



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

THIAGO INÁCIO BARROS LOPES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM PACIENTES COM
SOBREPESO TRATADOS COM ORLISTATE USANDO CG-EM E AVALIAÇÃO
DO PERFIL METABÓLICO DE PLASMA POR RMN DE ^1H**

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

ORIENTADOR: PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR THIAGO INÁCIO BARROS LOPES E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

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

L881a Lopes, Thiago Inácio Barros (1987-).
Avaliação do perfil de ácidos graxos em pacientes
com sobrepeso tratados com orlistate usando CG-EM e
avaliação do perfil metabólico de plasma por RMN de ¹H
/ Thiago Inácio Barros Lopes. – Campinas, SP: [s.n.],
2012.

Orientador: Anita Jocelyne Marsaioli.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Orlistate. 2. CG-EM. 3. Metabolômica. 4. RMN de
¹H. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of fatty acid profile in overweight subjects treated with orlistat applied GC-MS and evaluation of metabolic profile of plasma by ¹H NMR

Palavras-chave em inglês:

Orlistat
GC-MS
Metabolomics
¹H NMR

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

Anita Jocelyne Marsaioli [Orientador]
Gláucia Braz Alcântara
Carol Hollingworth Collins

Data de defesa: 28/02/2012

Programa de pós-graduação: Química

*“Dados não são iguais a informações;
informação não é igual a conhecimento,
e, mais importante de tudo,
conhecimento não é igual à sabedoria.*

*Nós temos oceanos de dados;
rios de informações,
poças de conhecimento,
e apenas respingos de sabedoria”*

Professor Henry Nix

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus. Aos meus pais Cirça e Inácio, por tudo que fizeram por mim por todos estes anos. A minha noiva Mayara, por todo amor e compreensão. A minha irmã Aryane e minha sogra Marisa, pela atenção e carinho.

A Prof. Dra. Anita J. Marsaioli, orientadora e amiga, pela confiança e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colaboradores, Prof. Dr. Bruno Geloneze (Coordenador do Laboratório de Investigação em Metabolismo e Diabetes LIMED - UNICAMP) e Dra. Sabrina Nagasaki (pós-doutoranda em Clínica Médica - UNICAMP) pelas amostras e importantes contribuições oferecidas a esta dissertação. A Lucas Gelain (doutorando em Química no Instituto de química - UNICAMP) por todo o trabalho no RMN.

Aos meus colegas de grupo, que caminharam junto comigo por estes dois anos: Adriana, Bruna, Carla, Carol, Célio, Daniele, Dávila, Diana, Fabiana, Felipe, Francine, Haleem, Lair, Lucas, Marcelo, Rafael, pela amizade e companheirismo durante estes anos. A Casey, pela parceria e contribuição dada ao trabalho.

A dona Maria, técnica do laboratório, pela amizade e todas as CCD preparadas.

Agradeço ao pessoal do RMN: Sônia, Anderson e Paula pela amizade e apoio.

A todos os meus professores do Instituto de Química da Unicamp, especialmente a Prof. Dra. Márcia Ferreira, por toda ajuda e ensinamentos de quimiometria.

A professora Dra. Carol Collins pela revisão dos artigos produzidos e participação das bancas de qualificação e defesa de mestrado. Aos professores Alviclér Magalhães, Cláudio Tormena pela participação da banca de qualificação.

Aos professores Fábio Gozzo, Bruno Geloneze pela participação na banca de defesa de mestrado.

A professora Dra. Glaucia Alcantara da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) por aceitar o convite e participar da banca de defesa.

Agradeço a **FAPESP** (processo n° **2010/04315-8**) por ter concedido a bolsa de mestrado e pelo auxílio financeiro ao projeto.

Agradeço a todos os meus familiares, pelo apoio e incentivo nesta jornada. A todos os meus amigos, de Campo Grande/MS e de Campinas/SP, por todos os momentos que passamos juntos.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional e pessoal, muito obrigado!

CURRICULUM VITAE

Nome Thiago Inácio Barros Lopes

Endereço eletrônico: inacio_thiago@hotmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

2005 - 2009 Graduação em Química-Licenciatura. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, Brasil

Título: *“Percepção das Condições de Laboratórios de Química e Atividades Práticas desenvolvidas na disciplina de Química de escolas do Ensino Médio de Campo Grande – MS”* **Orientador:** Prof. Dr. Dario Xavier Pires

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos:

1. Honda, N.K., Pavan, F.R., Coelho, R.G., Leite, C.Q.F., Micheletti, A.C., Lopes, T.I.B., Misutsu, M.Y., Beatriz, A., Brum, R.L., Leite, S. R. A. Antimycobacterial activity of lichen substances. *Phytomedicine (Stuttgart)*. , v.17, p.328 - 332, 2010.
2. CARLOS, I. Z, Quilles, M. B., CARLI, C. B. A., MAIA, D. C. G., BENZATTI, F. P., Lopes, T.I.B., GIANINI, A. S., BRUM, R. L., VILEGAS, W., SANTOS, L. C., HONDA, N. K. Lichen Metabolites Modulate Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide in Mouse Macrophages. *Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences*, v.64, p.664 - 672, 2009.
3. Lopes, T.I.B., Coelho, Roberta Gomes, Yoshida, Nídia Cristiane, Honda, Neli Kika. Radical-Scavenging Activity of Orsellinates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. , v.56, p.1551 - 1554, 2008.

Artigos completos escritos/submetidos a periódicos:

1. Thiago I. B. Lopes, Sabrina Nagassaki, Bruno Geloneze, Anita J. Marsaioli. A Simple Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method to Determine Fatty Acid Composition in Human Blood.
2. Sabrina Nagassaki, Thiago I. B. Lopes, Silka R. Geloneze, Christiane Stabe, Daniela Tezoto, Anita J. Marsaioli, Bruno Geloneze. Orlistat-induced Modulation on the Fatty Acid Composition of the Red Blood Cell Membranes and Plasma Lipids Fractions in Overweight Females. *J. Obesity*. Novembro/2011

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Lopes, T.I.B.; Marsaioli, A.J. Seleção de íons para determinação de Metil Ésteres de Ácidos Graxos por CG-EM no modo monitoramento seletivo de íons usando PCA,

- Resumos da 34a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.**
2. Lopes, T.I.B.; Marsaioli, A.J.; Neto, B.G.; Nagasaki, S. Quantitative Analysis by GC-MS of the Fatty Acid Profile of Patients Treated with Weight Loss Medications,
XL Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2011.
3. Casey A. Rimland, Thiago I. B.Lopes, Anita J. Marsaioli, Bruno G. Neto, Sabrina Nagasaki. Quantitative analysis using GC/MS of the fatty acid profile of patients treated with weight loss medication.
Anaheim (ACS), 2011.
4. Marcelo, M. Y., Lopes, Thiago Inácio Barros, Honda N. K., Coelho, R. G. Análise química de Ramalina sp. (líquen) e avaliação da atividade microbiana
Resumos da 31a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008.
5. Lopes, Thiago Inácio Barros, Honda N. K., Coelho, R. G. Avaliação do potencial antioxidante de substâncias fenólicas de líquens
XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, 2008.
6. LOPES, Thiago Inácio Barros, MARCELO, M. Y., Honda, Neli Kika, Coelho, R. G., Micheletti, A. C. Avaliação do potencial antioxidante de substâncias fenólicas de líquens
Resumos da 31a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008.
7. LOPES, Thiago Inácio Barros, Honda, Neli Kika, Coelho, Roberta Gomes Avaliação do potencial antioxidante de ésteres do ácido orselínico
Resumos da 30a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

Formação complementar (5 mais relevantes):

- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Construção de Conceitos em Química- Experimentação. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Fermentação Alcoólica e Destilação. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Resíduos Químicos em Laboratórios. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Estratégias Educacionais para o ensino de Química. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em I Escola de Verão em Química Verde. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

RESUMO

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM PACIENTES COM SOBREPESO TRATADOS COM ORLISTATE USANDO CG-EM E AVALIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DE PLASMA POR RMN DE ¹H

Palavras-chaves: *Orlistate, ácidos graxos, ésteres metílicos de ácidos graxos, plasma, membrana de eritrócitos, CG-EM, metabolômica, RMN de ¹H*

A organização mundial de saúde (OMS) estima que existam atualmente mais de 1,5 bilhões de adultos com sobrepeso, número que é esperado dobrar até 2015. Obesidade e sobrepeso são enfermidades caracterizadas pelo acúmulo excessivo de gordura corporal e têm sido associadas a vários problemas de saúde. Vários fármacos têm sido utilizados no tratamento desta enfermidade, entre os mais utilizados se encontra o Orlistate, um inibidor de lipases gástricas utilizado na redução da absorção de gordura da dieta, auxiliando na perda e manutenção do peso.

Esta dissertação teve como objetivo principal avaliar as alterações metabólicas sofridas por pacientes com sobrepeso tratados com Orlistate por 120 dias. Para tornar mais didático, o trabalho foi dividido em duas Partes: **Parte I**, implementação da metodologia analítica para análise de ácidos graxos por CG-EM e avaliação do perfil de ácidos graxos em indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate; e Parte II, avaliação do perfil metabólico de plasma por RMN de ¹H de indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate.

Na primeira etapa do trabalho, análise de componentes principais foi aplicada na seleção íons (*m/z*) para quantificação de ácidos graxos, após preparação de ésteres metílicos correspondentes, por CG-EM usando monitoramento de íons selecionados. Quatro íons foram então selecionados de forma a aumentar a

detectividade sem perda completa de informação qualitativa. Os íons de m/z 74, 79, 81 e 87 foram selecionados e permitiram a quantificação de vários ácidos graxos, além da determinação do número de insaturações dos mesmos relacionando a abundância relativa dos íons à presença de insaturações. A metodologia analítica implementada permitiu quantificar ácidos graxos esterificados em vários lipídios presentes no sangue, após transesterificação para produção dos ésteres metílicos de ácidos graxos, com adequada precisão, repetitividade e baixos limites de detecção e quantificação.

Na segunda etapa, a metodologia analítica foi aplicada no estudo do perfil de ácidos graxos de 20 mulheres com sobrepeso tratadas com Orlistate durante 120 dias. O tratamento não reduziu o índice de massa corpórea contribuiu para diminuição significativa dos níveis de colesterol-HDL no plasma e do conteúdo de colesterol na membrana de eritrócitos, além de alterar as proporções relativas de vários ácidos graxos essenciais e exógenos em vários lipídios estudados. Adicionalmente foi observado um perfil de ácido graxo significativamente diferente para os indivíduos magros (controles) em comparação com indivíduos com sobrepeso.

Na última etapa, o perfil metabólico de plasma por RMN de ^1H foi estudado por uma abordagem metabolômica. A análise discriminatória por quadrados mínimos parciais (PLS-DA) revelou que alterações nos níveis de lactato e magnésio são importantes na diferenciação entre indivíduos com sobrepeso tratados e não-tratados com Orlistate, sinalizando diminuição destes metabólitos relacionada ao tratamento. Não há relatos anteriores da alteração dos níveis de lactato devido ao tratamento. Adicionalmente, os níveis de triacilglicerídios, alanina e lactato contribuíram significativamente na distinção entre indivíduos magros e com sobrepeso.

ABSTRACT**EVALUATION OF FATTY ACID PROFILE IN OVERWEIGHT SUBJECTS TREATED WITH ORLISTAT APPLIED GC-MS AND EVALUATION OF METABOLIC PROFILE OF PLASMA BY ¹H NMR**

Keywords: *Orlistat, fatty acids, fatty acid methyl ester, plasma, red blood cell membrane, GC-MS, metabolomics and ¹H NMR*

The World Health Organization (WHO) estimates that there are currently more than 1.5 billion overweight adults, a number that is expected to double until 2015. Obesity and overweight are diseases characterized by excessive accumulation of body fat and linked to various health problems. Several drugs have been used to treat such diseases. Orlistat is a gastric lipase inhibitor largely used to reduce the absorption of dietary fat, helping weight loss.

Thus this thesis aimed at the metabolic variation of overweight subjects treated with Orlistat for 120 days. This work is divided into two parts: **Part I**, implementation of the analytical methodology for analysis of fatty acids by GC-MS and evaluation of the fatty acid profile in overweight subjects treated with Orlistat; and **Part II**, evaluation of the metabolic profile of plasma of overweight subjects treated with Orlistat using ¹H NMR.

In the **Part I** of this work, principal component analysis was applied to selected ions (m/z) for determination of fatty acids, after preparation of the corresponding methyl esters, by GC-MS using selected ion monitoring. Four ions were selected. The ions of m/z 74, 79, 81 and 87 allowed the quantification of various fatty acids and determination of the number of double bounds in the fatty acids through the relative abundance of these selected ions. The analytical methodology implemented permitted quantify esterifying fatty acids in various lipids in blood, after transesterification for production of methyl esters of fatty acids, with adequate accuracy, repeatability and low limits of detection and quantification.

In the second step, the analytical methodology was applied to study the fatty acid profile of 20 overweight women treated with Orlistat for 120 days. Although there was no significant reduction in body mass index, the treatment contributed to significant reduction of HDL-cholesterol levels in plasma and the cholesterol content in erythrocyte membranes. The Orlistat also alters the relative proportions of various fatty acids in the several lipids studied. Additionally, a significantly different fatty acid profile was observed for lean subjects (controls) compared to overweight subjects.

In **Part II**, the metabolic profile of plasma obtained by ^1H NMR was studied by a metabolomics approach. The partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) revealed changes in lactate and magnesium level, these metabolites were important to differentiating between overweight subjects treated and not-treated with Orlistat, suggesting that the level of these metabolites decreased with treatment. There are no previous reports of changes in lactate levels. Additionally, levels of triglycerides, alanine and lactate were highlighted by PLS-DA into distinguishing between lean and overweight individuals.

Índice Geral

Índice de Figura	xix
Índice de Tabelas.....	xxiii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xxv
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
1.1 Obesidade e sobrepeso.....	3
1.2 Orlistate	4
OBJETIVOS GERAIS	9
2.1 Objetivos específicos da Parte I.....	9
2.2 Objetivos específicos da Parte II.....	9
INTRODUÇÃO PARTE I.....	13
3.1 Ácidos graxos	13
3.2 Nomenclatura e representação de ácidos graxos.....	14
3.3 Biossíntese de ácidos graxos	16
3.4 Famílias de ácidos graxos	18
3.4.1 Família dos ácidos graxos saturados (AGS)	18
3.4.2 Família dos ácidos graxos monoinsaturados (AGMI)	19
3.4.3 Família dos ácidos graxos poliinsaturados n6 (AGPI-n6).....	19
3.4.4 Família dos ácidos graxos poliinsaturados n3 (AGPI-n3).....	20
3.5 Ácidos graxos essenciais.....	20
3.6 A importância da razão n6/n3	21
3.7 Orlistate e ácidos graxos	23
3.8 Determinação de ácidos graxos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	23
3.9 Seleção de íons para a análise de EMAG por monitoramento de íons selecionados (MIS)	24
3.10 Plasma e membrana de eritrócitos	25
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27

4.1 Implementação da metodologia analítica para determinação do perfil de ácidos graxos em sangue por CG-EM.....	27
4.1.1 Seleção dos íons para determinação de ésteres metílicos de ácidos graxos por monitoramento de íons selecionados usando análise de componentes principais (PCA)	27
4.1.2 Curvas de Calibração e Figuras de Mérito	36
4.2.2 Separação dos ésteres metílicos de ácidos graxos por CG	41
4.2.3 Perfil de ácidos graxos em membrana de eritrócitos e esterificados em fosfolipídios, triacilglicerídios e ésteres de colesterol de plasma.....	43
4.3 Avaliação das alterações do perfil lipídico dos pacientes tratados com Orlistate	49
4.3.1 Considerações gerais	49
4.3.2 <i>Efeitos do Orlistate nos parâmetros bioquímicos</i>	49
4.3.3 Efeito do Orlistate no perfil de ácidos graxos (análise exploratória)	52
CONCLUSÃO PARCIAL	63
INTRODUÇÃO PARTE II	67
6.1 Metabolômica e metabonômica	67
6.2 Metabolômica: origens e cenário atual	68
6.3 Aplicações da metabolômica	70
6.4 Ressonância magnética nuclear na metabolômica.....	73
6.5 Análise metabolômica.....	74
6.6 Análises quimiométricas	75
6.6.1 Análise de componentes principais	76
6.6.2 Análise discriminante por quadrados mínimos parciais	77
6.7 Pré-processamento dos dados	78
RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
7.1 Otimização dos parâmetros de aquisição	79
7.2 Análises quimiométricas	81
7.2.1 Análise de componentes principais (PCA).....	81
7.2.2 Análise discriminatória por quadrados mínimos parciais (PLS-DA).....	84

7.2.2.1	Análise de PLS-DA: indivíduos com sobrepeso antes e após o tratamento com Orlistate	84
7.2.2.2	Análise de PLS-DA: indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate e magros não-tratados	87
7.3	Identificação dos metabólitos diferenciais	90
7.4	Metabólitos diferenciais	92
CONCLUSÃO PARCIAL		97
PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS		101
9.1	Indivíduos e amostras	101
9.2	Isolamento de plasma e membrana de eritrócitos	101
9.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARTE I	102
9.3.1	Solventes e reagentes	102
9.3.2	Separação dos ésteres metílicos de ácidos graxos por cromatografia a gás	102
9.3.3	Análise multivariada dos espectros de massas	103
9.3.4	Curvas de calibração	103
9.3.5	Extração dos lipídios	104
9.3.6	Separação das frações lipídicas e preparação dos EMAG	104
9.3.7	Identificação dos EMAG produzidos pela transesterificação dos AG presentes em sangue	105
9.3.8	Determinação do colesterol na membrana	105
9.3.9	Análise estatística	107
9.4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARTE II	109
9.4.1	Reagentes	109
9.4.2	Preparação do plasma para análise do perfil metabólico por RMN de ^1H	109
9.4.3	Processamento dos espectros de RMN de ^1H	110
9.4.4	Análises quimiométricas	111
9.4.5	Análise de componentes principais	111
9.4.6	Análise discriminatória por quadrados mínimos parciais (PLS-DA) ...	112

9.4.7 Identificação dos metabólitos selecionados.....	112
REFERÊNCIAS.....	113
ANEXOS	129
Anexo A - Espectros de massas.....	129
Anexo B – Percentagem de abundâncias dos íons de m/z 74, 79, 81 e 87 nos espectros de massas obtidos por MIS de MEAG	136
Anexo C – Análise de componentes principais do perfil de ácido graxo individual dos lipídios estudados	138
Anexo C1 – Análise de componentes principais no perfil de ácido graxo de membrana de eritrócitos.....	139
Anexo C2 – Análise de componentes principais no perfil de ácido graxo de fosfolipídios de plasma	140
Anexo C3 – Análise de componentes principais do perfil de ácido graxo de Triglicerídeos de plasma.....	141
Anexo C4 – Análise de componentes principais no perfil de ácido graxo de ésteres de colesterol de plasma	142
Anexo D – Seleção das amostras para o conjunto de validação	143
Anexo E – Espectros de RMN de ^1H -TOCSY 1D do lactato	145
Anexo F – Experimentos de “ <i>spiked</i> ” para confirmação das ressonâncias de EDTA	146

Índice de Figura

Figura 1. Orlistate, éster de (S)-2-formilamino-ácido-4-metil-pentanóico (S)-1-[[[(2S, 3S)-3-hexil-4-oxo-2-oxetanyl] metil]-dodecila	4
Figura 2. Hidrólise dos triacilglicerídios em monoacilglicerídios e ácidos graxos livres catalisada pelas lipases	5
Figura 3 Ação do Orlistate no lúmen intestinal.....	5
Figura 4. Oleila-etanoamida [(Z)-N-(2-hidróxi-etila)octadec-9-enamida]	14
Figura 5. Esquema hipotético da distribuição de calorias da dieta ao longo dos anos.	22
Figura 6. Análise de componentes principais (CP = 3; 86,5%) a) gráficos de escores CP1 (55,56%) <i>versus</i> CP2 (25,89%); b) gráfico de pesos nos quais mostram a razão massa/carga.....	29
Figura 7. Abundâncias relativas dos íons de <i>m/z</i> 74, 79, 81 e 87 nos espectros de massas de EMAG obtidos por MIS	33
Figura 8. Gráfico de escores CP1 (82,12%) <i>versus</i> CP2 (17,83%) para os espectros de massas obtidos por monitoramento de íons selecionados (<i>m/z</i> 74, 79, 81 e 87).....	35
Figura 9. Curvas de calibração obtidas para os EMAG 14:0 e 16:1.....	36
Figura 10. Separação das frações lipídicas presentes em plasma e membrana de eritrócitos por CPCD	40
Figura 11. Exemplos de cromatogramas obtidos por CG-EM/MIS (<i>m/z</i> 74, 79, 81 e 87) indicando a separação dos EMAG preparados por transesterificação dos AG presentes em a) membrana de eritrócitos; b) fosfolipídios de plasma; c) triacilglicerídios de plasma e d) ésteres de colesterol de plasma.....	42
Figura 12. Análise de componentes principais do perfil total de AG (CP = 10; 94,11%); a) gráfico de escores mostrando CP1 (16,08%) <i>versus</i> CP2 (13,10%); b) gráfico de pesos, mostrando CP1 <i>versus</i> CP2	54
Figura 13. Comparação entre genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma em humanos e o número de entidades descritas atualmente(Adaptado de	

Wishart <i>et al.</i> , 2005)	71
Figura 14. Estratégia para análise de dados metabolômicos.....	75
Figura 15. Sequência de pulsos usada na obtenção dos espectros de RMN de ¹ H de amostras de plasma.....	79
Figura 16. Espectro modelo de RMN de ¹ H de plasma.....	82
Figura 17. Gráfico de escores da PCA (CP = 5; 98,66%) para os espectros de RMN de ¹ H centrados na média.....	83
Figura 18. Gráfico de escores da análise de PLS-DA ($R_{\text{calibração}} = 96\%$; $R_{\text{validação}} = 88\%$; CP = 7; 98,89%) para amostras de plasma provenientes de indivíduos com sobrepeso não-tratados (●) e tratados com Orlistate (■).....	85
Figura 19. Validação cruzada (“ <i>leave one out cross-validation</i> ”) e predição do conjunto de validação do modelo de PLS-DA da Figura 19.....	85
Figura 20. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA ($R_{\text{calibração}} = 96\%$; $R_{\text{validação}} = 88\%$; CP = 7; 98,89%) considerando apenas os indivíduos com sobrepeso tratados e não-tratados com Orlistate, mostrando a primeira CP versus deslocamento químico (ppm).....	87
Figura 21 . Gráfico de escores da análise de PLS-DA ($R_{\text{calibração}} = 94\%$; $R_{\text{validação}} = 85\%$; CP = 8; 99,58%) para amostras de plasma provenientes de indivíduos magros não-tratados (●) e indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate (●).....	88
Figura 22. Validação cruzada (“ <i>leave one out cross-validation</i> ”) e predição do conjunto de validação do modelo de PLS-DA da Figura 22.....	89
Figura 23. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA ($R_{\text{calibração}} = 94\%$; $R_{\text{validação}} = 85\%$; CP = 8; 99,58%) considerando apenas os indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate e magros não-tratados, mostrando a primeira CP versus deslocamento químico (ppm).....	90
Figura 24. Região dos espectros de RMN de ¹ H de plasma utilizada nas análises quimiométricas (intensidade x deslocamento químico); a) espectros modelos e b) assinalamento das ressonâncias mais significativas para discriminação dos	

grupos de amostras	91
Figura 25. Ciclo de Cori (adaptado de Zhang <i>et al.</i> , 2008)	93
Figura 26. Curva de calibração para determinação da concentração de colesterol na membrana de eritrócito	106



Índice de Tabelas

Tabela 1. Íons relevantes aos agrupamentos dos EMAG observados no gráfico de escores da PCA (Figura 7a)	30
Tabela 2. Percentagens de contribuição dos íons selecionados para os espectros de massas obtido por MIS para os EMAG	32
Tabela 3. Abundâncias relativas dos íons de m/z 74, 79, 81 e 87 para os espectros	33
Tabela 4. Percentagem de contribuição dos íons selecionados nos espectros de massas obtidos por MIS para alguns compostos e para um pico cromatográfico de dois EMAG co-eluídos	34
Tabela 5. Figuras de mérito para 22 EMAG de interesse	38
Tabela 6. Fatores respostas em função do número de carbonos	39
Tabela 7. Frações lipídicas e fatores de retenção.....	40
Tabela 8. Composição lipídica das membranas de eritrócitos	41
Tabela 9. Composição de ácidos graxos (g/100g) em membrana de eritrócitos	45
Tabela 10. Ácidos graxos (g/100g) presentes em fosfolipídios de plasma	46
Tabela 11. Ácidos graxos (g/100g) presentes em triacilglicerídios de plasma	47
Tabela 12. Ácidos graxos (g/100g) presentes em ésteres de colesterol de plasma	48
Tabela 13. Características dos indivíduos e parâmetros clínicos.....	51
Tabela 14. Desempenho do modelo PLS-DA na discriminação de indivíduos com sobrepeso tratados e não tratados com Orlistate.....	86
Tabela 15 . Assinalamento dos deslocamentos químicos dos metabólitos diferenciais do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de amostras de plasma..	92

Lista de abreviaturas e símbolos

RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de próton
PCA	análise de componentes principais
AG	ácidos graxos
AGCL	ácidos graxos de cadeia longa
AGE	ácidos graxos essenciais
AGI	ácidos graxos insaturados
AGL	ácidos graxos livres
EMAG	ésteres metílicos de ácidos graxos
AGMI	ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	ácidos graxos poliinsaturados
AGS	ácidos graxos saturados
CPCD	cromatografia preparativa em camada delgada
CG	cromatografia gasosa
COX	ciclooxigenases
CP	componentes principais
CPMG	Sequência de pulsos de Carr–Purcell–Meiboom–Gill
DIC	detector por ionização em chama
DP	desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
EC	ésteres de colesterol
EDTA	do inglês “ <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> ”
IE	ionização por elétrons
EM	espectrometria de massas
FCL	do inglês “ <i>fractional chain length</i> ”
FDA	do inglês “ <i>food and drug administration</i> ”
FL	fosfoglicerídios
FR	fator resposta
IMC	índice de massa corpóreo

Lista de abreviaturas e símbolos

IUPAC	do inglês “ <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ”
IUB	do inglês “ <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> ”
LoD	limite de detecção
LoQ	limite de quantificação
LDL	lipoproteínas de baixa densidade (do inglês “ <i>low-density lipoprotein</i> ”)
HDL	lipoproteínas de alta densidade (do inglês “ <i>high-density lipoprotein</i> ”)
ME	membrana de eritrócito
MG	monoacilglicerídios
MN	magros não-tratados com Orlistate
MIS	monitoramento de íons selecionados
n3	ácidos graxos com uma dupla ligação que dista 3 átomos de carbonos da metila terminal (ômega-3)
n6	ácidos graxos com uma dupla ligação que dista 6 átomos de carbonos da metila terminal (ômega-6)
PLS-DA	análise discriminatória por quadros mínimos parciais (do inglês “ <i>partial least squares discriminant analysis</i> ”)
PG	<i>Prostaglandins</i> landina
R	coeficiente de correlação de Pearson
RA	razão de área
SN	indivíduos com sobrepeso não-tratados com Orlistate
ST	indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate
TG	triacilglicerídios
TBX	tromboxano
t _R	tempo de retenção
VIT	varredura de íons totais

LISTA DE ABREVIATURAS DE ÁCIDOS GRAXOS

Símbolo	Nome usual do ácido	Nome IUPAC do ácido
6:0	capróico	hexanóico
8:0	caprílico	octanóico
10:0	cáprico	decanóico
11:0	undecílico	undecanóico
12:0	láurico	dodecanóico
13:0	tridecílico	tridecanóico
14:1	miristoleico	(Z)-11-tetradecenóico
14:0	mirístico	tetradecanóico
15:1	-	(Z)-10-pentadecenóico
15:0	pentadecílico	pentadecanóico
16:1	palmitoléico	(Z)-9-hexadecenóico
16:0	palmítico	hexadecanóico
17:1	-	(Z)-10-heptadecenóico
17:0	margárico	heptadecanóico
18:3 n_6	γ -linolênico	(Z,Z,Z)-6,9,12-octadecatrienóico
18:2 n_6	linoléico	(Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metila
18:1	oléico	(Z)-9-octadecenóico
18:2 n_6t	linoleláidico	(E,E)-9,12-octadecadienóico
18:3 n_3	α -linolênico	(Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienóico
18:1 n_9t	eláidico	(E)-9-octadecenóico
18:0	esteárico	octadecanóico
19:0	nonadecílico	nonadecanóico
20:4 n_6	araquidônico	(Z,Z,Z,Z)-5,8,11,14-eicosatetraenóico

LISTA DE ABREVIATURAS DE ÁCIDOS GRAXOS

Símbolo	Nome usual do ácido	Nome IUPAC do ácido
20:5 n 3	eicosapentaenóico	(Z,Z,Z,Z,Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico
20:3 n 6	di-homo- γ -linolênico	(Z,Z,Z)-8,11,14-eicosatrienóico
20:2 n 6	-	(Z,Z)-11,14-eicosadienóico
20:1	-	(Z)-11-eicosenóico
20:3 n 3	eicosatrienóico	(Z,Z,Z)-11,14,17-eicosatrienóico
20:0	araquídico	eicosanóico
21:0	-	heneicosanóico
22:6 n 3	docosahexaenóico	(Z,Z,Z,Z,Z,Z)-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico
22:2 n 6	-	(Z,Z)-13,16-docosadienóico
22:1 n 9	erúcico	(Z)-13-docosenóico
22:0	behênico	docosanóico
23:0	-	tricosanóico
24:1	nervônico	(Z)-15-tetracosenóico
24:0	lignocérico	tetracosanóico
TG(18:3/18:3/18:3)	tri- γ -linolênico	2,3-bis[[(9Z,12Z)-octadeca-9,12,15-trienoil]oxi]propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12,15-trienoato
TG(18:0/18:0/18:0)	tri-oléico	2,3-bis[[(Z)-octadec-9-enoil]oxi]propil (Z)-octadec-9-enoato

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Obesidade e sobrepeso

Obesidade e sobrepeso são enfermidades caracterizadas pelo acúmulo excessivo de gordura corporal. Têm sido associadas a essas enfermidades diversos problemas de saúde como aumento da incidência de doenças cardíacas, hipertensão, derrames, diabetes do tipo 2 e morte prematura (Mancini, 2001; Masuo *et al.*, 2001).

A organização mundial de saúde (OMS) estima que existam atualmente mais de 1,5 bilhões de adultos com sobrepeso, número que é esperado dobrar até 2015. Estima-se que o sobrepeso e obesidade sejam responsáveis por 44% dos casos de diabetes, 23% dos casos de isquemia cardíaca e até 41% da incidência de determinados tipos de câncer (WHO, 2011).

Estudos têm demonstrado que uma pequena redução no peso corpóreo é suficiente para melhorar a sensibilidade à insulina, reduzir os níveis de glicose, de colesterol, a pressão sanguínea e outros fatores de risco, além de reduzir a incidência de doenças cardiovasculares e processos inflamatórios (Wing *et al.*, 1994; Watts *et al.*, 1990; Ascherio *et al.*, 1993).

O tratamento da obesidade e do sobrepeso inclui, na maioria dos casos, alterações da dieta e prática de exercícios físicos. No entanto, em casos graves, nos quais a saúde do paciente está em risco, medicamentos são utilizados no auxílio à perda de peso (Bray, 2008; Clapham *et al.*, 2001). Os medicamentos mais usados atualmente podem ser divididos em duas grandes classes.

A primeira classe reúne as drogas que atuam no sistema nervoso central. Estes fármacos atuam sobre o sistema serotoninérgico e noradrenérgico do cérebro ou em vias endocanabinóide, suprimindo o apetite e contribuindo para diminuição da ingestão de alimentos (Bray, 2008; Wittert *et al.*, 2007). São exemplos de drogas desta classe aprovadas para uso em longo prazo a sibutramina e o rimonabanto.

A segunda classe de medicamentos inclui drogas que atuam sobre processos digestivos, comumente funcionando como inibidores seletivos de lipases gástricas. A droga mais popular desta classe, aprovada para uso em longo prazo, é o Orlistate (princípio ativo dos medicamentos Xenical® e Alli®) (Bray, 2008; Wittert *et al.*, 2007).

1.2 Orlistate

Orlistate, também conhecido como tetraidrolipstatina (**Figura 1**), é o inibidor de lipases atualmente mais utilizado no tratamento da obesidade e sobrepeso. Orlistate é um derivado semi-sintético de um inibidor de lipase naturalmente produzido pela *Streptomyces toxytricini*, aprovado pela ANVISA (agência nacional de vigilância sanitária) e pelo FDA (do inglês “*food and drug administration*”).

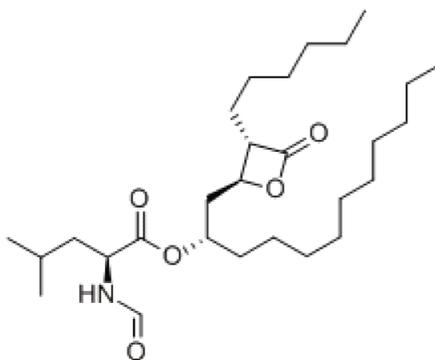


Figura 1. Orlistate, éster de (S)-2-formilamino-ácido-4-metil-pentanóico (S)-1-
[[[(2S, 3S)-3-hexil-4-oxo-2-oxetanyl] metil]-dodecila

Orlistate é um inibidor irreversível de lipases gastrointestinais e pancreáticas (EC 3.1.1.3), que atua na luz do estômago e no intestino delgado (Isler *et al.*, 1995). A inibição das lipases impede a hidrólise de triacilglicerídios (**TG**), principal lipídio da dieta, em AG livres e monoacilglicerídios (**MG**) absorvíveis (**Figura 2**). Assim, os TG não digeridos (**Figura 3**) não são absorvidos e serão eliminados de forma inalterada nas fezes, não contribuindo para o ganho de peso (Bray, 2008; Wittert *et al.*, 2007).

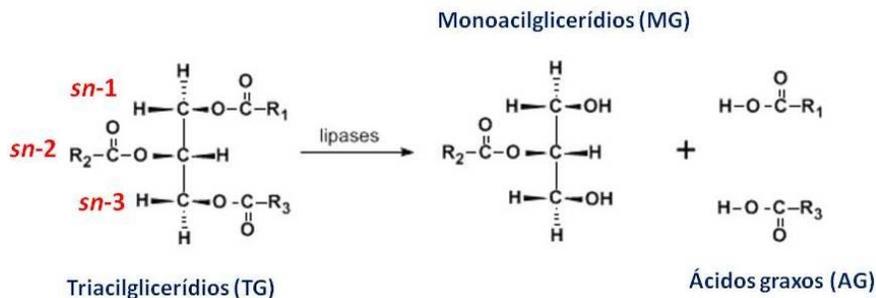


Figura 2. Hidrólise dos triacilglicerídios em monoacilglicerídios e ácidos graxos livres catalisada pelas lipases

Por outro lado, Orlistate não inibe, numa extensão significativa, outras enzimas presentes no sistema digestivo como hidrolases, tripsina, fosfolípase A2 e carboxiesterases (Harp, 1998; Gall *et al.*, 2004). Não deve, portanto, alterar a absorção de outros lipídios como FL e EC ou ainda a absorção de AG livres (Isler *et al.*, 1995).

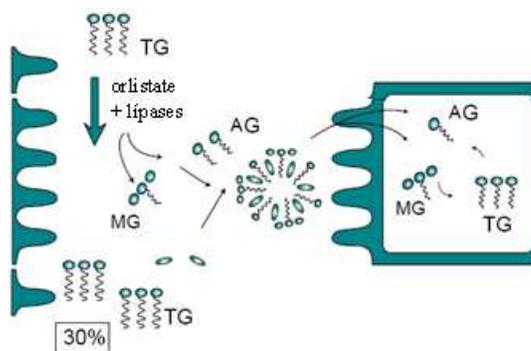


Figura 3 Ação do Orlistate no lúmen intestinal

“O fármaco inibe seletivamente as lipases, impedindo a hidrólise de triacilglicerídios (TG) em monoacilglicerídios (MG) e ácidos graxos (AG). Uma vez hidrolisado MG e AG formam micelas as quais são absorvidas no intestino, e podem ser reesterificadas como TG no organismo”

Quando administrado em conjunto com uma dieta hipocalórica, Orlistate pode

reduzir a absorção de gordura da dieta em até 30%. Harp (1998) relata que esta combinação é capaz de induzir uma redução de peso entre 0,25 e 0,5 kg/semana, durante várias semanas de tratamento, além de auxiliar na manutenção do peso por longos períodos. *Davidson et al.* (1999) acompanharam 1.187 pacientes tratados com Orlistate (120 mg, três vezes ao dia). Após um ano de tratamento, os pacientes que receberam o medicamento perderam em média 8,8% de massa comparado a 5,8% para aqueles que receberam placebo.

Embora seja um inibidor de lipases, Orlistate tem efeito limitado ou nenhum efeito sobre os níveis de TG em indivíduos com sobrepeso ou obesidade e níveis normais de TG e lipídios (*Drent et al.*, 1995), o fármaco também não altera os níveis pós-prandiais de lipídios e lipases plasmáticas em homens com peso e perfil lipídico normais, associado a uma dieta com baixos teores de lipídios (*Shepard et al.*, 2000).

Por outro lado, Orlistate tem se mostrado útil na normalização do perfil lipídico. O fármaco é capaz de reduzir o nível de TG em até 35% em pacientes com hipertrigliceridemia, além de reduzir em 19% os níveis de quilomícrons e remanescentes de quilomícrons circulantes, levando a uma melhora na trigliceridemia pós-prandial de indivíduos hiperlipidêmicos (*Reitsma et al.*, 1994). O medicamento reduz significativamente o nível de TG no período pós-prandial quando associado a uma dieta com moderados e altos teores de lipídios, o que suporta a hipótese de um perfil menos aterogênico de lipoproteínas durante a fase pós-prandial (*Suter et al.*, 2005).

Pelo seu mecanismo de ação, Orlistate pode não só diminuir a absorção de TG, mas também de outros nutrientes ou drogas lipossolúveis. Porém, não há relatos de deficiência de ácidos graxos essenciais (**AGE**) associados a esse tratamento. Embora os níveis plasmáticos de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e β -caroteno) foram menores em pacientes tratados com o fármaco, os mesmos permaneceram dentro da faixa de referência (*Davidson et al.*, 1999). E para manter níveis

plasmáticos normais de vitaminas lipossolúveis, podem ser utilizados suplementos durante o tratamento (Finer *et al.*, 2000).

A eficácia e segurança do Orlistate têm sido amplamente estudadas. Ballinger e Peikin (2002) mostram que uma combinação de Orlistate e uma dieta hipocalórica aumenta a perda de peso total sem prejuízos à saúde. O fármaco também tem oferecido benefícios no tratamento e na prevenção de diabetes. O estudo “*Xenical in the Prevention of Diabetes in Obese Subjects*” (XENDOS) mostrou que Orlistate (120 mg, três vezes ao dia) diminui a incidência cumulativa de diabetes em 37,7%, em indivíduos portadores de obesidade (IMC > 30 kg/m²) (Torgerson *et al.*, 2004).

Zhi *et al.* (1996) avaliaram a farmacocinética de uma única dose de Orlistate marcado com carbono-14, administrado a indivíduos saudáveis. A concentração máxima do fármaco obtida no plasma foi inferior a 2 ng/mL, com valor máximo obtido entre quatro e seis horas após a administração. Cerca de 96% do fármaco é eliminado de forma inalterada nas fezes (Clapham, 2001). Adicionalmente, foram encontrados na urina dois metabólitos resultantes da hidrólise do anel betalactâmico seguido da hidrólise da ligação éster do grupo N-formil-leucina, (Zhi *et al.*, 1996).

Estudos recentes demonstram que Orlistate pode se ligar irreversivelmente ao domínio tioesterase da enzima ácido graxo sintetase, a qual é super expressa em células tumorais. A infusão intra-peritônia de Orlistate diminui a proliferação e induz a apoptose de células prostáticas tumorais de ratos, possivelmente devido à inibição desta enzima, uma vez que a suplementação com ácido palmítico reverte à inibição (Kridel *et al.*, 2004). Administração oral do fármaco associada a uma dieta com altos níveis de lipídios tem prolongado ligeiramente (7-10%) a sobrevivência de ratos com câncer gastrointestinal (Dowling *et al.*, 2009).

OBJETIVOS GERAIS

Esta dissertação avaliou as alterações metabólicas de indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate associado a uma dieta hipocalórica. Alterações no perfil de AG foram avaliadas através de CG-EM e são apresentadas na **Parte I**. Alterações no perfil metabólico de plasma foram investigadas por uma abordagem metabolômica, usando RMN de ^1H , e são descritas na **Parte II**.

2.1 Objetivos específicos da Parte I

1. Aplicação da PCA na seleção de íons para determinação de EMAG por MIS;
2. Implementação da metodologia analítica para determinação do perfil de AG, após preparação dos EMAG, de diversos lipídios presentes em sangue por CG-EM;
3. Avaliação das alterações no perfil lipídico de ME e plasma com o tratamento;
4. Avaliação das alterações na composição de AG da ME e FL, TG e EC presentes no plasma com o tratamento;
5. Comparação do perfil lipídico e composição de AG obtidos para indivíduos com sobrepeso, antes e após o tratamento com Orlistate, e os obtidos para indivíduos magros não tratados submetidos à mesma dieta.

2.2 Objetivos específicos da Parte II

6. Avaliar as alterações no perfil metabólico de plasma devido ao tratamento com Orlistate;
7. Identificar marcadores metabólicos para o tratamento com Orlistate;
8. Comparar o perfil metabólico de plasma obtido para indivíduos com sobrepeso, antes e após o tratamento com Orlistate, com o perfil obtido para indivíduos magros não-tratados com Orlistate e submetidos à mesma dieta.

PARTE I:

IMPLEMENTAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE
ÁCIDOS GRAXOS DE PACIENTES COM SOBRE PESO TRATADOS COM ORLISTATE

INTRODUÇÃO PARTE I

3.1 Ácidos graxos

Gorduras, como são comumente denominados muitos lipídios, são os nutrientes mais marcadamente relacionados a doenças crônicas como obesidade, sobrepeso, diabetes, câncer, arteriosclerose, doenças cardíacas entre outras. Devido ao grande número de doenças relacionadas aos lipídios, existe a falsa idéia que as gorduras são totalmente prejudiciais a saúde, entretanto, a ingestão adequada de lipídios é importante, pois, fornecerem energia, funciona como veículo para vitaminas, nutrientes, antioxidantes lipossolúveis e como fonte de AG.

Segundo a IUPAC-IUB (*International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), AG são ácidos monocarboxílicos alifáticos que podem ser liberados pela hidrólise de gorduras e óleos de ocorrência natural (IUPAC-IUB, 1976). AG podem ser saturados (**AGS**), monoinsaturados (**AGM**) ou poliinsaturados (**AGPI**) dependendo do número de duplas ligações presentes na cadeia alquílica. AG podem ser de cadeias curtas (C₂-C₆), médias (C₈-C₁₂) e longas (C₁₄-C₄₀), sendo que os AG mais comuns, em mamíferos, possuem números pares de carbono e cadeias normais. (Rodriguez *et al.*, 2007).

É muito comum a preocupação apenas com a quantidade de calorias que o alimento lipídico fornecerá a dieta, mas assim como aminoácidos e carboidratos, cada AG possui papel biológico específico.

A composição e quantidade de AG no plasma e tecidos resultam de vários processos como ingestão, absorção intestinal, metabolismo, troca entre compartimentos e incorporação em lipídios. AG podem ser encontrados livres no plasma ou ligados a albumina, embora a maior Parte se encontre esterificado em lipídios como fosfolipídios (**FL**), acilgliceróis (monoacilglicerídios, diacilglicerídios e triacilglicerídios) ou ainda como ésteres de colesterol (**EC**) (Risé *et al.*, 2007).

Cada lipídio possui uma composição típica de AG, a qual é definida pela dieta

(podendo ser usada para estimar a qualidade da mesma, especialmente quanto à ingestão de AG exógenos), incidência de eventos patológicos ou intervenções farmacológicas (Nakamura e Nara, 2004) e consumo de cigarros, álcool e drogas (Vane, 1971).

AG presentes em N-acil-etanoamidas, tem atraído interesse devido à suas atividades biológicas. Oleila-etanoamida [(Z)-N-(2-hidróxi-etila)octadec-9-enamida] (**Figura 4**) é um regulador endógeno da ingestão de alimentos, com potencial atividade anti-obesidade (Gaetani *et al.*, 2003). Enquanto palmitila-etanoamida [N-(2-hidróxi-etila)hexadecanamida] possui atividade anti-inflamatória, e estearila-etanoamida [N-(2-hidróxi-etila)octadecanamida] é um agente pró-apoptóticos (Sun *et al.*, 2004). Demonstrando claramente a influência do AG na atividade biológica do lipídio.

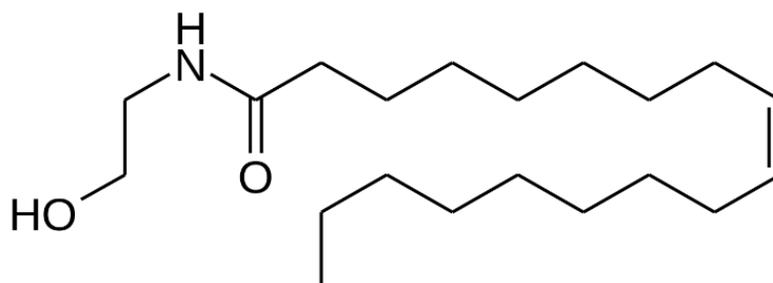


Figura 4. Oleila-etanoamida [(Z)-N-(2-hidróxi-etila)octadec-9-enamida]

3.2 Nomenclatura e representação de ácidos graxos

É frequente o uso dos nomes comuns de AG, o qual está normalmente associado à fonte mais abundante do mesmo. Para sermos mais precisos, é desejável identificar os AG utilizando as regras IUPAC de nomenclatura. Porém, para tornar mais fácil a escrita, representaremos, neste trabalho, os AG por símbolos, os quais representarão o número de carbonos e o número de insaturação do mesmo.

Por exemplo, o ácido palmítico (nome usual) ou ácido hexadecanóico (nome IUPAC) será representado por 16:0, pois possui 16 átomos de carbonos e nenhuma insaturação. Já o ácido oléico ou octadecenóico será representado por 18:1, pois possui 18 carbonos e uma única insaturação (IUPAC-IUB, 1967).

Quando há mais de uma dupla ligação em uma mesma molécula ela pode ser do tipo conjugada, separadas por apenas um carbono, ou não conjugadas separadas por mais de um carbono. AGPI naturais em animais e vegetais superiores são predominantemente *cis* e com ligações duplas não conjugadas, contendo normalmente dois carbonos entre as duplas ligações (Cyberlipid, 2010).

Para a completa identificação de um AGPI, é necessário indicar não só o número de duplas ligações, mas também a posição das mesmas. Do ponto de vista bioquímico representa-se a posição da última dupla ligação a qual é a possui maior relevância biológica (influência a biossíntese e metabolismo do AGPI). São comuns duas formas de indicar a posição da última dupla ligação: com a letra *n* ou a letra grega ω (ômega) seguidos de um número, o qual indica o número de átomos de carbonos que a dupla ligação dista da metila terminal, contando a partir deste. Por outro lado na IUPAC, a posição das insaturações é indicada constando-se a partir do carbono carboxílico. Neste trabalho adotaremos a representação *n*, assim, o ácido linoléico ((*Z,Z*)-9,12-octadecadienoato de metila – nome IUPAC) será representado por 18:2*n*6, pois a última dupla ligação dista de seis átomos de carbonos da metila terminal.

AG insaturados endógenos em mamíferos apresentam predominantemente isomeria *cis*, enquanto AG insaturados de isomeria *trans* possam ser encontrados em alguns microorganismos e vegetais, já AGPI com algumas ligações *cis* e outras *trans*, raramente são encontradas na natureza. Neste trabalho, todos os AG insaturados representados serão considerados *cis*, ao menos que expressamente indicado o contrário. Por exemplo, o ácido *trans,trans*-9,12-octadecadienóico será representado por 18:2*n*6*t*.

A configuração de derivados de glicerol será indicada através de numeração estereoespecífica. Considerando a projeção de Fischer do glicerol, na qual a hidroxila do carbono-2 está à esquerda, o átomo de carbono que aparece no topo na a projeção é designado como *sn*-1 (**Figura 2**), onde prefixo "*sn*" (do inglês "*stereospecifically numbered*") indica o uso desta notação (IUPAC-IUB, 1978).

3.3 Biossíntese de ácidos graxos

O ácido palmítico (16:0) é o produto final da síntese de AG catalisada pelo complexo enzimático ácido graxo sintetase presente no citoplasma. AG maiores e/ou insaturados são obtidos por elongações e dessaturações sucessivas nas mitocôndrias ou nos microsomas.

Elongações ocorrem através da condensação entre moléculas de acetil-CoA e AG, catalisada pelas elongases. Este processo leva a inserção de dois átomos de carbono na cadeia carbônica, justificando a prevalência de AG com números pares de átomos de carbono.

Dessaturases é um conjunto de enzimas, o qual catalisa a remoção de dois átomos de hidrogênio de um AG formando uma dupla ligação entre átomos de carbono. Na representação usada na **Figura 5**, a formação de uma dupla ligação por uma dessaturase tem sua posição indicada pelo número à direita (por exemplo, $\Delta 6$ -dessaturases formam uma dupla ligação no sexto átomo de carbono a partir da carboxila).

Três dessaturases têm sido relatadas em humanos: $\Delta 9$ -dessaturases (ou *stearoil-Coa dessaturase*, as quais catalisam a síntese de AGMI); $\Delta 6$ -dessaturases e $\Delta 5$ -dessaturases, as quais catalisam a síntese de AGPI (Nakamura e Nara, 2004). Como estas enzimas podem inserir uma dupla ligação no máximo até o nono carbono a partir da carboxila, os AG 18:2 n 6 e 18:3 n 3 não podem ser sintetizados em mamíferos e devem ser obtidos da dieta, sendo considerados como ácidos graxos essenciais (**AGE**).

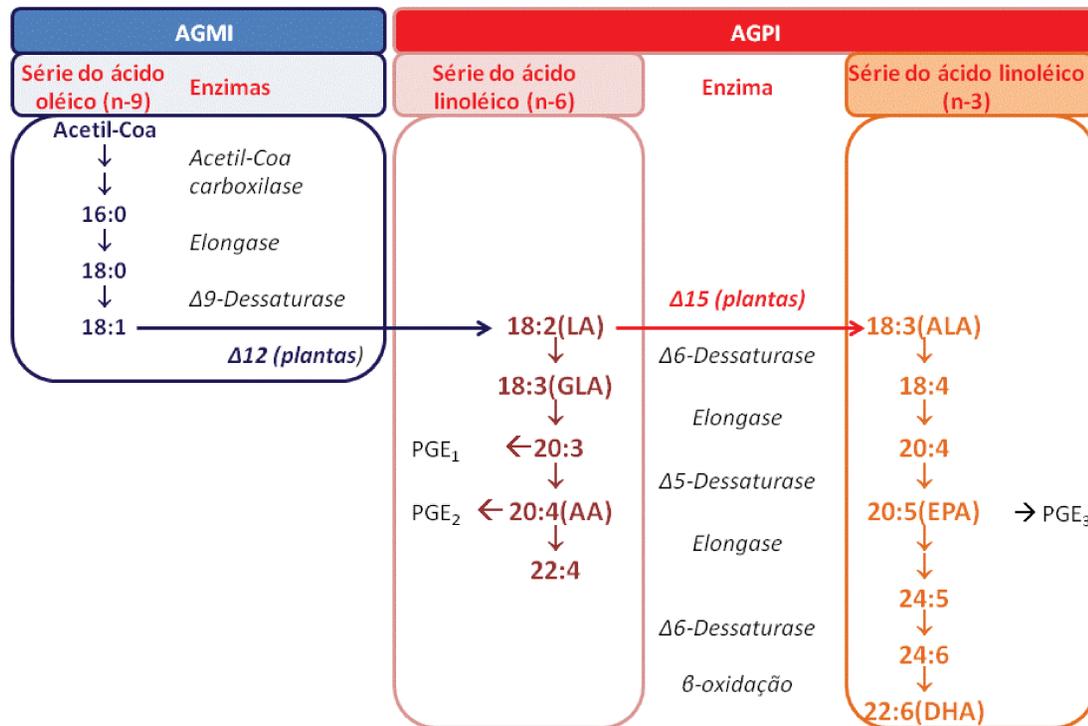


Figura 5. Biossíntese de AG através de alongação e dessaturação sucessivas.

“As enzimas $\Delta 12$ e $\Delta 15$ -dessaturases são encontradas apenas em plantas e AG num mesmo nível (linha) do caminho biossintético competem pela mesma enzima” **Legenda:** PG, Prostaglandinslandina; TBX, tromboxano; LA, ácido linoléico; AA, ácido araquidônico; ALA, ácido α -linoléico; GLA, γ -linoléico; EPA, ácido eicosapentaenóico; DHA, ácido docosaexaenóico (adaptado de Nakamura e Nara, 2004 e Pan et al., 2004)

Como mostra a **Figura 5**, $18:3n3$ é precursor de $20:5n3$ e $22:6n3$. Assim, um nível adequado de $18:3n3$ asseguraria, em tese, níveis adequados destes AG. Porém, a conversão de $18:3n3$ a $20:5n3$ e $22:6n3$ é limitada em humanos, acredita-se que apenas 5% do $18:3n3$ se converta a $22:6n3$ (Gerster, 1998). Esta conversão é ainda menor na presença de grandes quantidades de $18:2n6$, o qual compete com $18:3n3$ pela enzima $\Delta 6$ -dessaturase, a qual catalisa a etapa limitante da síntese de AGPI (Brenna et al., 2009). Assim, quantidades suplementares de $20:5n3$ e $22:6n3$ devem ser obtidas da dieta, para manter níveis adequados de AGPI- $n3$.

Os efeitos resultantes da suplementação de um AG no organismo são complexos, pois o AG pode favorecer ou desfavorecer a biossíntese de outros AG. Por exemplo, suplementação com 18:3n6 é efetiva na redução de mediadores da inflamação e na atenuação dos sintomas clínicos relacionados a desordens inflamatórias crônicas como artrite reumatóide. Muito dos efeitos clínicos de 18:3n6 foram atribuídos à inibição da conversão de 20:4n6 a eicosanóides bioativos, porém 18:3n6 é precursor de 20:4n6, e a suplementação de 18:3n6 aumenta os níveis de 20:4n6, embora diminua sua conversão a eicosanóides (Barham *et al.*, 2000).

O aumento no nível de 20:4n6, devido ao efeito pró-inflamatórios, é potencialmente nocivo a saúde. Barham *et al.* (2000) demonstram que o aumento nos níveis de 20:4n6 pode ser revertido pela adição de 20:5n3, uma vez que AGPI-n3 competem pela a enzima $\Delta 6$ -dessaturases. Embora haja reciprocidade, 20:4n6 inibe de forma menos eficiente a biossíntese de 20:5n3.

3.4 Famílias de ácidos graxos

Todos os AG de ocorrência natural em mamíferos podem ser classificados em uma das quatro famílias ou séries de AG a seguir.

3.4.1 Família dos ácidos graxos saturados (AGS)

AGS são endógenos, podendo ser sintetizados a partir do acetil-CoA, proveniente do metabolismo de carboidratos. O número de átomos de carbono no AGS é determinado por um processo de alongação sucessiva, a qual possui, normalmente, entre 12 e 24 átomos de carbono (Cyberlipid, 2010).

AGS são encontrados principalmente em gorduras de origem animal (incluindo carne, leite e manteiga) e são comumente consideradas como menos saudáveis que as gorduras com maior proporção de AGI, encontradas principalmente em vegetais. Neste sentido, inúmeras revisões têm examinado a relação entre

doenças cardiovasculares e a ingestão de gorduras saturadas. Mozaffarian *et al.* (2010) relatam uma redução de 19% nos eventos coronarianos devido à substituição de AGS da dieta por AGPI. Danaei *et al.* (2009) reportam a diminuição de 1-5% na mortalidade devido a doenças cardíacas, para cada 1% de calorias provenientes de AGS substituída por AGPI. Hooper *et al.* (2001) relatam que a redução no consumo de gordura total, AGS e colesterol reduzem a incidência de doenças coronarianas em 16% e o número de mortes em 9%.

3.4.2 Família dos ácidos graxos monoinsaturados (AGMI)

AGMI podem ser do tipo $n7$ ou $n9$, sendo os últimos mais comuns. A família dos AGMI- $n9$ é conhecida como família do ácido oléico (18:1) por ser este AG precursor dos demais membros da série. O 18:1 é formado através da desidrogenação microssomal de 18:0 catalisada pela enzima $\Delta 9$ -*dessaturase*.

3.4.3 Família dos ácidos graxos poliinsaturados $n6$ (AGPI- $n6$)

São também conhecidos como família do ácido linoléico (18:2 $n6$) por ser este o AG precursor dos demais membros da série, os quais são sintetizados através de alongações e dessaturações sucessivas. O 18:2 $n6$ é um AGE, ou seja, não pode ser sintetizado pelo organismo. Humanos também não podem converter 18:2 $n6$ em 18:3 $n3$, devido à ausência de $\Delta 15$ -*dessaturases*.

A produção excessiva de eicosanóide $n6$ (derivados do ácido araquidônico) tem sido associada ao aumento da incidência de ataques cardíacos, acidentes vasculares cerebrais e trombóticos, arritmia, artrite, osteoporose, inflamação, distúrbios do humor, obesidade e câncer (Smith, 2008). AGPI- $n6$ também estão relacionados a processos inflamatórios, nos quais inibidores da COX-1 e COX-2 podem ser utilizados no tratamento da inflamação e da dor (Cleland, 2006). Um aumento no consumo de AGPI- $n6$ tem sido associado ao aumento da probabilidade de mulheres na pós-menopausa desenvolverem câncer de mama (Sonestedt *et al.*, 2008) e homens desenvolverem câncer de próstata (Yong, 2007).

3.4.4 Família dos ácidos graxos poliinsaturados n3 (AGPI-n3)

É também conhecida como família do ácido linolênico (18:3n3) por ser este o precursor dos demais membros da série, formados por processos de elongações e dessaturações sucessivas. 18:3n3 é um AGE e consideráveis efeitos benéficos à saúde têm sido associados ao seu consumo, possivelmente mediados por metabólitos oxigenados derivados do ácido eicosapentaenóico (20:5n3), chamadas de resolvinas e protectinas, as quais possuem atividade antiinflamatória e imunorregulatória na concentração de picomolares (Serhan e Petasis, 2011).

A ingestão de AGPI-n3 tem sido associada à redução do risco de doenças coronarianas, morte súbita cardíaca, efeito antiarrítmico, inibição da agregação plaquetária, redução da viscosidade sanguínea, supressão da formação de leucotrienos, redução da resistência à insulina, diminuição dos níveis de TG, fibrinogênio e pressão sanguínea (Freije, 2009). 22:6n3 é o AGPI-n3 mais abundante no cérebro e na retina (Spector, 1999), a deficiência de 22:6n3 foi associada ao declínio cognitivo, depressão e aumento da morte de células neuronais (Serhan *et al.*, 2004; McNamara, 2007).

3.5 Ácidos graxos essenciais

Em 1929 num estudo pioneiro, Burr e Burr, realizado em 1929, demonstrou que a completa ausência de lipídios na dieta de ratos causava deficiências como necrose da cauda, diminuição do crescimento, morte prematura, dermatites, queda de pêlo e feridas na pele. Os autores também mostraram que pequenas quantidades de gordura de porco adicionadas diariamente à dieta levavam a regressão dos processos mórbidos, demonstrando a importância dos lipídios para o funcionamento normal do organismo.

Outros estudos em animais de laboratório têm demonstrado que AGE são mais importantes para jovens do que adultos e que 18:3n3 assim como os outros AGPI-n3 não substituem o 18:2n6 nas síndromes de deficiência de AG (Guarnieri e

Johnson, 1970). Estudos em humanos com dietas livres de lipídios por longos períodos não são possíveis e dietas com baixos teores de AG têm demonstrado síndrome de deficiência apenas para o AG 18:2n6 (Makrides *et al.*, 1995).

O termo AGE é aplicado na literatura em duas ocasiões distintas, uma no sentido fisiológico a outra no sentido nutricional. No sentido fisiológico, consideramos como um AGE um AG que tenha importância vital para as atividades celulares, como os AG 20:4n6, 20:5n3 e 22:6n3, cujas ausências irão manifestar síndromes de deficiência.

Por outro lado, podemos entender AGE como um AG que precisa ser ingerido na dieta, pois não pode ser sintetizado pelo organismo, nem mesmo a partir de um precursor, sentido nutricional. Neste sentido, apenas os AG 18:2n6 e 18:3n3 seriam essenciais.

Os AGPI como 20:4n6, 20:5n3 e 22:6n3 embora essenciais no sentido fisiológico, não são essenciais em relação à dieta, pois podem ser sintetizados a partir dos precursores 18:2n6 e 18:3n3, como mostra a **Figura 5** (Nakamura e Nara, 2003). Neste trabalho, consideraremos como AGE aqueles que devem necessariamente ser obtidos a partir da dieta.

3.6 A importância da razão n6/n3

Simopoulous (2002) descreve as alterações observadas na dieta ocidental, especialmente quanto à ingestão de AGE, nos últimos 150 anos. Segundo o estudo, humanos vivem atualmente num ambiente significativamente diferente daquele para o qual nossa constituição genética foi selecionada. As principais alterações observadas na dieta foram: aumento na ingestão de calorias e diminuição do gasto calórico; aumento no consumo de grãos de cereais, gorduras saturadas e AG-*trans*; diminuição da ingestão de AG-n3, frutas, vegetais, proteínas, antioxidantes e cálcio (**Figura 6**).

A dieta ocidental atual é deficiente em AG- $n3$, de forma que a razão $n6/n3$ está entre 15 e 20 (Simopoulous, 2008), enquanto a OMS recomenda para adultos saudáveis uma razão $n6/n3$ entre três e quatro (WHO, 1993). No período paleolítico, esta razão era de aproximadamente um (Simopoulous, 2008).

Algumas populações atingem proporções $n6/n3$ adequadas e respostas moderadas aos eicosanóides através da ingestão de quantidades relativamente grandes de AGPI- $n3$ (como o Japão e a Groenlândia), enquanto outras populações alcançam os mesmos objetivos através de uma menor ingestão quantidades menores de AGPI- $n6$ (como povos do Mediterrâneo) (Landsberg *et al.*, 1992).

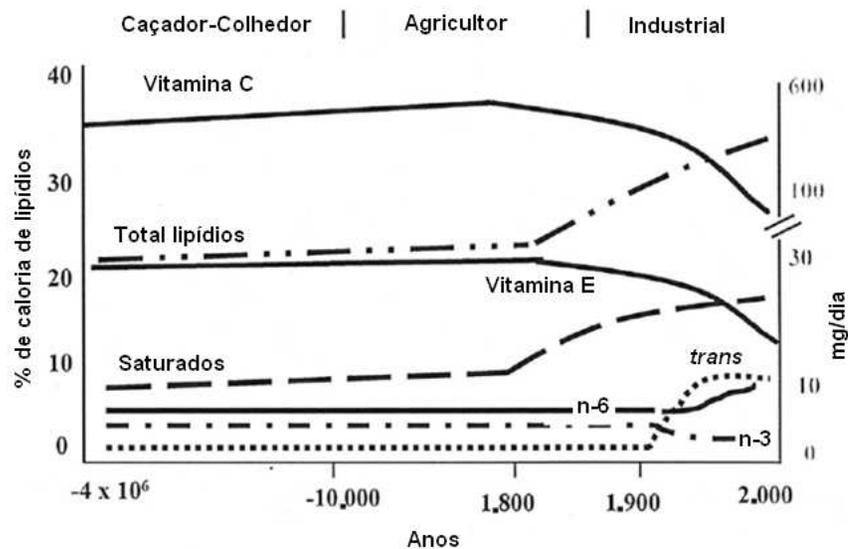


Figura 5. Esquema hipotético da distribuição de calorias da dieta ao longo dos anos.

AGS, AG- $n6$, AG- $n3$ e AG-*trans* são apresentados como percentual de calorias provenientes da ingestão de lipídios (escala à esquerda); ingestão de vitaminas C e E, total de lipídios são apresentados como mg/dia (escala à direita). Adaptado de Simopoulous, (2002)

A diminuição da razão $n6/n3$ tem efeitos antiinflamatórios, cardioprotetivo e efeitos benéficos em pacientes com artrite reumatóide e asma, além da redução na incidência de câncer de colo e pulmão e depressão (Simopoulous, 2008). Uma elevada razão $n6/n3$, está associada ao aumento dos níveis de eicosanóides derivados de $20:4n6$ em relação aos derivados de $20:5n3$, o que favorece a formação de ateromas e trombos; aumento na incidência de processos alérgicos, desordens inflamatórias, viscosidade do sangue, vasoespamos, vasoconstrição e diminuição no tempo de sangramento (Simopoulous, 2002).

3.7 Orlistate e ácidos graxos

Apesar do grande número de estudos sobre a eficácia do Orlistate no auxílio à perda de peso, pouco se sabe sobre os efeitos deste medicamento a nível celular e o seu impacto no perfil de AG.

Hernandez *et al.* (2010) reportam que a administração de Orlistate associado a uma dieta hipercalórica reduz a incorporação de AGPI- $n3$ em lipídios presentes no sangue (plasma e eritrócitos) e em tecidos de ratos tratados por 21 dias com o fármaco.

O único relato existente dos efeitos do Orlistate no perfil de AG em humanos foi publicado por Vidgren *et al.* (1999). Os autores relataram que o tratamento de indivíduos obesos com Orlistate em conjunto com uma dieta hipocalórica, por um ano, resulta na diminuição na proporção de vários AG provenientes da dieta.

Por fim, ainda não há relatos sobre os impactos do tratamento com Orlistate em indivíduos com sobrepeso, nem sobre as alterações observadas no perfil lipídico de eritrócitos.

3.8 Determinação de ácidos graxos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Várias metodologias podem ser aplicadas na determinação do perfil de AG em amostras biológicas. A metodologia atualmente mais utilizada compreende as seguintes etapas:

(a) extração dos lipídios presentes em sangue ou tecidos, geralmente baseados no de Folch ou no método de Bligh e Dyer (Iverson *et al.*, 2001);

(b) isolamento do lipídio de interesse (TG, FL, EC ou AGL) por cromatografia preparativa em camada delgada ou extração em fase sólida;

(c) preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos (**EMAG**) e por fim;

(d) extração dos EMAG com um solvente de baixa polaridade;

(e) separação dos EMAG por cromatografia gasosa (**CG**);

(f) quantificação dos EMAG por detector de ionização em chamas (**DIC**) ou espectrometria de massas (**EM**) (Rodriguez *et al.*, 2010).

3.9 Seleção de íons para a análise de EMAG por monitoramento de íons selecionados (MIS)

A determinação de EMAG por CG acoplado DIC (detector de ionização em chama) é um método bem estabelecido na literatura, o qual apresenta alta detectibilidade, repetitividade e boa correlação linear sobre uma ampla faixa de concentrações (Eder, 1995). Porém, DIC falha na identificação inequívoca do analito e EM frequentemente é usada para confirmar a identidade dos AG.

CG-EM no modo varredura de íons totais (VIT) raramente é usada para fins quantitativos devido à baixa detectibilidade e seletividade, o que pode ser superado por CG-EM no modo monitoramento de íons selecionados (**MIS**), o qual fornece maior detectibilidade e seletividade através do monitoramento de uns poucos íons característicos da amostra, com perda significativa de informação qualitativa (Dodds *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2010).

O monitoramento de íons moleculares, embora apresente alta seletividade e forneça alguma informação sobre a identidade do analito, possui baixa detectibilidade e repetitividade devido à abundância relativamente baixa e

variação da intensidade do mesmo em função das condições da fonte de ionização. Por outro lado, o monitoramento do íon mais intenso no espectro nem sempre leva a melhor seletividade. Neste sentido, o sucesso na análise por MIS é limitado pela habilidade e experiência do analista na escolha dos íons a serem monitorados.

Nesta dissertação, é relatada utilização da análise de componentes principais (**PCA**) na seleção dos íons a serem monitorados na quantificação de EMAG, sem a perda completa da informação qualitativa.

3.10 Plasma e membrana de eritrócitos

Plasma é o principal componente sanguíneo, representando aproximadamente 55% de seu volume total, sendo os principais lipídios encontrados em plasma: TG, FL e EC e em quantidades menores são encontrados diacilglicerídios, glicolípídios, entre outros (Nelson, 1972). A composição de AG de lipídios presentes no plasma tem sido utilizada no estudo de processos patológicos, hiperlipidemia e aterosclerose (Lada *et al.*, 2004; Raatz *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 2001; Erkkila *et al.*, 2003).

Em organismos vertebrados, o tipo mais comum de célula sanguínea é o eritrócito, correspondendo a aproximadamente um quarto do número total de células em humanos. Eritrócitos são produzidos pela medula óssea e possuem tempo de vida médio de 120 dias, quando são então reciclados pelos macrófagos (Nelson, 1972).

Membrana de eritrócito (**ME**) é uma bicamada lipídica típica, semelhante a que pode ser encontrada em todas as células humanas. A ME corresponde a aproximadamente 1,3% em massa do peso seco da célula e podem ser obtidos após lavagem e lise dos eritrócitos, aproximadamente 40% da massa da ME corresponde a lipídios, tais como FL, glicolípídios e colesterol (Nelson, 1972).

A composição lipídica da membrana pode ser dividida em duas frações, uma fração polar formada por fosfolipídios e glicolipídios (correspondendo a

aproximadamente 75% da massa dos lipídios da membrana), e uma fração neutra, a qual é formada predominantemente por um único constituinte, o colesterol livre. Embora amplamente presentes em lipídios e lipoproteínas plasmáticas, não há indícios de que TG, AGL ou EC sejam constituintes da membrana (Nelson, 1972).

A composição de AG na ME influencia a fluidez e permeabilidade da mesma, uma elevada razão colesterol/fosfolipídio tem sido associada ao aumento da rigidez e diminuição da permeabilidade da membrana (Cazzola *et al.*, 2004). A composição da ME influencia também a atividade das proteínas de membrana, pois lipídios específicos são necessários para estabilizar a estrutura de proteínas, além de controlar a inserção e o enovelamento de proteínas de membranas. Adicionalmente, as propriedades da ME depende também da composição de AG os quais esterificam FL e glicolipídios (Chabanel *et al.*, 1983; Owen *et al.*, 1982).

O perfil de AG em membrana de eritrócitos (**ME**) tem sido avaliado como indicador de processos patológicos (Skeaff *et al.*, 2006) e na avaliação da influência da dieta no perfil de AG, processos nos quais a ME é considerado um melhor marcador de AG de médio-longo prazo comparado a lipídios de plasma ou plaqueta (Sun *et al.*, 2007).

A composição da ME tem sido avaliada em patologias humanas como psoríase, obesidade e diabetes, doenças nas quais ocorrem significativas alterações no metabolismo de lipídios. Essas alterações são detectadas em ME antes de poderem ser observadas em plasma. Adicionalmente, a análise do perfil de AG em ME fornece informações relevantes sobre processos envolvidos na depressão (Maes *et al.*, 1996); dano no miocárdio (Sepulveda *et al.*, 2010); risco de desenvolvimento de câncer no pulmão (Pala *et al.*, 2001); diabetes tipo 2 e resistência a insulina (Kulacoglu *et al.*, 2002; Krachler *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Implementação da metodologia analítica para determinação do perfil de ácidos graxos em sangue por CG-EM

AG frequentemente são estudados por CG-DIC, mas como vimos na introdução, DIC falha na inequívoca identificação do analito. Neste sentido, CG-EM tem sido aplicada na identificação de AG, sendo a quantificação dos AG realizadas por monitoramento de íons selecionados (**MIS**). Porém, não há consenso na literatura sobre quais íons devem ser monitorados nas análises, além do fato das metodologias mais recentes serem destinadas a análise de AG presentes em alimentos. Neste sentido, nós procedemos à implementação de uma metodologia analítica para determinação de AG esterificados em diversos lipídios encontrados em sangue por CG-EM.

4.1.1 Seleção dos íons para determinação de ésteres metílicos de ácidos graxos por monitoramento de íons selecionados usando análise de componentes principais (PCA)

A seleção dos íons (m/z) a serem monitorados nas análises por MIS é de fundamental importância para sensibilidade e seletividade da metodologia analítica. A escolha frequentemente é baseada no padrão de fragmentação do analito e depende da habilidade do analista em selecionar os íons que forneçam maior sensibilidade, mantendo a seletividade do método.

Análise multivariada e EM têm sido empregadas em conjunto na busca de similaridades entre estruturas químicas (Schoonjans *et al.*, 2002), na classificação estrutural de compostos (Bankefors *et al.*, 2008), na compressão da dimensionalidade dos dados e na diminuição de ruído em espectros de massas (Statheropoulos *et al.*, 1999). Porém, desconhecemos a utilização de PCA na seleção de íons para quantificação de compostos.

Nesta seção, nós demonstramos o emprego da PCA na seleção de íons, a

partir dos espectros de massas obtidos por VIT, os quais serão utilizados na quantificação e determinação do número de insaturações de EMAG.

Espectros de massas no modo VIT de 32 EMAG comerciais foram obtidos em triplicatas, num total de 96 espectros de massas. Estes espectros foram então alinhados e reunidos em uma matriz de dados, a qual foi importada pelo software Pirouette (3.11, Infometrix) para a PCA.

O modelo de PCA contendo três componentes principais (**CP**) manteve 86,65% das informações dos dados originais, para os dados centrados na média. O gráfico de escores das duas primeiras CP (**Figura 7a**) revelou o agrupamento dos EMAG em cinco grupos distintos, de acordo com o número de insaturações presentes na cadeia alquílica. Não foi observada qualquer tendência de agrupamento dos EMAG em função do número de carbonos ou da família bioquímica em nenhuma das CP.

O gráfico de pesos (**Figura 7b**) foi então avaliado para selecionar os íons (m/z) os quais estão, provavelmente, relacionados ao agrupamento observado para as amostras (EMAG) no gráfico de escores. Os íons selecionados estão listados na **Tabela 1**.

Para garantir a seletividade da análise e aumentar a razão sinal/ruído, é interessante monitorar poucos íons específicos dos compostos de interesse. Para alcançar tal objetivo, utilizamos seleção de variáveis, a qual é frequentemente empregada em quimiometria para aumentar a discriminação entre as classes. Seleção de variáveis foi então realizada para identificar o menor número de íons (variáveis) que permitam a separação dos grupos de EMAG mostrados na **Figura 7a**.

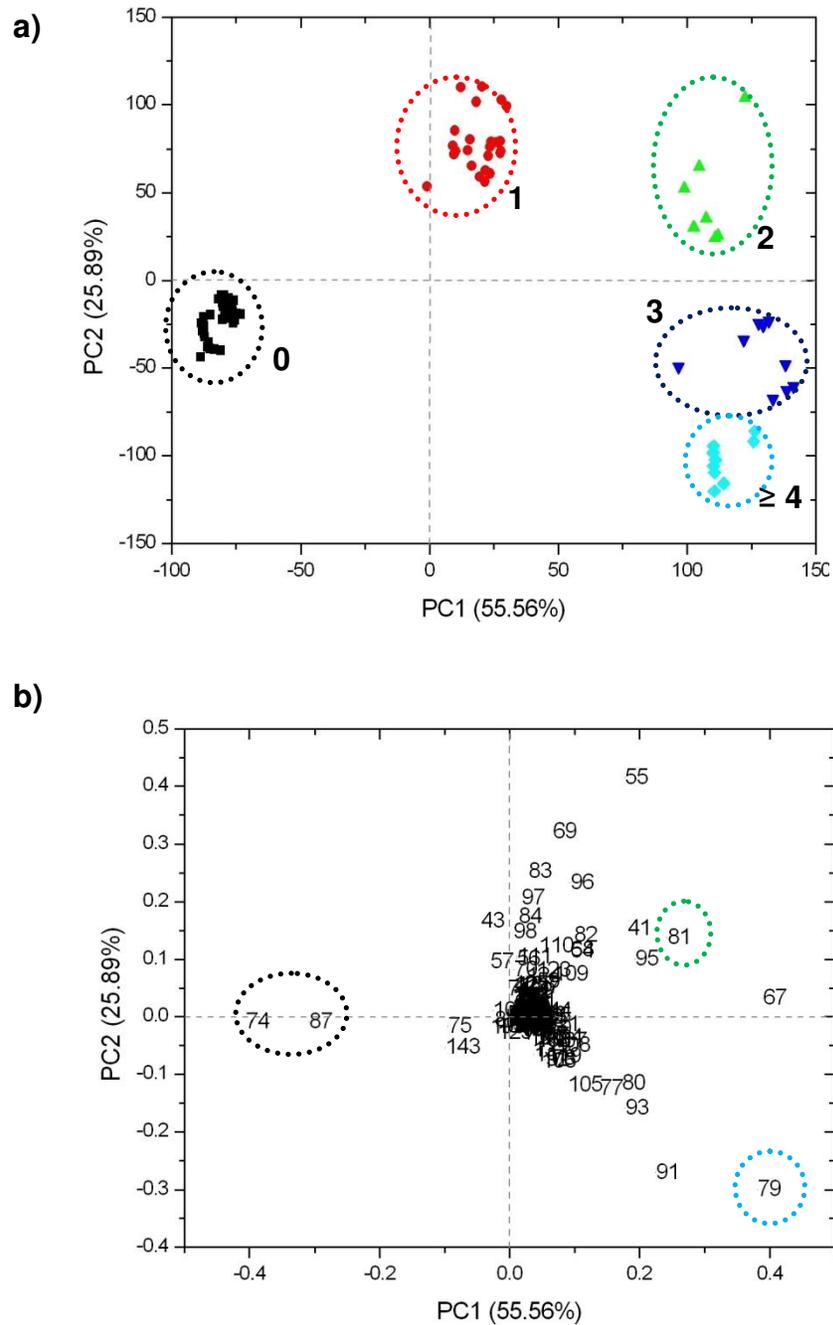


Figura 6. Análise de componentes principais (CP = 3; 86,5%) a) gráficos de escores CP1 (55,56%) versus CP2 (25,89%); b) gráfico de pesos nos quais mostram a razão massa/carga

Legenda: (■) EMAG saturados; (●) EMAG monoinsaturados; (▲) EMAG di-insaturados; (▼) EMAG tri-insaturado; (◆) EMAG com 4, 5 ou 6 insaturações

Tabela 1. Íons relevantes aos agrupamentos dos EMAG observados no gráfico de escores da PCA (**Figura 7a**)

EMAG	Grupos ^a (gráfico de escores)	Íons associados (<i>m/z</i>) ^b (gráfico de pesos)
saturados	0	74 e 87^c
monoinsaturados	1	69
di-insaturados	2	55 e 81
tri-insaturados	3	67
com 4, 5 ou 6 insaturações	≥ 4	79

^agrupos de EMAG de acordo com o número de insaturações na cadeia alquílica;

^bíons relevantes ao agrupamento dos EMAG no gráfico de escores da PCA (**Figura 7a**) selecionados pelo gráfico de pesos (**Figura 7b**);

^cos íons destacados em **negrito**, são aqueles essenciais a discriminação das amostras

A seleção de variáveis, embora não tenha melhorado significativamente a separação dos grupos, permitiu selecionar apenas quatro íons, entre os 161 íons iniciais. Os íons de *m/z* 74, 79, 81 e 87 são essenciais à discriminação dos EMAG segundo o número de insaturações. Assim, apenas estes íons foram considerados nas análises subseqüentes. Mesmo que íons característicos dos AG mono e tri-insaturados, a proporção dos quatro íons selecionados já é suficiente para diferenciá-los dos demais, como evidenciado na **Figura 9**.

O conjunto de íons selecionados é semelhante ao sugerido por Thurnhofer e Vetter (2005), através da análise minuciosa de espectros de massas de EMAG preparados a partir de AG presentes em alimentos. Isto confirma a aplicação da PCA na seleção do melhor conjunto de íons para quantificação de compostos, com a vantagem de não ser necessário o conhecimento prévio do padrão de fragmentação dos analitos. Embora o conjunto de íons selecionados não seja novo na literatura, nos desconhecemos a utilização prévia da PCA na seleção de íons para seleção de íons para quantificação de EMAG por MIS. Neste sentido, esta seção ilustra uma nova aplicação da PCA, a qual pode contribuir

significativamente na análise de outras classes de compostos por CG-EM.

Para confirmar a eficiência dos íons selecionados, novos espectros de massas foram obtidos agora por MIS (dos íons de m/z 74, 79, 81 e 87). A APC deste novo conjunto de espectros confirmou a discriminação das amostras segundo o número de insaturações presentes na cadeia alquílica do EMAG, para o modelo construído com duas CP (98,99% da informação dos dados originais e dados centrados na média) (Ampliação **Figura 9**).

Para confirmar os resultados obtidos por PCA, nos procedemos à comparação das abundâncias relativas dos íons selecionados pelo teste-t de Student (bicaudal para comparação de média a um valor de referência). Os espectros de massas obtidos por MIS para estes quatro íons, não variaram significativamente em função do número de carbono para EMAG contendo entre 12 e 24 átomos de carbono e o mesmo número de insaturações ($p > 0,05$). EMAG com quatro, cinco ou seis insaturações apresentaram abundâncias relativas semelhantes, como sugeridas pela PCA, e foram reunidos num mesmo grupo. A **Tabela 2** mostra a percentagem de contribuição de cada íon selecionado nos espectros de massas obtido por MIS.

Os espectros de massas obtidos por MIS deste conjunto de íons são úteis na determinação do número de insaturações do EMAG, o que juntamente com o tempo de retenção permite identificar os EMAG presentes em níveis de traços, para os quais espectros de massas obtidos por VIT não foram satisfatórios, devido à baixa concentração do EMAG nas amostras. A **Figura 8** e a **Tabela 3** ilustram as abundâncias relativas destes íons nos espectros de massas em função do número de insaturações dos EMAG.

Tabela 2. Percentagens de contribuição dos íons selecionados para os espectros de massas obtido por MIS para os EMAG

EMAG	% contribuição (média ± DP) ^a			
	m/z 74	m/z 79	m/z 81	m/z 87
6:0^b	73,92 ± 0,69	0,00 ± 0,00	0,48 ± 0,95	25,59 ± 0,39
8:0^b	68,77 ± 0,50	0,24 ± 0,11	0,60 ± 0,67	30,39 ± 0,54
10:0^b	63,81 ± 0,54	0,40 ± 0,03	0,93 ± 0,17	34,86 ± 0,44
11:0^b	62,26 ± 0,39	0,38 ± 0,17	1,12 ± 0,58	36,24 ± 0,44
12:0	60,77 ± 3,45	0,47 ± 0,03	0,93 ± 0,13	37,84 ± 1,42
13:0	59,36 ± 2,16	0,53 ± 0,03	1,86 ± 2,05	38,25 ± 1,98
14:1	43,59 ± 2,04	6,69 ± 0,57	18,16 ± 3,90	31,56 ± 1,36
14:0	58,59 ± 1,51	0,53 ± 0,02	1,44 ± 0,71	39,44 ± 0,54
15:1	43,66 ± 2,94	6,51 ± 0,66	17,90 ± 5,53	31,93 ± 2,00
15:0	57,82 ± 1,05	0,55 ± 0,04	2,00 ± 1,91	39,63 ± 0,91
16:1	41,49 ± 1,13	7,26 ± 0,45	20,84 ± 2,16	30,41 ± 0,76
16:0	57,39 ± 0,42	0,55 ± 0,01	1,48 ± 0,27	40,58 ± 0,44
17:1	42,38 ± 3,10	7,10 ± 0,68	19,32 ± 5,89	31,21 ± 2,19
17:0	56,44 ± 1,79	0,58 ± 0,03	2,73 ± 1,15	40,25 ± 1,37
18:3n6	6,13 ± 0,50	51,35 ± 4,33	32,91 ± 5,67	9,61 ± 0,91
18:2n6	7,60 ± 2,41	26,01 ± 4,89	59,89 ± 5,33	6,50 ± 1,03
18:1	38,74 ± 2,41	8,92 ± 1,00	22,57 ± 4,91	28,43 ± 1,29
18:3n3	5,14 ± 0,59	50,49 ± 3,39	31,92 ± 2,97	11,10 ± 0,96
18:1t	38,76 ± 2,49	8,95 ± 1,04	22,86 ± 5,12	29,43 ± 1,80
18:0	56,52 ± 0,30	0,59 ± 0,02	1,73 ± 0,27	41,16 ± 0,33
19:0	55,99 ± 0,22	0,57 ± 0,02	1,79 ± 0,21	41,65 ± 0,27
20:4n6	9,99 ± 0,39	64,93 ± 0,94	20,00 ± 1,21	5,08 ± 1,15
20:5n3	8,22 ± 0,69	67,81 ± 5,19	19,88 ± 6,12	4,09 ± 0,33
20:3n6	6,05 ± 0,42	47,64 ± 3,24	36,57 ± 4,24	9,73 ± 0,69
20:2n6	10,49 ± 0,43	24,88 ± 0,43	58,29 ± 0,88	6,33 ± 0,09
20:0	55,75 ± 0,34	0,61 ± 0,01	1,72 ± 0,35	41,93 ± 0,30
21:0	55,27 ± 0,41	0,43 ± 0,29	2,21 ± 0,57	42,09 ± 0,34
22:6n3	8,36 ± 0,32	70,57 ± 1,65	19,09 ± 0,21	1,98 ± 1,55
22:2n6	13,99 ± 2,15	24,34 ± 4,01	54,08 ± 7,11	7,59 ± 1,06
22:1n9	40,71 ± 2,35	7,26 ± 0,49	22,40 ± 4,62	29,63 ± 1,84
22:0	54,86 ± 0,38	0,60 ± 0,01	1,94 ± 0,44	42,59 ± 0,32
23:0	54,17 ± 0,92	0,43 ± 0,29	2,81 ± 1,52	42,58 ± 0,73
24:1	42,90 ± 1,12	5,60 ± 0,26	21,66 ± 2,10	29,85 ± 1,00
24:0	54,06 ± 0,52	0,62 ± 0,03	2,05 ± 0,82	43,27 ± 1,46

^a média ± DP de oito injeções;

^b p < 0,05 comparado ao espectro de massas do grupo 0 (AGS)

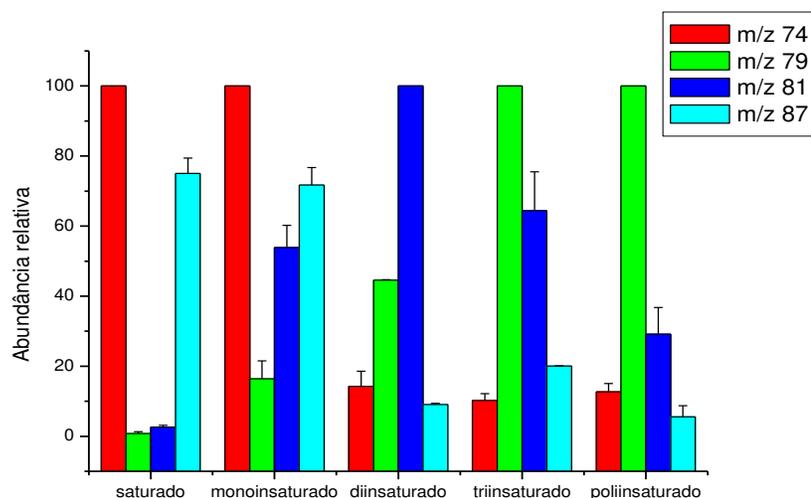


Figura 7. Abundâncias relativas dos íons de m/z 74, 79, 81 e 87 nos espectros de massas de EMAG obtidos por MIS

Tabela 3. Abundâncias relativas dos íons de m/z 74, 79, 81 e 87 para os espectros de massas obtidos por MIS para os grupos de EMAG

Grupos^b	Abundâncias relativas (média \pm DP)^a			
	<u>m/z 74</u>	<u>m/z 79</u>	<u>m/z 81</u>	<u>m/z 87</u>
0 (n^c = 13)	100	0,96 \pm 0,13	3,40 \pm 1,00	72,26 \pm 5,49
1 (n = 8)	100	17,06 \pm 2,97	50,89 \pm 7,27	72,96 \pm 1,75
2 (n = 3)	17,98 \pm 5,15	42,15 \pm 2,03	100	10,93 \pm 1,69
3 (n = 3)	11,65 \pm 1,16	100	64,51 \pm 6,75	19,86 \pm 0,94
≥ 4 (n = 3)	13,16 \pm 2,61	100	29,20 \pm 8,51	5,64 \pm 2,77

^a média \pm DP de oito injeções; ^b número de insaturações na cadeia do EMAG; ^c número de EMAG avaliados, todos os EMAG foram analisados em triplicata

Os espectros de massas obtidos por MIS (m/z 74, 79, 81 e 87) podem ser usados como critério qualitativo, eliminando a necessidade de monitorar íons adicionais para confirmar a identidade do analito, uma vez que a detectibilidade é

inversamente proporcional ao número de íons monitorados, a redução do número de íons contribui para o aumento da sensibilidade.

A análise quantitativa é normalmente conduzida através da análise de um único íon de quantificação para o analito (Kimura *et al.*, 2002; Vetter e Thurnhofer, 2007). Alternativamente, nós propomos o uso destes quatro íons para quantificação, o que permite significativo aumento na detectividade, sem prejudicar a repetitividade do método, a qual permaneceu satisfatória (**Tabela 4**).

Os espectros de massas obtidos por MIS foram úteis não só na determinação do número de insaturação e quantificação do EMAG, mas também na identificação de contaminações, artefatos e co-eluições. Para ilustrar esta capacidade nós comparamos os espectros de massas obtidos para os íons selecionados de um par de EMAG co-eluídos, um álcool, um aldeído e um hidrocarboneto aos valores de referência (**Tabela 3**). Os espectros de massas dos íons selecionados obtidos para o pico cromatográfico no qual houve co-eluição (20:1 mais 20:3n3) e os obtidos para decanol, dodecanal e pentacosano são significativamente diferentes dos valores de referência obtidos para os grupos de EMAG (**Tabela 3**).

Tabela 4. Percentagem de contribuição dos íons selecionados nos espectros de massas obtidos por MIS para alguns compostos e para um pico cromatográfico de dois EMAG co-eluídos

	TR ^c	Abundâncias relativas (média ± DP) ^a			
		m/z 74	m/z 79	m/z 81	m/z 87
decanol	5.307 ± 0.011	3.45 ^{e,f,g,h,i} ± 0.19	28.69 ^{e,f,g,h,i} ± 0.35	100 ^{e,f,h,i}	7.37 ^{e,f,h} ± 0.94
dodecanal	16.790 ± 0.017	0.33 ^{e,f,g,h,i} ± 0.15	18.83 ^{e,g,h,i} ± 1.00	100 ^{e,f,h,i}	1.53 ^{e,f,g,h} ± 0.21
20:1 ^b 20:3n3	23.733 ± 0.030	15.59 ^{e,f,h,i} ± 0.31	100 ^{e,f,g}	38.45 ^{e,f,h,i} ± 0.46	8.02 ^{e,f,h} ± 0.14
pentacosano	28.942 ± 0.068	0.51 ^{e,f,g,h,i} ± 0.24	32.46 ^{e,f,g,h,i} ± 2.56	100 ^{e,f,h,i}	6.47 ^{e,f,h} ± 0.45

^a média ± DP de três espectros; ^bEMAG co-eluídos; ^c cromatograma obtido conforme descrito na **seção 3.2**; ^eP < 0.05 comparado com o grupo 0 (AGS); ^f P < 0.05 comparado com o grupo 1 (AGMI); ^g P < 0.05 comparado com o grupo 2 (AGDI); ^h P < 0.05 comparado com o grupo 3 (AGTI); ⁱ P < 0.05 comparado com o grupo ≥ 4

A PCA incluindo todos os espectros ilustra bem a utilidade do método, o gráfico de escores (Figura 9) mostra como estes compostos podem ser facilmente distinguidos dos EMAG, permitindo ainda que os EMAG possam ser distinguidos entre si, segundo o número de insaturações presentes na cadeia alquílica. Este procedimento pode ser então aplicado para monitorar a seletividade da análise, monitorando contaminações e co-eluições sem perda de sensibilidade.

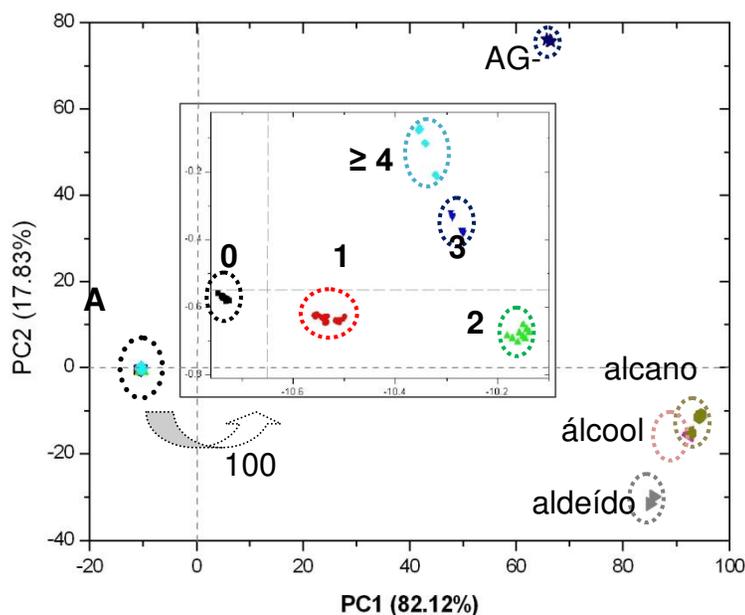


Figura 8. Gráfico de escores CP1 (82,12%) versus CP2 (17,83%) para os espectros de massas obtidos por monitoramento de íons selecionados (m/z 74, 79, 81 e 87)

Legenda: (◆) decanol; (▶) dodecanal; (■) pentacosane; (★) pico co-eluído (20:1 e 20:3n3); (■) EMAG saturados; (●) EMAG monoinsaturados; (▲) EMAG di-insaturados; (▼) EMAG tri-insaturado; (◆) EMAG com 4, 5 ou 6 insaturações

4.1.2 Curvas de Calibração e Figuras de Mérito

Fatores respostas (**FR**), coeficientes de correlação (**R**), faixas lineares, limites de detecção (**LoD**) e limites de quantificação (**LoQ**) foram obtidos através de curvas de calibração para todos os EMAG de interesse. Curvas de calibração foram obtidas considerando cinco níveis de concentrações em relação a uma concentração fixa de padrão interno (19:0), injetadas em triplicata. As curvas foram então obtidas por regressão linear e **R** foi considerado como uma estimativa da qualidade das curvas obtidas, quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais em relação à curva obtida e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A **Figura 10** ilustra as curvas de calibração obtidas para os EMAG 14:0 e 16:1.

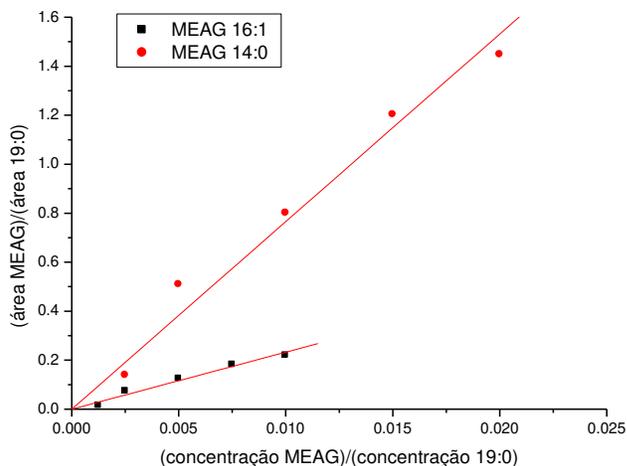


Figura 9. Curvas de calibração obtidas para os EMAG 14:0 e 16:1

FR individuais foram obtidos para cada EMAG (**Tabela 5**) permitindo a quantificação dos mesmos numa ampla faixa cromatográfica. Os FR obtidos foram inversamente proporcionais aos números de carbonos e insaturações dos EMAG, provavelmente devido à diminuição da volatilidade dos mesmos com o aumento da cadeia carbônica (Schreiner, 2005).

Uma correlação linear significativa foi observada entre o FR e o número de carbonos para EMAG saturados, monoinsaturados e com duas insaturações ($R = 0,941$; $0,996$ e $0,880$ respectivamente). O ajuste linear permite estimar ou confirmar o FR de um EMAG com base nos valores obtidos para os demais membros da série (**Tabela 6**).

Limites de detecção e quantificação foram calculados com base nas análises de regressão linear. Neste contexto o LoD expresso em termos da resposta instrumental, LoD_R é dado por:

$$LoD_R = b + 3s_b \quad \text{equação 1}$$

onde **b** é o ponto de intercepção em y da reta de regressão e **s_b** o erro padrão da intercepção (Miller e Miller, 2000). Reescrevendo a **equação 1** para dar o LoD expresso em termos da concentração do analito, LoD_C , e fazendo a aproximação de b igual à zero (o que ocorre na prática), temos:

$$LoD_C = 3s_b/m \quad \text{equação 2}$$

onde **m** é o coeficiente angular da reta de regressão.

Os LoD_C obtidos neste trabalho foram, em regra, um pouco maiores que os reportados por Dodds *et al.* (2005), na análise de vários EMAG por CG-EM através do MIS de três íons (entre os íons de m/z 41, 43, 55, 67, 74, 79, 87 e 91) para cada EMAG. Porém, vários dos íons sugeridos pelo autor (como os m/z 41, 43, 55, 67 e 91) são comuns a outras classes de compostos, diminuindo a seletividade do método, além de não permitir a determinação do número de insaturações do EMAG.

Equações equivalentes foram utilizadas na obtenção do LoQ:

$$LoQ_R = b + 10s_b; \quad LoQ_C = 10s_b/m \quad \text{equações 3 e 4}$$

O método desenvolvido apresentou grande detectividade, permitindo a determinação de vários EMAG na faixa de $\mu\text{g/mL}$ (**Tabela 5**).

Tabela 5. Figuras de mérito para 22 EMAG de interesse

EMAG	FR ^a	R	Faixa linear ($\mu\text{g/mL}$)	LoD _c ($\mu\text{g/mL}$)	LoQ _c ($\mu\text{g/mL}$)	Média RA	DPR (%)
14:0	1,701	0,988	0,416– 107,0	0,125	0,416	0,789 ^a	2,68
16:1	0,520	0,986	0,440– 53,0	0,132	0,440	0,122 ^b	3,27
16:0	1,280	0,976	0,912– 320,0	0,274	0,912	1,056 ^a	1,88
17:0	1,151	0,976	0,894– 53,0	0,268	0,894	0,349 ^b	0,35
18:3n6	0,370	0,979	1,013– 107,0	0,304	1,013	0,142 ^b	0,60
18:2n6	0,564	0,981	0,512– 107,0	0,154	0,512	0,135 ^b	0,16
18:1	0,417	0,989	0,964– 107,0	0,289	0,964	0,131 ^b	0,59
18:3n3	0,477	0,976	0,991- 107,0	0,297	0,991	0,740 ^a	1,23
18:0	1,018	0,985	0,800– 213,0	0,240	0,800	0,750 ^a	0,28
20:4n6	0,310	0,966	0,883– 107,0	0,265	0,883	0,117 ^b	0,34
20:5n3	0,482	0,973	0,619– 107,0	0,186	0,619	0,120 ^b	0,25
20:3n6	0,372	0,982	0,918– 53,0	0,275	0,918	0,134 ^b	0,24
20:2n6	0,547	0,981	0,529– 53,0	0,159	0,529	0,130 ^b	0,31
20:0	0,966	0,969	0,952– 213,0	0,286	0,952	0,703 ^a	0,63
21:0	0,887	0,968	0,872– 107,0	0,262	0,872	0,322 ^b	0,38
22:6n3	0,170	0,984	0,872– 147,0	0,305	0,872	0,092 ^b	0,50
22:2n6	0,234	0,987	1,018– 1,018	0,305	1,018	0,117 ^b	0,98
22:1n9	0,278	0,972	1,034– 147,0	0,310	1,034	0,098 ^b	2,10
22:0	0,870	0,980	1,071– 107,0	0,321	1,071	0,620 ^a	0,59
23:0	0,772	0,987	1,016– 147,0	0,305	1,016	0,279 ^b	0,80
24:1	0,212	0,980	1,200– 147,0	0,360	1,200	0,089 ^b	0,65

24:0 0,707 0,977 1,067– 213,0 0,320 1,067 0,546^a 0,86

^a FR relativo a concentração do padrão interno (19:0); ^a média da triplicata obtida para a concentração de 27,0 µg/mL; ^b média da triplicata obtida para a concentração de 53,0 µg/mL; **Legenda:** **FR**, fator resposta; **R**, coeficiente de correlação; **LoD_c**, limite de detecção; **LoD_q**, limite de quantificação; **RA**, razão entre a área do pico de interesse e a área do padrão interno (19:0); **DPR**, desvio padrão relativo; **DP**, desvio padrão

Tabela 6. Fatores respostas em função do número de carbonos

Grupos de EMAG	Média FR ± DP	DPR (%)	FR = a + b*c	R
0 (n ^a = 10)	1,017 ± 0,304	29,88	FR = 2,68 – 0,085*c	0,941
1 (n = 4)	0,455 ± 0,250	54,87	FR = 1,11 – 0,038*c	0,996
2 (n = 3)	0,449 ± 0,186	41,40	FR = 2,10 – 0,083*c	0,888
3 (n = 2)	0,406 ± 0,061	14,99	-	-
≥ 4 (n = 3)	0,321 ± 0,156	48,60	-	-

^a número de EMAG no grupo; **Legenda:** **a**, coeficiente linear da reta; **b**, coeficiente angular da reta; **c**, número de átomos de carbono na cadeia do AG correspondente

A repetitividade da técnica foi determinada pela análise de EMAG padrões. A razão da área (**RA**) de cada EMAG em relação à área do padrão interno foi obtida para amostras diferentes em um mesmo dia. A variabilidade da média de RA expressa como desvio padrão relativo (**DPR**) mostra que o método possui repetitividade aceitável para todos os EMAG (DPR < 5%).

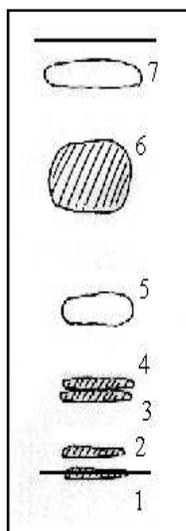
4.2 Determinação do perfil de ácidos graxos em amostras de sangue

4.2.1 Separação dos lipídios presentes em sangue

Cromatografia preparativa em camada delgada (**CPCD**) foi utilizada para separar os lipídios presentes em sangue. A **Figura 11** ilustra o cromatograma obtido para amostras de plasma após revelação com vapores de iodo. Sete frações lipídicas foram separadas e detectadas conforme apresentado na **Tabela 7**.

No extrato lipídico obtido a partir de ME foi detectada a presença de FL, glicolípidios, TG, AG livres e EC. Porém, TG, AG livres e EC não são constituintes da ME, e a presença destes lipídios sugere a contaminação das amostras de ME com lipoproteínas plasmáticas e/ou leucócitos.

Tabela 7. Frações lipídicas e fatores de retenção



	Fração lipídica	R_f
1	fosfolipídios (FL) e glicolípidios ^a	0,00
2	monoacilglicerídios	0,07
3	1,2-diacilglicerídios	0,14
4	1,3-diacilglicerídios	0,16
5	ácidos graxos livres ^a	0,54
6	triacilglicerídios (TG) ^a	0,84
7	ésteres de colesterol (EC) ^a	0,92

^aforam encontrados também em amostras de ME

^bSilica-Gel 60 foi utilizada como fase estacionária e hexano/dietil éter/ácido acético (70,0:30,0:1,5; v/v/v) foi utilizado como fase móvel

Figura 10. Separação das frações lipídicas presentes em plasma e membrana de eritrócitos por CPCD

Para confirmarmos a contaminação, procedemos à quantificação dos lipídios presentes em ME por microgravimetria. Os resultados obtidos revelam que as quantidades de TG e EC presentes nos extratos (**Tabela 8**) são significativamente maiores que as quantidades relatadas na literatura (Nelson, 1972).

A quantidade média de EC obtida foi quase três vezes maior que a quantidade esperada para ME e uma quantidade relativamente grande de TG foi encontrada nas amostras. Estes resultados sugerem que o processo de lavagem da ME

(seção 9.3.5) não permitiu a remoção completa dos leucócitos e proteínas plasmáticas. Como o aumento no número de lavagens poderia levar a perdas de FL e glicolípidios, constituintes da membrana, o número de lavagens não foi aumentado. Para evitar interferência dos TG e EC no perfil de AG da ME, todos os extratos lipídicos obtidos para esta fração foram submetidos à CPCD. Apenas a fração correspondente a fração lipídica de interesse ($F_r = 0,0$; fosfolipídios e glicolípidios) foi considerada as análises subsequentes.

Tabela 8. Composição lipídica das membranas de eritrócitos

	% lipídio (m/m) obtidos	% lipídio (m/m) Nelson (1972)
AGL	< 1,0	< 1,0
Colesterol livre	23,14 ± 2,08	24,0
EC	2,95 ± 0,96	< 1,0
TG	5,71 ± 1,71	-
FL + glicolipídios	68,20 ± 5,19	74 %

4.2.2 Separação dos ésteres metílicos de ácidos graxos por CG

Os EMAG preparados por transesterificação dos AG presentes em amostras de ME e FL, TG e EC de plasma, conforme descrito na seção 9.3.6, foram separados por cromatografia gasosa. A **Figura 12** ilustra os cromatogramas obtidos para cada fração lipídica, condições cromatográficas descritas na seção 9.3.2.

Todos os EMAG identificados estão indicados nos cromatograma. Porém, alguns EMAG não alcançaram o limite de quantificação e não são considerados nas discussões posteriores.

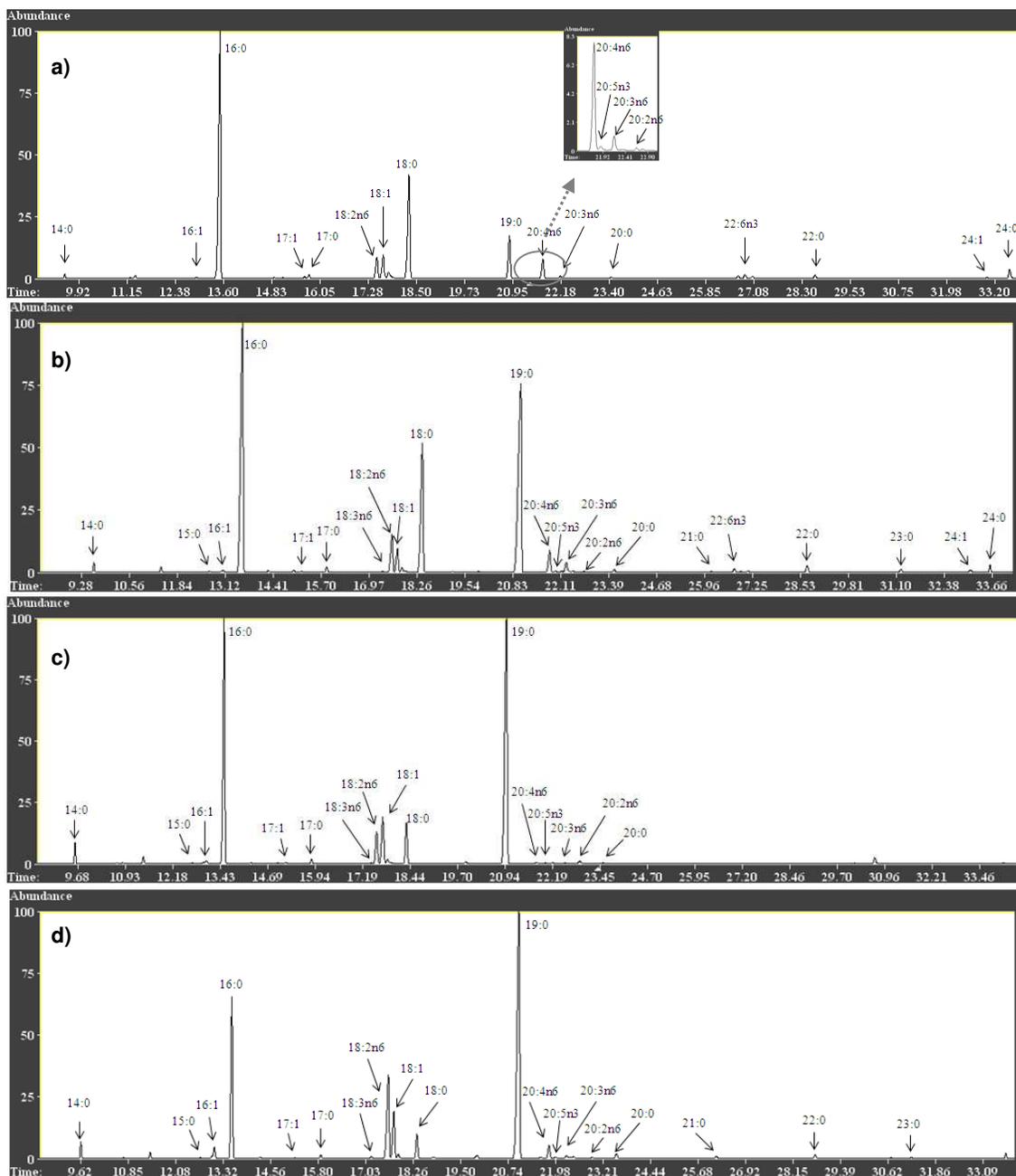


Figura 11. Exemplos de cromatogramas obtidos por CG-EM/MIS (m/z 74, 79, 81 e 87) indicando a separação dos EMAG preparados por transesterificação dos AG presentes em a) membrana de eritrócitos; b) fosfolípidios de plasma; c) triacilglicerídios de plasma e d) ésteres de colesterol de plasma

“Cromatogramas obtidos conforme descrito na seção 9.3.2”

4.2.3 Perfil de ácidos graxos em membrana de eritrócitos e esterificados em fosfolipídios, triacilglicerídios e ésteres de colesterol de plasma

Os espectros de massas obtidos por MIS (m/z 74, 79, 81 e 87) para os EMAG preparados a partir dos AG presentes em sangue não diferem significativamente dos valores dos obtidos para EMAG comerciais (**Anexo B**). Desta forma, os espectros obtidos permitiram não só a quantificação dos AG, após preparação dos EMAG, mas também monitorar eventuais co-eluições e contaminações nas amostras, permitindo repetir determinadas análises quando necessário.

Os perfis de AG presentes em ME e esterificados em FL, TG e EC de plasma são apresentados nas **Tabelas 10-13**. As principais características da composição de AG em função dos lipídios estudados são resumidas a seguir.

Foram detectados em ME 19 AG derivados em ésteres metílicos, dos quais 16 alcançaram o LoQ. Comparado às outras frações lipídicas, ME possui proporções elevadas dos ácidos araquidônico ($20:4n6$), palmítico ($16:0$), esteárico ($18:0$) e oléico ($18:1$), além de uma proporção relativamente grande de AG de cadeia longa. O perfil de AG em ME difere significativamente do perfil plasmático, por exemplo, as proporções de $18:2n6$ e $18:3n3$ (AG essenciais) são significativamente maiores nos lipídios plasmáticos. Estes AG são encontrados principalmente em TG e EC, lipídios que estão ausentes em ME.

Em FL de plasma foram detectados 24 AG dos quais 21 foram quantificados. Os AG $16:0$, $18:2n6$, $20:4n6$ e $18:0$ são os principais constituintes dessa fração lipídica. Aproximadamente 60% da quantidade de AG encontrados em FL correspondem a AG insaturados, os quais são encontrados, preferencialmente, esterificando a posição *sn*-2 do carbono do glicerol.

A composição de AG em TG é grandemente influenciada pela dieta, de forma que a composição lipídica desta fração é consideravelmente mais susceptível as variações da dieta quando comparada a ME ou FL e EC de

plasma. Esta afirmação é corroborada pelos maiores DPR encontrados para as proporções de AG desta fração lipídica. Foram detectados em TG, 19 AG dos quais 16 foram quantificados. Os AG 16:0; 18:2 n 6 e 18:1 são mais abundantes neste lipídio. Adicionalmente, TG possuem uma proporção consideravelmente menor de AGPI e AG de cadeia longa comparada a ME, FL ou EC.

O perfil de AG num dado lipídio é influenciado pela dieta, mas é o resultado de um complexo processo de absorção, transporte e metabolização (Schwenk *et al.*, 2010; Hodson *et al.*, 2009). Diferenças no perfil de AG pode ainda ser resultado da incorporação diferenciada dos mesmos nos diversos lipídios.

A conversão de colesterol livre em EC é realizada pela enzima LCAT (do inglês "*Lecithin—cholesterol acyltransferase*") a qual catalisa a transferência de um AG esterificado na posição *sn*-2 da lectina (fosfatidilcolina) para o colesterol (Yang *et al.*, 1986). Devido a prevalência de AG insaturados na posição *sn*-2 do FL, EC possuem quantidades relativamente altas de AG insaturadas comparado a ME, TG ou FL. De fato quase 75% dos AG esterificados em EC possuem pelo menos uma insaturação. 20 AG puderam ser identificados em EC dos quais 18 foram quantificados.

Tabela 9. Composição de ácidos graxos (g/100g) em membrana de eritrócitos

Ácido Graxo	<u>SN^a</u>	<u>ST^b</u>	<u>MN^c</u>	<u>p^d</u>		
	<u>Média ± DP</u>	<u>Média ± DP</u>	<u>Média ± DP</u>	<u>SNxST</u>	<u>SNxMN</u>	<u>MNxST</u>
14:0	0,57 ± 0,30	0,34 ± 0,14	0,24 ± 0,02	0,007	0,009	0,083
16:1	0,43 ± 0,24	0,31 ± 0,10	0,21 ± 0,05	0,072	0,034	0,031
16:0	30,75 ± 2,66	28,06 ± 2,55	24,92 ± 2,70	0,004	< 0,001	0,013
17:0	0,77 ± 0,32	0,61 ± 0,09	0,54 ± 0,07	0,048	0,072	0,105
18:2n6	10,74 ± 0,82	8,57 ± 0,78	7,56 ± 0,83	< 0,001	< 0,001	0,010
18:1	13,72 ± 1,89	14,13 ± 0,74	13,63 ± 0,82	0,413	0,903	0,163
18:0	20,9 ± 2,72	23,21 ± 1,63	22,15 ± 2,05	0,004	0,281	0,193
20:4n6	15,8 ± 2,41	18,29 ± 1,94	21,39 ± 2,33	0,002	< 0,001	0,003
20:5n3	0,53 ± 0,32	0,29 ± 0,12	0,30 ± 0,04	0,007	0,072	0,940
20:3n6	0,87 ± 0,58	1,39 ± 0,60	1,50 ± 0,39	0,011	0,013	0,661
20:2n6	0,28 ± 0,10	0,3 ± 0,09	0,28 ± 0,09	0,672	0,881	0,630
20:0	0,39 ± 0,10	0,22 ± 0,07	0,23 ± 0,09	< 0,001	0,001	0,799
22:6n3	1,33 ± 0,84	1,66 ± 0,60	3,02 ± 0,49	0,186	< 0,001	< 0,001
22:0	0,51 ± 0,17	0,3 ± 0,13	0,48 ± 0,08	< 0,001	0,600	0,003
24:1	1,04 ± 0,56	0,98 ± 0,54	1,32 ± 0,37	0,756	0,224	0,146
24:0	1,63 ± 0,50	1,5 ± 0,43	2,28 ± 0,72	0,387	0,015	0,003
ΣAGS	55,53 ± 3,87	54,23 ± 3,07	50,84 ± 4,70	0,363	0,041	0,048
ΣAGMI	15,18 ± 1,99	15,41 ± 0,93	15,16 ± 0,97	0,685	0,982	0,542
ΣAGPI	29,56 ± 2,76	30,5 ± 2,26	34,04 ± 3,91	0,416	0,012	0,028
n6/n3	14,88 ± 1,17	14,6 ± 0,77	9,37 ± 1,05	0,160	0,028	0,001

^a média de 20 sujeitos analisados em duplicata; ^b média de 17 sujeitos analisados em duplicata; ^c média de 07 sujeitos analisados em duplicata; ^d Os valores foram comparados usando o teste-t de Student, um valor de p < 0.05, foi considerado significativo; **ΣAGS**, somatória dos ácidos graxos saturados; **ΣAGMI**, somatória dos ácidos graxos mono-insaturados; **ΣAGPI**, somatória dos ácidos graxos poli-insaturados; **MN**, sujeitos magros não-tratados; **SN**, sujeitos com sobrepeso não-tratados; **ST**, sujeitos com sobrepeso tratados com Orlistate

Tabela 10. Ácidos graxos (g/100g) presentes em fosfolipídios de plasma

Ácido graxo	SN ^a	ST ^b	MN ^c	p ^d		
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	SNxST	SNxMN	MNxST
14:0	0,33 ± 0,07	0,42 ± 0,16	0,31 ± 0,05	0,031	0,344	0,080
15:0	0,27 ± 0,05	0,29 ± 0,10	0,28 ± 0,07	0,302	0,553	0,772
16:1	0,54 ± 0,11	0,57 ± 0,24	0,40 ± 0,06	0,539	0,004	0,073
16:0	27,08 ± 1,41	27,27 ± 2,00	24,48 ± 1,40	0,737	< 0,001	0,003
17:1	0,12 ± 0,05	0,11 ± 0,06	0,13 ± 0,06	0,658	0,588	0,459
17:0	0,43 ± 0,10	0,42 ± 0,13	0,46 ± 0,13	0,779	0,566	0,525
18:3n6	0,11 ± 0,05	0,14 ± 0,10	0,11 ± 0,04	0,262	0,910	0,445
18:2n6	19,74 ± 0,87	18,27 ± 1,07	18,23 ± 0,92	< 0,001	0,001	0,933
18:1	8,59 ± 1,35	8,13 ± 0,78	8,49 ± 0,77	0,221	0,846	0,317
18:3n3	1,47 ± 0,19	1,47 ± 0,33	1,30 ± 0,19	0,984	0,055	0,218
18:0	14,89 ± 0,86	16,68 ± 1,54	14,81 ± 1,36	< 0,001	0,857	0,011
20:4n6	14,48 ± 0,79	15,27 ± 1,00	16,26 ± 0,85	0,010	< 0,001	0,031
20:5n3	0,98 ± 0,23	0,57 ± 0,12	0,67 ± 0,15	< 0,001	0,004	0,085
20:3n6	4,72 ± 0,66	4,47 ± 0,66	5,38 ± 0,53	0,271	0,025	0,004
20:2n6	0,25 ± 0,07	0,26 ± 0,12	0,30 ± 0,09	0,969	0,211	0,424
20:1	0,17 ± 0,08	0,16 ± 0,09	0,14 ± 0,03	0,777	0,331	0,539
20:0	0,19 ± 0,07	0,22 ± 0,07	0,27 ± 0,03	0,230	0,008	0,066
22:6n3	4,45 ± 0,55	3,89 ± 0,86	6,34 ± 1,13	0,021	< 0,001	< 0,001
22:0	0,41 ± 0,18	0,44 ± 0,11	0,54 ± 0,06	0,664	0,090	0,028
24:1	0,47 ± 0,25	0,62 ± 0,34	0,71 ± 0,16	0,127	0,025	0,507
24:0	0,35 ± 0,18	0,38 ± 0,16	0,42 ± 0,15	0,565	0,333	0,549
ΣAGS	43,96 ± 1,36	46,13 ± 1,69	41,57 ± 1,92	< 0,001	0,001	< 0,001
ΣAGMI	9,77 ± 1,35	9,48 ± 0,77	9,73 ± 0,84	0,448	0,953	0,484
ΣAGPI	46,20 ± 1,20	44,33 ± 1,73	48,58 ± 1,46	< 0,001	< 0,001	< 0,001
n6/n3	5,72 ± 0,44	6,55 ± 0,78	4,91 ± 0,64	< 0,001	0,001	< 0,001

^a média de 20 sujeitos analisados em duplicata; ^b média de 17 sujeitos analisados em duplicata; ^c média de 07 sujeitos analisados em duplicata; ^d Os valores foram comparados usando o teste-t de Student, um valor de p < 0.05, foi considerado significativo; **ΣAGS**, somatória dos ácidos graxos saturados; **ΣAGMI**, somatória dos ácidos graxos mono-insaturados; **ΣAGPI**, somatória dos ácidos graxos poli-insaturados; **MN**, sujeitos magros não-tratados; **SN**, sujeitos com sobrepeso não-tratados; **ST**, sujeitos com sobrepeso tratados com Orlistate

Tabela 11. Ácidos graxos (g/100g) presentes em triacilglicerídios de plasma

Ácido graxo	SN ^a		ST ^b		MN ^c		p ^d		
	Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP		SNxST	SNxMN	MNxST
14:0	1,45	± 0,22	1,62	± 0,27	1,50	± 0,92	0,046	0,841	0,614
15:0	0,51	± 0,09	0,46	± 0,12	0,48	± 0,16	0,162	0,474	0,799
16:1	2,61	± 0,64	2,92	± 0,37	2,95	± 0,71	0,085	0,244	0,885
16:0	24,35	± 1,84	25,88	± 2,05	24,11	± 1,67	0,022	0,772	0,056
17:1	0,27	± 0,06	0,25	± 0,08	0,22	± 0,08	0,523	0,127	0,385
17:0	0,49	± 0,09	0,44	± 0,11	0,48	± 0,20	0,127	0,772	0,584
18:3n6	0,50	± 0,15	0,30	± 0,14	0,23	± 0,09	< 0,001	< 0,001	0,202
18:2n6	19,38	± 1,12	17,02	± 1,45	20,33	± 1,42	< 0,001	0,082	< 0,001
18:1	34,41	± 2,70	33,13	± 1,61	33,47	± 1,99	0,096	0,411	0,662
18:3n3	2,18	± 0,40	2,66	± 0,21	2,63	± 0,47	< 0,001	0,021	0,877
18:0	9,79	± 0,80	10,58	± 1,70	8,65	± 1,24	0,074	0,010	0,013
20:4n6	2,40	± 0,25	3,20	± 0,50	3,47	± 0,34	< 0,001	< 0,001	0,216
20:5n3	0,20	± 0,09	0,19	± 0,09	0,18	± 0,10	0,983	0,749	0,768
20:3n6	0,58	± 0,22	0,52	± 0,14	0,39	± 0,19	0,314	0,055	0,080
20:2n6	0,23	± 0,15	0,21	± 0,08	0,23	± 0,19	0,531	0,965	0,689
20:1	0,60	± 0,23	0,52	± 0,20	0,57	± 0,21	0,265	0,785	0,555
20:0	0,14	± 0,07	0,11	± 0,04	0,16	± 0,10	0,140	0,527	0,089
ΣAGS	36,74	± 1,88	39,10	± 2,12	35,38	± 1,76	0,001	0,108	< 0,001
ΣAGMI	37,88	± 2,48	36,82	± 1,39	37,21	± 1,78	0,125	0,520	0,563
ΣAGPI	25,46	± 1,41	24,10	± 1,66	27,47	± 1,65	0,010	0,005	< 0,001
n6/n3	10,12	± 2,33	7,51	± 0,89	8,96	± 1,35	< 0,001	0,228	0,005

^a média de 20 sujeitos analisados em duplicata; ^b média de 17 sujeitos analisados em duplicata; ^c média de 07 sujeitos analisados em duplicata; ^d Os valores foram comparados usando o teste-t de Student, um valor de p < 0,05, foi considerado significativo; **ΣAGS**, somatória dos ácidos graxos saturados; **ΣAGMI**, somatória dos ácidos graxos mono-insaturados; **ΣAGPI**, somatória dos ácidos graxos poli-insaturados; **MN**, sujeitos magros não-tratados; **SN**, sujeitos com sobrepeso não-tratados; **ST**, sujeitos com sobrepeso tratados com Orlistate

Tabela 12. Ácidos graxos (g/100g) presentes em ésteres de colesterol de plasma

Ácido graxo	SN ^a		ST ^b		MN ^c		p ^d		
	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	SNxST	SNxMN	MNxST
14:0	0,98	± 0,22	0,80	± 0,23	0,95	± 0,27	0,022	0,756	0,199
15:0	0,46	± 0,14	0,30	± 0,11	0,35	± 0,05	< 0,001	0,044	0,308
16:1	4,37	± 0,68	3,44	± 0,71	4,51	± 0,46	< 0,001	0,617	0,001
16:0	12,14	± 1,33	15,40	± 1,26	15,63	± 1,32	< 0,001	< 0,001	0,692
17:1	0,24	± 0,04	0,22	± 0,13	0,17	± 0,02	0,350	< 0,001	0,373
17:0	0,29	± 0,11	0,20	± 0,05	0,16	± 0,03	0,002	0,005	0,136
18:3n6	0,69	± 0,29	0,61	± 0,21	0,39	± 0,11	0,380	0,014	0,016
18:2n6	42,94	± 1,81	38,59	± 2,18	37,50	± 3,11	< 0,001	< 0,001	0,338
18:1	20,15	± 1,29	19,30	± 1,71	20,22	± 1,20	0,092	0,906	0,209
18:3n3	1,44	± 0,28	1,39	± 0,29	1,29	± 0,52	0,583	0,340	0,557
18:0	3,34	± 0,83	4,01	± 0,52	2,40	± 0,32	0,007	0,007	< 0,001
20:4n6	9,85	± 1,27	11,35	± 1,14	11,54	± 0,93	0,001	0,004	0,711
20:5n3	0,50	± 0,15	0,31	± 0,07	0,35	± 0,08	< 0,001	0,024	0,242
20:3n6	1,38	± 0,33	2,02	± 0,42	1,52	± 0,41	< 0,001	0,368	0,013
20:2n6	0,32	± 0,19	0,32	± 0,18	0,38	± 0,21	0,960	0,476	0,455
20:1	0,49	± 0,17	0,33	± 0,17	0,34	± 0,08	0,009	0,034	0,922
20:0	0,18	± 0,09	0,09	± 0,05	0,08	± 0,03	< 0,001	0,007	0,745
22:6n3	0,35	± 0,16	0,45	± 0,28	0,25	± 0,16	0,160	0,200	0,089
ΣAGS	17,40	± 1,80	20,79	± 1,39	18,64	± 22,48	< 0,001	0,009	0,069
ΣAGMI	25,25	± 1,38	23,29	± 1,99	18,98	± 26,37	0,001	0,981	0,028
ΣAGPI	57,46	± 2,11	55,05	± 1,74	51,23	± 57,56	0,001	< 0,001	0,065
n6/n3	24,47	± 3,12	25,43	± 4,78	16,72	± 33,44	0,468	0,090	0,204

^a média de 20 sujeitos analisados em duplicata; ^b média de 17 sujeitos analisados em duplicata; ^c média de 07 sujeitos analisados em duplicata; ^d Os valores foram comparados usando o teste-t de Student, um valor de p < 0,05, foi considerado significativo; **ΣAGS**, somatória dos ácidos graxos saturados; **ΣAGMI**, somatória dos ácidos graxos mono-insaturados; **ΣAGPI**, somatória dos ácidos graxos poli-insaturados; **MN**, sujeitos magros não-tratados; **SN**, sujeitos com sobrepeso não-tratados; **ST**, sujeitos com sobrepeso tratados com Orlistate

4.3 Avaliação das alterações do perfil lipídico dos pacientes tratados com Orlistate

4.3.1 Considerações gerais

As amostras analisadas foram divididas em três grupos, listados a seguir:

- i) indivíduos magros não-tratados (**MN**): 07 indivíduos;
- ii) indivíduos com sobrepeso não-tratados (**SN**): 20 indivíduos;
- iii) indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate (**ST**): 17 indivíduos.

Todos os voluntários foram submetidos a uma dieta de baixas calorias, mantida durante todo o experimento. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

O grupo de estudo foi restrito a mulheres de meia idade com sobrepeso (**Tabela 9**). Embora esta restrição garanta a homogeneidade das amostras e contemple um grupo significativo de usuários de Orlistate, a escolha limita a abrangência do estudo, o qual não pode ser prontamente extrapolado para homens ou mulheres de faixa etária diferente.

4.3.2 Efeitos do Orlistate nos parâmetros bioquímicos

A avaliação dos parâmetros bioquímicos foi realizada no Laboratório de Investigação em Metabolismo e Diabetes LIMED – UNICAMP em colaboração com o Dr. Bruno Geloneze Neto e a pós-doutoranda em Clínica Médica Sabrina Nagasaki.

Os sujeitos tratados com Orlistate não apresentaram alterações significativas no índice de massa corporal (**IMC**) ao longo de 120 dias de tratamento ($p = 0,64$; comparando indivíduos com sobrepeso tratados e não-tratados).

O nível de colesterol-HDL, popularmente conhecido como “bom colesterol”, diminui significativamente devido ao tratamento com Orlistate ($- 7,0$ mg/dl; $p = 0,08$). Adicionalmente, para os níveis de glicose, colesterol, TG e colesterol-LDL foram observadas apenas uma diminuição não significativa ($p > 0,05$), dados apresentados na **Tabela 9**.

Vidgren *et al.* (1999) relatam uma diminuição significativa do IMC para

indivíduos obesos tratados com Orlistate por um ano. Os autores observaram apenas diminuições não significativas dos níveis de colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-VLDL e TG ($p > 0,05$). Porém, os autores observaram um aumento significativo dos níveis de colesterol-HDL.

Finer *et al.*, 2000 demonstraram a capacidade do Orlistate em reduzir significativamente os níveis séricos de colesterol total e colesterol-LDL. As diferenças entre os resultados obtidos nos estudos citados e os obtidos nesta dissertação, podem estar relacionadas à ausência da perda de peso e ao curto período de tratamento (120 dias).

Embora a diminuição do nível de colesterol no plasma, devido ao tratamento com Orlistate, seja bem documentada na literatura (Muls *et al.*, 2001), não há relatos anteriores da alteração do conteúdo de colesterol na ME devido ao tratamento.

O tratamento com Orlistate diminuiu significativamente o teor de colesterol presente na ME do grupo com sobrepeso tratado (- 0,15 mg/g de ME, $p < 0,001$ comparado com sobrepeso não-tratado). Adicionalmente, o conteúdo de colesterol médio, obtido para o grupo sobrepesos tratados foi significativamente menor do que para o grupo de magros não-tratados (~ 12%, $p = 0,031$). Estes resultados demonstram que o Orlistate é capaz de influenciar o conteúdo de colesterol na ME, o que pode ser explicado pela diminuição do nível de colesterol no plasma, embora a diminuição no teor de colesterol na ME tenha sido proporcionalmente maior comparado à alteração observada em plasma.

Orlistate não possui efeito direto sobre a absorção do colesterol ou sobre a sua biossíntese. O mecanismo de ação descrito para o fármaco se restringe ao trato gastrointestinal. A capacidade do Orlistate em inibir lipases gastrointestinais reduz a disponibilidade de AG e MG, os quais formam micelas capazes de solubilizar o colesterol, permitindo sua absorção. Uma vez que os TG são menos hidrolisados devido à inibição das lipases pancreáticas, ao invés de formarem-se micelas

absorvíveis, forma-se uma fase oleosa persistente no intestino (constituída dos TG não hidrolisados), a qual retém o colesterol impedindo a sua absorção (Muls *et al.*, 2001), levando a uma diminuição dos níveis de colesterol devido ao tratamento.

Tabela 13. Características dos indivíduos e parâmetros clínicos

Parâmetros	Média ± DP			p		
	MN	SN	ST	MNxSN	MNxST	SNxST
Idade (anos)	28,1 ± 3,0	37,5 ± 4,35	37,5 ± 4,35	-	-	-
IMC (kg/m ²)	21,8 ± 1,4	32,8 ± 2,9	32,4 ± 3,0	<0,001	<0,001	0,64
Glicose (mg/dl)	78,3 ± 4,2	79,7 ± 9,6	75,9 ± 5,7	0,93	0,22	0,25
Colesterol total (mg/dl)	159,8 ± 16,7	185,5 ± 25,1	171,8 ± 34,9	0,15	0,61	0,27
TG (mg/dl)	88,6 ± 21,9	115,6 ± 45,9	110 ± 45,0	0,26	0,38	0,74
Colesterol-HDL (mg/dl)	65,0 ± 5,7	52,0 ± 8,7	45,0 ± 7,9	0,01	<0,001	0,08
Colesterol-LDL (mg/dl)	83,0 ± 12,6	110,5 ± 19,2	104,5 ± 21,4	0,01	0,03	0,62
Colesterol na ME (mg/g de ME)	1,16 ± 0,09	1,22 ± 0,12	1,07 ± 0,09	0,224	0,031	<0,001

Legenda: IMC, índice de massas corporal (IMC = peso(kg)/altura(m)²); HDL, do inglês “*high-density lipoprotein*”; LDL, do inglês “*low-density lipoprotein*”; MN, sujeitos magros não-tratados; SN, sujeitos com sobrepeso não-tratado; ST, sujeitos com sobrepeso tratados com Orlistate; TG, triacilglicerídios; p, probabilidade associada ao Teste-t de Student, p < 0,05 foram considerados significativos e estão destacados em **negrito**.

O conteúdo médio de colesterol foi maior (diferença não significativa) para o grupo sobrepesos não-tratados comparado ao grupo de magros não-tratados (+ 0,06 mg/gME; p = 0,224). Resultados semelhantes são reportados por Cazzola *et al.* (2004), os quais constataram que o teor de colesterol na ME para indivíduos obesos é significativamente maior comparado a indivíduos magros.

Embora seja consensual que o tratamento com Orlistate melhore a sensibilidade à insulina e diminua os níveis de glicose, não há consenso se este é um efeito primário da ação do fármaco ou um efeito secundário mediado pela perda de peso (Heymsfield *et al.*, 2000; Tiikkainen *et al.*, 2004). Neste trabalho, não se observou uma diminuição significativa no nível de glicose (p = 0,25).

4.3.3 Efeito do Orlistate no perfil de ácidos graxos (análise exploratória)

PCA foi utilizada para investigar similaridades entre as amostras e revelar quais AG são importantes na discriminação dos indivíduos, e conseqüentemente, quais AG tiveram suas proporções alteradas devido ao tratamento com Orlistate.

A matriz de dados foi construída com 43 linhas (amostras; 20 de sobrepeso não-tratados, 16 de sobrepeso tratados e 07 de magros não-tratados; em duplicata) e 88 colunas (variáveis; proporções médias de 16 AG em ME, 21 em FL, 17 em TG e 18 em EC; adicionalmente Σ AGS, Σ AGMI, Σ AGPI e a razão $n6/n3$ para cada lipídio foram considerados). As percentagens médias de cada AG presentes em ME (**Tabelas 10**), FL (**Tabelas 11**), TG (**Tabelas 12**), EC (**Tabelas 13**) de plasma, estão descritos nas tabelas citadas.

PCA permitiu a redução da dimensionalidade dos dados para dez CP, mantendo 94,11% das informações dos dados originais. Auto-escalamento das variáveis foi utilizado como pré-processamento, permitindo que todos os AG tenham a mesma influência no modelo. Isto é importante uma vez que vários AG, como 20:5 $n3$ e 22:6 $n3$, embora encontrados em baixa proporção nas amostras, possuem importantes funções biológicas.

A versão final do modelo de PCA foi obtida após a exclusão de uma amostra a qual apresentou um comportamento atípico, esta amostra foi excluída considerando como critério os valores de distância de Mahalanobis, os resíduos fornecidos e sua posição na projeção em três dimensões do gráfico de escores. Seleção de variáveis considerando o poder de modelagem das variáveis. O proceso não melhorou a discriminação das amostras e não foi, portanto, considerado.

O gráfico de escores (**Figura 13a**) revelou o agrupamento das amostras em três grupos distintos, confirmando um perfil diferente de AG para indivíduos magros e com sobrepeso, além da alteração do perfil de AG devido ao tratamento com Orlistate. As amostras do grupo sobrepesos tratados foram separadas dos grupos

de sobrepesos não-tratados e magros não-tratados ao longo da primeira CP (16,08% das informações dos dados originais), já a segunda CP (13,10% das informações dos dados originais) permitiu discriminar os grupos de sobrepesos tratados e magros não-tratados. Apenas uma amostra (do grupo de sobrepesos tratados) foi encontrada no gráfico de escores numa região diferente do grupo ao qual pertence.

O gráfico de escores (**Figura 13a**) também revela uma aproximação do perfil de AG dos indivíduos com sobrepeso após o tratamento com Orlistate em direção ao perfil de AG obtidos para indivíduos magros. Isto é evidenciado pela similaridade destes grupos em PC1 (a qual contém maior quantidade de informação). Adicionalmente, há uma diminuição na dispersão das amostras (indivíduos) tratados, isto pode sugerir uma convergência do perfil de AG, semelhante ao observado para indivíduos magros.

A análise do gráfico de escores revelou que o grupo de sobrepesos não-tratados possui valores positivos na primeira CP, que está relacionada a níveis elevados do ácido linoléico (18:2n6) em diversos lipídios como mostra o gráfico de pesos.

A proporção de 18:2n6, um AG essencial, diminuiu em todas as frações lipídicas estudadas (- 2,07% em ME, $p < 0,001$; - 1,47% em FL, $p < 0,001$; - 2,36% em TG, $p < 0,001$; - 4,35% em EC, $p < 0,001$). Resultados semelhantes foram encontrados por Vidgren *et al.* (1999), os quais relatam que o Orlistate, leva a uma diminuição significativa na proporção de 18:2n6 em TG, EC e FL presentes em plasma de indivíduos obesos.

A redução dos níveis de 18:2 n 6 pode ser explicada pela menor absorção deste AG da dieta, devido ao tratamento com Orlistate. É improvável que o Orlistate interfira na absorção de TG em estágios posteriores a hidrólise, como na incorporação em micelas, absorção da micela, ou na reesterificação e liberação dos lipídios absorvidos. É sabido que 18:2 n 6 se encontra esterificado preferencialmente na posição *sn*-2 do glicerol (**Figura 2**), e que a hidrólise incompleta do TG impede a formação de *sn*-2-MG absorvíveis. Assim, podemos especular que a inibição da hidrólise do TG, ou sua hidrólise parcial (formando diacilglicerídios) contribua, em alguma extensão, para a diminuição da proporção de 18:2 n 6 em diversos lipídios.

A proporção de ácido α -linolênico (18:3 n 3) nas frações de FL e EC de plasma ($p = 0,980$, $p = 0,580$, respectivamente) não foram alterados significativamente devido ao tratamento com Orlistate, mas em TG, esta proporção aumentou significativamente (+ 0,48%, $p < 0,001$). Uma vez que 18:3 n 3 também é um AG essencial, a explicação do aumento de sua proporção permanece desafiador e difícil de racionalizar com base no mecanismo de ação atualmente aceito para inibidor de lipases Orlistate.

A PCA evidenciou a diminuição da proporção do ácido heptadecanóico (17:0) presente em ME e EC, do ácido pentadecanóico (15:0) devido ao tratamento com Orlistate. Estes AG contribuíram para separação das amostras de indivíduos com sobrepeso, tratados e não-tratados com o fármaco, ao longo da primeira CP do gráfico de escores. AG com números ímpares de carbonos são exógenos e devem, portanto, serem obtidos da dieta. Assim uma diminuição na absorção de TG devido ao tratamento com Orlistate, deve contribuir para a diminuição na proporção de AG provenientes da dieta.

O tratamento com Orlistate também diminuiu a proporção de 20:5 n 3 em vários lipídios (- 0,24% em ME, $p = 0,007$; -0,41% em FL de plasma, $p < 0,001$; -0,19% em EC de plasma, $p < 0,001$), porém não foi observada alteração significativa em

TG de plasma ($p = 0,983$). Embora, 20:5n3 possa ser sintetizado pelo organismo a partir do precursor 18:3n3, humanos possuem uma limitada capacidade em converter este precursor à 20:5n3 (Medeiros *et al.*, 2007; Poulsen *et al.*, 2007). Desta forma, para que níveis adequados de 20:5n3 em diversos lipídios sejam mantidos no organismo, quantidades suplementares de 20:5n3 devem ser obtidas da dieta. Assim, a redução na absorção de lipídios devido ao tratamento com Orlistate tem um impacto direto sobre a proporção do AG 20:5n3.

A proporção de 22:6n3, outro AG cujas quantidades suplementares devem ser obtidas da dieta, diminuiu significativamente em FL de plasma (- 0,56%, $p = 0,020$), porém não se alterou significativamente em ME e EC de plasma ($p = 0,186$ e $0,160$; respectivamente). As diferenças nas alterações das proporções de 20:5n3 e 22:6n3 na ME, devem estar relacionadas à taxa de troca destes AG entre lipoproteínas e ME, sendo a taxa de troca de 22:6n3 menor, devido ao fato deste estar localizado no lado interno da bicamada lipídica (Katan *et al.*, 1997; Burdge *et al.*, 2007). Assim, devido à menor taxa de troca, pode não ter havido tempo suficiente para que a alteração na proporção de 22:6n3 em plasma refletisse na composição da ME. Resultados semelhantes foram relatados em ratos tratados com Orlistate durante 19 dias por Hernandez *et al.* (2010).

Proporções elevadas de 20:4n6 foram associadas a valores negativos da primeira CP, demonstrando o aumento nas proporções deste AG devido ao tratamento com Orlistate. A proporção de 20:4n6 aumentou significativamente em todos os lipídios estudados (+ 2,49% na ME, $p = 0,002$; + 0,79% em FL, $p = 0,010$; + 0,8% em TG, $p < 0,001$; + 1,5% em EC, $p < 0,001$). Resultados, semelhantes foram encontrados por Hernandez *et al.* (2010), os autores relataram um aumento no nível do AG 20:4n6 em eritrócitos e plasma de ratos tratados com Orlistate e uma dieta rica em lipídios. O aumento na proporção de 20:4n6 pode ser explicado pela diminuição dos níveis de 20:5n3, o qual compete com 20:3n6 (precursor do 20:4n6) pela enzima $\Delta 5$ -dessaturase, **Figura 3**. Consequentemente, quanto menor o nível de 20:5n3 mais elevadas serão as proporções de 20:4n6. Adicionalmente,

a proporção de 20:3n6 aumentou em ME (+0,52%, $p = 0,011$) e em EC de plasma (+0,64%, $p < 0,001$), contribuindo para o aumento na proporção de 20:4n6.

O grupo de sobrepesos não-tratados apresentou valores negativos na primeira CP no gráfico de escores, a análise do gráfico de pesos sugere que o tratamento contribuiu para o aumento da Σ AGS em EC.

Ácido palmítico (16:0) é o AG saturado mais abundante em animais e plantas, 16:0 é o primeiro AG produzido pela lipogênese (biossíntese de AG). O tratamento com Orlistate diminuiu a proporção de 16:0 em ME (- 2,69%, $p = 0,004$), mas aumentou significativamente a proporção em TG e EC de plasma (+1,35%, $p = 0,022$ e +3,26%, $p < 0,001$; respectivamente), e não a proporção de 16:0 em FL de plasma ($p = 0,737$). Já a proporção de 18:0 aumentou significativamente em todos os lipídios estudados, em ME (+ 2,31%, $p = 0,004$) e plasma (+ 1,79% em PL, $p < 0,001$; + 0,79% em TG, $p = 0,074$; + 0,67 % em CE, $p = 0,007$).

O tratamento de indivíduos com sobrepeso não alterou significativamente a Σ AGS, Σ AGMI e Σ AGPI em ME ($p = 0,363$; 0,685 e 0,416, respectivamente). Em plasma, o Σ AGS aumentou em todos os lipídios estudados (+ 2,17% em FL, $p < 0,001$; + 2,36% em TG, $p < 0,001$; + 3,39% em EC, $p < 0,001$). O Σ AGMI em plasma foi alterado significativamente somente na fração de EC, a qual diminuiu com o tratamento (-1,96%, $p < 0,001$), enquanto o Σ AGPI diminuiu em todos os lipídios presentes em plasma (- 1,87% em FL, $p < 0,001$; - 1,36% em TG, $p = 0,010$; - 2,41% em EC, $p < 0,001$).

Cazzola *et al.* (2004) sugerem que baixos níveis de AGPI e antioxidantes em ME são conseqüências de eventos bioquímicos relacionados à obesidade/sobrepeso, provavelmente devido a uma redução na taxa de troca entre lipoproteínas e ME, resultando na diminuição da fluidez da membrana. ME de indivíduos magros apresentam maiores Σ AGPI que de indivíduos obesos, mas as diferenças não foram significativas. Resultados semelhantes foram obtidos na presente dissertação, onde o Σ AGPI em ME foi significativamente maior para

indivíduos magros relativamente a indivíduos com sobrepeso (+ 4,48% em comparação com sobrepeso não-tratados, $p = 0,012$; + 3,54% em comparação com sobrepeso tratados, $p = 0,028$).

A dieta ocidental atual é marcada por altas quantidades de AG- $n6$ em relação à quantidade AG- $n3$. A razão $n6/n3$ em vários tecidos tem sido utilizada para avaliar os efeitos de fármacos e da dieta no perfil de AG e o aumento desta razão tem sido interpretada como deletéria (Simopoulos, 2002).

O tratamento com Orlistate aumentou a razão $n6/n3$ em FL de plasma (+ 0,83%, $p < 0,001$), diminuiu em TG (- 2,61%, $p < 0,001$) e não alterou significativamente em ME e EC de plasma ($p = 0,160$ e $0,468$, respectivamente). Maiores razões $n6/n3$ em FL, TG e EC de plasma e em ME foram observados para indivíduos com sobrepeso em comparação com indivíduos magros. Em ME a razão $n6/n3$ foi 59% maior para o grupo com sobrepeso não-tratados comparado ao grupo de magros não-tratados ($p = 0,028$). Os resultados obtidos estão em ótima concordância com as observações de Cazzola *et al.* (2004), no estudo de indivíduos obesos. Adicionalmente, as razões $n6/n3$ encontrados na ME no presente estudo ($9,37 \pm 1,05$ para magros não-tratados, $14,88 \pm 1,1$ para sobrepesos tratados e $14,60 \pm 0,77$ para sobrepesos não-tratados) são consideravelmente maiores que os valores recomendados pela OMS, a qual recomenda uma razão $n6/n3$ entre 3 e 4 para adultos saudáveis (FAO/WHO, 1993).

Duas frações sanguíneas foram avaliadas no presente estudo, ME e plasma. ME é aceito como um melhor marcador de AG a médio-longo prazo, enquanto o plasma reflete alterações em curto prazo, como ingestões recentes de lipídios. A análise cuidadosa dos resultados obtidos permite afirmar que o estudo de ambas as frações sanguíneas fornecem informações complementares.

A PCA sugere que EC de plasma é um bom marcador para monitorar as alterações no perfil de AG devido ao tratamento com Orlistate. Esta afirmativa é

apoiada pelo grande número de AG esterificados em EC significativos na diferenciação entre indivíduos com sobrepeso tratados e não-tratados com Orlistate. Além do maior número de AG desta classe que sofreram alterações significativas nas proporções, as quais foram consideravelmente maiores às observadas para outros lipídios. Adicionalmente, a PCA de cada lipídio isolado, revelou que AG presentes exclusivamente em EC foram os que forneceram melhor discriminação entre indivíduos com sobrepeso tratados e não-tratados com Orlistate (**Anexo C**).

O grupo de indivíduos magros não-tratados também obteve valores negativos em CP1, mas ao contrário do grupo de indivíduos com sobrepeso tratados foi associado a eles valores positivo em CP2. A análise do gráfico de pesos revelou que AG contendo mais de 20 átomos de carbono e AG presentes na ME tem maior importância na separação entre indivíduos magros e com sobrepeso. Maiores níveis de 22:6n3 e 20:5n3 foram encontrados em ME e FL para magros não-tratados, de forma geral, um maior conteúdo de AGPI em ME e FL é característica deste grupo.

ME e FL de plasma podem ser considerados melhores marcadores para obesidade que TG ou EC, isto sugere que alterações no perfil de AG em FL, principal constituinte da ME, tem papel significativo na obesidade/sobrepeso. Esta afirmação é suportada pelos modelos de PCA para cada lipídio isoladamente (**Anexo C**).

Orlistate é um inibidor de lipases que atua no sistema digestivo sem sofrer absorção, e não possui, portanto, ação sistêmica (Zhi *et al.*, 1996). Este fármaco inibe a hidrólise de TG e conseqüentemente diminui a absorção de AG e MG, o que pode afetar, indiretamente, o perfil de AG. Orlistate não altera a atividade ou seletividade das enzimas relacionadas à biossíntese de AG, as quais se encontram dentro das células, de forma que, alterações no perfil AG devem ser devidas exclusivamente as alterações na absorção de lipídios da dieta. Esta

hipótese é corroborada pela diminuição na proporção de AG essenciais e exógenos associada ao tratamento.

As proporções de AG exógenos e AG que precisam de suplementação para manter níveis adequados no organismo diminuíram em quase todos os lipídios estudados. Isto era esperado uma vez que Orlistate diminui a digestibilidade de TG e, conseqüentemente, a absorção de AG (King *et al.*, 2006).

Por outro lado, AG endógenos (AGS e vários AGMI), os quais podem ser sintetizados a partir da acetil-CoA, provenientes da digestão de carboidratos, foram menos afetados pela ingestão de lipídios. O aumento na proporção de AG endógenos em resposta ao tratamento pode ser apenas reflexo da diminuição na proporção dos AG exógenos e essenciais, uma vez que medimos proporções relativas ao invés de quantidades absolutas. Desta forma, o aumento na proporção dos AG endógenos, não corresponde necessariamente ao aumento na biossíntese dos mesmos.

O aumento na proporção de AG endógenos observados devido ao tratamento com Orlistate é similar a influência de uma dieta com baixo teor de gordura no perfil lipídico de mulheres na pós-menopausa (King *et al.*, 2006). King *et al.* (2006) relatam o aumento na proporção de AGS (especialmente 16:0 e 18:0) e 20:4n6, acompanhada da diminuição na proporção de 18:2n6 e do ΣAGPI. As semelhanças entre os resultados obtidos sugerem que o efeito do Orlistate no perfil de AG, é similar ao efeito da diminuição do teor de lipídios na dieta, o que está de acordo com o mecanismo de ação anteriormente proposto para o fármaco (Clapham *et al.*, 2001; Harp, 1998; Bray, 2008; Wittert *et al.*, 2007).

Mudanças similares, embora quantitativamente distintas, foram observadas em ambas as frações sanguíneas avaliadas (plasma e ME). Esta observação está de acordo com estudos anteriores, os quais relatam a troca de AG entre plasma, eritrócitos e plaquetas (Skeaff *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2007). Adicionalmente, variações num mesmo sentido foram observadas para os lipídios

estudados.

Estudos demonstram que em TG de plasma, o perfil de AG se assemelha, mas não é idêntico, ao observado para a dieta (Bysted *et al.*, 2005; Summers *et al.*, 2000). Por outro lado, a composição de AG em outros lipídios como FL e EC, é menos influenciada pela dieta, devido à especificidade das acil-transferases responsáveis pela incorporação dos AG nestes lipídios. Hodson *et al.* (2008) relataram que os AG 18:1, 18:2 n 6 e 16:0 são incorporadas em FL de plasma e em ME numa mesma taxa, a qual foi significativamente diferente da observada para incorporação destes AG em EC de plasma. A taxa de incorporação diferenciada observada para incorporação de AG em EC pode ser explicada devido à especificidade da enzima lecitina-colesterol aciltransferase responsável pelo processo (Yang *et al.*, 1986).

Por fim, os resultados apresentados nesta dissertação não são suficientes para elucidar todas as alterações no perfil lipídico devido o tratamento com Orlistate e avaliar a influência da dieta no tratamento. Os resultados obtidos demonstram que o tratamento com Orlistate altera o perfil de AG em vários lipídios presentes em sangue e na ME, com possível impacto na funcionalidade da mesma. Além de contribuir para a diminuição das proporções de AGPI- n 3 e vários AG exógenos e essenciais.

CONCLUSÃO PARCIAL

Nesta Parte, ilustramos a capacidade da PCA em selecionar íons do espectro de massas para quantificação de EMAG por CG-EM através de monitoramento de íons selecionados (íons com m/z 74, 79, 81 e 87). O método manteve a informação qualitativa relativa ao número de insaturações, o que juntamente com o tempo de retenção permite identificar o EMAG. Adicionalmente, os espectros de massas obtidos por monitoramento dos íons selecionados permitiu avaliar a seletividade do método simultaneamente a quantificação do EMAG, identificando possíveis co-eluições e/ou contaminações nas análises.

A metodologia implementada para determinação de AG, após preparação dos respectivos EMAG, obteve adequada precisão, repetitividade e baixos limites de detecção e quantificação. O desempenho obtido é aceitável para muitas aplicações analíticas, entre elas a determinação de AG presentes em diversos lipídios sanguíneos.

O tratamento com Orlistate durante 120 dias resultou numa diminuição não significativa no índice de massa corpórea (**IMC**), mas contribuiu para diminuição nos níveis de colesterol-HDL no plasma e do conteúdo de colesterol total na ME. Embora seja conhecida a capacidade do Orlistate em diminuir o conteúdo de colesterol no plasma, este é o primeiro relato de que o fármaco altere o conteúdo de colesterol na ME.

O tratamento com Orlistate também provocou a diminuição nas proporções de vários AG essenciais e exógenos, com conseqüente aumento nas proporções de AG endógenos. O tratamento diminuiu significativamente a proporção de AG com importantes funções biológicas, como AGPI- $n3$, de forma que quantidades suplementares dos mesmos podem ser indicadas com o uso prolongado do fármaco. Adicionalmente, um perfil de AG significativamente diferente foi descrito para indivíduos magros comparados a indivíduos com sobrepeso, confirmando a alteração do perfil lipídico que acompanha o aumento de peso.

PARTE II:
ANÁLISE METABOLÔMICA DO PLASMA DE PACIENTES COM SOBREPESO
TRATADOS COM ORLISTATE POR RMN DE ¹H.

INTRODUÇÃO PARTE II

6.1 Metabolômica e metabonômica

Metabolômica e metabonômica são termos aplicados ao estudo de organismos ou sistemas biológicos destinados a monitorar um grande número de metabólitos (Weckwerth *et al.*, 2005). Formalmente há uma diferença sutil entre os termos, embora, na prática eles sejam muitas vezes utilizados como sinônimos.

A diferença entre metabolômica e metabonômica não está relacionada à escolha da plataforma analítica: embora, na literatura, metabonômica esteja mais associada à ressonância magnética nuclear (**RMN**), enquanto metabolômica à espectrometria de massas (**EM**). Embora ainda não haja concordância absoluta, há um consenso crescente de que **metabolômica** coloque uma maior ênfase no perfil metabólico endógeno normal, enquanto **metabonômica** amplie o perfil metabólico para incluir alterações do metabolismo causadas por fatores ambientais (como dieta e estilo de vida), influências extragenômicas (como microflora intestinal), processos fisiológicos ou patológicos e intervenções farmacológicas (Robertson, 2005; Lindon e Nicholson, 2008, Oliver *et al.*, 1998). Neste trabalho, o termo metabolômica será empregado ao se referir ao estudo do perfil metabólico.

Alternativamente, podemos entender metabolômica como uma combinação de metodologias analíticas e análise estatística multivariada no estudo do metaboloma. Metaboloma se refere ao conjunto completo de metabólitos de um organismo. Dentro deste contexto, os metabólitos são geralmente definidos como moléculas com massa molar menor que um 1 kDa presentes nos organismos (Samuelsson e Larsson, 2008). No entanto, existem exceções a esta regra, e macromoléculas como lipoproteínas podem ser consideradas como metabólitos, por exemplo, na avaliação de plasma sanguíneo por RMN (Nicholson *et al.*, 1995).

Ainda podemos entender metaboloma como o produto da interação do genoma com o ambiente, refletindo estados fisiológicos, patológicos e/ou intervenções farmacológicas (Oliver *et al.*, 1998). Metabólitos são frequentemente classificados em primários (diretamente envolvido no crescimento, desenvolvimento e reprodução do organismo) ou secundários (não estão diretamente envolvidos nesses processos). Em humanos, os metabólitos são mais comumente classificados como endógenos (produzidos pelo próprio organismo) ou exógenos (Oliver *et al.*, 1998).

6.2 Metabolômica: origens e cenário atual

A idéia de que fluídos biológicos refletem a saúde do indivíduo é antiga. Na antiguidade, chineses utilizavam formigas para avaliar se a urina do paciente continha níveis elevados de glicose e, portanto, detectar diabetes. Na Idade Média, características como cor, sabor e odor da urina eram utilizados na identificação de diversas condições clínicas (Nicholson e Lindon, 2008).

O conceito de que indivíduos possuem um "perfil metabólico" (termo cunhado por Hornings em 1971), o qual é refletido na composição de seus biofluidos foi introduzido no início dos anos 50 por Roger Williams e colaboradores. Estes pesquisadores utilizaram mais de 200 mil cromatogramas em papel, para demonstrar de forma convincente que os padrões de excreção para uma variedade de metabólitos variam em função do tempo, mas que esses padrões eram relativamente constantes para um determinado indivíduo. O método foi então utilizado para examinar amostras provenientes de diversos grupos de indivíduos, incluindo alcoólatras e esquizofrênicos, os cromatogramas obtidos constituíram então, evidências muito sugestivas de que havia padrões metabólicos característicos associados a cada um desses grupos (Gates e Sweeley, 1978). As idéias de Williams e colaboradores, sobre a utilidade do padrão metabólico, permaneceram essencialmente dormentes até o final dos

anos 1960, quando as cromatografias gasosas e líquidas se tornaram suficientemente avançadas para que estudos similares fossem realizados com esforços consideravelmente menores. Já nos anos 70, tornou-se evidente a utilização do perfil metabólico de biofluidos na investigação de processos patológicos, quando George Williams *et al.* (1970) demonstraram que o perfil de excreção de ácidos orgânicos na urina de pacientes com fenilcetonúria era consideravelmente diferente do perfil observado para os indivíduos saudáveis (controles).

Seeley *et al.* (1976) demonstram a utilidade da RMN na determinação de metabólitos em amostras biológicas, este estudo pioneiro permitiu determinar que no músculo, 90% dos ATP celulares estão complexados ao magnésio (Hoult *et al.*, 1974).

Recentemente, análises metabolômicas utilizando RMN têm sido, em grande, Parte impulsionadas pelos estudos de Dr. Jeremy Nicholson no “*Birkbeck College*”, na Universidade de London. Em 1984, o grupo de Nicholson demonstrou que RMN de ¹H poderia ser utilizada para diagnosticar diabetes mellitus, este grupo foi também pioneiro na aplicação de métodos de reconhecimento de padrões (métodos quimiométricos) na análise de dados espectroscópicos de RMN.

Em 23 de janeiro de 2007, o Projeto do Metaboloma Humano (*hmp*, do inglês “*human metabolome project*”), liderado pelo Dr. David Wishart, da Universidade de Alberta no Canadá, completou o primeiro esboço do metaboloma humano, que consistia em um banco de dados de aproximadamente 2.500 metabólitos. A versão atual do Banco de Dados do Metaboloma Humano (HMDB, do inglês “*Human Metabolome Database*”; versão 2.5; www.hmdb.ca) contém mais de 7900 metabólitos. HMB é um banco de dados gratuito destinado a aplicações em metabolômica, química clínica, descoberta de biomarcadores e educação em geral. O banco de dados é projetado para conter três tipos de

dados: *i*) químicos; *ii*) clínicos e *iii*) de biologia molecular/bioquímica.

6.3 Aplicações da metabolômica

Em sistemas biológicos, as informações seguem um caminho natural do DNA para o RNA, do RNA para as proteínas para então desencadear a função biológica (a qual pode ser a produção/degradação de um determinado metabólito). O sentido do fluxo de informações, sugere uma regulação hierárquica, dominada pela expressão gênica. Porém, não há relação quantitativa entre os níveis de mRNA e a resposta biológica desencadeada, pelo menos não para o fluxo glicolítico (Kuile *et al.*, 2001). Adicionalmente, o metabolismo integrado do organismo (hospedeiro + simbiote), não pode ser entendido considerando apenas o genoma humano, visto que organismos simbiotes (interpretados como informações "extra-genômicas") podem ser fontes de metabólitos e outras influências no metabolismo (Nicholson e Wilson, 2003).

Assim, a expressão gênica sozinha não explica o fluxo metabólico de um sistema biológico complexo como o corpo humano, e não é suficiente para recuperar toda informação biológica disponível. Neste sentido, a metabolômica fornece uma oportunidade única de avaliar o metabolismo integrado do organismo, permitindo ainda integração com as demais abordagens "ômicas".

Outra vantagem da metabolômica é o tamanho do metaboloma, o qual é relativamente pequeno (em termos de número de entidades) comparado ao genoma, transcriptoma ou proteoma (Claudino *et al.*, 2007). A **Figura 14** ilustra as relações entre as abordagens e o número entidades envolvidas.

Além do menor número de entidades envolvidas, o estudo do metaboloma possui várias outras vantagens adicionais, ressaltadas abaixo:

1. Uma vez que o metaboloma é o produto final da expressão gênica, variações na concentração dos metabólitos são, em tese, amplificadas em relação às alterações nos níveis de transcriptores e proteínas (Dunn, 2005);

2. O metaboloma está mais próximo do nível funcional da célula (Goodacre *et al.*, 2004);
3. É menos dispendioso;
4. Facilidade na obtenção de amostras;
5. Em comparação a transcriptômica e proteômica, técnicas analíticas para determinação de metabólitos são mais desenvolvidas (Fiehn, 2001).

Espécie	Definição	Número de Entidades
DNA	<i>Genômica: é o estudo dos genes de um organismo através do seqüenciamento do DNA</i>	40.000 genes
RNA	<i>Transcriptômica: avaliação da expressão gênica</i>	150.000 transcriptores
Proteínas	<i>Proteômica: é o estudo das estruturas e funções de proteínas em grande escala</i>	1.000.000 proteínas
Metabólitos	<i>Metabolômica e Metabolômica: combinação de metodologias analíticas aliadas a técnicas de reconhecimento de padrão no estudo de metabólitos</i>	7.900 metabólitos

Figura 13. Comparação entre genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma em humanos e o número de entidades descritas atualmente (Adaptado de Wishart *et al.*, 2005)

Por fim, as análises metabolômicas podem ser conduzidas através de duas abordagens básicas: i) análise compressiva dos metabólitos de um organismo numa dada condição, o que inclui a identificação e quantificação de “todos” os metabólitos; ii) análise da impressão digital (“*metabolic fingerprinting*”), não é necessário identificar ou quantificar todos os metabólitos, apenas a impressão digital é considerada na classificação da amostras, a fim de manter o alto desempenho (“*throughput*”) do método.

Metabolômica experimentou nos últimos anos uma expansão vertiginosa, sendo atualmente aplicada em diversas áreas como (Moco *et al.*, 2007):

1. Diferenciação de fenótipos;
2. Diagnóstico médico;
3. Avaliação de estados patológicos, atividade e toxicidade de fármacos;
4. Busca de novos biomarcadores;
5. Elucidação de rotas metabólicas;
6. Avaliação da influência do estilo de vida, da dieta, do ambiente e de fatores genéticos no metaboloma.

Metabolômica pode ser utilizada na clínica para diagnósticos, através da análise do perfil metabólico ou na busca de novos biomarcadores. Há um crescimento acelerado no número de trabalhos publicados e patologias investigadas nos últimos anos.

Metabolômica tem sido aplicada no diagnóstico, predição e avaliação de estados patológicos como diabetes do tipo 1 e 2 (Lanza *et al.*, 2010), cirrose (Qui *et al.*, 2004), câncer (Claudino *et al.*, 2007), doenças coronarianas (Brindle *et al.*, 2002) usando amostra de plasma ou soro. Já desordens neurológicas como meningite e doença de Alzheimer têm sido avaliadas através de amostras de fluído cerebrospinal (Wikoff *et al.*, 2005).

Estudos metabonômicos têm emergido lentamente como ferramenta na elucidação da influência da dieta no perfil metabólico. Bertram *et al.* (2009) avaliaram o efeito de uma dieta à base de centeio em relação a uma dieta rica em fibras trigo em suínos hipercolesterolêmicos, a análise de PLS-DA dos espectros de RMN de ¹H obtidos para amostras de plasma revelou que a região espectral relativa a betaína permite diferenciar os suínos de acordo com a dieta, a análise ainda revelou que a alteração metabólica tem efeitos benéficos na hipercolesterolemia.

O perfil metabólico total pode ainda ser utilizado no estudo de patologias para as quais biomarcadores com sensibilidade e seletividades adequadas não estão disponíveis, por exemplo, na detecção de *necrose papilar renal* (Tsuchiya *et al.*, 2008).

6.4 Ressonância magnética nuclear na metabolômica

RMN é amplamente empregada na metabolômica fornecendo análises rápidas, não-destrutivas, além da alta reprodutibilidade e mínima preparação da amostra (Lindon, 2003). A maioria dos estudos emprega RMN de ^1H devido à alta sensibilidade e desempenho, uma vez que um grande número de metabólitos contém átomos de hidrogênio (Lindon, 2008).

Equipamentos de RMN de campos magnéticos maiores permitem a análise de um número maior de metabólitos e facilita a aplicação da RMN em estudos metabolômicos. O uso de sondas criogênicas que diminuem o ruído eletrônico/térmico dos equipamentos, o que melhora a razão sinal/ruído em mais de quatro vezes, permitindo não só a análise de metabólitos em menores quantidades, como a detecção de outros núcleos menos sensíveis, por exemplo, ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P (Coen *et al.*, 2008, Lindon, 2008).

Embora a identificação dos metabólitos não seja necessária para classificação das amostras (uso na clínica, “fingerprint”), metabólitos diferenciais (biomarcadores) podem fornecer informações *importantes* sobre o mecanismo bioquímico de uma patologia ou *sobre o mecanismo de ação* de um fármaco.

Espectros de RMN de ^1H de biofluidos possuem um grande número de sinais superpostos, entretanto, muitos metabólitos podem ser assinalados diretamente com base nos seus deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento. As atribuições podem então ser confirmadas pela adição da “suposta substância” (“*spiked*”), ou através de espectros bidimensionais de RMN.

RMN 2D permite estabelecer a conectividade entre duas ou mais

ressonâncias. A espectroscopia de correlação (COSY do inglês “correlation spectroscopy”) e a espectroscopia de correlação total (TOCSY do inglês “total correlation spectroscopy”) fornecem correlações associadas aos acoplamentos spin-spin ^1H - ^1H de um dado metabólito. Correlações heteronucleares, por exemplo, ^1H - ^{13}C , podem ser utilizadas para identificar metabólitos poucos usuais.

RMN 2D também tem sido empregado na avaliação do perfil metabólico, o que permite um aumento da dispersão dos sinais, facilitando a visualização dos acoplamentos e diminuindo a sobreposição dos sinais.

6.5 Análise metabolômica

A análise metabolômica pode ser dividida em várias etapas (**Figura 15**), após o planejamento experimental e coleta das amostras é então realizada a obtenção e processamentos dos espectros (**A**); os espectros são então convertidos em uma matriz de dados a qual é pré-processada (alinhamento e “*binning*” são os mais utilizados) (**B**); a matriz dados é então submetida à análise quimiométrica, métodos não-supervisionados (análise exploratória) são utilizados na investigação de padrões (**C**) e identificação de biomarcadores (**D**). Análises de correlação metabólica (**E**) podem ser utilizadas na investigação de alterações em vias metabólicas através de mapas de correlação diferencial (**F**). Em alguns casos, métodos supervisionados de reconhecimento de padrões são utilizados para predição de amostras independentes (**G**).

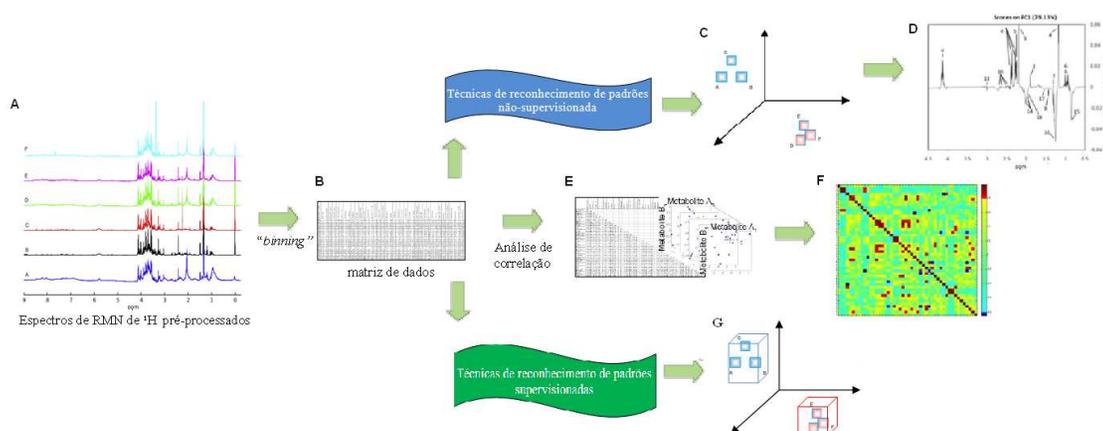


Figura 15

Figura 14. Estratégia para análise de dados metabolômicos

6.6 Análises quimiométricas

Dados metabolômicos contém informações sobre centenas de metabólitos, dos quais apenas uma pequena fração, está diretamente relacionada ao problema. Métodos quimiométricos são úteis na extração de informações relevantes, permitindo a identificação de biomarcadores.

Quimiometria é uma área da Química que usa métodos matemáticos e estatísticos no planejamento de experimentos, processamento de dados, calibração, controle de qualidade e organização de processos analíticos. A quimiometria emergiu na década de 1970 com o aumento na utilização de computadores na investigação científica, sendo termo cunhado por Svante Wold em 1974 (Wold, 1995).

A aplicação de métodos quimiométricos foi um marco decisivo na aplicação prática da metabolômica, por maximizar a recuperação de informações a partir de dados espectrais complexos, permitindo o desenvolvimento e a progressão do campo desde então (Coen *et al.*, 2008).

Métodos quimiométricos são úteis na classificação de um espectro

representativo de um fenótipo ou processo, com base no padrão inerente de picos e na identificação das características espectrais responsáveis por esta classificação. Métodos quimiométricos são úteis em situações nas quais o número de variáveis é grande, permitindo a redução da dimensionalidade do conjunto de dados para duas ou três dimensões, facilitando a visualização de padrões.

Os métodos quimiométricos podem ser divididos em duas categorias: *i*) não-supervisionados e *ii*) supervisionados.

i) **Métodos não-supervisionados:** também conhecidos como análise exploratória de dados, estabelecem padrões intrínsecos presentes nos dados, sem considerar qualquer informação sobre a classe. Exemplos de métodos não-supervisionados incluem a análise de componentes principais (**PCA**) e análise de agrupamentos hierárquicos (**HCA** do inglês “*hierarchical cluster analysis*”).

ii) **Métodos supervisionados:** levam em consideração informações sobre a classe, para otimizar a separação entre as mesmas. Os modelos obtidos nos métodos supervisionados podem ser contínuos (regressão) ou categóricos (classificação), sendo os últimos mais aplicados em metabolômica. Exemplos métodos supervisionados são: PLS-DA, SIMCA e KNN (Duda *et al.*, 2001). Uma vez que em conjuntos de dados grandes é possível de encontrar correlações aleatórias, métodos supervisionados utilizam um segundo conjunto independente de dados (conjunto de validação) para confirmar a validade do modelo construído a partir do conjunto de treinamento.

6.6.1 Análise de componentes principais

Análise de componentes principais (**PCA**) é um método quimiométrico que visa representar dados n -dimensionais através de um número menor de “componentes”, facilitando o reconhecimento de padrões. Isto é feito através da construção de um novo espaço dimensional, no qual os eixos das variáveis

originais são substituídos por novos eixos, chamados componentes principais (CP). As amostras são então representadas nas componentes principais, tipicamente duas ou três (Ferreira *et al.*, 2002).

Cada CP é uma combinação linear das variáveis originais de forma a descrever a máxima variância dos dados, cada CP sucessiva explica o máximo de variância não incluída nas componentes anteriores. Assim as CP são ortogonais entre si e, portanto, independentes. A quantidade de informação dos dados originais descrita por cada CP pode ser calculada, se uma quantidade significativa da informação é considerada pelo modelo, o mesmo pode ser usado na interpretação dos dados (Beebe *et al.*, 1998; Brereton, 2007).

A PCA fornece gráficos de escores (do inglês “scores”) e gráficos de pesos (do inglês “loadings”). Os gráficos de escores refletem a distribuição das amostras nas CP. Os gráficos de pesos indicam o quanto uma variável contribui para uma dada CP, em outras palavras, os pesos representam a magnitude da correlação entre as variáveis medidas e a CP. É possível examinar as relações entre os gráficos para estimar a influência de cada variável no agrupamento observado para as amostras (Beebe *et al.*, 1998; Brereton, 2007).

6.6.2 Análise discriminante por quadrados mínimos parciais

A análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA do inglês “*partial least squares discriminant analysis*”) é usada para estabelecer a posição ideal da superfície de separação entre as classes de amostras. PLS-DA fornece CP as quais focam na máxima separação (discriminação) entre as classes em preferência ao modelamento ótimo das mesmas, como ocorre em PCA (Eriksson *et al.*, 2004). A máxima separação é conseguida ao considerar as informações presentes na matriz contendo as variáveis dependentes (respostas) na análise.

6.7 Pré-processamento dos dados

O pré-processamento de dados metabolômicos obtidos por RMN, frequentemente incluem uma redução do número de variáveis através da integração de pequenas regiões espectrais (“bins”, janelas de frequência), as quais possuem normalmente uma largura espectral entre 0,01 e 0,04 ppm. Este procedimento permite minimizar pequenas variações na posição das ressonâncias, as quais ocorrem devido a flutuações nas condições ambientais (como pH, força iônica e temperatura da amostra) (Holmes *et al.*, 1994).

Por outro lado, alguns estudos têm considerado toda a resolução espectral. Cloarec *et al.* (2005) demonstraram que variações na posição dos picos, por exemplo, devido a variação do pH, pode ser informativa em alguns casos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliação do perfil metabólico foram obtidos espectros de RMN de ^1H , os quais permitem monitorar simultaneamente um grande número de metabólitos. Para tornar possível a identificação e quantificação destes metabólitos foi necessária a utilização de uma sequência de pulsos que elimine o sinal referente à água e os sinais relativos às proteínas, ambas encontradas em grande abundância em amostras de plasma.

7.1 Otimização dos parâmetros de aquisição

A supressão do sinal da água ($\text{H}_2\text{O}/\text{HDO}$) foi feita por pré-saturação deste sinal (“*pressat*”). As amostras foram irradiadas durante 5,0 s (D1) com uma potência de atenuação de 35 dB (**Figura 16**). A frequência de irradiação foi ajustada individualmente para cada amostra e variou entre 4,69 e 4,71 ppm.

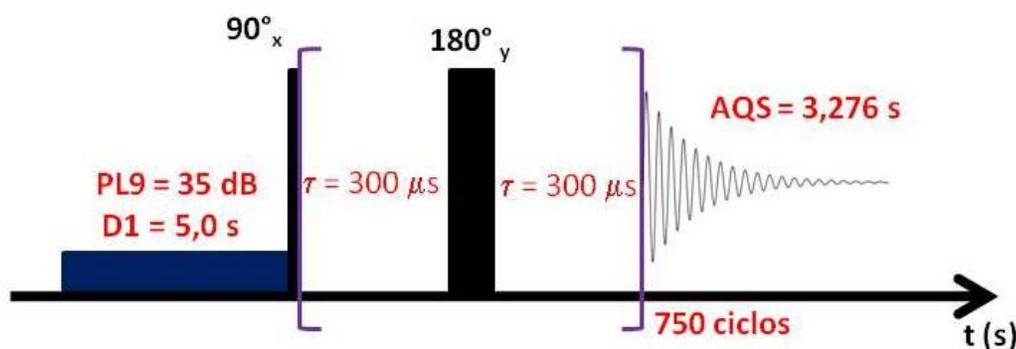


Figura 15. Sequência de pulsos usada na obtenção dos espectros de RMN de ^1H de amostras de plasma

Espectros de RMN de ^1H de plasma apresentam sinais alargados devido à presença de macromoléculas, como proteínas e lipoproteínas. Uma sequência de *spin-eco*, CPMG (Carr–Purcell–Meiboom–Gill), foi utilizada na obtenção de espectros de RMN de ^1H (T_2 – editados), permitindo a visualização de sinais finos

resultantes dos metabólitos. Sequências de *spin-eco* funcionam como um filtro T_2 , eliminando sinais provenientes de moléculas com tempo de relaxação transversal (T_2) curtos. Macromoléculas possuem baixas taxas de tombamento em solução (“*tumbling*” em inglês), resultante em taxas de relaxação elevadas e T_2 curtos.

Para tempos de *spin-eco* curtos (menores que 450 ms) foram observadas poucas ressonâncias com razões sinal/ruído adequadas, alguns sinais pouco intensos, relativos a metabólitos minoritários, permaneceram encobertos pelos sinais alargados provenientes de macromoléculas como proteínas e lipoproteínas. Enquanto 450 ms foram suficientes para obter os sinais dos metabólitos resolvidos na linha de base, tempos maiores de *spin-eco* levaram a eliminação destas ressonâncias, com conseqüente aumento da razão sinal/ruído.

Moléculas pequenas ligadas às proteínas seja a ligação irreversível ou não, tem sua taxa de tombamento em solução reduzida a da proteína, com conseqüente aumento na taxa de relaxação, diminuição do T_2 e alargamento do sinal. Conseqüentemente, ressonâncias provenientes de metabólitos ligados a macromoléculas serão alargadas e poderão ser eliminadas em espectros de RMN T_2 - editados. A ligação proteína-metabólito pode também introduzir variabilidades no espectro devido à variação na concentração de proteínas presente no plasma.

A evolução dos acoplamentos escalares homonucleares durante o tempo de *spin-eco* pode ocasionar distorções na fase de multipletos e/ou diminuição na amplitude do sinal, as quais podem ser evitadas mantendo-se τ muito menor que o inverso da constante de acoplamento (J^1) (Peng *et al.*, 1991; Van *et al.*, 2003). Um τ igual a 300 μ s foi usado na aquisição de todos os espectros, para manter o tempo de *spin-eco* fixo em 450 ms, foram utilizados 750 ciclos.

Para aplicações quantitativas ou metabolômicas é desejável que haja recuperação total da magnetização longitudinal do núcleo de interesse, antes da incidência do próximo pulso, de forma a assegurar a proporcionalidade entre a

intensidade do sinal e a concentração do analito. O tempo necessário para assegurar a completa recuperação da magnetização longitudinal é de cinco vezes o tempo de relaxação longitudinal ($5 \cdot T_1$). Desta forma, a soma do tempo de relaxação (**D1**) e do tempo de aquisição deve ser pelo menos cinco vezes maior que T_1 , a qual é excessivamente grande e usualmente impraticável.

Na prática, o intervalo entre os pulsos sucessivos é escolhido como um compromisso entre o tempo total do experimento e a sensibilidade desejada. Neste experimento, um intervalo de 8,3 segundos foi utilizado (tempo de aquisição = 3,3 s; tempo de relaxação = 5,0 s). Nenhum desvio detectável foi observado na integração dos sinais. Um espectro modelo, semelhante ao obtido para todas as amostras, é apresentado na **Figura 17**.

7.2 Análises quimiométricas

O mesmo padrão de sinais foi observado em todos os espectros de RMN de ^1H obtidos para os diferentes grupos de amostras, com exceção das intensidades de algumas ressonâncias, como evidenciado pelas análises quimiométricas.

7.2.1 Análise de componentes principais (PCA)

PCA foi utilizada para investigar o efeito do tratamento com Orlistate no perfil metabólico de plasma obtido por RMN de ^1H de indivíduos com sobrepeso. PCA permitiu a redução da dimensionalidade dos dados para cinco CP mantendo 98,66% das informações dos dados originais, para os dados centrados na média, para valorizar as informações relativas às ressonâncias representativas de metabólitos em relação ao ruído. O gráfico de escores obtido (**Figura 17**) ilustra a distribuição das amostras no espaço formado pelas três primeiras CP, cada ponto representa um espectro de RMN de ^1H .

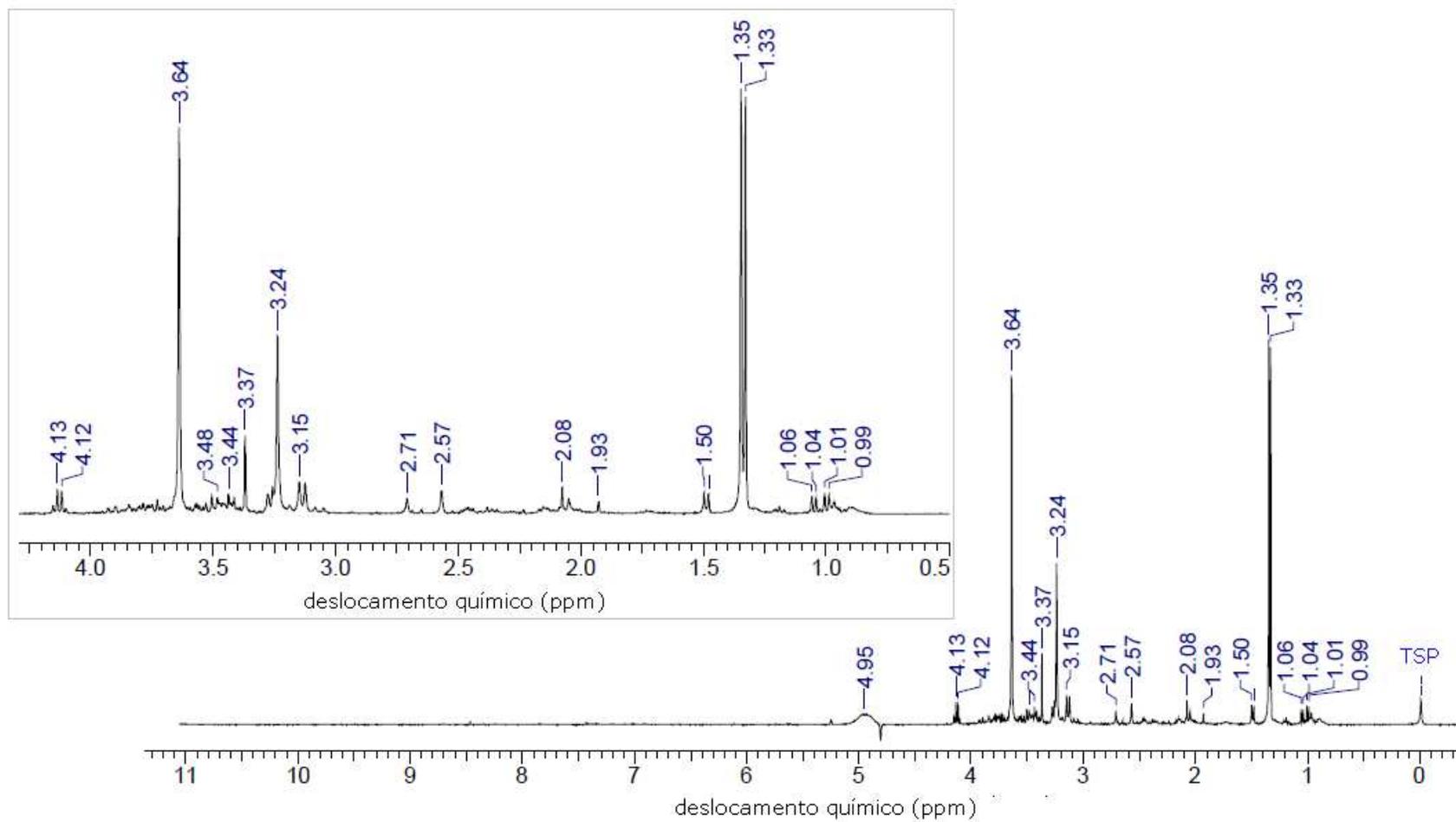


Figura 16. Espectro modelo de RMN de ^1H de plasma

O gráfico de escores (**Figura 18**) permitiu discriminar entre indivíduos com sobrepeso tratados e não-tratados com Orlistate ao longo da primeira CP. Porém, a separação entre os indivíduos magros não-tratados e com sobrepeso tratados com Orlistate não foi satisfatória. O escrutínio de CP de maiores ordens (PC3, PC4, etc..) não forneceu informações adicionais nem permitiu a discriminação destas amostras.

A análise do gráfico de escores (**Figura 18**) sugere uma normalização metabólica dos indivíduos com sobrepeso após o tratamento com Orlistate. A aproximação é indicada pela aproximação do perfil metabólico dos indivíduos tratados e dos indivíduos magros não-tratados. Adicionalmente, há uma diminuição na dispersão das amostras do grupo de indivíduos com sobrepeso após o tratamento com Orlistate, o que pode sugerir uma regulação metabólica provocada pelo tratamento.

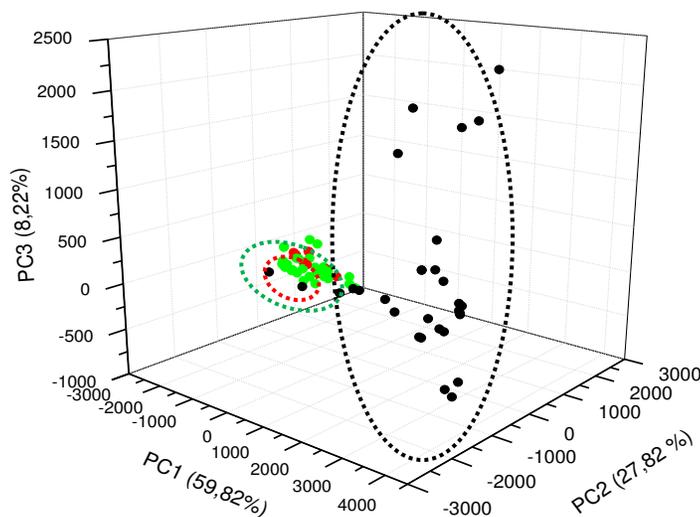


Figura 17. Gráfico de escores da PCA (CP = 5; 98,66%) para os espectros de RMN de ^1H centrados na média

Legenda: magros não-tratados (●); sobrepeso não-tratados (●) e sobrepeso tratados com Orlistate (●)

Os poderes de modelagem das variáveis e o gráfico de pesos foram avaliados para selecionar as variáveis mais significativas na discriminação das amostras. Seleção de variáveis não melhorou as separações obtidas para os grupos no gráfico de escores e, portanto não foi considerada.

7.2.2 Análise discriminatória por quadrados mínimos parciais (PLS-DA)

Métodos quimiométricos supervisionados, os quais modelam as classes individualmente, são preferidos nos casos nos quais o número de classes é grande ou para maximizar a discriminação das amostras (Lindon *et al.*, 2003). Para maximizar a discriminação entre os grupos de amostras estudados, dois modelos de PLS-DA foram construídos: *i*) um considerando indivíduos com sobrepeso tratados e não-tratados com Orlistate e *ii*) outro considerando os indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate e os indivíduos magros não-tratados.

7.2.2.1 Análise de PLS-DA: indivíduos com sobrepeso antes e após o tratamento com Orlistate

O modelo de PLS-DA foi construído para as duas classes, considerando sete CP, 98,89% das informações dos dados originais, para os dados centrados na média ($R_{\text{calibração}} = 96\%$; $R_{\text{validação}} = 88\%$). O gráfico de escores (**Figura 19**) revela que as amostras provenientes de indivíduos com sobrepeso não-tratados são separadas das provenientes de indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate ao longo da primeira CP.

Para assegurar a validade do modelo de PLS-DA, foram realizadas validação cruzada (“*leave one out cross validation*”) e a validação externa do modelo. Para validação externa, o conjunto de amostras foi dividido em dois subconjuntos: *i*) conjunto de calibração e *ii*) conjunto de validação. Dez amostras de provenientes de indivíduos com sobrepeso não-tratados e onze de tratados com Orlistate foram selecionadas para o conjunto de validação. HCA foi utilizada para auxiliar a seleção do conjunto de validação, como apresentado no **Anexo D**.

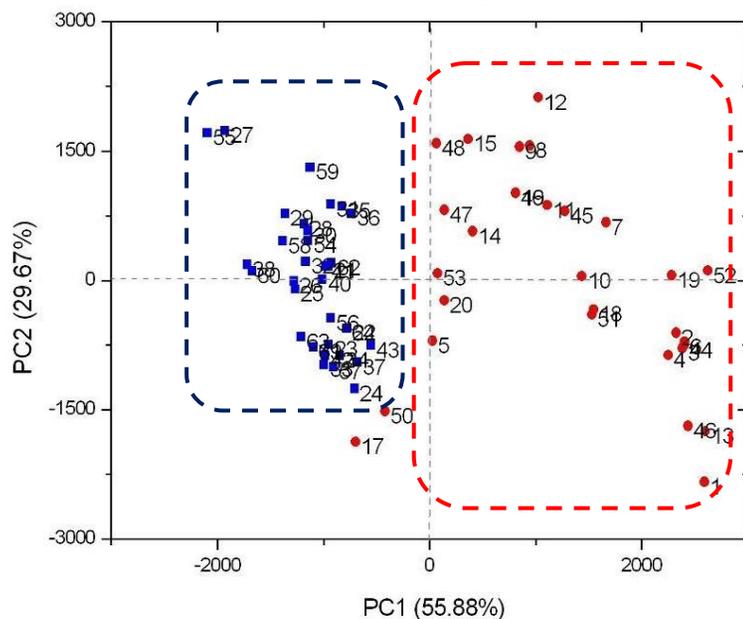


Figura 18. Gráfico de escores da análise de PLS-DA ($R_{\text{calibração}} = 96\%$; $R_{\text{validação}} = 88\%$; $CP = 7$; $98,89\%$) para amostras de plasma provenientes de indivíduos com sobrepeso não-tratados (●) e tratados com Orlistate (■)

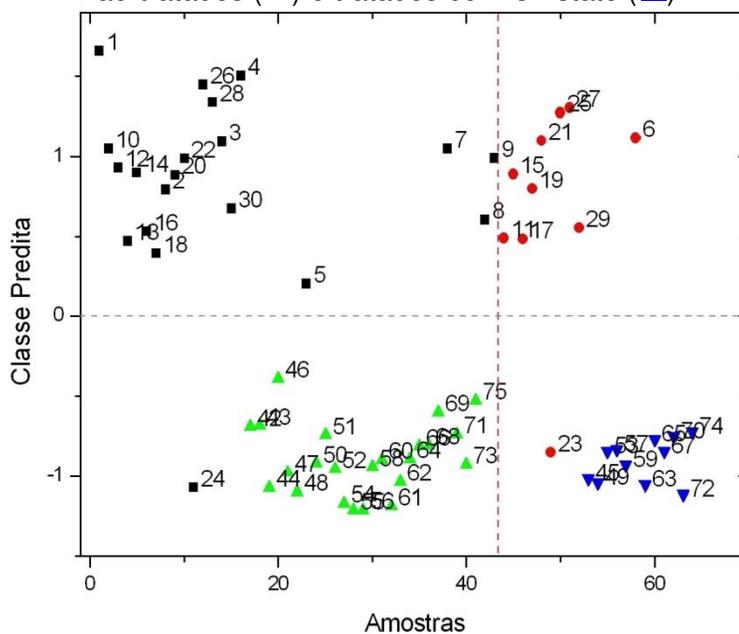


Figura 19. Validação cruzada (“leave one out cross-validation”) e predição do conjunto de validação do modelo de PLS-DA da Figura 19

Conjunto de calibração: sobrepesos tratados com Orlistate (■) e não-tratados (▲); **conjunto de validação:** sobrepesos tratados com Orlistate (●) e não-tratados (▼). A linha pontilhado horizontal (- -) é a fronteira de separação entre as classes e a linha pontilhada vertical (- -) separa os conjuntos de calibração e validação

O novo modelo PLS-DA construído apenas para o conjunto de calibração,

aplicando as mesmas condições do modelo anterior (mesmo número de CP), foi utilizado na predição das amostras do conjunto de calibração. A **Figura 20** apresenta as previsões obtidas para ambos os conjuntos.

O modelo de PLS-DA construído foi preciso ao classificar as amostras, apenas um erro foi cometido na predição das amostras do conjunto de calibração, onde o modelo previu a amostra 24 como de um indivíduo tratado com Orlistate, embora ela pertença a um não-tratado. Outro erro ocorreu no conjunto de validação, no qual a amostra 23 foi prevista como de um indivíduo tratado sendo na realidade proveniente de um não-tratado. Ambas as amostras (23 e 24) são provenientes de um mesmo paciente, o que pode indicar uma alteração no perfil metabólico do mesmo, mas não há motivos para destacar esta amostra como anômala. O desempenho do modelo de PLS-DA está resumido na **Tabela 14**.

Tabela 14. Desempenho do modelo PLS-DA na discriminação de indivíduos com sobrepeso tratados e não tratados com Orlistate

Grupos	Amostras	Erros de predição	% Erro
Não-tratados	30	2	6,67
Tratados com Orlistate	34	0	0,00
Total	64	2	3,13

A análise do gráfico de pesos (**Figura 21**) do modelo PLS-DA para os espectros de RMN de ¹H de amostras de plasma de indivíduos com sobrepeso revelou que a discriminação entre amostras associada principalmente à alteração na intensidade das ressonâncias em 1,33; 3,23; 3,36 e 3,64 ppm, as quais foram destacadas para posterior identificação dos respectivos metabólitos.

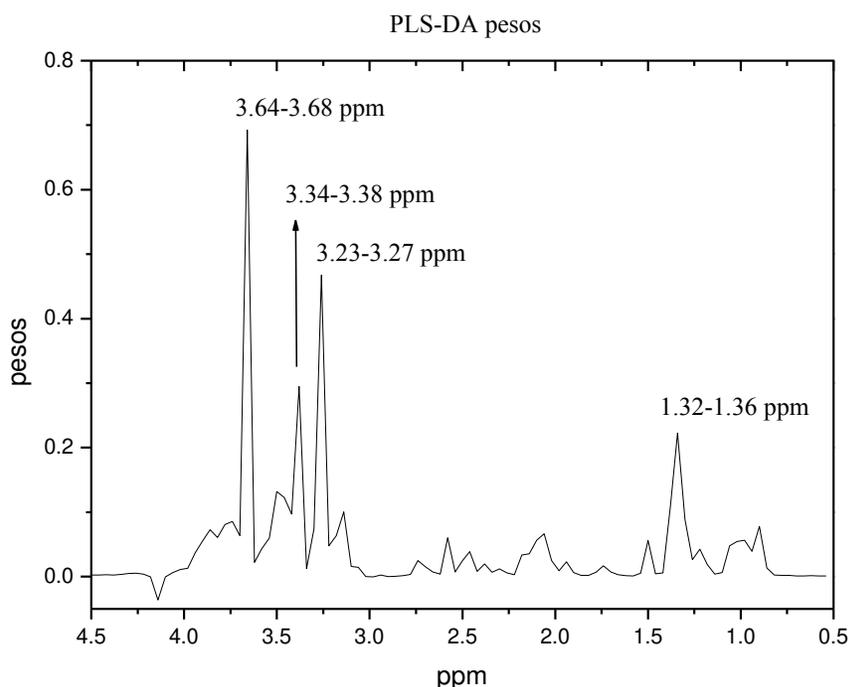


Figura 20. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA ($R_{\text{calibração}} = 96\%$; $R_{\text{validação}} = 88\%$; $CP = 7$; $98,89\%$) considerando apenas os indivíduos com sobrepeso tratados e não-tratados com Orlistate, mostrando a primeira CP versus deslocamento químico (ppm)

7.2.2.2 Análise de PLS-DA: indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate e magros não-tratados

O melhor modelo de PLS-DA ($R_{\text{calibração}} = 94\%$; $R_{\text{validação}} = 85\%$) obtido para as amostras provenientes de magros não-tratados e indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate, incluiu oito CP, contendo $99,58\%$ das informações dos dados originais, para os dados centrados na média. O gráfico de escores (**Figura 22**) mostra a distribuição das amostras nas três primeiras CP.

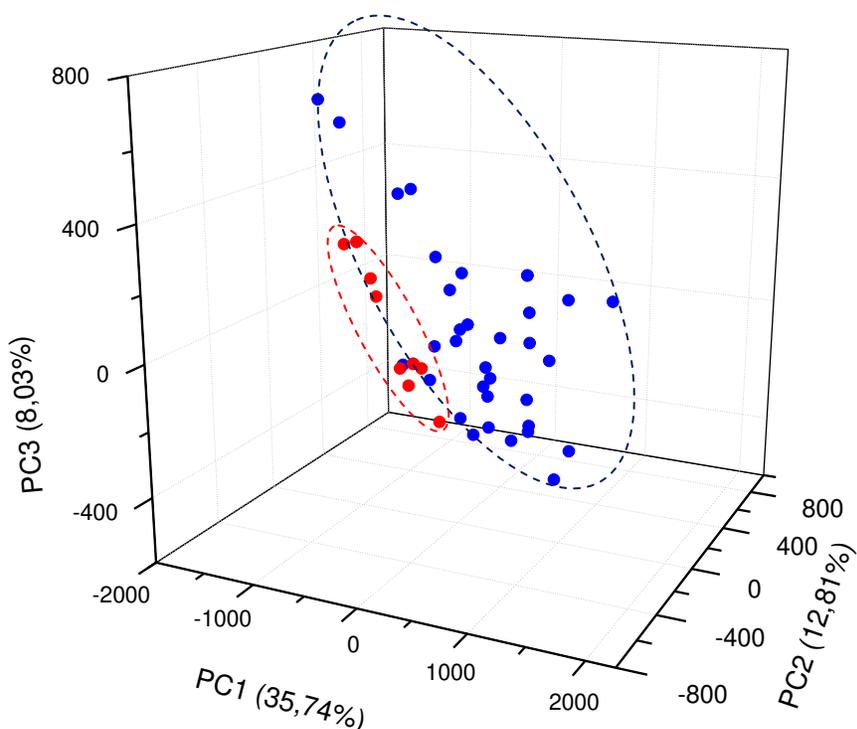


Figura 21 . Gráfico de escores da análise de PLS-DA ($R_{\text{calibração}} = 94\%$; $R_{\text{validação}} = 85\%$; $CP = 8$; $99,58\%$) para amostras de plasma provenientes de indivíduos magros não-tratados (●) e indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate (●)

Embora a separação entre as amostras de pacientes magros não-tratados e de pacientes com sobrepeso tratados com Orlistate seja modesta, a validação do modelo obtido, confirmou sua eficiência. Onze amostras provenientes de indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate e quatro de magros não-tratados foram selecionadas para o conjunto de validação. Um novo modelo PLS-DA foi construído para o conjunto de calibração aplicando as mesmas condições do modelo anterior. A **Figura 23** apresenta os resultados da validação cruzada e as previsões das amostras do conjunto de validação.

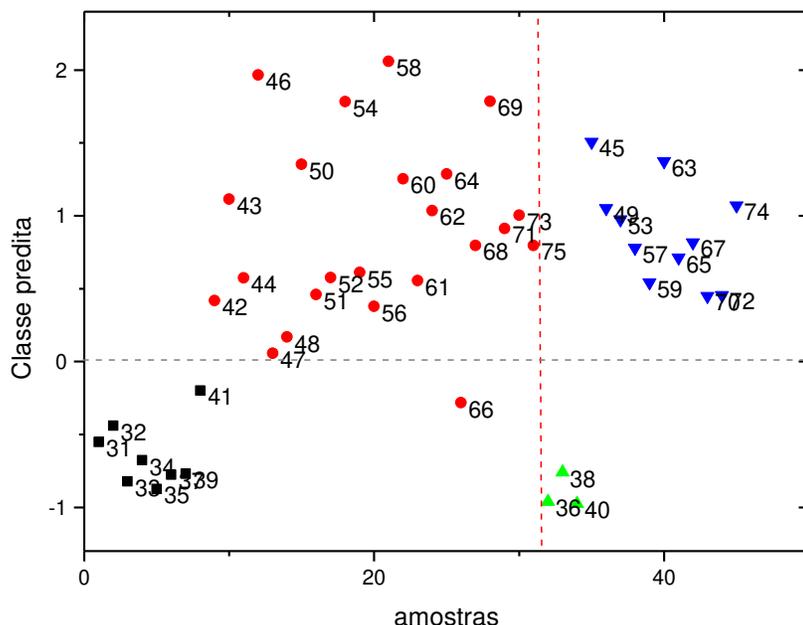


Figura 22. Validação cruzada (“leave one out cross-validation”) e predição do conjunto de validação do modelo de PLS-DA da **Figura 22**

Conjunto de calibração: sobrepesos tratados com Orlistate (●) e magros não-tratados (■); **conjunto de validação:** sobrepesos tratados com Orlistate (▼) e magros não-tratados (▲). A linha pontilhado horizontal (- -) é a fronteira de separação entre as classes e a linha pontilhada vertical (- -) separa os conjuntos de calibração e validação

Apenas um erro de predição foi cometido para uma amostra do conjunto de calibração, no qual a amostra 66 foi prevista como uma amostra proveniente de um indivíduo magro não-tratado, quando é proveniente de um com sobrepeso tratado com Orlistate.

As regiões do espectro de RMN de ^1H mais significativas para o agrupamento das amostras observados no gráfico de escores são destacadas no gráfico de pesos (**Figura 24**). As ressonâncias entre 0,96-1,00; 1,32-1,36; 1,48-1,52; 3,23-3,27; 3,64-3,68 e 4,12-4,16 ppm foram importantes na discriminação.

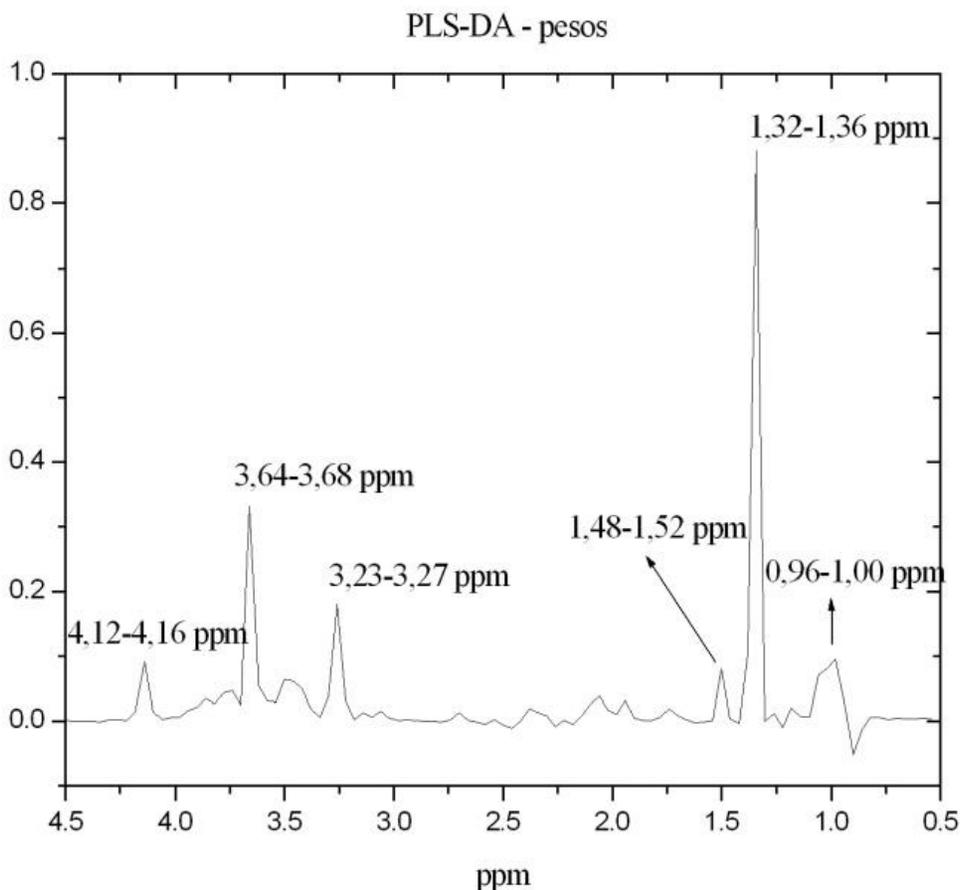


Figura 23. Gráfico de pesos do modelo PLS-DA ($R_{\text{calibração}} = 94\%$; $R_{\text{validação}} = 85\%$; $CP = 8$; $99,58\%$) considerando apenas os indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate e magros não-tratados, mostrando a primeira CP *versus* deslocamento químico (ppm)

7.3 Identificação dos metabólitos diferenciais

O mesmo padrão foi observado em todos os espectros de RMN de ^1H (**Figura 25a**), porém algumas ressonâncias específicas apresentaram diferentes intensidades em cada classe, como demonstrado pela análise PLS-DA. A identificação dos metabólitos diferenciais, metabólitos os quais permitiram diferenciação dos grupos, foi realizada para as ressonâncias destacadas pelos gráficos de pesos dos modelos quimiométricos (**Figuras 21 e 24**).

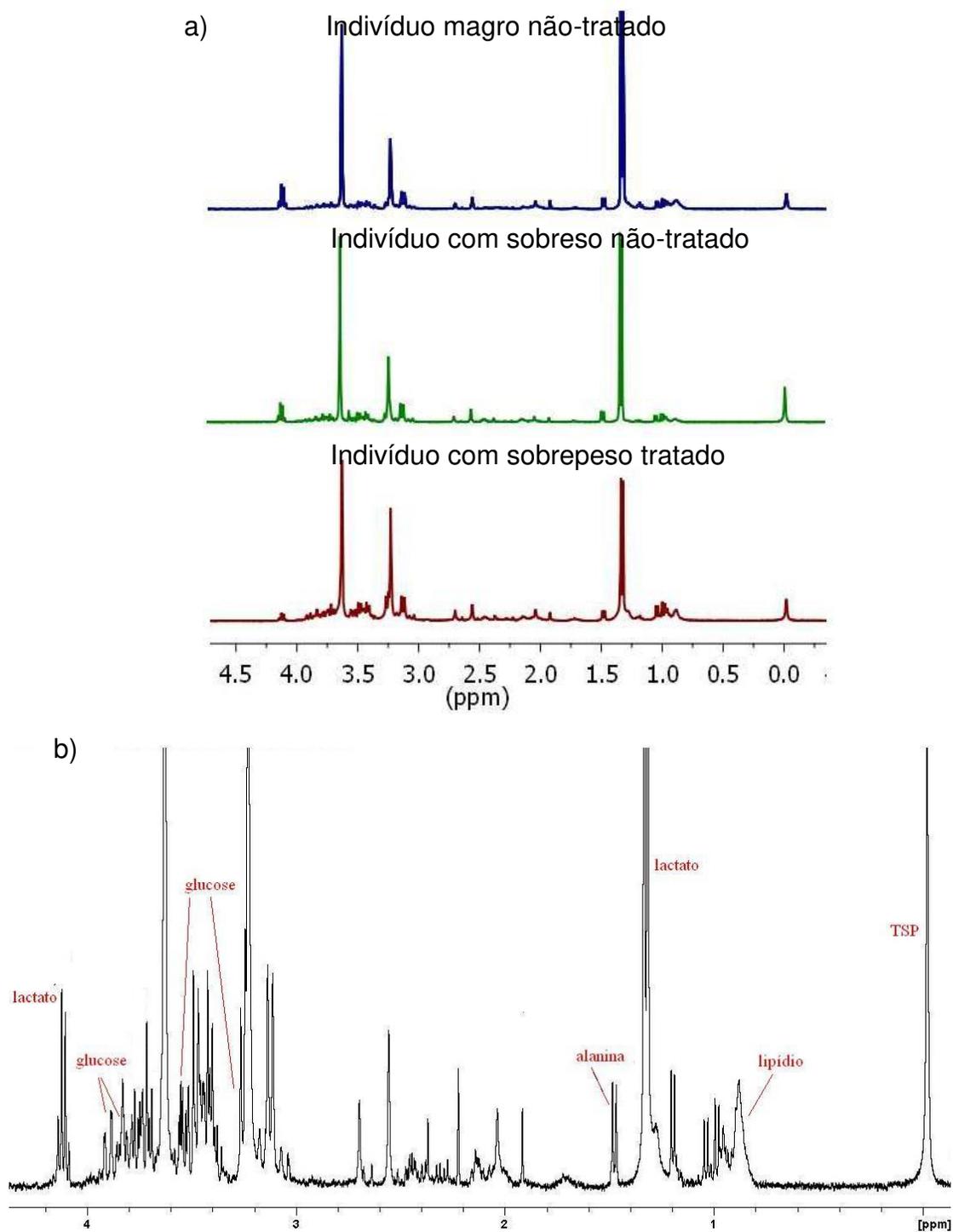


Figura 24. Região dos espectros de RMN de ^1H de plasma utilizada nas análises quimiométricas (intensidade \times deslocamento químico); a) espectros modelos e b) assinalamento das ressonâncias mais significativas para discriminação dos grupos de amostras

A identificação dos metabólitos que permitiram a diferenciação dos grupos foi realizada com base na comparação de seus deslocamentos químicos, multiplicidade de sinal e constantes de acoplamentos obtidos com valores reportados na literatura (Nicholson *et al.*, 1995; Fan, 1996; Bell *et al.*, 1987). Os metabólitos mais significativos para diferenciação entre os grupos estão destacados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Assinalamento dos deslocamentos químicos dos metabólitos diferenciais do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de amostras de plasma

Metabólito	δ ^1H (ppm) e multiplicidade	Assinalamento	J (Hz)
lipídios	0,96 (m)	CH_3CH_2	-
lactato	1,33 (d)	CH_3	7,0
	4,13 (q)	CH	7,0
alanina	1,48 (d)	CH_3	7,2
EDTA-livre	3,37 (s)	CH_2	-
	3,64 (s)	CH_2	-
EDTA- Ca^{2+}	3,24 (s)	CH_2	-

^a o assinalamento dos picos feito com base no espectro da **Figura 25b**;

A confirmação das ressonâncias para o lactato foi realizada com base nos espectros de ^1H -TOCSY 1D (**Anexo E**). Enquanto a atribuição das ressonâncias do EDTA-livre e quelato EDTA- Ca^{2+} foram feitas com base no experimento de “spiked” (**Anexo F**).

7.4 Metabólitos diferenciais

A análise quimiométrica dos espectros de RMN de ^1H (T_2 – editados), obtidos para amostras de plasma de indivíduos com sobrepeso, revelou que a

discriminação entre amostras provenientes de pacientes tratados e não-tratados com Orlistate está principalmente associada à diminuição nos níveis de lactato e alteração na concentração de íons capazes de formar complexos com EDTA (possivelmente íons cálcio).

Alterações nos níveis de lactato têm sido relacionadas à patologia da obesidade. Uma concentração significativamente maior de lactato foi observada em pacientes obesos em comparação com indivíduos magros (Lovejoy *et al.*, 2004). Embora o nível de lactato em jejum seja inversamente relacionado ao ganho de peso, níveis plasmáticos elevados de lactato têm sido associados à redução da fome (Dyken *et al.*, 2010). Uma concentração plasmática alta de lactato está associada à diminuição da ingestão de alimentos e a infusão periférica do mesmo em ratos, diminui a ingestão de alimentos e contribui para perda de peso (Lam *et al.*, 2008).

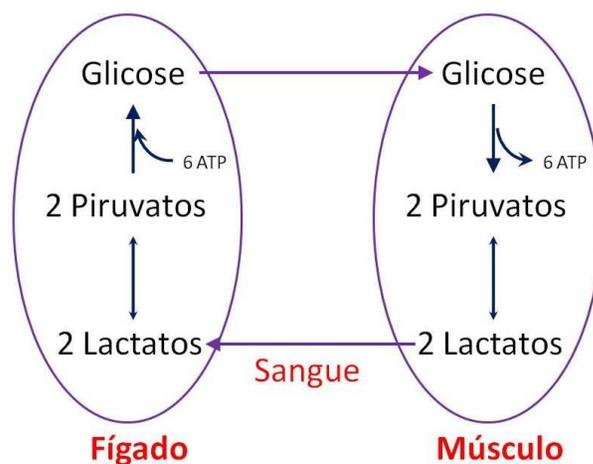


Figura 25. Ciclo de Cori (adaptado de Zhang *et al.*, 2008)

Embora a relação entre lactato e obesidade e a eficiência do Orlistate em auxiliar na perda de peso sejam bem documentadas na literatura, nós desconhecemos relatos anteriores da alteração do nível de lactato devido ao tratamento com o fármaco. Possivelmente a diminuição no nível de lactato esteja

relacionada a alterações no ciclo de Cori (**Figura 26**) e podendo estar relacionada a prática de exercícios físico. Desta forma, estudos adicionais precisam ser conduzidos para comprovação desta hipótese.

Os gráficos de pesos (**Figuras 21 e 24**) sugerem também uma alteração nos níveis de EDTA-livre e do complexo EDTA-Ca²⁺ associado ao tratamento com Orlistate. Embora EDTA tenha sido adicionado às amostras na etapa de coleta, as ressonâncias relativas ao EDTA não foram desconsiderados da análise, pois, podem fornecer informações importantes sobre a alteração da concentração de íons capazes de formar complexos estáveis com o agente quelante, especialmente os íons cálcio e magnésio (Han *et al.*, 2008; Nicholson *et al.*, 1983).

Os resultados obtidos sugerem uma possível diminuição na concentração dos íons cálcio e magnésio devido ao tratamento com Orlistate. A racionalização da alteração no nível de íons metálicos devido ao tratamento com um inibidor de lipases parece desafiadora e não é descrita na literatura. Desta forma, confirmação dos resultados obtidos através da quantificação dos íons cálcio e magnésio, antes e após o tratamento com Orlistate, será realizada pela técnica de absorção atômica.

A comparação entre os espectros de RMN de ¹H obtidos para indivíduos magros e com sobrepeso tratados com Orlistate revelou que embora os níveis de lactato e glicose tenham diminuído com o tratamento, eles ainda permanecem maiores que os obtidos para indivíduos magros, permitindo discriminar as amostras provenientes de indivíduos magros não-tratados e indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate.

Uma maior concentração de alanina também foi associada ao grupo de indivíduos com sobrepeso. O IMC tem sido relacionado ao aumento nos níveis séricos da enzima alanina transaminase (ALT) (Bedogni *et al.*, 2003), a qual é provavelmente, responsável pelo maior nível de alanina associado ao grupo de pacientes com sobrepeso.

A dislipidemia da obesidade/sobrepeso é caracterizada por níveis elevados de TG e baixos níveis de colesterol associado à lipoproteína de alta densidade (HDL) (Lamarche *et al.*, 1999), além de níveis elevados de glicose (Plourde, 2002). Alterações semelhantes às obtidas neste trabalho ao comparar o perfil metabólico obtido por RMN de ¹H de indivíduos magros e indivíduos com sobrepeso através de uma abordagem metabolômica.

Ressonâncias relativas aos lipídios não foram importantes na discriminação entre indivíduos com sobrepeso tratados e não-tratados com Orlistate, indicando que os níveis dos mesmos não se alteraram significativamente devido ao tratamento. Orlistate tem se mostrado útil na normalização do perfil lipídico em casos de hiperlipidêmicos, mas afeta pouco o nível de TG em indivíduos com sobrepeso ou obesidade e níveis normais de lipídios (Drent *et al.*, 1995). O fármaco também não altera os níveis pós-prandiais de lipídios e lipases plasmáticas em homens com perfil lipídico normal quando associado a uma dieta de baixa caloria (Shepard *et al.*, 2000), como a utilizada neste trabalho.

CONCLUSÃO PARCIAL

Espectros de RMN de ^1H obtidos por uma sequência de pulsos incluindo pré-saturação do sinal da água e filtro T_2 (espectros T_2 editados) foi utilizado com sucesso na obtenção do perfil metabólico de amostras de plasmas. A comparação dos espectros através de métodos quimométricos, particularmente PLS-DA, foi capaz de fornecer informações importantes sobre alterações metabólicas relacionadas ao tratamento com Orlistate, além de diferenças no perfil metabólico entre indivíduos magros e indivíduos com sobrepeso.

Indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate apresentaram uma diminuição no nível de lactato, independentemente da perda de peso. Por outro lado, não foram observadas alterações significativas no perfil lipídico com o tratamento. Este é o primeiro relato da diminuição no nível de lactato associado ao tratamento com Orlistate, adicionalmente o estudo sugere uma possível diminuição na concentração de íons capazes de formar quelatos com o EDTA (especialmente os íons Ca^{2+}). O entendimento destas alterações podem fornecer pistas adicionais sobre o mecanismo de ação e efeitos deste fármaco, que vão muito além da simples inibição de lipases gastrointestinais, com consequente diminuição na absorção de TG.

Adicionalmente, um perfil metabólico significativamente diferente foi observado ao comparar indivíduos magros e indivíduos com sobrepeso. Sendo a diferença nos níveis dos metabólitos alanina, lactato e lipídios destacados como as diferenças mais significativas na discriminação dos grupos. Por fim, os modelos de PCA e PLS-DA sugerem uma aproximação do perfil metabólico do grupo de indivíduos com sobrepeso em direção ao observado para indivíduos magros após 120 dias de tratamento. Este fato pode indicar uma normalização metabólica como consequência do tratamento.



PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS



PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

9.1 Indivíduos e amostras

Vinte voluntárias com sobrepeso e sete voluntárias magras foram selecionadas para o estudo pelo Laboratório de Investigação em Metabolismo e Diabetes LIMED – UNICAMP, inscrição no Instituto Nacional de Saúde (INS) número NCT01414465. O estudo foi aprovado pelo do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas, número 836/2009 aprovado no dia 15/10/09. Todas as voluntárias consentiram na realização estudo.

Amostras de sangue foram coletadas das 20 voluntárias com sobrepeso (IMC entre 30 e 40) submetidas a uma dieta hipocalórica antes do início do tratamento. Orlistate (120 mg durante as três principais refeições) foi ministrado as pacientes durante 120 dias, 17 voluntárias terminaram o estudo e novas amostras de sangue foram colhidas. Adicionalmente, sete voluntárias magras (IMC < 25) também submetidas a uma dieta hipocalórica foram incluídas no estudo. Nenhuma das voluntárias apresentavam doenças crônicas, não faziam uso de outros medicamentos e não haviam apresentado alterações no peso corpóreo nos meses precedentes ao estudo.

9.2 Isolamento de plasma e membrana de eritrócitos

Amostras de plasma e ME foram obtidas conforme descrito por Restituto *et al.* (2010). Amostras de sangue foram coletadas em Na₂EDTA (1,0 mg/mL) e o plasma foi obtido por centrifugação (15 minutos a 800 *g*). Eritrócitos foram obtidos pela coleta do sangue em heparina sódica 10%, seguida de centrifugação (18 minutos a 200 *g*). Os eritrócitos obtidos foram novamente centrifugadas (18 minutos a 800 *g*) e o precipitado foi lavado duas vezes com tampão fosfato (0,1 mol.L⁻¹). As membranas de eritrócitos (**ME**) foram obtidas após lise das células. As amostras foram então estocadas a – 80°C até análise.

9.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARTE I

9.3.1 Solventes e reagentes

Uma mistura comercial de EMAG padrões (10 mg/mL) foi obtida da Sigma-Aldrich (Supelco, Brasil). O ácido nonadecanóico (19:0), e os ésteres octadecanóico (18:0), (Z)-9-octadecenóico (18:1), (Z,Z,Z)-6,9,12-octadecatrienóico (18:3 n 6), (Z,Z)-9,12-octadecadienoato (18:2 n 6) de metila foram obtidos da FURLAB (ACROS, Brasil) e tiveram a pureza checada por CG-EM. Clorofórmio e ácido acético glacial (MERCK, Brasil), *n*-hexano e metanol (Synth, Brasil) e éter etílico (NUCLEA, Brasil) foram usados como solvente nas análises.

9.3.2 Separação dos ésteres metílicos de ácidos graxos por cromatografia a gás

A separação dos EMAG padrões e obtidos após transesterificação dos AG esterificados em lipídios presentes em sangue foram obtidas em um cromatógrafo a gás (Agilent, 6890 series) acoplado a um espectrômetro de massas (Hewlett Packard, 5973 Mass Seletive Detector) equipado com uma coluna DB-5 (30 m; 0,25 mm; 0.25 μ m, Agilent). 1,0 μ L de amostra foi injetada sem divisão de fluxo (modo “*splitless*”) a 250 °C, usando hélio como gás de arraste, na vazão de 1,2 mL.min⁻¹. A programação de temperatura do forno do CG iniciou em 50 °C (mantida por 1 min), aquecida a 170 °C numa razão de 50 °C/min, aquecida 260 °C numa razão de 3 °C/min e por fim a 290 °C a 50 °C/min, temperatura na qual permaneceu por 5 minutos, o tempo total de corrida foi de 39 minutos. Os espectros de massas (*m/z* 40-440) foram obtidos com energia de ionização de 70 eV, patamar (“*threshold*”) igual a 100 e tempo de espera (“*delay*”) do solvente igual a 3,0 minutos. A temperatura da fonte de íons foi de 230 °C e do quadrupolo 150 °C.

Quantificações posteriores foram realizadas por MIS dos íons de *m/z* 74, 79, 81 e 87 selecionados pela PCA.

9.3.3 Análise multivariada dos espectros de massas

Os cromatogramas obtidos foram processados no software MSD ChemStation (G1701EA) e os espectros de massas de 32 EMAG foram exportados no formato Excel (.xls, Microsoft® Office Excel 2003) para análise multivariada. Noventa e seis espectros de massas foram obtidos conforme descrito no parágrafo anterior. Este conjunto de espectros foi reunido em uma matriz de dados para realização da análise multivariada.

A matriz obtida foi importada pelo software Pirouette (v3.11, Infometrix) e submetida a PCA. Foram considerados como variáveis apenas íons com m/z entre 41 e 200, já que íons com m/z superiores a 200 possuem abundância relativa baixa e não são indicados para fins quantitativos.

9.3.4 Curvas de calibração

Curvas de calibração individuais foram obtidas para todos os EMAG de interesse. Cada curva considerou cinco níveis de concentrações injetadas em ordem crescente, as quais variaram entre 0,3 e 320,0 $\mu\text{g/mL}$, dependendo da abundância do AG correspondente em sangue humano. As soluções padrões foram obtidas por diluições da mistura comercial de EMAG padrões. As injeções foram feitas em triplicata, com desvio padrão relativo (**DPR**) menor que 5%, utilizando nonadecanoato de metila (19:0; 20,0 $\mu\text{g/mL}$) como padrão interno.

Os gráficos foram construídos representando a (área do pico do EMAG)/(área do pico do 19:0) *versus* (concentrações do EMAG)/(concentração fixa de 19:0). A equação da reta ($Y = a.X$) foi obtida por regressão linear aplicando o programa Origin 6.0®. O coeficiente de correlação (**R**) forneceu uma estimativa da qualidade da curva obtida, ou seja quanto mais próximo de um, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Fatores respostas (**FR**) foram calculados pelo inverso do coeficiente angular da reta de calibração (**FR = 1/a**).

9.3.5 Extração dos lipídios

Os lipídios presentes no plasma e na ME foram extraídos segundo a metodologia descrita por Folch (Folch *et al.*, 1957) com algumas modificações (Iverson *et al.*, 2001). A uma amostra (500 μL) de plasma ou ME em tubo de ensaio (8 mL), foram adicionados galato de etila (5 mg/mL, 20 μL) e clorofórmio/metanol (1:2; v/v, 3,0 mL) seguido de agitação. A seguir foi adicionado clorofórmio (1,0 mL) e a solução foi novamente agitada em vortex (1 minuto). Os extratos de ME foram então mantidos em contato com o solvente de extração a 4 °C por 24 horas, enquanto os extratos de plasma foram submetidos imediatamente a próxima etapa.

O procedimento de extração foi finalizado pela adição de solução aquosa de KC/ (0,5 mmol.L⁻¹, 1 mL) seguido de nova agitação (1 minuto). As misturas foram então centrifugadas (15 minutos a 5.000 rpm) e a fase inferior (clorofórmio), contendo o extrato lipídico foi recolhido, a fase superior foi novamente extraída com clorofórmio (2,0 mL). As fases orgânicas foram reunidas e o extrato lipídico foi então concentrado a um volume final de 50 μL sob fluxo de nitrogênio. As amostras e os solventes utilizados na extração foram mantidos em banho de gelo durante todo procedimento.

9.3.6 Separação das frações lipídicas e preparação dos EMAG

Os extratos lipídicos obtidos na etapa anterior foram submetidos a cromatografia preparativa em camada delgada, conforme descrito por Croset *et al.* (2000), para separação das frações lipídicas de interesse. Placas de Silica-Gel 60 com 1,0 mm de espessura foram utilizadas no procedimento, a eluição foi realizada com hexano/dietil éter/ácido acético (70,0:30,0:1,5; v/v/v), dupla eluição foi utilizada para melhorar a separação. O mesmo procedimento foi aplicado ao extrato lipídico de ME para assegurar a ausência de lipídios neutros tais como TG e EC (devido à possível contaminação com lipoproteínas plasmáticas e/ou

leucócitos).

Após secagem das placas as frações lipídicas foram detectadas por breve exposição ao iodo. As porções de sílica contendo os lipídios de interesse foram retiradas das placas e diretamente tratadas com 3,0 mL de ácido sulfúrico/metanol (5% de H₂SO₄ em metanol) e 10 µL de ácido nonadecanóico (20 µg/mL, padrão interno, 19:0). A mistura reacional foi então aquecida a 70 °C por uma hora, para preparação dos EMAG.

Os EMAG obtidos por transesterificação, foram extraídos com de *n*-hexano (2x2,0 mL) após a adição de solução aquosa de KCl (0,5 m mol.L⁻¹, 1,0 mL) à mistura reacional. A fase superior foi recolhida e o procedimento de extração repetido. As fases orgânicas foram reunidas e tratadas com sulfato de sódio anidro, em seguida o solvente foi evaporado em fluxo de nitrogênio e as amostras foram redissolvidas em 30 µL de *n*-hexano bidestilado. Os EMAG foram então separados e quantificados por CG-EM como descrito na seção **9.3.2**.

9.3.7 Identificação dos EMAG produzidos pela transesterificação dos AG presentes em sangue

Os EMAG foram identificados pela comparação dos espectros de massas obtidos por VIT (**ANEXO A**) com os espectros padrões da biblioteca *NIST* e por co-injeção de EMAG padrões. A posição da dupla ligação e sua configuração nos EMAG insaturados foi confirmada pelo estudo da fragmentação dos espectros de massas e pela comparação dos valores obtidos para fração equivalente de comprimento de cadeia (**FCL**) obtidos com os valores reportados por Härtig, 2008.

9.3.8 Determinação do colesterol na membrana

O conteúdo de colesterol na ME foi determinado pela reação de

Liebermann-Burchard (Kenny, 1952; Abell *et al.*, 1952). Nesta etapa, uma alíquota de ME (100 μg) foi submetida à extração conforme descrito na seção **3.7**. O extrato lipídico obtido foi evaporado e redissolvido em clorofórmio (640 μL) e à solução resultante foi adicionado anidrido acético/ácido sulfúrico (10:1 *v/v*, 176 μL). Após incubação por 30 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$, a absorbância foi lida contra um branco num espectrofotômetro (Agilent, Brasil) a 620 nm, todos os ensaios foram feitos em duplicata.

O conteúdo de colesterol total na amostra foi obtido a partir da curva da calibração apresentada na **Figura 27**. Sete níveis de concentrações (entre 50,0 e 400,0 μg de colesterol/mL), analisados em triplicata foram considerados. Por fim, o conteúdo de colesterol na ME foi representado na forma de (μg de colesterol)/(mg de ME).

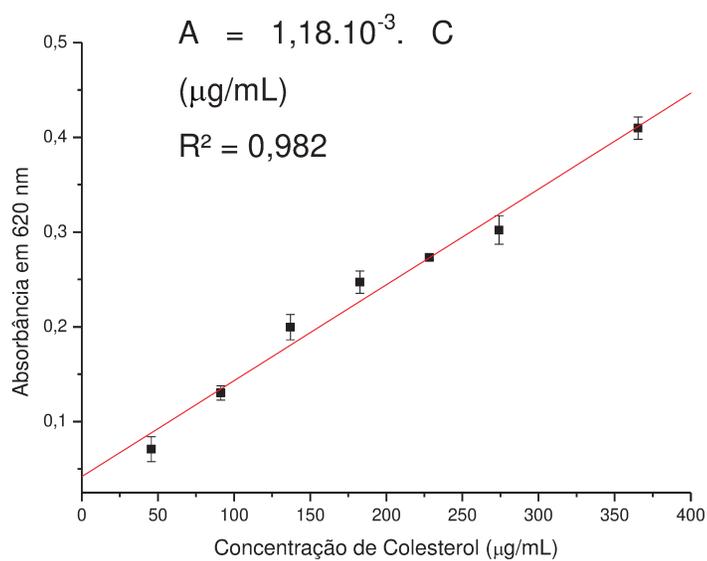


Figura 26. Curva de calibração para determinação da concentração de colesterol na membrana de eritrócito

9.3.9 Análise estatística

Todos os valores foram apresentados como médias \pm DP. As composições de AG são apresentadas como percentagens relativas médias \pm DP para cada fração lipídica de interesse. As médias obtidas foram comparadas pelo teste-*t* não-pareado bicaudal de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. A correlação linear entre co-variáveis foi investigada através do coeficiente de correlação de Pearson.

9.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARTE II

9.4.1 Reagentes

Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) foram obtidos da Merck (Brasil). Óxido de deutério (D_2O ; Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) e ácido 2,2,3,3- d_4 -3-trimetilsilil-propiónico (TSP; Acros Organics, Brasil) foram utilizados na preparação da amostra.

9.4.2 Preparação do plasma para análise do perfil metabólico por RMN de ^1H

Amostras de plasma foram analisadas conforme descrito por Lanza *et al.* (2010). Ao plasma (500,0 μL) foi adicionado tampão fosfato (0,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 75,0 μL ; pH 7,0) e TSP em D_2O (1,0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 75,0 μL). O sinal de deutério (D_2O) foi utilizado para travar o campo magnético (“*lock*” do equipamento), enquanto o sinal do TSP teve dupla função: referência interna (0,00 ppm) e providenciar um sinal (singlete fino) para acertar a homogeneidade do campo (“*shimming*”) e permitir o alinhamento e comparação dos espectros.

A mistura foi então centrifugada (5.000 rpm por 15 minutos) para remoção de eventuais partículas sólidas em suspensão. Por fim Parte do sobrenadante (500,0 μL) foi transferida para um tubo de RMN (5 mm). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Espectros de RMN de ^1H foram obtidos utilizando um espectrômetro Bruker Avance DRX 400 de 9.4 T (400 MHz, frequência do ^1H), equipado com sonda de detecção direta (5 mm o.d.).

Para supressão do sinal da água, foi utilizado pré-saturação do sinal do solvente. Para eliminarmos sinais alargados provenientes de proteínas e lipoproteínas foi aplicado uma sequência de pulsos Carr–Purcell–Meiboom–Gill (**CPMG**), funcionando como um filtro T_2 para eliminação dos sinais relativos às moléculas com tempo de relaxação transversal (T_2) curto.

Todos os espectros foram adquiridos sem giro a 25 °C. A largura espectral foi de 10 kHz, 32k pontos digitalizados e acúmulo de 128 transientes. Os tempos de aquisição e de *spin-eco* foram iguais a 3,3 s e 450 ms, respectivamente.

Os demais parâmetros de aquisição, apresentados na **Figura 16**, foram: P1 (largura do pulso de 90° de ¹H) = 9,25 μs; P2 (largura do pulso de 180° de ¹H) = 18,50 μs; D1 = 30 ms (tempo de saturação da água com pulso seletivo PL9 = 35 dB); L4 = 750 ciclos; τ = (tempo antes e depois dos pulsos de 180°) = 300 μs; RG = 203. A frequência de irradiação do pulso (PL9) para saturação da ressonância da água (H₂O/HDO) foi ajustado individualmente para todos os espectros, e variou entre 4,690 e 4,710.

9.4.3 Processamento dos espectros de RMN de ¹H

Os espectros de RMN de ¹H obtidos foram então processados utilizando software TopSpin (v2.1, Bruker Biospin). Foram realizados em todos os espectros: i) zero-filling para 64k pontos digitalizados; ii) multiplicação exponencial com LB (*line broadening*) de 0,3 Hz; iii) correção da fase e da linha de base (automáticas).

Os espectros foram então calibrados em relação ao sinal do lactato (CH₃, duplete em 1,33 ppm; *J* = 7 Hz), o sinal relativo ao TSP não foi utilizado devido ao alargamento, resultante da interação não específicas do TSP com porções hidrofóbicas da superfície de proteínas presente na amostra, resultando no alargamento do sinal relativo ao TSP, diminuindo sua utilidade como referência interna (Kriat *et al.*, 1992; Sussulini *et al.*, 2009).

Os espectros foram em seguida importados pelo programa MestReNova (v7.0, MestReC). A região de interesse (0,50 a 4,50 ppm) foi submetida a *“binning”*, a largura de cada região integrada foi de 0,040 ppm (num total de 100 *bins*). A região espectral entre 4,50 e 4,80 ppm foi desconsiderada devido ao

sinal residual da água (HDO; 4,70 ppm). A região acima de 4,80 ppm não apresentou informações relevantes e também foi desconsiderada.

A matriz de dados obtida foi transposta de forma que cada linha representasse uma amostra (75 espectros de RMN de ^1H de plasma). Cada coluna corresponde a uma região de deslocamentos químicos (100 regiões integradas de 0,04 ppm). A matriz foi então normalizada para a soma das integrais e exportada como arquivo do tipo ASCII.

9.4.4 Análises quimiométricas

A análise quimiométrica foi dividida em duas etapas: *i*) PCA foi conduzida para investigar o agrupamento das amostras e destacar amostras com comportamento anômalo, em seguida *ii*) PLS-DA foi utilizada na classificação das amostras e seleção dos metabólitos diferenciais. Ambas as etapas foram realizadas no software Pirouette (v3.11, Infometrix).

9.4.5 Análise de componentes principais

O conjunto de espectros obtidos (**seção 8.4**) foi submetido à PCA, para os dados centrados na média. Cada classe de espectros foi modelada separadamente, os resíduos obtidos foram então comparados para identificação de amostras anômalas, conforme descrito por Beebe *et al.* (1998). Os espectros selecionados foram então avaliados visualmente, verificando se as diferenças espectrais provinham das amostras ou estavam relacionados a problemas espectrais, tais do campo magnético não homogêneo (“*shimming*” ruim), baixa eficiência da pré-saturação do sinal de $\text{H}_2\text{O}/\text{HDO}$, imperfeições na fase ou na linha de base e baixa razão sinal/ruído. Os espectros que apresentaram algum dos problemas citados acima foram considerados inadequados ao estudo.

9.4.6 Análise discriminatória por quadrados mínimos parciais (PLS-DA)

Os espectros selecionados foram então submetidos à análise discriminatória por quadrados mínimos parciais (**PLS-DA**). Foram construídos dois modelos para maximizar a discriminação entre as classes: *i*) indivíduos com sobrepeso antes e após o tratamento com Orlistate e *ii*) indivíduos com sobrepeso tratados com Orlistate e indivíduos magros não-tratados. Todos os dados foram centrados na média e validação cruzada (*“leave one out cross validation”*) foi realizada para auxiliar na determinação do número de componentes principais (**CP**).

Para validar os modelos de PLS-DA obtidos, as amostras foram divididas em conjuntos de calibração e validação, 70 e 30 % das amostras respectivamente. A seleção do conjunto de validação foi auxiliada pela análise de componentes hierárquico (**HCA**). O modelo de predição (PLS-DA) foi então construído para o conjunto de calibração nas mesmas condições do modelo anterior. Posteriormente, foi realizada uma predição para amostras do conjunto de validação.

9.4.7 Identificação dos metabólitos selecionados

As atribuições das regiões espectrais selecionadas pela análise de PLS-DA, foram realizadas considerando os espectros originais, com base nos deslocamentos químicos, multiplicidade e constantes de acoplamento. A confirmação dos assinalamentos foi realizada por correlações totais homonuclear $^1\text{H}-^1\text{H}$ (TCOSY 1D).

REFERÊNCIAS

- Abell, L.L.; Levy, B.B.; Brodie, B.B.; Kendall, F.E. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J. Biol. Chem.* **1952**, 39: 357-366
- Ascherio, A.; Rimm, E.B.; Giovannucci, E.L.; Spiegelman, D.; Stampfer, M.; Willett, W.C. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: Cohort follow up study in the United States. *BMJ*, **1996**, 313: 84-90
- Ballinger, A.; Peikin, S. Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. *Eur. J. Pharm.* **2002**, 440: 109–117
- Bankefors, J.; Nord, L.I.; Kenne, L. Structural classification of Quillaja saponins by electrospray ionization ion trap multiple-stage mass spectrometry in combination with multivariate analysis, proof of concept. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2008**, 90: 178-187
- Barham, J.B.; Edens, M.B.; Fonteh, A.N.; Johnson, M.M.; Easter, L.; Chilton, F.H. Addition of eicosapentaenoic acid to γ -linolenic acid-supplemented diets prevents serum arachidonic acid accumulation in humans. *J. Nutr.* **2000**, 130: 1925-1931
- Bedogni, G.; Migliolia, L.; Battistinib, N.; Masuttia, F.; Tiribellia, C.; Bellentania, S. Liver, pancreas and biliary tract body mass index is a good predictor of an elevated alanine transaminase level in the general population: Hints from the Dionysos study. *Dig. Liver Dis.* **2003**, 35: 648–652
- Beebe, K.R.; Pell, R.J.; Seasholtz, M.B. Chemometrics: A practical guide. Wiley, New York. *Biophys. Acta.* **1998**, 161-169
- Bell, J.D.; Sadler, P.J.; Macleod, A.F.; Turner, P.R.; Ville, A.L. ^1H NMR studies of human blood plasma: Assignment of resonances for lipoproteins. *FEBS Letter.* **1987**, 219: 239-243
- Bertram, H.C.; Malmendal, A.; Nielsen, N.C.; Straadt, I.K.; Larsen, T.; Knudsen, K.E.B.; Lærke, H.L. NMR-based metabolomics reveals that plasma betaine increases upon intake of high-fiber rye buns in hypercholesterolemic pigs. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, 53, 1055-1062
- Bino, R. J.; Hall, R. D.; Fiehn, O.; Kopka, J.; Saito, K.; Draper, J.; Nikolau, B. J.; Mendes, P.; Roessner-Tunali, U.; Beale, M.H. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends Plant. Sci.* **2004**, 9: 418–425
- Bray, G.A. Medications for weight reduction. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **2008**, 37: 923–942
- Brenna, J.T.; Salem, N.J.; Sinclair, A.J.; Cunnane, S.C. α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids

- in humans. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids*. **2009**, 80: 85-91
- Brereton, R.G. Applied Chemometrics for Scientists. Wiley, New York. **2007**, pp. 132
- Brindle, J.T.; Antti, H.; Holmes, E.; Tranter, G.; Nicholson, J.K.; Bethell, H.W. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabolomics. *Nat. Med.* **2002**; 8: 1439-1444
- Burdge, G.C. Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. **2004**, 7: 137-144
- Burdge, G.C.; Sala-Vila, A.; West, A.L.; Robson, H.J.L.; Fevre, W.L.; Powell, J.; Calder, P.C. The effect of altering the 20:5n3 and 22:6n3 content of a meal on the postprandial incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into plasma triacylglycerol and non-esterified fatty acids in humans. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acid*. **2007**, 77: 59-65
- Bysted A, Holmer G, Lund P, Sandstrom B, Tholstrup T. Effect of dietary fatty acids on the postprandial fatty acid composition of triacylglycerol-rich lipoproteins in healthy male subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2005**, 59: 24–34
- Camacho, D.; Fuente, A.; Mendes, P. The origin of correlations in metabolomics data. *Metabolomics*. **2005**; 1: 53-63
- Campbell, M.K.; Farrel, S.O. Biochemistry. 5ed. Thomson. **2006**, 21: 568-601
- Cavaliere, H.; Floriano, I.; Medeiros-Neto, G. Gastrointestinal side effects of orlistat may be prevented by concomitant prescription of natural fibers (psyllium mucilloid). *Intern. J. Obes.* **2001**, 25: 1095-1099
- Cazzola, R.; Rondanelli, M.; Volpe, S.R.; Ferrari, E.; Cestaro, B. Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes. *J. Lipid Res.* **2004**, 45: 1846–1851
- Chabanel, A.; Flamm, M.; Sung, K.L.; Lee, M.M.; Schachter, D.; Chien, S. Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. *Biophys. J.* **1983**, 44: 171-176
- Clapham, J.C.; Arch, J.R.S.; Tadayon, M. Anti-obesity drugs: a critical review of current therapies and future opportunities. *Pharm. Therap.* **2001**, 89: 81-121
- Claudino, W.M.; Quatronne, A.; Pestrim, M.; Biganzoli, L.; Bertini, I.; Leo, A. Metabolomics: Available Results, Current Research Projects in Breast Cancer, and Future Applications. *J. Clin. Oncol.* **2007**, 25: 2840-2846
- Cleland, L.G.; James, M.J.; Proudman, S.M. Fish oil: what the prescriber needs to know. *Arthritis Res. Ther.* **2006**, 8: 202

- Cloarec, O.; Dumas, M.E.; Craig, A.; Barton, R.H.; Trygg, J. Statistical total correlation spectroscopy (STOCSY): A new approach for individual biomarker identification from metabonomic NMR data sets. *Anal. Chem.* **2005**, *77*: 1282–1289
- Clow, K.A.; Treberg, J.R.; Brosnan, M.E.; Brosnan, J.T. Elevated tissue betaine contents in developing rats are due to dietary betaine. *J. Nutr.* **2008**, *138*: 1641–1646
- Coen, M.; Holmes, E.; Lindon, J.C.; Nich, J.K. NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*: 9–27
- Coen, M.; Lenz, E.M.; Nicholson, J.K.; Wilson, I.D.; Pognan, F.; Lindon, J.C. An integrated metabonomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*: 295-303
- Croset, M.; Brossard, N.; Polette, A.; Lagarde, M. Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. *Biochem. J.* **2000**, *345*: 61–67
- Cyberlipid Center, disponível em < <http://www.cyberlipid.org/index.htm> > acessado em 01/06/20011
- Hoult, D.I.; Busby, J.W.; Gadian, D.G.; Radda, G.K.; Richards, R.E.; Seeley P.J. Observation of tissue metabolites using ³¹P nuclear magnetic resonance. *Nature*, **1974**, *252*: 285–287
- Danaei, G.; Ding, E.L.; Mozaffarian, D.; Taylor, B.; Rehm, J.; Murray, C.J.; Ezzati, M. The preventable causes of death in the united states: comparative risk assessment of dietary, lifestyle, and metabolic risk factors. *PLoS Med.* **2009**, *6*: e1000058
- Davidson, M.H.; Hauptman J.; Digirolamo M., *et al.* Weight control and risk factor reduction in obese subjects treated for 2 years with Orlistat: a randomized controlled trial. *JAMA.* **1999**, *281*: 235-42
- Dodds, E.D., McCoy, M.R.; Rea, L.D.; Kennish, J.M. Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry. *Lipids.* **2005**, *40*: 419-428
- Donald, G.; Robertson. M. Metabonomics in toxicology: A review. *Toxicol. Sci.* **2005**, *85*: 809–822
- Dowling, S.; Cox, J.; Cenedella, R.J. Inhibition of fatty acid synthase by Orlistat accelerates gastric tumor cell apoptosis in culture and increases survival rates in gastric tumor bearing mice in vivo. *Lipids.* **2009**, *44*: 489-498
- Drent, M.L.; Veen, E.A. First clinical studies with orlistat: A short review. *Obes. Res.* **1995**, *3*: 6235-6255

- Duda, R.O.; Hart, P.E.; Stork, D.G Pattern Classification, *New York*, **2001**
- Dunn, W.B.; Ellis, D.I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends Anal. Chem.* **2005**, 24: 285-294
- Dyken, R.; Hubold, C.; Meier, S.; Hitze, B.; Marxsen, A.; Oltmanns, K.M.; Schweiger, U.; Lehnert, H.; Pellerin, L.; Peters, A. Low plasma lactate concentration as a biomarker of an incompetent brain-pull: a risk factor for weight gain in type 2 diabetes patients. *Psychoneuroendocrinology.* **2010**, 35: 1287-1293
- Eder, K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. B.* **1995**, 671: 113-131
- Eriksson, L.; Antti, H.; Gottfries, J.; Holmes, E.; Johansson, E.; Lindgren, F.; Long, I.; Lundstedt, T.; Trygg, J.; Wold, S. Using chemometrics for navigating in the large data sets of genomics, proteomics, and metabonomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 380: 419-429
- Erkkila, A.T.; Lehto, S.; Pyorala, K.; Uusitupa, M.I. n-3 Fatty acids and 5-y risks of death and cardiovascular disease events in patients with coronary artery disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, 78: 65–71
- Fan, T.W.M. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1996**, 28: 161-219
- Ferreira, M.M.C; Multivariate QSAR. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, 13: 742-753
- Ferreira, M.M.C; Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Braz. Chem. Soc.* **2002**, 13: 742-753
- Fiehn, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modeling to understand metabolic networks. *Comp. Funct. Genomics.* **2001**, 2: 155–168
- Finer, N.; James, W.P.; Kopelman, P.G.; Lean, M.E.; Williams, G. One-year treatment of obesity: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre study of orlistat, a gastrointestinal lipase inhibitor. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **2000**, 24: 306-313
- Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* **1957**, 226: 497-509
- Foxall, P.J.; Spraul, M.; Farrant, R.D.; Lindon, L.C.; Neild, G.H.; Nicholson, J.K. 750 MHz ¹H-NMR spectroscopy of human blood plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, 11: 267-276
- Freije A. Fatty acid profile of the erythrocyte membranes of healthy Bahraini citizens in comparison with coronary heart disease patients. *J. Oleo Sci.* **2009**; 58: 379-88

- Gaal, L.V.; Mertens, I.; Ballaux, D. Modern, new pharmacotherapy for obesity. A gastrointestinal approach. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *18*: 1049–1072
- Gaetani, S.; Oveisi, F.; Piomelli, D. Modulation of meal pattern in the rat by the anorexic lipid mediator oleoylethanolamine. *Neuropsychopharmacology*, **2003**, *28*: 1311–1316
- Gates, S.C.; Sweeley, C.C. Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography. *Clin. Chem.* **1978**, *24*: 1663–1673
- Gerster, H. Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **1998**, *68*: 159–173
- GISSI-Prevenzione Investigators, Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet.* **1999**, *354*: 447–455
- Goodacre, R.; Vaidyanathan, S.; Dunn, W. B.; Harrigan, G. G.; Kell, D. B. Metabolomics by numbers: Acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*: 245–252
- Guarnieri, M.; Johnson, R.M. The essential fatty acids. *Adv Lipid Res.* **1970**; *8*: 115–174
- Harp, J.B. An assessment of the efficacy and safety of Orlistat for the long-term management of obesity. *J. Nutr. Biochem.* **1998**, *9*: 516–521
- Härtig, C. Rapid identification of fatty acid methyl esters using a multidimensional gas chromatography–mass spectrometry database. *J. Chromatogr. A.* **2008**, *1177*: 159–169
- Hauff, S.; Vetter, W. Quantitation of *cis*- and *trans*-monounsaturated fatty acids in dairy products and cod liver oil by mass spectrometry in the selected ion monitoring mode. *J. Agric. Food. Chem.* **2009**, *57*: 3423–3430
- Hauptman, J.B.; Jeunet, F.S.; Hartmann, D. Initial studies in humans with the novel gastrointestinal lipase Ro 18-0647 (tetrahydrolipstatin). *Am. J. Clin. Nutr.* **1992**; *55*: 309S–313S
- Hernandez, C.C.; Oliveira, M.; Pescia, G.; Moulin, J. Elmelegy, I.M.; Dionisi, F.; Destailats, F. Lipase inhibitor orlistat decreases incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in rat tissues. *Nutr. Res.* **2010**, *30*: 134–140
- Heymsfield, S.B.; Segal, K.R.; Hauptman, J.; Lucas, C.P.; Boldrin, M.N.; Rissanen, A.; Wilding, J.P.; Sjöström, L. Effects of weight loss with Orlistat on glucose tolerance and progression to type 2 diabetes in obese adults. *Arch. Intern. Med.* **2000**, *160*: 1321–1326

- Hodson, L.; McQuaid, S.E.; Karpe, F.; Frayn, K.N.; Fieldin, B.A. Differences in partitioning of meal fatty acids into blood lipid fractions: a comparison of linoleate, oleate, and palmitate. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2009**, 296: 64-71
- Hodson, L.; Skeaff, C.M.; Fielding, B.A. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog. Lipid Res.* **2008**, 47: 348–380
- Holm, P.I.; Bleie, O.; Ueland, P.M.; Lien, E.A.; et al. Betaine as determinant of postmethionine load total plasma homocysteine before and after B-vitamin supplementation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, 24: 301 –307
- Holmes, E.; Foxall, P. J. D.; Nicholson, J. K.; Neild, G. H.; Brown, S. M.; Beddell, C. R.; Sweatman, B. C.; Rahr, E.; Lindon, J. C.; Spraul, M.; Neidig, P. Automatic data reduction and pattern recognition methods for analysis of ¹H nuclear magnetic resonance spectra of human urine from normal and pathological states. *Anal. Biochem.* **1994**, 220, 284-296
- Hooper, L. *et al.* Dietary fat intake and prevention of cardiovascular disease: systematic review. *Brit. Med. J.* **2001**, 322: 757–763
- Hsieh, C.J.; Wang, P.W.; Liu, R.T.; Tung, S.C.; Chien, W.Y.; Chen, J.F.; Chen, C.H.; Kuo, M.C.; Hu, Y.H. Orlistat for obesity: benefits beyond weight loss. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2005**, 67: 78-83
- Isler, D.; Moeglen, C.; Gains, N.; Meier, M.K. Effect of the lipase inhibitor Orlistat and of dietary lipid on the absorption of radiolabelled triolein, tri- γ -linolenin and tripalmitin in mice. *Br. J. Nutr.* **1995**, 73: 851-862
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. The nomenclature of lipids. *J. Lipid Res.* **1967**, 105: 897-902
- IUPAC-IUB, Commission on Biochemical Nomenclature. The nomenclature of lipids: recommendations. *Eur. J. Biochem.* **1976**, 1977: 1-11
- Iverson, S.J.; Lang, S.L.C.; Cooper, M.H. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids.* **2001**, 36: 1283-1287
- Katan, M.B.; Deslypere, J.P.; van Birgelen, A.P.; Penders, M.; Zegwaard, M. Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: An 18-month controlled study. *J. Lipid Res.* **1997**, 38: 2012-2022
- Kendall, A.; Levitsky, D.A.; Strupp, B.J.; Lissner, L. Weight loss on a low-fat diet: consequence of the imprecision of the control of food intake in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **1991**, 53: 1124-1129
- Kenny, A. P. The determination of cholesterol by the Liebermann-Burchard

- reaction. *Biochem. J.* **1952**, 52: 611-619
- Kimura, M.; Yoon, H.R.; Wasant, R.; Takahashi, Y.; Yamaguchi, S. A sensitive and simplified method to analyze free fatty acids in children with mitochondrial beta oxidation disorders using gas chromatography/mass spectrometry and dried blood spots. *Clin. Chim. Acta.* **2002**, 316: 117–121
- King, I.B.; Lemaitre, R.N.; Kestin, M. Effect of a low-fat diet on fatty acid composition in red cells, plasma phospholipids, and cholesterol esters: Investigation of a biomarker of total fat intake. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, 83: 227-36
- Krachler, B.; Norberg, M.; Eriksson, J.W.; Hallmans, G.; Johansson, I.; Vessby, B.; Weinehall, L.; Lindahl, B. Fatty acid profile of the erythrocyte membrane preceding development of type 2 diabetes mellitus. *Nut. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2008**, 18: 503-510
- Kriat, M.; Gouny, S.C.; Dury, J.V.; Sciaky, M.; Viout, P.; Cozzone, P.J. Quantitation of metabolites in human blood serum by proton magnetic resonance spectroscopy. A comparative study of the use of formate and TSP as concentration standards. *NMR Biomed.* **1992**, 5: 179–184
- Kridel, S.J.; Axelrod, F.; Rozenkrantz, N.; Smith, J.W. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res.* **2004**, 2070: 2070-2075
- Krishnan, S. M., Dixit, N. M. Estimation of red blood cell lifespan from alveolar carbon monoxide measurements. *Translational Res.* **2009**, 154: 15-17
- Kuile, B.H.; Westerhoff, H.V. Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic. *FEBS Lett.* **2001**, 500: 169-171
- Kulacoglu, D.N.; Kocer, I.; Kurtul, N.; Keles, S.; Baykal, O. Alterations of fatty acid composition of erythrocyte membrane in type 2 diabetes patients with diabetic retinopathy. *Jpn. J. Ophthalmol.* **2003**, 47: 551–556
- Lada, A.T.; Rudel, L.L. Associations of low-density lipoprotein particle composition with atherogenicity. *Curr. Opin. Lipidol.* **2004**, 15: 19–24
- Lam, C.K.; Chari, M.; Wang, P.Y.T.; Lam, T.K.T. Central lactate metabolism regulates food intake. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2008**, 295: 159-170
- Lamarche, B.; Lemieux, I.; Després, J.P. The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: Epidemiology, patho-physiology and therapeutic aspects. *Diabetes. Metab.* **1999**, 25: 199-211
- Landsberg, L. Hyperinsulinemia: Possible role in obesity-induced hypertension. *Hypertension.* **1992**, 19: 161-166
- Langhans, W.; Damaske, U.; Scharrer, E. Different metabolites might reduce food intake by the mitochondrial generation of reducing equivalents. *Appetite.*

- 1985**, 6: 143-152
- Lanza, I.R.; Zhang, S.; Ward, L.E.; Karakelides, H.; Raftery, D. Sreekumaran N. Quantitative metabolomics by ¹H-NMR and LC-MS/MS confirms altered metabolic pathways in diabetes. *PLoS ONE*. **2010**, 5: 10538-10542
- Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2004a**, 4: 189–199
- Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. Metabonomics: Systems biology in pharmaceutical research and development. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2004b**, 6: 265–272
- Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. So what's the deal with metabonomics? *Anal. Chem.* **2003**, 75: 384–391
- Lindon, J.C.; Nicholson, J.K. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabonomics. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, 1: 45–69
- Lovejoy, J.; Newby, F.D.; Gebhart, S.S.P.; DiGirolamo, M. Insulin resistance in obesity is associated with elevated basal lactate and diminished lactate appearance following intravenous glucose and insulin. *Metabolism*. **1992**, 41: 22-27
- Lucas, C.P.; Boldrin, M.N.; Reaven, G.M. Effect of Orlistate added to diet (30% of calories from fat) on plasma lipid, glucose, and insulin in obese patients with hypercholesterolemia. *Am. J. Card.* **2003**, 15: 961-964
- Ma, J.; Folsom, A.R.; Shahar, E.; Eckfeldt, J.H. Plasma fatty acid composition as an indicator of habitual dietary fat intake in middle-aged adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, 62: 564-571
- Maes, M.; Smith, R.; Christophe, A.; Cosyns, P.; Desnyder, R.; Meltzer H. Fatty acid composition in major depression: decreased omega 3 fractions in cholesteryl esters and increased C20: 4 omega 6/C20:5 omega 3 ratio in cholesteryl esters and phospholipids. *J. Affect. Disord.* **1996**, 38: 35-46
- Makrides, M.; Neumann, M.; Simmer, K.; Pater, J.; Gibson, R. Are long-chain polyunsaturated fatty acids essential nutrients in infancy? *Lancet*. **1995**, 10; 345:1463-1468
- Mancini, M.C. Obstáculos diagnósticos e desafios terapêuticos no paciente obeso. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* **2001**; 45: 584-608
- Masuo, K.; Mikami, H.; Ogiwara, T.; Tuck, M. Weight reduction and pharmacologic treatment in obese hypertensives. *Am. J. Hypertens.* **2001**, 14: 530-538
- McNamara, R. K., Jandacek, R., Rider, T., Tso, P., Stanford, K. E., Hahn, C. G. and Richtand, N. M. Deficits in docosahexaenoic acid and associated

- elevations in the metabolism of arachidonic acid and saturated fatty acids in the postmortem orbito frontal cortex of patients with bipolar disorder. *Psychiatry Res.* **2008**, 160: 285-299
- Medeiros, D.M.; Hamptona, M.; Kurtzera, K.; Parelmana, M.; Tamimia, E.A.; Drouillard, J.S. Feeding enriched omega-3 fatty acid beef to rats increases omega-3 fatty acid content of heart and liver membranes and decreases serum vascular cell adhesion molecule-1 and cholesterol levels. *Nutr. Res.* **2007**, 27: 295– 299
- Mensink, R.P.; Zock, P.L.; Kester, A.D.M.; Katan, M.B. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am. J. Clin. Nut.* **2003**, 77: 1146-1155
- Miller, J.N.; Miller, J.C. Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 4ed. *Pearson Education*, **2000**: 120-123
- Moco, S.; Capanoglu, E.; Tikunov, Y.; Bino, R.J.; Boyacioglu, D.; Hall, R.D.; Vervoort, J.; Vos, R.C.H.; Bennett, D. Tissue specialization at the metabolite level is perceived during the development of tomato fruit, *J. Exp. Bot.* **2007**, 58: 4131–4146
- Montero, J.L.; Muntané, J.; Fraga E.; Delgado M.; Costán, G.; Serrano, M.; Padillo, J.; Mata, M.; Miño, G. Orlistat associated subacute hepatic failure. *J Hepatol.* **2001**, 34: 173-177
- Mozaffarian, D.; Micha, R.; Wallace, S.; Katan, M.B. Effects on coronary heart disease of increasing polyunsaturated fat in place of saturated fat: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS Med.* **2010**, 7: 1–10
- Muls, E.; Kolanowski, J.; Scheen, A.; Gaal, L.V. The effects of orlistat on weight and on serum lipids in obese patients with hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *Intern. J. Obes.* **2001**, 25: 1713–1721
- Nagase, H.; Bray, G.A.; York, D.A. Effect of pyruvate and lactate on food intake in rat strains sensitive and resistant to dietary obesity. *Physiol. Behav.* **1996**, 59: 555-560
- Nakamura, M.T.; Nara, T.Y. Essential Fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *ProstaglandinsLeukot. Essent. Fatty Acids.* **2003**, 68: 145-150
- Nakamura, M.T.; Nara, T.Y. Structure, function and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* **2004**, 24: 345-76
- Nelson, G.J. Blood lipids and Lipoproteins: Quantitation, Composition and

- Metabolism, *Wiley-Interscience, New York*. **1972**: 317-319
- Nicholson J.K.; Foxall, P.J.; Spraul, M.; Farrant, R.D.; Lindon, J.C. 750 MHz ^1H and ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal. Chem.* **1995**, 67: 793–811
- Nicholson, J. K.; Lindon, J. C.; Holmes, E. 'Metabonomics': Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. **1999**, 29: 1181–1189
- Nicholson, J. K.; Wilson, I. D. Opinion: Understanding 'global' systems biology: Metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2: 668–676
- Nicholson, J.K.; Connelly, J.; Lindon, J.C.; Holmes, E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1: 153-161
- Nicholson, J.K.; Lindon, J.C. Systems biology: Metabonomics. *Nature*. **2008**, 455: 1054–1056
- Okura, T.; Nakata, Y.; Ohkawara, K.; Numao, S.; Katayama, Y.; Ono, Y.; Matsuo, T.; Sone, H.; Tanaka, K. Effect of weight reduction on concentration of plasma total homocysteine in obese Japanese men. *Obes. Res. Clin. Pract.* **2007**, 1: 213-221
- Oliver, S.G.; Winson, M.K.; Kell, D.B.; Baganz, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* **1998**, 16: 373-378
- Owen, J.S.; Bruckdorfer, K.R.; Day, R.C.; McIntyre, N. Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease. *J. Lipid Res.* **1982**, 23:124-32
- Pala, V.; Krogh, V.; Muti, P.; Chajès, V.; Riboli, E.; Micheli, A.; Saadian, M.; Sieri, S.; Berrino, F. Erythrocyte membrane fatty acids and subsequent breast cancer: a prospective Italian Study. *J. Nat. Cancer Inst.* **2001**, 93: 1088–1095
- Pan D.A.; Lillioja S.; Kriketos A.D.; Milner M.R.; Baur L.A.; Bogardus C.; Jenkins A.B.; Storlien L.H. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes*. **1997**, 46: 983-988
- Pan, D.A.; Hulbert, A.J.; Storlien, L.H. Dietary fats, membrane phospholipids and obesity. *J Nutr.* **1994**, 124:1555-1565
- Peng, J.W.; Thanabal, V.; Wagner, G. Improved accuracy of heteronuclear transverse relaxation time measurements in macromolecules. Elimination of antiphase contribution. *J. Magn. Reson.* **1991**, 95: 421–427
- Plourde, G. Impact of obesity on glucose and lipid profiles in adolescents at

- different age groups in relation to adulthood. *BMC Fam. Pract.* **2002**, 3: 18-32
- Poulsen, R.; Firth, E.; Rogers, C.; Moughan, P.; Kruger, M. Specific effects of γ -linolenic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic ethyl esters on bone post-ovariectomy in rats. *Calcif. Tissue Int.* **2007**, 81: 459-471
- Qi, S.W.; Tu, Z.G.; Peng, U.J.; Wang, L.X.; Yang, X.O.; Cai, A.J.; Daí, Y. ¹H NMR-based serum metabolic profiling in compensated and decompensated cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* **2012**, 18: 285-290
- Raatz, S.K.; Bibus, D.; Thomas, W.; Etherton, P.K. Total fat intake modifies plasma fatty acid composition in humans. *J. Nutr.* **2001**, 131: 231-234
- Rees, T.; Hill, S.A. Metabolic control analysis of plant metabolism. *Plant. Cell. Env.* **1994**, 17: 587-599
- Reitsma, J.B.; Cabezas, M.C.; Bruin, T.W.A.; Erkelens, D.W. Relationship between improved postprandial lipemia and low-density lipoprotein metabolism during treatment with tetrahydrolipstatin a pancreatic lipase inhibitor. *Metabolism*, **1994**, 43: 293-298
- Reo, N. V. NMR-based metabolomics. *Drug Chem. Toxicol.* **2002**, 25: 375-382
- Restituto, P.; Colina, M.I.; Varo, J.J.; Varo, N. Adiponectin diminishes platelet aggregation and sCD40L release. Potential role in the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2010**, 2: 1072-1077
- Risé, P.; Eligini, S.; Ghezzi, S.; Colli, S.; Galli, C. Fatty acid composition of plasma, blood cells and whole blood: Relevance for the assessment of the fatty acid status in humans. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids.* **2007**, 76: 363-369
- Robertson, D.G. Metabonomics in toxicology: A review. *Toxicol. Sci.* **2005**, 85: 809-822
- Rodriguez, A.R.; Reglero, G.; Ibañez, E. Recent trends in the advanced analyses of bioactive fatty acids, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, 51: 305-326
- Samuelsson, L.M.; Larsson, D.G. Contributions from metabolomics to fish research. *Mol. Biosyst.* **2008**, 4: 974-979
- Sara J. Iverson, Shelley L. C. Lang and Margaret H. Cooper. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Lipids*, **2001**, 36: 1283-1287
- Schnackenberg, L.K.; Beger, R.D. Metabonomic biomarkers: their role in the critical path. *Drug Disc. Today: Tec.* **2007**, 4: 13-16
- Schoonjans, V.; Taylor, N. Hudon, B.D. Massart, D.L. Characterization of the similarity of chemical compounds using electrospray ionization mass spectrometry an multivariate exploratory techniques. *J. Pharm. Biom. Anal.*

- 2002**, 28: 537-548
- Schreiner, M. Quantification of long chain polyunsaturated fatty acids by gas chromatography. Evaluation of factors affecting accuracy. *J. Chromatogr. A*. **2005**, 1095: 126–130
- Schwenk, R.W.; Holloway, G.P.; Luiken, J.F.P.; Bonen, A.; Glatz, J.F.C. Fatty acid transport across the cell membrane: Regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids*. **2010**, 82: 149-154
- Seeley, P.J.; Busby, S.J.W.; Gadian, D.G.; Radda, G.R.; Richards, R.E. A New Approach to Metabolite Compartmentation in Muscle Biochemical. *Soc. Trans.* **1976**, 4: 62–64
- Sepulveda, J.L.; Tanhehco, Y.C.; Frey, M.; Guo, L.; Cropcho, L.; Gibson, K.M.; Blair, H.C. Variation in human erythrocytes membrane unsaturated fatty acid, correlation with cardiovascular disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2010**, 134: 73-79
- Serhan, C.N.; Gotlinger, K.; Hong, S.; Arita, M. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins. Other Lipid Mediat.* **2004**, 73: 155–72
- Serhan, C.N.; Petasis, N.A. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem. Rev.* **2011**, 111: 5922-5943
- Shepard, T.Y.; Jensen, D.R.; Blotner, S.; Zh, J.; Guerciolini, R.; Pace, D.; Eckel R.H. Orlistat fails to alter postprandial plasma lipid excursions or plasma lipases in normal-weight male volunteers. *Int. J. Obes.* **2000**, 24: 187-194
- Shin, C.S.; Lee, M.K.; Park, K.S.; Kim, S.Y.; Cho, B.Y.; Lee, H.K.; Koh, C.S.; Min, H.K. Insulin restores fatty acid composition earlier in liver microsomes than erythrocyte membranes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **1995**, 29: 93-98
- Simopoulos, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* **2002**, 56: 365-379
- Simopoulos, A.P.; Cleland, L.G. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2008**, 17: 131-134
- Sinclair, A.J.; Dea, K.; Dunstan, G.; Ireland, P.D.; Niall, M. Effects on plasma lipids and fatty acid composition of very low fat diets enriched with fish or kangaroo meat. *Lipids*. **1987** ;22: 523-529
- Skeaff C.M.; Hodson L.; McKenzie J.E. Dietary-induced changes in fatty acid composition of human plasma, platelet, and erythrocyte lipids follow a similar time course. *J. Nutr.* **2006**, 136: 565-569

- Skeaff C.M.; Hodson L.; McKenzie J.E. Dietary-induced changes in fatty acid composition of human plasma, platelet, and erythrocyte lipids follow a similar time course. *J. Nutr.* **2006**, 136: 565-569
- Smith, W.L. Nutritionally essential fatty acids and biologically indispensable cyclooxygenases. *Trends Biochem. Sci.* **2008**, 33: 27–37
- Sonestedt, E.; Ericson, U.; Gullberg, B.; Skog, K.; Olsson, H.; Wirfält, E. Do both heterocyclic amines and omega-6 polyunsaturated fatty acids contribute to the incidence of breast cancer in postmenopausal women of the Malmö diet and cancer cohort? *Int. J. Cancer.* **2008**, 123: 1637–1643
- Spector, A.A. Essentiality of Fatty Acids. *Lipids.* **1999**, 34: S1-S3
- Statheropoulos, M.; Pappa A.; Karamertzains, P.M. Noise reduction of fast, repetitive GC-MS measurements using principal component analysis (PCA). *Anal. Chim.ica Acta.* **1999**, 401: 35-43
- Steuer, R.; Kurths, J.; Daub, C.O. *et al.* The mutual information: Detecting and evaluating dependencies between variables. *Bioinformatics.* **2002**, 18: 231-240
- Summers, L.K.; Barnes S.C.; Fielding, B.A.; Beysen, C.; Ilic, V.; Humphreys, S.M.; Frayn, K.N. Uptake of individual fatty acids into adipose tissue in relation to their presence in the diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, 71: 1470–1477
- Sun, Q.; Ma, J.; Campos, H.; Hankinson, S.E.; Hu, F.B. Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarkers of fatty acid intake in US women. *Am J. Clin. Nutr.* **2007**, 86:74-81
- Sun, Y.X.; Tsuboi, K.; Okamoto, Y.; Tonai, T.; Murakami, M.; Kudo, I.; Ueda, N. Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase. *Biochem. J.* **2004**, 380: 749–756
- Sussulini, A.; Prando, A.; Maretto, D.A.; Poppi, R.J.; Tasic, L.; Banzato, C.E.M.; Arruda, M.A.Z.; Metabolic profiling of human blood serum from treated patients with bipolar disorder employing ¹H NMR spectroscopy and chemometrics. *Anal. Chem.* **2009**, 81: 9755–9763
- Suter, P.M.; Marmier, G.; Linder, C.V.; Hanseler, E.; Lentz, J.; Vetter, W.; Otvos, J. Effect of Orlistat on postprandial lipemia, NMR lipoprotein subclass profiles and particle size. *Atherosclerosis.* **2005**, 180: 127–135
- Thurnhofer, S.; Lehnert, K.; Vetter, W. Exclusive quantification of methyl-branched fatty acids and minor 18:1-isomeres in foodstuff by GC-MS in the SIM mode using 10,11-dichloroundecanoic acid and fatty acid ethyl esters as internal standards. *Eur. Food. Res. Technol.* **2008**, 226: 975-983
- Thurnhofer, S; Vetter, W. A gas chromatography/electron ionization-mass

- spectrometry-selected ion monitoring method for determining the fatty acid pattern in food after formation of fatty acid methyl esters. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53: 8896-8903
- Tiikkainen, M.; Bergholm, R.; Rissanen, A.; Aro, A.; Salminen, I.; Tamminen, M.; Teramo, K.; Jarvinen, H.Y. Effects of equal weight loss with Orlistat and placebo on body fat and serum fatty acid composition and insulin resistance in obese women. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 79: 22-30
- Tiziani, S.; Emwas, A.H. Lodi, A.; Ludwig, C.; Bunce, C.M.; Viant, M.R.; Gunther, U.L. Optimized metabolite extraction from blood serum for ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Anal. Bioch.* **2008**, 377: 16-23
- Tomlins, A.M.; Foxall, P.J.D; Lynch, M.J.; Parkinson, J.; Everett, J.R.; Nicholson, J.K. High resolution ¹H NMR spectroscopic studies on dynamic biochemical processes in incubated human seminal fluid samples. *Biochim. Biophys. Acta.* **1998**, 1379: 367-380
- Torgerson, J.S.; Hauptman, J.; Boldrin, M.N.; Sjostrom L. Xenical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of Orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care.* **2004**, 27: 155-161
- Tsuchiya, Y.; Yabe, K.; Takada, S.; Ishii, Y.; Jindo, T.; Furuhashi, K.; Suzuki, K.T. Early pathophysiological features in canine renal papillary necrosis induced by nefiracetam. *Toxicol. Pathol.* **2005**; 33: 561-569
- Turker, I.; Demirag, N.G.; Tanaci, N.; Tutar, N.U.; Kirbas, I. Effects of Orlistat plus diet on postprandial lipemia in brachial artery reactivity in normolipidemic obese women with normal glucose tolerance: a prospective, randomized, controlled study. *Curr. Ther. Res.* **2006**, 67: 159-172
- Umehara, T.; Ichijo, T.; Matsumoto, A.; Kiyosawa, K. Severe hepatic injury caused by Orlistat. *Am. J. Med.* **2006**, 119: e7-e8
- Van, Q.N.; Chmurny, G.N.; Veenstra, T.D. The depletion of protein signals in metabolomics analysis with the WET-CPMG pulse sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 301: 952-959
- Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.* **1971**, 231: 232-235
- Vetter, W; Thurnhofer, S. Analysis of fatty acids by mass spectrometry in the selected ion monitoring mode. *Lipid Techn.* **2007**, 19: 184-186
- Vidgren, H.M.; Agren, J.J.; Valve, R.S.; Karhunen, L.J.; Rissanen, A.M.; Uusitupa, M.I. The effect of orlistat on the fatty acid composition of serum lipid fractions in obese subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1999**, 66: 315-322
- Vriese, S.R.; Christophe, A.B.; Maes, M. Lowered serum n-3 polyunsaturated

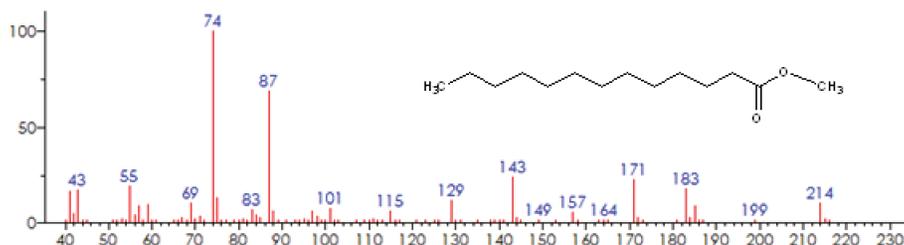
- fatty acid (PUFA) levels predict the occurrence of post partum depression: further evidence that lowered n-3 PUFAs are related to major depression. *Life Sci.* **2003**, 73: 3181–3187
- Watts, N.B.; Spanheimer, R.G.; Digirolamo, M.; Gebhart, S.S.; Musey, V.C.; Siddiq, Y.K.; Phillips, L.S. Prediction of glucose response to weight loss in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Arch. Intern. Med.* **1990**, 150: 803-806
- Weckwerth, W.; Morgenthal, K. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discov. Today.* **2005**, 10: 1551-1558
- Weckwerth, W.; Wenzel, K.; Fiehn, O. Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. *Proteomics.* **2004**, 4: 78–83
- WHO. Reports, Fats and Oils in Human Nutrition: Food and Agricultural Organization of the United Nations. **1993**, 49-55. Disponível em < <http://www.fao.org/docrep/v4700e/v4700e00.htm> > (acessado 06/06/2011)
- Wikoff, W.R.; Pendyala, G.; Siuzdak, G.; Fox, H.S. Metabolomic analysis of the cerebrospinal fluid reveals changes in phospholipase expression in the CNS of SIV-infected macaques. *J. Clin. Invest.* **2008**, 118: 2661–2669
- Williams, G. Z.; Young, D. S.; Stein, M. R.; Cotlove, E. Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. I. Objectives, subject selection, laboratory procedures and estimation of analytic deviation. *Clin. Chem.* **1970**, 16: 1016-1021
- Wing, R.; Blair, E.; Bononi, P.; Marcus, M.; Watanabe, R.; Bergman, R. Caloric restriction per se is a significant factor in improvements in glycemic control and insulin sensitivity during weight loss in obese NIDDM patients. *Diabetes Care.* **1994**, 17: 30-36
- Wishart, D.S. Metabolomics: The principles and potential applications to transplantation. *Am. J. Transplant.* **2005**; 5: 2814–2820
- Wittert, G., Caterson, I., & Finer, N. The clinical effectiveness of weight loss drugs. *Obes. Res. Clin. Pract.* **2007**, 1: 1-5
- Wold, S. Chemometrics: what do we mean with it and what do we want from it? *Chemometr. Intell. Lab.* **1995**, 30: 109–115
- Yang, C.; Manoogian, D.; Pao, Q.; Lee, F.; Knapp, R.D. Gotto, A.M. Powmall, H.J. Lecithin:Cholesterol Acyltransferase - Functional regions and a structural model of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **1986**, 262: 3086-3091
- Yong, Q.C. *et al.* Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids. *J. Clin. Investig.* **2007**, 117: 1866–1875
- Young, O.; Saswata, T.; Eun, J.B.; Takeshi, I.; Hidetaka, M.; WuQiang, F.;

- Pingping, L.; Wendell, J.L.; Steven, M.W.; Jerrold, M.O. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. **2010**, 142: 687-698
- Zhang, S.; Nagana, G.A.; Asiago, V.; Shanaiah, N.; Barbas, C.; Correlative and quantitative ¹H NMR-based metabolomics reveals specific metabolic pathway disturbances in diabetic rats. *Anal. Biochem.* **2008**, 383: 76–84
- Zhi, J.; Melia, A.T.; Guerciolini, R.; Koss-Twardy, S.G.; Pässe, S.M.; Rakhit, A.; Sadowski, J.A. The effect of Orlistat on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **1996**, 36: 659-666
- Zuppi, C.; Messana, I.; Tapanainen, P.; Knip, M.; Vincenzoni, F. Proton nuclear magnetic resonance spectral profiles of urine from children and adolescents with type 1 diabetes. *Clin. Chem.* **2002**, 48: 660–662

ANEXOS

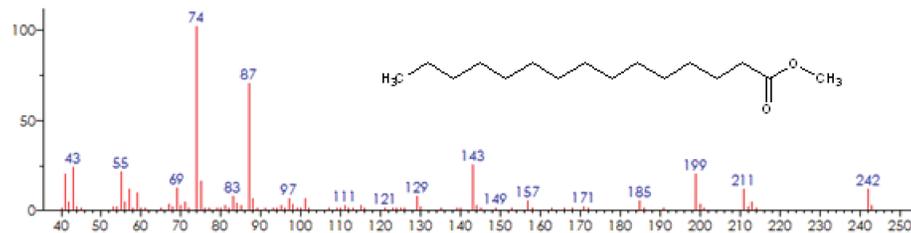
Anexo A - Espectros de massas

12:0 (Dodecanoato de Metila)



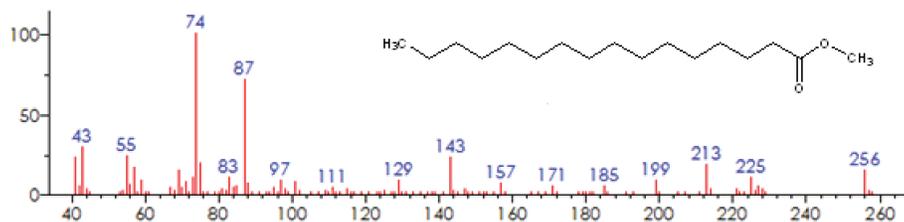
Íons característicos no espectro de massas: m/z 74, rearranjo de McLafferty; m/z 87, clivagem γ ; m/z 214, íon molecular; m/z 199, perda de metila; m/z 183, perda de metoxila.

14:0 (Tetradecanoato de Metila)



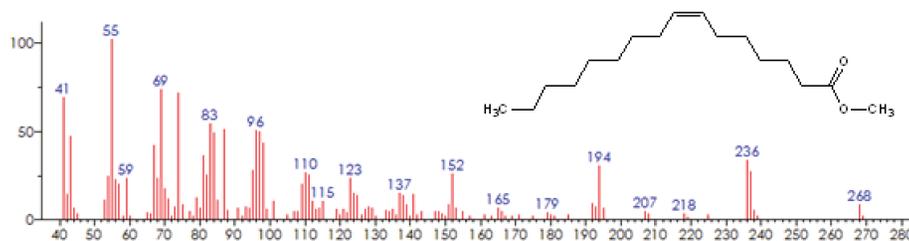
Íons característicos no espectro de massas: m/z 74, rearranjo de McLafferty; m/z 87, clivagem γ ; m/z 242, íon molecular; m/z 211, perda de metoxila.

15:0 (Pentadecanoato de Metila)



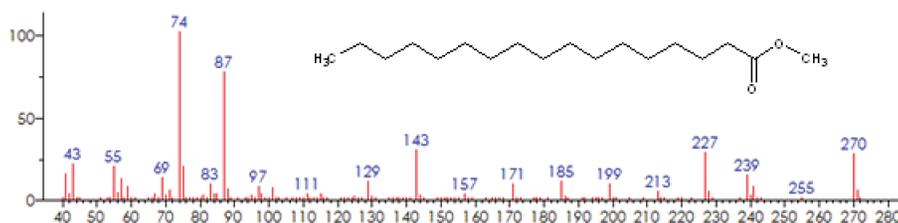
Íons característicos no espectro de massas: m/z 74, rearranjo de McLafferty; m/z 87, clivagem γ ; m/z 256, íon molecular; m/z 225, perda de metoxila.

16:1 ((Z)-7-Hexadecenoato de Metila)



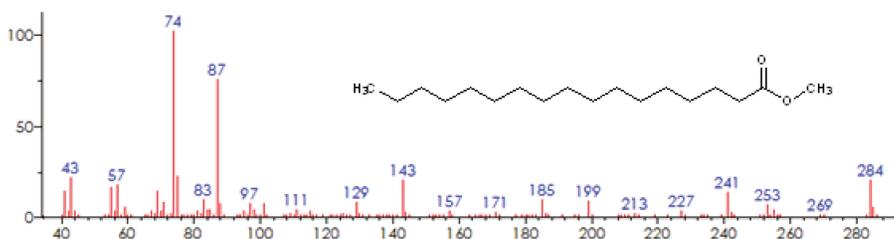
Íons característicos no espectro de massas: m/z 74, rearranjo de McLafferty; m/z 87, clivagem γ ; fragmentos de m/z 83 e m/z 97 intensos característicos de EMAG monoinsaturados; m/z 268, íon molecular; m/z 237, perda de metoxila.

16:0 (Hexadecanoato de Metila)



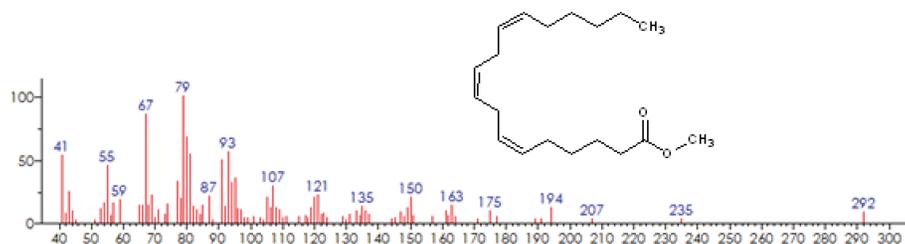
Íons característicos no espectro de massas: m/z 74, rearranjo de McLafferty; m/z 87, clivagem γ ; m/z 270, íon molecular; m/z 239 perda de metoxila.

17:0 (Heptadecanoato de Metila)



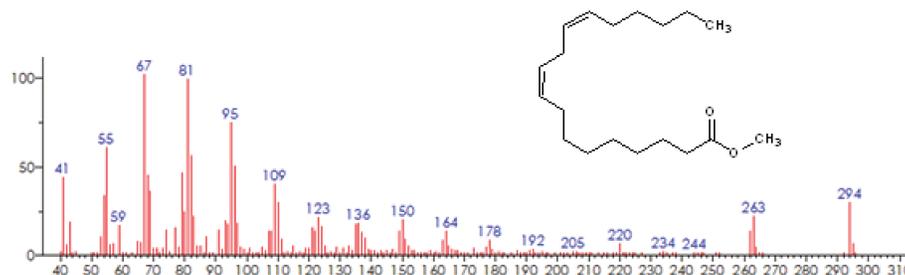
Íons característicos no espectro de massas: m/z 74, rearranjo de McLafferty; m/z 87, clivagem γ ; m/z 284, íon molecular; m/z 253, perda de metoxila.

18:3n3 ((Z,Z,Z)-6,9,12-Octadecatrienoato de Metila)



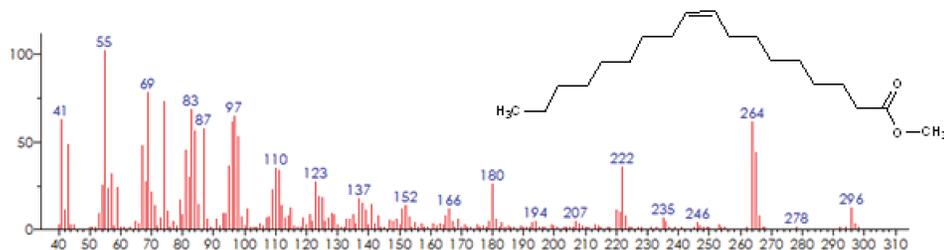
Íons característicos no espectro de massas: m/z 79, clivagem seguida de rearranjo da cadeia alquílica para formar o cátion cicloexadienila; m/z 87, clivagem γ ; m/z 292, íon molecular.

18:2n6 ((Z,Z)-9,12-Octadecadienoato de Metila)



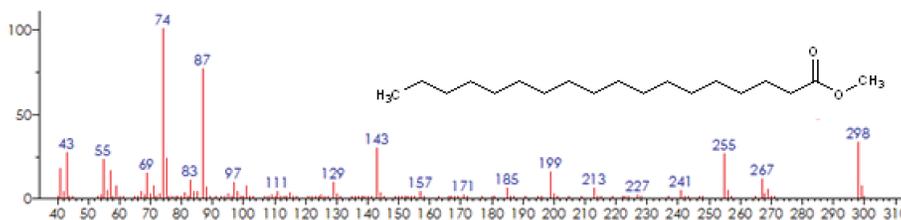
Íons característicos no espectro de massas: m/z 81, clivagem seguida de rearranjo da cadeia alquílica para formar o cátion ciclohexaenila; m/z 87, clivagem γ ; m/z 294, íon molecular.

18:1 ((Z)-9-Octadecenoato de Metila)



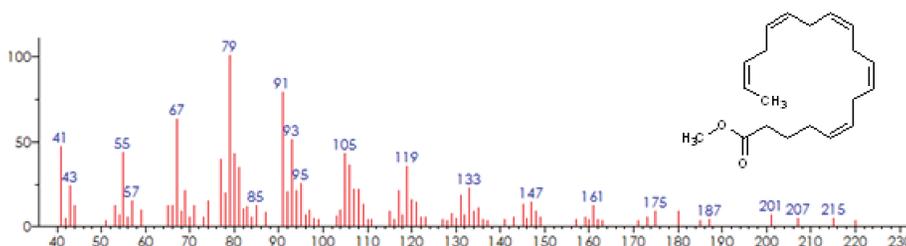
Íons característicos no espectro de massas: m/z 74, rearranjo de McLafferty; m/z 87, clivagem γ ; fragmentos m/z 83 e 97 intensos característicos de EMAG monoinsaturados; m/z 296, íon molecular.

18:0 (Octadecanoato de Metila)



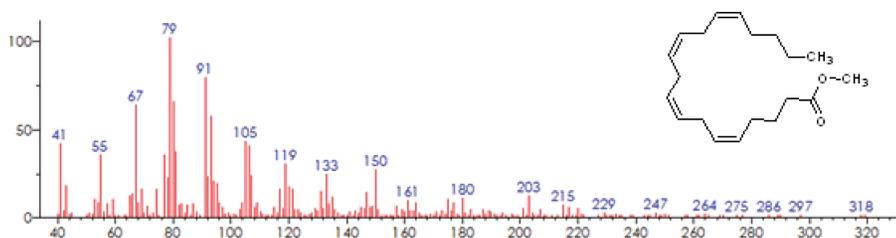
Íons característicos no espectro de massas: m/z 74, rearranjo de McLafferty; m/z 87, clivagem γ ; m/z 298, íon molecular; m/z 267 perda de metoxila.

20:5n3 ((Z,Z,Z,Z,Z)-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoato de Metila)



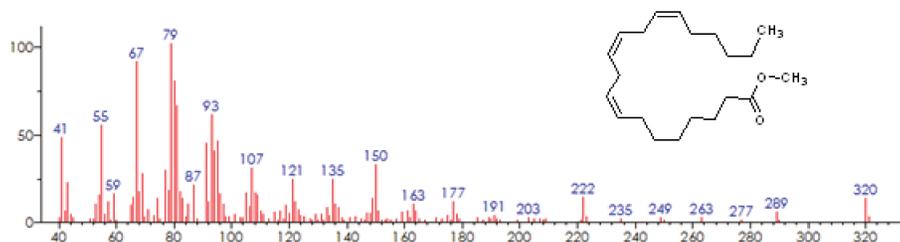
Íons característicos no espectro de massas: m/z 79, clivagem seguida de rearranjo da cadeia alquílica para formar o cátion ciclohexadienila; íon molecular ausente.

20:4n6 ((Z,Z,Z,Z)-5,8,11,14-Eicosatetraenoato de Metila)



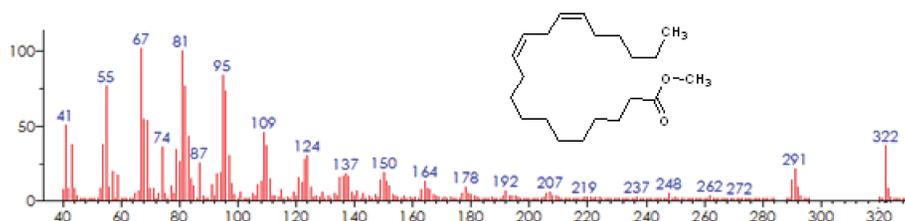
Íons característicos no espectro de massas: m/z 79, clivagem seguida de rearranjo da cadeia alquílica para formar o cátion ciclohexadienila; m/z 318, íon molecular.

20:3n6 ((Z,Z,Z)-8,11,14-Eicosatrienoato de Metila)



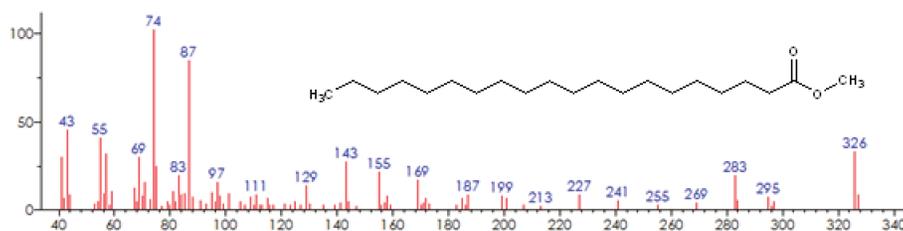
Íons característicos no espectro de massas: m/z 79, clivagem seguida de rearranjo da cadeia alquílica para formar o cátion ciclohexadienila; m/z 320 íon molecular; m/z 289 perda de *metoxila*.

20:2n6 ((Z,Z)-10,13-Eicosadienoato de Metila)



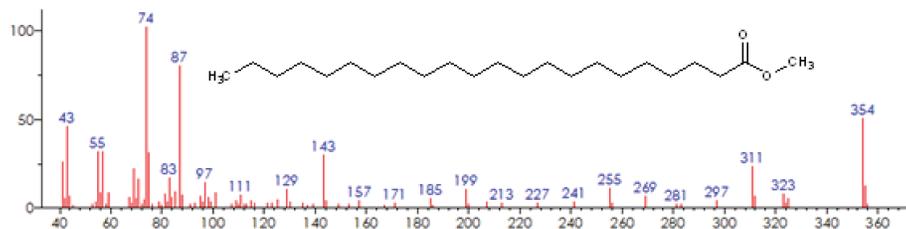
Íons característicos no espectro de massas: m/z 81, clivagem seguida de rearranjo da cadeia alquílica para formar o cátion ciclohexaenila; m/z 322, íon molecular; m/z 291, perda de *metoxila*.

20:0 (Eicosatetraenoato de Metila)



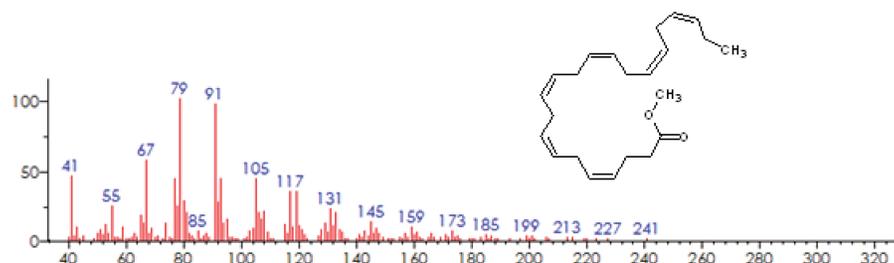
Íons característicos no espectro de massas: m/z 74, rearranjo de McLafferty; m/z 87, clivagem γ ; m/z 326 íon molecular; m/z 295 perda de *metoxila*.

20:0 (Eicosanoato de Metila)



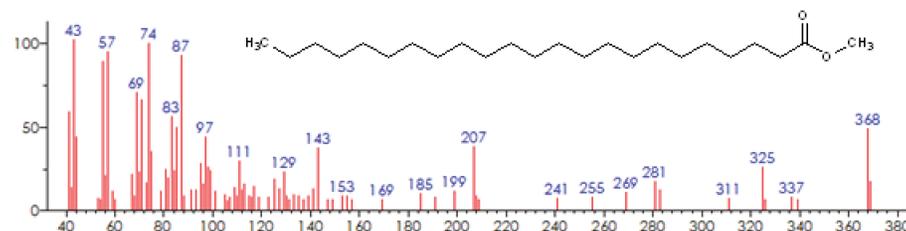
Íons característicos no espectro de massas: m/z 74, rearranjo de McLafferty; m/z 87, clivagem γ ; m/z 354, íon molecular; m/z 323, perda de *metoxila*.

22:6n3 ((Z,Z,Z,Z,Z,Z)-4,7,10,13,16,19-Docosaexanoato de Metila)



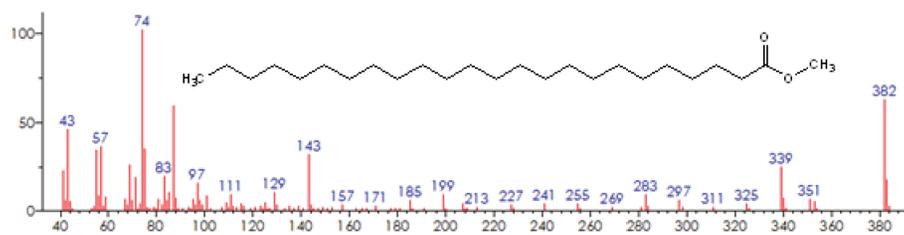
Íons característicos no espectro de massas: m/z 79, clivagem seguida de rearranjo da cadeia alquílica para formar o cátion cicloexadienila; íon molecular ausente.

23:0 (Tricosanoato de Metila)



Íons característicos no espectro de massas: m/z 74, rearranjo de McLafferty; m/z 87, clivagem γ ; m/z 368, íon molecular; m/z 337, perda de *metoxila*.

24:0 (Tetracosenoato de metila)



Íons característicos no espectro de massas: m/z 74, rearranjo de McLafferty; m/z 87, clivagem γ ; m/z 382, íon molecular; m/z 351, perda de *metoxila*.

Anexo B – Percentagem de abundâncias dos íons de m/z 74, 79, 81 e 87 nos espectros de massas obtidos por MIS de MEAG

	EMAG preparados a partir dos AG presentes nas amostras de sangue				EMAG padrões			
	m/z 74	m/z 79	m/z 81	m/z 87	m/z 74	m/z 79	m/z 81	m/z 87
14:1					43,59% ± 2,04%	6,69% ± 0,57%	18,16% ± 3,90%	31,56% ± 1,36%
14:0	59,40% ± 0,94%	0,47% ± 0,39%	1,06% ± 0,49%	39,06% ± 1,04%	58,59% ± 0,51%	0,53% ± 0,02%	1,44% ± 0,71%	39,44% ± 0,54%
15:1					43,66% ± 2,94%	6,51% ± 0,66%	17,90% ± 5,53%	31,93% ± 2,00%
15:0					57,82% ± 1,05%	0,55% ± 0,04%	2,00% ± 1,91%	39,63% ± 0,91%
16:1	40,89% ± 3,70%	6,43% ± 0,72%	21,64% ± 2,07%	31,05% ± 3,71%	41,49% ± 1,13%	7,26% ± 0,45%	20,84% ± 2,16%	30,41% ± 0,76%
16:0	56,41% ± 0,84%	0,47% ± 0,21%	1,22% ± 0,54%	41,90% ± 0,93%	57,39% ± 0,42%	0,55% ± 0,01%	1,48% ± 0,27%	40,58% ± 0,44%
17:1					42,38% ± 3,10%	7,10% ± 0,68%	19,32% ± 5,89%	31,21% ± 2,19%
17:0	57,54% ± 1,25%	0,26% ± 0,33%	1,50% ± 0,83%	40,69% ± 0,47%	56,44% ± 1,79%	0,58% ± 0,03%	2,73% ± 3,15%	40,25% ± 1,37%
18:3n6	4,77% ± 2,43%	53,95% ± 2,93%	30,52% ± 2,27%	10,76% ± 0,63%	6,13% ± 0,50%	51,35% ± 4,33%	32,91% ± 5,67%	9,61% ± 0,91%
18:2n6	6,79% ± 2,06%	27,13% ± 0,96%	60,73% ± 2,20%	5,35% ± 0,82%	7,60% ± 1,41%	26,01% ± 4,89%	60,89% ± 7,33%	5,50% ± 1,03%
18:1	39,30% ± 2,84%	9,14% ± 0,57%	22,90% ± 1,81%	28,67% ± 1,79%	38,76% ± 2,49%	8,95% ± 1,04%	22,86% ± 5,12%	29,43% ± 1,80%
18:0	56,37% ± 1,48%	0,44% ± 0,22%	1,28% ± 0,64%	41,91% ± 1,17%	56,52% ± 0,30%	0,59% ± 0,02%	1,73% ± 0,27%	41,16% ± 0,33%
19:0	55,19% ± 0,92%	0,54% ± 0,05%	1,66% ± 0,16%	42,61% ± 0,96%	55,99% ± 0,22%	0,57% ± 0,02%	1,79% ± 0,21%	41,65% ± 0,27%
20:4n6	9,61% ± 0,67%	62,99% ± 0,77%	22,49% ± 1,49%	4,90% ± 0,25%	9,99% ± 0,39%	61,93% ± 0,94%	23,00% ± 1,21%	5,08% ± 0,15%
20:5n3	8,22% ± 0,25%	66,58% ± 2,15%	20,59% ± 1,29%	4,61% ± 1,32%	8,22% ± 0,69%	67,81% ± 5,19%	19,88% ± 6,12%	4,09% ± 0,33%
20:3n6	5,69% ± 0,37%	49,03% ± 1,46%	35,42% ± 2,19%	9,86% ± 0,75%	6,05% ± 0,42%	47,64% ± 3,24%	36,57% ± 4,24%	9,73% ± 0,69%
20:2n6	10,19% ± 0,80%	26,22% ± 2,56%	58,89% ± 2,95%	5,46% ± 1,54%	10,49% ± 0,43%	24,88% ± 0,43%	58,29% ± 0,88%	6,33% ± 0,09%
20:1	39,21% ± 2,17%	7,51% ± 3,75%	23,26% ± 4,21%	30,03% ± 1,52%	22,80% ± 2,36%	35,59% ± 3,35%	23,46% ± 7,33%	18,16% ± 1,80%

	EMAG preparados a partir dos AG presentes nas amostras de sangue								EMAG padrões							
	m/z 74		m/z 79		m/z 81		m/z 87		m/z 74		m/z 79		m/z 81		m/z 87	
20:0	55,09%	± 1,04%	0,85%	± 0,82%	1,53%	± 1,01%	42,53%	± 1,97%	55,75%	± 0,34%	0,61%	± 0,01%	1,72%	± 0,35%	41,93%	± 0,30%
21:0	56,64%	± 0,91%	0,06%	± 0,16%	1,46%	± 2,30%	41,84%	± 2,27%	55,27%	± 0,41%	0,43%	± 0,29%	2,21%	± 0,57%	42,09%	± 0,34%
22:6n3	7,96%	± 1,51%	75,99%	± 3,83%	15,81%	± 1,61%	1,49%	± 0,74%	8,36%	± 0,32%	74,57%	± 1,65%	15,09%	± 0,21%	1,98%	± 1,55%
22:2n6									13,99%	± 2,15%	24,34%	± 4,01%	54,08%	± 7,11%	7,59%	± 1,06%
22:1n9	42,14%	± 4,49%	5,97%	± 2,13%	23,36%	± 1,88%	28,53%	± 1,00%	40,71%	± 2,35%	7,26%	± 0,49%	22,40%	± 4,62%	29,63%	± 1,84%
22:0	55,08%	± 1,11%	0,48%	± 0,36%	1,95%	± 0,98%	42,49%	± 0,42%	54,86%	± 0,38%	0,60%	± 0,01%	1,94%	± 0,44%	42,59%	± 0,32%
23:0	54,72%	± 0,87%	0,06%	± 0,16%	1,14%	± 1,15%	44,09%	± 1,46%	54,17%	± 0,92%	0,43%	± 0,29%	2,81%	± 1,52%	42,58%	± 0,73%
24:1	45,76%	± 3,46%	4,47%	± 1,12%	19,87%	± 4,00%	29,89%	± 0,87%	42,90%	± 1,12%	5,60%	± 0,26%	21,66%	± 2,10%	29,85%	± 1,00%
24:0	54,30%	± 1,69%	0,91%	± 1,75%	1,76%	± 0,84%	43,04%	± 1,87%	54,06%	± 0,52%	0,62%	± 0,03%	2,05%	± 0,82%	43,27%	± 0,46%
0	56,07%	± 1,55%	0,45%	± 0,28%	1,46%	± 0,29%	42,02%	± 1,36%	56,08%	± 1,46%	0,55%	± 0,07%	1,99%	± 0,45%	41,38%	± 1,27%
1	41,46%	± 2,70%	6,70%	± 1,75%	22,21%	± 1,47%	29,63%	± 1,05%	42,23%	± 1,16%	6,74%	± 0,71%	20,42%	± 1,82%	30,61%	± 0,96%
2	8,49%	± 2,40%	26,67%	± 0,64%	59,81%	± 1,30%	5,40%	± 0,08%	10,70%	± 3,20%	25,08%	± 0,85%	57,75%	± 3,44%	6,47%	± 1,05%
3	5,23%	± 0,64%	51,49%	± 3,47%	32,97%	± 3,47%	10,31%	± 0,64%	6,09%	± 0,05%	49,50%	± 2,62%	34,74%	± 2,59%	9,67%	± 0,09%
≥ 4	8,60%	± 0,89%	68,52%	± 6,71%	19,63%	± 3,45%	3,67%	± 1,89%	8,86%	± 0,98%	68,10%	± 6,32%	19,32%	± 3,99%	3,72%	± 1,58%

Legenda: **0**, EMAG saturados; **1**, EMAG monoinsaturados; **2**, EMAG di-insaturados; **3**, EMAG tri-insaturado; **≥ 4**, EMAG com 4, 5 ou 6 insaturações

Anexo C – Análise de componentes principais do perfil de ácido graxo individual dos lipídios estudados

Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada separadamente para cada lipídio estudado, de forma a investigar qual dos lipídios avaliados constitui um melhor marcador independentemente para os efeitos do Orlistate no perfil de AG e para as alterações observadas no perfil de AG associadas ao sobrepeso.

Anexo C1 – Análise de componentes principais no perfil de ácido graxo de membrana de eritrócitos

Foram considerados para a construção do modelo 20 variáveis (16 AG; Σ AGS, Σ AGMI, Σ AGPI e a razão $n6/n3$). O melhor modelo de PCA foi obtido para sete CP (90,35% das informações dos dados originais), para os dados auto-escalados.

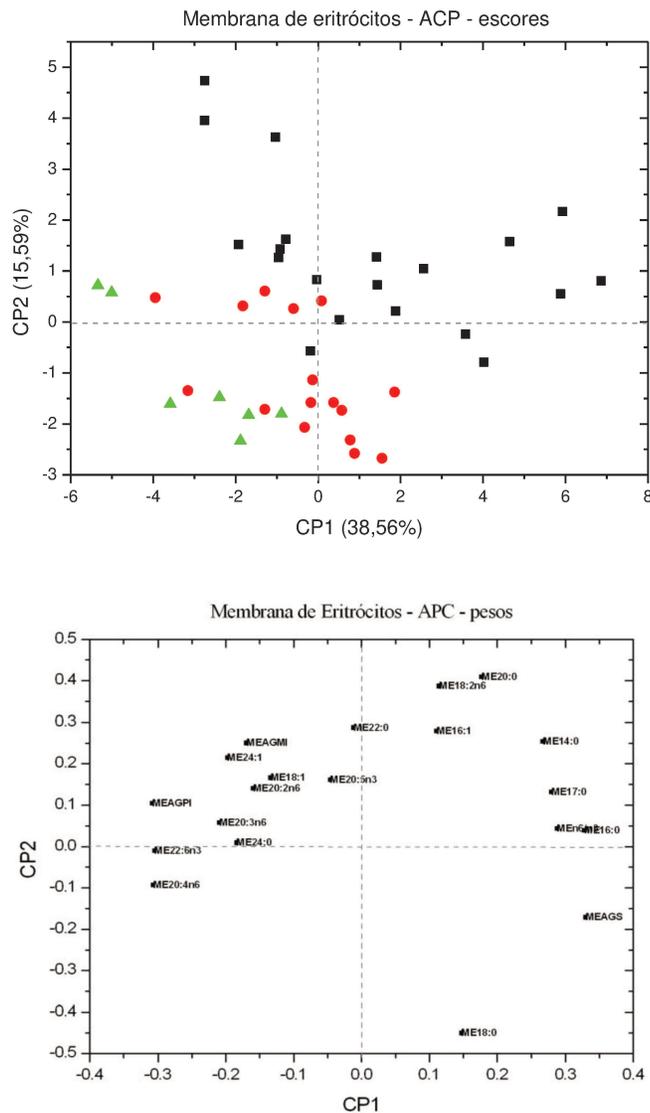


Figura C-1: Análise de componentes principais do perfil de AG de membrana de eritrócitos; **a)** gráfico de escore para os grupos de (■) sobrepeso não-tratados; (●) sobrepeso tratados com Orlistate e (▲) magros não-tratados, mostrando CP1 *versus* CP2; **b)** gráfico de pesos, mostrando CP1 *versus* CP2

Anexo C2 – Análise de componentes principais no perfil de ácido graxo de fosfolípidios de plasma

Foram considerados para a construção do modelo 25 variáveis (21 AG; Σ AGS, Σ AGMI, Σ AGPI e a razão $n6/n3$). O melhor modelo de PCA foi obtido para seis CP (75,54% das informações dos dados originais), para os dados auto-escalados.

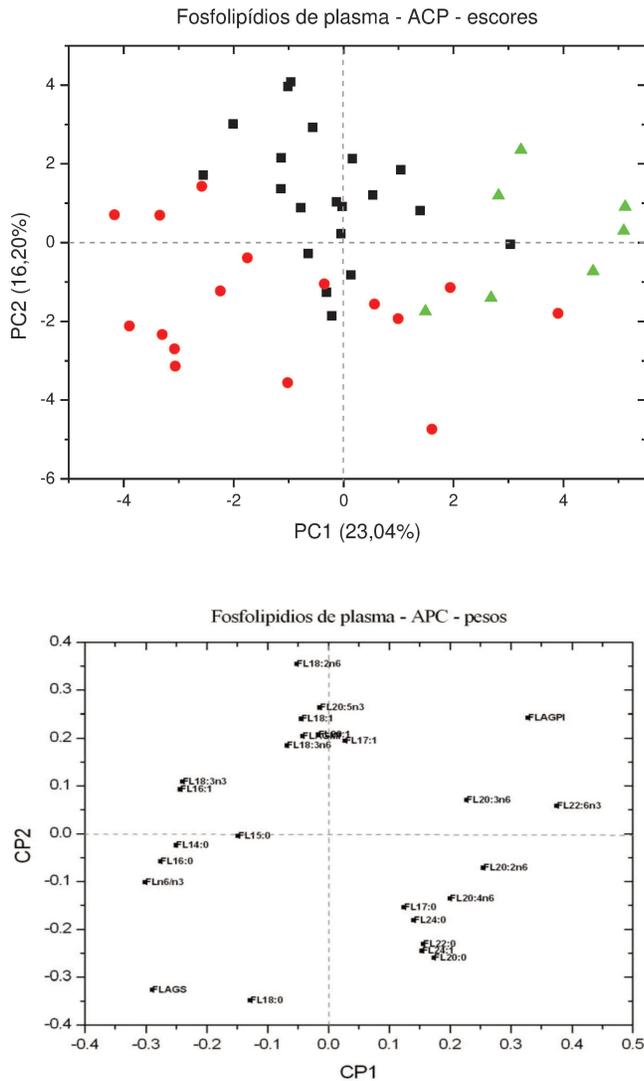


Figura C-2: Análise de componentes principais do perfil de AG de fosfolípidios de plasma; **a)** gráfico de escore para os grupos de (■) sobrepeso não-tratados; (●) sobrepeso tratados com Orlistate e (▲) magros não-tratados, mostrando CP1 *versus* CP2; **b)** gráfico de pesos, mostrando CP1 *versus* CP2

Anexo C3 – Análise de componentes principais do perfil de ácido graxo de Triglicerídeos de plasma

Foram considerados para a construção do modelo 21 variáveis (17 AG; Σ AGS, Σ AGMI, Σ AGPI e a razão $n6/n3$). O melhor modelo de PCA foi obtido para seis CP (85,83% das informações dos dados originais), para os dados auto-escalados.

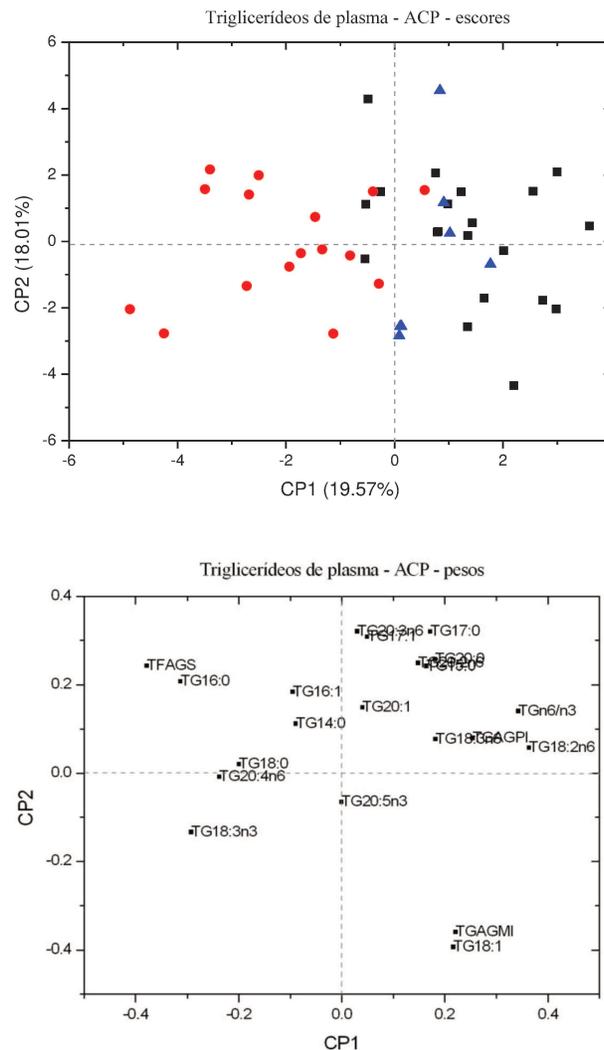


Figura C-3: Análise de componentes principais do perfil de AG de triacilglicerídios de plasma; **a)** gráfico de escore para os grupos de (■) sobrepeso não-tratados; (●) sobrepeso tratados com Orlistate e (▲) magros não-tratados, mostrando CP1 *versus* CP2; **b)** gráfico de pesos, mostrando CP1 *versus* CP2

Anexo C4 – Análise de componentes principais no perfil de ácido graxo de ésteres de colesterol de plasma

Foram considerados para a construção do modelo 22 variáveis (18 AG; Σ AGS, Σ AGMI, Σ AGPI e a razão $n6/n3$). O melhor modelo de PCA foi obtido para 6 CP (85,83% das informações dos dados originais), para os dados auto-escalados.

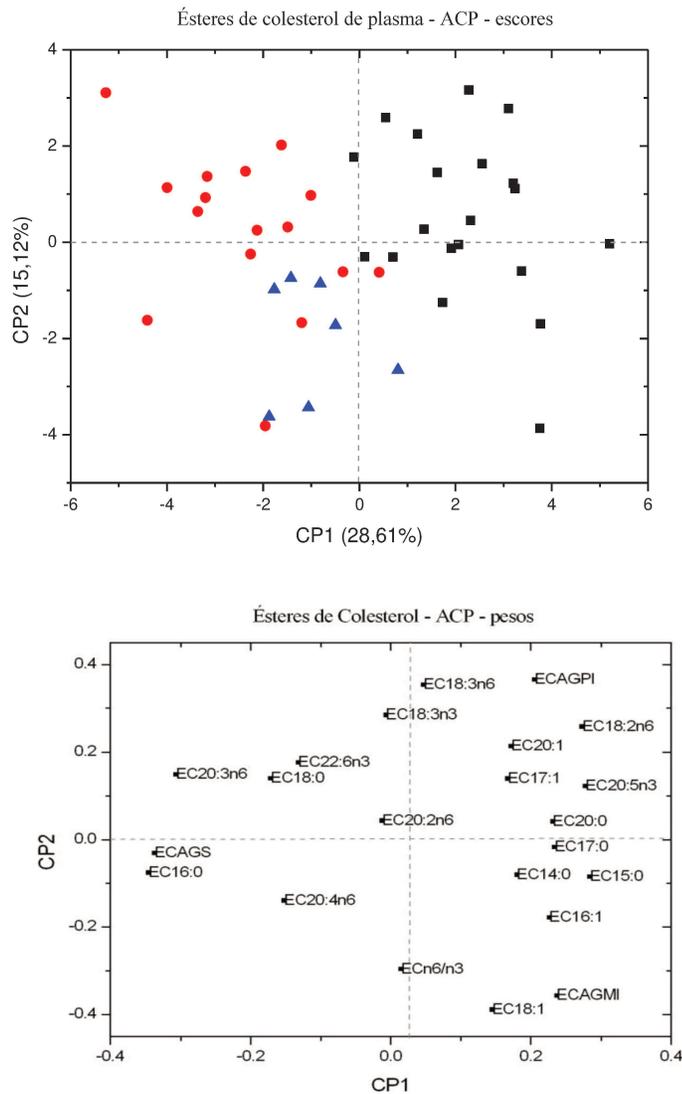
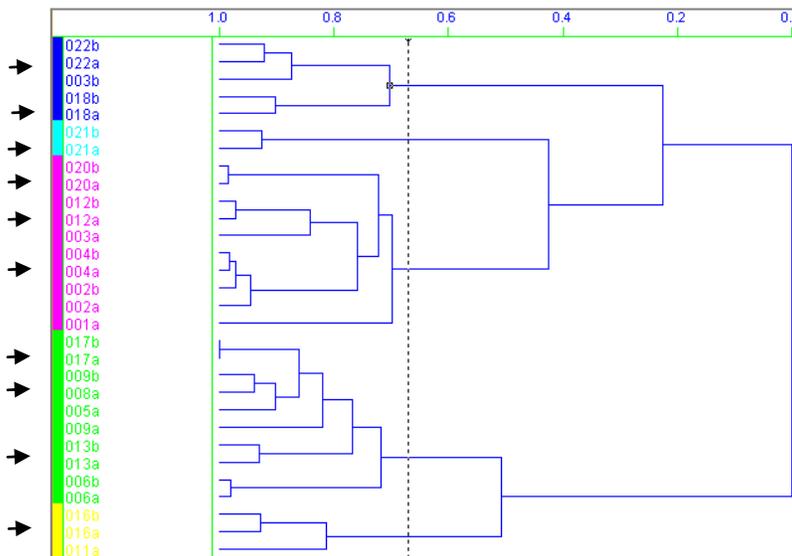
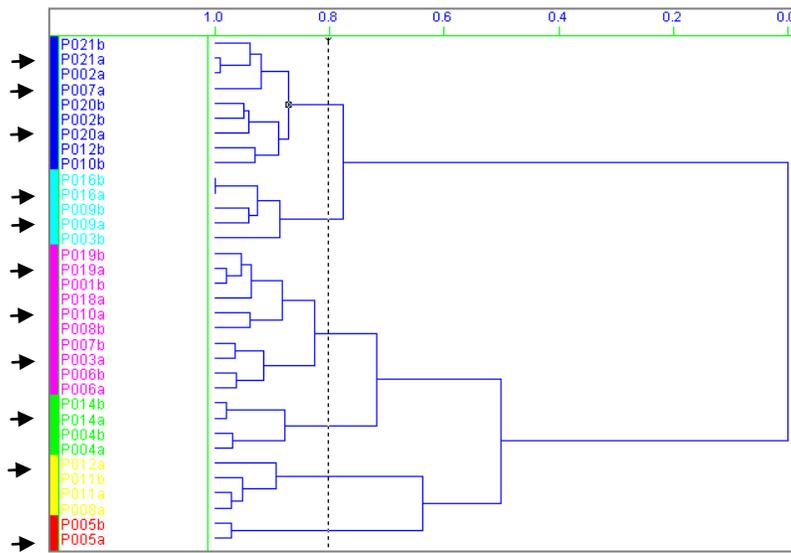


Figura C-4: Análise de componentes principais do perfil de AG de ésteres de colesterol de plasma; **a)** gráfico de escore para os grupos de (■) sobrepeso não-tratados; (●) sobrepeso tratados com Orlistate e (▲) magros não-tratados, mostrando CP1 versus CP2; **b)** gráfico de pesos, mostrando CP1 versus CP2

Anexo D – Seleção das amostras para o conjunto de validação



Análise de agrupamentos hierárquicos de 30 espectros de RMN ¹H de plasma de sujeitos obesos não-tratados com orlistate; para os dados centrados na média, distância euclidiana e método de ligação incremental. As dez amostradas selecionadas para o conjunto de validação estão indicadas pela seta.



Análise de agrupamentos hierárquicos de 34 espectros de RMN ¹H de plasma de sujeitos magros não tratados com orlistate; para os dados centrados na média, distância euclidiana e método de ligação incremental. As 11 amostradas selecionadas para o conjunto de validação estão indicadas pela seta.

Anexo E – Espectros de RMN de ^1H -TOCSY 1D do lactato

Espectros obtidos no Espectrômetro Bruker Avance DRX 400 ($B_0 = 9.4 \text{ T}$) equipado com sonda de detecção direta. **Parâmetros de aquisição:** Tempo de aquisição = 2,72 s; largura espectral (Hz/ppm) = 6009,6/15,0; número de transientes = 512; potência da trava de spin (“*spinlock*”) do TOCSY = 5,65 dB; tempo de mistura do TOCSY = 0,20 s.

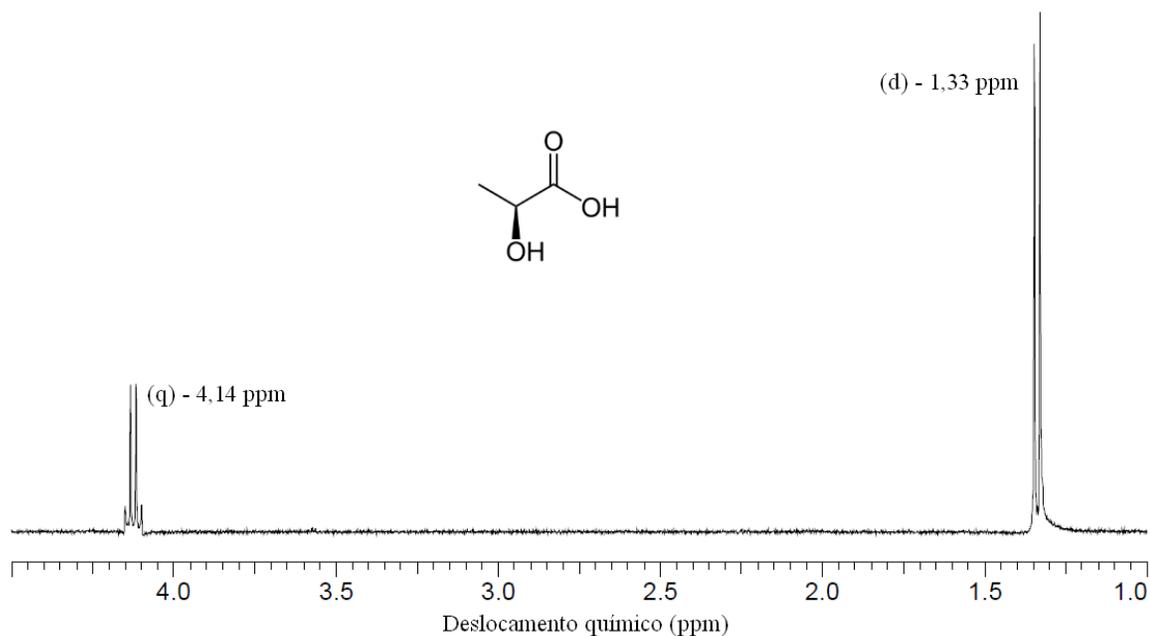


Figura E-1: Espectro de lactato obtido por ^1H -TOCSY 1D para uma amostra de plasma (irradiação em 1,33 ppm; 400 MHz; 10% de D_2O , pH = 7,4; 25° C)

Anexo F – Experimentos de “spiked” para confirmação das ressonâncias de EDTA

Espectros obtidos no Espectrômetro Bruker Avance DRX 400 ($B_0 = 9.4 \text{ T}$) equipado com sonda de detecção direta. Os espectros foram adquiridos sem giro, a 298 K, com largura espectral de 10 kHz, 32k pontos digitalizados provenientes de 128 transientes. O processamento dos espectros foi realizado no software TopSpin (v2.1, Bruker Biospin).

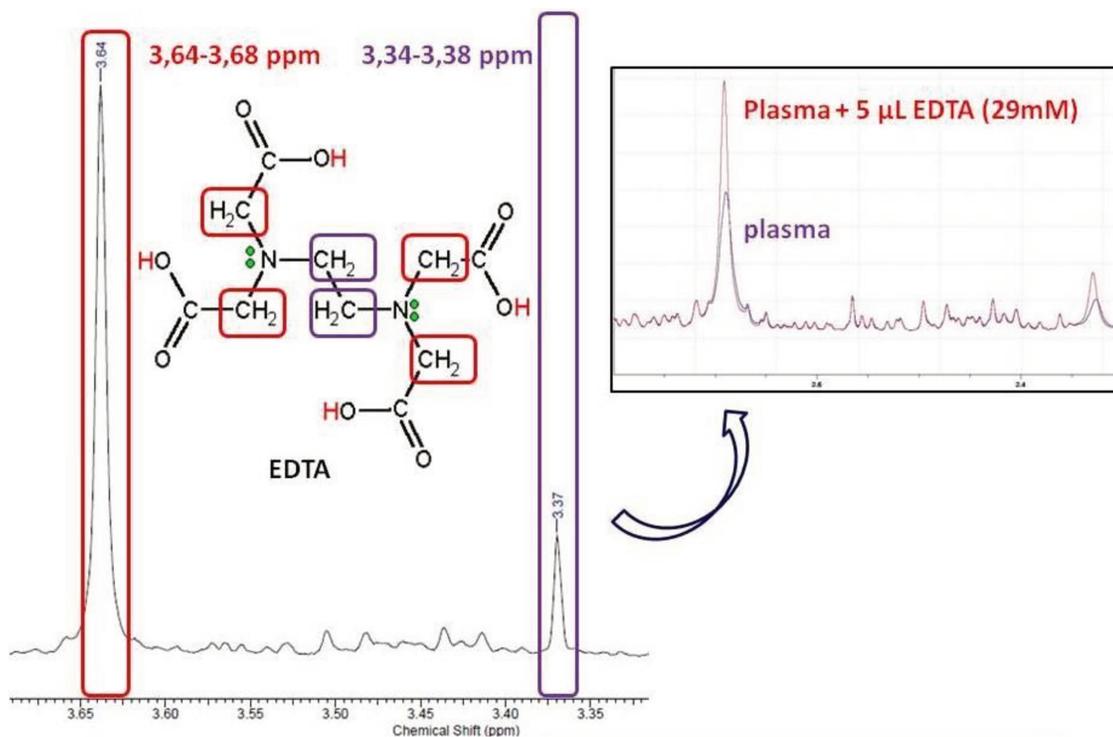


Figura F-1: Parte do espectro de RMN de plasma destacando as ressonâncias do EDTA-livre. Destacado na expansão o efeito da adição de EDTA (5µL; 29 mM)

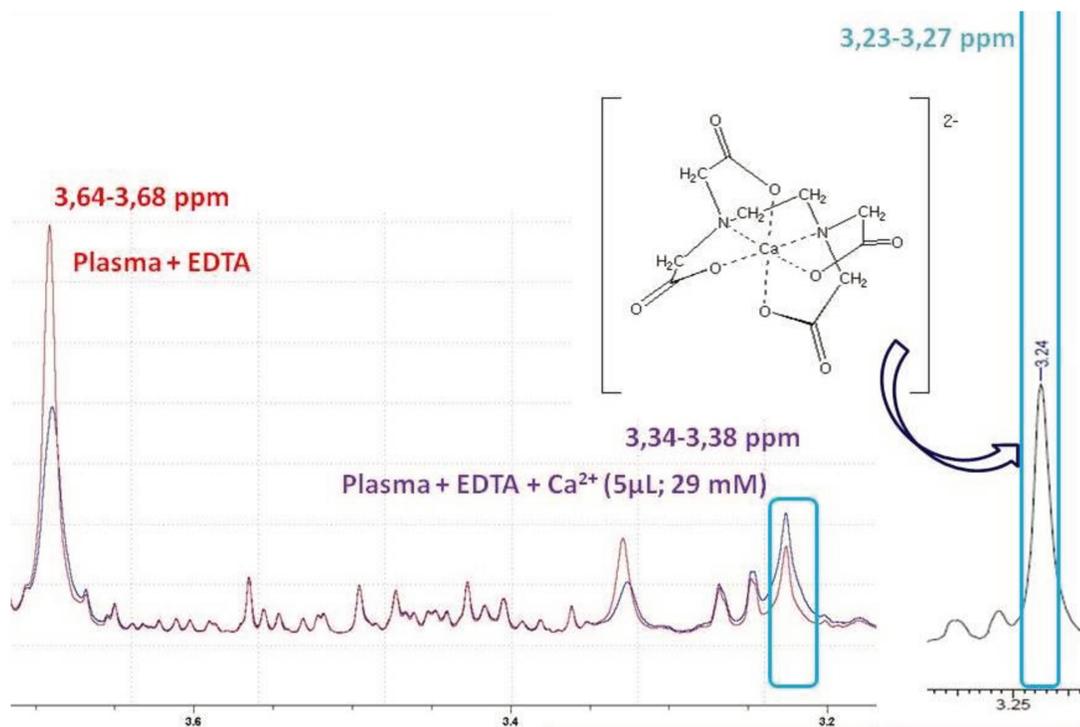


Figura F-2: Parte do espectro de RMN de plasma destacando as ressonâncias do EDTA-livre (3,27 e 3,64 ppm) e do complexo EDTA-Ca²⁺ (3,24 ppm).

Destacado o efeito da adição de íons Ca²⁺ (5µL; 30 mM)

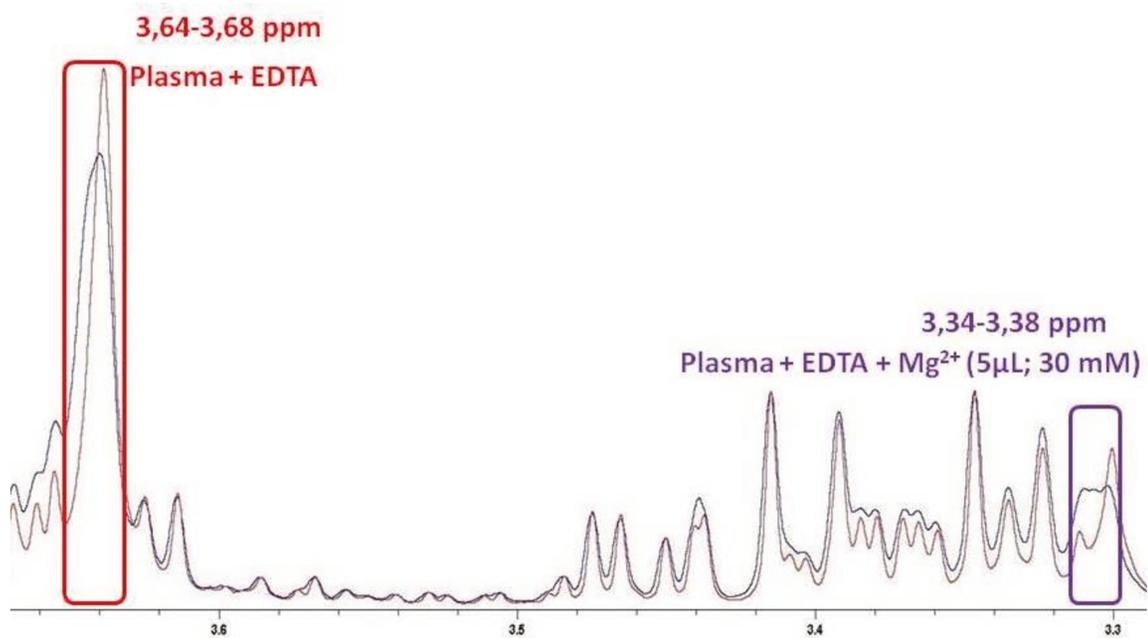


Figura F-3: Parte do espectro de RMN de plasma destacando as ressonâncias do EDTA-livre e do complexo ETDA-Mg²⁺ (3,27 e 3,64 ppm). Destacado o efeito da adição de íons Mg²⁺ (5µL; 30 mM).