



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ANDRÉIA DE MELO PORCARI

**APLICAÇÕES DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM CARACTERIZAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DE MATRIZES BIOLÓGICAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
QUÍMICA NA ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA**

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
POR ANDRÉIA DE MELO PORCARI, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

P821a Porcari, Andréia de Melo (1983-).
Aplicações da espectrometria de massas em
caracterização e quantificação de matrizes biológicas /
Andréia de Melo Porcari. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Espectrometria de massas. 2. Triacilgliceróis.
3. Cortisol. 4. Bovinos. I. Eberlin, Marcos Nogueira.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Mass spectrometry applications for characterization and quantitation in biological matrices

Palavras-chave em inglês:

Mass spectrometry
Triacylglycerol
Cortisol
Cattle

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Marcos Nogueira Eberlin [Orientador]
Isabel Cristina Sales Fontes Jardim
Ed Hoffman Madureira

Data de defesa: 12/03/2012

Programa de pós-graduação: Química

Dedico este trabalho...

*À minha filha Marina, que é meu maior presente de Deus.
Dedico também ao meu esposo Rafael, pelo apoio em todas as horas
E aos meus pais, Benedito e Elizabeth, pelo exemplo de luta e perseverança.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a *Deus* pela oportunidade desta conquista em minha vida, e a *Nossa Senhora*, que me segurou e me ajudou a passar por todas as pedras do meu caminho.

À minha família: minha filha *Marina*, pela paciência e carinho com a mamãe, meu marido *Rafael*, pelo apoio incondicional e meus pais, *Elizabeth* e *Benedito*, por participarem em todos os momentos e me ajudarem de todas as formas possíveis e imagináveis. A eles meu afeto, carinho e gratidão!

Ao *Professor Marcos Nogueira Eberlin*, pela orientação, carinho e amizade durante todo esse período de convívio.

À *Christina R. Ferreira* pela presença em todos os momentos, mesmo estando tão longe.

À *Rosineide C. Simas* pela ajuda nos momentos mais difíceis, pela companhia, pelas madrugadas de trabalho e dedicação e pela paciência.

À toda equipe de quantificação: *Kélio A. Martins Jr.*, pela sua alegria e sabedoria; *Marcos P. Steola*, *Patrícia M. Porciúncula*, *Fábio D'Alexandri* e *Phellipe H. Amaral*, pela ajuda e companherismo.

Ao querido amigo *Jesuí O. Visentainer* e à *Rosana Alberici*, pelo conhecimento transmitido.

À Bianca Martins e Mateus Campos, da Life Technologies, pelo empenho e comprometimento em manter o equipamento no Laboratório ThoMSon

À D. Cida que, além de facilitar meu trabalho, era para mim uma presença materna no laboratório

À Níbia, Natália, Patrícia, Thaís e Vanessa, amigas especiais que me animaram, me ouviram, me aconselharam em tantos momentos, e tornaram mais leve e divertido o fardo carregado.

À Livia S. Eberlin Sanders, por sempre acreditar em mim e ser para mim um grande exemplo, em todos os sentidos.

Ao pessoal da Senzala, que tornou minha vida mais animada, sempre!

À toda equipe do Laboratório ThoMSon, essa grande família.

À *FAPESP* pelo financiamento deste trabalho.

Andréia de Melo Porcari

Brasileira, casada, nascida à 18/05/1983, natural de Vinhedo – SP.

Formação Acadêmica

- 2010- 2012** **Mestrado (Stricto Sensu) em Química Analítica** – Título da Dissertação: “*Aplicações da Espectrometria de Massas em Caracterização e Quantificação de Matrizes Biológicas*” Orientador: Marcos Eberlin UNICAMP. Apoio: FAPESP
- 2004-2008** **Graduação em Química (Licenciatura em Química e Bacharelado em Química Tecnológica)** – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Formação Técnica

- 1999 - 2000** **Curso Técnico – Segurança do Trabalho** – ETECVAV - Jundiaí

Atividades profissionais

- 1. AkzoNobel Ltda. / National Starch & Chemical.**
Estagiária Laboratório de Personal Care. De Set/2007 à Dez/2008.
- 2. Astra S/A Indústria e Comércio.**
Técnica de Segurança do Trabalho. De Jul/2002 à Mai/2003.

Atividades Acadêmicas

- 2006 - 2007** **Iniciação Científica PIBIC/CNPq.** “*Síntese e caracterização de catalisadores de nanopartículas de Ni suportadas em carvão e sílica*”. Orientadora: Daniela Zanchet. **Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas-SP).**
- 2005 - 2006** **Iniciação Científica PIBIC/CNPq** “*Desenvolvimento de Experimentos para o Ensino de Química no Nível Médio, Com Base no Programa de Química do Vestibular da Unicamp*”. Orientador: José de Alencar Simoni. IQ-UNICAMP

Outras atividades e cursos

- 1.** Participação no comitê organizador do IV Congresso BRMASS, Nov, 2011.
- 2.** Curso: A Espectrometria de Massas como Ferramenta em Produção Animal, Diagnóstico e Análise de Resíduos. Nov, 2011. 8h. IV Congresso BRMASS.

Artigos completos publicados em periódicos

- 1.** N.V. Schwab, A.M. Porcari, M.B. Coelho, E.M. Schmidt, J.L. Jara, J.V. Visentainer, M.N. Eberlin. Easy dual-mode ambient mass spectrometry with Venturi self-pumping, canned air, disposable parts and voltage-free sonic-spray ionization. Analyst, *in press*. DOI: 10.1039/c2an16312h

2. R.M.T. Fernandes, G.C. Gomes, A.M. Porcari, J.R.V. Pimentel, P.M. Porciúncula, H.A. Martins-Júnior, P.H.P. Miguez, J.L. da Costa, P.H. Amaral, F. Perecin, E.C. Meurer, P.V. Furtado, R.C. Simas, M.N. Eberlin, C.R. Ferreira, E.H. Madureira. *Theriogenology*, **2011**, 76, 1266
3. R. Rinaldi, A.M. Porcari, T.C.R. Rocha, W.H. Cassinelli, R.U. Ribeiro, J.M.C. Bueno, D. Zanchet. Construction of heterogeneous Ni catalysts from supports and colloidal nanoparticles - A Challenging Puzzle. *Journal of Chemical Catalysis. A, Chemical*, 301, 11 - 17, 2009.

Painéis e Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. A.M. Porcari, R.C. Simas, H.A. Martins-Jr., M.P. Steola, P.M. Porciuncula, C.R. Ferreira, M.A.F. Porcionato, F. D'alexandri, M.N. Eberlin. Quantitation of Cortisol in bovine Milk and Plasma using Liquid Chromatography-Photo Spray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-APPI-MS/MS): Evaluating Plasma and Milk cortisol correlation. IV Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas (BRMASS), **2011**.
2. H.A. Martins, R.C. Simas, P.P. Steola, M.B. Coelho, P.M. Porciúncula, A.M. Porcari, M.P. Brolio, C.R. Ferreira, F. Perecin, C.E. Ambrosio, M.A. Miglin, D.S. Marins, M.N. Eberlin. Measurement of steroids hormones in canine serum during estrus using ID-APPI-LC-MS/MS. IV Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas (BRMASS), **2011**.
3. M.P. Steola, J.N.S. Sales, H.A. Martins-Jr., P.M. Porciúncula, A.M. Porcari, R.C. Simas, C.R. Ferreira, P.S. Baruselli, M.N. Eberlin. Multi steroid hormone quantitation by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization mass spectrometry in follicular fluid and plasma of cows. IV Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas (BRMASS), **2011**.
4. N.V. Schwab, A.M. Porcari, M.B. Coelho, J.L. Jara, E.M. Schmidt, J.V. Visentainer, M.N. Eberlin. A Spartan Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Source: Simplifying Mass Spectrometry Ionization to its Upmost Limit. IV Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas (BRMASS), **2011**.
5. P.H. Amaral, A.M. Porcari, P.C.P. Rosa, W.C. Alver, M.N. Eberlin, N.F. Hoer. "Método Rápido para Quantificação de Multidrogas utilizando Injeção em Fluxo acoplada à Espectrometria de Massas (FI-MS). 2º Congresso Analítica Latin America, **2011**.
6. M.N. Eberlin, A.M. Porcari, R.M. Alberici, C. Ferreira, J.V. Visentainer. "Thermal Assisted Easy Ambient Sonic-Spray Ionization (T-EASI) for analysis of triacylglycerides (TAG) in meat matrices". 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry, **2011**, (377)
7. A.M. Porcari, C.E. Ambrosio, J.V. Visentainer, M. Bertolini, R.P.C. Gerger, F.V. Meirelles, E.C. Cabral, M.B. Coelho, E.J. Pilau, F.C. Gozzo, F. Perecin, M.A. Miglino, C.R. Ferreira, M.N. Eberlin. "Thermal Assisted Easy Ambient Sonic-Spray Ionization (T-EASI) for triacylglycerides (TAG) profile in IVF- and NT-derived bovine placentas". 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry, **2011**, (2635)

RESUMO

APLICAÇÕES DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MATRIZES BIOLÓGICAS

O presente trabalho utiliza a Espectrometria de Massas para caracterização e quantificação de diferentes analitos em matrizes biológicas. Inicialmente é demonstrado o desenvolvimento de uma técnica para análise direta de triacilgliceróis (TAG) em carnes e tecidos, que podem então ser caracterizados por seu perfil lipídico. Nesta técnica, uma etapa de foto aquecimento visa extrair quase instantaneamente TAG da matriz, utilizando pouco ou nenhum solvente. O conteúdo extraído e coletado num papel pardo é então analisado por EASI-MS (Easy Ambient Sonic-spray Ionization - Mass Spectrometry), revelando o perfil de TAG em poucos segundos, sem necessidade de hidrólise, derivação ou outras extrações. *Thermally-imprinted* EASI-MS (T-EASI-MS) é uma técnica capaz de diferenciar tipos de carnes e seus resultados mostraram-se concordantes com a literatura e com outras técnicas tradicionais para análise de lipídios. Num segundo momento, utilizou-se a espectrometria de massas como ferramenta de quantificação, através do desenvolvimento de dois métodos analíticos para análise de cortisol em plasma e leite bovinos, utilizando LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas seqüencial). Os métodos aqui desenvolvidos foram validados utilizando a metodologia de compatibilização de matriz (para o plasma) e de calibração direta em solvente (curva não extraída) para o leite. Ambos os métodos empregaram pequeno volume de amostra e forneceram baixos limites de quantificação ($0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ e $0,15 \text{ ng mL}^{-1}$ de cortisol para o plasma e leite, respectivamente). A metodologia desenvolvida foi aplicada para análise de dois experimentos veterinários. No primeiro foi investigada a correlação entre as concentrações de cortisol no plasma e no leite bovino, bem como o efeito da ordenha sobre a concentração do cortisol nesses fluídos biológicos. No segundo o nível de cortisol em vacas com e sem mastite sub-clínica foi investigado e os resultados foram comparados aos resultados obtidos por ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) para as mesmas amostras.

ABSTRACT

MASS SPECTROMETRY APPLICATIONS FOR CHARACTERIZATION AND QUANTITATION IN BIOLOGICAL MATRICES

This research uses mass spectrometry (MS) as a tool to characterize and quantify different analytes in biological matrices. At first, the development of a technique for direct analysis of triacylglycerols (TAG) in meats and animal tissues is shown. This technique allows sample characterization through its lipid profile. It starts with a photo-heating process which aims to extract, almost instantaneously, TAG from the matrix, using very little amounts of solvent. The extract is collected on a paper which is then analyzed by EASI-MS (easy ambient sonic-spray ionization), thus revealing the TAG profile in a few seconds, without the use of hydrolysis, derivatization or exhaustive extractions. Thermally-imprinted EASI-MS (T-EASI-MS) is able to differentiate kinds of meats and has been shown to be in agreement with previous reported data and results from traditional techniques used for lipid analysis of the same samples. In a second phase, this research uses MS as a tool for quantitative analyses, through the development of two analytical methods for cortisol analysis in bovine plasma and milk, using a LC-MS/MS (liquid chromatography - tandem mass spectrometry) system. These methods were fully validated using the matrix matched methodology for plasma analysis and a non-extracted calibration curve (prepared in solvent) for milk analysis. Both methodologies use small amounts of sample and achieved very low limits of quantification (0.1 ng mL^{-1} and 0.15 ng mL^{-1} of cortisol for plasma and milk, respectively). The methods were applied to the analysis of samples from two veterinary experiments. In the first one, the aim was to investigate the correlation between bovine plasma and milk cortisol concentrations, as well as to determine if the milking process can change basal cortisol level in these fluids. In the second experiment, the aim was to evaluate whether milk cortisol concentrations varied or not in cows with or without sub-clinical mastitis. The samples of the second experiment were also analyzed by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) in order to compare the results with those from LC-MS/MS.

ÍNDICE

Lista de Tabelas.....xiv

Lista de Figurasxv

I – CAPÍTULO 1: Caracterização Direta de Triacilgliceróis em Carnes e Tecidos Animais.1

1.1. Introdução

1.1.1 Triacilgliceróis 1

1.1.2 Análise de TAG..... 2

1.1.3 Princípios da Técnica de EASI-MS 4

1.2. Objetivos.....6

1.3. Procedimento Experimental6

1.3.1. Pré-testes..... 6

1.3.2. Análise por T-EASI-MS 7

1.3.3 Análise Quimiométrica 7

1.3.4. Análise por GC-FID..... 9

1.4. Resultados e Discussão9

1.5. Conclusões..... 18

II – CAPÍTULO 2: Desenvolvimento e Validação de Métodos Para Determinação de Cortisol em Plasma e Leite Bovinos para Estudo de Bem-Estar Animal.....	19
2.1. Introdução	19
2.1.1 – O Bem-Estar Animal na Indústria Pecuária e a Necessidade de Monitoramento do Cortisol	19
2.1.2 – Técnicas para Determinação de Esteróides.....	20
2.1.3 – LC-MS/MS: A Técnica de Escolha para Quantificação de Esteróides.....	23
2.2 – Objetivos	24
2.3. Procedimento Experimental	25
2.3.1 - Coleta de Amostras	25
2.3.2 - Condições Cromatográficas	27
2.3.3 - Espectrômetro de Massas.....	28
2.3.4 - Preparo da Amostra	28
2.3.5 - Soluções e Curvas Analíticas.....	29
2.3.6 – Validação.....	30
2.3.7 - Tratamento Estatístico dos Dados	31
2.4. Resultados e Discussão Parte I – Desenvolvimento e Validação dos Métodos	32
2.4.1 – Características dos Métodos LC-MS/MS Desenvolvidos	32
2.4.2 – Escolha da Metodologia de Validação.....	36
2.4.3 – Metodologia de Preparo de Amostra	37
2.4.4 – Validação dos Métodos	37

2.5. Resultados e Discussão Parte II – Experimentos I e II....	42
2.5.1 - Experimento I: Estudo de Correlação entre a Concentração de Cortisol em Plasma e Leite e Estudo do Efeito da Ordenha em Relação à Concentração de Cortisol.....	42
2.5.2 - Experimento II: Estudo da Concentração de Cortisol em Vacas Diagnosticadas Positiva e Negativamente para a Mastite Sub-Clínica e Comparação com os Resultados Obtidos por ELISA	47
2.6. Conclusões	52
III – Referências Bibliográficas	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de ácidos graxos das amostras determinada por GC-FID.....	13
Tabela 2. Atribuição de TAG detectados por T-EASI(+)-MS e razão <i>m/z</i> de seus adutos de sódio e potássio.....	16
Tabela 3. Animais utilizados para o experimento I e suas características.	26
Tabela 4. Gradientes de vazão e composição da fase móvel utilizados para análise de plasma.	28
Tabela 5. Gradientes de fluxo e fase móvel utilizados para análise de leite.	28
Tabela 6. Dados de precisão intra-corrida e inter-corrida para o plasma.	41
Tabela 7. Dados de precisão intra-corrida e inter-corrida para o leite.	41
Tabela 8. Efeito de matriz observados para os métodos de plasma e leite.	42
Tabela 9. Resultados das amostras de plasma.....	43
Tabela 10. Resultados das amostras de leite.....	43
Tabela 11. Estudo de correlações múltiplas entre as variáveis número de lactações, meses de lactação e concentração plasmática de cortisol	47
Tabela 12. Resultados para as amostras dos grupos positivo e negativo para diagnóstico de mastite sub-clínica por LC-MS/MS	48
Tabela 13. Resultados para as amostras dos grupos positivo e negativo para diagnóstico de mastite sub-clínica por ELISA.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do glicerol e representação esquemática de um ácido graxo e de um triacilglicerol, onde R representa uma cadeia alquílica saturada ou insaturada, com mais de 3 átomos de carbono.	1
Figura 2. (A) EASI-MS e suas derivações: (B) V-EASI-MS e (C) <i>Spartan</i> V-EASI-MS. Simplicidade e aplicabilidade em diversas análises.	5
Figura 3. Detalhes da análise por T-EASI-MS. Em (A) o aquecedor montado no laboratório; em (B) o papel pardo e a amostra, que deve ser colocada próxima à borda do papel; em (C) o detalhe da fonte de EASI e em (D) o equipamento monoquadrupolar utilizado, contendo a fonte de EASI em sua entrada.	8
Figura 4. Esquema simplificado para o processo de T-EASI-MS. Em (A) a carne é cortada. Em (B) a solução de extração é gotejada sobre a carne que está sobre o papel pardo. Em (C) a carne é aquecida sobre o papel. Em (D) apenas o papel é analisado por EASI-MS. Em (E) o perfil de TAG é revelado no espectro de massas.	8
Figura 5. EASI(+)-MS diretamente sobre a carne (A) <i>in natura</i> e (B) embebida em solução de MeOH/CHCl ₃ (2:1, %v/v).	10
Figura 6. T-EASI(+)-MS: análise do papel sobre o qual a carne foi aquecida por (A) 60 segundos; (B) 90 segundos e (C) 120 segundos, sempre com o gotejamento prévio da solução de MeOH/CHCl ₃	11
Figura 7. Espectro de massas de gordura bovina utilizando (A) T-EASI(+)-MS e (B) MALDI(+)-MS ⁽²⁶⁾	12
Figura 8. Espectros de T-EASI(+)-MS para amostras de diferentes carnes.	14
Figura 9. Espectros de T-EASI(+)-MS para amostras de diferentes peixes.	15
Figura 10. PCA para carnes de vaca (N=3) e frango (N=3) com dados obtidos por T-EASI(+)-MS.	17

Figura 11. Estrutura do cortisol e sua produção no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) em resposta ao estresse	20
Figura 12. Esquema simplificado para ELISA. Em (A) a placa contendo o anticorpo. Em (B) o reconhecimento do antígeno pelo anticorpo. Em (C) a reação com outro anticorpo contendo uma enzima que se ligará a um substrato capaz de emitir um sinal mensurável.	21
Figura 13. Sistema LC-MS/MS empregando um triplo quadrupolo.	24
Figura 14. Espectros de massas (MS/MS – <i>full scan</i>) mostrando o perfil de fragmentação de (A) cortisol e (B) d4-cortisol, e a atribuição dos principais sinais ⁰	34
Figura 15. Cromatogramas típicos obtidos para o método de (A) plasma e (B) Leite, conforme condições descritas nos itens 2.3.2 a e b.	35
Figura 16. Cromatogramas estendidos de amostras de plasma e leite extraídas conforme itens 2.3.4 a e b, sendo em (A) análise de plasma e em (B) análise de leite. Condições cromatográficas descritas nos itens 2.3.2 a e b.	35
Figura 17. Cromatogramas do LD para (A) método de plasma e (B) método de leite mostrando a relação sinal ruído (S/N) para as transições monitoradas de cortisol. Condições cromatográficas descritas no item 2.3.2 a e b.	38
Figura 18. (A) Cromatograma para solução fisiológica 6% BSA não dopada extraída conforme protocolo para plasma e (B) Cromatograma para solução fisiológica 6% BSA dopada com 0,10 ng mL ⁻¹ . Condições cromatográficas descritas no item 2.3.2 a.	39
Figura 19. (A) Cromatograma para solução metanólica de cortisol (0,15 ng mL ⁻¹) e (B) Cromatograma para amostra de referência de leite dopada com cortisol (0,15 ng mL ⁻¹) e extraída. Condições cromatográficas descritas no item 2.3.2 b.	39
Figura 20. Linearidade de 0,1 à 20,0 ng mL ⁻¹ para o método do plasma (N=3)	40
Figura 21. Linearidade de 0,1 à 20,0 ng mL ⁻¹ para o método de leite (N=3)	40

Figura 22. Distribuição dos resultados de (A) Plasma e (B) Leite nos tempos (-1) e (+10) entre os animais. A barra de erros representa a incerteza da medida (<i>I</i>)...	44
Figura 23. Média entre os animais (N=6) das concentrações de cortisol no plasma e no leite no início e final da ordenha. A barra de erros se refere à incerteza da média (variação entre os animais).	45
Figura 24. Estudo de correlação de Pearson entre a concentração de cortisol no plasma e no leite	46
Figura 25. Resultados das amostras do grupo (A) Negativo e (B) Positivo para diagnósticos de mastite sub-clínica obtidos pelos métodos de LC-MS/MS e ELISA	49
Figura 26. Estudo de correlação linear de Pearson entre os resultados obtidos por ELISA e LC-	50
Figura 27. Comparação entre LC-MS/MS e ELISA para os grupos positivo e negativo. A barra de erros se refere à incerteza da média (variação entre os animais).	50

I – CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DIRETA DE TRIACILGLICERÓIS EM CARNES E TECIDOS ANIMAIS.

1.1. Introdução

1.1.1 Triacilgliceróis

Triacilgliceróis (TAG) são compostos classificados quimicamente como ésteres de glicerol, onde os três grupos hidroxílicos do glicerol se encontram esterificados com ácidos graxos, cuja cadeia alquílica pode variar em comprimento e número de insaturações⁽¹⁾. Na **Figura 1** encontram-se as estruturas do glicerol e a representação das estruturas de um ácido graxo e de um TAG.

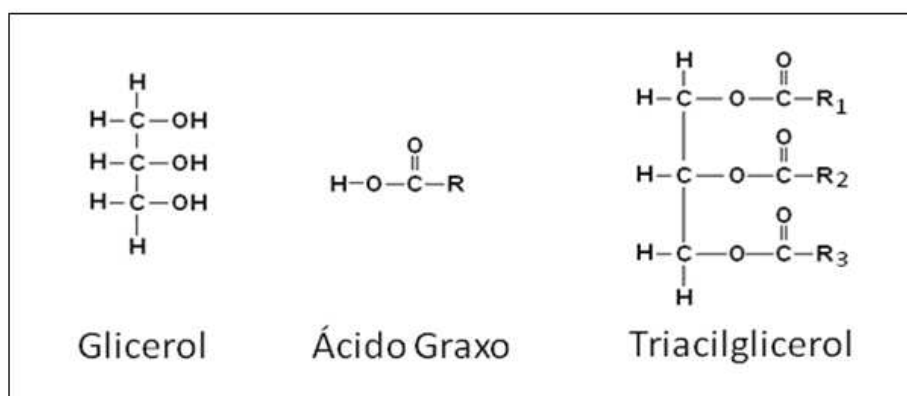


Figura 1. Estrutura do glicerol e representação esquemática de um ácido graxo e de um triacilglicerol, onde R representa uma cadeia alquílica saturada ou insaturada, com mais de 3 átomos de carbono.

TAG são substâncias lipídicas biosintetizadas a partir da glicose⁽²⁾ e são os principais constituintes de óleos e gorduras, sendo responsáveis pelo armazenamento de energia em animais e plantas, além de atuarem como solvente para constituintes celulares minoritários, tais como as vitaminas lipossolúveis. TAG têm grande valor nutritivo, dependendo da existência de saturações/insaturações em suas cadeias⁽³⁾.

Estes lipídios também interferem na estrutura, estabilidade, sabor, aroma, qualidade de armazenamento e características visuais dos alimentos⁽⁴⁾. São importantes para o controle de qualidade em ramos industriais que trabalham com processamento de alimentos, uma vez que essas substâncias podem ser utilizadas para avaliar a formação de produtos de oxidação⁽⁵⁾. A deterioração oxidativa de lipídios em tecidos biológicos pode gerar produtos voláteis de baixa massa molar, que são percebidos como a rancidez, e deve, portanto ser monitorada.

Uma das nomenclaturas usuais dos TAG se baseia na representação dos três ácidos graxos que o compõem, que podem, por sua vez, serem simbolizados pelas letras iniciais de seu nome trivial. Por exemplo, um TAG composto pelos ácidos palmítico (P), oléico (O) e linoléico (L) deve ser representado por POL. Neste caso, o ácido com a menor cadeia ou, em caso de cadeias iguais, aquele com menor número de insaturações, deve ser escrito primeiro⁽⁶⁾. Outra maneira de designar TAG bastante utilizada em trabalhos científicos^(7,1) refere-se à soma dos carbonos e das insaturações dos ácidos graxos que o compõem, ou seja, da relação entre o número de carbonos e de insaturações (CN/DB – *carbon number / double bound*) da mistura dos três ácidos graxos, excetuando a cadeia do glicerol. Citando o mesmo exemplo, o ácido palmítico é representado por C16:0 (possui 16 carbonos e nenhuma insaturação); o ácido oléico é representado por C18:1 (possui 18 carbonos e uma insaturação); já o ácido linoléico é representado por C18:2 (possui 18 carbonos e duas insaturações). Desta forma, um TAG composto por POL seria representado por 52:3. Porém, essa notação, desacompanhada da posição das insaturações, é bastante inespecífica, podendo ser atribuída a mais de uma estrutura.

1.1.2 Análise de TAG

A análise de lipídios (classe que inclui TAG, mono- e diacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios, entre outros⁽⁸⁾), de forma geral, se constitui em uma etapa de extração e uma outra de detecção, que pode requerer ou não reações de derivação e separações cromatográficas, dependendo do propósito da análise⁽⁹⁾.

A etapa de extração geralmente se faz necessária tanto para lipídios de origem vegetal quanto animal, a fim de separá-los de outros constituintes celulares como proteínas, polissacarídeos, aminoácidos, entre outras moléculas, além de preservar o lipídio para análises futuras. Além disso, em matrizes complexas, como tecidos e carnes, uma parte do conteúdo de lipídios está bloqueada por membranas celulares, resultando na necessidade de procedimentos de extração que geralmente envolvem uso de solventes orgânicos, centrifugação, filtração e evaporação. Entre os métodos de extração destaca-se o desenvolvido por Bligh & Dyer (1959)⁽¹⁰⁾, que utiliza clorofórmio e metanol à temperatura ambiente, preservando assim a amostra da oxidação causada por temperatura. Hidrólises ácidas (geralmente com ácido clorídrico) podem ser necessárias em amostras com alto conteúdo protéico, como é o caso de proteína de soja⁽⁹⁾. Hexano também vem sendo utilizado para a extração, assim com éter de petróleo e tolueno em alguns casos. Embora existam muitos métodos consolidados de extração líquido-líquido para lipídios, a utilização destes procedimentos pode resultar em consumo de tempo e também demandar grandes quantidades de solvente⁽¹¹⁾.

Quanto à etapa de purificação e detecção, existem várias técnicas analíticas que visam determinar a composição de TAG, o que é uma tarefa complexa, devido à variedade de ácidos graxos naturais e seu ordenamento na estrutura do glicerol.

A cromatografia gasosa (GC) é bastante aplicada para caracterização de extratos lipídicos e permite uma análise rápida, simples e confiável de amostras complexas, baseada no perfil de ácidos graxos^(12,13,14,15). Nesta técnica, os lipídios intactos geralmente são convertidos a ésteres metílicos dos ácidos graxos que os compõem (FAME – *Fatty acid methyl esters*)⁽¹⁶⁾. Para isto as amostras devem ser hidrolisadas em meio alcalino para conversão dos lipídios a ácidos graxos que serão então esterificados, antes de serem injetados no sistema de GC^(17,18). A detecção geralmente é realizada por detectores de ionização em chama (FID – *Flame Ionization Detector*), na qual se atribuem os FAME a partir da comparação com os tempos de retenção de padrões conhecidos⁽¹⁶⁾. A partir do percentual de cada ácido graxo obtido são feitas combinações estatísticas que possibilitam retornar a proporção aproximada de cada TAG presente na amostra. A espectrometria de massas também é bastante utilizada para análise desses compostos e oferece a vantagem de incluir informações sobre a fragmentação dos ácidos graxos, que corrobora para sua identificação^(19,20). Embora a análise de FAME por GC não forneça informações sobre a natureza dos lipídios intactos, perdendo informações sobre a contribuição de fosfolipídios, por exemplo, esta técnica é ideal para fins de controle de qualidade, onde o perfil do produto já é estabelecido e bem conhecido.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) aliada à espectrometria de massas tem sido muito empregada para a análise de várias classes lipídicas, principalmente TAG e fosfolipídios, com destaque para o uso de detecção por espectrometria de massas através de ionização por APCI-MS (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization – Mass Spectrometry*), que tem permitido a identificação qualitativa de isômeros posicionais, além de fornecer dados quantitativos^(21,22). Há dois tipos de cromatografia bem estabelecidos para a análise de TAG intactos: a cromatografia em fase reversa não aquosa (NARPLC – *Non-aqueous reversed-phase – liquid chromatography*) e a cromatografia de íons de prata⁽²³⁾. Para análise de perfil lipídico em misturas complexas a detecção por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS – *High Resolution Mass Spectrometry*) geralmente é necessária e se faz cada vez mais comum⁽²⁴⁾.

A análise direta de extratos lipídicos com pouco preparo de amostra vem sendo cada vez mais realizada através da espectrometria de massas, com destaque para a infusão direta do extrato polar e análise por *Electrospray* (ESI)⁽²⁵⁾ e também para a técnica de MALDI (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*)⁽²⁶⁾, já bastante difundida para tipificação de óleos e gorduras. Neste sentido, se deve destacar a introdução de técnicas de dessorção/ionização ambientes em espectrometria de

massas^(27,28), que simplificou ou eliminou completamente o processo de preparação de amostra, uma vez que tais técnicas permitem a análise direta de amostras sobre uma superfície ou em suas próprias matrizes naturais. Entre estas técnicas, a técnica de EASI-MS (*Easy Ambient Sonic-Spray Ionization*)^(29,30) desenvolvida em nosso laboratório, é uma das técnicas de ionização ambiente mais simples e já provou sua eficiência na análise de diferentes analitos e matrizes (combustíveis, comprimidos, perfumes, biodiesel e tintas)^(31,32,33,34). EASI tem sido usada para caracterizar instantaneamente diferentes óleos vegetais via perfil de TAG e ácidos graxos livres, usando uma pequena gota de óleo colocada em uma superfície inerte sob condições ambientes⁽³⁵⁾. Esta técnica também tem sido utilizada para a análise de TAG na diferenciação do perfil lipídico de ratos hipertrigliceridêmicos⁽³⁶⁾, para o monitoramento da oxidação do TAG em óleos e gorduras⁽³⁷⁾ e análises qualitativa e semi-quantitativa em óleos vegetais⁽³⁸⁾.

1.1.3 Princípios da Técnica de EASI-MS

EASI é uma técnica inovadora, pois permitiu que uma ionização branda fosse alcançada, sem a necessidade de tensão, radiação, descarga corona ou aquecimento. EASI é baseada na ionização por *sonic-spray* (SSI – *sonic-spray ionization*)^(39,40). Acredita-se que o bombeamento de um solvente polar (vazão de 20 $\mu\text{L min}^{-1}$) através de um capilar de sílica fundida (d.i. 100 μm), com uma alta vazão de gás (geralmente $\text{N}_{2(g)}$, $\sim 3 \text{ L min}^{-1}$) seja responsável por promover o cisalhamento da gota do solvente, formando assim gotas diminutas com desequilíbrio entre cargas positivas e negativas. Essas gotículas têm capacidade reduzida de acomodação das cargas, possuindo baixa densidade de cargas e igual probabilidade de ocorrência de gotas com polaridades opostas. Assim, ao serem direcionadas para amostra elas são capazes de dessorver os analitos de suas superfícies pelo impacto e promover sua ionização^(29,30). O solvente é então evaporado com auxílio do próprio gás do spray, que agora atua como secante. A partir deste momento o mecanismo de ionização é semelhante ao que ocorre em *electrospray* (ESI), uma vez que a perda do solvente pela gota leva a um aumento na densidade de cargas até o ponto em que as forças de repulsão das cargas superam a tensão superficial da gota, levando ao seu colapso, ejetando os íons para fora da mesma⁽⁴¹⁾. Os íons, agora em fase gasosa, são atraídos para dentro do espectrômetro de massas por um campo elétrico de polaridade oposta, sendo conduzidos assim ao analisador. Em princípio a técnica EASI pode ser acoplada a qualquer analisador de massas como quadrupolos, *ion traps*, TOF (*time of flight*), entre outros.

A simplicidade tem sido cada vez mais um quesito a ser considerado no *design* de equipamentos em espectrometria de massas e a técnica EASI tem contribuído nesse sentido, uma vez que a aparelhagem pode ser facilmente construída utilizando-se peças comumente encontradas

nos laboratórios, o que conduz a sua expansão e popularização nos mais diversos estudos. Esta técnica também já apresenta diversificações e aprimoramentos, sempre no sentido de simplificar e ampliar a gama de análises possíveis de serem realizadas. Como exemplo pode-se citar a técnica de V-EASI (*Venturi* – EASI)⁽⁴²⁾, no qual o efeito Venturi (causado pela passagem de um gás a alta pressão por uma restrição de área que causa uma pressão negativa) é capaz de succionar um solvente ou a própria amostra líquida, levando à posterior formação do spray sônico, atuando como uma fonte de EASI sem auxílio de uma bomba de seringa, sendo capaz inclusive de analisar amostras líquidas diretamente. Outro exemplo é a recém desenvolvida fonte de *Spartan*-V-EASI⁽⁴³⁾, que consiste numa fonte de ionização que utiliza uma lata de ar comprimido (*dust cleaners*) como fonte de gás e cateteres cirúrgicos disponíveis em farmácias como conexões, sendo totalmente autônoma e custando o equivalente a US\$ 2,5, tendo sido utilizada para análise de drogas, proteínas, polímeros e agrotóxicos.

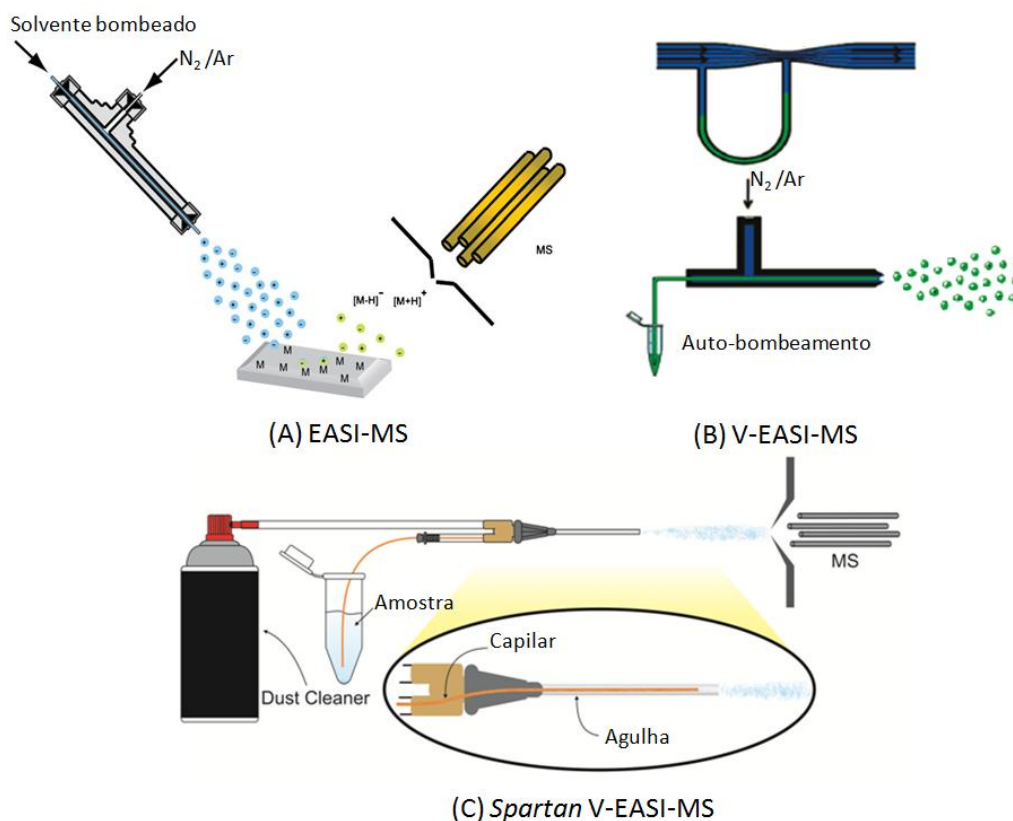


Figura 2. (A) EASI-MS e suas derivações: (B) V-EASI-MS e (C) *Spartan* V-EASI-MS. Simplicidade e aplicabilidade em diversas análises.

Neste trabalho, será apresentada uma alternativa para unir o imediatismo e a simplicidade de EASI-MS aos benefícios de uma etapa de extração rápida, usando a assistência de foto-aquecimento para atingir o conteúdo celular de TAG, usando quantidade mínima de solvente.

Thermally-imprinted EASI-MS (T-EASI-MS) utiliza um aquecedor caseiro para transferir o conteúdo graxo da amostra para a superfície de um papel, que é então analisado por EASI-MS. Desta forma, perfis de TAG de matrizes de carne são fornecidos em poucos segundos. Comparações desta técnica com técnicas atualmente utilizadas (GC-FID e MALDI-MS) também foram realizadas para garantir a autenticidade dos perfis de TAG observados por T-EASI-MS. Além de ser uma análise “verde” (por utilizar pouco ou nenhum solvente), T-EASI pode ser facilmente automatizada, permitindo uma análise rápida para o controle de qualidade em alimentos.

1.2. Objetivos

Dentro do contexto exposto anteriormente sobre a extração e análise de TAG e a possibilidade de desenvolver uma metodologia eficaz e mais rápida para esta análise com o uso da técnica de EASI-MS, o trabalho aqui descrito teve por objetivo geral **propor um método direto de análise de TAG em carnes e tecidos animais, envolvendo pouco ou nenhum solvente, que possa ser realizado em poucos minutos, sem necessidade de extração exaustiva.**

Desta forma, os objetivos específicos foram: (i) testar a viabilidade da técnica EASI-MS para análise direta de TAG em carnes e tecidos; (ii) propor melhorias ou modificações na técnica de EASI-MS ou no preparo de amostra que viabilizassem esta análise; (iii) otimizar as condições propostas para a nova metodologia; (iv) avaliar tecidos de diferentes origens animais quanto ao conteúdo de TAG por T-EASI-MS e (v) confrontar os resultados obtidos com aqueles provenientes de outras técnicas como análise de FAME por GC-FID e análise de TAG por MALDI-MS.

1.3. Procedimento Experimental

1.3.1. Pré-testes:

Inicialmente foram realizados testes utilizando a técnica de EASI-MS diretamente sobre um pedaço de carne, com e sem auxílio de solvente de extração (clorofórmio, metanol e hexano), testando variáveis como vazões do gás e solvente, angulação do spray, entre outras. Porém, o sinal obtido desta forma era insatisfatório, impossibilitando qualquer tipo de análise. Assim foram feitas tentativas de aquecer a carne com o objetivo de liberar o conteúdo gorduroso. Neste sentido, chegou-se a uma condição considerada ótima, que consistia no aquecimento prévio da carne sobre o papel e posterior análise do papel. Essa condição teve então todas as suas variáveis otimizadas (algumas otimizações serão mostradas nos resultados), chegando à metodologia detalhada a seguir para o T-EASI-MS. Todas as amostras foram também analisadas por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID), conforme será descrito no item 1.3.4.

1.3.2. Análise por T-EASI-MS:

Carnes e peixes de diferentes espécies (vaca, porco, frango, carneiro, sardinha, truta e salmão) e gordura bovina foram adquiridas em um supermercado local e mantidas a -20°C até a ocasião da análise. Antes de serem analisadas as amostras foram cortadas manualmente com auxílio de uma faca em pequenos pedaços (aproximadamente $1,0 \times 0,5 \times 0,5 \text{ cm}$). Em seguida a amostra foi colocada sobre uma tira de papel pardo (**Figura 3b**). Então, sobre cada pedaço (imediatamente antes da análise) foram gotejadas, por meio de pipeta Pasteur, três gotas de uma solução 2:1 MeOH/ CHCl_3 (% v/v). Um aquecedor de fabricação própria, contendo uma lâmpada halógena de 150 W, envolta por uma fina chapa de alumínio (**Figura 3a**), foi direcionado para a amostra por um determinado tempo (90 segundos no caso das carnes e 20 segundos no caso da gordura). Nesta etapa, um pirômetro óptico foi utilizado para estimar a temperatura atingida pela amostra. Em seguida, a amostra foi retirada do papel e o mesmo foi analisado por EASI-MS. Os espectros foram adquiridos por 60s, em modo positivo, na faixa de razão massa/carga (m/z) de 400 a 1100, num mono-quadrupolo modelo LC-MS 2010EV (Shimadzu), acoplado a uma fonte de EASI, construída em nosso laboratório (**Figura 3c**), cujos detalhes foram descritos em trabalhos anteriores^(29, 30). As condições da fonte foram as seguintes: gás nebulizante (N_2 , 3 L min^{-1}), ângulo com a superfície de aproximadamente 30° , metanol como solvente a uma vazão de $30 \mu\text{L min}^{-1}$. O software utilizado foi o LCMS solution versão 3.50 SP2 da Shimadzu. Um esquema simplificado para o processo geral é mostrado na **Figura 4**.

1.3.3 Análise Quimiométrica:

Após a obtenção dos espectros, os resultados obtidos para as amostras de carne bovina ($N=3$) e de frango ($N=3$) sofreram tratamento quimiométrico por Análise de Componentes Principais (PCA – *Principal Component Analysis*). Com esse conjunto de dados foi realizada validação interna. Além disso, duas amostras de frango foram utilizadas para validação externa do modelo. Os dados foram tratados utilizando o software Matlab[®] 6.5 (Eigenvector Research Inc.)

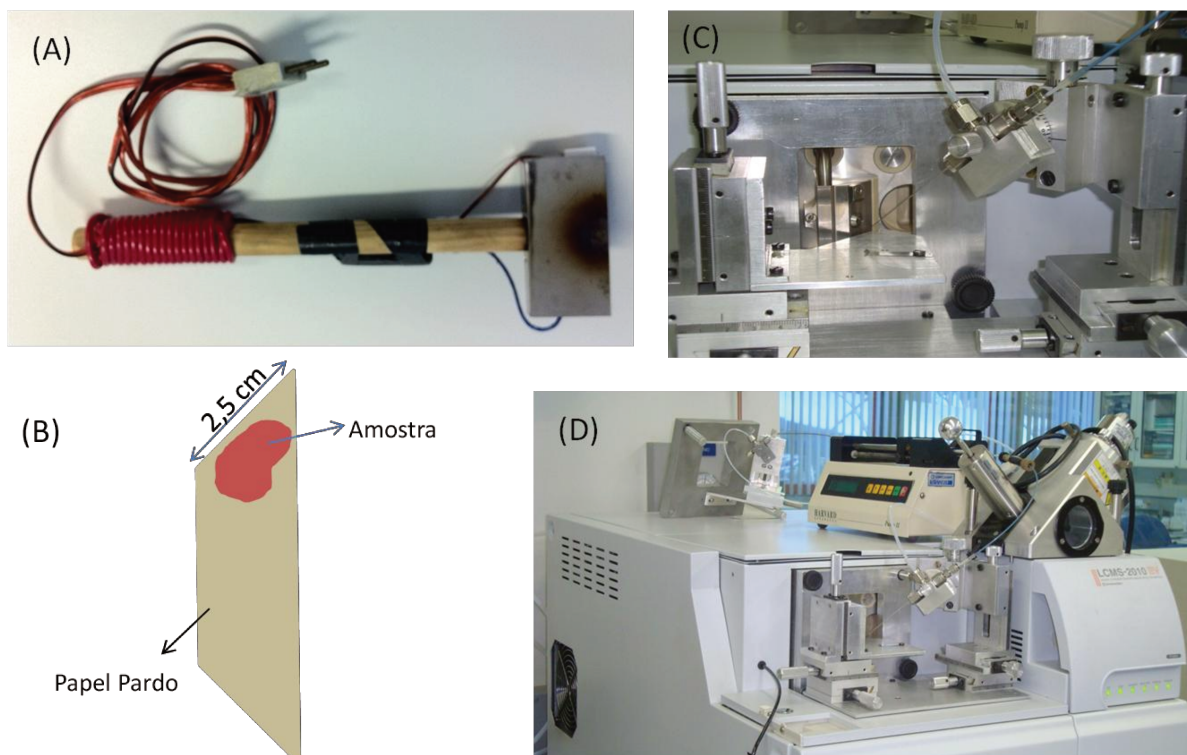


Figura 3. Detalhes da análise por T-EASI-MS. Em (A) o aquecedor montado no laboratório; em (B) o papel pardo e a amostra, que deve ser colocada próxima à borda do papel; em (C) o detalhe da fonte de EASI e em (D) o equipamento monoquadrupolar utilizado, contendo a fonte de EASI em sua entrada.

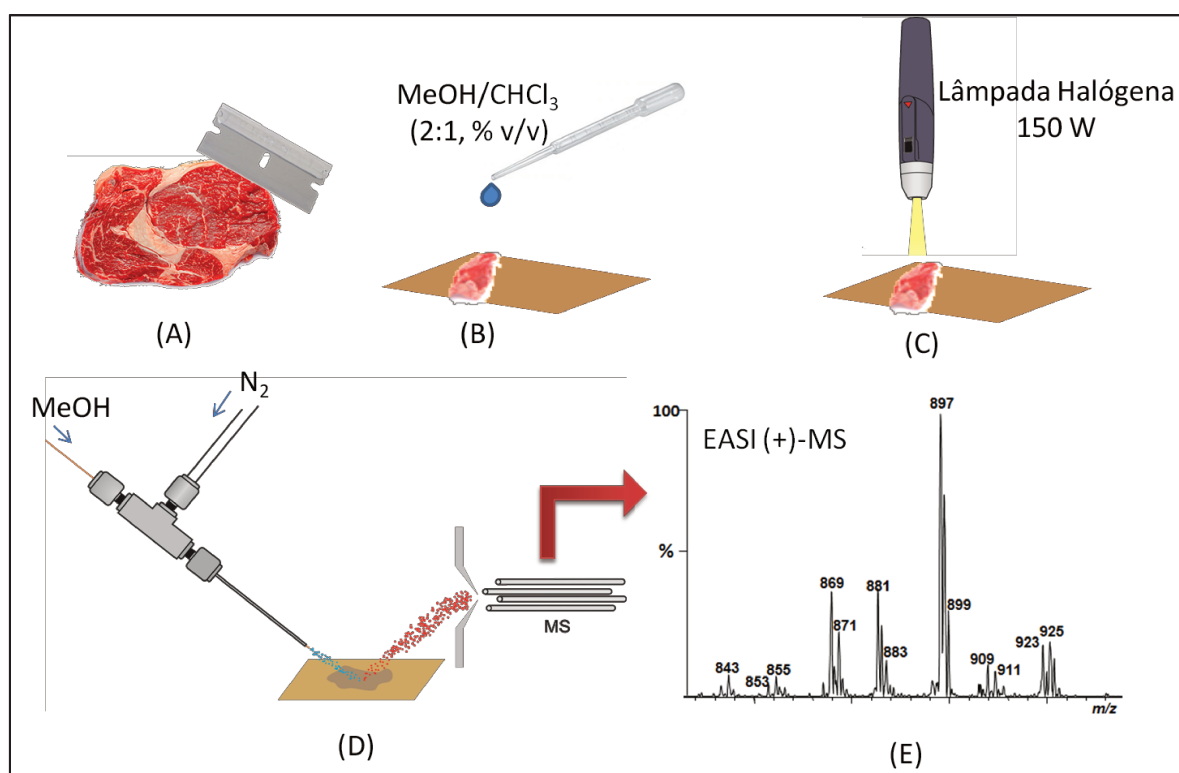


Figura 4. Esquema simplificado para o processo de T-EASI-MS. Em (A) a carne é cortada. Em (B) a solução de extração é gotejada sobre a carne que está sobre o papel pardo. Em (C) a carne é aquecida sobre o papel. Em (D) apenas o papel é analisado por EASI-MS. Em (E) o perfil de TAG é revelado no espectro de massas.

1.3.4. Análise por GC-FID:

Todas as amostras analisadas por T-EASI-MS tiveram também seu conteúdo de ácidos graxos analisados por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID) para comparação dos resultados, em regime de colaboração com a Universidade Estadual de Maringá (UEM). Para esta análise, o conteúdo graxo das amostras foi extraído usando protocolo Bligh & Dyer⁽¹⁰⁾. Para o processo de esterificação, uma massa de 1,0 g dos lipídios extraídos foi submetida à *vortex* com 10,0 mL de n-heptano. Em seguida, 0,5 mL de NaOH (2 mol L^{-1} em MeOH) foram adicionados, sendo o conteúdo então agitado por 20s e centrifugado (10 min, 1800 rpm). A fase superior foi coletada e submetida à análise de GC-FID em cromatógrafo a gás Thermo, modelo trace ultra 3300, equipado com um detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida CP - 7420 (Select FAME) (100m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de cianopropil). A vazão de H_2 (gás de arraste) foi de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, com 30 mL min^{-1} de N_2 (make up); e 35 e 300 mL min^{-1} , para o H_2 e ar sintético, para a chama do detector. O volume injetado foi de aproximadamente $2,0 \mu\text{L}$, utilizando *split* 1:80, sendo as temperaturas do injetor e detector de 220 e 230 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente, enquanto a coluna foi mantida a 165 $^{\circ}\text{C}$ durante 18 min e elevada a 235 $^{\circ}\text{C}$ com taxa de 4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sendo mantida por 14,5 min. As porcentagens foram determinadas através da integração das áreas dos picos pelo Software Chronquest versão 5.0. e expressas como porcentagens de área normalizada dos ácidos graxos.

1.4. Resultados e Discussão

A análise de T-EASI utiliza o calor para fazer com que os TAG presentes na carne/gordura sejam transferidos para a superfície do papel que é então submetido à análise por EASI(+)-MS. Acredita-se que o uso de algumas gotas da solução de MeOH/CHCl_3 (a mesma que se utiliza no processo de Blyer & Dyer)⁽¹⁰⁾, aliado ao processo de aquecimento (que leva a superfície da carne a cerca de 70 $^{\circ}\text{C}$) ajudam a clivar a membrana celular dos tecidos, permitindo a liberação do conteúdo lipídico. A gordura presente na amostra é então derretida e acumulada no papel, gerando material suficiente para a análise posterior por EASI-MS.

Por outro lado, quando se testou o processo apenas comprimindo o papel sobre a carne, sem uso de aquecimento, o sinal obtido foi pouco intenso e os íons esperados não foram observados. É importante salientar que mesmo utilizando aquecimento térmico não foram detectados produtos de oxidação (hidroperóxidos), provavelmente devido à rapidez do processo de aquecimento. Além disso, embora se tenha utilizado um pirômetro óptico por infra-vermelho para se estimar a

temperatura da superfície da amostra, não há necessidade de monitoramento da temperatura, uma vez que essa varia no decorrer do aquecimento ($\pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$), contudo sem afetar a análise.

Desta forma, com o uso de T-EASI-MS o perfil de TAG de tecidos biológicos pôde ser obtido sem a necessidade de hidrólise, em poucos segundos e com preparo mínimo de amostra, o que pode ser considerado uma caracterização instantânea dos constituintes de carnes e gorduras.

No processo de otimização da técnica, conforme já mencionado, foram realizadas análises de EASI-MS diretamente sobre a carne, com e sem a presença da solução de MeOH/ CHCl_3 , conforme mostrado na **Figura 5**. Pode-se observar na **Figura 5A** a ausência de sinais na região entre m/z 850 e 920, característica dos TAG. Já na **Figura 5B**, embora haja íons na região dos TAG, a intensidade é relativamente baixa.

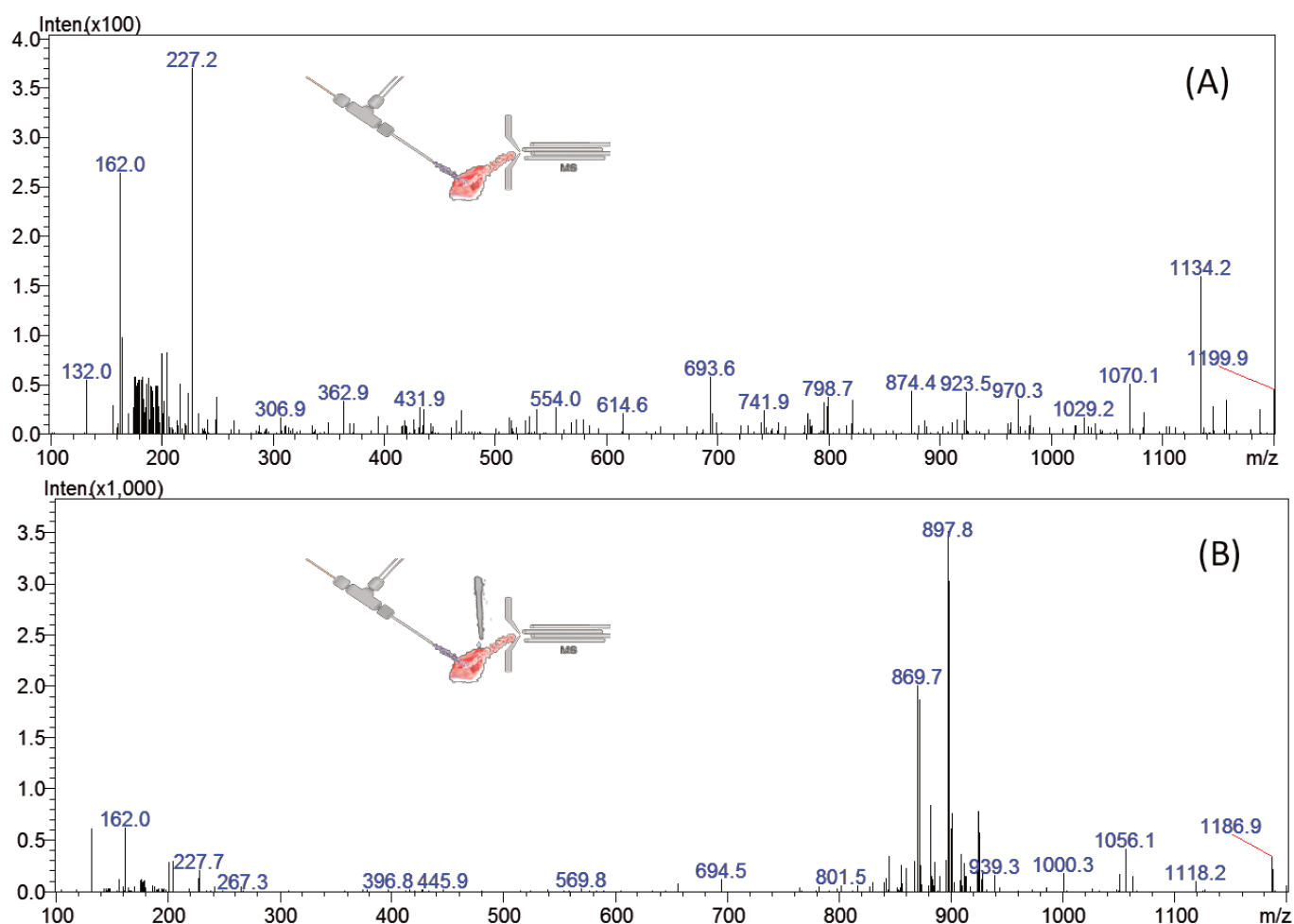


Figura 5. EASI(+)-MS diretamente sobre a carne (A) *in natura* e (B) embebida em solução de MeOH/ CHCl_3 (2:1, %v/v).

Da mesma forma, para determinar o tempo ideal de aquecimento da carne, foram realizadas variações entre 60 e 120 s de aquecimento, conforme a **Figura 6**. Observa-se um grande incremento em intensidade do tempo 60 para 90 s. Entre 90 e 120 s a intensidade de sinal obtida é bastante

semelhante, optando-se assim pelo menor tempo para menor exposição da amostra ao estresse térmico.

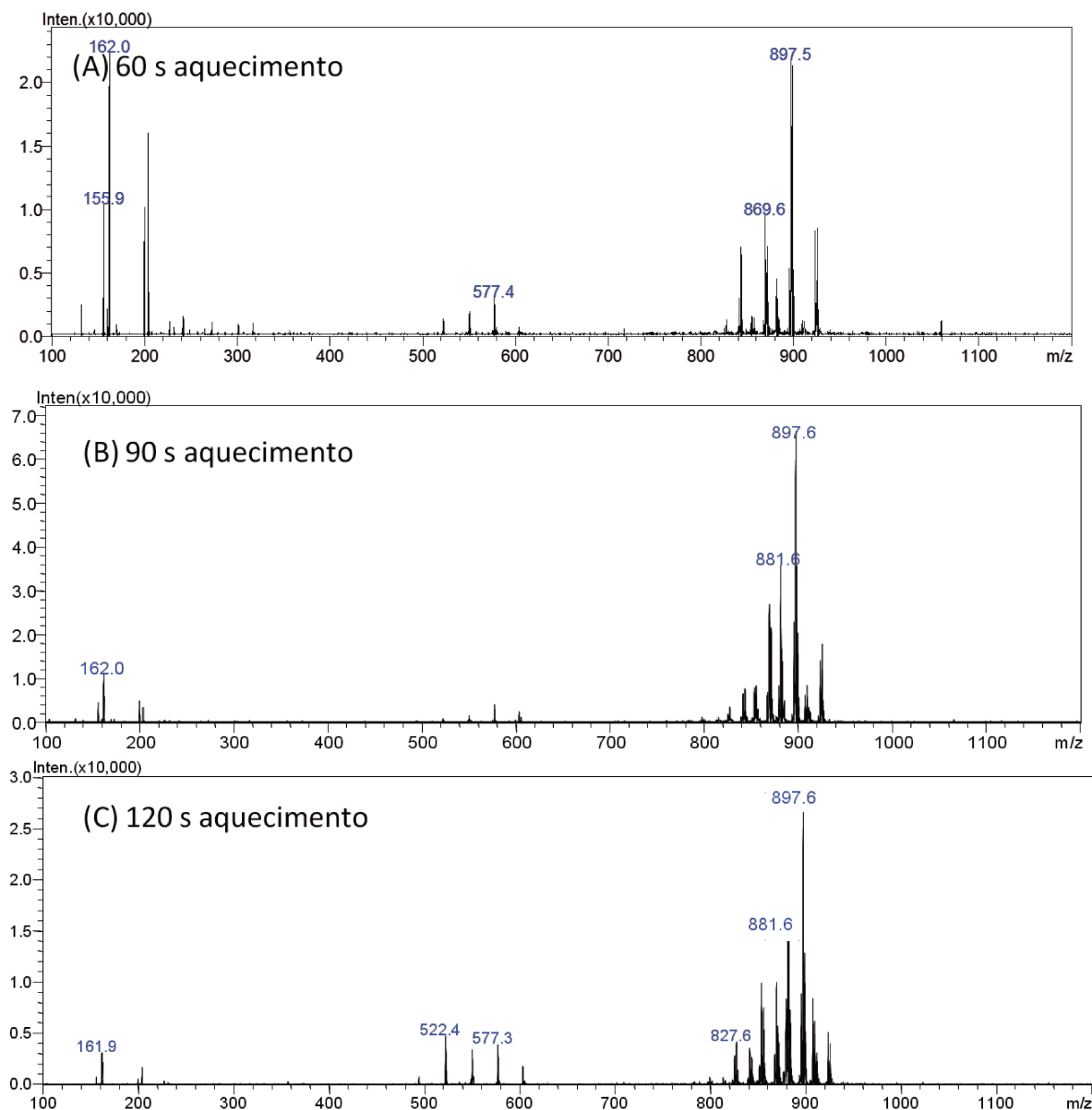


Figura 6. T-EASI(+)-MS: análise do papel sobre o qual a carne foi aquecida por (A) 60 segundos; (B) 90 segundos e (C) 120 segundos, sempre com o gotejamento prévio da solução de MeOH/CHCl₃.

Espectros obtidos quando amostras de gordura bovina foram analisados como descrito no item 1.3.2 foram comparados com dados da literatura para análise do mesmo tipo de amostra por MALDI(+)-MS conforme mostra a **Figura 7**⁽²⁶⁾. O perfil obtido por ambas as técnicas apresenta as mesmas espécies de TAG, lembrando que a análise de T-EASI-MS foi realizada em menos de 3 minutos, sem envolver a extração exaustiva da amostra como é realizado para o MALDI. A principal diferença entre as duas técnicas, quanto aos resultados, se refere à predominância dos adutos de sódio para a técnica de MALDI-MS, enquanto no espectro de T-EASI, aparecem adutos de sódio e

potássio. Essa diferença ocorre pois na técnica de MALDI é possível realizar dopagem da amostra com sódio (por exemplo), enquanto que na análise de T-EASI-MS essa dopagem não é possível, sendo que os adutos serão formados de acordo com a disponibilidade dos sais na própria amostra.

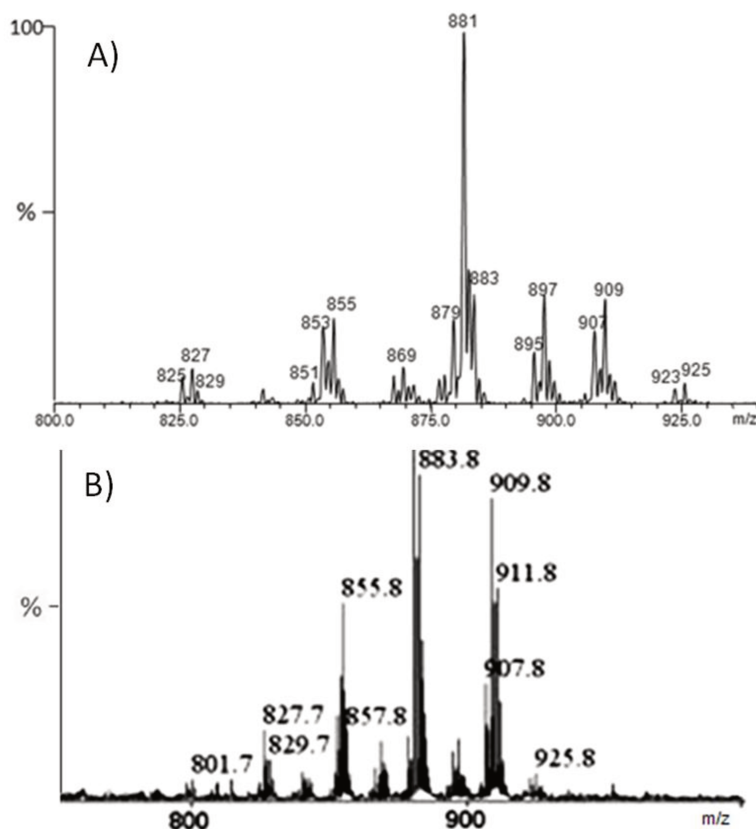


Figura 7. Espectro de massas de gordura bovina utilizando (A) T-EASI(+)-MS e (B) MALDI(+)-MS⁽²⁶⁾

Os espectros obtidos para as demais amostras de carnes são mostrados nas **Figuras 8 e 9**. O perfil obtido mostra que TAG foram detectados principalmente como espécies $[TAG + Na]^+$, exceto para amostras de carne bovina e truta, nas quais $[TAG+K]^+$ foram predominantes. Como mencionado anteriormente, uma vez que não foi realizado nenhum processo de dopagem das amostras com sódio ou potássio, os adutos observados estão provavelmente relacionados à composição das amostras, já que sódio e potássio são elementos necessários ao processo de contração muscular.

A comparação dos espectros de T-EASI-MS com os dados de GC-FID (**Tabela 1**) revelou que a técnica proposta foi capaz de detectar TAG cujos ácidos graxos representam relações superiores a 1% por GC-FID. Da mesma forma, os TAG mais abundantes observados por T-EASI-MS são formados pelos ácidos graxos majoritários revelados na análise de GC, mostrando assim que a técnica preserva a composição original da matriz. A **Tabela 2** resume algumas das possíveis combinações de ácidos graxos para formar TAG, sua atribuição e m/z dos respectivos adutos de sódio e potássio.

Tabela 1. Composição de ácidos graxos das amostras determinada por GC-FID

CN/DB ^a	Ác. Graxo ^b	Composição % (GC-FID)							
		Carne bovina	Gordura bovina	Frango	Porco	Carneiro	Truta	Salmão	Sardinha
14:0	Mirístico	3,5	3,5	-	1,3	3,5	1,5	3,0	6,1
16:0	Palmítico	25,9	26,0	23,9	22,8	24,6	21,0	13,9	12,1
16:1n-7	Palmitoleico	4,2	4,3	5,5	2,1	-	6,4	4,4	4,3
18:0	Esteárico	16,3	16,2	6,8	11,8	31,9	5,5	3,8	1,2
18:1n-9	Oleico	37,4	38,9	43,4	42,0	6,6	35,9	32,6	8,0
18:1n-7	<i>Cis</i> -vaccênico	1,1	-	2,2	2,6	24,0	2,7	3,2	1,4
18:2n-6	Linoleico	2,4	-	14,6	13,3	-	16,8	15,5	1,9
20:1n-9	Gondóico	-	-	-	-	-	2,1	2,4	3,7
20:1n-7	Paulínico	-	-	-	-	-	-	-	15,3
20:4n-6	Araquidônico	-	-	-	-	-	-	0,7	22,2
20:5n-3	Timnodônico (EPA)	-	-	-	-	-	1,2	6,7	8,3
22:6n-3	Cervônico (DHA)	-	-	-	-	-	1,5	4,5	8,3
outros		9,2	11,1	3,6	4,1	9,4	5,4	8,9	7,3

^aCN/DB: n^o. de carbonos/n^o. de duplas. ^bNomenclatura usual

Os perfis obtidos por T-EASI-MS para carne bovina, frango e porco são bem diferentes e dominados pelo ácido palmítico (P) e oleico (O). A **Figura 8A** mostra o perfil de TAG para carne bovina, que tem o íon mais abundante com m/z 897, correspondente ao TAG [POO+K]⁺. Exceto pela maior abundância de adutos de sódio, o perfil da gordura bovina (**Figura 8B**) é praticamente o mesmo observado para a carne, tendo o íon mais intenso com m/z 881, correspondente ao [POO+Na]⁺. Frango e porco apresentaram maiores quantidades de ácido linoleico (L) do que as amostras de carne e o perfil de [TAG+Na]⁺ para essas duas espécies são similares (**Figuras 8C e D**). Contudo a razão entre os íons de m/z 879/881 (POL/POO) são diferentes. A carne de carneiro (**Figura 8E**) é rica em ácido esteárico (S) e palmítico (cerca de 32% e 25%, respectivamente, **Tabela 1**), o que ficou evidente em seu perfil de TAG, no qual os [TAG+Na]⁺ mais abundantes são os de m/z 881 (POO) e 883 (PSO).

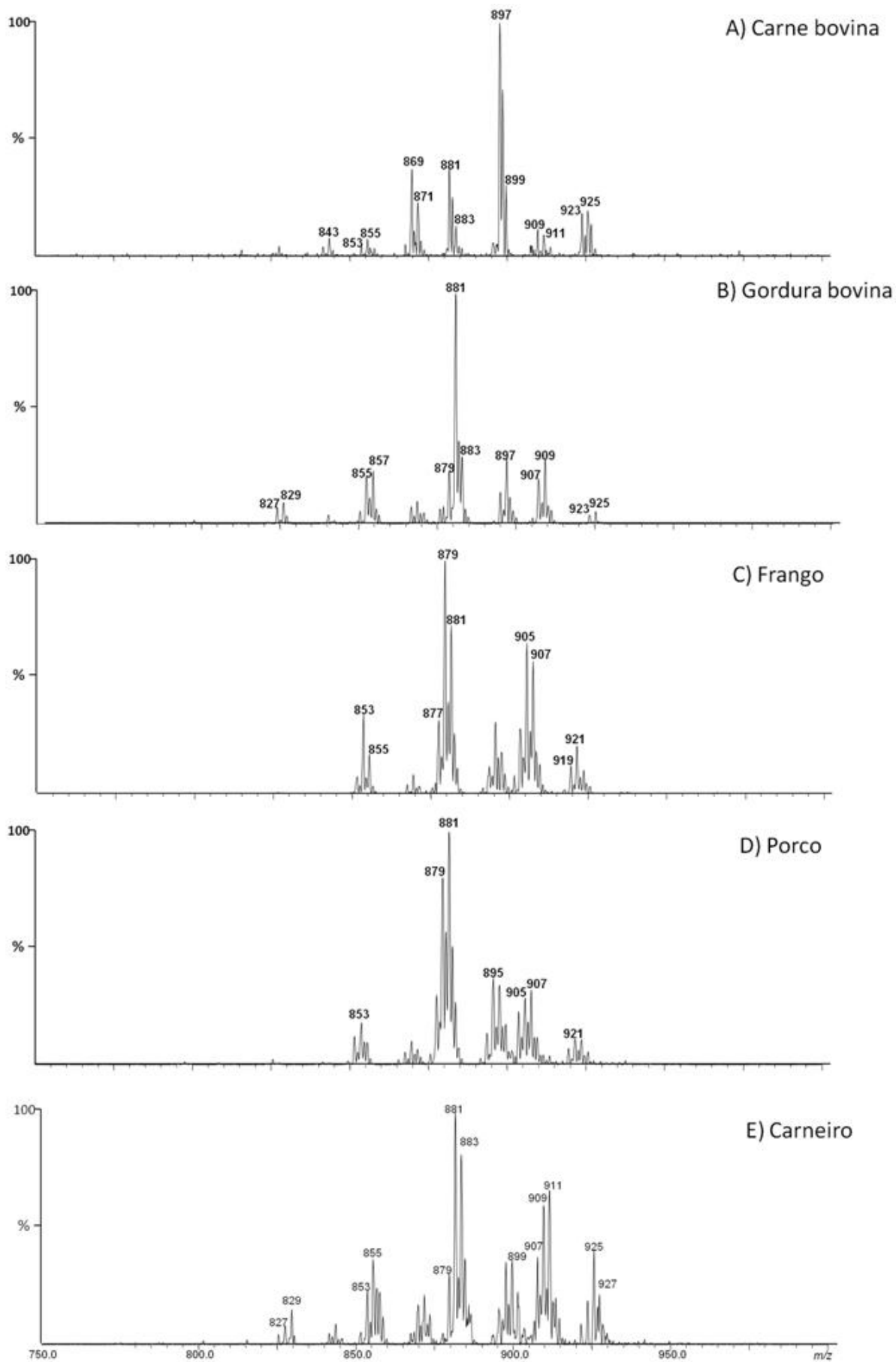


Figura 8. Espectros de T-EASI(+)-MS para amostras de diferentes carnes.

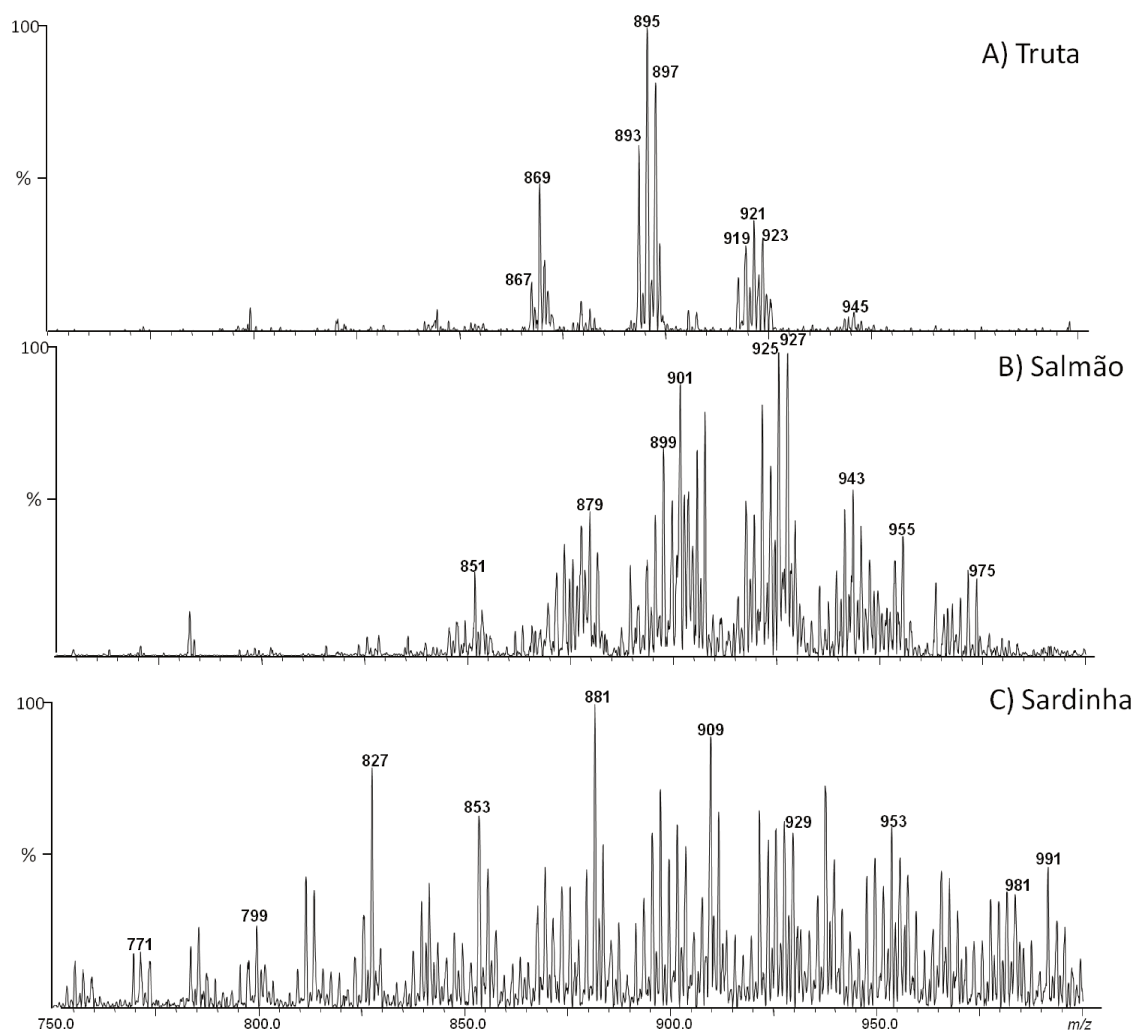


Figura 9. Espectros de T-EASI(+)-MS para amostras de diferentes peixes.

As amostras de peixe são mostradas na **Figura 9** e, como esperado, apresentaram perfil de TAG bem distinto das demais amostras, com a presença de combinações contendo ácido araquidônico (AA), timnodônico (EPA) e cervônico (DHA). Entre as amostras de peixe, a truta (**Figura 9A**) apresenta um perfil de $[\text{TAG}+\text{K}]^+$ bastante similar à carne, exceto pela presença dos $[\text{TAG}+\text{K}]^+$ de m/z 895 (POL) e 893 (PLL), que confirmam as altas quantidades de ácido linoleico. Salmão (**Figura 9B**) é rico em EPA e DHA e mostra $[\text{TAG}+\text{Na}]^+$ de m/z 925 (OLEPA) e 927 (SODHA), além dos íons de m/z 901 e 899 que correspondem à TAG contendo ácido linoleico. A sardinha (**Figura 9C**) além de EPA e DHA contém grandes quantidades de AA e ácido paulínico (Pa) (22% e 15%, respectivamente, **Tabela 1**), apresentando $[\text{TAG}+\text{Na}]^+$ de m/z 909 (OLAA) e 881 (MOPa), mostrando um perfil bastante distinto das demais espécies. As diferenças observadas entre as amostras de peixes, principalmente quanto à presença de EPA, DHA e AA, refletem diretamente a alimentação das espécies estudadas, uma vez que era esperado que peixes de águas mais profundas e nativos (como é o caso da sardinha) apresentassem uma composição mais rica em

ácidos graxos e com maior quantidade de EPA e DHA quando comparados à peixes de cativeiro (como o salmão e a truta). Um estudo abrangente poderia ser realizado com peixes de uma mesma espécie, onde apenas a dieta fosse variada. Contudo os dados aqui apresentados demonstram a viabilidade da técnica de T-EASI-MS para avaliar alterações nutricionais em carnes relacionadas à exposição dos animais a diferentes dietas.

Tabela 2. Atribuição de TAG detectados por T-EASI(+)-MS e razão m/z de seus adutos de sódio e potássio.

TAG ^a	CN/DB ^b	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺
MMPo	44:1	771	787
MPPo ou MMO	46:1	799	815
PPoPo	48:2	825	841
PPPo ou MPO	48:1	827	843
MPS	48:0	829	845
PPoL ou PoPoO ou MOL	50:3	851	867
MOO ou PPL	50:2	853	869
PPO	50:1	855	871
PPS	50:0	857	873
PLL	52:4	877	893
POL	52:3	879	895
POO ou MOPa	52:2	881	897
PSO	52:1	883	899
PSS	52:0	885	901
PLEPA ou PPODHA ou LLLn ou OLnLn	54:7	899	915
LLL ou OLLn	54:6	901	917
OLL	54:5	903	919
OOL ou SLL	54:4	905	921
OOO	54:3	907	923
SOO ou OLAA ou PoPaEPA ou PODHA	54:2	909	925
SSO	54:1	911	927
OLEPA	56:8	925	941
SLEPA ou PODHA ou MPaDHA	56:7	927	943
SOEPA ou PSDHA ou OOAA	56:6	929	945
LnEPAEPA	58:12	943	959
OAAAA	58:9	951	967
OODHA ou SLDHA ou PoPaDHA	58:8	953	969
SODHA	58:7	955	971
LAADHA ou AAAAAA	60:12	973	989
SEPADHA	60:11	975	991
PaAAAA	60:9	979	995
OPaDHA	60:8	981	997
PaPaPa	60:3	991	1007

^aAbreviações dos Ác. Graxos: M, ácido mirístico; Po, ácido palmitoleico; P, ácido palmitico; Ln, ácido linolenico; L, ácido linoleico; O, ácido oleico; S, ácido estearico; Pa, ácido paulínico; AA, ácido araquidônico, EPA, ácido timnodônico; DHA, ácido cervônico. ^bCN/DB: n° de carbonos/n° de duplas da mistura de três ácidos graxos.

Os dados gerados por esse trabalho foram tratados através de análise de componentes principais (PCA) para amostras de carne e frango. Pode-se observar a separação na primeira componente (PC1) com 44,65 % de variância acumulada, e 20,60 % na componente PC2. Dessa forma, esses resultados explicam 65,25 % dos dados, mostrando a adequação do modelo proposto às amostras estudadas, conforme mostra a **Figura 10**. Ao realizar validação externa, ou seja, colocar amostras de frango para testar o modelo, pode-se averiguar a capacidade da técnica para avaliar a robustez do método frente às variações da análise, podendo assim caracterizar as amostras testes como sendo de frango.

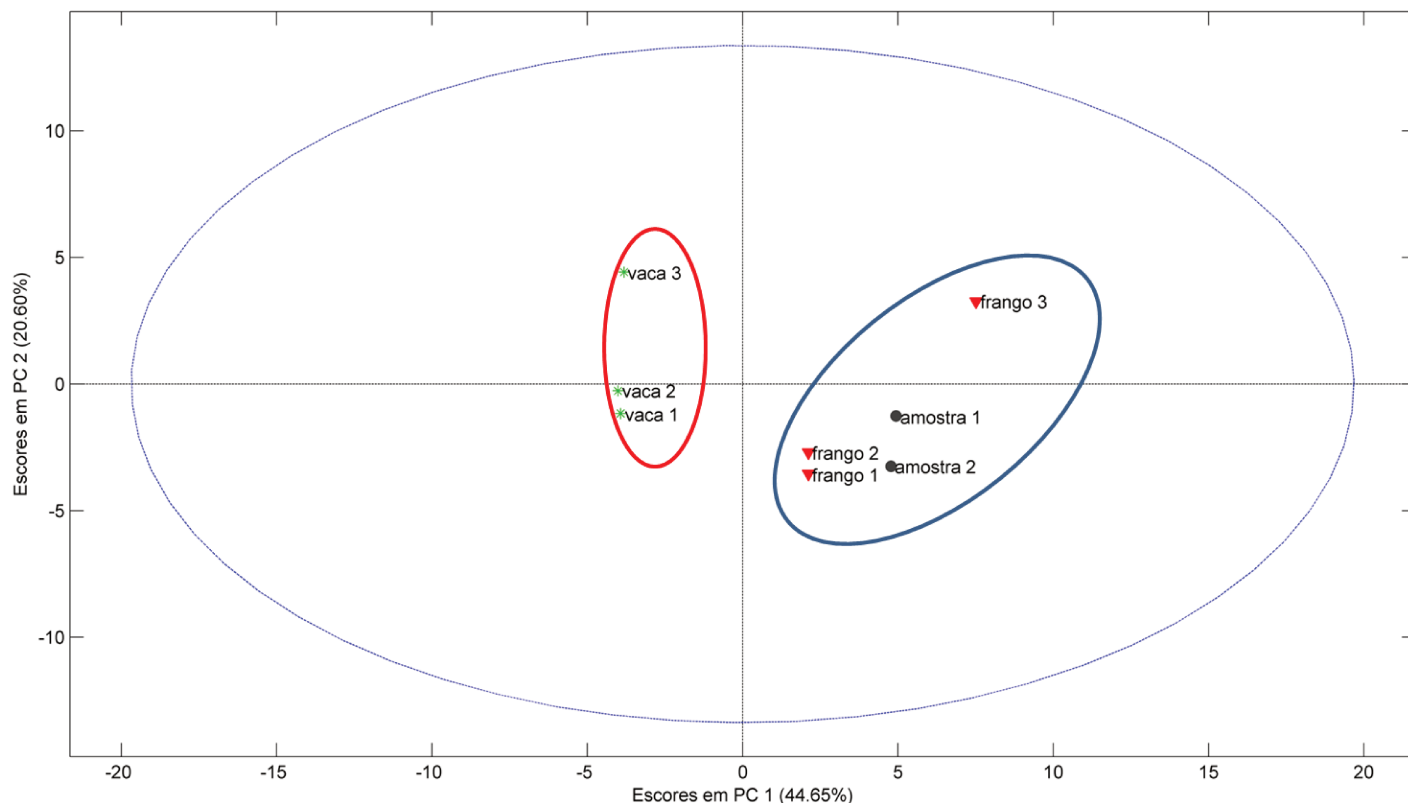


Figura 10. PCA para carnes de vaca (N=3) e frango (N=3) com dados obtidos por T-EASI(+)-MS.

1.5. Conclusões

Uma técnica simples e rápida para análise de perfil de TAG em tecidos musculares e gorduras animais foi proposta neste trabalho, por meio do desenvolvimento da técnica de T-EASI-MS. O perfil de TAG pôde ser obtido sem o uso de extração exaustiva, hidrólise ou derivação dos ácidos graxos. O processo inteiro dura poucos segundos, envolve mínimo preparo de amostra e utiliza pouco ou nenhum solvente, o que é muito vantajoso se comparado aos métodos tradicionais, podendo assim ser considerada uma técnica “verde” e praticamente instantânea, dada a agilidade do processo. Os dados obtidos por T-EASI-MS para amostras de carne e gordura bovina e carnes de frango, porco, carneiro e peixes (truta, salmão e sardinha) mostraram excelente conformidade com a análise de FAMEs realizada para as mesmas amostras por GC-FID. Além disso, dados da literatura para análise de gordura bovina por MALDI-MS (técnica de ionização tradicional para lipídios) também mostraram excelente conformidade com os resultados obtidos por T-EASI-MS, que envolve instrumentação mais simples e menor preparo de amostra.

Logicamente, a técnica aqui proposta não é capaz de extrair a quantidade máxima de informações de um perfil de TAG, como por exemplo a identificação de isômeros posicionais e regioisômeros. Tais informações, para serem acessadas, necessitariam o emprego de várias técnicas em conjunto, o que tornaria a análise mais demorada e complexa, como descrito na literatura⁽²³⁾. No entanto, a técnica de T-EASI-MS pode ser uma ferramenta útil e rápida para análises de rotina e de controle de qualidade, por exemplo. A técnica de T-EASI, pode ainda ser acoplado a analisadores de massas de maior resolução, ou analisadores que permitam mais de um estágio de análise (MS/MS), o que traria mais informações estruturais.

Embora os espectros obtidos para carne bovina e de frango já pudessem ser visualmente diferenciados, a capacidade de diferenciação entre essas duas matrizes foi ilustrada através da análise quimiométrica, que se mostrou eficiente na caracterização das amostras teste. Além disso, na análise de peixes, a técnica evidenciou diferenças na composição de ácidos graxos (EPA, DHA e AA) que puderam ser diretamente relacionadas ao tipo de alimentação a que essas espécies são expostas.

Projetos futuros poderiam utilizar essa técnica para avaliar alterações nutricionais decorrentes da alimentação dos animais de uma mesma espécie submetidos a diferentes dietas. Além disso, estudos de quantificação poderiam ser realizados, por meio de construção de curvas analíticas para cada TAG separadamente, podendo assim ampliar as informações possíveis de serem acessadas por esta técnica. Outra proposta seria estudar se o conteúdo de TAG é diferente em amostra de um mesmo tecido, porém com morfologias distintas.

II – CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE CORTISOL EM PLASMA E LEITE BOVINOS PARA ESTUDO DE BEM-ESTAR ANIMAL.

2.1. Introdução

2.1.1 – O Bem-Estar Animal na Indústria Pecuária e a Necessidade de Monitoramento do Cortisol

A crescente demanda mundial por alimentos exige manejo intensivo e nutrição que estimulem o desenvolvimento precoce, engorda e produção de animais. Em contrapartida, as condições a que esses animais são submetidos para alcançar este aumento de produção induzem ao sofrimento animal, principalmente por restrição de espaço e ambiente pouco natural. Práticas como a ordenha mecanizada, confinamentos, afastamento da cria, inseminações artificiais, técnicas de abate e outros procedimentos invasivos geram não só desvios comportamentais, mas doenças e sofrimentos durante o desenvolvimento e abate dos animais. Conjuguar interesses econômicos e condições mínimas de bem-estar animal é um desafio da ciência, de órgãos públicos e de organizações de defesa aos animais. Felizmente, o bem-estar animal vem sendo considerado uma necessidade bastante relevante e depende do desenvolvimento de ferramentas analíticas que auxiliem a gerar progressos.

Embora o bem-estar animal seja um conceito bastante subjetivo, já que está ligado à adaptação psicológica do animal ao meio^(44,45), tem se tentado mensurá-lo através de sinais psicofisiológicos e fisiopatológicos relacionados às emoções, estresse e adaptação⁽⁴⁶⁾. O estresse foi caracterizado como sendo a resposta do organismo a qualquer demanda ameaçadora, com reações do sistema imuno-endócrino e expressões comportamentais características⁽⁴⁷⁾. Embora o estresse seja um mecanismo normal do organismo (recorrente em condições de acasalamento, caça, entre outras), ele está relacionado ao desenvolvimento de doenças e a alterações hormonais capazes de modificar maleficamente o funcionamento do organismo^(48,49).

Além da abordagem comportamental, uma forma bastante objetiva e quantitativa para monitorar o estresse animal é a determinação da concentração de cortisol em fluidos biológicos como saliva, urina e sangue. O cortisol (**Figura 11**) é um corticosteróide secretado pelo córtex adrenal, após a estimulação pelo CRH (hormônio liberador de corticotrofina) e ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). Este esteróide exerce um papel importante em processos fisiológicos essenciais como o metabolismo energético, manutenção da pressão arterial, proliferação e diferenciação de células, inibição do sistema imune e resposta ao estresse (ativação do mecanismo de luta ou fuga)^(50,51,52). Situações consideradas estressantes, como a ordenha mecanizada ou a

presença de doenças como as mastites (inflamação de glândula mamária causada por infecção bacteriana⁽⁵³⁾), alteram a concentração de cortisol no plasma sanguíneo e em outros fluidos corpóreos (urina e leite)^(54,55). A maior parte deste hormônio encontra-se no organismo ligado à proteína CBG (globulina ligante do cortisol) e à albumina. Apenas cerca de 3-5% do cortisol circula em sua forma livre, que também é a forma bioativa. A excreção deste hormônio na urina se dá na forma de sulfatos e glucoronatos. Nos fluidos corpóreos os níveis de cortisol se caracterizam num ritmo circadiano, com um pico pela manhã, que diminui no decorrer do dia e atinge sua concentração mais baixa próxima à meia noite, voltando a aumentar após as primeiras horas de sono⁽⁵²⁾.

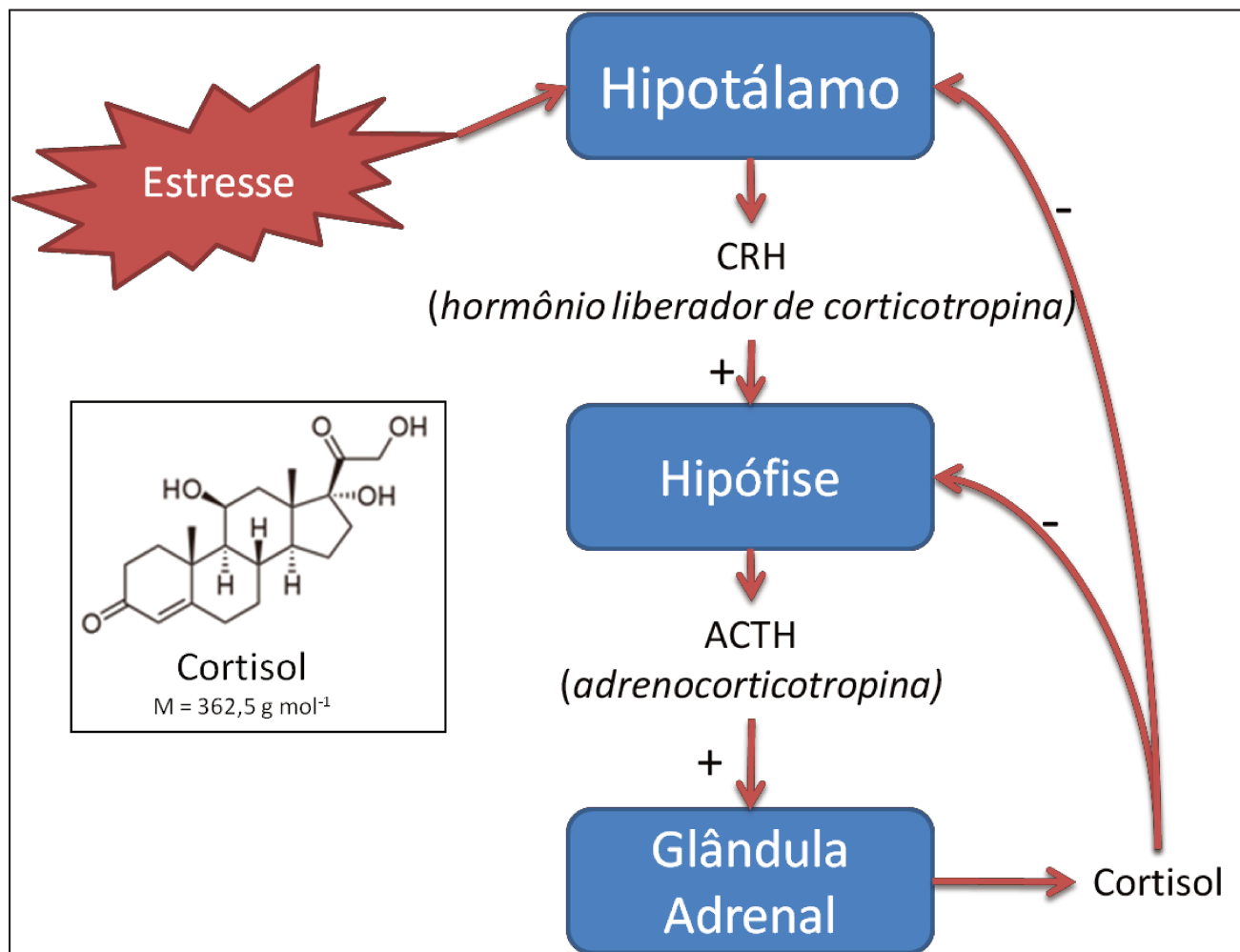


Figura 11. Estrutura do cortisol e sua produção no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) em resposta ao estresse

2.1.2 – Técnicas para Determinação de Esteróides

A concentração de cortisol em plasma sanguíneo e outros fluidos, assim como a concentração de vários esteróides, é vastamente estudada em humanos para diversos fins, sendo determinada principalmente através de kits de dosagens imunoenzimáticas do tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay* – ensaio por enzimas imuno-adsorvidas) ou RIA (*radio immuno assays* -

radioimunoensaios)⁽⁵⁶⁾. Ambas são técnicas imunoanalíticas, ou seja, baseadas em interações entre antígeno e anticorpo, e por esse motivo, possuem alta seletividade e especificidade (**Figura 12**). Contudo, anticorpos são proteínas (moléculas de alta massa molar) e necessitam que os antígenos possuam uma complexidade química que os diferencie das demais substâncias presentes, bem como uma massa molar mínima de 1 kDa⁽⁵⁷⁾.

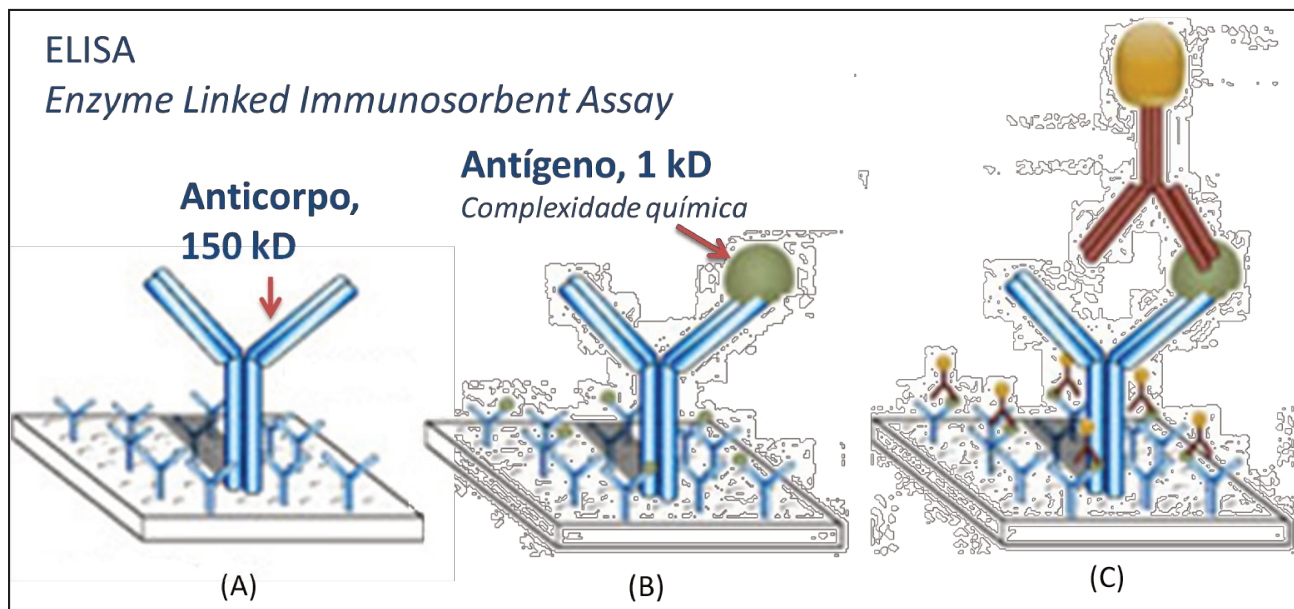


Figura 12. Esquema simplificado para ELISA. Em (A) a placa contendo o anticorpo. Em (B) o reconhecimento do antígeno pelo anticorpo. Em (C) a reação com outro anticorpo contendo uma enzima que se ligará a um substrato capaz de emitir um sinal mensurável.

Embora já existam ferramentas para diminuir essas limitações, no caso dos hormônios esteróides há baixa complexidade química, ou seja, muitos esteróides possuem estruturas extremamente semelhantes basicamente formadas por um núcleo ciclopentano-peridrofenantreno. Além disso, esteróides são moléculas relativamente pequenas (~300 Da). Essas características fazem com que a análise de esteróides por tais técnicas sejam influenciadas por altos índices de reações cruzadas⁽⁵⁸⁾, que podem levar a superestimar o nível de esteróides em mais de 60%^(59,60,61). Contribuem para esta inespecificidade os efeitos de extrações ineficientes de amostras biológicas, além do efeito de matriz^(56,62).

As dosagens imunoenzimáticas do tipo ELISA e RIA para esteróides em humanos, embora sejam amplamente empregadas, possuem significativa fragilidade analítica, principalmente em concentrações de normal à baixa devido à padronização e otimização inadequadas dos métodos frente à vasta faixa de concentração encontrada na prática⁽⁶³⁾. Além disso, os métodos disponíveis comercialmente são diferentes entre si quanto à tolerância de interferentes e valores de referência, tornando impraticável a comparação de resultados entre métodos de fabricantes diferentes⁽⁶⁴⁾. A falta de padronização nos ensaios imunoenzimáticos é considerada uma deficiência significativa em

estudos epidemiológicos. A utilização de métodos com eficiências distintas contribui para a grande variabilidade entre trabalhos e consequentemente para interpretações científicas pouco consistentes. Além disso, somam-se os fatores de risco operacional e ambiental no caso dos radioimunoensaios.

No caso da medicina veterinária, o problema se agrava devido à inexistência de kits de dosagens específicos e consequente adaptação de kits indicados para fluidos biológicos humanos, geralmente sem nenhuma validação. Há trabalhos publicados em literatura, por exemplo, que fazem a determinação de cortisol em leite de vaca através da utilização de kits de imunoensaios destinados à saliva de cavalos, desconsiderando completamente os efeitos da matriz e de reações cruzadas⁽⁶⁵⁾.

Embora as técnicas imunoanalíticas tenham muitas limitações para a análise de esteróides, conforme citado anteriormente, o uso de metodologias empregando cromatografia líquida ou gasosa acopladas à espectrometria de massas, por muito tempo, enfrentou a barreira da complexidade analítica e monetária, uma vez que tais técnicas requerem equipamentos considerados caros, além de pessoas qualificadas e preparo diferenciado de amostras. Contudo esta barreira vem sendo cada vez mais suplantada pela comprovação de que o uso dessas técnicas pode assegurar a confiabilidade analítica desejada (no quesito seletividade, detectabilidade e reprodutibilidade), além de permitir a análise inequívoca de múltiplos analitos ao mesmo tempo, o que não é possível através das técnicas imunoanalíticas.

A técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foi capaz de melhorar significativamente a especificidade das análises laboratoriais de esteróides, uma vez que a alta resolução na separação dos picos aliada à caracterização por MS podem aumentar a especificidade da detecção⁽⁶⁶⁾. Esta ainda é a técnica de escolha para análise de perfil de metabólitos de esteróides e análise estrutural. Sua capacidade de resolução é inigualável, necessitando, contudo de corridas mais longas, além de procedimentos de derivação para garantir a volatilidade das moléculas, implicando muitas vezes em maior manipulação das amostras. Desta forma, esta técnica é preterida em relação à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas seqüencial (LC-MS/MS) em laboratórios de análises clínicas^(66,67).

A técnica de LC-MS/MS, por sua vez, é capaz de promover alta detectabilidade analítica, seletividade e a habilidade de determinar vários analitos simultaneamente, numa ampla faixa dinâmica, necessitando de menor preparo de amostra ao comparar-se com GC-MS⁽⁶⁶⁾. Esta é hoje a técnica de escolha na determinação de múltiplos esteróides e encontra seu maior desafio, atualmente, em procedimentos de automação de preparo de amostra, visando aumentar cada vez mais o rendimento das análises, além de possibilitar a menor manipulação da amostra e menor introdução de erros no processo. O advento de novos espectrômetros de massas e novas fontes de ionização tem permitido atingir níveis de quantificação extremamente baixos, possibilitando assim a

simplificação do preparo da amostra, que pode muitas vezes consistir apenas de uma diluição em fase móvel^(67,68).

2.1.3 – LC-MS/MS: A Técnica de Escolha para Quantificação de Esteróides

O acoplamento do espectrômetro de massas à cromatografia líquida traz a vantagem de diminuir o efeito de interferentes e da própria matriz do analito sobre a ionização do mesmo, devido à separação cromatográfica. Esta separação, no caso de esteróides, geralmente emprega a cromatografia em fase reversa, sendo amplamente utilizadas colunas de fase C8⁽⁶⁹⁾, C18⁽⁷⁰⁾ e fenil⁽⁷¹⁾. Análises mais rápidas, sensíveis e de maior resolução podem ser alcançadas com o uso da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography*)^(72,73), que tem se tornado cada vez mais comum.

Um espectrômetro de massas consiste, basicamente, em uma fonte de ionização, um ou mais analisadores de razão m/z e um detector. Métodos baseados em LC-MS/MS podem utilizar diferentes fontes de ionização, que geram respostas diferentes para cada hormônio⁽⁷⁴⁾. As fontes de ionização são empregadas de acordo com a massa molar e polaridade das moléculas, podendo ser utilizada a ionização por *electrospray* (ESI – *electrospray ionization*)⁽⁷⁵⁾, ionização química a pressão atmosférica (APCI - *atmospheric pressure chemical ionization*)⁽⁷⁶⁾ e fotoionização a pressão atmosférica (APPI – *atmospheric pressure photoionization*)⁽⁷⁷⁾.

Na ionização por ESI há transferência de íons formados em solução para a fase gasosa através da ejeção dos íons da gota. Esta técnica é muito eficiente para analitos mais polares e é a mais popular, além de permitir a análise de moléculas de massas molar mais elevada, como é o caso dos esteróides em sua forma sulfatada ou glucoronada^(66,67). Na técnica de APCI o eluente é evaporado através de aquecimento, sendo que uma descarga corona promove uma série de reações com os gases da fonte e solvente, que levam o analito à ionização em fase gasosa. A grande vantagem desta técnica é a redução de efeitos de matriz e supressão iônica, uma vez que a ionização ocorre em fase gasosa. A técnica de APPI também promove ionização em fase gasosa, de maneira similar à APCI, contudo no lugar da descarga corona utiliza-se a radiação proveniente de uma lâmpada (fotoionização) para ionizar o analito ou uma substância dopante (que levará o analito à ionização). Esta técnica tem excelente rendimento para moléculas de baixa polaridade (como é o caso dos esteróides), além de ter os benefícios de menor supressão iônica e efeito de matriz pela ionização em fase gasosa⁽⁷⁸⁾.

Técnicas de LC-MS/MS baseiam-se em dois estágios de análise de massas, o que caracteriza a espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Dessa forma há duas seleções da razão m/z , uma para o precursor e outra para o fragmento. Um espectrômetro de massas para um sistema LC-

MS/MS pode ser constituído de um triplo quadrupolo, onde o primeiro e o terceiro quadrupolos (Q1 e Q3) funcionam como seletores de m/z (ou filtros de massa) e o segundo quadrupolo (Q2) funciona como câmara de colisão (**Figura 13**). Assim, íons precursores podem ser isolados em Q1, fragmentados em Q2 e terem seus fragmentos identificados e quantificados em Q3. Diz-se assim que se monitorou uma transição de m/z . Este modo de monitoramento é chamado de MRM (*multiple reaction monitoring*) e permite a redução significativa do ruído de base da análise (*background*) resolvendo definitivamente o problema na quantificação de isômeros que co-eluem, desde que possuam fragmentos com diferentes razões de m/z . Em estudos de quantificação, utiliza-se uma transição de m/z para quantificar o analito e outra para confirmar sua identidade, o que aumenta ainda mais a seletividade do método.

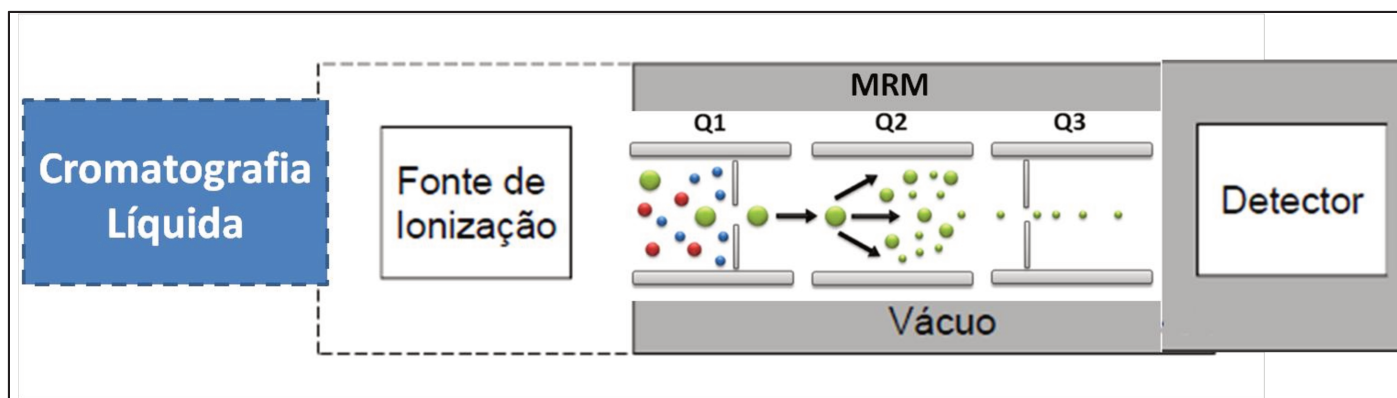


Figura 13. Sistema LC-MS/MS empregando um triplo quadrupolo.

A técnica baseada em LC-MS/MS é considerada assim uma técnica auto-confirmativa, já que um analito com tempo de retenção característico de seu padrão pode ser identificado através de sua relação m/z , e da fragmentação específica que pode ser monitorada através do modo MRM, para uma ou mais transições de m/z . Sendo assim, esta técnica mostra-se potencialmente vantajosa para o estudo de substâncias como esteróides, que podem ser confundidos em técnicas imunoenzimáticas por serem susceptíveis à inúmeras reações cruzadas, inclusive com a própria matriz.

Por essas razões, há crescente interesse e demanda de desenvolvimento de ensaios baseados em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) para quantificação de hormônios esteróides, como o cortisol, em amostras biológicas.

2.2 – Objetivos

Tendo em vista a grande demanda veterinária por ensaios com confiabilidade analítica aliada à necessidade de estudos relacionados ao bem-estar animal, este trabalho tem por **objetivo geral o desenvolvimento de métodos LC-MS/MS para quantificação de cortisol em fluídos bovinos**. Este trabalho foi realizado em parceria com a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da

USP (Pirassunga, SP), que trouxe então dois estudos de caso onde a dosagem de cortisol é utilizada como ferramenta de avaliação de condições de estresse.

O primeiro estudo de caso tem por objetivo responder se há correlação entre a concentração de cortisol em plasma e leite bovinos. Essa pergunta pode permitir que estudos futuros utilizem o leite (coleta menos invasiva) ao invés do plasma para determinação de cortisol. Outra questão a ser respondida é se o ato da ordenha aumenta o teor de cortisol no plasma e no leite.

O segundo estudo de caso visa responder se há diferença no teor de cortisol do leite em vacas diagnosticadas positiva ou negativamente para a mastite sub-clínica. Como já mencionado, a mastite é uma inflamação de glândula mamária causada por infecção bacteriana⁽⁵³⁾. Seu estágio sub-clínico, em vacas, é caracterizado pela ausência de sinais clínicos, ou seja, o animal não aparenta estar doente. Contudo, uma contagem das células somáticas (CCS) no leite estabelece o diagnóstico, deixando para o veterinário a decisão do tratamento do animal. No caso, se $CCS > 2.10^5$ células mL^{-1} o diagnóstico é positivo. Se $CCS < 2.10^5$ células mL^{-1} , o diagnóstico é negativo.

Dessa forma, este trabalho tem por objetivos específicos desenvolver e validar métodos para quantificação de cortisol em plasma e leite bovinos, permitindo assim a quantificação das amostras provenientes dos estudos de casos citados acima. Deseja-se também comparar resultados de cortisol em leite obtidos por ELISA com aqueles obtidos por LC-MS/MS, buscando estudar se há correlação entre os métodos.

2.3. Procedimento Experimental

2.3.1 - Coleta de Amostras

As amostras de plasma e leite bovino foram disponibilizadas em sistema de colaboração interdisciplinar pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Campus de Pirassununga – SP, por meio do Prof. Dr. Marco Aurélio F. Porcionato. Essas amostras são provenientes de animais de mesma raça e critérios de manejo. As amostras estão divididas em dois experimentos:

a) *Experimento I*

Estudo de correlação entre a concentração de cortisol em plasma e leite e estudo do efeito da ordenha em relação à concentração de cortisol.

- i) **Animais:** Foram selecionadas seis vacas Gyr com diagnóstico negativo para mastite sub-clínica ($CCS < 2.10^5$ células. mL^{-1}) , ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia. As vacas eram alimentadas após a ordenha em pasto de *Brachiaria brizanta*, tendo livre acesso a água e suplementação alimentar com ração misturada (grão e silagem de milho). A ordenha foi realizada pelas pessoas de costume, no sistema

de ordenha com bezerro ao pé. Na **Tabela 3** estão descritas outras características dos animais.

Tabela 3. Animais utilizados para o experimento I e suas características.

Animal	Nº. de lactações	Meses de Lactação	Meses de Gestação
1	4	6	4
2	3	6	4
3	3	5	3
4	3	7	5
5	3	5	3
6	3	7	5

- ii) **Amostras:** Optou-se por utilizar o material da primeira ordenha (manhã) de todas as vacas, sendo que a primeira ordenha é feita antes da primeira alimentação. Essas vacas foram submetidas à coleta de sangue no início e término da ordenha mecanizada (tempo *-1* e *+10* minutos, respectivamente). Da mesma forma, foi coletado o leite do início da ordenha e do final da ordenha (tempo *-1* e *+10* minutos, respectivamente). Para tal era utilizado o leite proveniente dos quatro tetos, sendo que os primeiros jatos eram desprezados e amostra era coletada em seguida. As amostras de plasma foram coletadas via veia caudal, em tubos heparinizados e depois centrifugadas a 1500 x g, à 4°C, durante 15 minutos, sendo estocadas a -20°C até a análise. As amostras de leite foram coletadas em frascos estéreis e depois centrifugadas a 2000 x g, à 4°C, durante 20 minutos. O ultrafiltrado foi estocado à -20°C para posteriormente ser utilizado nas determinações das concentrações de cortisol.

b) **Experimento II**

Estudo da concentração de cortisol em vacas diagnosticadas positiva e negativamente para a mastite sub-clínica.

- i) **Animais:** 58 vacas Gyr, de 2º e 3º lactação, foram utilizadas neste experimento. Esses animais estavam entre o 3º e 7º meses de lactação e tinham os mesmos critérios de alimentação e ordenha descritos para o experimento I. Entre os animais havia 28 vacas com diagnóstico negativo para mastite sub-clínica ($CCS < 2.10^5$ células.mL⁻¹), bem como

28 vacas com diagnóstico positivo para mastite sub-clínica ($CCS > 2.10^5$ células.mL⁻¹). Todos os animais com diagnóstico positivo vinham de subseqüentes mastites sub-clínicas.

ii) **Amostras:** Nesta coleta o leite era proveniente de apenas um dos tetos da vaca, previamente higienizado, sendo que os primeiros jatos de leite eram sempre descartados, partindo-se então para a coleta em frascos estéreis. As amostras eram então centrifugadas a 2000 x g, à 4°C, durante 20 minutos. O ultrafiltrado foi estocado à -20°C para posteriormente ser utilizado nas determinações das concentrações de cortisol. Dessas amostras, apenas 20 de cada grupo tiveram sua concentração de cortisol dosada por kit de ELISA para saliva humana (Diagnostic Systems Laboratories, Inc.) no Laboratório de Fisiologia Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos / USP, Campus de Pirassununga – SP, seguindo as recomendações do fabricante.

2.3.2 - Condições Cromatográficas:

a) Método para Análise de Plasma Bovino

Utilizou-se um equipamento HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) Agilent 1200 Series, com coluna Zorbax Eclipse XDB- C18, 4,6 x 150 mm e partícula 3,5 µm da Agilent. A temperatura do forno foi mantida em 40°C. O gradiente de vazão e composição da fase móvel utilizados são mostrados na **Tabela 4**. O volume de injeção foi de 40 µL. Acetona foi utilizada como solvente de lavagem da agulha por 45 segundos antes da injeção. A temperatura do injetor foi mantida a 4°C.

b) Método para Análise de Leite Bovino

Utilizou-se um equipamento HPLC Agilent 1200 Series, com coluna Luna PFP (2), 4,6 x 150 mm e partícula 5 µm da Phenomenex. A temperatura do forno foi mantida em 40°C. gradiente de vazão e composição da fase móvel utilizados são mostrados na **Tabela 5**. O volume de injeção foi de 20 µL. Acetona foi utilizada como solvente de lavagem da agulha por 30 segundos antes da injeção. A temperatura do injetor foi mantida a 4°C.

Tabela 4. Gradientes de vazão e composição da fase móvel utilizados para análise de plasma.

Tempo (min)	Fluxo ($\mu\text{L min}^{-1}$)	% (v/v) H_2O	% (v/v) MeOH
0.00	800	5.0	95.0
2.00	800	5.0	95.0
2.50	800	0.0	100.0
2.51	1200	0.0	100.0
8.00	1200	0.0	100.0
8.10	1200	5.0	95.0
11.50	1200	5.0	95.0

Tabela 5. Gradientes de fluxo e fase móvel utilizados para análise de leite.

Tempo (min)	Fluxo ($\mu\text{L min}^{-1}$)	% (v/v) H_2O	% (v/v) MeOH
0.00	800	60.0	40.0
2.00	800	30.0	70.0
4.00	800	15.0	85.0
4.10	800	0.0	100.0
7.00	800	0.0	100.0
7.01	1200	0.0	100.0
8.00	1200	0.0	100.0
8.10	1200	60.0	40.0
10.50	800	60.0	40.0

2.3.3 - Espectrômetro de Massas:

O equipamento utilizado foi um espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo com *Ion Trap* linear modelo 5500 Q-Trap[®] da AB Sciex com fonte de fotoionização (APPI), equipada com uma lâmpada de criptônio de 10 eV. Utilizou-se modo positivo de ionização, sendo o tolueno utilizado como dopante, numa vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$. O equipamento foi operado em modo MRM. Nitrogênio foi utilizado como gás contra-corrente (*curtain gas*, 15 psi), gás nebulizante (20 psi), gás auxiliar (20 psi) e gás de colisão (9 u.a. – unidades arbitrárias). A voltagem utilizada na fonte foi de 830 V e a temperatura da probe foi de 350°C .

Para quantificação do cortisol foram monitoradas as transições de razão massa/carga (m/z) $363,1 > 327,3$ (quantificação) e $363,1 > 121,0$ (confirmação). As transições do padrão interno (Cortisol-9,11,12,12- d_4) foram escolhidas como as equivalentes ao cortisol (m/z $367,1 > 331,3$ e $367,1 > 121,0$).

2.3.4 - Preparo da Amostra

a) Amostras de Plasma

Para amostras de plasma adaptou-se uma extração líquido-líquido (LLE – *Liquid-liquid extraction*) previamente descrita em literatura⁽⁷⁹⁾. Assim, $500 \mu\text{L}$ de MTBE (éter metil-terc-butilico) foram adicionados a $200 \mu\text{L}$ de plasma. Após *vortex* de 1 min, a amostra foi centrifugada por 5 min a 10 mil rpm, sendo então submetida a banho de gelo seco com etanol⁽⁸⁰⁾. Nesta etapa coletou-se o sobrenadante, sendo que a fase aquosa (inferior) sofreu nova extração, onde adicionou-se novamente $500 \mu\text{L}$ de MTBE, realizou-se *vortex* de 30 s, e centrifugação por 5 min a 10 mil rpm. A

amostra foi novamente congelada, sendo o sobrenadante coletado e misturado à porção orgânica anterior, que foi então seca em N₂(g). A amostra foi então re-suspendida em 200 µL de MeOH:H₂O (95:5 % v/v) e colocada em vial para injeção.

b) Amostras de Leite

Para amostras de leite utilizou-se extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase extraction*)⁽⁸¹⁾. Para tal, 1 mL de MeOH gelado foi adicionado a 500 µL de leite. O conteúdo foi agitado por 30 s e centrifugado por 3 min a 10 mil rpm. Em seguida o sobrenadante foi coletado e diluído em 4 mL de H₂O. Esse conteúdo foi então carregado em coluna de SPE HLB Oasis 3cc, previamente ativada com 1 mL de MeOH e 2 mL de H₂O:MeOH (95:5 % v/v). Após carregamento da amostra, a coluna foi lavada com 5 mL de H₂O:MeOH (95:5 % v/v) e 3 mL de hexano. A amostra foi então eluída em 850 µL de acetato de etila. Esse conteúdo foi centrifugado por 1 min a 10 mil rpm. 650 µL do sobrenadante foram levados à secagem com N₂(g) e re-suspendidos em 250 µL de MeOH:H₂O (95:5 % v/v), sendo levado para injeção.

2.3.5 - Soluções e Curvas Analíticas

Soluções estoque de padrão de cortisol e d4-cortisol foram preparadas em metanol na concentração de 250 µg mL⁻¹. Soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução estoque, também em metanol, na concentração de 500 ng mL⁻¹. Todas as soluções foram mantidas a -20°C.

a) Método para Plasma

As soluções de calibração foram preparadas nas concentrações de 0,1; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 e 12,8 ng mL⁻¹ de cortisol em solução fisiológica contendo 6% em massa de Albumina de Soro Bovino (*BSA – Bovine Serum Albumin*) e 5 ng mL⁻¹ de padrão interno (d4-cortisol). Os controles de qualidade (CQ) foram preparados da mesma forma nas concentrações de 0,25; 4,8 e 9,6 ng mL⁻¹. Essas soluções passaram pela extração descrita no item 2.3.4 a. As amostras, na ocasião da extração, foram dopadas com 5 ng mL⁻¹ de padrão interno.

b) Método para Leite

As soluções de calibração foram preparadas nas concentrações de 0,15; 0,5; 1,5; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 ng mL⁻¹ de cortisol em MeOH, contendo 5 ng mL⁻¹ de padrão interno (d4-cortisol). Os controles de qualidade (CQ) foram preparados da mesma forma nas concentrações de 0,25; 1,0 e 5,0 ng mL⁻¹. As amostras, na ocasião da extração, foram dopadas com 5 ng mL⁻¹ de padrão interno.

2.3.6 – Validação

Para o método de quantificação de cortisol em plasma seguiu-se a resolução RE nº 899, de 29/05/2003 da ANVISA⁽⁸²⁾ no que tange à validação de métodos bioanalíticos, utilizando a metodologia de compatibilização (ou superposição) de matriz⁽⁸³⁾. Para o método de quantificação em leite, utilizou-se a curva não extraída (em solvente)⁽⁸⁴⁾, o que foge à resolução da ANVISA. Porém, os demais critérios foram mantidos ou adaptados.

Os critérios a seguir foram determinados para ambos os métodos: o limite de detecção (LD) foi determinado pela análise de soluções de concentração decrescente do analito em MeOH, sendo considerado a menor concentração detectável do analito, possuindo resposta 3 vezes superior ao ruído da linha de base; a linearidade foi determinada em soluções do analito em MeOH, de 0,1 a 20 ng mL⁻¹ de cortisol; a especificidade foi determinada pela análise de soluções não dopadas de BSA 6% em soro fisiológico (para o método de plasma).

Para o método de plasma o limite inferior de quantificação (LIQ) foi determinado em solução de BSA dopada e extraída, sendo a menor concentração com relação sinal/ruído igual a 10 para a transição de quantificação, sendo identificável e reprodutível com precisão de 20% e exatidão de 80 – 120 %⁽⁸²⁾. A repetibilidade do método de plasma foi determinada pela análise de soluções CQ (N=5) numa mesma corrida. A precisão intermediária (inter-corrida) foi determinada pela análise de soluções CQ (N=10) em dias diferentes. O efeito de matriz foi determinado pela comparação das áreas de pico de soluções padrão (em MeOH) com soluções extraídas não dopadas de BSA (N=5), reconstituídas em soluções padrão de mesma concentração⁽⁸⁵⁾.

Para o método de leite o LIQ foi determinado como sendo a menor concentração adicionada a uma amostra referência de leite já contendo cortisol (endógeno) que fosse identificável e reprodutível com precisão de 20% e exatidão de 80 – 120 %. Essa concentração (LIQ) também deve ter relação sinal/ruído igual a 10 para a transição de quantificação quando analisada em solução padrão em metanol. Para determinar a precisão do método, adicionaram-se 0,15, 1,0 e 5,0 ng mL⁻¹ a uma amostra referência de leite (N=5) sendo que essas amostras dopadas passaram pela extração num mesmo dia (repetibilidade, intra-corrida) e em dias diferentes (precisão intermediária, inter-corrida). O efeito de matriz foi determinado pela comparação das áreas de pico de soluções padrão (em MeOH) com soluções extraídas não dopadas de leite (amostra referência, N=5), reconstituídas em soluções padrão de mesma concentração, subtraindo o valor da concentração endógena.

Para os cálculos da validação utilizou-se o software Multiquant 2.0 (AB Sciex).

2.3.7 - Tratamento Estatístico dos Dados

Os resultados estão expressos na forma de **média $\pm$ I**, onde **I** é a incerteza da medida, definida por $I = t_{n-1} \cdot s / (n-1)^{1/2}$. O coeficiente de variação relativo (CV%) será dado por $CV\% = s / (\bar{x}) \cdot 100$, onde **s** é a estimativa do desvio padrão e $\bar{x}$ é a média das determinações. A exatidão será dada por:

$$\text{Exatidão} = \left[\frac{(\text{valor experimental} - \text{valor nominal})}{\text{valor nominal}} \right] \cdot 100$$

Para a análise estatística dos dados utilizou-se o software Minitab® 16. Foi considerado o nível de confiança de 95% para todos os experimentos.

a) Testes Estatísticos Realizados para o Experimento I

Experimento I (estudo de correlação entre a concentração de cortisol em plasma e leite e estudo do efeito da ordenha em relação à concentração de cortisol): Para comparação entre plasma no tempo (-1) e tempo (+10) utilizou-se o teste t pareado, com nível de significância de $P < 0,05$. Esse mesmo teste foi utilizado para comparação entre leite no tempo (-1) e (+10). Para estudo de correlação entre plasma e leite utilizou-se o estudo de correlação de Pearson, com $P < 0,05$. Para estudo da influência das características dos animais (meses de gestação, meses de lactação e número de lactações) sobre as concentrações obtidas no plasma e leite realizou-se estudo de correlação múltipla com $P < 0,05$.

b) Testes Estatísticos Realizados para o Experimento II

Experimento II (estudo da concentração de cortisol em vacas diagnosticadas positiva e negativamente para a mastite sub-clínica): Para comparação entre a concentração de cortisol entre os grupos positivo e negativo dentro de cada método (ELISA ou LC-MS/MS) utilizou-se o teste t com significância de $P < 0,05$. Para comparação entre os resultados obtidos pelos dois métodos (para cada amostra), utilizou-se o teste t pareado com nível de significância de $P < 0,05$. Para estudo de correlação entre os métodos utilizou-se o estudo de correlação de Pearson, com $P < 0,05$.

2.4. Resultados e Discussão Parte I – Desenvolvimento e Validação dos Métodos

2.4.1 – Características dos Métodos LC-MS/MS Desenvolvidos

A fonte de ionização utilizada no trabalho foi a de APPI, por haver vários estudos mostrando sua maior eficiência para moléculas mais apolares como é o caso de hormônios esteróides^(86,87). Além disso, em estudos comparativos reportados entre APPI, ESI (*Electrospray Ionization*) e APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)⁽⁸⁸⁾ para o cortisol, a fonte de APPI mostrou-se mais eficiente, com sinal mais abundante e melhor relação sinal/ruído do que nas outras fontes. APPI é altamente seletiva, devido ao seu mecanismo de ionização, minimizando efeitos de supressão iônica presentes em matrizes biológicas⁽⁸⁹⁾.

Esta técnica de ionização utiliza fótons provenientes de uma lâmpada (criptônio, p. ex, $h\nu = 10$ eV) para promover a ionização dos analitos. O mecanismo de ionização pode se dar de duas formas. Quando um fóton interage diretamente com a molécula de analito (M), essa molécula pode ser convertida ao íon molecular (M^+), que pode então ser convertido à molécula protonada (MH^+) através da colisão com solventes próticos (S), conforme ilustram as **equações 1 e 2**. No segundo mecanismo, um dopante (D) com baixo potencial de ionização é utilizado, sendo primeiramente ionizado pelos fótons, gerando assim íons D^+ . Esses íons radicalares de dopante são então promovidos a moléculas protonadas (DH^+) através da reação com outras moléculas de dopante, podendo assim ionizar o analito, conforme ilustram as **equações 3, 4 e 5**. Conforme descrito anteriormente, neste trabalho utilizou-se tolueno como dopante.

Neste estudo, a ionização do cortisol ocorre seguindo preferencialmente o mecanismo II, uma vez que não há sinal para o analito quando nenhum dopante é utilizado⁽⁸⁹⁾.

Mecanismo I para ionização por APPI



Mecanismo II para ionização por APPI



Para a escolha das transições de m/z do cortisol foram considerados os fragmentos cuja estrutura pudesse ser elucidada e relacionada ao íon precursor $[\text{Cortisol}+H]^+$, possuindo maior intensidade de resposta (sinal). Dessa forma foram escolhidas as transições de m/z $363 > 327$

(referente à segunda perda neutra de uma molécula de água) e $363 > 121$. Para o cortisol deuterado, que é 4 unidades de massa mais pesado, foram escolhidas as transições $367 > 331$ (uma vez que após a segunda perda d'água a molécula ainda preserva os 4 deutérios) e $367 > 121$. O fragmento de m/z 121 é fruto da fragmentação do anel A do esteróide, que não possui átomo marcado⁽⁹⁰⁾. A **Figura 14** mostra os espectros de MS/MS (*full scan*) para a dissociação do cortisol e d4-cortisol e a atribuição dos principais sinais.

Embora o trabalho envolva a quantificação de apenas um analito (ou seja, não é necessária a resolução entre picos de analitos diferentes), e a técnica de espectrometria de massas seja extremamente seletiva (ao monitorar transições de quantificação e de confirmação), matrizes complexas como leite e plasma trazem grandes quantidades de interferentes, além do efeito matriz⁽⁸⁵⁾ (efeito de supressão ou adição de sinal do analito acarretados por interferentes constantes da matriz). Sendo assim, a separação cromatográfica teve papel crucial e teve de ser trabalhada a fim de minimizar os efeitos de interferentes, tanto nos tempos de retenção do analito quanto fora deles. Desta forma, em ambos os métodos foi utilizada eluição por gradiente de composição e vazão visando separar o pico do analito dos interferentes, bem como tornar mais rápida a fase de limpeza e re-equilíbrio da coluna. Na **Figura 15** são mostrados os cromatogramas típicos obtidos para os dois métodos desenvolvidos e os tempos de retenção do analito e padrão interno. O tempo final da corrida, para ambos os métodos teve de ser estendido muito além do tempo de retenção do analito, dada a grande quantidade de interferentes eluindo posteriormente ao analito. Para escolha do tempo de término das corridas, realizou-se uma corrida estendida (~20 minutos), onde os sinais do analito e padrão interno foram monitorados durante toda a aquisição, observando-se o momento em que não havia mais interferentes. Dessa forma, estabeleceu-se o tempo de corrida, conforme mostra a **Figura 16**, onde é possível verificar a estabilização da linha de base no último minuto, para ambos os métodos.

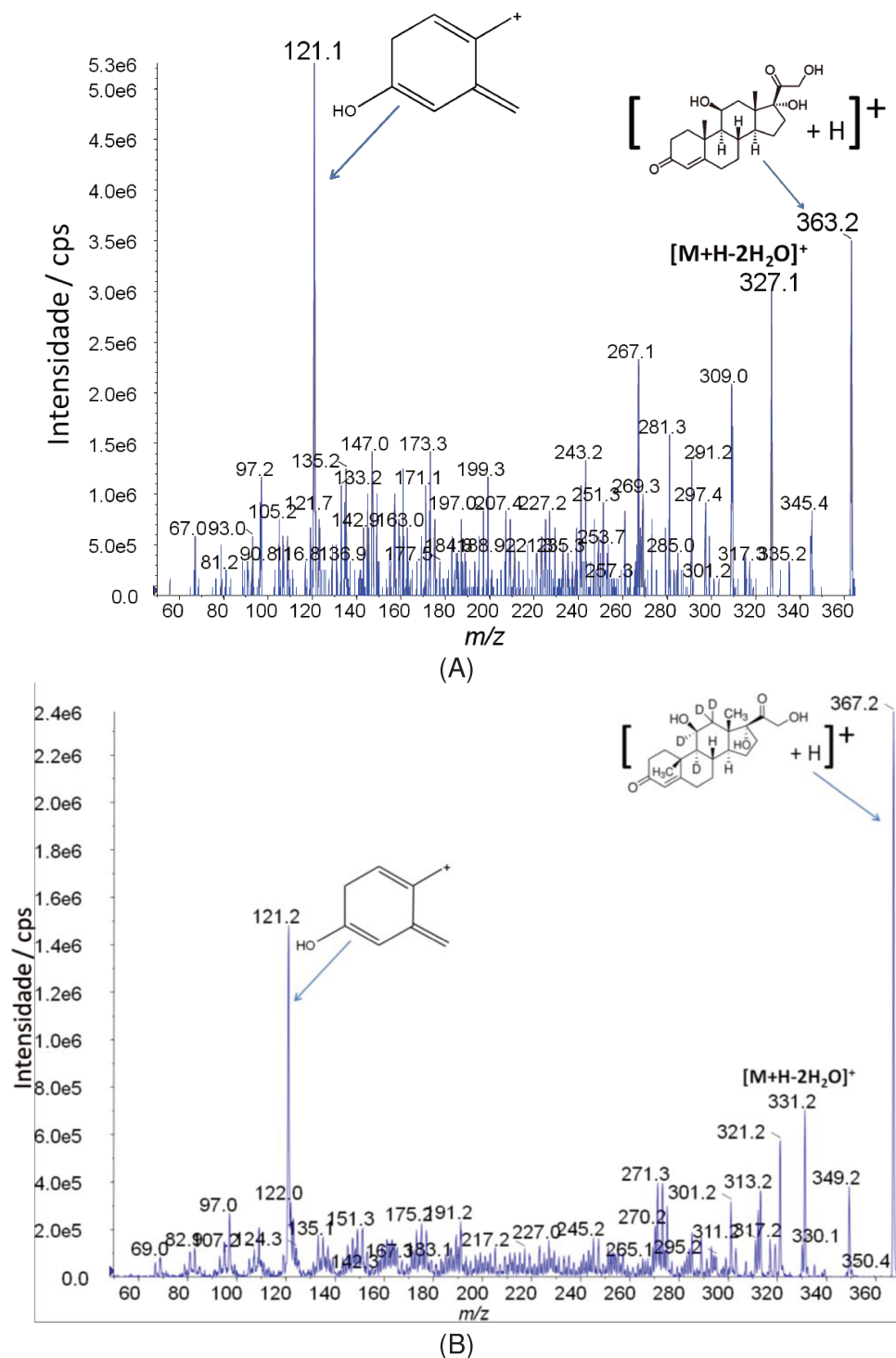
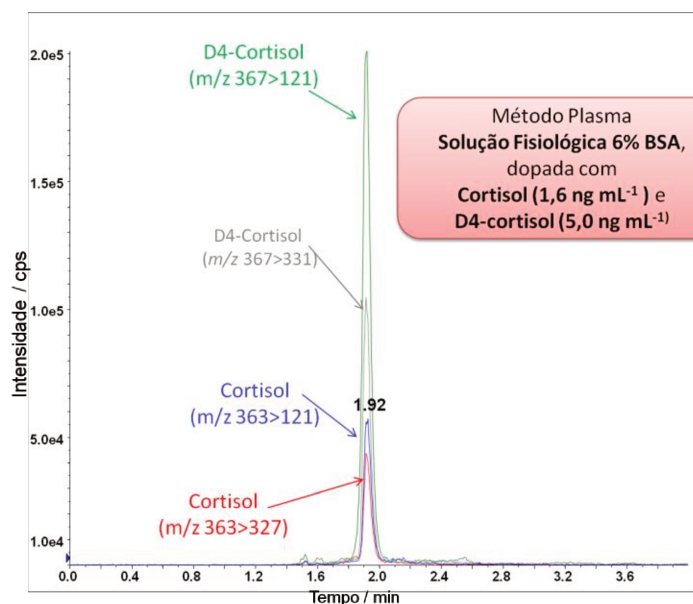
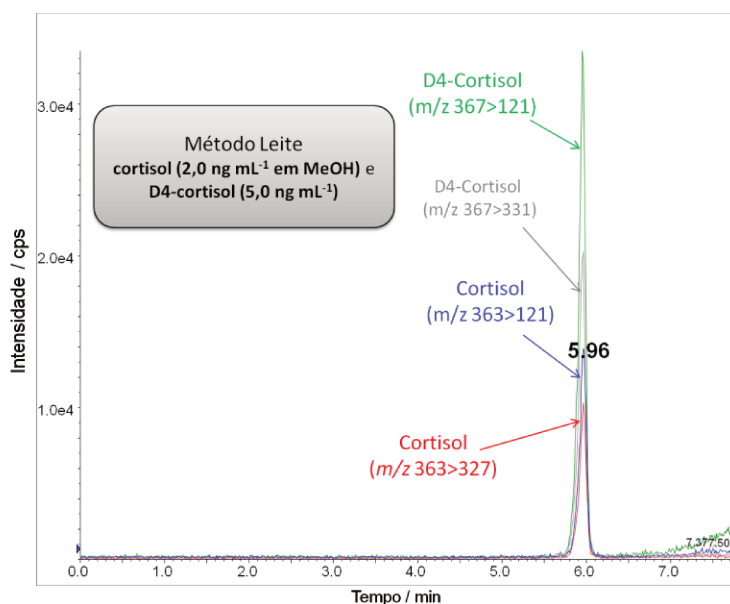


Figura 14. Espectros de massas (MS/MS – *full scan*) mostrando o perfil de fragmentação de (A) cortisol e (B) d4-cortisol, e a atribuição dos principais sinais⁽⁹⁰⁾.

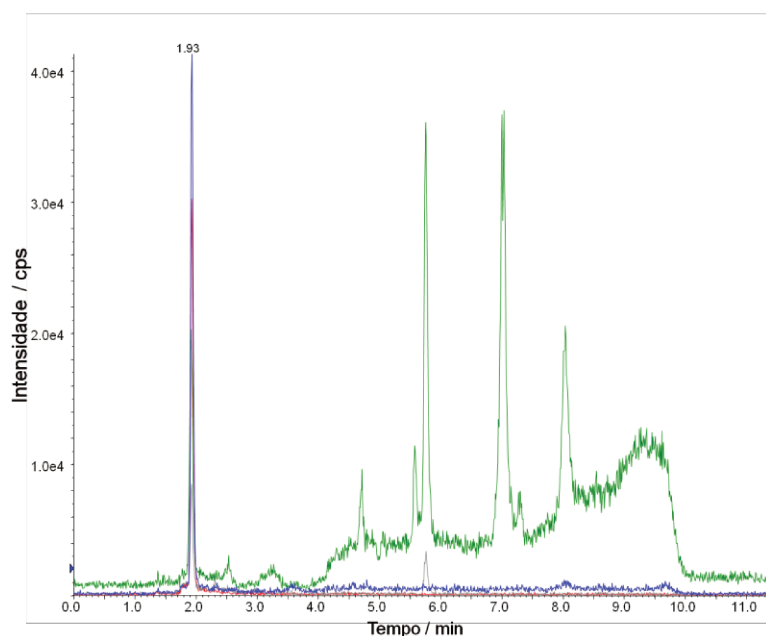


(A)

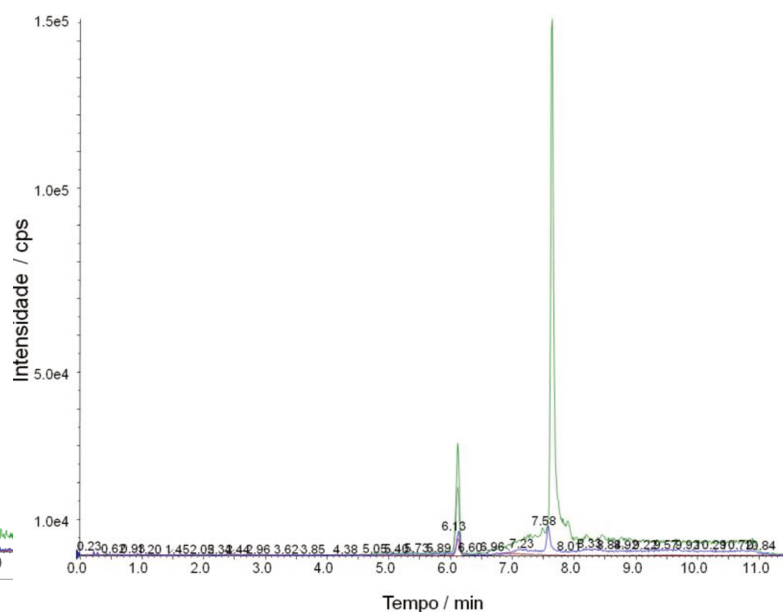


(B)

Figura 15. Cromatogramas típicos obtidos para o método de (A) plasma e (B) Leite, conforme condições descritas nos itens 2.3.2 a e b.



(A)



(B)

Figura 16. Cromatogramas estendidos de amostras de plasma e leite extraídas conforme itens 2.3.4 a e b, sendo em (A) análise de plasma e em (B) análise de leite. Condições cromatográficas descritas nos itens 2.3.2 a e b.

2.4.2 – Escolha da Metodologia de Validação

Como dito anteriormente, o cortisol é uma substância endógena presente em todos os animais, independente de sexo ou idade. Desta forma, é impossível encontrar uma matriz totalmente isenta de cortisol (tanto para o caso de plasma quanto para o leite), na qual pudessem ser realizados os estudos de validação do método, conforme preconiza a normativa da ANVISA⁽⁸²⁾.

Existem várias alternativas analíticas para contornar esta situação, e cada uma apresenta vantagens e limitações. Entre essas alternativas encontra-se o método de adição de padrão⁽⁹¹⁾ que, embora bem estabelecido, demanda um maior consumo de tempo e de reagentes. Além disso, no plasma, por exemplo, a validação de concentrações abaixo de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ seria dificilmente atingida, uma vez que havia disponibilidade de plasma (em quantidade grande para os estudos de validação) apenas em concentrações superiores a 5 ng mL^{-1} (já filtrados). Ou seja, uma variação de 10% no valor da medida (que é aceitável), já implicaria numa soma de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ na matriz não dopada.

A filtragem das matrizes para obtenção de branco é uma alternativa também bastante utilizada⁽⁹²⁾. Contudo, questionamentos sobre a preservação da integridade da matriz poderiam ser conduzidos, ou seja, até que ponto o processo de filtragem teria ou não alterado a matriz e a presença de interferentes. Outras abordagens como a metodologia do *surrogate*⁽⁹³⁾ ou ainda a diluição isotópica⁽⁹⁴⁾ poderiam ser igualmente aplicadas. Contudo, no caso do cortisol, as substâncias similares que poderiam ser utilizadas como *surrogate* geralmente são fármacos que também são utilizados na veterinária e poderiam estar presentes na amostra. Assim, tanto a metodologia do *surrogate* quanto a diluição isotópica implicariam no uso, em grande quantidade, de isótopo marcado, o que terminaria por encarecer o método.

Duas estratégias diferentes foram utilizadas para o plasma e para o leite, visando contornar a problemática apresentada.

No caso do plasma optou-se pela compatibilização (ou superposição) de matriz, ou seja, buscou-se montar uma matriz de composição similar que estivesse praticamente livre de cortisol. Esse método já havia sido descrito em literatura para análise de cortisol em plasma humano⁽⁹⁵⁾, com bons resultados analíticos. No caso do plasma bovino, sua composição em massa é de cerca de 91% de água, 7% de proteína (principalmente albumina e globulina), e uma grande variedade de sais e compostos de baixa massa molar ($\sim 1\%$). Desta forma, tentou-se buscar uma matriz similar (solução 6% de BSA em soro fisiológico), a fim de simular, ao menos parcialmente, o efeito de matriz apresentado pelos sais e proteínas do plasma.

Para o leite, utilizou-se uma nova proposta, já descrita em literatura⁽⁸⁴⁾, onde a quantificação foi realizada frente à curva em solvente. Essa abordagem apresenta várias vantagens frente a

validação utilizando curva extraída: menor consumo de materiais e reagentes, maior rapidez na preparação da curva, maior repetibilidade e reprodutibilidade e possibilidade de adaptação do método para diferentes matrizes. Por outro lado, para o sucesso do método, a eficiência de extração do mesmo deve ser elevada e reprodutível e as etapas de *clean-up* das amostras devem ser bem elaboradas, a fim de minimizar os efeitos de matriz, uma vez que o sinal na amostra (suja) será comparado com um solvente puríssimo (grau LC-MS). Além disso, é imprescindível o uso de padrão interno.

Para ambas as metodologias escolhidas, o uso de cortisol deuterado como padrão interno é de fundamental importância para o sucesso analítico, uma vez que esta é a melhor maneira de corrigir a supressão ou adição de sinal decorrente de interferentes co-eluentes com o analito. Uma vez que o padrão isotopicamente marcado elui exatamente no mesmo tempo de retenção do analito, ele irá enfrentar os mesmos efeitos de supressão ou aumento de sinal, sendo que seu uso como padrão interno minimiza ou anula esses efeitos⁽⁸⁵⁾.

2.4.3 – Metodologia de Preparo de Amostra

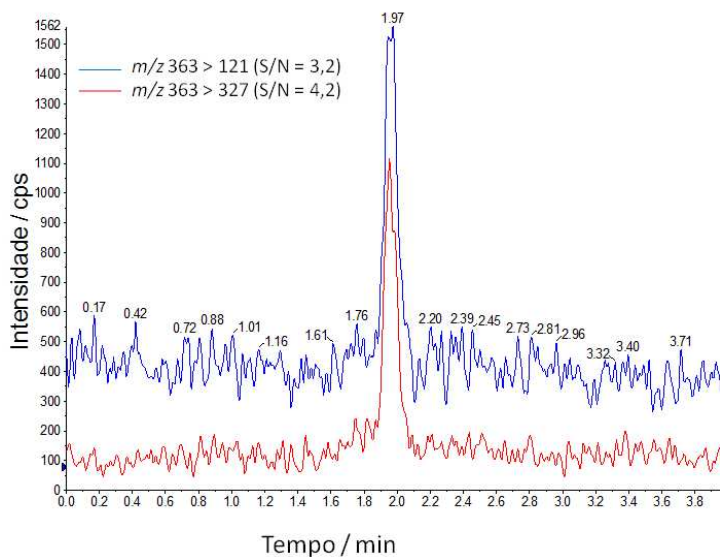
Este trabalho empregou duas metodologias diferentes para preparo de amostra. No caso do plasma, a LLE utilizada⁽⁷⁹⁾ foi capaz de garantir eficiência de extração média de 85%, em toda a faixa validada. A vantagem de se utilizar este tipo de extração é porque ela é relativamente mais barata do que a extração em fase sólida (SPE), demandando contudo um maior trabalho de bancada.

A metodologia de extração desenvolvida para o método de leite, utilizando SPE, possibilitou o trabalho com volume reduzido de amostra (500 µL de leite), fato inovador na literatura, que é farta em métodos trabalhando de 2 a 10 g de leite por amostra^(96,97,98). A metodologia aqui proposta tem potencial para ser aplicada em casos onde o volume de leite é limitante, como para animais de pequeno porte. Além disso, a quantidade reduzida de amostra possibilita menor utilização de solventes e consumíveis, economia de tempo e espaço de armazenagem. Esta metodologia também forneceu ótimas taxas de eficiência de extração, sendo em média 87% em toda a faixa validada.

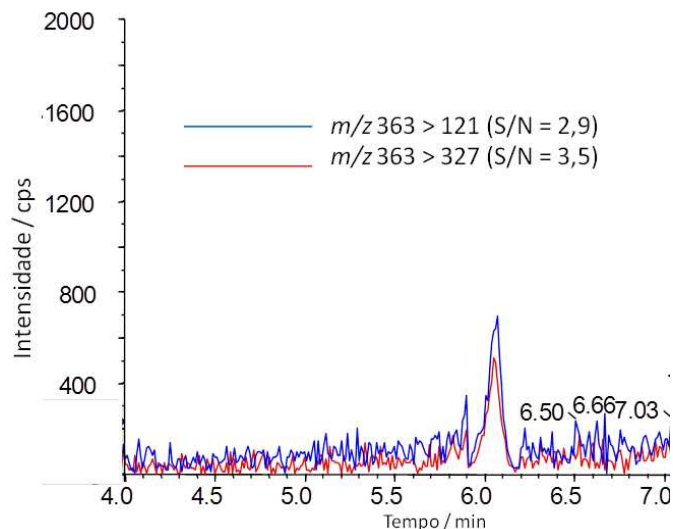
2.4.4 – Validação dos Métodos

a) Limite de Detecção e Atribuição das Transições de Quantificação e Confirmação

O Limite de Detecção (LD), determinado como descrito na seção 2.3.6, foi de 10 pg mL⁻¹ para o método de plasma e de 50 pg mL⁻¹ para o método de leite, conforme mostra a **Figura 17**.



(A)



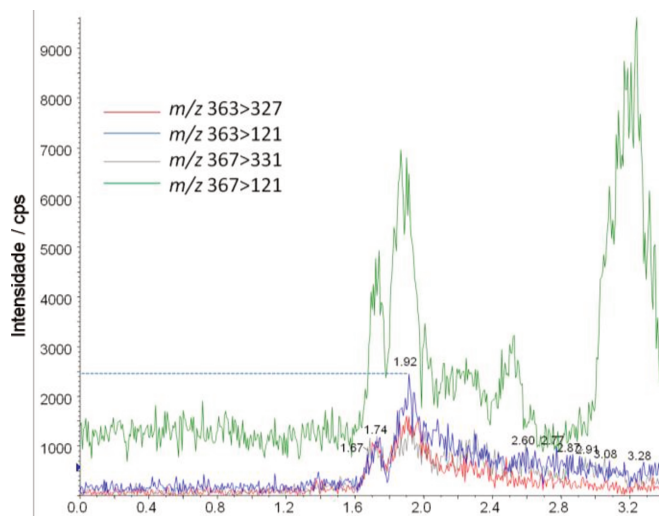
(B)

Figura 17. Cromatogramas do LD para (A) método de plasma e (B) método de leite mostrando a relação sinal ruído (S/N) para as transições monitoradas de cortisol. Condições cromatográficas descritas no item 2.3.2 a e b.

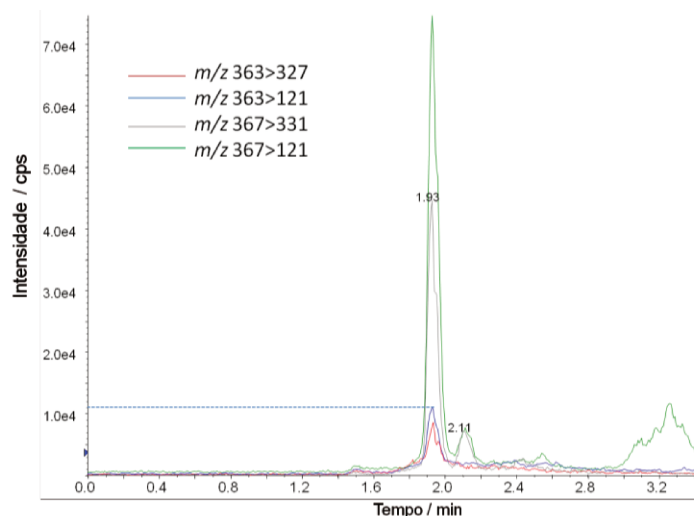
Como observado na **Figura 17**, a transição de m/z 363 > 327 possui maior relação sinal ruído do que a transição de m/z 363 > 121. Este comportamento foi observado durante o decorrer de todo o desenvolvimento e esta transição também possui maior linearidade nas curvas analíticas. Desta forma, a transição de m/z 363 > 327 foi escolhida para a quantificação do analito, enquanto a transição de m/z 363 > 121 foi escolhida para confirmação do mesmo. A transição de quantificação utilizou a transição equivalente do padrão interno para correção (m/z 367 > 331).

b) Especificidade e Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

A especificidade, para o método de plasma, foi avaliada através da análise da solução de BSA não dopada. Embora a solução de BSA tenha sido escolhida para simular uma matriz branca, observou-se que nela há uma pequena concentração de cortisol (**Figura 18A**), fato que resultou num aumento do LIQ para preservar a especificidade do método de plasma, conforme rege a normativa de ANVISA⁽⁸²⁾. Sendo assim, para que a resposta dos interferentes não ultrapassasse 20% do LIQ, o mesmo foi estabelecido como $0,10 \text{ ng mL}^{-1}$ para o método de plasma, conforme mostra a **Figura 18B**.



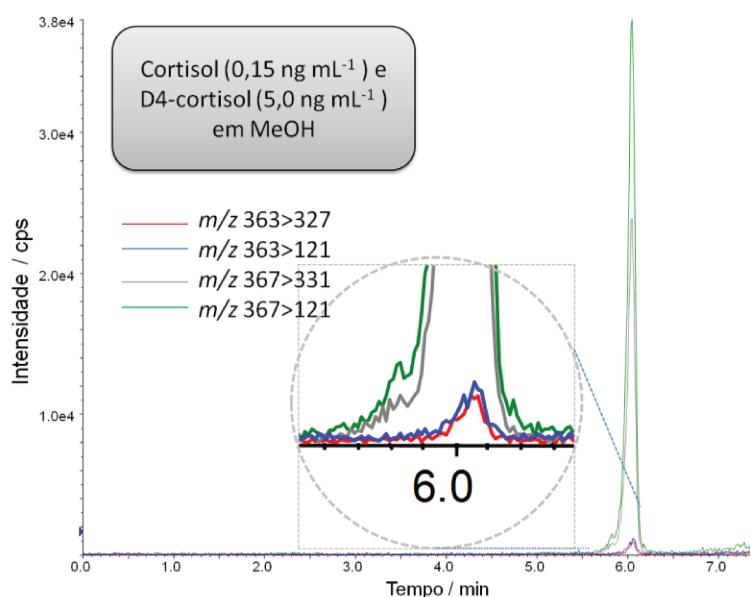
(A)



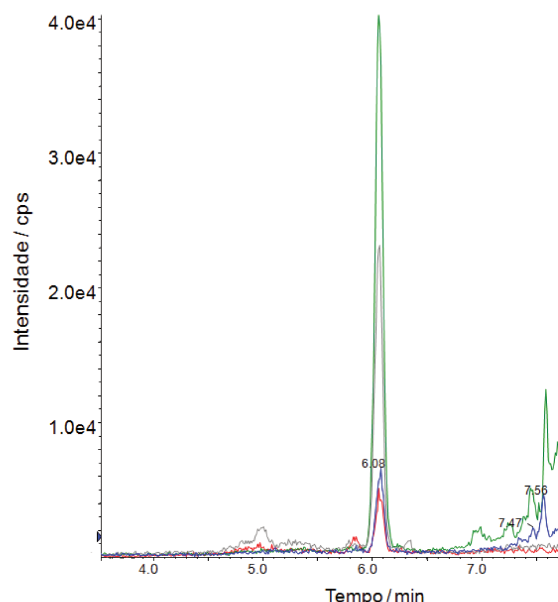
(B)

Figura 18. (A) Cromatograma para solução fisiológica 6% BSA não dopada extraída conforme protocolo para plasma e (B) Cromatograma para solução fisiológica 6% BSA dopada com $0,10 \text{ ng mL}^{-1}$. Condições cromatográficas descritas no item 2.3.2 a.

Para o leite o LIQ obtido foi de $0,15 \text{ ng mL}^{-1}$ em MeOH (**Figura 19A**) que, somado à concentração da amostra referência ($0,51 \text{ ng mL}^{-1}$) gerou uma concentração média de $0,66 \text{ ng mL}^{-1}$ (**Figura 19B**), lembrando o que foi proposto no item 2.3.6. Neste caso não foi estudada a especificidade, visto que o branco utilizado foi MeOH puro.



(A)



(B)

Figura 19. (A) Cromatograma para solução metanólica de cortisol ($0,15 \text{ ng mL}^{-1}$) e (B) Cromatograma para amostra de referência de leite dopada com cortisol ($0,15 \text{ ng mL}^{-1}$) e extraída. Condições cromatográficas descritas no item 2.3.2 b.

a) Linearidade

Ambos os métodos se mostraram lineares de 0,1 a 20 ng mL⁻¹ em solvente, com ponderação 1/x², conforme mostram as **Figuras 20 e 21**. Este tipo de ponderação é necessária em situações nas quais a estimativa do desvio padrão não varia proporcionalmente com a concentração⁽⁹⁹⁾. Para as faixas de trabalho também se utilizou a ponderação 1/x².

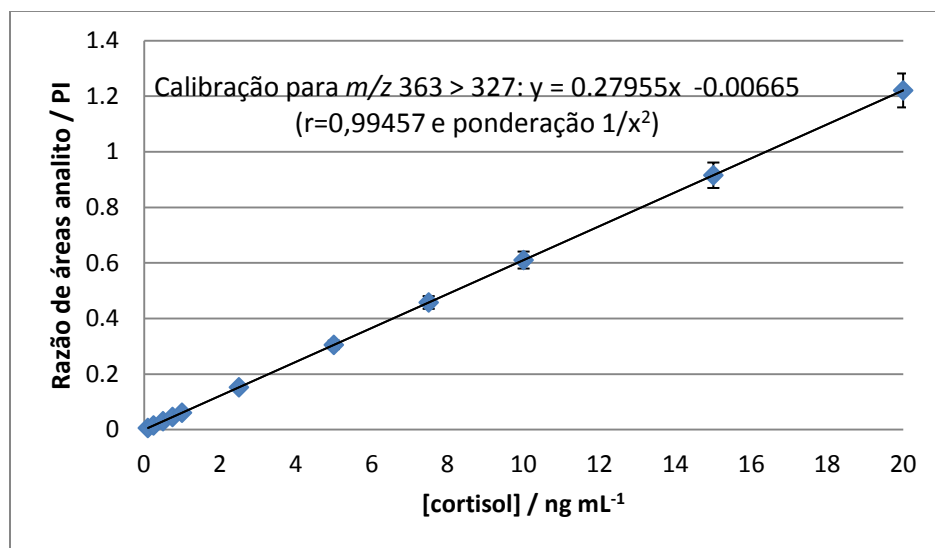


Figura 20. Linearidade de 0,1 à 20,0 ng mL⁻¹ para o método do plasma ($N=3$)

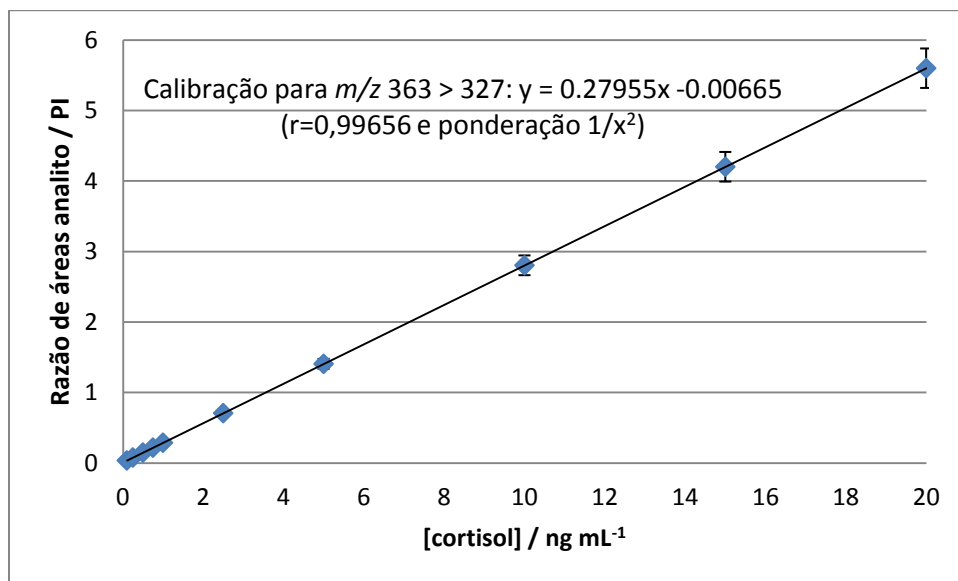


Figura 21. Linearidade de 0,1 à 20,0 ng mL⁻¹ para o método de leite ($N=3$)

b) *Precisão e Repetibilidade*

Os dados de precisão intra e inter-corrida para o plasma e leite são mostrados nas **Tabelas 6** e **7** respectivamente, que traz também os valores de exatidão em termos de adição de padrão.

Tabela 6. Dados de precisão intra-corrida e inter-corrida para o plasma.

Cortisol (ng mL ⁻¹) (<i>nominal</i>)	Intra-corrida (N=5)			Inter-corrida (N=10)		
	Média $\pm$ I (ng mL ⁻¹)	CV% (%)	Exatidão (%)	Média $\pm$ I (ng mL ⁻¹)	CV% (%)	Exatidão (%)
0,10	0,09 $\pm$ 0,01	9,9	100,0	0,12 $\pm$ 0,01	16,9	114,5
0,20	0,20 $\pm$ 0,02	9,6	111,0	0,21 $\pm$ 0,02	10,5	106,3
4,80	4,37 $\pm$ 0,06	2,3	91,4	4,3 $\pm$ 0,1	2,0	90,3
9,60	10,0 $\pm$ 0,3	2,2	107,5	10,2 $\pm$ 0,3	2,9	106,6

Curva de calibração média: $y = 0.29804 x + 0.03336$ ($r = 0.99668$ e ponderação $1 / x^2$)

Tabela 7. Dados de precisão intra-corrida e inter-corrida para o leite.

Cortisol (ng mL ⁻¹) (<i>nominal</i>)	Intra-corrida (N=5)			Inter-corrida (N=10)		
	Média $\pm$ I (ng mL ⁻¹)	CV% (%)	Exatidão (%)	Média $\pm$ I (ng mL ⁻¹)	CV% (%)	Exatidão (%)
0,51*	0,51 $\pm$ 0,04	5,4	100,2	0,51 $\pm$ 0,03	10,1	100,0
0,66	0,65 $\pm$ 0,07	7,6	97,8	0,66 $\pm$ 0,04	9,5	100,0
1,51	1,58 $\pm$ 0,08	4,0	104,7	1,51 $\pm$ 0,06	6,3	100,0
5,51	5,5 $\pm$ 0,2	2,3	100,6	5,49 $\pm$ 0,07	1,4	99,7

Curva de calibração média: $y = 0.25098 x + 0.00107$ ($r = 0.99658$ e ponderação $1 / x^2$)

* Refere-se ao leite referência não dopado

Vale ressaltar que não foi realizado estudo de exatidão através da análise de CRM (*certified reference material*), pois não existem disponíveis CRM para estudo de hormônios esteróides em matrizes bovinas. O uso de CRMs de plasma humano, por exemplo, poderia resultar em discrepância devido às diferenças da matriz.

c) Efeito de Matriz

O efeito de matriz, para ambos os métodos foi calculado através da equação abaixo, conforme descrito no item 2.3.6.:

$$\text{Efeito Matriz} = \left(100 - \frac{B}{A}\right) \cdot 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde A = Área média do pico da solução padrão ($N=5$) e B = Área média do pico da matriz não dopada reconstituída em solução padrão ($N=5$)

Os resultados obtidos para ambos os métodos são mostrados na **Tabelas 8**.

Tabela 8. Efeito de matriz observados para os métodos de plasma e leite.

Plasma		Leite	
Cortisol ⁻¹ (ng mL ⁻¹)	Efeito de Matriz* (%)	Cortisol ⁻¹ (ng mL ⁻¹)	Efeito de Matriz* (%)
0,25	9,1 ± 0,5	0,15	2,2 ± 0,2
4,8	5,4 ± 0,1	1,0	-4,3 ± 0,3
9,6	-5,5 ± 0,2	5,0	4,8 ± 0,4

* Média ± I ($N=5$)

O efeito de matriz observado para ambos os métodos é menor que 10% para as concentrações analisadas, sendo considerado aceitável desta forma.

2.5. Resultados e Discussão Parte II – Experimentos I e II

Amostras de plasma e leite descritas anteriormente foram analisadas seguindo as instruções da RE 899 da Anvisa, no que se refere à presença de CQ ($\geq 5\%$ do número de amostras) entre as amostras. O resultado do tratamento dos dados está resumido a seguir.

2.5.1 - Experimento I: Estudo de Correlação entre a Concentração de Cortisol em Plasma e Leite e Estudo do Efeito da Ordenha em Relação à Concentração de Cortisol.

Os valores encontrados para as amostras de plasma e leite nos tempos (-1) e (+10) encontram-se nas **Tabelas 9 e 10**.

Tabela 9. Resultados das amostras de plasma

Plasma [cortisol] [*] / ng mL ⁻¹		
Animal	Tempo (-1)	Tempo (+10)
1	2,34 ± 0,2	1,8 ± 0,3
2	11 ± 1	11 ± 1
3	4,4 ± 0,1	3,7 ± 0,5
4	7,1 ± 0,9	14 ± 2
5	5,2 ± 0,6	14 ± 2
6	11,3 ± 0,8	4,68 ± 0,06

* Média ± I (N≥3)

Tabela 10. Resultados das amostras de leite

Leite [cortisol] [*] / ng mL ⁻¹		
Animal	Tempo (-1)	Tempo (+10)
1	0,34 ± 0,02	0,23 ± 0,02
2	1,28 ± 0,05	1,21 ± 0,02
3	0,65 ± 0,03	0,41 ± 0,02
4	0,78 ± 0,02	1,08 ± 0,03
5	0,89 ± 0,02	0,70 ± 0,02
6	0,65 ± 0,02	0,51 ± 0,04

* Média ± I (N≥3)

As amostras de plasma tiveram concentração de cortisol variando de 1,8 à 14 ng mL⁻¹. Conforme a Tabela 9, duas amostras de plasmas precisaram ser diluídas e analisadas novamente. Assim, foi realizada uma diluição 1:1 (% v/v) de amostra:solução fisiológica de BSA para o plasma dos animais 4 e 5 no tempo (+10). Após a diluição foi adicionado o padrão interno e seguiu-se a extração como de costume. As amostras de leite, por sua vez, tiveram concentração de cortisol variando de 0,23 à 1,28 ng mL⁻¹. Para as amostras de leite nenhuma diluição precisou ser feita, estando todas as amostras dentro da faixa validada. Todas as amostras tiveram CV% menor que 15%, obtendo baixos valores de incerteza de medida (*I*).

Os resultados revelam ainda que, no caso do plasma, poderia ter se trabalhado com um LIQ dez vezes maior. Porém, como este trabalho precede outros estudos de quantificação de hormônios, optou-se por validar a menor concentração possível.

Da mesma forma, para o leite, percebe-se que poderia ter se trabalhado com um limite superior em torno de 3 ng mL⁻¹. A idéia em se estender a faixa de trabalho do leite é de, em trabalhos futuros, realizar a análise de amostras de plasma no mesmo método validado de leite, comparando os resultados entre os métodos, já que o método de leite é de mais simples operação, por ter padrões de calibração preparados em solvente. A limitação do tempo de máquina impediu a realização desta etapa do projeto.

a) *Efeito da Ordenha em Relação à Concentração de Cortisol em Plasma e Leite*

Ao comparar, dentro de cada matriz, os resultados nos tempos (-1) e (+10) para cada animal individualmente, observa-se que não há uma tendência clara de elevação ou diminuição no teor de cortisol, conforme mostra a **Figura 22**.

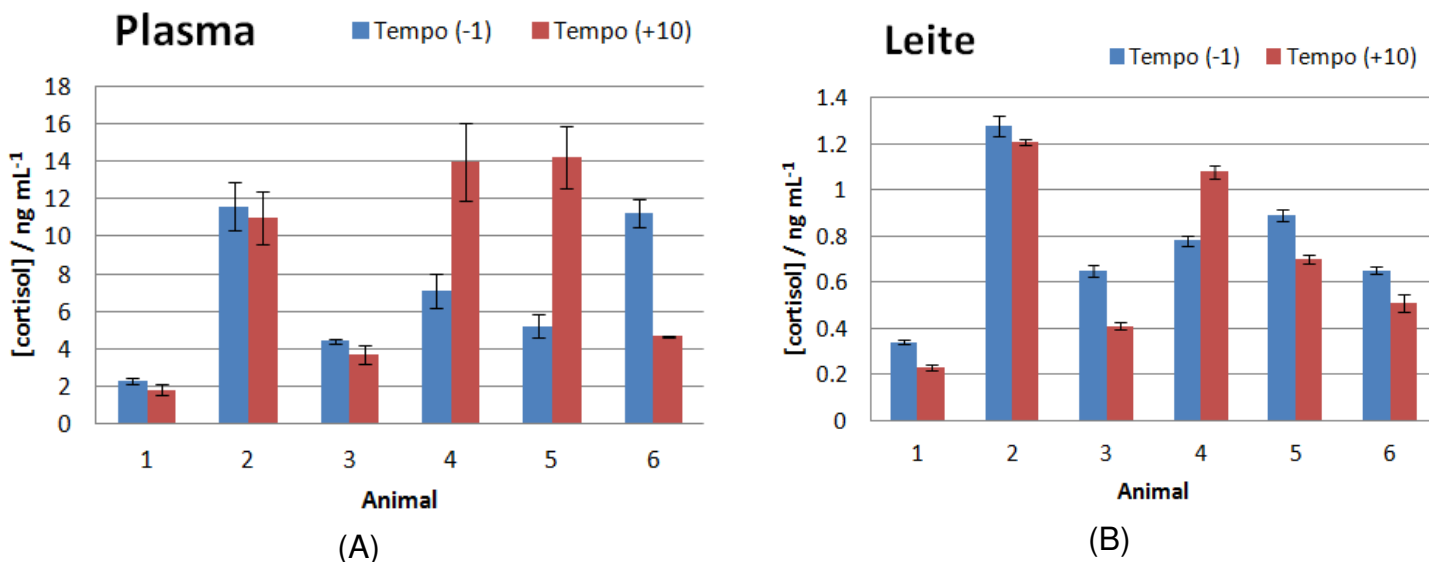


Figura 22. Distribuição dos resultados de (A) Plasma e (B) Leite nos tempos (-1) e (+10) entre os animais. A barra de erros representa a incerteza da medida (*l*).

No entanto, ao realizar o teste t pareado para a média de cada uma das matrizes, considerando o conjunto de dados, observa-se a variação referente ao conjunto de animais e não mais à análise, ou seja, excluí-se o efeito do animal. Dessa forma, calculou-se a média entre os animais em cada tempo, para cada matriz. Os resultados são mostrados graficamente na **Figura 23**. Este tratamento dos dados mostrou que não há diferença estatística na concentração de cortisol do plasma dos tempos (-1) e (+10) ($P=0,616$). Para o leite, também não se observou diferença na concentração de cortisol entre os tempos ($P=0,385$). Observa-se ainda que a concentração média de cortisol no leite entre os dois tempos de coleta ($0,7 \pm 0,2$ ng mL⁻¹) é estatisticamente menor ($P<0,000$) do que a concentração média entre os dois tempos observada para o plasma (8 ± 2 ng mL⁻¹).

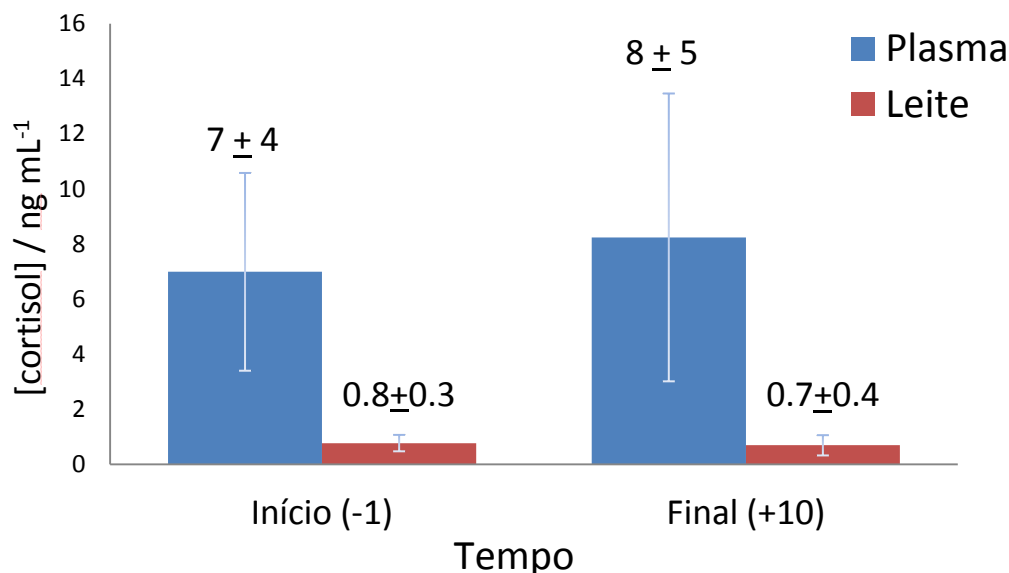


Figura 23. Média entre os animais (N=6) das concentrações de cortisol no plasma e no leite no início e final da ordenha. A barra de erros se refere à incerteza da média (variação entre os animais).

Conforme se observa na **Figura 23**, a incerteza dos resultados é grande, devido ao pequeno número de animais utilizados para o experimento. Este é um dos fatores que pode ter contribuído para não observação de tendência de diminuição ou aumento na concentração de cortisol dentre de uma mesma matriz, no intervalo estudado de tempo. Os baixos valores de concentração encontrados para ambos os fluídos, podem ser atribuídos ao nível basal de cortisol nos animais⁽¹⁰⁰⁾. É possível que o pico deste hormônio decorrente do estímulo da ordenha não tenha sido percebido no intervalo de tempo estudado. Talvez, se tempos intermediários tivessem sido coletados o efeito da ordenha no teor de cortisol pudesse ter sido observado⁽¹⁰⁰⁾.

b) Estudo da Correlação entre as Concentrações de Cortisol no Plasma e no Leite

O estudo de correlação de Pearson realizado para os pares de plasma e leite no tempo (-1) e (+10) de cada animal mostrou que esses fluídos apresentaram correlação positiva ($R= 0,99$ e $P<0,000$), conforme mostra a **Figura 24**. Por meio da análise de resíduos, foram detectados quatro outliers (entre os 12 pares de amostras) no modelo de regressão linear, os quais foram, portanto, excluídos. Contudo, mesmo sem a exclusão dos outliers a correlação ainda foi alta e linear ($R=0,7284$ e $P=0,07$), mostrando assim que a exclusão desses pontos não influenciou o resultado obtido.

A forte correlação encontrada indica que a quantificação de cortisol no leite pode ser um método mais simples (em termos de manejo animal) e eficiente para monitorar o teor de cortisol no organismo e correlacioná-lo com a concentração do hormônio no plasma, uma vez que a coleta de

sangue pode causar estresse nos animais e afetar a quantidade de cortisol sanguínea. Este fato é bastante relevante do ponto de vista científico. Além disso, a coleta de leite é muito menos invasiva que a coleta de plasma e acarreta muito menos sofrimento ao animal. Assim, para fins de monitoramento do cortisol em estudos de bem-estar animal, ou ainda em outros estudos, os dados apresentados indicam que a quantificação de cortisol em leite é uma alternativa viável para a simplificação do experimento, maior confiabilidade dos dados e menor desgaste emocional dos animais.

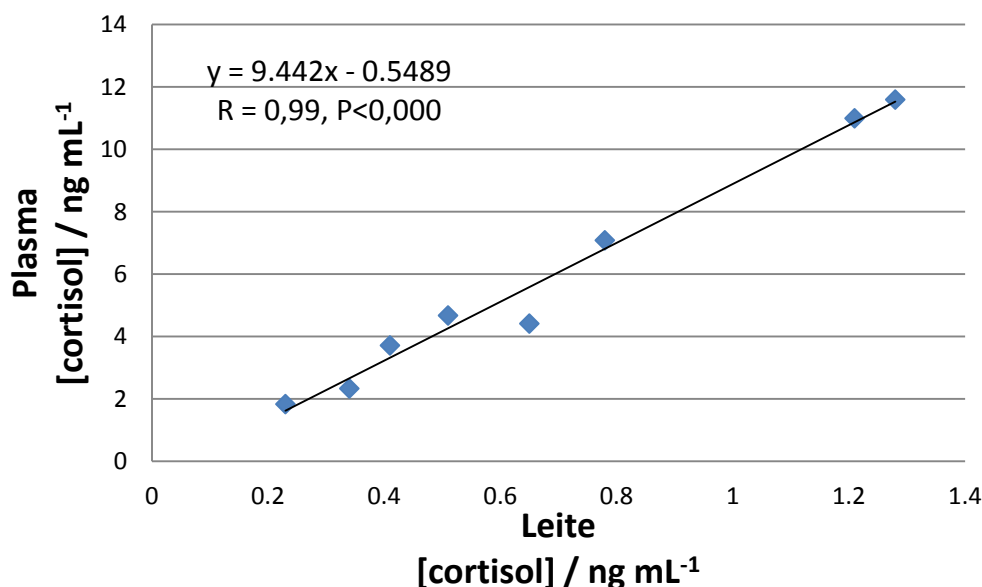


Figura 24. Estudo de correlação de Pearson entre a concentração de cortisol no plasma e no leite

Foi investigado ainda se haveria alguma influência das características dos animais (meses de gestação, meses de lactação e número de lactações) sobre as concentrações de cortisol obtidas no plasma e leite, realizando-se o estudo de correlações múltiplas entre essas variáveis. Os resultados são mostrados na **Tabela 11** e revelam que as variáveis “meses de lactação” e “número de lactações” não influenciaram a concentração plasmática de cortisol ($P > 0,05$). Neste estudo a variável “meses de gestação” (MG) foi excluído por ter se apresentado como uma função linear da variável “meses de lactação” (ML), na forma de $MG = ML - 2$, conforme os dados descritos na Tabela 3 da seção 2.3.1.

Tabela 11. Estudo de correlações múltiplas entre as variáveis número de lactações, meses de lactação e concentração plasmática de cortisol

Variável	Número de lactações	Meses de Lactação	Plasma (-1) [cortisol] / ng mL ⁻¹
Nº. de lactações	R=1,000 P=----	R=0,0000 P=1,00	R=-0,6051 P=0,203
Meses de Lactação	R=0,0000 P=1,00	R=1,000 P=----	R=0,5172 P=0,293
Plasma (-1) [cortisol] /ng mL ⁻¹	R=-0,6051 P=0,203	R=0,5172 P=0,293	R=1,000 P=----

No sentido de ampliar o conhecimento sobre a correlação das concentrações de cortisol nos dois fluídos biológicos, outro experimento poderia ser conduzido com a aplicação da metodologia desenvolvida neste projeto, onde se estimulasse a produção de cortisol nos animais (através da injeção de ACTH), e se coletassem plasma e leite em intervalos seguidos de tempo, a fim de entender se ambos os fluídos teriam suas concentrações de cortisol variando igualmente no tempo.

2.5.2 - Experimento II: Estudo da Concentração de Cortisol em Vacas Diagnosticadas Positiva e Negativamente para a Mastite Sub-Clínica e Comparação com os Resultados Obtidos por ELISA

Os resultados de cortisol obtidos por LC-MS/MS variaram de 0,1 à 1,96 ng mL⁻¹ (**Tabela 12**). Como o LIQ do método é de 0,15 ng mL⁻¹, três (das 56 amostras) foram re-suspendidas em 125 µL de MeOH:H₂O (95:5 % v/v), ao invés de 250 µL como havia sido proposto. Todas as amostras tiveram CV% menor que 15%, obtendo baixos valores de incerteza de medida.

Os resultados de cortisol obtidos por ELISA variaram de 0,17 à 1,4 ng mL⁻¹ (**Tabela 13**). O limite de detecção (LD) do método fornecido pelo fabricante para análise em saliva humana é de 0,1 ng mL⁻¹. O LIQ é de 1,0 ng mL⁻¹ e o limite superior de quantificação é de 100 ng mL⁻¹. Desta forma, 77,5% das amostras permaneceram abaixo da faixa de concentração recomendada. Além disso, as análises de ELISA foram realizadas em duplicata (devido ao custo dos kits), fato que aumentou a incerteza da medida, a qual em alguns casos equivale à mais de 100% do valor da média da análise.

Tabela 12. Resultados para as amostras dos grupos positivo e negativo para diagnóstico de mastite sub-clínica por LC-MS/MS

Leite - [cortisol] / ng mL ⁻¹				
Nº	Grupo Negativo *			
1	0,19	±	0,03	
2	0,90	±	0,05	
3	0,83	±	0,03	
4	1,2	±	0,2	
5	0,7	±	0,2	
6	0,66	±	0,08	
7	0,6	±	0,1	
8	0,6	±	0,1	
9	0,28	±	0,03	
10	0,36	±	0,07	
11	0,2	±	0,2	
12	0,50	±	0,1	
13	0,42	±	0,02	
14	0,60	±	0,03	
15	0,62	±	0,02	
16	0,32	±	0,02	
17	0,29	±	0,02	
18	0,20	±	0,02	
19	0,24	±	0,02	
20	0,38	±	0,02	
21	0,43	±	0,02	
22	0,53	±	0,03	
23	0,55	±	0,02	
24	0,46	±	0,02	
25	0,36	±	0,02	
26	0,32	±	0,02	
27	0,41	±	0,02	
28	0,41	±	0,02	
29	0,40	±	0,03	

Nº	Grupo Positivo*			
1	0,21	±	0,02	
2	0,19	±	0,02	
3	0,16	±	0,03	
4	0,14	±	0,02	
5	0,39	±	0,02	
6	0,16	±	0,03	
7	0,57	±	0,02	
8	0,27	±	0,02	
9	0,25	±	0,02	
10	0,19	±	0,03	
11	0,40	±	0,03	
12	0,53	±	0,02	
13	N/A			
14	0,27	±	0,02	
15	0,41	±	0,03	
16	0,24	±	0,03	
17	0,22	±	0,02	
18	0,12	±	0,02	
19	0,1	±	0,02	
20	0,68	±	0,03	
21	0,33	±	0,02	
22	1,06	±	0,02	
23	1,19	±	0,02	
24	0,39	±	0,02	
25	0,57	±	0,03	
26	0,39	±	0,02	
27	0,47	±	0,05	
28	1,24	±	0,03	
29	1,96	±	0,02	

* Média ± I (N≥3); N/A = não analisada

Tabela 13. Resultados para as amostras dos grupos positivo e negativo para diagnóstico de mastite sub-clínica por ELISA

Leite - [cortisol] / ng mL ⁻¹				
Nº	Grupo Negativo *			
1	0,5	±	0,5	
2	1,08	±	0,06	
3	1,1	±	0,7	
4	1,4	±	2	
5	1,04	±	0,06	
6	1,0	±	0,2	
7	0,80	±	0,03	
8	1,2	±	0,4	
9	1	±	2	
10	0,5	±	0,8	
11	0,4	±	0,7	
12	0,5	±	0,3	
13	0,6	±	0,3	
14	0,6	±	0,3	
15	0,6	±	1	
16	0,9	±	0,2	
17	1,0	±	0,5	
18	1,12	±	0,06	
19	0,9	±	0,2	
20	1,0	±	0,3	

Nº	Grupo Positivo*			
1	0,4	±	0,5	
2	0,34	±	0,06	
3	0,17	±	0,09	
4	1,2	±	1	
5	0,3	±	0,2	
6	0,4	±	0,6	
7	0,7	±	0,1	
8	1,3	±	0,2	
9	0,7	±	0,2	
10	0,9	±	0,4	
11	0,5	±	0,8	
12	0,5	±	0,6	
13	0,2	±	0,3	
14	0,2	±	0,2	
15	0,8	±	0,2	
16	0,5	±	0,1	
17	0,4	±	0,4	
18	0,4	±	0,2	
19	0,2	±	0,2	
20	0,9	±	1	

* Média ± I (N=2)

a) Comparação entre os Métodos de ELISA e LC-MS/MS para a Matriz de Leite:

A análise da comparação dos resultados dos dois métodos para cada grupo é mostrada graficamente na **Figura 25**. Nesta figura vê-se que o perfil das amostras apresenta semelhanças para grande parte das amostras do grupo negativo, embora a concentração obtida por ELISA seja sempre mais alta. No grupo positivo a discrepância entre os perfis é maior, provavelmente por se

tratarem de concentrações mais baixas de cortisol. A concentração obtida por ELISA também manteve-se mais alta no grupo positivo. A comparação entre os resultados de leite pelos dois métodos através do teste t pareado mostrou que eles apresentam resultados diferentes ($P < 0,000$), sendo que o método ELISA apresenta concentração média de cortisol ($0,7 \pm 0,1 \text{ ng mL}^{-1}$) maior do que para o método LC-MS/MS ($0,38 \pm 0,07 \text{ ng mL}^{-1}$), considerando os dois grupos.

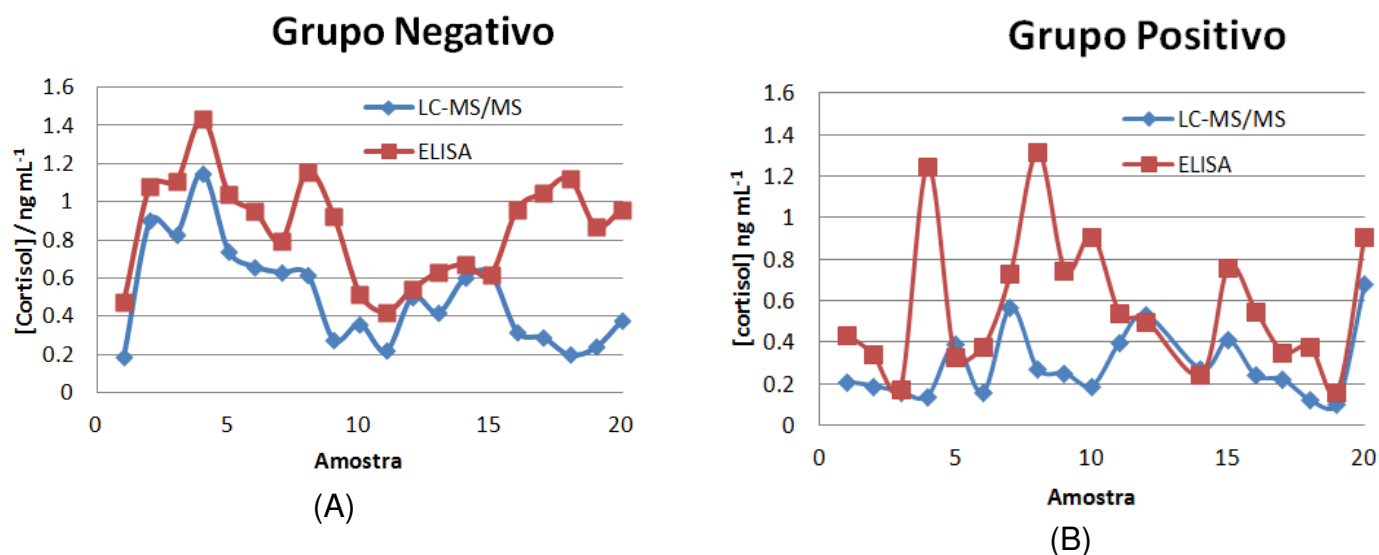


Figura 25. Resultados das amostras do grupo (A) Negativo e (B) Positivo para diagnósticos de mastite sub-clínica obtidos pelos métodos de LC-MS/MS e ELISA

Quando se comparam individualmente os resultados das amostras, percebe-se que o método de ELISA superestimou em média $63 \pm 7\%$ (entre todas as amostras) o valor da concentração obtido por LC-MS/MS. Esse resultado está de acordo com outros trabalhos comparando as duas técnicas na área de endocrinologia humana⁽⁵⁰⁾. Assim, esse resultado era esperado uma vez que ELISA pode ser influenciado por reação cruzada com outras moléculas similares. Além disso, esse resultado pode ser fruto do pronunciado efeito de matriz, uma vez que saliva humana e leite bovino são completamente diferentes em composição, principalmente do ponto de vista protéico.

O estudo de correlação entre os métodos mostrou correlação positiva ($R=0,411$ e $P=0,010$), porém não linear, dado o baixo valor do coeficiente de Pearson, conforme mostra a **Figura 26**. A análise de resíduos realizada para a regressão apresentada na **Figura 26** não detectou outliers, sendo este mais um indício de que a correlação não é linear. Mesmo ao tratar os resultados dos grupos separadamente, não se observa correlação linear entre as concentrações. Desta forma, não foi estabelecido um paralelo direto entre os resultados obtidos pelos dois métodos.

A discrepância dos resultados evidencia que o método de saliva humana para dosagem de leite é inadequado em termos analíticos. Além de não possuir o LIQ adequado para as concentrações observadas, o método de saliva não fornece resultados condizentes com um método validado de

acordo com as melhores práticas analíticas, específico e seletivo para cortisol em leite como o método de LC-MS/MS aqui proposto.

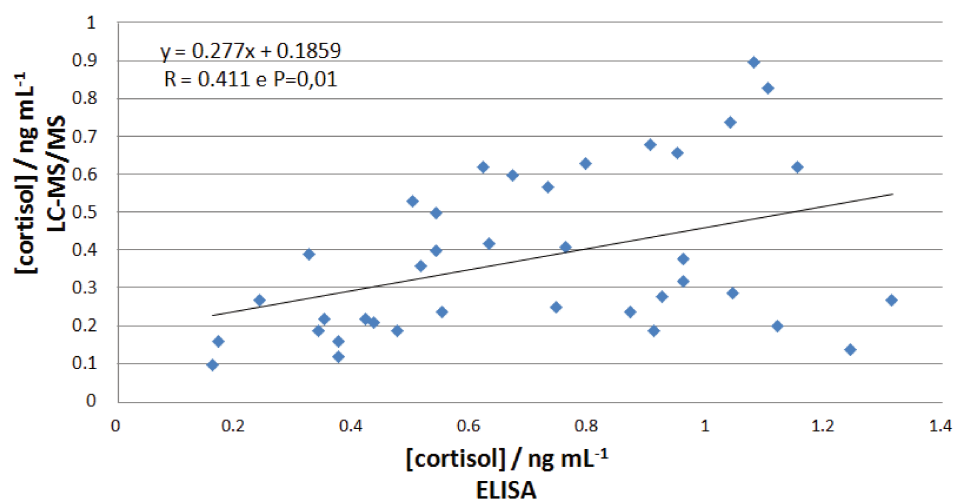


Figura 26. Estudo de correlação linear de Pearson entre os resultados obtidos por ELISA e LC-MS/MS.

b) Comparação entre os Grupos Positivo e Negativo:

Para comparação entre a concentração de cortisol entre os grupos positivo e negativo para diagnóstico de mastite sub-clínica dentro de cada método (ELISA ou LC-MS/MS) utilizou-se teste t com significância de $P < 0,05$. Os resultados médios entre os grupos para cada método são mostrados na **Figura 27**. Tanto por LC-MS/MS quanto por ELISA, observou-se uma menor concentração de cortisol no grupo positivo (animais doentes) em relação ao grupo negativo.

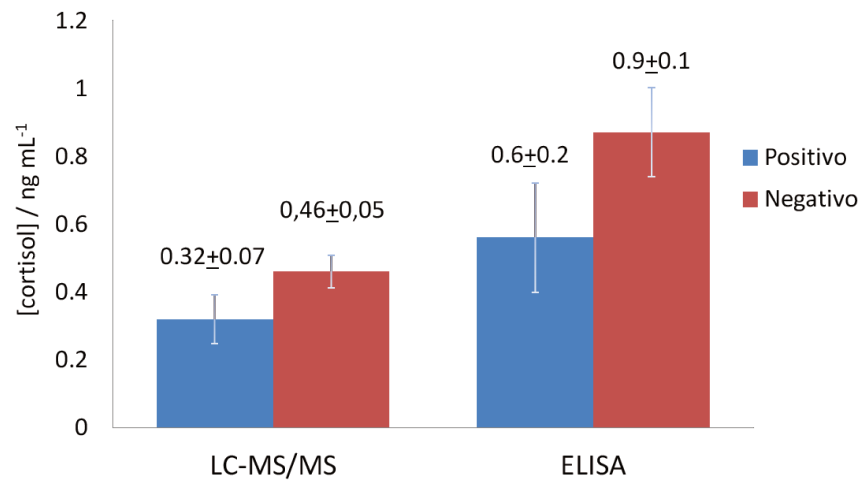


Figura 27. Comparação entre LC-MS/MS e ELISA para os grupos positivo e negativo. A barra de erros se refere à incerteza da média (variação entre os animais).

Os resultados de LC-MS/MS para os grupos positivo ($N=28$) e negativo ($N=29$) para diagnóstico de mastite sub-clínica foram testados quanto à homogeneidade das variâncias, sendo que as

diferenças encontradas não foram significativas ($P=0,46$). Dessa forma, o teste t para variâncias equivalentes foi aplicado, revelando que a concentração de cortisol para os grupos positivo e negativo são diferentes ($P=0,006$). Observou-se ainda que o grupo positivo apresentou concentração média de cortisol ($0,32 \pm 0,07 \text{ ng mL}^{-1}$) menor do que o grupo negativo ($0,46 \pm 0,05 \text{ ng mL}^{-1}$).

Da mesma forma, os resultados de ELISA para os grupos positivo ($N=20$) e negativo ($N=20$) foram testados quanto à homogeneidade das variâncias, sendo que as diferenças encontradas não foram significativas ($P=0,18$). Dessa forma, o teste t para variâncias equivalentes foi aplicado, revelando que a concentração de cortisol para os grupos positivo e negativo são diferentes ($P=0,003$). Observou-se ainda que o grupo positivo apresentou concentração média de cortisol ($0,6 \pm 0,2 \text{ ng mL}^{-1}$) menor do que o grupo negativo ($0,9 \pm 0,1 \text{ ng mL}^{-1}$).

O fato de o grupo positivo apresentar, por ambos os métodos, uma menor concentração de cortisol é intrigante e merece atenção. Sabe-se que a presença de um agente estressante pode alterar o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), como descrito na literatura^(50,51,52). Essa alteração pode acontecer tanto no sentido de hiper-ativação, com aumento da concentração de cortisol, quanto no sentido de hipo-ativação, com diminuição desta. Por exemplo, sabe-se que a abstinência de álcool e cigarro por dependentes, exercícios excessivos (atletas profissionais) e hipertireoidismo podem causar hiper-ativação do eixo HPA em humanos. Da mesma forma, fadiga crônica, depressão sazonal e o período pós-parto podem causar hipo-ativação deste sistema⁽¹⁰¹⁾.

Um estudo realizado com cavalos de corrida, onde foi dosada a quantidade de cortisol no plasma, mostrou que ao se manter um estímulo considerado estressante por um longo período de tempo, este pode se tornar um estresse crônico, resultando numa redução dos receptores de CRH na hipófise, diminuindo a produção de cortisol. Neste caso, a secreção de opióides endógenos (como a endorfina), também pode gerar uma baixa na concentração de cortisol, já que essas substâncias estão envolvidas no *feedback* negativo deste hormônio⁽¹⁰²⁾.

Como a mastite sub-clínica é uma infecção sem sinais clínicos aparentes, não se pode dizer a quanto tempo esses animais estavam sob ação dos microorganismos. Além disso, o fato de os animais virem de mastites consecutivas pode caracterizar um quadro de mastite crônica, onde a infecção se mantém em estágio sub-clínico, com picos sub-agudos ou agudos que duram um curto período de tempo. A depressão de animais com mastite é observada no estágio clínico, porém não são percebidas alterações no estado sub-clínico, embora a produção de leite seja diminuída.

Desta forma, há indícios que levam a acreditar que os níveis diminuídos de cortisol nos animais doentes possam refletir a hipoativação do eixo HPA decorrente da infecção sub-clínica crônica que esses animais enfrentam.

Logicamente outras substâncias poderiam ser dosadas em conjunto para obter um panorama mais completo da condição dos animais, como por exemplo níveis de glicose sanguínea e ACTH. Um estudo de estresse oxidativo em rebanho de búfalos saudável, com mastite sub-clínica e clínica revelou que os índices de malondialdeído (MDA), fruto da peroxidação lipídica, são significativamente mais altos em animais tanto no estágio sub-clínico quanto clínico da mastite, indicando que esses animais sofreram maiores danos oxidativos⁽¹⁰³⁾. Desta forma, associar a atividade do eixo HPA com indicadores de estresse oxidativo poderia ajudar no entendimento do comprometimento do organismo no estágio subclínico.

Contudo, neste estudo, o fato de o grupo positivo apresentar concentrações menores de cortisol evidencia que esses animais expressam endocrinologicamente os efeitos de uma infecção sub-clínica, mesmo que não sejam externados sintomas clínicos aparentes.

2.6. Conclusões

Dois métodos de quantificação de cortisol em plasma e leite bovino foram desenvolvidos observando-se os melhores critérios analíticos para validação dos mesmos. Esses métodos utilizam sistema LC-MS/MS em modo MRM, com transições de razão m/z específicas do analito, cujo monitoramento conjunto proporciona seletividade e detectabilidade ao método.

O preparo de amostra de ambos os métodos proporcionou a utilização de baixos volumes de amostra, o que é muito relevante para outras aplicações, principalmente para o leite, onde apenas volumes maiores de amostra eram descritos na literatura. Para o método de plasma foi empregada LLE, que se mostrou exata e precisa na recuperação de padrão adicionado. Para o método de leite, o uso de SPE facilitou o trabalho de bancada, possibilitando um eficiente *clean-up* da amostra de leite, cujo conteúdo protéico é mais pronunciado, sendo susceptível à maior efeito de matriz. O baixo volume de amostra empregado na metodologia de extração do leite constitui-se numa contribuição do presente trabalho, já que a literatura é farta em métodos empregando grandes volumes de amostra, como discutido anteriormente.

As metodologias de validação utilizadas mostraram bons resultados analíticos nas figuras de mérito observadas (precisão, repetibilidade, exatidão por recuperação de padrão adicionado). O uso de compatibilização de matriz no caso do plasma permitiu que fosse atingido limite de quantificação

inferior ao que seria possível pelo método de adição de padrão. A quantificação frente à curva não extraída também obteve êxito analítico e mostrou-se bastante vantajosa, uma vez que foi encontrado baixo efeito de matriz e obteve-se maior agilidade e economia no método, pela preparação de soluções de calibração em solvente.

A possibilidade de se utilizar como padrão interno o analito isotopicamente marcado também contribuiu para a obtenção de bons resultados, uma vez que o efeito de matriz pôde ser minimizado através da correção pela razão de área entre o analito e seu padrão marcado, já que ambos co-eluem e sofrem assim os mesmos efeitos de supressão ou de adição de sinal pela presença de interferentes.

Desta forma, para o método de plasma o Limite de Detecção foi de 10 pg mL^{-1} de cortisol. A faixa validada foi de $0,1$ à $12,8 \text{ ng mL}^{-1}$, sendo a linearidade do método estudada até 20 ng mL^{-1} de cortisol. A análise dos controles de qualidade forneceu coeficientes de variação de acordo com a normativa da ANVISA⁽⁸²⁾. Para o método de leite o Limite de Detecção foi de 50 pg mL^{-1} . A faixa validada foi de $0,15$ à $8,0 \text{ ng mL}^{-1}$. A análise de amostras dopadas forneceu baixos coeficientes de variação ($\text{CV}\% \leq 10\%$) e ótima exatidão em termos de adição de padrão, evidenciando assim mais uma vantagem na utilização de soluções calibrantes preparadas em solvente: a facilidade no preparo evita erros experimentais, acarretando em resultados mais precisos e exatos. O método LC-MS/MS desenvolvido para o leite possibilitou atingir menor Limite de Detecção e de Quantificação do que o método ELISA para saliva humana utilizado de forma comparativa no *Experimento II* aqui descrito.

Os experimentos veterinários cujas análises foram efetuadas pelos métodos descritos puderam ser plenamente avaliados do ponto de vista analítico, dada a conformidade dos métodos com a faixa de concentração encontrada nas amostras.

O primeiro experimento, com o objetivo de estudar a correlação entre a concentração de cortisol em plasma e leite bovinos e o estudo do efeito da ordenha em relação à concentração de cortisol, demonstrou que não há diferença estatística entre as concentrações de cortisol no plasma e no leite nos intervalos de tempo estudados (início e fim da ordenha) para o número de animais estudados, já que a variação dos resultados entre os animais foi alta. Pode ser que essa diferença pudesse ser observada se mais animais tivessem seu plasma e leite coletados em um número maior de intervalos de tempo. A correlação entre as duas matrizes, por sua vez, pode ser bem estabelecida de forma linear e significativa ($R=0,99$ e $P<0,00$), mostrando a viabilidade do uso da matriz de leite para conhecer a concentração plasmática de cortisol, o que é muito relevante, já que o leite tem uma coleta não invasiva, ao contrário do plasma sanguíneo.

No segundo experimento, realizou-se o estudo da concentração de cortisol no leite em vacas diagnosticadas positiva e negativamente para a mastite sub-clínica e compararam-se os resultados obtidos por LC-MS/MS com aqueles encontrados por ELISA (kit de saliva humana). A comparação entre os métodos revelou que o método de ELISA superestimou os resultados em média 63% para as amostras analisadas, em relação aos resultados de LC-MS/MS. Observou-se ainda que os resultados dos dois métodos não têm correlação linear direta ($R=0,411$ e $P=0,010$), o que dificulta o estabelecimento de paralelos entre os resultados. Soma-se a isso o fato de a maior parte das amostras de leite terem sua concentração abaixo da faixa recomendada pelo fabricante do método de ELISA. Desta forma, os resultados dessas amostras mostraram que não foi adequado utilizar o referido kit de ELISA para leitura de cortisol em leite bovino.

Quanto à concentração de cortisol entre os grupos de animais, observou-se que a concentração de cortisol é mais baixa em animais com mastite sub-clínica (grupo positivo) do que em animais saudáveis (negativo). E, embora os resultados de ELISA estejam super-estimados em relação aos de LC-MS/MS, ambos os métodos foram capazes de detectar este comportamento. O menor teor de cortisol em animais “doentes” pode ser atribuído a uma hipo-ativação do eixo HPA, que é relatada em casos como depressão sazonal e estresse crônico. A menor concentração de cortisol observada nos animais com mastite sub-clínica evidencia que esses animais expressam endocrinologicamente os efeitos de uma infecção sub-clínica, mesmo que não sejam externados sintomas clínicos aparentes.

Levando-se em consideração os objetivos iniciais descritos neste trabalho, pode-se concluir que dois métodos analíticos foram desenvolvidos de acordo com os melhores padrões de análise bioanalítica, possibilitando o emprego das metodologias desenvolvidas em matrizes bovinas que, assim como demais matrizes da área veterinária, são carentes de metodologias específicas capazes de proporcionar confiabilidade analítica e reprodutibilidade aos resultados.

III – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Gerbig, S., Takáts, Z. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2010**, 24, 2186
- ² Randle, P.J., Hales, C.N., Garland, P.B., Newsholme, E.A. *Lancet*, **1963**, 1(7285), 785
- ³ Aguiar, A.C., Cottica, S.M., Sargi, S.C., Prado, I.N., Bonafé, E.G., França, P.B., Souza, N.E., Visentainer, J.V. *Eur. J. Lipid Sci Technol*, **2011**, 113, 269
- ⁴ Endo, Y., Ohta, A., Kidu, H., Kuriyama, M., Sakaguchi, Y., Takebayashi, S., Hirai, H., Murakami, C., Wada, S. *J Oleo Sci*, **2011**, 60(9), 451
- ⁵ Brannan, R.G., Connolly, B.J., Decker, E.A. *Trends Food Sci Technol*, **2001**, 12, 164
- ⁶ Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. *Food Chemistry*. 4th Ed. Springer, Berlim : 2009, p 170
- ⁷ Saraiva, S.A., Cabral, E.C., Eberlin, M.N., Catharino, R.R. *J Agric Food Chem*, **2009**, 57, 4030
- ⁸ Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. *Food Chemistry*. 4th Ed. Springer, Berlim : 2009, 158
- ⁹ Block, J.M., Barrera-Arelano, D. *Temas Selectos em Aceites y Grasas – Vol. 1 – Procesamiento*. Ed. Blucher. Brasil : **2009**, p 366
- ¹⁰ Bligh, E.G., Dyer, W.J. *Can. J Biochem Physiol*, **1959**, 37,911
- ¹¹ Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H. *J Biol Chem*, **1957**, 226, 497
- ¹² Seppänen-Laakso, T., Laakso, I., Hiltunen, R. *Anal Chim Acta* , **2002**, 465, 39.
- ¹³ Ha, J., Seo, D., Shin, D. *Talanta*, **2011**, 85, 252.
- ¹⁴ Chmilenko, F.A., Minaeva, N.P., Sidorova, L.P. *J Anal Chem* , **2011**, 66, 572
- ¹⁵ Ruiz-Samblasa, C., Gonzalez-Casadoa, A., Cuadros-Rodrigueza, L., Rodriguez, F.P. *Talanta*, **2010**, 82, 255.
- ¹⁶ MacDougall, K.M., McNichol, J., McGinn, P.J., O'Leary, S.J.B., Melanson, J.E. *Anal Bioanal Chem*, **2011**, 401, 2609.
- ¹⁷ Mansour M.P. *J Chromatogr. A*, **2005**, 1097, 54
- ¹⁸ Paik M-J., Kim H., Lee J., Brand J., Kim K-R. *J Chromatogr A*, **2009**, 1216, 5917.
- ¹⁹ Ha, J., Seo, D., Shin, D. *Talanta*, **2011**, 85, 252.
- ²⁰ Chmilenko, F. A., Minaeva, N. P., Sidorova, L. P. *J Anal Chem*, **2011**, 66, 572
- ²¹ Fasciotti, M., Netto A.D.P. Optimization. *Talanta*, **2010**, 81, 1116.
- ²² Byrdwell, W.C. *Lipids*, **2001**, 36, 327.
- ²³ Lísá, M., Netušilová, K., Franěka, L., Dvořakovaa, H., Vrkoslavb, V., Holčapek, M. *J Chromatogr A*, **2011**, 1218, 7499.

-
- ²⁴ Koulman, A., Woffendin, G., Narayana, V.K., Welchman, H., Crone, C., Volmer, D.A. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **2009**, 23, 1411.
- ²⁵ Catharino, R.R., Haddad, R., Cabrini, L.G., Cunha, I.B.S., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N. *Anal Chem*, **2005**, 77, 7429
- ²⁶ Picariello, G., Sacchib, R., Adde, F. *Eur J Lipid Sci Technol*, **2007**, 109, 511
- ²⁷ Takats, Z., Wiseman, J. M., Gologan, B., Cooks, R. G. *Science*, **2004**, 306, 471.
- ²⁸ Cody, R. B., Laramée, J. A., Durst, H. D. *Anal Chem*, **2005**, 77, 2297.
- ²⁹ Haddad, R., Sparrapan, R., Eberlin, M.N. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2006**, 20, 2901
- ³⁰ Haddad R., Sparrapan R., Kotiaho T., Eberlin M.N. *Anal Chem*, **2008**, 80, 898.
- ³¹ Alberici, R.M., Simas, R.C., Souza, V., Sá, G.F., Daroda, R.J., Eberlin, M.N., *Anal Chim Acta*, **2010**, 659, 15.
- ³² Lalli, P.M., Sanvido, G.B., Garcia, J.S., Haddad, R., Cosso, R.C., Maia, D.R.J., Zacca, J.B., Maldanerc, A.O., Eberlin, M.N. *Analyst*, **2010**, 135, 745
- ³³ Romão, W., Lalli, P.M., Franco, M.F., Sanvido, G.B., Schwab, N.V., Lanaro, R., Costa, J.L., Sabino, B.D., Bueno, M.I., As, G.F., Daroda, R.J., Souza, V., Eberlin, M.N. *Anal Bioanal Chem*, **2011**, 400, 3053
- ³⁴ Haddad, R., Catharino, R.R., Marques, L.A., Eberlin, M.N. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2008**; 22, 3662.
- ³⁵ Simas, R.C., Catharino, R.R., Cunha, I.B.S., Cabral, E.C., Barrera-Arellano, D., Eberlin, M.N., Alberici, R.M. *Analyst*, **2010**, 135, 738.
- ³⁶ Alberici, L.C., Oliveira, H.C.F., Catharino, R.R., Vercesi, A.E., Eberlin, M.N., Alberici, R.M. *Anal Bioanal Chem*, **2011**, 401, 1651.
- ³⁷ Simas R.C., Catharino R.R., Eberlin M.N., Barrera-Arellano D., Souza V., Alberici R.M. *J Am Soc Mass Spectrom.*, **2011**, submetido.
- ³⁸ Fernandes A.M.A.P., Simas R.C., Souza V., de Sá G.F., Daroda R.J., Eberlin M.N., Alberici R.M. *Energy Fuels*, **2011**, submetido.
- ³⁹ Hirabayashi A., Sakairi M., Koizumi H. *Anal Chem*, **1995**, 67, 2878.
- ⁴⁰ Hirabayashi A., Hirabayashi Y., Sakairi M., Koizumi H. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **1996**, 10, 1703
- ⁴¹ Dole, M., Mack, L.L., Hies, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., Alice, M.B. *J Chem Phys*, **1968**, 49, 2240.
- ⁴² Santos, V.G., Regiani, R., Dias, F.F.G., Romão, W., Jara, J.L.P., Klitzke, C.F., Coelho, F., Eberlin, M.N. *Anal Chem*, **2011**, 83, 1375.
- ⁴³ Schwab, N.V., Porcari, A.M., Coelho, M.B., Schmidt, E.M., Jara, J.L., Visentainer, J.V., Eberlin, M.N. *Analyst*, **2012**, artigo no prelo, DOI: 10.1039/c2an16312h
- ⁴⁴ Fraser, D. *Appl Anim Behav Sci*, **1999**, 65, 171.
- ⁴⁵ Rushen, J. *Appl Anim Behav Sci*, **2003**, 81, 199.

-
- ⁴⁶ Dantzer R., Mormède P. *J Anim Sci*, 1983, 57, 6.
- ⁴⁷ Selye, C. *J Hum Stress*, **1975**, 1, 37
- ⁴⁸ Thiry, E., Saliki, J., Bublot, M., Pastoret, P. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **1987**, 10, 59.
- ⁴⁹ Bruckmaier, R.M., Blum, J.W., *Symposium on milk synthesis: secretion and removal in ruminants*, **1996**, Berna, Suíça: School of Veterinary Medicine, 37.
- ⁵⁰ Busch, D.S., Hayward, L.S. *Biol Conserv*, **2009**, 142, 2844.
- ⁵¹ Jansen, A.S.P., Nguyen, X.V., Karpitskiy, V., Mettenleiter, T.M., Loewy, A.D. *Science*, **1995**, 270 (5236), 644.
- ⁵² Gatti, R., Antonelli, G., Prearo, M., Spinella, P., Cappellin, E., De Palo, E.F. *Clin Biochem*, **2009**, 42, 1205.
- ⁵³ Malek dos Reis, Barreiro, J.R., Moreno, J.F.G., Porcionato, M.A.F., Santos, M.V. *J Dairy Sci*, **2011**, 94, 4406.
- ⁵⁴ Negrão, J.A., Porcionato, M.A., Passille, A.M, Rushen, J. *J Dairy Sci*, **2004**, 87, 1713.
- ⁵⁵ Paiva, F.A., Negrão, J.A., Netto, A.S., Porcionato, M.A.F., Lima, C.G. *Rev. Bras. Zootec.*, **2006**, 35, 2376.
- ⁵⁶ Vining, R.F., McGinley, R.A., Maksvytis, J.J., Ho, K.Y. *Ann Clin Biochem.*, **1983**, 20, 329
- ⁵⁷ Gil, E.S., Kubota, L.T., Yamamoto, Y.I. *Quim Nova*, **1999**, 22(6), 874.
- ⁵⁸ Stanczyk, F.Z., Cho, M.M., Endres, D.B., Morrison, J.L., Patel, S., Paulson, R.J. *Steroids*, **2003**, 68, 1173.
- ⁵⁹ Leung, Y.S., Dees, K., Cyr, R., Schloegel, I., Kao, P.C. *Clin Chem*, **1997**, 43, 1250
- ⁶⁰ Ismail, A.A, Walker, P.L, Cawood, M.L, Barth, J.H. *Ann Clin Biochem*, **2002**, 39, 366
- ⁶¹ Farré, M., Kuster, M., Brix, R., Rubio, F., López de Alda, M.J., Barceló, D. *J Chromatogr A*, **2007**, 1160, 166
- ⁶² Taieb, J., Benattar, C., Birr, A.S., Lindenbaum, A. *Clin Chem*, **2002**, 48, 583
- ⁶³ Moal, V., Mathieu, E., Reynier, P., Malthiery, Y., Gallois, Y. *Clin Chim Acta*, **2007**, 386, 12
- ⁶⁴ Taieb, J., Benattar, C., Birr, A.S., Lindenbaum, A. *Clin Chem*, **2002**, 48, 583
- ⁶⁵ Wenzel, C., Schönreiter-Fischer, S., Unshelm, J. *Livest Prod Sci*, **2003**, 83, 237
- ⁶⁶ Shackleton, C., *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2010**, 121, 481.
- ⁶⁷ Marikin, H.L.J., Gower, D.B. *Steroid Analysis*. 2nd ed. Springer, New York, **2010**, p 249.
- ⁶⁸ Kushnir, M.M., Rockwood, A. L., Roberts, W. L., Yue, B., Bergquist, J., Meikle, A. W. *Clin Biochem*, **2011**, 44, 77.
- ⁶⁹ Guo, T., Taylor, R.L., Singh, R.J., Soldin, S.J. *Clin Chim Acta*, **2006**, 372, 76
- ⁷⁰ Taylor, P.J, Cooper, D.P., Gordon, R.D., Stowasser, M. *Clin Chem*, **2009**, 55, 1155.

-
- ⁷¹ Ionita I.A., Fast, D.M., Akhlaghi, F. *J Chromatogr B*, **2009**, 877, 765
- ⁷² Ceglarek, U., Kortz, L., Leichtle, A., Fiedler, G.M., Kratzsch, J., Thiery, J. *Clin Chim Acta*, **2009**, 401, 114.
- ⁷³ Schwarz, E., Liu, A., Randall, H., Haslip, C., Keune, F., Murray, M., Longo, N., Pasquali, M. *Pediatr Res*, **2009**, 66, 230.
- ⁷⁴ Rauh M. *Mol Cel Endocrinol*, **2009**, 302, 272
- ⁷⁵ Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M. *Science*, **1989**, 246, 64
- ⁷⁶ Horning, E.C, Carroll, D.I., Dzidic, I., Haegele, K.D., Hornining, M.G., Stillwell, R.N. *J Chromatogr Sci*, **1974**, 12, 725
- ⁷⁷ Robb, D.B., Covey, T.R., Bruins, A.P. *Anal Chem*, **2000**, 72, 3653
- ⁷⁸ Watson, J.T., Sparkman, O.D. Introduction to Mass Spectrometry. Instruments, applications and strategies for Data Interpretation. 4th ed. John Wiley & Sons Ltda., Chichester : **2008**, p 385
- ⁷⁹ Mansour M.P. *J Chromatog. A*, **2005**, 1097, 54
- ⁸⁰ Hill, M., Cibula, D., Havlikova, H., Kancheva, L., Fait, T., Kancheva, R., Parizek, A., Starka, L. *J Steroid Biochem Mol Biol*. **2007**, 105, 166
- ⁸¹ Chen, X.B., Wub, Y.L., Yang, T. *J Chromatogr B*, **2011**, 879, 799.
- ⁸² Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE n. 899, 29/05/2003, ANVISA, 2003.
- ⁸³ Hewavitharana, A.K. *J Chromatogr A*, **2011**, 1218, 359.
- ⁸⁴ Yang, J., Schmelzer, K., Georgi, K., Hammock, B.D. *Anal. Chem.*, **2009**, 81, 8085.
- ⁸⁵ Cappiello, A, Famiglini, G., Palma, P., Trufellia, H. *J Liq Chromatogr Rel Technol*, **2010**, 33, 1067.
- ⁸⁶ Yamamoto, A., Kakutani, N., Yamamoto, K., Kamiura, T., Miyakoda, H. *Environ Sci Technol*, **2006**, 40, 4132.
- ⁸⁷ Song, L. *Intern J Mass Spec*, **2001**, 303, 173.
- ⁸⁸ Greig, M.J., Bolaños, B., Quenzer, T., Bylund, J.M.R. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2003**, 17, 2763.
- ⁸⁹ Watson, J.T., Sparkman, O.D. Introduction to Mass Spectrometry. Instruments, applications and strategies for Data Interpretation. 4th ed. John Wiley & Sons Ltda., Chichester : **2008**, p 393
- ⁹⁰ Popot, M.A. *Analyst*, **1998**, 123, 2649.
- ⁹¹ Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C. *Quim Nova*, **2004**, 27 (5), 771.
- ⁹² Fernandes, R.M.T. Gomes, G.C., Porcari, A.M., Pimentel, J.R.V., Porciúncula, P.M., Martins-Júnior, H.A., Miguez, P.H.P., da Costa, J.L., Amaral, P.H., Perecin, F., Meurer, E.C., Furtado, P.V., Simas, R.C., Eberlin, M.N., Ferreira, C.R. Madureira, E.H. *Theriogenology*, **2011**, 76, 1266.
- ⁹³ Ahmadkhaniha, R., Shafiee, A., Rastkari, N., Khoshayand, M.R., Kobarfard, F. *J Chromatog B*, **2010**, 878, 845

-
- ⁹⁴ Fanelli, F., Belluomo, I., Di Lallo, V.D., Cuomo, G., De lasio, R., Baccini, M., Casadio, E., Casetta, B., Vicennatia, V., Gambineria, A., Grossib, G., Pasqualia, R., Pagotto, U. *Steroids*, **2011**, 76, 244.
- ⁹⁵ Kushnir, M.M., Neilson, R., Roberts, W.L., Rockwood, A.L. *Clin Biochem*, **2004**, 37, 357
- ⁹⁶ Tso, J., Aga, D.S., *J. Chromatogr A*, **2010**, 1217, 4784
- ⁹⁷ Shen, D.X., Lian, H.Z., Ding, T., Xu, J.Z., Shen, C.Y. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, 395, 2359
- ⁹⁸ Xia, X., Li, X., Ding, S., Zhang, S., Jiang, H., Li, J., Shen, J. *J. Chromatogr A*, **2009**, 1216, 2587
- ⁹⁹ Kotz, S., Johnson, N.L. *Least Squares, Encyclopedia of Statistical Sciences*. John Wiley & Sons, New York, **1983**, p 593-598.
- ¹⁰⁰ Negrão, J.A., Porcionato, M.A., de Passillé, A.M., Rushen, J. *J. Dairy Sci*, **2004**, 87, 1713.
- ¹⁰¹ Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G. *Annu Rev Physiol*, **2005**, 67, 259.
- ¹⁰² Nogueira, G.P., Barnabe, R.C. *Braz J Med Biol Res*, **1997**, 30(10), 1237
- ¹⁰³ Kumar, M., Kumar, R., Sharma, A., Jain, V.K. *Ital J Anim Sci*, **2007**, 6(2), 978.