics**, v. 14, n. 11, p. 152, 2018.
- 32 BEGOU, O. *et al.* Hyphenated MS-based targeted approaches in metabolomics. **Analyst**, v.
33 142, n. 17, p. 3079–3100, 2017.
- 34 BHARGAVA, P.; SCHNELLMANN, R. G. Mitochondrial energetics in the kidney. **Nature**
35 **Reviews Nephrology**, v. 13, n. 10, p. 629–646, 1 out. 2017.
- 36 BHATTACHARYYA, S. *et al.* Metabolomic signature of exposure and response to
37 citalopram/escitalopram in depressed outpatients. **Translational Psychiatry**, v. 9, n. 1, p.
38 173, 2019.

- 1 BOCCARD, J.; RUDAZ, S. Unravelling the effects of multiple experimental factors in
2 metabolomics, analysis of human neural cells with hydrophilic interaction liquid
3 chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry. **Journal of**
4 **Chromatography A**, v. 1527, p. 53–60, 2017.
- 5 BULLÓ, M. *et al.* Tricarboxylic acid cycle related-metabolites and risk of atrial fibrillation
6 and heart failure. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 125, p. 154915, 1 dez. 2021.
- 7 BUSZEWSKI, B.; NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) — a
8 powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 1, p.
9 231–247, 2012.
- 10 CALA, M. P. *et al.* Multiplatform plasma fingerprinting in cancer cachexia: a pilot
11 observational and translational study. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, n.
12 2, p. 348–357, 2018.
- 13 CALDERÓN-SANTIAGO, M. *et al.* Method based on GC-MS to study the influence of
14 tricarboxylic acid cycle metabolites on cardiovascular risk factors. **Journal of**
15 **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 74, p. 178–185, 3 fev. 2013.
- 16 CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações
17 representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.
- 18 CASSIANO, N. M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas
19 moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.
- 20 CHALECKIS, R. *et al.* Challenges, progress and promises of metabolite annotation for LC–
21 MS-based metabolomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 55, p. 44–50, 2019.
- 22 CHOI, I.; SON, H.; BAEK, J. H. Tricarboxylic acid (Tca) cycle intermediates: Regulators of
23 immune responses. **Life**, v. 11, n. 1, p. 1–19, 1 jan. 2021.
- 24 CHRISTOU, C. *et al.* GC-MS analysis of organic acids in human urine in clinical settings: A
25 study of derivatization and other analytical parameters. **Journal of Chromatography B**, v.
26 964, p. 195–201, 1 ago. 2014.
- 27 CIESLAROVA, Z. *et al.* Capillary electrophoresis with dual diode array detection and tandem
28 mass spectrometry to access cardiovascular biomarkers candidates in human urine:
29 Trimethylamine-N-Oxide and l-carnitine. **Journal of Chromatography A**, v. 1583, p. 136–
30 142, 2019.
- 31 CIOCAN-CARTITA, C. A. *et al.* The relevance of mass spectrometry analysis for
32 personalized medicine through its Successful application in cancer “omics”. **International**
33 **Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2576, 2019.
- 34 CLIMENT, E. *et al.* Bariatric surgery and hypertension. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10,
35 n. 18, p. 4049, 1 set. 2021.
- 36 DAI, W.; JIANG, L. Dysregulated Mitochondrial Dynamics and Metabolism in Obesity,
37 Diabetes, and Cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, 3 set. 2019.

- 1 DE-CLEVA, R. *et al.* Lactate can be a marker of metabolic syndrome in severe obesity?
2 **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 34, n. 1, p. e1579, 2021.
- 3 DENKERT, C. *et al.* Metabolite profiling of human colon carcinoma - Deregulation of TCA
4 cycle and amino acid turnover. **Molecular Cancer**, v. 7, p. 72, 18 set. 2008.
- 5 DEVALLANCE, E. *et al.* The Role of NADPH Oxidases in the Etiology of Obesity and
6 Metabolic Syndrome: Contribution of Individual Isoforms and Cell Biology. **Antioxidants
7 and Redox Signaling**, v. 31, n. 10, p. 687–709, 1 out. 2019.
- 8 DIBATTISTA, A. *et al.* Metabolic signatures of cystic fibrosis identified in dried blood spots
9 for newborn screening without carrier identification. **Journal of Proteome Research**, v. 18,
10 n. 3, p. 841–854, 2018.
- 11 DIEPEN, J. A. VAN *et al.* SUCNR1-mediated chemotaxis of macrophages aggravates
12 obesity-induced inflammation and diabetes. **Diabetologia**, v. 60, n. 7, p. 1304–1313, 1 jul.
13 2017.
- 14 DOBLE, P.; MACKA, M.; HADDAD, P. R. Design of background electrolytes for indirect
15 detection of anions by capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 1,
16 p. 10–17, 2000.
- 17 DOHERTY, E. A. S. *et al.* Microchannel wall coatings for protein separations by capillary
18 and chip electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, n. 1–2, p. 34–54, 2003.
- 19 DOLNÍK, V.; DOLNÍKOVÁ, J. Capillary zone electrophoresis of organic acids in serum of
20 critically ill children. **Journal of Chromatography A**, v. 716, p. 269–277, 1995.
- 21 DONG, X. M. *et al.* Targeted profiling of polar metabolites in cancer metabolic
22 reprogramming by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
23 **Journal of Chromatography A**, v. 1686, p. 463654, 20 dez. 2022.
- 24 DUNN, W. B. *et al.* Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using
25 gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature
26 Protocols**, v. 6, n. 7, p. 1060, 2011.
- 27 ESKO, T. *et al.* Metabolomic profiles as reliable biomarkers of dietary composition. **The
28 American Journal of Clinical Nutrition**, v. 105, n. 3, p. 547–554, 2017.
- 29 FAN, J. *et al.* New conditions of HPLC analysis for separation and quantification of simple
30 organic acids of tricarboxylic acid cycle in psoriasis. **Acta Chromatographica**, v. 33, n. 4, p.
31 322–332, 1 dez. 2021.
- 32 FIORI, J. *et al.* Cellular and mitochondrial determination of low molecular mass organic acids
33 by LC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2018.
- 34 GALLI, V.; BARBAS, C. Capillary electrophoresis for the analysis of short-chain organic
35 acids in coffee. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, n. 1–2, p. 299–304, 2 abr. 2004.
- 36 GAO, P. *et al.* Investigation on response of the metabolites in tricarboxylic acid cycle of
37 *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotic perturbation by capillary

- 1 electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 1, p. 180–
2 187, 9 maio 2007.
- 3 GAO, S. *et al.* Evaluation of volatile ion-pair reagents for the liquid chromatography-mass
4 spectrometry analysis of polar compounds and its application to the determination of
5 methadone in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40,
6 n. 3, p. 679–688, 24 fev. 2006.
- 7 GARCÍA, A. *et al.* Capillary electrophoresis for rapid profiling of organic acidurias. **Clinical**
8 **Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 1905–1911, 1998.
- 9 GEBAUER, P.; BECKERS, J. L.; BOČEK, P. Theory of system zones in capillary zone
10 electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 23, n. 12, p. 1779–1785, 2002.
- 11 GIKA, H. *et al.* Untargeted LC/MS-based metabolic phenotyping
12 (metabonomics/metabolomics): The state of the art. **Journal of Chromatography B**, v. 1117,
13 p. 136–147, 2019.
- 14 GIKA, H. G. *et al.* Within-day reproducibility of an HPLC-MS-based method for
15 metabonomic analysis: application to human urine. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n.
16 8, p. 3291–3303, 2007.
- 17 _____. Quantitative profiling of polar primary metabolites using hydrophilic interaction
18 ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of**
19 **Chromatography A**, v. 1259, p. 121–127, 12 out. 2012.
- 20 GIKA, H. G. *et al.* Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in
21 metabolomics and metabonomics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.
22 87, p. 12–25, 2014.
- 23 GONZÁLEZ-MUNIESA, P. *et al.* Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 15 jun.
24 2017.
- 25 GUASCH-FERRÉ, M. *et al.* Glycolysis/gluconeogenesis- and tricarboxylic acid cycle-related
26 metabolites, Mediterranean diet, and type 2 diabetes. **American Journal of Clinical**
27 **Nutrition**, v. 111, n. 4, p. 835–844, 1 abr. 2020.
- 28 GUMMADI, S.; KANDULA, V. N. A review on electrophoresis, capillary electrophoresis
29 and hyphenations. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 11,
30 n. 12, p. 6038, 2020.
- 31 HALLAN, S. *et al.* Metabolomics and Gene Expression Analysis Reveal Down-regulation of
32 the Citric Acid (TCA) Cycle in Non-diabetic CKD Patients. **EBioMedicine**, v. 26, p. 68–77, 1
33 dez. 2017.
- 34 HIROKAWA, T. *et al.* Table of isotachophoretic indices: I. Simulated qualitative and
35 quantitative indices of 287 anionic substances in the range pH 3–10. **Journal of**
36 **Chromatography**, v. 271, n. 2, p. D1–D106, 1983.
- 37 HOLLYWOOD, K.; BRISON, D. R.; GOODACRE, R. Metabolomics: Current technologies
38 and future trends. **Proteomics**, v. 6, n. 17, p. 4716–4723, 2006.

- 1 HSU, J. L.; FARRELL, T. M. Updates in Bariatric Surgery. **The American Surgeon**, p.
2 00031348231220576, 2023.
- 3 HUANG, Y. *et al.* A HILIC-MS/MS method for the simultaneous determination of seven
4 organic acids in rat urine as biomarkers of exposure to realgar. **Journal of Chromatography**
5 **B**, v. 905, p. 37–42, 2012.
- 6 HUR, H. *et al.* Quantitative measurement of organic acids in tissues from gastric cancer
7 patients indicates increased glucose metabolism in gastric cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6,
8 2014.
- 9 INIGO, M.; DEJA, S.; BURGESS, S. C. Ins and Outs of the TCA Cycle: The Central Role of
10 Anaplerosis. **Annual Review of Nutrition**, v. 41, p. 19–47, 2021.
- 11 INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Instituto Nacional de
12 Metrologia, Qualidade e Tecnologia, , 2020.
- 13 ISSAQ, H. J. *et al.* Analytical and statistical approaches to metabolomics research. **Journal of**
14 **Separation Science**, v. 32, n. 13, p. 2183–2199, 2009.
- 15 JAGER, A. V; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese
16 capilar: fundamentos e aplicações. **Revisão Quim. Nova**, v. 24, n. 3, p. 363–373, 2001.
- 17 JANDERA, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a
18 review. **Analytica Chimica Acta**, v. 692, n. 1–2, p. 1–25, 2011.
- 19 JONES, T. E. *et al.* Plasma lactate as a marker of metabolic health: Implications of elevated
20 lactate for impairment of aerobic metabolism in the metabolic syndrome. **Surgery**, v. 166, n.
21 5, p. 861–866, 1 nov. 2019.
- 22 KADHI, O. AL *et al.* Development of a LC-MS/MS Method for the Simultaneous Detection
23 of Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates in a Range of Biological Matrices. **Journal of**
24 **Analytical Methods in Chemistry**, v. 2017, p. 1, 2017.
- 25 KARTSOVA, L. A.; BESSONOVA, E. A.; SOMOVA, V. D. Hydrophilic Interaction
26 Chromatography. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 415–424, 2019.
- 27 KARTSOVA, L. A.; MAKEEVA, D. V.; BESSONOVA, E. A. Current Status of Capillary
28 Electrophoresis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 75, n. 12, p. 1497–1513, 1 dez. 2020.
- 29 KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. **factoextra: Extract and Visualize the Results of**
30 **Multivariate Data Analyses**, 2020. Disponível em: <[https://CRAN.R-](https://CRAN.R-project.org/package=factoextra)
31 [project.org/package=factoextra](https://CRAN.R-project.org/package=factoextra)>
- 32 KAWAI, T.; AUTIERI, M. V.; SCALIA, R. Adipose tissue inflammation and metabolic
33 dysfunction in obesity. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 320, n. 3, p.
34 C375–C391, 1 mar. 2021.
- 35 KHASKHALI, M. H.; BHANGER, M. I.; KHAND, F. D. Simultaneous determination of
36 oxalic and citric acids in urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of**
37 **Chromatography B**, v. 675, p. 147–151, 1996.

- 1 KIM, S. *et al.* Urinary metabolomic profiling for noninvasive diagnosis of acute T cell-
2 mediated rejection after kidney transplantation. **Journal of Chromatography B**, v. 1118–
3 1119, p. 157–163, 2019.
- 4 KIRA, S. *et al.* Metabolomics analysis of blood identifies potential biomarkers and possible
5 treatment targets for nocturia. **Therapeutic Advances in Urology**, v. 11, p. 1–7, 2019.
- 6 KOK, M. G. M.; SOMSEN, G. W.; JONG, G. J. DE. The role of capillary electrophoresis in
7 metabolic profiling studies employing multiple analytical techniques. **TrAC Trends in**
8 **Analytical Chemistry**, v. 61, p. 223–235, 2014.
- 9 KRIVÁCSY, Z. *et al.* Electrokinetic injection in capillary electrophoresis and its application
10 to the analysis of inorganic compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 834, p. 21–44,
11 1999.
- 12 KUBOTA, K. *et al.* Development of an HPLC-fluorescence determination method for
13 carboxylic acids related to the tricarboxylic acid cycle as a metabolome tool. **Biomedical**
14 **Chromatography**, v. 19, n. 10, p. 788–795, dez. 2005.
- 15 KUEHNBAUM, N. L. *et al.* Multiplexed separations for biomarker discovery in
16 metabolomics: Elucidating adaptive responses to exercise training. **Electrophoresis**, v. 36, n.
17 18, p. 2226–2236, 2015.
- 18 KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. New advances in separation science for
19 metabolomics: resolving chemical diversity in a post-genomic era. **Chemical Reviews**, v.
20 113, n. 4, p. 2437–2468, 2013.
- 21 KUHL, J. *et al.* Metabolomics as a tool to evaluate exercise-induced improvements in insulin
22 sensitivity. **Metabolomics**, v. 4, n. 3, p. 273–282, 2008.
- 23 LANDERS, J. P. (ED.). **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and**
24 **Associated Microtechniques**. Third Edition ed. [s.l.] CRC Press, 2007.
- 25 LI, M. *et al.* GC/TOFMS analysis of metabolites in serum and urine reveals metabolic
26 perturbation of TCA cycle in db/db mice involved in diabetic nephropathy. **American**
27 **Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 304, p. 1317–1324, 2013.
- 28 LIU, J. J. *et al.* Urine tricarboxylic acid cycle metabolites predict progressive chronic kidney
29 disease in type 2 diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 103, n.
30 12, p. 4357–4364, 2018.
- 31 LU, S. *et al.* Determination of tricarboxylic acid cycle acids and other related substances in
32 cultured mammalian cells by gradient ion-exchange chromatography with suppressed
33 conductivity detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1012, n. 2, p. 161–168, 19 set.
34 2003.
- 35 LUBES, G.; GOODARZI, M. GC–MS based metabolomics used for the identification of
36 cancer volatile organic compounds as biomarkers. **Journal of Pharmaceutical and**
37 **Biomedical Analysis**, v. 147, p. 313–322, 2018.

- 1 LUCY, C. A.; MACDONALD, A. M.; GULCEV, M. D. Non-covalent capillary coatings for
2 protein separations in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n.
3 1–2, p. 81–105, 14 mar. 2008.
- 4 LUNYERA, J. *et al.* Urine tricarboxylic acid cycle signatures of early-stage diabetic kidney
5 disease. **Metabolomics**, v. 18, n. 1, p. 5, 1 jan. 2022.
- 6 LUO, B. *et al.* Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis,
7 pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass
8 spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1147, n. 2, p. 153–164, 2007.
- 9 MA, M. *et al.* Quaternary ammonium chitosan derivative dynamic coating for the separation
10 of veterinary sulfonamide residues by CE with field-amplified sample injection.
11 **Electrophoresis**, v. 28, n. 22, p. 4091–4100, 2007.
- 12 MACLENNAN, M. S. *et al.* Capillary electrophoresis-mass spectrometry for targeted and
13 untargeted analysis of the sub-5 kDa urine metabolome of patients with prostate or bladder
14 cancer: A feasibility study. **Journal of Chromatography B**, v. 1074, p. 79–85, 2018.
- 15 MALATJI, B. G. *et al.* A diagnostic biomarker profile for fibromyalgia syndrome based on an
16 NMR metabolomics study of selected patients and controls. **BMC Neurology**, v. 17, n. 88, p.
17 1–15, 2017.
- 18 MARKUSZEWSKI, M. J. *et al.* Analysis of carboxylic acid metabolites from the
19 tricarboxylic acid cycle in *Bacillus subtilis* cell extract by capillary electrophoresis using an
20 indirect photometric detection method. **Journal of Chromatography A**, v. 1010, n. 1, p.
21 113–121, 22 ago. 2003.
- 22 MARTÍNEZ-REYES, I.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control
23 physiology and disease. **Nature Communications** Nature Research, , 1 dez. 2020.
- 24 MASTRANGELO, A. *et al.* From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for
25 untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 900, p. 21–
26 35, 2015.
- 27 _____. New insight on obesity and adipose-derived stem cells using comprehensive
28 metabolomics. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 14, p. 2187–2203, 2016.
- 29 MASTRANGELO, A. *et al.* Insulin resistance in prepubertal obese children correlates with
30 sex-dependent early onset metabolomic alterations. **International Journal of Obesity**, v. 40,
31 n. 10, p. 1494–1502, 2016.
- 32 MELANSON, J. E.; BARYLA, N. E.; LUCY, C. A. Dynamic capillary coatings for
33 electroosmotic flow control in capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v.
34 20, n. 6–7, p. 365–374, 2001.
- 35 MICHOPoulos, F. *et al.* Targeted profiling of polar intracellular metabolites using ion-
36 pair-high performance liquid chromatography and -ultra high performance liquid
37 chromatography coupled to tandem mass spectrometry: Applications to serum, urine and
38 tissue extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1349, p. 60–68, 4 jul. 2014.

- 1 MISRA, B. B. *et al.* Analysis of serum changes in response to a high fat high cholesterol diet
2 challenge reveals metabolic biomarkers of atherosclerosis. **PLoS One**, v. 14, n. 4, p.
3 e0214487, 2019.
- 4 MIYAGAWA, H.; BAMBA, T. Comparison of sequential derivatization with concurrent
5 methods for GC/MS-based metabolomics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.
6 127, n. 2, p. 160–168, 2019.
- 7 MOHABBATI, S.; WESTERLUND, D. Improved properties of the non-covalent coating with
8 N,N-didodecyl-N, N-dimethylammonium bromide for the separation of basic proteins by
9 capillary electrophoresis with acidic buffers in 25 µm capillaries. **Journal of**
10 **Chromatography A**, v. 1121, n. 1, p. 32–39, 14 jul. 2006.
- 11 MORENO, M. DE V. G.; CAMPOY, C. J. J.; BARROSO, C. G. Method devised for
12 determining low molecular weight organic acids in vinic samples by capillary electrophoresis:
13 Validation of the method with real samples. **European Food Research and Technology**, v.
14 213, n. 4–5, p. 381–385, 2001.
- 15 MORENO, M. V. G.; JURADO, C. J.; BARROSO, C. G. Determination of Organic Acids by
16 Capillary Electrophoresis with Simultaneous Addition of Ca and Mg as Complexing Agents.
17 **Chromatographia**, v. 57, p. 185–189, 2003.
- 18 MUNG, D.; LI, L. Chemical isotope labeling liquid chromatography mass spectrometry for
19 investigating acute dietary effects of cow milk consumption on human urine metabolome.
20 **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 2, p. 565–574, 2019.
- 21 NARATH, S. H. *et al.* An untargeted metabolomics approach to characterize short-term and
22 long-term metabolic changes after bariatric surgery. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. 1–18, 2016.
- 23 NEWGARD, C. B. Metabolomics and metabolic diseases: where do we stand? **Cell**
24 **Metabolism**, v. 25, n. 1, p. 43–56, 2017.
- 25 NOZAL, M. J. *et al.* HPLC determination of low molecular weight organic acids in honey
26 with series-coupled ion-exclusion columns. **Journal of Liquid Chromatography and**
27 **Related Technologies**, v. 26, n. 8, p. 1231–1253, 2003.
- 28 O'BRIEN, P. E. Controversies in bariatric surgery. **Journal of British Surgery**, v. 102, n. 6,
29 p. 611–618, 1 maio 2015.
- 30 OSBORN, O.; OLEFSKY, J. M. The cellular and signaling networks linking the immune
31 system and metabolism in disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 3, p. 363–374, mar. 2012.
- 32 OWEN, O. E.; KALHAN, S. C.; HANSON, R. W. The key role of anaplerosis and
33 cataplerosis for citric acid cycle function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 34, p.
34 30409–30412, 23 ago. 2002.
- 35 PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy.
36 **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 4, p. 263–269, 2012.
- 37 PEÑA-BAUTISTA, C. *et al.* Plasma metabolomics in early Alzheimer's disease patients
38 diagnosed with amyloid biomarker. **Journal of Proteomics**, v. 200, p. 144–152, 2019.

- 1 PETRARULO, M. *et al.* Sensitive Ion-Chromatographic Determination of Citric Acid in
2 Urine. **Separations**, v. 9, n. 6, 1 jun. 2022.
- 3 PIMENTEL, M. F.; NETO, B. D. B. Calibração: Uma Revisão Para Químicos Analíticos.
4 **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268–277, 1996.
- 5 PIÑERO, M.-Y.; BAUZA, R.; ARCE, L. Thirty years of capillary electrophoresis in food
6 analysis laboratories: Potential applications. **Electrophoresis**, v. 32, n. 11, p. 1379–1393,
7 2011.
- 8 PONT, L. *et al.* Metabolic profiling for the identification of Huntington biomarkers by on-line
9 solid-phase extraction capillary electrophoresis mass spectrometry combined with advanced
10 data analysis tools. **Electrophoresis**, v. 37, n. 5–6, p. 795–808, 2016.
- 11 QUEIROZ, S. C. DO N. DE; JARDIM, I. C. S. F. Eletroforese Capilar. **Revista Chemkeys**,
12 v. 8, p. 1–9, 2001.
- 13 R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing** Vienna,
14 Austria R Foundation for Statistical Computing, , , 2022.
- 15 RAMAUTAR, R. *et al.* Metabolic profiling of human urine by CE-MS using a positively
16 charged capillary coating and comparison with UPLC-MS. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 1,
17 p. 194–199, 2011.
- 18 RASHEED, A. S.; AL-PHALAHY, B. A.; SEUBERT, A. Studies on Behaviors of
19 Interactions Between New Polymer-based ZIC-HILIC Stationary Phases and Carboxylic
20 Acids. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 1, p. 52–59, 2017.
- 21 RATHOD, R. *et al.* Simultaneous measurement of tricarboxylic acid cycle intermediates in
22 different biological matrices using liquid chromatography–tandem mass spectrometry;
23 quantitation and comparison of TCA cycle intermediates in human serum, plasma, kasumi-1
24 cell and murine liver tissue. **Metabolites**, v. 10, n. 3, p. 103, 1 mar. 2020.
- 25 ROBLES, A. *et al.* Determination and identification of organic acids in wine samples.
26 Problems and challenges. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2019.
- 27 RODRÍGUEZ, D. A. *et al.* Plasma metabolic profile in COPD patients: effects of exercise and
28 endurance training. **Metabolomics**, v. 8, n. 3, p. 508–516, 2012.
- 29 RUNKEL, N. *et al.* Bariatric Surgery. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 108, n. 20, p.
30 341–346, 20 maio 2011.
- 31 RYAN, D. G.; FREZZA, C.; O’NEILL, L. A. TCA cycle signalling and the evolution of
32 eukaryotes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 68, p. 72–88, 1 abr. 2021.
- 33 SAAVEDRA, L.; BARBAS, C. Validated capillary electrophoresis method for small-anions
34 measurement in wines. **Electrophoresis**, v. 24, n. 12–13, p. 2235–2243, 2003.
- 35 SANTORO, C. *et al.* Urine in Bioelectrochemical Systems: An Overall Review.
36 **ChemElectroChem**, v. 7, n. 6, p. 1312–1331, 16 mar. 2020.

- 1 SAOI, M. *et al.* Characterization of the human skeletal muscle metabolome for elucidating the
2 mechanisms of bicarbonate ingestion on strenuous interval exercise. **Analytical Chemistry**,
3 v. 91, n. 7, p. 4709–4718, 2019.
- 4 SCHERER, P. E.; HILL, J. A. Obesity, diabetes, and cardiovascular diseases. **Circulation**
5 **Research**, v. 118, n. 11, p. 1703–1705, 27 maio 2016.
- 6 SCIACOVELLI, M.; FREZZA, C. Oncometabolites: Unconventional triggers of oncogenic
7 signalling cascades. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 100, p. 175–181, 1 nov. 2016.
- 8 SERVIÀ, L. *et al.* A prospective pilot study using metabolomics discloses specific fatty acid,
9 catecholamine and tryptophan metabolic pathways as possible predictors for a negative
10 outcome after severe trauma. **Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and**
11 **Emergency Medicine**, v. 27, n. 1, p. 56, 2019.
- 12 SÉVIN, D. C. *et al.* Biological insights through nontargeted metabolomics. **Current Opinion**
13 **in Biotechnology**, v. 34, p. 1–8, 2015.
- 14 SEYMOUR, J. V. DE *et al.* Early pregnancy metabolite profiling discovers a potential
15 biomarker for the subsequent development of gestational diabetes mellitus. **Acta**
16 **Diabetologica**, v. 51, n. 5, p. 887–890, 2014.
- 17 SHAO, Y.; LE, W. Recent advances and perspectives of metabolomics-based investigations
18 in Parkinson's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 14, n. 1, p. 3, 2019.
- 19 SHIRAO, M. *et al.* Determination of organic acids in urine by capillary zone electrophoresis.
20 **Journal of Chromatography A**, v. 680, p. 247–251, 1994.
- 21 SHULMAN, L. *et al.* High pH instability of quaternary ammonium surfactant coatings in
22 capillary electrophoresis. **Analyst**, v. 142, n. 12, p. 2145–2151, 21 jun. 2017.
- 23 SHURUBOR, Y. I. *et al.* Simultaneous determination of tricarboxylic acid cycle metabolites
24 by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Analytical**
25 **Biochemistry**, v. 503, p. 8–10, 15 jun. 2016.
- 26 SILVA, C. G. A. DA; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. Cromatografia por interações
27 hidrofílicas (HILIC): estado da arte e aplicações. **Química Nova**, v. 39, n. 2, p. 210–220,
28 2016.
- 29 SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Conceitos básicos em Eletroforese
30 Capilar. v. 4, n. 4, p. 287–297, 2012.
- 31 SUÁREZ, M. *et al.* Metabolomics : An emerging tool to evaluate the impact of nutritional and
32 physiological challenges. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 96, p. 79–88, 2017.
- 33 SUN, P. *et al.* Development of New HPLC Chiral Stationary Phases Based on Native and
34 Derivatized Cyclofructans. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 24, p. 10215–10226, 2009.
- 35 SUN, Q. *et al.* Determination of Citric Acid in Urine by Enzymatic Flow Injection System
36 Based on a Novel Microfluidic Chip. **Procedia Chemistry**, v. 20, p. 52–55, 2016.

- 1 SYGGELOU, A. *et al.* Metabolomics in the developing human being. **Pediatric Clinics**, v.
2 59, n. 5, p. 1039–1058, 2012.
- 3 TANG, D. Q. *et al.* HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach
4 to RPLC-MS. **Mass spectrometry reviews**, v. 35, n. 5, p. 574–600, 1 set. 2016.
- 5 TANG, K. W. A.; TOH, Q. C.; TEO, B. W. Normalisation of urinary biomarkers to creatinine
6 for clinical practice and research – when and why. **Singapore Medical Journal**, v. 56, n. 1, p.
7 7–10, 1 jan. 2015.
- 8 TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v.
9 20, n. 5, p. 493–511, 1997.
- 10 TAVARES, M. F. M.; COLOMBARA, R.; MASSAO, S. Modified electroosmotic flow by
11 cationic surfactant additives in capillary electrophoresis. Evaluation of electrolyte systems for
12 anion analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 772, p. 171–178, 1997.
- 13 TOKARZ, J. *et al.* Endocrinology Meets Metabolomics: Achievements, Pitfalls , and
14 Challenges. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 10, p. 705–721, 2017.
- 15 TORAÑO, J. S.; RAMAUTAR, R.; JONG, G. DE. Advances in capillary electrophoresis for
16 the life sciences. **Journal of Chromatography B**, v. 1118, p. 116–136, 2019.
- 17 TŮMA, P. *et al.* Large-volume sample stacking for in vivo monitoring of trace levels of γ -
18 aminobutyric acid, glycine and glutamate in microdialysates of periaqueductal gray matter by
19 capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Journal of**
20 **Chromatography A**, v. 1303, p. 94–99, 16 ago. 2013.
- 21 TŮMA, P.; SAMCOVÁ, E.; ŠTULÍK, K. Determination of the spectrum of low molecular
22 mass organic acids in urine by capillary electrophoresis with contactless conductivity and
23 ultraviolet photometric detection—An efficient tool for monitoring of inborn metabolic
24 disorders. **Analytica Chimica Acta**, v. 685, n. 1, p. 84–90, 2011.
- 25 VAZ, F. A. S. *et al.* Optimisation of a capillary zone electrophoresis methodology for
26 simultaneous analysis of organic aliphatic acids in extracts of *Brachiaria brizantha*.
27 **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 6, p. 569–575, nov. 2012.
- 28 VINCENT, A. *et al.* Herring and chicken/pork meals lead to differences in plasma levels of
29 TCA intermediates and arginine metabolites in overweight and obese men and women.
30 **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 61, n. 3, p. 1600400, 1 mar. 2017.
- 31 VIRGILIOU, C. *et al.* Development and validation of a HILIC-MS/MS multitargeted method
32 for metabolomics applications. **Electrophoresis**, v. 36, n. 18, p. 2215–2225, 1 set. 2015.
- 33 VITALI, L. **Preparação, caracterização e aplicação de capilares modificados com**
34 **quitosana e sal de quitosana quaternizada em eletroforese capilar.** [s.l: s.n.].
- 35 WAIKAR, S. S.; SABBISSETTI, V. S.; BONVENTRE, J. V. Normalization of urinary
36 biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. **Kidney International**,
37 v. 78, n. 5, p. 486–494, 2010.

- 1 WANG, X. *et al.* Ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry as
2 a sensitive and powerful technology for metabolomic studies. **Journal of Separation**
3 **Science**, v. 34, n. 24, p. 3451–3459, 2011.
- 4 WANG, Y. *et al.* Urinary metabonomic study of patients with acute coronary syndrome using
5 UPLC-QTOF/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1101, p. 122–130, 2018.
- 6 WŁODARCZYK, M.; NOWICKA, G. Obesity, DNA damage, and development of obesity-
7 related diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1146, 1 mar.
8 2019.
- 9 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global**
10 **epidemic: report of a WHO consultation**. [s.l.: World Health Organization, 2000.
- 11 WORLD OBESITY FEDERATION. **World Obesity Atlas 2022**. [s.l.: s.n.]. Disponível em:
12 <www.worldobesity.org/worldobesityatlas>.
- 13 WU, X. *et al.* A HILIC-UHPLC–MS/MS untargeted urinary metabonomics combined with
14 quantitative analysis of five polar biomarkers on osteoporosis rats after oral administration of
15 Gushudan. **Journal of Chromatography B**, v. 1072, p. 40–49, 2018.
- 16 WU, X.-H. *et al.* Exploring the pharmacological effects and potential targets of paeoniflorin
17 on the endometriosis of cold coagulation and blood stasis model rats by ultra-performance
18 liquid chromatography tandem mass spectrometry with a pattern recognition approach. **RSC**
19 **Advances**, v. 9, n. 36, p. 20796–20805, 2019.
- 20 XU, J. *et al.* An optimized analytical method for cellular targeted quantification of primary
21 metabolites in tricarboxylic acid cycle and glycolysis using gas chromatography-tandem mass
22 spectrometry and its application in three kinds of hepatic cell lines. **Journal of**
23 **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 171, p. 171–179, 2019.
- 24 YAMAMOTO, M. *et al.* Metabolomics reveals elevated urinary excretion of collagen
25 degradation and epithelial cell turnover products in irritable bowel syndrome patients.
26 **Metabolomics**, v. 15, n. 6, p. 82, 2019.
- 27 YAMAMOTO, T. *et al.* Development of simultaneous quantitative analysis of tricarboxylic
28 acid cycle metabolites to identify specific metabolites in cancer cells by targeted metabolomic
29 approach. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 584, p. 53–59, 20
30 dez. 2021.
- 31 YU, J. *et al.* GC–MS analysis of organic acids in rat urine: A protocol of direct ultrasound-
32 assisted derivatization. **Biomedical Chromatography**, v. 34, n. 3, 2020.
- 33 YURCISIN, B. M.; GADDOR, M. M.; DEMARIA, E. J. Obesity and Bariatric Surgery.
34 **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, n. 3, p. 539–553, set. 2009.
- 35 ZELENA, E. *et al.* Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-
36 term metabolomic study of human serum. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 1357–1364,
37 2009.
- 38 ZHANG, A. *et al.* Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **Analyst**, v. 137, n.
39 2, p. 293–300, 2012.

- 1 ZHANG, A. *et al.* Metabolomics study of type 2 diabetes using ultra-performance LC-
2 ESI/quadrupole-TOF high-definition MS coupled with pattern recognition methods. **Journal**
3 **of Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 117–128, 2014.
- 4 ZHANG, W. *et al.* Sheathless capillary electrophoresis–mass spectrometry for metabolic
5 profiling of biological samples. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 116, p.
6 e54535, 2016.
- 7 ZHANG, W. *et al.* Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method Revealed
8 that Lung Cancer Cells Exhibited Distinct Metabolite Profiles upon the Treatment with
9 Different Pyruvate Dehydrogenase Kinase Inhibitors. **Journal of Proteome Research**, v. 17,
10 n. 9, p. 3012–3021, 7 set. 2018.
- 11 ZHANG, Y.; YU, P.-C.; LIU, P. Using high-throughput metabolomics to discover perturbed
12 metabolic pathways and biomarkers of allergic rhinitis as potential targets to reveal the effects
13 and mechanism of geniposide. **RSC Advances**, v. 9, n. 30, p. 17490–17500, 2019.
- 14 ZHONG, L. *et al.* Untargeted saliva metabolomics study of breast cancer based on ultra
15 performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with HILIC and RPLC
16 separations. **Talanta**, v. 158, p. 351–360, 2016.
- 17 ZHOU, S. *et al.* Colorimetric detection of citric acid as the biomarker for urolithiasis based on
18 sodium dodecylsulfate-AgNPs with a portable CD-spectrometer. **Analytica Chimica Acta**, v.
19 1191, p. 339178, 25 jan. 2022.
- 20
21

1 APÊNDICE A - Desenvolvimento de um método por LC-MS/MS para determinação dos 2 intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico

3 4 1. MATERIAL E MÉTODOS

5 6 1.1. INSTRUMENTAÇÃO

7
8 Para as análises por cromatografia líquida foi utilizado um cromatógrafo líquido da
9 Agilent Technologies modelo 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA), com fonte de
10 ionização por electrospray modelo TurboIonSpray acoplada a um espectrômetro de massas
11 triplo quadrupolo modelo Qtrap 3200 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, EUA). Os íons
12 foram monitorados no modo negativo pelo monitoramento de reações múltiplas (MRM). Para
13 a aquisição e o tratamento dos dados foi utilizado o *software Analyst*.

14 15 1.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

16
17 Para as fases móveis de HPLC foi utilizada acetonitrila grau HPLC e ácido fórmico
18 96% grau HPLC da Tedia (São Paulo, SP, Brasil). Para preparar as soluções tampão utilizadas
19 como fase móvel foi utilizado ácido acético 50% grau HPLC da Sigma-Aldrich (St. Louis,
20 MO, U.S.A.) e hidróxido de sódio (NaOH) adquirido de Neon Comercial (São Paulo, SP,
21 Brasil).

22 23 1.3. ANÁLISES POR LC-MS/MS

24 25 1.3.1. Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas

26
27 A otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foi realizada por meio da
28 infusão direta de cada um dos analitos. Foram preparadas soluções de 10 mg L⁻¹ e 1 mg L⁻¹,
29 em acetonitrila 50 % com ácido fórmico 0,1 %, a partir de soluções estoques de 1000 mg L⁻¹.
30 As infusões foram realizadas com uma seringa de 1 mL de capacidade e 4,6 mm de diâmetro
31 interno com um fluxo de 10 µL min⁻¹. Entre cada infusão, a seringa e o tubo de PEEK foram
32 lavados com acetonitrila. As infusões foram realizadas com as soluções de 1 mg L⁻¹, com
33 exceção do padrão de ácido oxaloacético, para o qual foi utilizada uma solução de 100 mg L⁻¹.
34 A polaridade das infusões foi negativa e a detecção foi realizada no modo MRM. Durante as

1 infusões, a *probe* foi mantida em 5 mm na direção horizontal e em 10 mm na direção vertical,
2 de acordo a recomendação do fabricante.

3 Com este procedimento, os parâmetros envolvidos na ionização dos analitos que foram
4 otimizados foram os seguintes: potencial de desagregação (DP), potencial de entrada (EP),
5 energia de colisão (CE2), potencial de entrada na célula de colisão (CEP) e potencial da célula
6 de saída (CXP). Os resultados da otimização e as transições monitoradas estão apresentadas
7 na Tabela 8.

8
9 **Tabela 8** - Transições de m/z selecionadas para monitoramento no espectrômetro de massas.

Analito	m/z íon precursor	m/z fragmento	DP	EP	CEP	CE	CXP
Ácido α -cetoglutárico	144,948	100,9; 56,9	- 15	- 4	- 10	- 12	0
Ácido cítrico	190,936	111,0; 87,0	- 20	- 2,5	- 10	- 16	0
Ácido fumárico	114,9	70,9	- 20	- 7,5	- 10	- 10	0
Ácido málico	132,898	114,9; 71,0	- 20	- 5	- 10	- 14	0
Ácido oxaloacético	130,925	86,9; 40,9	- 15	- 1,5	- 12	- 10	0
Ácido succínico	116,907	72,9; 99,1	- 20	- 8,5	- 10	- 16	0

10 Parâmetros do espectrômetro de massas: agulha do capilar, -4500V; *curtain gas*, 10 psi; temperatura, 400 °C; gás
11 1, 45 psi; gás 2, 45 psi; gás CAD, médio.
12 Fonte: elaborado pelo autor
13

14 1.3.2. Escolha da coluna

15

16 Para o desenvolvimento do método para determinação de ácidos orgânicos do ciclo do
17 ácido tricarboxílico por LC-MS/MS, foram avaliadas três colunas: ZIC-HILIC (150 mm x 4,6
18 mm, 3,5 μ m) da Merck (Darmstadt, Alemanha), Atlantis HILIC Silica (30 mm x 2,1 mm 3
19 μ m) da Waters (Milford, Massachusetts, EUA) e a coluna FRULIC-N (150 mm x 4,6 mm x 5
20 μ m).

21 Foram avaliadas diferentes condições experimentais em todas as colunas. Foi
22 realizado um planejamento fatorial completo 2^2 com ponto central. Todos os experimentos
23 foram realizados em duplicata e o ponto central em triplicata. Os fatores avaliados foram o
24 percentual de e o pH da fase móvel. A matriz do planejamento está apresentada na Tabela 9.
25 Foi realizado o mesmo planejamento para as três colunas. Para avaliar o pH, foram preparadas
26 três soluções 8 mmol L⁻¹ de formiato de amônio e o pH foi ajustado com ácido fórmico
27 conforme os valores estabelecidos no planejamento. Quanto aos demais parâmetros do

1 método, o fluxo utilizado foi de 500 $\mu\text{L min}^{-1}$, o volume de injeção foi de 5 μL e a
 2 temperatura da coluna foi mantida a 20 $^{\circ}\text{C}$.

3

4 **Tabela 9** - Matriz do planejamento fatorial 2^2 realizado para selecionar as melhores condições
 5 de separação nas três colunas avaliadas.

Experimento	Proporção de acetonitrila (%)	pH
1	70	3
2	70	5
3	90	3
4	90	5
5*	80	4

6

7

8

*Ponto central
 Fonte: elaborado pelo autor

9 Para estes testes, foi preparada uma solução estoque aquosa contendo todos os padrões
 10 na concentração 10 mg L^{-1} . Essa solução foi diluída para uma concentração de 5 mg L^{-1} com
 11 acetonitrila em uma proporção 1:1. O fator resposta escolhido para avaliar os planejamentos
 12 está representado na equação 5:

$$\text{fator de resposta} = \frac{\Pi k'}{\Pi w \times t_r} \quad (5)$$

13

14 sendo:

15 $\Pi k'$ = produto de todos os fatores de retenção obtidos;

16 Πw = produto de todas as larguras de sinal obtidas;

17 t_r = maior tempo de retenção.

18

19 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

20

21 2.1. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR LC-MS/MS

22

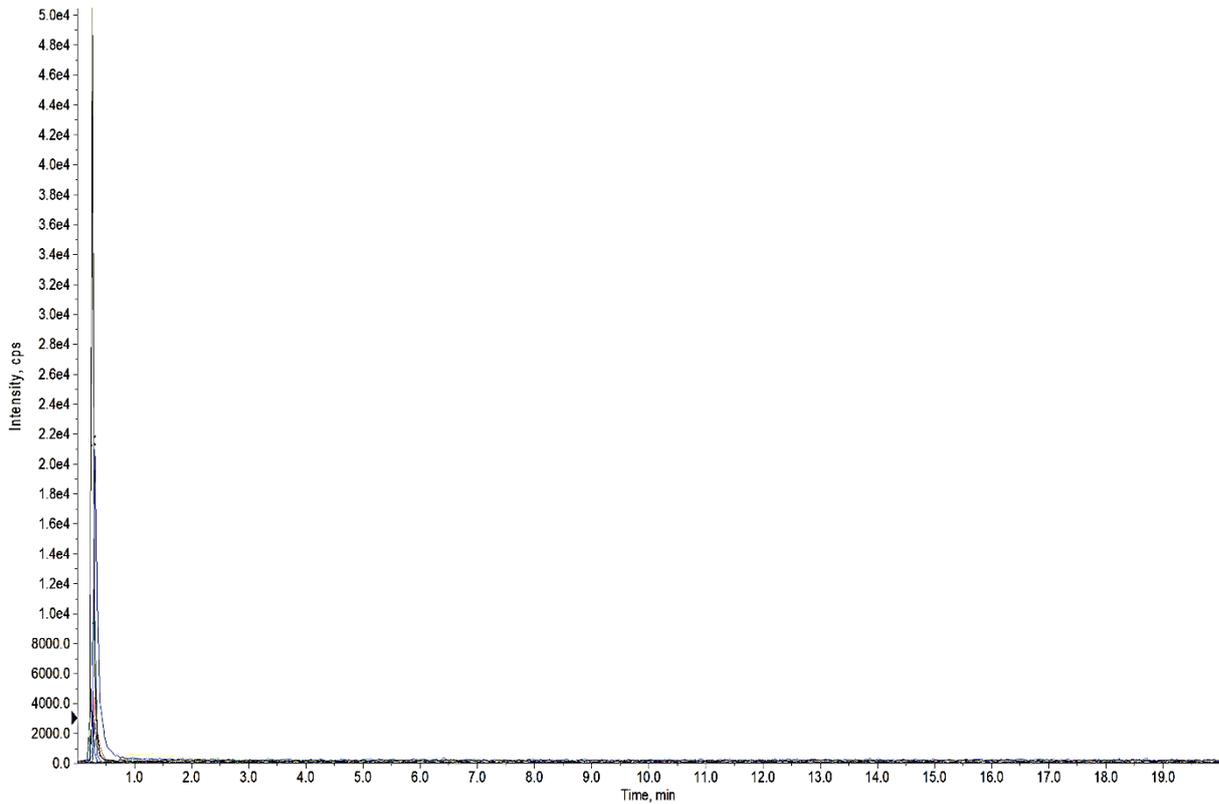
23 Inicialmente, o objetivo deste trabalho era desenvolver um método por LC-MS/MS
 24 para determinação e quantificação dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. Como
 25 estes intermediários são polares, foram selecionadas colunas HILIC para o desenvolvimento
 26 do método. As três colunas avaliadas, embora sejam todas HILIC, possuem fases

1 estacionárias diferentes. As colunas escolhidas foram: Atlantis HILIC Silica, FRULIC-N e
2 ZIC-HILIC. A Atlantis HILIC Silica possui uma fase estacionária de sílica pura (Jandera,
3 2011). A fase estacionária da FRULIC-N é constituída por um oligossacarídeo cíclico (Sun *et*
4 *al.*, 2009). Por fim, A ZIC-HILIC possui uma fase estacionária zwitteriônica constituída por
5 moléculas de sulfobetaina ligadas a superfície de sílica (Kartsova, Bessonova e Somova,
6 2019; Rasheed, Al-phalahy e Seubert, 2017).

7 A natureza da fase estacionária afeta consideravelmente a retenção dos analitos, uma
8 vez que a formação da camada de água adsorvida na superfície do adsorvente depende dos
9 grupos funcionais da fase estacionária (Buszewski e Noga, 2012; Kartsova, Bessonova e
10 Somova, 2019). Portanto, foram realizados planejamentos de experimentos testando
11 diferentes condições cromatográficas com cada coluna para avaliar qual seria a mais
12 apropriada para a separação dos analitos. No entanto, não foi possível obter uma resposta
13 adequada para calcular o fator resposta para que os planejamentos pudessem ser devidamente
14 avaliados. Com a coluna Atlantis HILIC Silica não houve separação dos analitos, todos
15 saíram juntos em menos de 1 min (Figura 12). Além disso, os ácidos cítrico e málico não
16 foram detectados em nenhuma das condições avaliadas. Nos testes utilizando a coluna
17 FRULIC-N não foi possível detectar o ácido cítrico e, em algumas das condições, nenhum dos
18 analitos eluíram (Figura 11).

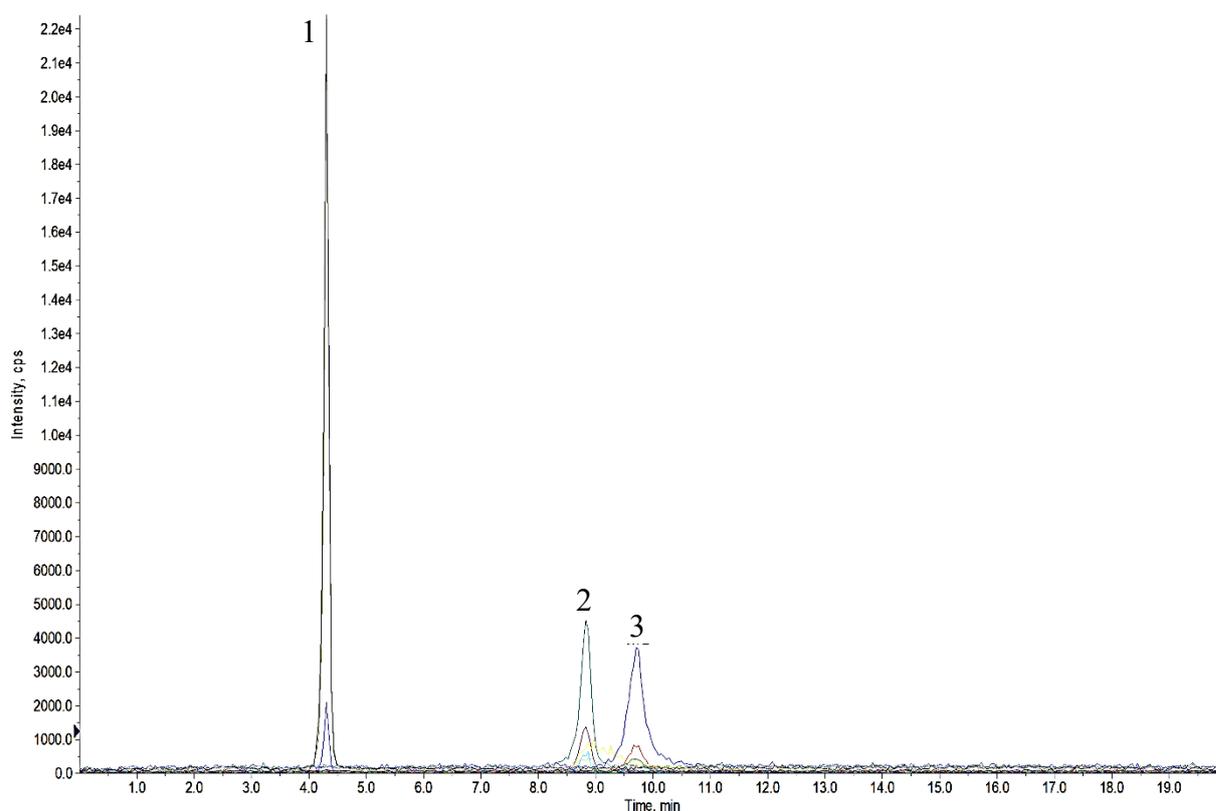
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

1 **Figura 10** - Cromatograma de uma solução contendo padrões dos ácidos α -cetoglutárico,
2 cítrico, fumárico, málico e succínico em uma concentração de 5 mg L^{-1} em acetonitrila 50 %
3 utilizando a coluna Atalntis HILIC Silica (30 mm x 2,1 mm 3 μm). Condições experimentais:
4 fase móvel, acetonitrila 70 % e tampão formiato de amônio 8 mmol L^{-1} (pH = 3) 30 % em
5 modo isocrático; fluxo, $500 \mu\text{L min}^{-1}$; volume de injeção, $5 \mu\text{L}$; temperatura da coluna, $20 \text{ }^\circ\text{C}$;
6 detecção por espectrometria de massas no modo de negativo por monitoramento de reações
7 múltiplas.



8
9 Fonte: elaborado pelo autor.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

1 **Figura 11** - Cromatograma de uma solução contendo padrões dos ácidos α -cetoglutárico,
2 cítrico, fumárico, málico e succínico em uma concentração de 5 mg L^{-1} em acetonitrila 50 %
3 utilizando a coluna FRULIC-N (150 mm x 4,6 mm x $5 \mu\text{m}$). Condições experimentais: fase
4 móvel, acetonitrila 70 % e tampão formiato de amônio 8 mmol L^{-1} (pH = 3) 30 % em modo
5 isocrático; fluxo, $500 \mu\text{L min}^{-1}$; volume de injeção, $5 \mu\text{L}$; temperatura da coluna, $20 \text{ }^\circ\text{C}$;
6 detecção por espectrometria de massas no modo negativo por monitoramento de reações
7 múltiplas. Sinais e seus tempos de retenção (t_r): ácido succínico, $t_r = 4,31 \text{ min}$ (1); ácido
8 fumárico, $t_r = 8,84 \text{ min}$ (2); ácido málico, $t_r = 8,96 \text{ min}$ (2); ácido α -cetoglutárico $t_r = 9,72 \text{ min}$
9 (3).

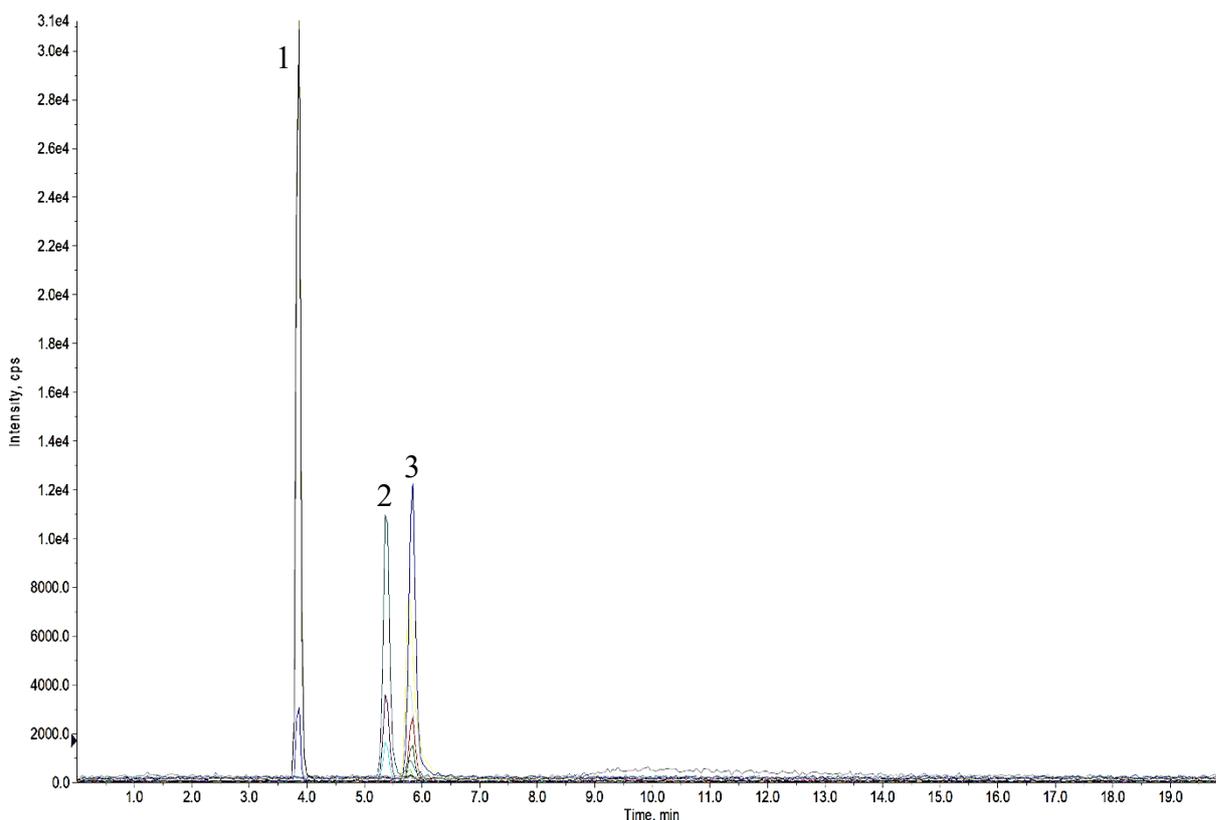


Fonte: elaborado pelo autor.

28 O perfil dos picos e a separação mais satisfatórios foram obtidos utilizando a coluna
29 ZIC-HILIC (Figura 12). Além disso, o tempo de corrida foi menor que utilizando a coluna
30 FRULIC-N. Optou-se, então, por continuar o desenvolvimento do método com a coluna ZIC-
31 HILIC. A melhor condição obtida para esta coluna foi utilizando 70 % de acetonitrila e pH 3.
32 No entanto, mesmo nessas condições experimentais também não foi possível detectar o ácido
33 cítrico.

34
35
36

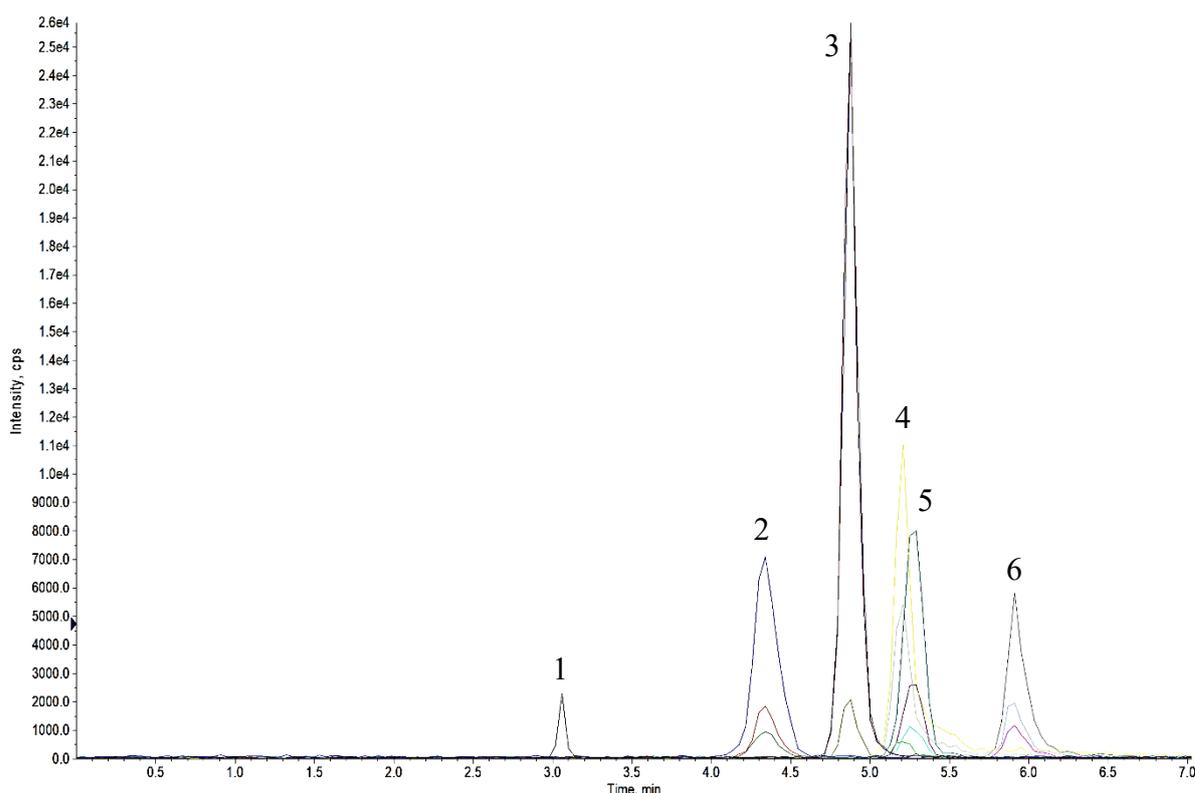
1 **Figura 12** - Cromatograma de uma solução contendo padrões dos ácidos α -cetoglutarico,
 2 cítrico, fumárico, málico e succínico em uma concentração de 5 mg L^{-1} em acetonitrila 50 %
 3 utilizando a coluna ZIC-HILIC (150 mm x 4,6 mm, 3,5 μm). Condições experimentais: fase
 4 móvel, acetonitrila 70 % e tampão formiato de amônio 8 mmol L^{-1} (pH = 3) 30 % em modo
 5 isocrático; fluxo, $500 \mu\text{L min}^{-1}$; volume de injeção, $5 \mu\text{L}$; temperatura da coluna, $20 \text{ }^\circ\text{C}$;
 6 detecção por espectrometria de massas no modo de negativo por monitoramento de reações
 7 múltiplas. Sinais e seus tempos de retenção (t_r): ácido succínico, $t_r = 3,85 \text{ min}$ (1); ácido
 8 fumárico, $t_r = 5,38 \text{ min}$ (2); ácido málico, $t_r = 5,78 \text{ min}$ (3); ácido α -cetoglutarico $t_r = 5,83 \text{ min}$
 9 (3).



22 Fonte: elaborado pelo autor.

23 Devido a importância do ácido cítrico para as análises, buscaram-se alternativas para
 24 detectá-lo. Foi testado então um novo método utilizando como fase móvel 70 % acetonitrila e
 25 30 % acetato de amônio (pH = 7) em modo isocrático, com volume de injeção $10 \mu\text{L}$ e a
 26 temperatura da coluna foi mantida em $45 \text{ }^\circ\text{C}$ (Huang *et al.*, 2012). O fluxo foi mantido o
 27 mesmo dos testes anteriores, $500 \mu\text{L min}^{-1}$. Nessas condições, utilizando uma temperatura
 28 elevada em relação a que se estava trabalhando anteriormente, foi possível detectar o ácido
 29 cítrico juntamente com os demais ácidos e obter uma separação satisfatória (Figura 13).
 30 Contudo, continuou não sendo possível detectar o ácido oxaloacético. Este ácido é instável e
 31 sensível ao pH, podendo sofrer um processo de descarboxilação, o que faz com que ele seja
 32 convertido no ácido pirúvico (Kadhi, Al *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2007). A alternativa, então,
 33 foi detectá-lo com a transição do ácido pirúvico ($86,9/43 \text{ m/z}$).

1 **Figura 13** - Cromatograma de uma solução contendo padrões dos ácidos α -cetoglutarico,
2 cítrico, fumárico, málico e succínico em uma concentração de 5 mg L⁻¹ em acetonitrila 50 %
3 utilizando a coluna ZIC-HILIC (150 mm x 4,6 mm, 3,5 μ m). Condições experimentais: fase
4 móvel, acetonitrila 70 % e acetato de amônio (pH = 7) 30 % em modo isocrático; fluxo, 500
5 μ L min⁻¹; volume de injeção, 10 μ L; temperatura da coluna, 45 °C; detecção por
6 espectrometria de massas no modo de negativo por monitoramento de reações múltiplas.
7 Sinais e seus tempos de retenção (t_r): ácido oxaloacético, t_r = 3,06 min (1); ácido α -
8 cetoglutarico, t_r = 4,33 min (2); ácido succínico, t_r = 4,88 min (3); ácido málico, t_r = 5,20 min
9 (4); ácido fumárico, t_r = 5,27 min (5); ácido cítrico, t_r = 5,91 min (6).



27 Esta etapa de desenvolvimento do método por LC-MS/MS foi desenvolvida em 2020,
28 durante a pandemia do COVID-19, em um período em que o acesso ao laboratório era
29 extremamente restrito. A orientação que tínhamos era para permanecer o menor tempo
30 possível dentro do laboratório. Então, as idas até o laboratório eram somente para preparar os
31 padrões e fases móveis, o controle do instrumento era feito de modo remoto. Com as
32 atividades limitadas, o desenvolvimento do trabalho também acabou ficando limitado. Além
33 disso, no final do ano ocorreu um problema no injetor do LC e foi preciso aguardar até que a
34 manutenção pudesse ser realizada. Neste intervalo, no início de 2021, optou-se por tentar
35 desenvolver um método por GC-MS. No entanto, os primeiros resultados obtidos não foram
36 satisfatórios devido ao processo de derivatização. Como não havia tempo para otimizar o

1 procedimento, a ideia foi descartada e esperou-se o conserto do injetor do LC. Quando o LC
2 voltou a funcionar, seis meses após o problema, não foi possível reproduzir o método
3 desenvolvido anteriormente e, portanto, não foi possível retomar o desenvolvimento. Assim,
4 decidiu-se desenvolver o método por CZE-DAD.
5

1 APÊNDICE B - Desenvolvimento do método por CZE usando capilares revestidos com 2 SAQQ para inversão de fluxo

4 1. MATERIAL E MÉTODOS

6 Para o desenvolvimento deste método foi utilizado o mesmo instrumento e as mesmas
7 soluções e reagentes já descritos nos itens 4.1 e 4.2 deste trabalho.

9 1.1. ANÁLISES UTILIZANDO CAPILAR REVESTIDO COM SAQQ

11 Para revestir os capilares para análise por CZE foi utilizada uma solução SAQQ 0,2%
12 (m/v, diluída com ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹). Primeiro foi realizado o condicionamento
13 do capilar com NaOH (1 mol L⁻¹) por 30 min, seguido de uma lavagem com água ultrapura,
14 também por 30 minutos. Em seguida, o capilar foi lavado com uma solução de SAQQ 0,2%
15 (m/v) por 15 min e mantido em contato estático também por 15 min. Por fim, o capilar foi
16 condicionado com o eletrólito de corrida por 15 minutos.

17 Para os testes com revestimento interno de SAQQ foi utilizado um capilar de sílica
18 fundida revestido externamente com poliimida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ,
19 U.S.A.) com 75 cm de comprimento total (66,5 cm de comprimento efetivo x 75 µm diâmetro
20 interno e 375 µm de diâmetro externo). O eletrólito utilizado foi constituído por 10 mmol L⁻¹
21 de ácido ftálico e 20 mmol L⁻¹ de β-alanina (pH = 3,5). Antes das análises, o capilar foi
22 condicionado com BGE por 15 min. Entre as corridas, o capilar foi lavado com o BGE por 1
23 min. As amostras foram injetadas utilizando injeção hidrodinâmica (50 mBar 5 s⁻¹). Foi
24 aplicada uma voltagem de 30 kV, com polaridade negativa na injeção, e os analitos foram
25 identificados com detecção indireta em 210 nm. A temperatura do capilar foi mantida a 20 °C.
26 Estes testes foram realizados utilizando uma solução contendo todos os padrões com uma
27 concentração de 25 mg L⁻¹.

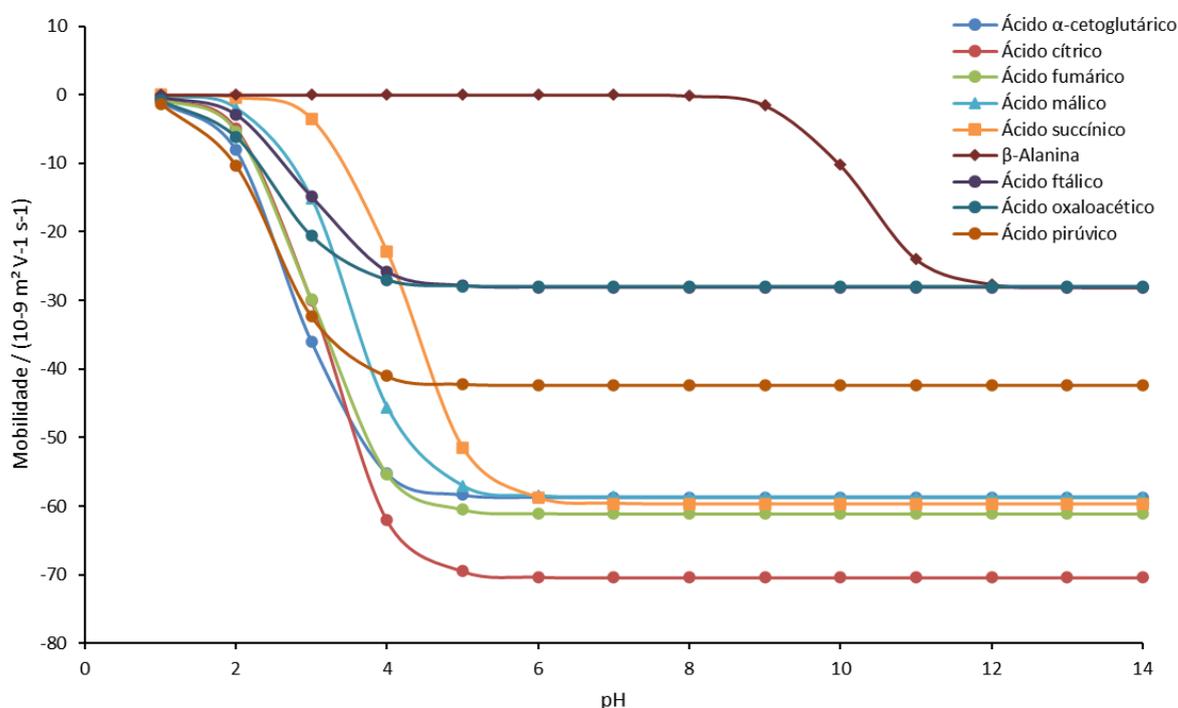
28

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR CZE UTILIZANDO CAPILAR REVESTIDO COM SAQQ

Para a inversão do EOF, a primeira tentativa foi utilizar um revestimento estático e, portanto, o capilar foi revestido internamente com SAQQ. O pH do eletrólito foi selecionado com base nas curvas de mobilidade vs pH dos analitos (Figura 14). A faixa de pH entre 3 e 4 mostrou-se a mais adequada para otimização do método e optou-se, então, por trabalhar com um pH igual a 3,5. Como co-íon, foi selecionado o ácido ftálico, pois este possui mobilidade próxima a dos analitos e também por ser cromóforo, permitindo a detecção indireta, uma vez que os analitos não absorvem ou absorvem pouco no espectro UV. Para garantir a capacidade tamponante necessária para o eletrólito, a β -alanina foi selecionada como contra-íon.

Figura 14 - Curvas de mobilidade efetiva versus pH dos analitos ácido α -cetoglutarico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido málico, ácido oxaloacético, ácido pirúvico e ácido succínico, e dos componentes do eletrólito de corrida β -alanina e ácido ftálico.

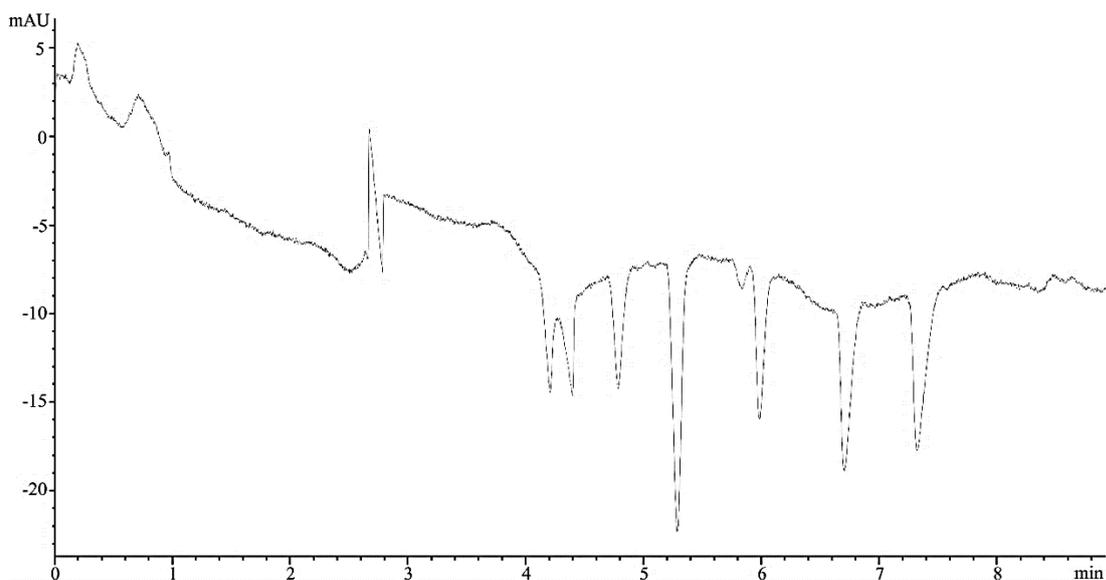


Embora o revestimento com SAQQ tenha apresentado um desempenho adequado para a inversão de fluxo, os resultados não foram reproduzíveis. O revestimento polimérico feito com SAQQ pode apresentar instabilidade uma vez que é suscetível a lixiviação ao longo das

1 análises. Como consequência, pode ocorrer uma mudança no fluxo, resultando em uma
2 alteração do perfil de separação dos analitos (Lucy, MacDonald e Gulcev, 2008). Além disso,
3 não foi possível separar alguns dos analitos, mesmo testando diferentes condições, alguns
4 destes continuavam comigrando. Dois dos eletroferogramas obtidos nessa etapa estão
5 representados nas Figuras 15 e 16 com a descrição das condições instrumentais utilizadas.

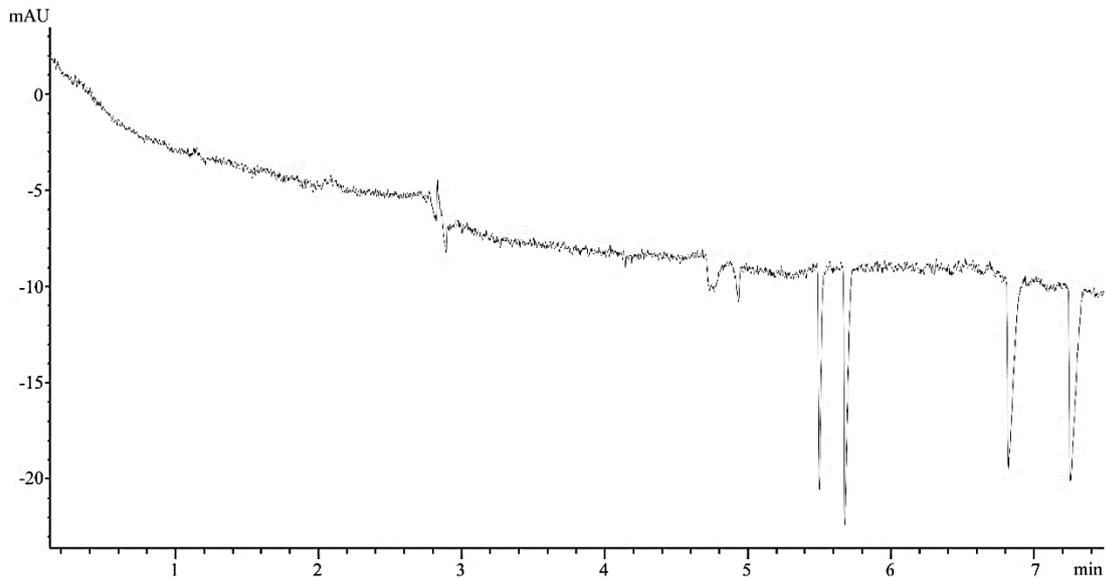
6 A próxima etapa foi, então, utilizar um revestimento dinâmico empregando um
7 surfactante como inversor de fluxo. Como o ácido oxaloacético sofre degradação facilmente e
8 o ácido pirúvico também apresentou problemas em sua determinação durante o
9 desenvolvimento do método, optou-se por não os incluir na etapa seguinte.

10
11 **Figura 15** - Eletroferograma de uma solução contendo todos os padrões dos ácidos orgânicos
12 em uma concentração de 25 mg L^{-1} , e padrão interno em uma concentração de 25 mg mL^{-1} ,
13 obtido utilizando o método desenvolvido por CZE. Condições experimentais: BGE, 10 mmol
14 L^{-1} de ácido ftálico, 45 mmol L^{-1} de β -alanina (pH 4); capilar de sílica, 65 cm de
15 comprimento total (56,5 cm efetivo), $75 \mu\text{m}$ de diâmetro interno; injeção $50 \text{ mBar } 5 \text{ s}^{-1}$; -30
16 kV; temperatura $20 \text{ }^\circ\text{C}$; detecção indireta em 210 nm. Sinais não identificados.



19
20
21
22
23
24
25
26
27

- 1 **Figura 16** - Eletroferograma de uma solução contendo todos os padrões dos ácidos orgânicos
2 em uma concentração de 25 mg L^{-1} , e padrão interno em uma concentração de 25 mg mL^{-1} ,
3 obtido utilizando o método desenvolvido por CZE. Condições experimentais: BGE, 10 mmol
4 L^{-1} de ácido ftálico, 20 mmol L^{-1} de β -alanina (pH 3,5); capilar de sílica, 75 cm de
5 comprimento total ($66,5 \text{ cm}$ efetivo), $75 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno; injeção $50 \text{ mBar } 5 \text{ s}^{-1}$; -30
6 kV ; temperatura $20 \text{ }^\circ\text{C}$; detecção indireta em 210 nm . Sinais não identificados.



7

8