



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

GUSTAVO BRAGA SANVIDO

**ESPECTROMETRIA DE MASSAS APLICADA A PRODUÇÃO
ANIMAL**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.**

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR GUSTAVO BRAGA SANVIDO, E ORIENTADA PELO PROF.DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Sa59e Sanvido, Gustavo Braga (1980-).
Espectrometria de massas aplicada a produção
animal / Gustavo Braga Sanvido. – Campinas, SP: [s.n.],
2012.

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Produção animal. 2. Embrião. 3. Alimento.
4. Espectrometria de massas. I. Eberlin, Marcos
Nogueira. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Mass spectrometry applied to animal production

Palavras-chave em inglês:

Animal production

Embryo

Food

Mass spectrometry

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Marcos Nogueira Eberlin [Orientador]

Humberto Márcio Santos Milagre

Paulo César Pires Rosa

Fábio Cesar Gozzo

Adriana Vitorino Rossi

Data de defesa: 04/06/2012

Programa de pós-graduação: Química

À meus pais e minha
querida esposa...

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem Ele não haveria qualquer sentido em minha vida.

À minha Família, que sempre esteve do meu lado em todos os momentos da minha vida e por acreditarem em mim.

À minha esposa por ter sido o apoio que necessitei durante todo este tempo.

Ao Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin, por todos os ensinamentos transmitidos, pela orientação, confiança, amizade e por ter acreditado que um médico veterinário era capaz de entender espectrometria de massas.

À todos os meus amigos por tornarem minha vida mais fácil e divertida. Em especial ao João Leonel e Marcelo Morandi por serem exemplos de profissionais e pesquisadores para mim.

À todos meus amigos do Laboratório Thomson, pela contribuição e convivência durante esses anos de trabalho. Em especial: Boniek, Wanderson, Núbia, Cris e Rose, por todo o carinho e convivência durante estes anos de doutorado.

Aos quatro pós-docs que me ajudaram durante este doutorado: Jerusa pelos ensinamentos no preparo de amostra, Gustavo por todos os ensinamentos em MALDI e manutenção de equipamentos, Rodrigo pelos ensinamentos em ESI e em como “rodar 90 amostras” em um mesmo dia sem injeção automática de amostras e Renato Haddad por todos os ensinamentos em instrumentação.

Aos funcionários do IQ (BIQ, CPG, Xerox, Desenho, Vidraria, Segurança e Limpeza), pela prestação de serviços com eficiência.

À FAPESP (processo: nº 2007/54357-6) pela bolsa de estudo concedida.

Ao Laboratório Microbial pela experiência profissional e pelo suporte financeiro que possibilitou minha manutenção durante o último ano deste doutorado.

À todos os colaboradores que de alguma forma participaram e tornaram possível a realização deste trabalho. Em especial à Polícia Federal (Dr. José Jorge Zacca).

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS:

Nome: Gustavo Braga Sanvido
Filiação: Mário de Campos Sanvido
Maria Lúcia Braga Sanvido
Nascimento: 08 de agosto de 1980 em Campinas, SP, Brasil
Contato: gus_sanvido@yahoo.com
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7267153365676204>

FORMAÇÃO ACADÊMICA / TITULAÇÃO:

- Doutorado em Ciências. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Área de concentração: Espectrometria de massas. Conclusão 2012.
- Mestrado em Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Área de concentração: Tecnologia de leite e derivados. Conclusão 2007.
- Bacharelado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP). Conclusão 2004.

EXPERIÊNCIA ACADÊMICA:

- 1) REGIANI, T; KLITZKE, CF; SANVIDO, GB, *ET AL.* GASOLINE, KEROSENE AND DIESEL FINGERPRINTING VIA POLAR MARKERS. *ENERGY & FUELS*. ACCEPTED, **2012**.
- 2) FASCIOTTI, M; SANVIDO, GB; SANTOS, VG *ET AL.* SEPARATION OF ISOMERIC DISACCHARIDES BY TRAVELING WAVE ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY: INCREASING RESOLUTION WITH POLARIZABLE DRIFT GASES. *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY*. ACCEPTED, **2012**.
- 3) ROMAO, W; FRANCO, M; SANVIDO, GB, *ET AL.* ANALYZING THE CHEMICAL PROFILE OF META-CHLOROPHENYLPIPERAZINE (M-CPP) IN ECSTASY TABLETS BY EASY AMBIENT SONIC-SPRAY IONIZATION, X-RAY FLUORESCENCE, ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY AND NMR. *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY*. 400 (9), P.3053-3064, **2011**.
- 4) BARREIRO, JR; FERREIRA, CR; SANVIDO, GB, *ET AL.* IDENTIFICATION OF SUBCLINICAL COW MASTITIS PATHOGENS IN MILK BY MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*. 93 (12), P.5661-5667, **2010**.
- 5) BIASOTO, ACT; CATHARINO, RR; SANVIDO, GB, *ET AL.* FLAVOUR CHARACTERIZATION OF RED WINES BY DESCRIPTIVE ANALYSIS AND ESI MASS SPECTROMETRY. *FOOD QUALITY AND PREFERENCE*, 21 (7), P.755-762, **2010**.

- 6) EBERLIN, LS; HADDAD, R; NETO, RCS, *ET AL.* INSTANTANEOUS CHEMICAL PROFILES OF BANKNOTES BY AMBIENT MASS SPECTROMETRY. *ANALYST*. 135 (10), P.2533-2539, **2010**.
- 7) RIJS, NJ; SANVIDO, GB; KHAIRALLAH, GN, *ET AL.* GAS PHASE SYNTHESIS AND REACTIVITY OF DIMETHYLAURATE. *DALTON TRANSACTIONS*. 39 (37), P.8655-8662, **2010**.
- 8) SANVIDO, GB; GARCIA, JS; CORILO, YE, *ET AL.* FAST SCREENING AND SECURE CONFIRMATION OF MILK POWDER ADULTERATION WITH MALTODEXTRIN VIA ELECTROSPRAY IONIZATION-MASS SPECTROMETRY [ESI(+)-MS] AND SELECTIVE ENZYMATIC HYDROLYSIS. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*. 58 (17), P.9407-9412, **2010**.
- 9) ALBERICI, RM; SIMAS, RC; SANVIDO, GB, *ET AL.* AMBIENT MASS SPECTROMETRY: BRINGING MS INTO THE "REAL WORLD". *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY*. 398 (1), P.265-294, **2010**.
- 10) FERREIRA, CR; SARAIVA, SA; CATHARINO, RR, *ET AL.* SINGLE EMBRYO AND OOCYTE LIPID FINGERPRINTING BY MASS SPECTROMETRY. *JOURNAL OF LIPID RESEARCH*. 51 (5), P.1218-1227, **2010**.
- 11) ROMAO, W; FRANCO, MF; IGLESIAS, AH, *ET AL.* FINGERPRINTING OF BOTTLE-GRADE POLY(ETHYLENE TEREPHTHALATE) VIA MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION MASS SPECTROMETRY. *POLYMER DEGRADATION AND STABILITY*. 95 (4), P.666-671, **2010**.
- 12) FIGUEIREDO, EC; SANVIDO, GB; ARRUDA, MAZ, *ET AL.* MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS AS ANALYTE SEQUESTERS AND SELECTIVE SURFACES FOR EASY AMBIENT SONIC-SPRAY IONIZATION. *ANALYST*. 135 (4), P.726-730, **2010**.
- 13) LALLI, PM; SANVIDO, GB; GARCIA, JS, *ET AL.* FINGERPRINTING AND AGING OF INK BY EASY AMBIENT SONIC-SPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY. *ANALYST*. 135 (4), P.745-750, **2010**.
- 14) FERREIRA, CR; BORGES, JC; SANTOS, LFA, *ET AL.* MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION MASS SPECTROMETRY (MALDI-MS) CHARACTERIZATION OF SPERM LIPID PROFILES OF BULLS WITH DIFFERENT CAPACITIES OF EMBRYO IN VITRO PRODUCTION. *REPRODUCTION FERTILITY AND DEVELOPMENT*. 22 (1), P.289-290, **2010**.
- 15) OSAWA, CC; FERRARI, CC; SIQUEIRA, PB, *ET AL.* SENSORY PROFILE EVALUATION OF LIGHT PEACH TEA. *CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS*. 28, P.102-108, **2008**.
- 16) SANVIDO, GB; KABUKI, DY; COSTA, MR, *ET AL.* EFFECTS OF RAW MILK STORAGE TIME AND PASTEURIZED MILK STORAGE TEMPERATURE ON MILK SHELF-LIFE. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*. 90, P.484-484, **2007**.
- 17) ANDREATTA, E; OLIVEIRA, CAF; MARQUES, MC; SANVIDO, GB, *ET AL.* AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO E PROTEÓLISE DO QUEIJO MINAS FRESCAL PRODUZIDO COM DIFERENTES NÍVEIS DE CÉLULAS SOMÁTICAS: RESULTADOS PRELIMINARES. *BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY*. 3, P.71-74, **2006**.

QUALIFICAÇÕES E EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL:

- INGLÊS – Fluente (Graduado pela Escola Cultura Inglesa. Conclusão 2004).
- Pesquisador, responsável pelo desenvolvimento e validação de métodos para análise de resíduos de drogas veterinárias no Laboratório Microbial, Campinas, SP, Brasil. Setembro 2010 – Maio 2012.
- Estagiário no Bio21 Institute com o Prof. Dr. Richard O'Hair, Melbourne, Victoria, Australia. Janeiro 2010 – Julho 2010.

RESUMO

O Brasil é hoje um dos maiores produtores de alimentos de origem animal. Este papel de destaque só foi alcançado a partir de grandes investimentos em biotecnologia e tecnologia. O primeiro foi responsável pelo grande aumento na produtividade dos agropecuaristas nacionais possibilitando um ganho genético de nossos rebanhos e por consequência uma maior competitividade no mercado internacional. Já o ganho tecnológico tem nos levado a melhorar nosso processamento de alimentos garantindo uma maior qualidade de nossos alimentos e fazendo com que possamos deixar de ser um país exportador unicamente de matéria-prima para nos tornarmos, cada vez mais, exportadores de manufaturas. Neste trabalho foi proposto o uso da espectrometria de massas, técnica ainda muito pouco conhecida na área de produção de alimentos, em diferentes pontos desta cadeia produtiva de alimentos de origem animal.

Para a análise de embriões foi utilizado o *MALDI-Q-TOF*. Esta técnica possibilitou a identificação do perfil lipídico de cada amostra se mostrando muito mais apta do que a técnica comumente utilizada para estas análises (GC) para a identificação de diferenças individuais. A tipificação e o monitoramento de algumas mudanças neste perfil durante as fases de desenvolvimento se mostraram intrínsecas às espécies e relacionadas ao ambiente. Esta estratégia em *MALDI-MS* permitiu a caracterização do perfil lipídico de embriões e oócitos de diversas espécies, contribuindo para os campos de pesquisa em reprodução tais como a das alterações do perfil lipídico nas células durante o desenvolvimento embrionário e seu papel na criopreservação de embriões *in vitro*.

Na área de alimentos dois trabalhos foram realizados. No primeiro a detecção de maltodextrina em leite em pó foi avaliada através da técnica de fingerprinting. O eletrospray (ESI) foi utilizado para a identificação da adição de maltodextrina em leite em pó de uma forma rápida direta e simples. Este método se mostrou sensível, robusto e altamente seletivo e confiável, como foi comprovado pelos ensaios de digestão enzimática.

O segundo trabalho desta área de alimentos utilizou a técnica de fingerprint por *MALDI-Q-TOF* para detectar a adição de gordura exógena em leite em pó bovino. Através desta técnica conseguiu-se detectar, com precisão a adição de óleo/gordura exógena em leite em

pó, utilizando um procedimento simples e rápido. Este procedimento proporcionou um método robusto e seletivo para a classificação e o controle de qualidade do leite em pó.

Nos últimos anos, estudos envolvendo *MS* tem se expandido em ritmo impressionante no campo das ciências biológicas. As novas exigências de qualidade e segurança dos mercados consumidores impulsionam a busca de métodos analíticos capazes de buscarem limites de detecção e quantificação cada vez menores. Devido a grande versatilidade da técnica de *MS*, foi possível, neste trabalho, o desenvolvimento de métodos analíticos em duas áreas distintas (reprodução animal e qualidade de produtos de origem animal), dentro de um mesmo tema (produção animal), com grande eficiência.

Observa-se ainda que é de fundamental importância desenvolver experiência científica em grupos multidisciplinares de modo a criar competências para novos desafios e resolver problemas na área de agronegócios.

ABSTRACT

Brazil is nowadays one of the biggest producers of foods from animal origins. This prominent role in the international market was only achieved through important investments made in biotechnology and technology. The first one was responsible for the productivity increase of national agriculture producers allowing then having a genetic gain of their herds and consequently allowing them to enhancing competitiveness in the international market. The technology increase have been taking us to improve our food processing ensuring higher quality products and allowing us to become manufacture exporters instead of been just raw products exporters. In this work it was suggested the use of mass spectrometry, a still very unknown technique in the food production field, in different points of animal origin food chain.

For the embryo analysis a *MALDI-Q-TOF* was used. This technique allowed a lipid profile identification of each single sample showing to be more able to identify individual differences than the usual techniques (*GC*). The typification and monitoring of some changes in these profiles occurred during development phases showed to be intrinsic to the species and related to the environment. This strategy on *MALDI-MS* allowed the characterization of many species embryos and oocytes lipid profiles, contributing for the fields of research in reproduction as lipid profiles changes in cells during embryo development and its role on *in vitro* embryo cryopreservation.

In the field of food control quality two works were developed. In the first one the detection of maltodextrin in milk powder was evaluated through the mass spectrometry fingerprint technique. The *ESI* was used for the fast, direct and simple identification of maltodextrin addition in milk powder. This method showed to be sensible, robust and highly selective and reliable, as it was proved by the enzymatic assays.

The second work in the food control quality field used the *MALDI-Q-TOF* fingerprint technique to detect the exogenous fat addition in bovine milk powder. Through this technique we managed to precisely detect the addition of exogenous oil/fat in milk powder, through a fast and easy procedure. This procedure provided a robust and selective method to classification and control quality of milk powder.

During the last years studies involving *MS* have been expanding in an impressive rate in the biological sciences field. The new requisites of quality and safety of consumer markets

drive to the search of analytical methods able to seek lower detection and quantification limits. Due to the great versatility of MS technique it was possible in this work to develop analytical methods in two different areas (animal reproduction and quality of animal origin products) in the same field (animal production), with great efficiency.

Furthermore it is noted that it has a fundamental importance to develop scientific experience in multi-disciplinary to create competencies to face new challenges and solve problems in the agribusiness field.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
1. CAPÍTULO 1.....	2
1.1. Produção Animal	2
1.2. A Espectrometria de Massas em Biotecnologia	2
1.2.1. Lipídeos em oócitos e embriões.....	3
1.3. A Espectrometria de Massas e a Ciência de Alimentos	7
1.3.1. Utilização da Espectrometria de Massas para Determinação de Substâncias em Alimentos	9
1.3.2. Técnicas Modernas de Espectrometria de Massas para Determinação de Biomoléculas em Alimentos.....	10
2. CAPÍTULO 2.....	16
2.1. Objetivos.....	16
3. CAPÍTULO 3.....	18
3.1. Introdução.....	18

3.2. Material e Métodos	20
3.2.1. Reagentes	20
3.2.2. Coleta e armazenamento de amostra para análise	20
3.2.3. Análise de lipídios por <i>MALDI-MS</i>	22
3.3. Resultados e Discussão	23
3.3.1. <i>Fingerprinting</i> de lipídios em diferentes espécies	24
3.3.2. Caracterização de lipídios em oócitos e embriões.....	31
3.4. Conclusão.....	33
4. CAPÍTULO 4.....	35
4.1. Introdução.....	35
4.2. Material e Métodos	37
4.2.1. Amostras	37
4.2.2. Reagentes	37
4.2.3. Preparo das soluções de leite em pó	38
4.2.4. Ensaio enzimático.....	38
4.2.5. Infusão direta no espectrômetro de massas	39
4.3. Resultados e Discussão	39
4.3.1. ESI-MS em leite em pó	42

4.3.2. Confirmação da adulteração por adição de maltodextrina por digestão enzimática.....	43
4.4. Conclusão.....	49
5. CAPÍTULO 5.....	51
5.1. Introdução.....	51
5.2. Materiais e Métodos	52
5.2.1. Reagentes	52
5.2.2. Preparo das soluções de leite em pó	52
5.2.3. Análise por MALDI-QTOF MS.....	53
5.3. Resultados e Discussão	53
5.4. Conclusão.....	58
6. CAPÍTULO 6.....	60
6. CAPÍTULO 7.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

- BSA – Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)
- CI – Chemical Ionization (Ionização química)
- CID – Collision Induced Dissociation (Dissociação induzida por colisão)
- EI – Electron Impact Ionization (Ionização por impacto de elétrons)
- ESI – Electrospray ionization (Ionização por eletrospray)
- FCS – Fetal Calf Serum (Soro Fetal Bovino)
- FIV – Fertilização *in vitro*
- GC – Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas)
- GC-C-IRMS – Gas Chromatography Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometry (Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas de razão isotópica)
- L – Ácido Linoléico
- LC/MS – Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry (Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas)
- Ln – Ácido Linolénico
- MALDI – Matrix-Assisted *LASER* Desorption Ionization (Dessorção e ionização à *LASER* assistida por matriz)
- MS – Mass Spectrometry (Espectrometria de massas)
- m/z – Mass to charge ratio (Razão massa sobre carga)
- O – Ácido Oléico
- P – Ácido Palmítico
- PC – Phosphatidyl Choline (Fosfatidil colina)
- PCA – Principal Component Analysis (Análise de componentes principais)
- PL – Phospholipids (Fosfolípidos)
- Q – Quadrupole (Quadrupolo)
- S – Ácido Esteárico
- SM – Sphingomyelin (Esfingomiélna)
- TAGS – Triglycerides (Triacilgliceróis)
- TOF – Time of Flight (Tempo de Voo)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Identificação de fosfolipídios (PL) e triacilglicerol (TAG) via <i>MALDI-MS(+)</i> de oócitos humanos, oócitos bovinos, embriões bovinos, oócitos ovinos, oócitos de peixe e ovo de formiga.....	26
TABELA 2. Atribuições dos íon identificados nos padrões.....	42
TABELA 3. Valores de massa calculados dos fragmentos, monohexoses, hexobioses e hexotrioses	43
TABELA 4. Digestão de padrões e amostras de leite em pó	49
TABELA 5. Atribuição e abundância relativa (%) dos principais íons observados no espectro de MALDI-QTOF(+) nas amostras de leite em pó.....	56
TABELA 6. Resultados de análises prévias das amostras estudadas	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema Simplificado Dos Componentes De Um Espectrometro De Massas	3
FIGURA 2. Estruturas Básicas De A) Triacilglicerídeo, B) Fosfolipídeo E C) Esteróide. .4	
FIGURA 3. Ionização Por MALDI	11
FIGURA 4. Mecanismo De Ionização Por ESI	12
FIGURA 5. Espectro Da Proteína A De Peso Molecular 45.000 U	13
FIGURA 6. Equipamento De ESI-MS/MS	14
FIGURA 7. Esquema Do Preparo De Amostra E Da Aquisição De Espectro De <i>MALDI-MS</i> De Um Único Embrião Ou Oócito.	23
FIGURA 8. <i>MALDI-MS</i> Em Modo Positivo Para Um Único E Intacto Embrião Ou Oócito	25
FIGURA 9. Gráficos De PCA Para Os Dados De Embriões E Oócitos	28
FIGURA 10. Espectros De <i>MALDI-MS</i> Em Modo Positivo Para Amostras Únicas De Embriões Bovinos Cultivados <i>In Vitro</i> Em Diferentes Condições	30
FIGURA 11. Gráfico De PCA 3D Utilizando Os Dados De Perfil Lipídico De Embriões Bovinos Cultivados <i>In Vitro</i> Em Diferentes Condições De Suplementação De Meio.....	31
FIGURA 12. <i>MALDI-MS/MS</i> De Embriões Individuais	32
FIGURA 13. Estruturas Dos Di E Trissacarídeos Estudados.....	40
FIGURA 14. ESI(+)-MS Fingerprints	41
FIGURA 15. Fingerprints De ESI(+)-MS (LTQ FT) De Amostras De Leite Em Pó.....	43

FIGURA 16. Espectro De Massa De ESI(+)-MS Dos Padrões De Carboidratos Com E Sem A Enzima A-Glucosidase	44
FIGURA 17. Espectro De Massa De ESI(+)-MS Dos Padrões De Carbohidratos Com E Sem A Enzima B-Galactosidase	45
FIGURA 18. Espectro De Massa De ESI(+)-MS Das Amostras De Leite Em Pó Com E Sem A Enzima A-Glucosidase	46
FIGURA 19. Espectro De Massa De ESI(+)-MS Das Amostras De Leite Em Pó Com E Sem A Enzima B-Galactosidase	48
FIGURA 20. Espectro De Massa De ESI(+)-MS Das Amostras De Leite Em Pó Na Faixa De M/Z 500 – 550	48
FIGURA 21. Espectro De MALDI-QTOF(+) De A) Leite Em Pó Sem Adulteração, B) Leite Em Pó Com Nível Médio De Adulteração E C) Leite Em Pó Com Nível Alto De Adulteração	55
FIGURA 22. PCA Das Amostras De Leite Em Pó (N=14) Obtido A Partir Dos Dados De MALDI-QTOF(+)-MS	57

CAPÍTULO 1:

INTRODUÇÃO

1. CAPÍTULO 1

1.1. Produção Animal

A termo produção animal não é bem definido entre os integrantes desta área. De uma maneira mais abrangente ela poderia ser definida como a área que compreende todas as etapas de obtenção de um produto de origem animal.

O agronegócio brasileiro desempenha um papel muito importante na economia. De acordo com dados do ministério da agricultura, foi observado um crescimento de 23 % nas exportações em 2008, comparado a 2007, atingindo a marca recorde de US\$ 71,9 bilhões respondendo por 36,3 % do total das exportações.

A pecuária, inserida dentro deste contexto, apresenta grande contribuição no agronegócio brasileiro com forte tendência de crescimento para os próximos anos, havendo uma expressiva mudança do país no cenário mundial. Projeções do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) apontam que em 2018/2019, as exportações de carne bovina, de frango e suína representarão respectivamente, 60,6%, 89,7% e 21% do comércio mundial de carne. Estes 3 tipos de carne juntas passarão de 24,6 milhões de toneladas em 2008, para 37,2 milhões em 2018, dos quais metade deste valor deverá ser absorvido pelo mercado interno.

Pode-se observar que o termo em si é amplamente abrangente, o que possibilita os mais diversos tipos de estudo e intervenções nesta área.

1.2. MS Aplicada a Biotecnologia

A espectrometria de massas é uma ferramenta analítica que permite identificar, quantificar e elucidar as propriedades estruturais de moléculas e atualmente é indispensável em diferentes áreas, como química, biologia, ciências médicas, tecnológicas e inúmeras outras.

O princípio básico da espectrometria de massas consiste em gerar íons a partir de compostos (orgânicos ou inorgânicos) por meio de um método de ionização apropriado, separá-los através de sua relação massa-carga (m/z) em um analisador de massas, e detectar quali- e/ou quantitativamente os compostos a partir da relação massa-carga dos íons

(m/z) e suas respectivas abundâncias por meio de um detector, que “conta” os íons e transforma o sinal em corrente elétrica. A magnitude do sinal elétrico em função da relação m/z é convertida por um processador de dados, que gera o espectro de massas correspondente¹ (**FIGURA 1**).

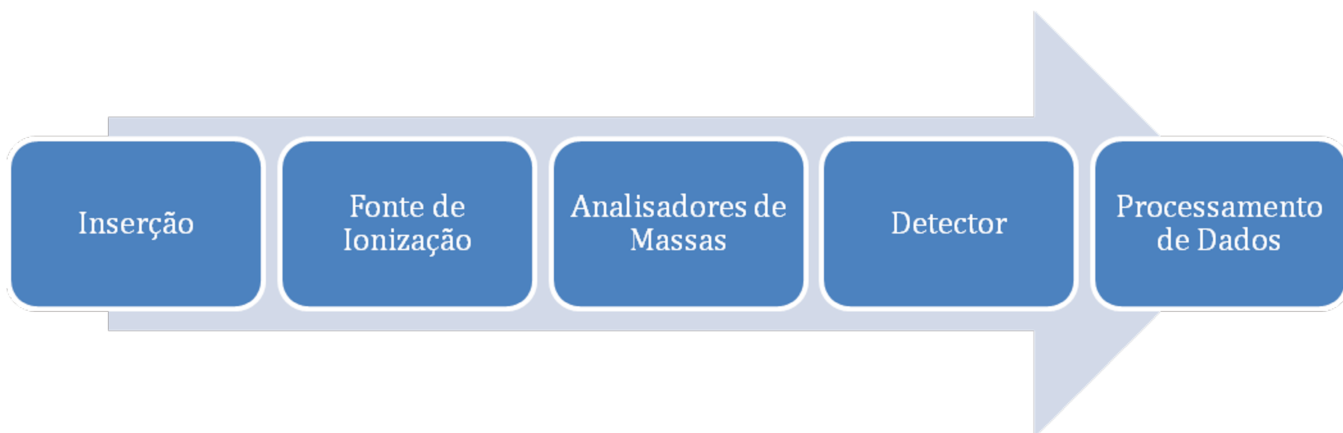


FIGURA 1. Esquema simplificado dos componentes de um espectrometro de massas

1.2.1. Lipídeos em oócitos e embriões

Os lipídeos são biomoléculas compostas e como vários compostos orgânicos podem ser caracterizados fisicamente por não serem solúveis em água. Esses compostos são quimicamente diversos e, portanto, possuem variadas funções químicas. Os triacilgliceróis (TAGs) são a principal forma de estocagem de energia em diversos organismos. Fosfolipídeos e esteróides são componentes estruturais de grande importância em membranas biológicas (**FIGURA 2**).

Outros lipídeos, embora presentes em pequena proporção, possuem papel crucial como cofatores de enzimas, carreadores de elétrons, pigmentos absorvedores de luz, âncoras hidrofóbicas de proteínas, agentes emulsificantes no trato digestivo, hormônios e mensageiros intracelulares².

¹ GROSS, J.H. Mass Spectrometry – A Textbook. Berlin: Springer, 2004.

² NELSON, D.L; COX, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th Edition, USA:W.H. Freeman, 1100 p., 2004.

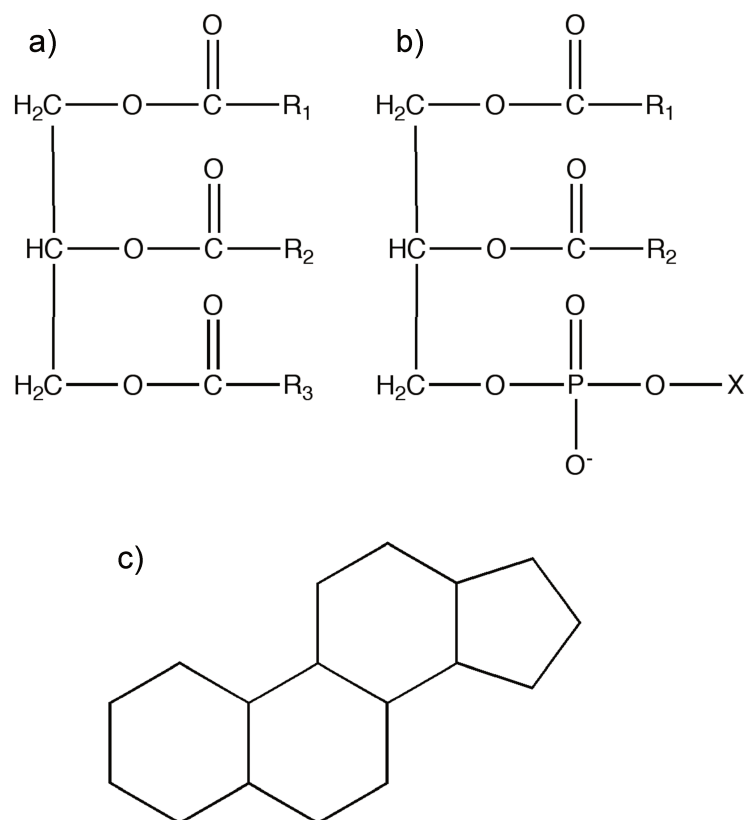


FIGURA 2. Estruturas básicas de **a)** Triacilglicerídeo, **b)** Fosfolipídeo e **c)** Esteróide.

Os TAGs são formados a partir da reação do glicerol-3-fosfato com três unidades de ácidos graxos livres. Sua função primordial é como reserva de energia. Quando TAGs são convertidos em dióxido de carbono e água por meio de reações bioquímicas (isto é, quando TAGs são metabolizados), ocorre geração de energia duas vezes superior à gerada pelo metabolismo de carboidratos e proteínas³.

Ácidos graxos livres são ácidos carboxílicos com cadeias de hidrocarbonetos contendo 4 a 36 átomos de carbono (C4 a C36). A nomenclatura simplificada desses compostos especifica o tamanho da cadeia e o número de duplas ligações, com separação pelo sinal de dois pontos. Por exemplo, o ácido palmítico trata-se de um ácido graxo saturado de 16 carbonos na cadeia, cuja abreviação adotada é 16:0. O ácido oléico, que contém uma ligação dupla e 18 carbonos é abreviado como 18:1. Os ácidos graxos mais comuns (ex. ácido

³ SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. *Organic Chemistry*. 8th Edition, New York: John Wiley & Sons Inc., 1272p., **2004**.

palmítico, mirístico, oléico e ácido linoléico) possuem número par de carbonos e cadeia linear de 12 a 24 carbonos. O número par de carbonos resulta do modo de síntese desses compostos, que envolve a condensação de unidades de acetato².

Outra função de grande importância dos lipídeos é sua participação na composição das membranas celulares. Existem três classes importantes de lipídeos de membranas: glicerolipídeos, esfingolipídeos e esteróides. Dentre esses, os glicerolipídeos são os mais abundantes e podem ser subdivididos em dois grupos: aquele contendo fósforo (fosfolipídeos) e aqueles sem fósforo e com um grupo de açúcar (glicosilglicerídeos). Fosfolipídeos são o tipo de lipídeo predominante em membranas. O fosfolipídeo mais simples é o ácido fosfatídico, o qual possui uma molécula de ácido fosfórico ligada a um diacilglicerol. Outros exemplos de fosfolipídeos são a fosfatidil colina, a fosfatidil etanolamina e o fosfatidil inositol. Os glicolipídeos são os constituintes de membrana principais de membranas celulares em plantas².

No relatório da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões do ano de 2006⁴, o Brasil foi classificado como o primeiro país em volume de produção de embriões *in vitro*. A produção de embriões *in vitro* tornou-se intensa no Brasil devido à combinação de vários fatores, incluindo o volume do rebanho, a preponderância de raças zebuínas e condições do mercado no país⁵. Entretanto, a qualidade e a sobrevivência dos embriões produzidos *in vitro* são inferiores à dos embriões gerados *in vivo*⁶. As condições de cultivo embrionário *in vitro* interferem na taxa de clivagem, na ativação do genoma embrionário, na compactação embrionária, na diferenciação e na viabilidade fetal^{7,8}.

Estudos em gametas e embriões de mamíferos indicaram que a composição de ácidos graxos afeta a maturação oocitária, a fertilidade e o desenvolvimento embrionário *in vitro*⁹. Glicose marcada com [U-14C] foi adicionada ao meio de cultivo de embriões murinos sua incorporação em diferentes classes de lipídeos foi avaliada. A classe dos lipídeos mais

⁴ THIBIER M. *IETS Embryo Transfer Newsletter*. **2006**, 24:12-18.

⁵ PONTES, J.H.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V. *et al. Theriogenology*. **2009**, 71:690-697.

⁶ BONI, R.; TOSTI, E.; ROVIELLO, S. *et al. Biology of Reproduction*, **1999**, 61:1050-1055.

⁷ RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S. *et al. Biology of Reproduction*, **2003**, 68:236-243.

⁸ WRENZYCKI, C.; HERRMAN, D.; LUCAS-HAHN, A. *et al. Reproduction, Fertility and Development*. **2005**, 17:23-35, 2005.

⁹ KHANDOKER, M.; TSUJII, H. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences*. **1999**, 12:169-173.

frequentemente marcada foi a dos TAGs. Além disso, os resultados sugeriram que os embriões murinos utilizam lipídeos presentes no meio de cultivo para incorporação e para produção de energia via oxidação^{10,11}.

Os estudos sobre a composição de ácidos graxos em oócitos e embriões de mamíferos utilizam na maioria das vezes a técnica de cromatografia gasosa (GC), com necessidade de trans-esterificação e metilação da amostra^{12,13,14,9,15}. A espectrometria de massas de razão isotópica (GC-C-IRMS) foi utilizada para avaliar o consumo de ácidos graxos em embriões humanos¹⁶.

Observou-se que durante o desenvolvimento, embriões consumiram os ácidos linolêicos e palmíticos marcados com ¹³C presentes nos meios de cultivo. Além disso, embriões que se desenvolveram a partir do estágio de quatro células apresentaram maior concentração dos ácidos graxos linolêico e oléico e menor concentração de ácidos graxos saturados¹⁷.

Estudos utilizando embriões de ratos demonstraram que o desenvolvimento até a fase de blastocisto é favorecido pela adição de ácidos graxos insaturados (oléico, linolêico e araquidônico), mas não houve efeito positivo do ácido graxo saturado palmítico no meio de cultivo⁹. Para o estudo de TAGs, colesterol total, fosfolipídeos e ácidos graxos não-esterificados em oócitos e embriões bovinos, utilizou-se também kits para análise de lipídeos por espectrofotometria¹². Os resultados demonstraram que os lipídeos estão disponíveis como fontes de energia durante a maturação oocitária e lipídeos do soro fetal bovino (SFB) são incorporados durante o processo de maturação in vitro. Foram observadas alterações dos níveis de fosfolipídios e ácidos graxos em oócitos imaturos criopreservados.

¹⁰ FLYNN, T.J.; HILLMAN, N. *Biology of Reproduction*. **1978**, 19:922-926.

¹¹ FLYNN, T.J.; HILLMAN, N. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*. **1980**, 56:157-168.

¹² KIM, J.Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M. *et al. Reproduction*. **2001**, 122:131-138.

¹³ Khandoker MAMY, Tsujii H, Karasawa D. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences*. **1997**, 10:523-527.

¹⁴ Khandoker MAMY, Tsujii H, Karasawa D. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences*. **1998**, 11:60-64.

¹⁵ MCEVOY, T.G.; COULL, G.D.; BROADBENT, P.J. *et al. Journal of Reproduction & Fertility*. **2000**, 118:163-170.

¹⁶ BRENNAN, J.T. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. **1997**, 57:467-472.

¹⁷ HAGGARTY, P.; WOOD, M.; FERGUSON, E. *et al. Human Reproduction*. **2006**, 21:766-773.

Recentemente, Pereira e colaboradores^{18,19} relataram que a utilização de ácido linoléico trans-10, cis-12 conjugado como suplemento no meio de cultivo embrionário promoveu diminuição do depósito de lipídeos citoplasmáticos e melhorou a resistência dos embriões ao processo de criopreservação. O perfil de lipídeos de membranas está associado às propriedades físico-químicas da membrana celular e, portanto, a respostas ao resfriamento, congelamento e descongelamento envolvem propriedades de empacotamento de moléculas de lipídeo, fluidez de membrana, permeabilidade e comportamento em fase térmica.

A análise de fosfolipídeos em membranas celulares, inclusive de células-tronco foi recentemente descrita utilizando a técnica de MALDI-TOF MS em vários modelos biológicos^{20,21,22,23,24}. Além disso, o perfil químico ou fingerprint de fosfolipídeos foi utilizado para diferenciar espermatozóides de felídeos e ruminantes²¹. Como observado acima, para oócitos e embriões existe somente relato da composição de ácidos graxos livres, utilizando principalmente a técnica de GC. Embora a caracterização de fosfolipídeos utilizando a técnica de MALDI-TOF MS esteja se difundindo em vários modelos biológicos, esta ainda não foi aplicada em oócitos e embriões.

1.3. A Espectrometria de Massas e a Ciência de Alimentos

Avanços recentes em instrumentação e o desenvolvimento de novas e revolucionárias técnicas revitalizaram acentuadamente a Espectrometria de Massas (MS), que se constitui hoje em uma das mais abrangentes técnicas instrumentais em ciência, com amplas aplicações em diversos campos da química, biologia, ciências médicas e tecnológicas. Com seus novos horizontes, e amplas perspectivas de desenvolvimento, a MS vem se consolidando como uma ferramenta extremamente versátil e essencial em ciência. Desde

18 PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I. *et al.* *Animal Reproduction Science*. **2007**, 98:293-301.

19 PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J. *et al.* *Animal Reproduction Science*. **2008**, 106:322-332.

20 FUCHS, B.; NIMPTSCH, A.; SUSS, R. *et al.* *Journal of AOAC International*. **2008**, 9:1227-1236.

21 FUCHS, B.; SCHILLER, J.; SUSS, R. *et al.* *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2008**, 392:849-860.

22 FUCHS, B.; JAKOP, U.; GÖRITZ, F. *et al.* *Theriogenology*. **2009**, 71:568-575.

23 SCHILLER, J.; SUSS, R.; FUCHS, B. *et al.* *Frontiers in Bioscience*. **2007**, 1:2568-2579.

24 SCHILLER, J.; SUSS, R.; ARNHOLD, J. *et al.* *Progress in Lipid Research*. **2004**, 43:449-488.

pesquisas aplicadas até as mais fundamentais, a MS tem exercido papel de grande destaque, com crescente atuação na área de ciência de alimentos^{25,26}.

A ciência de alimentos ocupa um lugar de destaque na era moderna. A preocupação em relação aos alimentos deixou de ser apenas a prevenção de sua deterioração e extensão de sua vida de prateleira, mas se concentra hoje nos macronutrientes e micronutrientes que os compõem (água, carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e sais minerais)²⁷. As evidências crescentes que demonstram uma estreita relação entre a dieta e as doenças humanas têm levado a grandes investimentos em países desenvolvidos e intensas atividades de pesquisas em alimentos, tanto governamentais como particulares. As propriedades médico-preventivas, além do valor nutricional dos constituintes naturais dos alimentos, de um lado, e os efeitos tóxicos de constituintes e contaminantes do outro, tornaram prioritário o conhecimento da composição química e microbiológica dos alimentos através do emprego das mais diferentes técnicas instrumentais²⁶. Os benefícios decorrentes da diminuição do sofrimento humano e dos gastos com medicamentos e atendimento hospitalar, aliados à maior produtividade que resulta em uma população mais sadia, retribuem os investimentos nas pesquisas visando proporcionar uma dieta adequada e saudável para a população, esforços que requerem o constante monitoramento de componentes funcionais nos alimentos^{28,29}.

Um país que deseja entrar na modernidade e garantir seu lugar em um mercado internacional de alimentos cada vez mais competitivo deve ter grupos de pesquisa e desenvolvimento capazes de realizar análises essenciais para garantir a qualidade e a segurança dos alimentos, avaliar e desenvolver métodos analíticos adequados para as necessidades do país e a natureza dos seus produtos e de gerar um banco de dados sobre os alimentos comercializados ou potencialmente comercializáveis. Esta infraestrutura garante à população alimentos nutritivos, seguros e de alta qualidade, além de evitar a rejeição dos

²⁵ CARERI, M.; BIANCHI, F.; CORRADINI, C. *Journal of Chromatography A*. **2002**, 970:3-64.

²⁶ FERNANDES, V.C.; DOMINGUES, V.F.; MATEUS, N. *et al. Journal of Chromatographic Science*. **2011**, 49:715:730.

²⁷ MERCADANTE, A.Z. *Ciência de Alimentos - Avanços e Perspectivas. Volume II*. cap. 19, Campinas: UNICAMP, p. 65-67, **2001**.

²⁸ CECCHI, H.M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. Campinas:UNICAMP, 212 p., **1999**.

²⁹ CARBONE, V.; MONTORO, P.; TOMMASI, N. *et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2004**, 34:295-304.

produtos exportados. A análise química é também o primeiro passo para utilização eficiente das riquezas naturais^{30,31}.

Dados sobre a composição de alimentos têm como usuários indústrias, institutos governamentais, instituição de ensino e pesquisa, hospitais, serviços de informação à comunidade, sendo necessárias as atividades profissionais de milhares de pessoas envolvendo cientistas, engenheiros, tecnólogos, nutricionistas, médicos, farmacêuticos, economistas, professores e profissionais de marketing³⁰.

No Brasil existe escassez de dados em pesquisa de alimentos. A população está, portanto, exposta ao consumo de alguns alimentos de qualidade não controlada, inclusive quanto ao valor nutricional e presença de contaminantes tóxicos. Portanto, o uso na análise química de alimentos de técnicas instrumentais rápidas com alta precisão, exatidão e versatilidade torna-se indispensável em ciência de alimentos. As técnicas de MS ocuparam um papel de destaque na última década, por exatamente preencherem tais requisitos³⁰. Assim aliar a técnica de MS a ciência de alimentos torna-se uma tarefa de suma importância tecnológica e econômica para o Brasil.

1.3.1. Utilização da Espectrometria de Massas para Determinação de Substâncias em Alimentos

A importância da MS no futuro das pesquisas de ciência e tecnologia de alimentos é inquestionável. Indubitavelmente, os avanços significativos nas técnicas de ionização “*Electrospray*” (ESI) e “*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*” (MALDI) e o aumento da sensibilidade dos equipamentos contribuíram muito para a aplicação da MS em análise de biomoléculas encontradas em alimentos, sendo esta aplicação a principal chave deste desenvolvimento nos últimos anos³². Assim, a MS e suas técnicas relacionadas vêm demonstrando várias formas de aplicação em ciência de alimentos. Este desenvolvimento passa pela química e toxicologia de alimentos e agora também tem alcançado a microbiologia de alimentos. As melhorias na instrumentação, avanços em técnicas de separação e no

³⁰ RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; PASTORE, G.M. *Ciência de Alimentos: Avanços e Perspectivas na América Latina*. Campinas: Fundação Cargil, **1997**.

³¹ GODOY, H.T. II Seminário sobre Alimentos Enriquecidos. ITAL, p. 43, **1997**.

³² STOKES, P.; WEBB, K. *Journal of Chromatography A*. **1999**, 864:59-67.

processamento de dados contribuíram para determinar também esta grande expansão no papel da MS em ciência de alimentos. O acoplamento do cromatógrafo líquido ao MS (LC/MS) conduziu ao desenvolvimento de novas aplicações, estendendo as possibilidades e a automatização de vários procedimentos^{33,34}. A análise de extratos complexos extraídos dos alimentos exigem técnicas analíticas altamente seletivas prontas para caracterizar e determinar compostos existentes em sua composição bem como também para elucidação de mecanismos de reações. A complexidade das amostras biológicas, em especial dos alimentos, dificultam a análise por MS, devido à supressão de íons e possíveis interferências. Nestes casos necessita-se de um processo de extração, bem como também de uma separação cromatográfica eficiente permitindo o mínimo de interferentes possível, gerando assim, menores problemas no equipamento. Já na área de tecnologia de alimentos a aplicação da MS é bem mais recente. Avaliações de processos, da qualidade, e do controle tecnológico visando a autenticidade dos alimentos começam a ser considerados e elucidados através do uso da MS³⁴. A ampliação do campo de pesquisa em MS para análise de substâncias em alimentos é um desafio, mas também é a certificação de qualidade tecnológica em produtos de origem nacional, auxiliando na melhoria dos produtos agroindustriais brasileiros.

1.3.2. Técnicas Modernas de Espectrometria de Massas para Determinação de Biomoléculas em Alimentos

Embora a espectrometria de massas tenha sido consolidada há vários anos pelas técnicas de ionização por elétrons e ionização química, elas eram limitadas quanto a aplicação em biomoléculas em alimentos.

No início dos anos 90, duas técnicas de ionização foram desenvolvidas o que ampliou a gama de aplicações de MS. Estas duas técnicas foram chamadas MALDI e ESI³⁵. Através de conceitos simples, mas revolucionários, moléculas termolábeis, íons em solução,

³³ COLE, R.B., Editor. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*. New York: Wiley, 577 p., **1997**.

³⁴ NIESSEN, W.M.A. In: NIESSEN, W.M.A., Editor. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*. 2ed. *Chromatographic Science Series Vol. 79*. New York: Marcel Dekker, 648 p., **1999**.

³⁵ STEWART, I.I. *Spectrochimica Acta Part B*. **1999**, 54:1649-1695.

complexos organo-metálicos, polímeros e moléculas de elevadas massas moleculares (até 1Mu ou mais), enfim espécies antes não adequadas às técnicas clássicas de ionização em MS, podem hoje ser analisadas com facilidade por MALDI-MS e/ou por ESI-MS. Massas moleculares de proteínas e outras macromoléculas têm sido determinadas com alta precisão, além de inúmeras novas aplicações para moléculas menores de diversas classes. Estas novas técnicas de ionização tem assim projetado a MS também na área de alimentos de forma nunca antes possível³⁶.

1.3.2.1. MALDI-MS

Em uma análise por MALDI, prepara-se uma solução da amostra e matriz (normalmente um ácido orgânico). O solvente é então evaporado resultando em uma mistura sólido-sólido que é depositada sobre uma superfície chamada de anteparo de amostra. Esta solução é então irradiada com LASER (**FIGURA 3**), ocorrendo aquecimento localizado e seletivo. A matriz por sua vez absorve fortemente a radiação do laser e por consequência ocorre a evaporação rápida da matriz e da molécula ionizada (ex: MH^+), que é então liberada para a fase gasosa, e acelerada pelo potencial aplicado à sonda em direção ao analisador de massas³⁷.

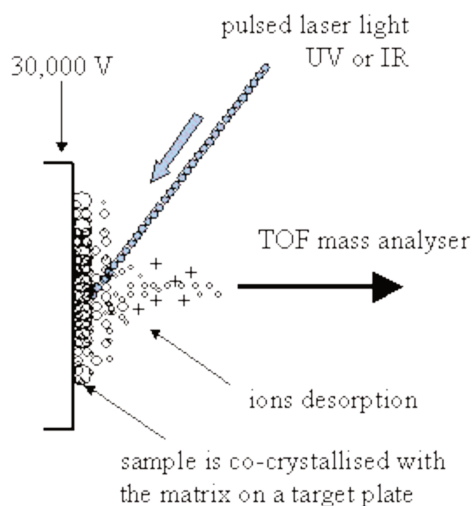


FIGURA 3. Ionização por MALDI

³⁶ LOO, J.A. *Mass Spectrometry Reviews*. **1997**, 16:1-23.

³⁷ KUSSMANN, M.; NORDHOFF, E.; RAHBEK-NIELSEN, H. *et al. Journal of Mass Spectrometry*. **1997**, 32:593–601.

1.3.2.2. ESI-MS

A **FIGURA 4** descreve o mecanismo de ionização com a transferência dos íons positivos das gotas do spray para a fase gasosa. O processo de ionização ESI é inovador, pois íons são formados em solução, e não mais na fase gasosa, eliminando-se então os problemas de volatilização de substâncias termolábeis e macromoléculas. A solução pode conter íons resultantes da dissolução de sais, ou íons formados por protonação ou desprotonação (ou complexação com cátions) de substâncias ácidas ou básicas com ampla faixa de pesos moleculares como proteínas. Em ESI no modo positivo, a solução é então submetida a um spray eletrolítico que oxida os íons negativos, deixando as gotas produzidas no spray com excesso de íons positivos, ou alternativamente através da redução dos íons positivos, com excesso de íons negativos (ESI negativo). Através de contracorrente de nitrogênio aquecido, evapora-se o solvente e reduz-se o volume das gotas. Ocorre então repulsão crescente entre íons de mesma carga, com possível subdivisão das gotas, e estes íons são eventualmente transferidos para a fase gasosa em um processo brando e eficaz. A partir desta etapa, operam os processos normais de análise, seleção e detecção de íons na fase gasosa por MS³⁵.

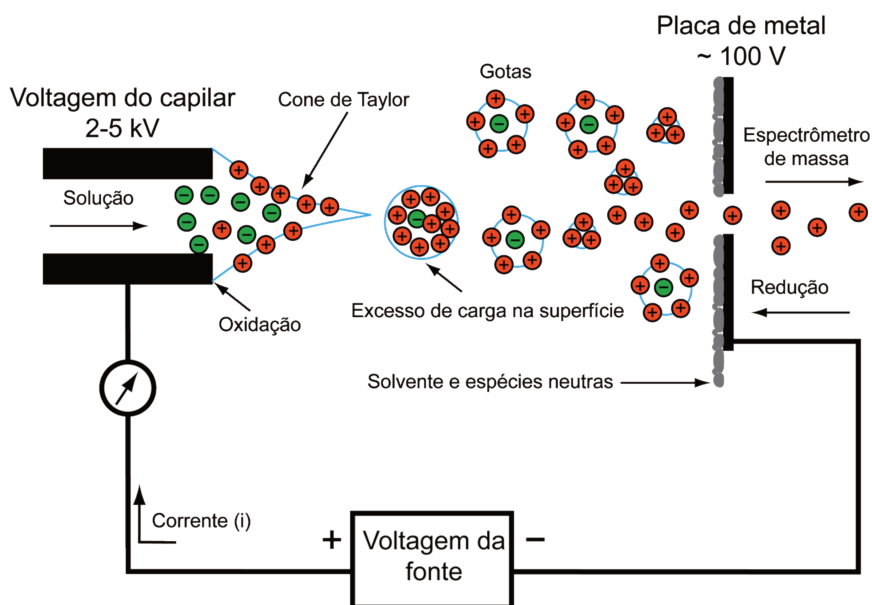


FIGURA 4. Mecanismo de Ionização por ESI

A **FIGURA 5** mostra espectros de ESI de uma macromolécula (proteína A de peso molecular 45.000 u). Em solução ácida ocorre a multiprotonação da macromolécula, com formação de íons multicarregados MH_n^{+n} com diferentes quantidades de cargas positivas. Obtém-se então o espectro na forma de envelope de íons centrado em torno da razão massa sobre carga (m/z) 1000. Outra grande vantagem da técnica ESI é que podem ser utilizados analisadores convencionais de m/z para determinações de altas massas. Portanto, os íons deste envelope são todos formados por moléculas da mesma proteína, mas com cargas variadas. Medindo-se o espaçamento entre os picos do envelope formado de diferentes razões m/z , calcula-se então a massa da proteína. Alternativamente, pode-se obter o espectro de ESI-MS de íons negativos através de desprotonação em meio básico^{35,36}.

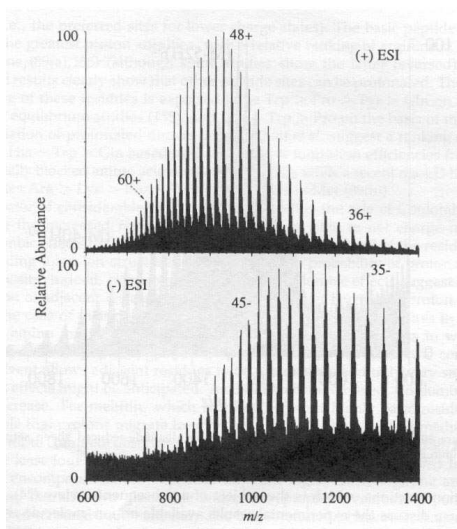


FIGURA 5. Espectro da proteína A de peso molecular 45.000 u

A ESI é também revolucionária ao permitir a MS o acesso e o estudo da química e estrutura de uma ampla variedade de íons antes inacessíveis por MS clássica com ionização por impacto de elétrons ou química (EI e CI, respectivamente). Como exemplos podemos citar aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos e compostos bioativos, em geral, e diversas substâncias termolábeis, ionizadas em solução nas suas formas protonada, desprotonada ou complexada com cátions metálicos. A ausência de dissociação devido à formação de íons "frios" em solução é vantajosa para a análise de massas moleculares, mas dificulta a análise estrutural detalhada. A combinação de ESI com técnicas de MS/MS (**FIGURA 6**) se mostra

então ideal e completa, pois, por exemplo, moléculas mono ou multiprotonadas como é o caso das proteínas e peptídeos, podendo ser selecionadas pelo primeiro analisador de massas (Q1) de um equipamento triploquadrupolar, com dissociação induzida por colisão (CID) em Q2, e os fragmentos analisados então por Q3, possibilitando o sequenciamento de peptídeos através da espectrometria de massas^{35,36}.

Porém pode ocorrer supressão iônica em ESI para análise de misturas, sendo muitas vezes necessário aliar a técnica de cromatografia líquida para eliminar tal efeito. Utilizando normalmente gradientes diferentes de soluções acetronitrila/água em conjunto com colunas C18, entre outras, diminui-se o efeito de supressão iônica, pelo alto poder de separação que a técnica fornece^{35,38}.

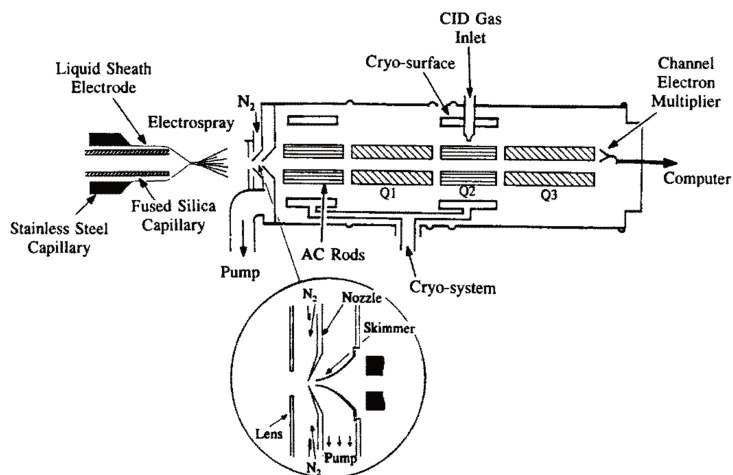


FIGURA 6. Equipamento de ESI-MS/MS

³⁸ KARAS, M.; HILLENKAMP, F. *Analytical Chemistry*. **1988**, 60:2299-2301.

CAPÍTULO 2:

OBJETIVOS

2. CAPÍTULO 2

2.1. Objetivos

Esta tese está dividida em 3 partes com objetivos distintos, que serão apresentados nos **CAPÍTULOS 3, 4 e 5**.

O objetivo do **CAPÍTULO 3** é o desenvolvimento de método analítico para identificar a qualidade e a viabilidade de embriões e oócitos bovinos através de seus perfis lipídicos.

O objetivo do **CAPÍTULO 4** é o desenvolvimento de método analítico para a detecção de maltodextrina em leite em pó.

O objetivo do **CAPÍTULO 5** é o desenvolvimento de método analítico para a detecção de gorduras e óleos vegetais em leite em pó.

CAPÍTULO 3:
VIABILIDADE DE
EMBRIÕES E OÓCITOS
POR ESPECTROMETRIA
DE MASSAS

3. CAPÍTULO 3

3.1. Introdução

A dupla camada molecular de lipídios polares é um maravilhoso elemento arquitetônico da engenharia biológica. Funções específicas e variações de fosfolípidios diversos (*PL*), os lipídios mais abundantes nas membranas de células eucarióticas são, no entanto, ainda mal compreendida³⁹. Uma diversidade de *PL* em um equilíbrio finamente balanceado é usada pelas células para construir membranas estáveis e funcionais, e a composição de *PL* determina a maioria das propriedades físico-químicas das membranas tais como a fluidez, permeabilidade e comportamento térmico⁴⁰.

O conhecimento da função dos lipídios no interior das células tem se beneficiado do desenvolvimento de técnicas analíticas cada vez mais sensíveis e seletivas, particularmente aqueles baseados em espectrometria de massa^{41,42}. Entre essas técnicas, a matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry – *MALDI-MS*³⁸ tem sido muito bem sucedida em estudos das composições de lipídios e outras moléculas biológicas de importância. O *MALDI-MS* tem permitido a análise direta de amostras complexas e não divididas, tais como o estudo do perfil de peptídeos de uma única célula⁴³. No estudo de lipídeos (“*lipidomics*”), o *MALDI-MS* tem proporcionado a rápida e simples aquisição de espectros de massa com perfil lipídico de células, tecidos e fluidos corporais⁴⁴. O fingerprinting dos lipídios por *MALDI-MS* pode, por exemplo, ajudar em estudos que visem compreender o efeito da composição lipídica da membrana sobre o comportamento da membrana celular após mudanças de temperatura. Este conhecimento é essencial para os estudos de criopreservação de uma variedade de células, incluindo ovócitos de pacientes submetidos a tratamento de câncer⁴⁵, gametas e embriões para a conservação de recursos genéticos animais, ou para facilitar o

³⁹ VAN MEER, M.; VOELKER, G.D.R.; FEIGENSON, G.W. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2008**, 9:112-124.

⁴⁰ EDIDIN, M. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2003**, 4:414-418.

⁴¹ ROBERTS, L.D.; MCCOMBIE, G.; TITMAN, C.M. *et al. Journal of Chromatography B*. **2008**, 871:174-181.

⁴² EJSING, C.S.; SAMPAIO, J.L.; SURENDRANATH, V *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2009**, 106:2136-2141.

⁴³ LI, L.; GARDEN, R.W.; SWEEDLER, J.V. *Trends in Biotechnology*. **2000**, 18:151-160.

⁴⁴ FUCHS, B.; SCHILLER, J. *Subcellular Biochemistry*. **2008**, 49:541-565.

⁴⁵ TAO, T.; DEL VALLE, A. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. **2008**, 25:287-296.

trânsito internacional de material genético⁴⁶. O acúmulo de lipídios no citoplasma de células de embriões de fertilização *in vitro* (FIV) foi identificado como importante fator na diminuição da taxa de pós-implantação e desenvolvimento de embriões^{47,48,49}, o que sugere que o processo de cultura do embrião provoca alterações de metabolismo lipídico que, por sua vez, afeta as propriedades e a estabilidade das membranas celulares⁵⁰. Em laboratórios de reprodução assistida para os seres humanos, os embriões e os oócitos são rotineiramente criopreservados, mas há ainda considerável necessidade de pesquisa com o objetivo de melhorar os conhecimentos sobre o papel dos lipídios e a eficiência dos protocolos usados^{51,52,53}. Até à presente data, alterações na composição do perfil de *PL* de embriões mamíferos e oócitos são bem compreendidos. A cromatografia gasosa (GC) foi aplicada em estudos da composição de triacilglicerol (*TAG*) em oócitos e embriões humanos e bovinos^{54,12},¹⁷, mas esta abordagem requer a transformação química via saponificação e derivatização, fornecendo perfis de resíduo de ácidos graxos livre e não a identificação dos *TAG* ou *PL*. A principal desvantagem para análises por GC é a necessidade de um grande grupo de amostras (mais de 10 oócitos ou embriões para cada análise de lipídios), especialmente quando embriões humanos ou oócitos são estudados¹⁷. O *MALDI-MS* oferece, no entanto, a vantagem de detecção de lipídios intactos e, devido à sua alta resolução espacial, permite o estudo de espécies de dimensões microscópicas (100-200 µm) como oócitos e embriões de mamíferos. Neste capítulo mostramos que a análise direta por *MALDI-MS* pode contribuir significativamente para os estudos do perfil de lipídios de embriões e oócitos. Além do reconhecimento de espécies, o método descrito neste documento também é mostrado para

⁴⁶ PEREIRA, R.M.; MARQUES, C.C. *Cell Tissue Bank*. **2008**, 9:267-277.

⁴⁷ ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T. *et al. Molecular Reproduction and Development*. **2002**, 61:57-66.

⁴⁸ BARCELO-FIMBRES, M.; SEIDEL, G.E. *Molecular Reproduction and Development*. **2007**, 74:1406-1418.

⁴⁹ GEORGE, F.; DANIAUX, C.; GENICOT, G.; *et al. Theriogenology*. **2008**, 69:612-623.

⁵⁰ DINNYES, A.; NEDAMBALE, T.L. *Reproduction, Fertility and Development*. **2009**, 21:45-59.

⁵¹ DESAI, N.; BLACKMON, H.; SZEPTYCKI, J. *et al. Reproductive BioMedicine Online*. **2007**, 14:208-213.

⁵² COBO, A.; KUWAYAMA, M.; Perez, S. *et al. Fertility and Sterility*. **2008**, 89:1657-1664.

⁵³ HIRAOKA, K.; FUCHIWAKI, M.; HORIUCHI, T.; *et al. Reproductive BioMedicine Online*. **2008**, 17:689-694.

⁵⁴ MATORRAS, R.; RUIZ, J.I.; MENDOZA, R. *et al. Human Reproduction*. **1998**, 13:2227-2230.

ser sensível e, portanto, para revelar mudanças importantes no perfil de lipídios durante o desenvolvimento de embriões bovinos de cultura *in vitro* em condições de pré-implantação.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Reagentes

Os reagentes químicos e os meios de cultura para o uso em oócitos bovinos e ovinos foram comprados da Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). O meio de cultura utilizado em oócitos humanos (*modified Human Tubal Fluid* – HTF) foi adquirido de Irvine Scientific (Santa Ana, Califórnia, EUA). O tampão salino fosfato (PBS) foi fornecido pela Nutricell (Campinas, São Paulo, Brasil).

Metanol (ACS/HPLC *grade*) foi comprado de Burdick & Jackson (Muskegon, Michigan, EUA) e o ácido 2,5-di-hidróxido-benzóico (DHB) foi adquirido de ICN Biomedicals (Aurora, Ohio, EUA). Água ultrapura foi obtida de um sistema Direct-Q da Millipore (Bedford, Massachusetts, EUA).

3.2.2. Coleta e armazenamento de amostra para análise

A manipulação e o uso de amostras animais (bovino, ovino, de peixe e formiga) foram aprovadas pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), que segue os Princípios de Ética de Pesquisa Animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) sob o protocolo de número 1752-1. O uso de oócitos humanos não fertilizados foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob o protocolo de número 0411/07.

Oócitos imaturos de bovinos (*Bos taurus*) e ovelhas (*Ovis aries*) foram obtidos da aspiração folicular ovariana *post mortem* de ovários de vacas e ovelhas abatidas em frigoríficos comerciais. Os ovários foram transportados para o laboratório em solução salina 0,9% (m/v) a 25-30°C, e os folículos foram aspirados usando uma agulha de 0,838 mm de lúmen acoplada em uma seringa de 20 mL. Complexos do *cumulus* do oócito com pelo menos 3 camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo foram retiradas do *cumulus* através da cuidadosa pipetagem de hialuridase 0,5%.

Embriões *in vivo* foram obtidos de vacas superovuladas mantidas a pasto (*Brachiaria decumbens*) sedidos pela empresa Invitrogen situada no município de Mogi-Mirim, São Paulo.

As emergências das ondas foliculares dos animais foram sincronizadas com uma injeção intramuscular (i.m.) de 2,0 mg de benzoato de estradiol (Estrogin, Farmavet, São Paulo, Brasil) e a inserção de um dispositivo intravaginal liberador de fármaco (*CIDR*), contendo 1,9 g de progesterona (Pfizer, Hamilton, Nova Zelândia) no dia 0. No dia 4,5 o tratamento superestimulatório foi iniciado (hormônio estimulador folicular – *FSH*; Folltropin-V, Bioniche Animal Health, Belleville, Canada) e dado em doses decrescentes de 28, 21, 14 e 7 mg de *FSH* duas vezes ao dia, por um período de 4 dias, totalizando 70 mg. No momento da quinta e sexta injeção de *FSH*, 25 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse, Pfizer, Paulínia, São Paulo, Brasil) foi injetada intramuscularmente. O *CIDR* foi retirado no momento da sétima dose de *FSH*. A ovulação foi induzida com uma injeção intramuscular de 0,05 mg de hormônio liberador de gonadotrofina (*GnRH*; Geltran Plus, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina) 12 horas após a aplicação da última dose de *FSH*. Todas as vacas foram inseminadas artificialmente (IA) com sêmen congelado/descongelado do mesmo touro em 12 e 24 horas após a injeção de *GnRH*. Sete dias após a primeira IA os embriões foram recuperados utilizando uma técnica de lavagem uterina não cirúrgica⁵⁵.

Para a produção de embriões bovinos *in vitro*, os oócitos obtidos pela aspiração folicular ovariana *post mortem* foram fertilizados e cultivados, como descrito em trabalhos anteriores⁵⁶, porém com alterações na suplementação do meio e na atmosfera de incubação. Após a fertilização *in vitro* (FIV), os embriões foram cultivados em 4 diferentes condições: 5% de O₂ contendo *Bovine Serum Albumin* (BSA, albumina sérica bovina) [grupo 1], 20% de O₂ e BSA [grupo 2], 20% de O₂ contendo *Fetal Calf Serum* (FCS, soro fetal bovino) [grupo 3] e 5% de O₂ contendo FCS [grupo 4].

Óocitos humanos não fertilizados, provenientes de mulheres submetidas a recuperação transvaginal de oócitos, foram disponibilizados pelo Serviço de Reprodução Humana da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Essas amostras seriam normalmente descartadas.

Ovas de Tainhas (*Mugil spp.*) foram coletadas de peixes frescos obtidos no Mercado de Peixe da Cidade em Santos, e transportados para o laboratório a 4°C.

⁵⁵ NETO, A.S.C.; SANCHES, B.V.; BINELLI, M. *et al.* *Theriogenology*. **2005**, 63:1249-1255.

⁵⁶ FERREIRA, C.R.; SOUZA, G.H.M.F.; RICCIO, M.F. *et al.* *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2009**, 23:1313-1320.

Ovos de formiga (*Solenopsis spp.*) foram coletados no campo após identificação da espécie e imediatamente transportadas para o laboratório.

Oócitos e embriões foram armazenados em microtubos contendo 100 µL de solução aquosa de metanol 50% à -80°C até serem analisadas. O preparo da amostra consistiu em colocar cada oócito, embrião ou ovo em um *spot* da placa de *MALDI* em um microscópio. As amostras foram deixadas para secar em temperatura ambiente, e sua localização foi anotada para que fosse possível focalizar o laser na posição correta durante as análises. Imediatamente antes da análise 1 µL da matriz DHB preparada em metanol foi colocada sobre cada amostra e deixada secar em temperatura ambiente.

3.2.3. Análise de lipídios por *MALDI-MS*

Os espectros de *MALDI-MS* e *MALDI-MS/MS* foram adquiridos em modo *reflectron* positivo em um espectrômetro de massas Synapt G1 (Waters, Manchester, UK) equipado com LASER (NdYag) de estado sólido de 200 Hz na faixa de massa entre m/z 700 e 950. A matrix utilizada foi o ácido 2,5-dihidróxibenzóico (DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid), preparado em uma mistura acetonitrila e água (50%) com adição de 0.01% de ácido trifluoroacético (TFA, trifluoroacetic acid) obtendo uma concentração final de 20mg/mL.

As principais condições de operação utilizadas foram 10 V na placa de amostra, e a irradiação do laser consistiu em diversos *shots* em um intervalo de 60 – 90 segundos na região da placa onde a amostra foi colocada, até que os sinais de interesse aparecessem e desaparecessem devido ao consumo da amostra microscópica (**FIGURA 7. b**). Os dados de *MALDI-MS/MS* foram adquiridos manualmente através do aumento da energia de colisão até ser observada extensiva dissociação do íon precursor. O gás de colisão utilizado foi o argônio. Os espectros foram processados utilizando-se o software MassLynx 4.0 (Waters, Manchester, UK). Para cada espectro, após a exclusão dos sinais do padrão isotópico de cada íon, os 50 íons mais intensos foram considerados como o ponto de partida para a busca e atribuição dos m/z correspondentes aos lipídios. Após a atribuição, somente os m/z claramente diferenciáveis do ruído nos espectros foram incluídos na análise de componentes principais (PCA), a qual foi realizada no software Pirouette 3.11 (Infometrix Inc., Woodinville, Washington, EUA).

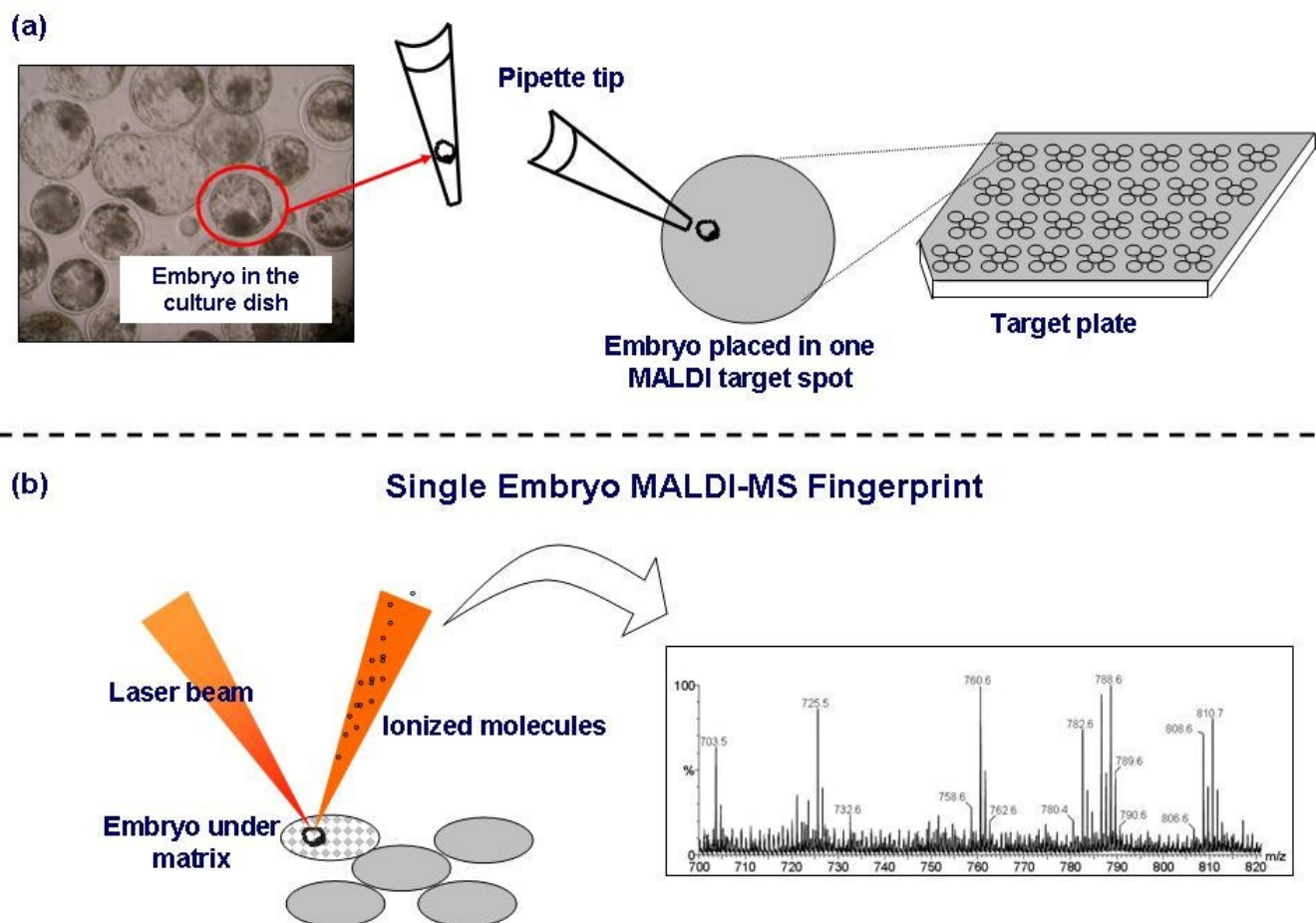


FIGURA 7. Esquema do preparo de amostra e da aquisição de espectro de *MALDI-MS* de um único embrião ou oócito. **(a)** Amostras individuais são retiradas de uma placa de cultura, lavadas e transferidas para um *spot* da placa de amostra de *MALDI-MS*, secas e recobertas pela solução de matriz. **(b)** O laser é focalizado sobre a amostra e os dados de *MALDI-MS* são adquiridos. As placas de *MALDI* geralmente permitem o preparo simultâneo de 96 ou 384 amostras em *spots* individuais, e um espectro completo requer alguns milissegundos de acúmulo de dados

3.3. Resultados e Discussão

Como casos de prova de princípio, nós investigamos a potencialidade do *fingerprinting* por *MALDI-MS* para obter perfil lipídico característico para um grupo representativo de embriões e oócitos de mamíferos e de duas espécies menos relacionadas (peixe e inseto).

Após esta etapa avaliamos a capacidade da técnica em revelar mudanças no perfil lipídico ocorridas durante o desenvolvimento embrionário e sob diferentes condições de cultura *in vitro* de bovinos como um modelo biológico.

3.3.1. *Fingerprinting* de lipídios em diferentes espécies

O preparo de amostra e a análise de *MALDI-MS* não envolve extração de lipídios ou manipulação química, o que por sua vez diminui consideravelmente o número de amostras necessárias, geralmente de alto valor ou mesmo indisponíveis, para a realização de ensaios quando comparado aos métodos tradicionais de análises de lipídios. Um embrião ou oócito intacto é coletado e colocado em um dos muitos *spots* disponíveis da placa de amostra (**FIGURA 7 a**). Então a amostra é recoberta com matriz antes da análise por *MALDI* (**FIGURA 7 a**). O LASER é focalizado na região onde se depositou a amostra e o espectro é obtido (**FIGURA 7 b**).

A **FIGURA 8** apresenta um espectro representativo de embrião ou oócito das 5 espécies estudadas neste trabalho. Os espectros foram adquiridos na faixa de m/z entre 700 e 950, onde a maioria dos PL e TAG devem ser detectados por *MALDI-MS*(+), em sua maioria como moléculas protonadas $[M + H]^+$ ou como adutos de sódio $[M + Na]^+$, ou ambas⁵⁷. Observa-se que o perfil obtido por *MALDI-MS* são bem característicos e, em alguns casos, muito distintos com íons únicos de PL, SM e TAG com diferentes abundâncias e proporções.

As espécies de fosfolipídios foram atribuídas com relação a trabalhos publicados de perfil lipídico com *MALDI-MS* (**TABELA 1**) e a nomenclatura adotada foi a abreviação da classe seguida do número de carbono e o número de ligações duplas nos resíduos dos grupos acil ligadas ao glicerol entre parêntese (como o exemplo **[SM (16:0) + H]⁺**).

O *MALDI-MS* do oócito humano é caracterizado principalmente por dois *clusters* de íons, onde os íons de m/z 760,6 $[PC (34:1) + H]^+$ e o 782,6 $[PC (36:4) + H]^+$ ou $[PC (34:1) + Na]^+$ são predominantes. Esse comportamento também é observado nas outras amostras de mamíferos: oócito bovino (**FIGURA 8 b**), embrião bovino (**FIGURA 8 c**) e oócito ovino (**FIGURA 8 d**).

⁵⁷ SCHILLER, J.; ARNHOLD, J.; BENARD, S. *et al. Analytical Biochemistry*. **1999**, 267:46-56.

O desenvolvimento embrionário bovino (compare o resultado apresentado na **FIGURA 8 b** e **FIGURA 8 c**, respectivamente oócito e embrião bovino) é responsável por grande diferenciação no perfil lipídico obtido pelas análises de *MALDI-MS*, como visto pela maior abundância dos íons de m/z 788,6, e o aparecimento dos íons de m/z 788,6 [PC (36:1) + H]⁺, 808,6 [PC (38:5) + H]⁺ ou [PC (36:2) + Na]⁺ e 810,6 [PC (38:4) + H]⁺ ou [PC (36:1) + Na]⁺.

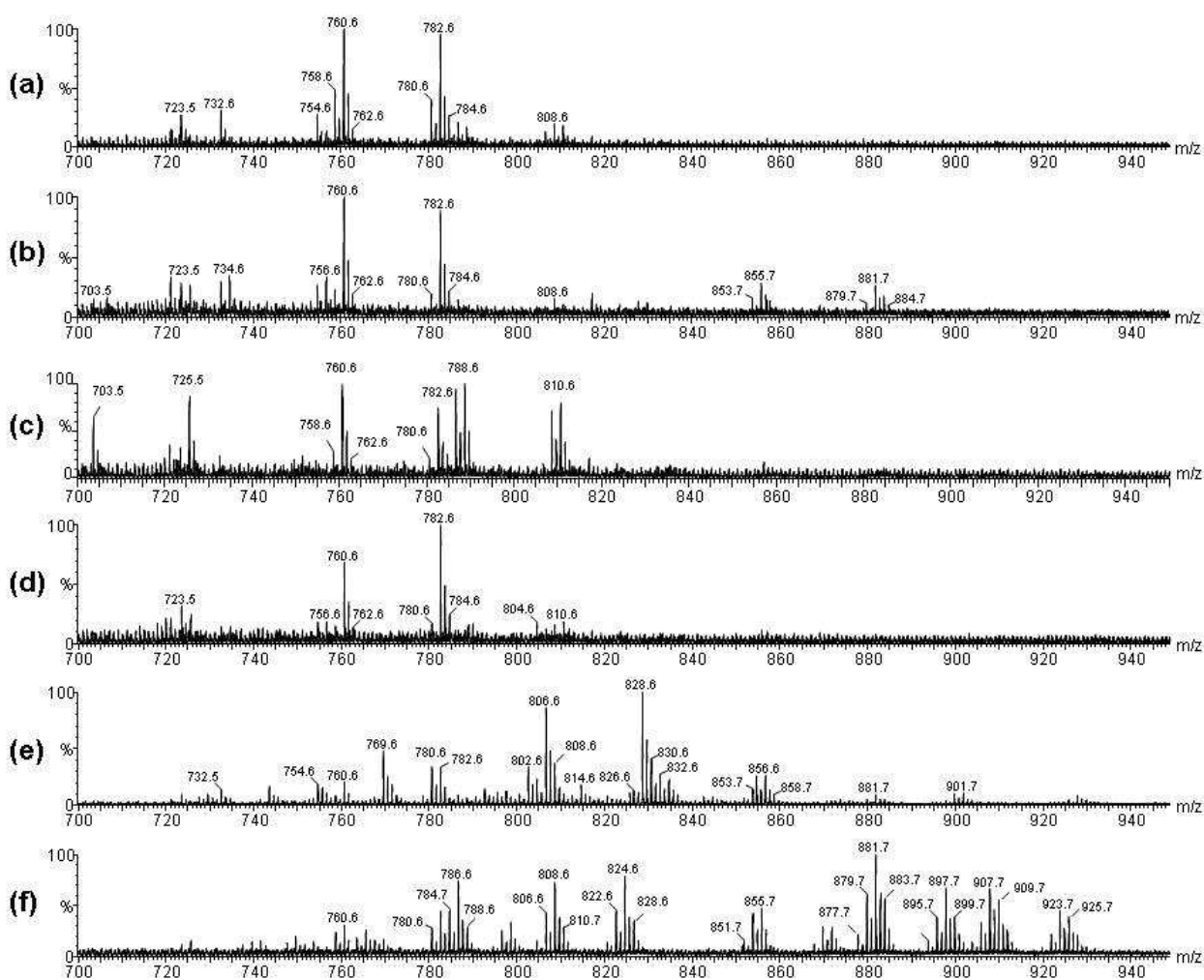


FIGURA 8. *MALDI-MS* em modo positivo para um único e intacto embrião ou oócito: **(a)** oócito humano (*Homo sapiens*), **(b)** oócito bovino (*Bos taurus*), **(c)** embrião bovino (*Bos taurus*), **(d)** oócito ovino (*Ovis aries*), **(e)** oócito de peixe (*Mugil spp.*), e **(f)** ovo de formiga (*Solenopsis spp.*)

No *fingerprinting* do oócito de peixe (**FIGURA 8 e**) os íons referentes as PC com maiores graus de instauração nos resíduos dos grupos acil, como as de m/z 806,6 [PC (38:6)

+ H]⁺ ou [PC (36:3) + Na]⁺, bem como os TAGs de *m/z* 853,7 [PPL (50:2) + Na]⁺ e 855,7 [PPO (50:1) + Na]⁺ se destacam e eram esperados em pescados⁵⁸.

O perfil do ovo de inseto (**FIGURA 8 f**) é ainda mais distinto e característico, mostrando uma gama maior (em *m/z*) e mais diversa de íons de PC, SM e TAG. Deve-se ressaltar que cerca de 30 – 40% da massa seca dos ovos de insetos corresponde a lipídios, em sua maioria TAGs^{59,60,61}.

TABELA 1. Identificação de fosfolipídios (PL) e triacilglicerol (TAG) via *MALDI-MS(+)* de oócitos humanos, oócitos bovinos, embriões bovinos, oócitos ovinos, oócitos de peixe e ovo de formiga

<i>m/z</i>	Íon do lipídio (número de carbonos:insaturações)	Referência
703,5	[SM (16:0) + H] ⁺	26, 30
723,5	[PC (34:1) + Na] ⁺ com perda de N(CH ₃) ₃	29
725,5	[SM (16:0) + Na] ⁺	28,30
731,5	[SM (18:0) + H] ⁺	26
732,5	[PC (32:1) + H] ⁺	26
734,6	[PC (32:0) + H] ⁺	26
753,6	[SM (18:0) + Na] ⁺	26
754,6	[PC (32:1) + Na] ⁺	26
756,6	[PC (32:0) + Na] ⁺	29, 30
758,6	[PC (34:2) + H] ⁺	26, 27, 30
760,6	[PC (34:1) + H] ⁺	28
762,6	[PC (34:0) + H] ⁺	27
780,6	[PC (34:2) + Na] ⁺ , [PC (36:5) + H] ⁺	26, 27, 30
782,6	[PC (36:4) + H] ⁺ , [PC (34:1) + Na] ⁺	27, 28, 29, 30
784,6	[PC (34:0) + Na] ⁺	30
786,6	[PC (36:2) + H] ⁺	26, 28, 30
788,6	[PC (36:1) + H] ⁺	27, 28
802,6	[PC (36:5) + Na] ⁺	*

⁵⁸ RECKS, M.A.; SEABORN, G.T. *Fish Physiology and Biochemistry*. **2008**, 34:275-287.

⁵⁹ TROY, S.; ANDERSON, W.A.; SPIELMAN, A. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. **1975**, 50:457-461.

⁶⁰ BRIEGEL, H. *Journal of Insect Physiology*. **1990**, 36:165-172.

⁶¹ KAWOoya, J.K.; OSIR, E.O.; LAW, J.H. *The Journal of Biological Chemistry*. **1988**, 263:8740-8747.

804,6	[PC (38:7) + H] ⁺ , [PC (36:4) + Na] ⁺	30, *
806,6	[PC (38:6) + H] ⁺ , [PC (36:3) + Na] ⁺	*
808,6	[PC (38:5) + H] ⁺ , [PC (36:2) + Na] ⁺	26, 27, 28, 30
810,6	[PC (38:4) + H] ⁺ , [PC (36:1) + Na] ⁺	26, 27, 28, 30
828,6	[PC (38:6) + Na] ⁺	*
830,6	[PC (38:5) + Na] ⁺	28
832,6	[PC (38:4) + Na] ⁺	26, 30
834,6	[PC (40:6) + H] ⁺	27
836,6	[PC (40:5) + H] ⁺	28
851,7	[PPLn (50:3) + Na] ⁺	31
853,7	[PPL (50:2) + Na] ⁺	31
855,7	[PPO (50:1) + Na] ⁺	31
856,6	[PC (40:6) + Na] ⁺	29
877,7	[PLL (52:4) + Na] ⁺	31
879,7	[PLO (52:3) + Na] ⁺	31
881,7	[POO (52:2) + Na] ⁺	31
883,7	[POS (52:1) + Na] ⁺	31
895,7	[TAG (54:9) + Na] ⁺	*
897,7	[TAG (54:8) + Na] ⁺	*
899,7	[LLLn (54:7) + Na] ⁺	31
901,7	[LLL (54:6) + Na] ⁺	31
903,7	[LLO (54:5) + Na] ⁺ , [OOLn (54:5) + Na] ⁺	31
905,7	[OOL (54:4) + Na] ⁺ , [LLS (54:4) + Na] ⁺	31
907,7	[OOO (54:3) + Na] ⁺ , [SOL (54:3) + Na] ⁺	31
909,7	[OOS (54:2) + Na] ⁺ , [SSL (54:2) + Na] ⁺	31
911,7	[SSO (54:1) + Na] ⁺	31
919,7	[LLO (54:5) + K] ⁺ , [OOLn (54:5) + K] ⁺	31
921,7	[OOL (54:4) + K] ⁺ , [LLS (54:4) + K] ⁺	31
923,7	[OOO (54:3) + K] ⁺ , [SOL (54:3) + K] ⁺	31
925,7	[OOS (54:2) + K] ⁺ , [SSL (54:2) + K] ⁺	31

L: ácido linoleico; Ln: ácido linolênico; O: ácido oleico; P: ácido palmítico; PC: fosfatidilcolinas; SM: esfingomielinas; S: ácido esteárico.

* Atribuição realizada neste trabalho

A análise de PCA dos dados coletados através de *MALDI-MS* (**FIGURA 9 a**) mostra que as classes das amostras podem ser facilmente separadas através dos seus perfis

lipídicos. Como era esperados, as amostras de mamíferos ((a1) humano, (a2) ovino e (a3) bovino) formam um grupo que se distingue grandemente das demais amostras ((a4) peixe e (a5) formiga). Apesar da maior proximidade entre as amostras de mamíferos, é possível observar que as espécies se separam dentro deste grupo, com pouca sobreposição.

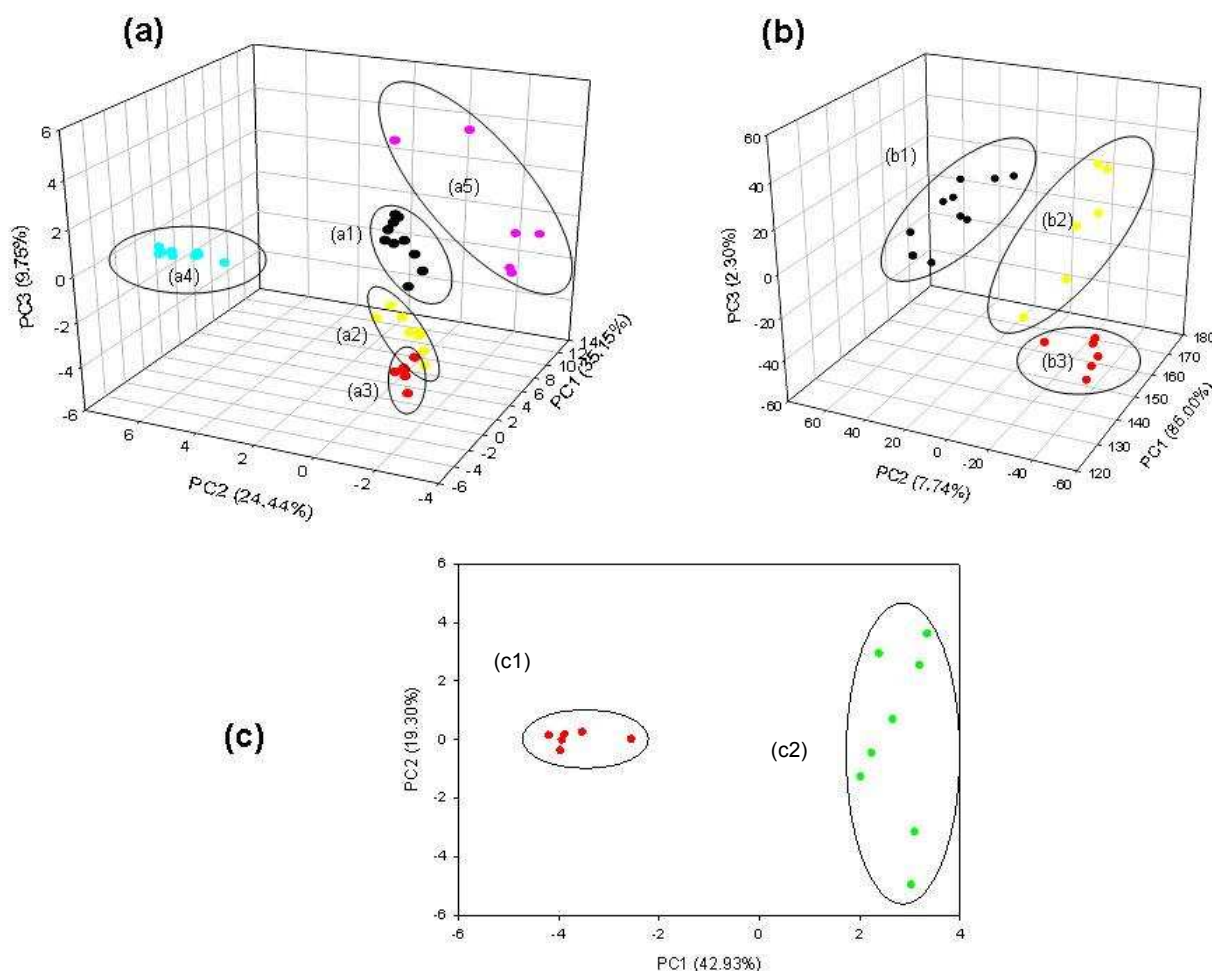


FIGURA 9. Gráficos de PCA para os dados de embriões e oócitos de: **(a)** todas as amostras de todas as 5 espécies: **(a1)** oócito humano (*Homo sapiens*) (n=10), **(a2)** oócito ovino (*Ovis aries*) (n=6), **(a3)** oócito bovino (*Bos taurus*) (n=6), **(a4)** oócito de peixe (*Mugil spp.*) (n=9) e **(a5)** ovo de formiga (*Solenopsis spp.*) (n=6); **(b)** das três espécies de mamíferos: **(b1)** humano, **(b2)** ovino e **(b3)** bovino; **(c)** somente oócitos e embriões bovinos: **(c1)** oócito bovino (n=6) e **(c2)** embrião bovino (n=8)

Quando os dados dos mamíferos são analisados separadamente (**FIGURA 9 b**) o gráfico 3D do PCA demonstra uma separação melhor ainda, sem qualquer sobreposição. As amostras de peixe e inseto (formiga), como esperado pelos resultados de seus perfis lipídicos, apresentaram maior separação. Também observou-se uma maior dispersão nas amostras dos ovos de formiga, possivelmente pelo maior número de íons apresentados e as variações de suas intensidades.

No PCA 2D apresentado na **FIGURA 9 c** está a comparação das duas fases de desenvolvimento embrionário de bovinos ((**c1**) oócito e (**c2**) embrião). As amostras se agrupam propriamente, o que sugere uma interessante aplicação, para a técnica desenvolvida aqui, no monitoramento das mudanças no perfil de PL e TAG durante as fases de desenvolvimento, auxiliando no entendimento dos processos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento embrionário.

Para investigar se o *MALDI-MS* de embriões e oócitos poderia monitorar mudanças no perfil lipídico devido a alterações nos procedimentos de cultura *in vitro*, embriões bovinos foram cultivados em 4 condições diferentes: 5% de O₂ e BSA (Grupo 1), 20% de O₂ e BSA (Grupo 2), 20% de O₂ e FCS (Grupo 3) e 5% de O₂ e FCS (Grupo 4).

Foram realizadas comparações considerando-se a influência da atmosfera (Grupo 1 X Grupo 2 e Grupo 3 X Grupo 4) e da suplementação do meio de cultura (Grupo 1 X Grupo 4 e Grupo 2 X Grupo 3). O efeito da atmosfera de cultivo dos embriões foi observado em ambos os meios de cultura. A maioria dos embriões do grupo cultivado em BSA com baixa concentração de oxigênio apresentaram menor intensidade dos íons de *m/z* 760,6 e 782,6 (as formas protonadas e sodiadas da PC 34:1, respectivamente) e de *m/z* 725,5 (a forma sodiada da SM 16:0) quando comparada com os embriões cultivados em BSA com alta concentração de oxigênio (**FIGURA 10 a e b** e **FIGURA 11 a**). Quando os embriões foram cultivados no meio FCS aqueles que se desenvolveram em altas concentrações de oxigênio apresentaram menor intensidades do íon PC 36:1, e maiores intensidades dos íons PC 34:1 e SM 16:0 (**FIGURA 10 c e d** e **FIGURA 11 b**).

O meio de cultivo (BSA e FCS) não apresentou qualquer influência nos embriões cultivados em baixa concentração de oxigênio (**FIGURA 10 a e d** e **FIGURA 11 c**). Quando a comparação foi realizada entre os embriões cultivados em alta concentração de oxigênio, o PCA separa claramente aqueles suplementados com BSA daqueles com FCS (**FIGURA 10 b e c** e

FIGURA 11 d). A principal diferença é que os embriões do Grupo 1 apresentaram maior intensidade do íons PC 36:1 do que aqueles do Grupo 4, os quais apresentaram maior intensidade dos íons PC 34:1 e o de m/z 725,6. Estes resultados em conjunto com os dados de composição de ácidos graxos obtidos por GC para oócitos bovinos^{54,15}, indicam que uma baixa concentração de oxigênio na incubadora e a suplementação do meio de cultura com BSA favorecem o acúmulo de cadeias contendo 18:1 (PC 36:1) e não as contendo 16:0 (PC 34:1 e SM 16:0).

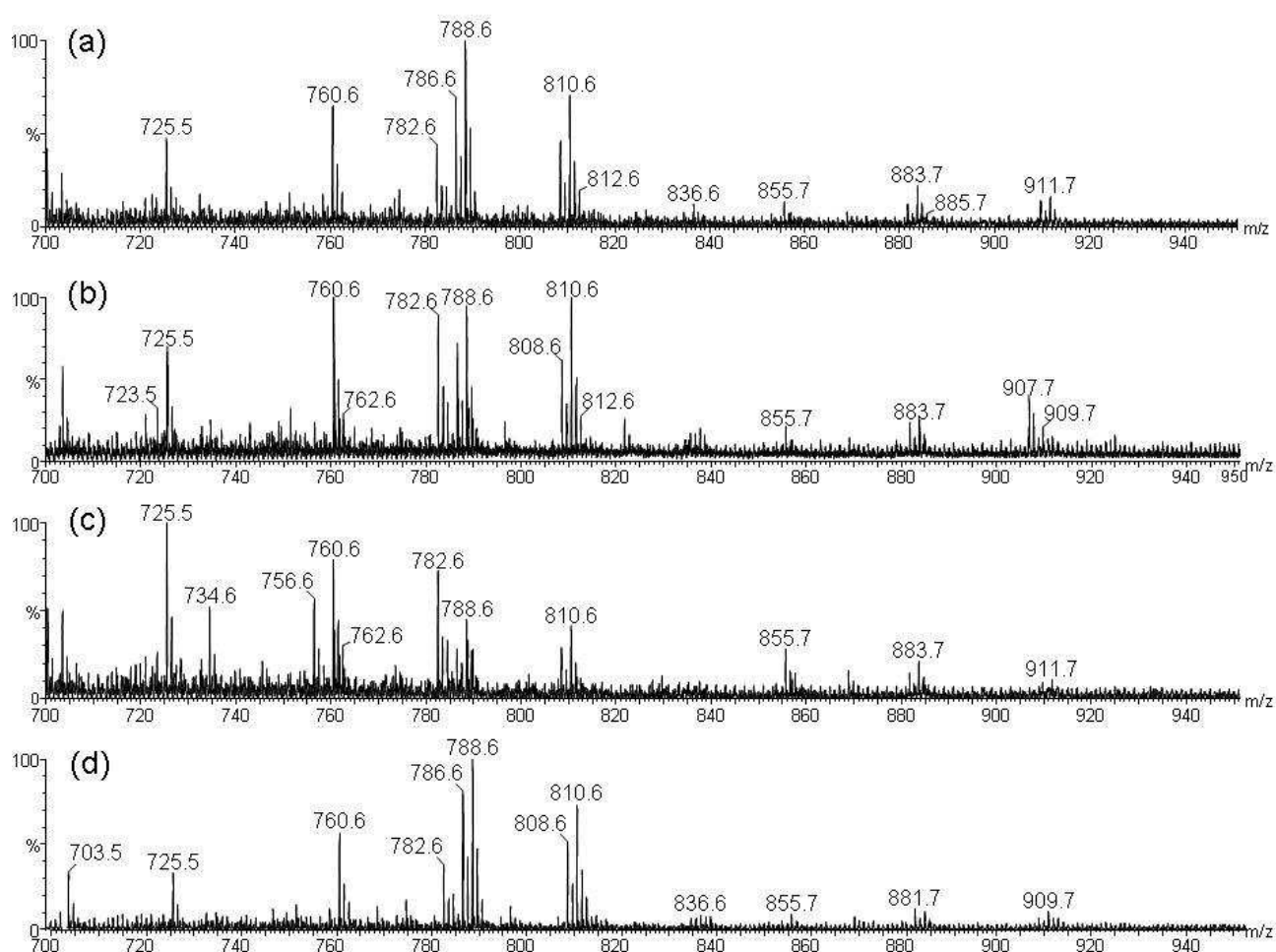


FIGURA 10. Espectros de *MALDI-MS* em modo positivo para amostras únicas de embriões bovinos cultivados *in vitro* em diferentes condições: **(a)** 5% de O_2 e BSA (Grupo 1, $n=14$), **(b)** 20% de O_2 e BSA (Grupo 2, $n=12$), **(c)** 20% de O_2 e FCS (Grupo 3, $n=10$) e **(d)** 5% de O_2 e FCS (Grupo 4, $n=14$)

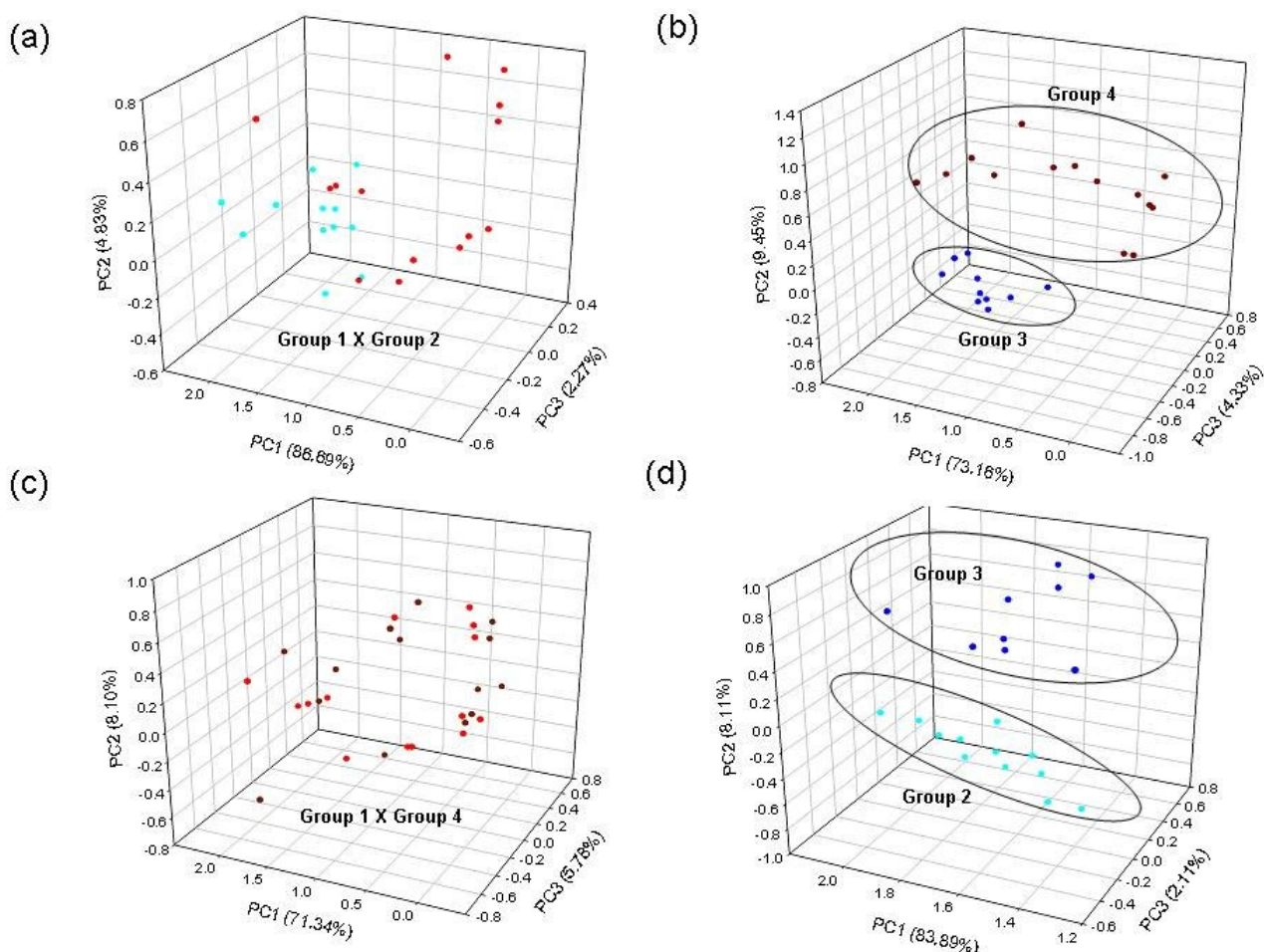


FIGURA 11. Gráfico de PCA 3D utilizando os dados de perfil lipídico de embriões bovinos cultivados *in vitro* em diferentes condições de suplementação de meio: **(a)** 5% de O₂ e BSA (Grupo 1, pontos vermelhos) X 20% de O₂ e BSA (Grupo 2, pontos azuis claros), e **(b)** 20% de O₂ e FCS (Grupo 3, pontos azuis escuros) X 5% de O₂ e FCS (Grupo 4, pontos marrons), e de atmosfera: **(c)** 5% de O₂ e BSA (Grupo 1, pontos vermelhos) X 5% de O₂ e FCS (Grupo 4, pontos marrons), e **(d)** 20% de O₂ e BSA (Grupo 2, pontos azuis claros) X 20% de O₂ e FCS (Grupo 3, pontos azuis escuros)

3.3.2. Caracterização de lipídios em oócitos e embriões

A **TABELA 1** apresenta a atribuição dos PL e TAG dos dados de MALDI-MS. Para reforçar estas atribuições, os íons mais intensos de PL e TAG foram submetidos a análise de MALDI-MS/MS. Perfis de dissociação compatíveis com íons de PC, SM e TAG foram

observados^{62,63,64,65,66,67}. A **FIGURA 12 a e b** apresentam exemplos representativos de MALDI-MS/MS dos íons m/z 810,6 e m/z 725,5. A perda de 59 Da se deve a trimetilamina neutra $[(N(CH_3)_3]$, enquanto a de 124 Da representa a perda do anel de ciclofosfano ($C_2H_5O_4P$).

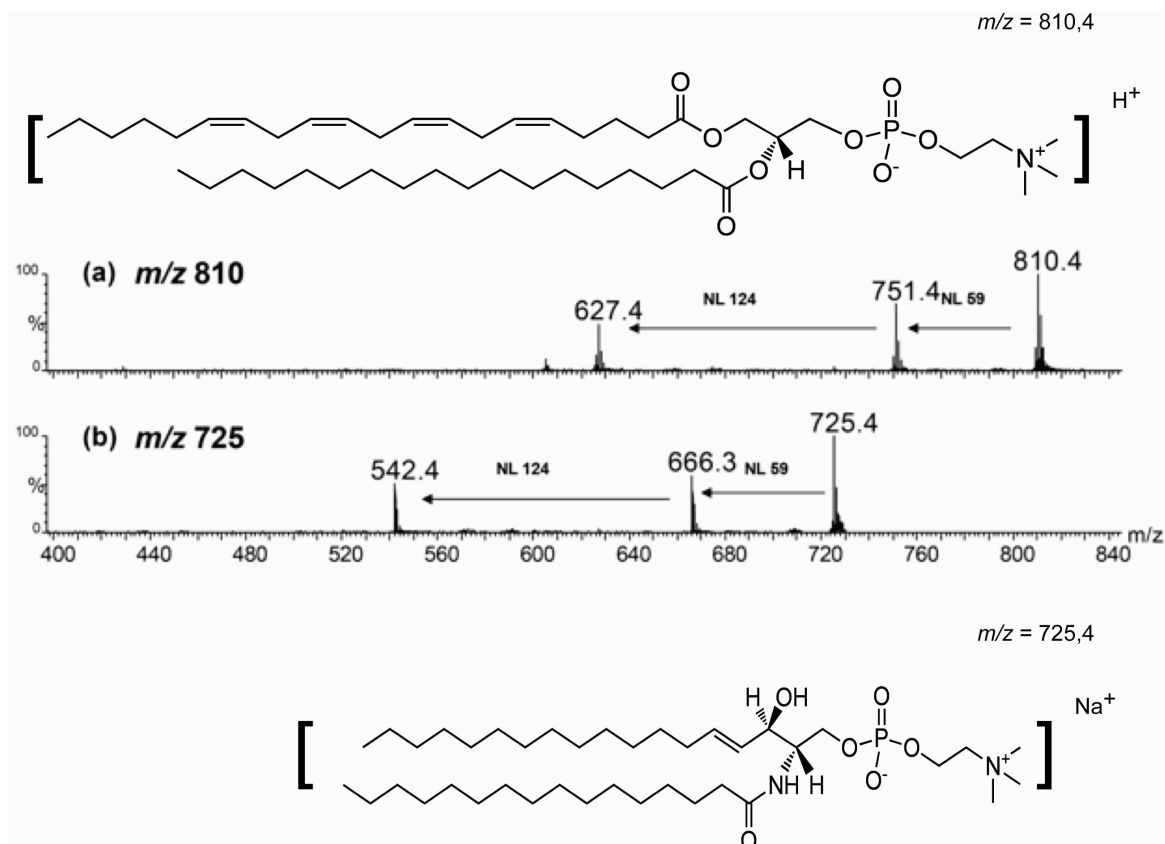


FIGURA 12. MALDI-MS/MS de embriões individuais para os íons: **a)** m/z 810,6 [PC (38:4) + H]⁺ ou [PC (36:1) + Na]⁺, e **b)** m/z 725,5 [SM (16:0) + Na]⁺ (NL 59 = $N(CH_3)_3$, NL 124 = $C_2H_5O_4P$)

⁶² BRUGGER, B.; ERBEN, G.; SANDHOFF, R. *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences.* **1997**, 94:2339-2344.

⁶³ PETKOVIC, M.; SCHILLER, J.; MULLER, M. *et al. Analytical Biochemistry.* **2001**, 289:202-216.

⁶⁴ FUCHS, B.; JAKOP, U.; GORITZ, F. *et al. Theriogenology.* **2009**, 71:568-575.

⁶⁵ HAYASAKA, T.; GOTO-INOUE, N.; SUGIURA, Y. *et al. Rapid Communications in Mass Spectrometry.* **2008**, 22:3415-3426.

⁶⁶ BURNUM, K.E.; CORNETT, D.S.; PUOLITAIVAL, S.M. *et al. Journal of Lipid Research.* **2009**, 50:2290-2298.

⁶⁷ SARAIVA, S.A.; CABRAL, E.C.; EBERLIN, M.N. *et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2009**, 57:4030-4034.

3.4. Conclusão

A análise por *MALDI-MS* de amostras intactas de um único embrião ou oócito permite uma análise direta do perfil lipídico (representada pelas espécies *SM*, *PC*, *TAG*) sem as etapas de extração, manipulação química ou pré-separação. As medidas de massa são realizadas com precisão, alta reprodutibilidade e grande explicação da variação do perfil lipídico da amostra. A tipificação e o monitoramento de algumas mudanças no perfil lipídico durante as fases de desenvolvimento se mostraram intrínsecas as espécies e relacionadas ao ambiente. Esta estratégia em *MALDI-MS* permite a caracterização do perfil lipídico de embriões e oócitos de diversas espécies com grande simplicidade e velocidade, contribuindo para os campos de pesquisa em reprodução tais como a das alterações do perfil lipídico nas células durante o desenvolvimento embrionário e seu papel na criopreservação de embriões *in vitro*.

CAPÍTULO 4: DETECÇÃO DE MALTODEXTRINA EM LEITE EM PÓ

4. CAPÍTULO 4

4.1. Introdução

A autenticidade de alimentos é hoje uma das maiores preocupações dos consumidores, indústrias e dos legisladores, em todos os níveis da cadeia produtiva⁶⁸. Os produtos lácteos formam um grupo de alto interesse uma vez que ocupam um importante papel na nutrição humana e é essencial para mulheres, crianças e idosos.

O leite não é um produto bruto caro, entretanto, o processamento do leite faz com que seus derivados agregem valor (valor comercial do leite líquido USD 380,00/ton enquanto o do leite em pó é de USD 2.600,00/tonelada). Este fato somado ao grande volume comercializado mundialmente tornam (volume de leite em pó comercializado mundialmente é de 100 milhões de toneladas por ano), do ponto de vista econômico, os derivados lácteos um alvo atrativo para que criminosos produzam falsificações, através da mistura de produtos mais baratos com outros ingredientes lácteos e não lácteos, e as comercializem como leite em pó instantâneo. A substituição, por exemplo, da gordura, proteína ou carboidratos naturalmente presentes no leite por componentes de origens diferentes é uma prática considerada fraude, mesmo que esta substituição aumente o valor nutricional do produto final.

O desenvolvimento na química e tecnologia do leite tem levado a criação de produtos lácteos específicos, o que, infelizmente, também gera novas oportunidades para manipulações e falsificações mais sofisticadas. Ramos e Juárez⁶⁹, há 25 anos, revisaram as principais possibilidades de fraudes em produtos lácteos e os procedimentos analíticos correspondentes para suas detecções, disponíveis na época. Desde então avanços significativos foram obtidos na área analítica de lácteos, sendo a maioria para análise de proteína, devido aos desenvolvimentos na cromatografia, eletroforese, imuno ensaios (ELISA), análises de PCR^{70,71,72,73,74,75,76}, e, em particular na espectrometria de massas

⁶⁸ WEHR, M.; FRANK, J.F. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. APHA:Washington, D.C., 2004.

⁶⁹ RAMOS, M.; JUÁREZ, M. *Bulletin of the International Dairy Federation*. **1986**, 202:175-187.

⁷⁰ CSERHÁTI, T.; FORGÁCS, E.; DEYL, Z. *et al. Biomedical Chromatography*. **2005**, 19:183-190.

⁷¹ DE LA FUENTE, M.A.; JUÁREZ, M. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2005**, 45:563-585.

⁷² KAROUI, R.; DE BAERDEMAEKER, J. *Food Chemistry*. **2007**, 102:621-640.

⁷³ FELIGINI, M.; BONIZZI, I.; CURIK, V.C. *et al. Food Technology and Biotechnology*. **2005**, 43:91-95.

(MS)^{77,78,79,80,81,82,83,84}. Um exemplo recente de alerta mundial foi o “escândalo da melanina”, que resultou em um enorme problema de saúde e até mesmo em mortes na China, o que levou ao desenvolvimento de novos métodos de análise por MS^{85,86}.

O ESI-MS é uma técnica de ionização branda e de amplo uso que revolucionou a forma como as moléculas são ionizadas e transferidas ao espectrômetro de massas para suas detecções e caracterizações³³. O ESI-MS expandiu grandemente a aplicação da MS para uma variedade de novas classes de moléculas termicamente instáveis, mais polares e de massas mais elevadas. Diversos trabalhos com infusão direta em ESI-MS para a caracterização rápida e o controle de qualidade de misturas complexas têm sido desenvolvidos, como por exemplo no extrato de plantas⁸⁷, própolis⁸⁸, vinho⁸⁹, whisky⁹⁰ e cachaça^{91,92,93}. O ESI-MS com infusão direta de amostras é uma técnica promissora para o rápido *fingerprinting* e o controle de qualidade de leite em pó com mínimo preparo de amostra.

Uma fraude comum em leite no Brasil é a adição de pequenas quantidades de maltodextrina ao leite em pó adulterado com, por exemplo, proteína de soro e gordura, para

-
- ⁷⁴ CHENG, Y.H.; CHEN, S.D.; WENIG, C.F. *Journal of Animal Science*. **2006**, 19:1503-1507.
- ⁷⁵ YUE, Q.; CHEN, D.; WU, C. *et al. Shipin Kexue (Beijing, China)*. **2009**, 30:190-193. [Chemical Abstracts. **2009**].
- ⁷⁶ DI PINTO, A.; CONVERSANO, M.C.; FORTE, V.T. *et al. Journal of Food Quality*. **2004**, 27:428-435.
- ⁷⁷ MULLER, L.; BARTAK, P.; BEDNAR, P. *et al. Electrophoresis*. **2008**, 29:2088-2093.
- ⁷⁸ FANTON, C.; DELOGU, G.; MACCIONI, E. *et al. Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **1998**, 12:1569-1573.
- ⁷⁹ COZZOLINO, R.; PASSALACQUA, S.; SALEMI, S. *et al. Journal of Mass Spectrometry*. **2002**, 37:985-991.
- ⁸⁰ CHEN, R.K.; CHANG, L.W.; CHUNG, Y.Y. *et al. Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2004**, 18:1167-1171.
- ⁸¹ ZUCKSCHWERTD, J.B.; NIXON, C.E.; CINER, F.L. *et al. Journal of Food Protection*. **2008**, 71:1007-1014.
- ⁸² CORDEWENER, J.H.G.; LUYKX, D.M.A.M.; FRANKHUIZEN, R. *et al. Journal of Separation Science*. **2009**, 32:1216-1223.
- ⁸³ SACCO, D.; BRESCIA, M.A.; SGARAMELLA, A. *et al. Food Chemistry*. **2009**, 114:1559-1563.
- ⁸⁴ PIASSENTIER, E.; VALUSSO, R.; CAMIN, F. *et al. Meat Science*. **2003**, 64:239-247.
- ⁸⁵ DANE, A.J.; CODY, R. B. *Analyst*. **2010**, 135:696-699.
- ⁸⁶ HUANG, G.; XU, W.; VISBAL-ONUFRAC, M.A. *et al. Analyst*. **2010**, 135:705-711.
- ⁸⁷ MAURI, P.; PIETTA, P. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2000**, 23:61-68.
- ⁸⁸ SAWAYA, A.C.H.F.; TOMAZELA, D.M.; CUNHA, I.B.S. *et al. Analyst*. **2004**, 129:739-744.
- ⁸⁹ COOPER, H.J.; MARSHALL, A.G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, 49:5710-5718.
- ⁹⁰ MØLLER, J.K.S.; CATHARINO, R.R.; EBERLIN, M.N. *Analyst*. **2005**, 130, 890-897.
- ⁹¹ SOUZA, P.P.; OLIVEIRA, L.C.A.; CATHARINO, R.R. *et al. Food Chemistry*. **2009**, 115:1064-1068.
- ⁹² SOUZA, P.P.; SIEBALD, H.G.L.; AUGUSTI, D.V. *et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55:2094-2012.
- ⁹³ SOUZA, P.P.; CATHARINO, R.R.; AUGUSTI, D.V. *et al. Journal of Mass Spectrometry*. **2007**, 42:1294-1299.

ajustar a densidade e a crioscopia do leite em pó reconstituído e para caracterizar o produto como leite em pó “integral”⁹⁴. No entanto, alguns produtos lácteos, como algumas fórmulas infantis, podem conter amido e seus derivados maltose e maltodextrina⁹⁵. A adulteração de leite em pó com maltodextrina é, portanto, uma prática de difícil caracterização, sendo que uma extensiva revisão bibliográfica não mostrou, até a presente data, outros trabalhos sobre este assunto. O método oficial do utilizado pelos laboratórios oficiais e por aqueles que prestam serviço para o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) é a cromatografia de camada delgada (TLC, Thin Layer Chromatography)⁹⁶. Este método sofre com o problema de baixa especificidade, uma vez que é extremamente comum, nesta análise, obter resultados falsos positivos, falsos negativos ou simplesmente inconclusivos. Os métodos cromatográficos para a análise de carboidratos em leite e derivados por cromatografia líquida e gasosa são muito demoradas e podem sofrer de baixa sensibilidade. Com o objetivo de estabelecer um método rápido e confiável para a detecção rotineira de maltodextrina em leite em pó adulterado, nós desenvolvemos um protocolo analítico combinando a hidrólise enzimática e a infusão direta em ESI-MS.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Amostras

As amostras de leite em pó bovino (n=14) foram cedidas pela Polícia Federal do Brasil. Estas amostras foram apreendidas durante investigações ocorridas no ano de 2008. Por esta razão, as amostras foram adquiridas diretamente dos estabelecimentos produtores.

4.2.2. Reagentes

Os carboidratos, lactose, maltose, isomaltose, maltotriose, isomaltotriose, panose e maltodextrina, bem como as enzimas α -glucosidase (maltase) de *Bacillus stearothermophilus* e β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foram adquiridas da Sigma Aldrich (USA). Metanol

⁹⁴ FERRÃO, M.F.; MELLO, C.; BORIN, A. *et al.* *Química Nova*. **2007**, 30:852-859.

⁹⁵ MORALES, V.; OLANO, A.; CORZO, N. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52:6732-6736.

⁹⁶ MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Instrução Normativa No. 14 de 27 de abril de 2007: Métodos Analíticos Físico-Químicos para Detecção da Maltodextrina em leite*. **2007**.

(HPLC-grade) e ácido fórmico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA) e utilizados sem purificação. A água deionizada foi obtida em um sistema Milli-Q (Millipore, USA).

4.2.3. Preparo das soluções de leite em pó

As amostras autênticas e adulteradas de leite em pó foram coletadas de diversos produtores pela Polícia Federal do Brasil. Treze gramas (13 g) de leite em pó foram diluídos em 100 mL de água deionizada. As amostras foram então diluídas (1:1000 v/v) em uma solução de metanol e água (50:50 v/v).

4.2.4. Ensaio enzimáticos

Duas amostras de leite em pó (codificadas como LP350 e LP364) foram utilizadas nos ensaios enzimáticos adaptados dos protocolos provenientes dos fabricantes das enzimas (Sigma, USA)^{97,98}. As soluções stock foram preparadas em água deionizada (Milli Q). Para os ensaios com a enzima α -glucosidase, 20 μ L de uma solução 3 mM de glutatona e 20 μ L de uma solução de 1,0 mg.mL⁻¹ (79 U.mL⁻¹) de α -glucosidase foram misturadas com 500 μ L de solução tampão de fosfato de potássio (67 mM), preparada com KH₂PO₄, e tendo seu pH ajustado para 6,8 com uma solução de NaOH (1 M). A concentração final dos substratos foram 0,47 mg.mL⁻¹ de dissacarídeos, 0,78 mg.mL⁻¹ de trissacarídeos, 1,0 mg.mL⁻¹ das amostras de leite em pó (LP350 e LP364). Para os ensaios com a enzima β -galactosidase, 50 μ L de uma solução de 2,2 mg.mL⁻¹ (22 U.mL⁻¹) de β -galactosidase foi misturada com 400 μ L de uma solução tampão de fosfato de sódio, preparada com Na₂HPO₄ (20 mM), e tendo seu pH ajustado para 4,5 com uma solução de ácido cítrico. Às soluções de oligossacarídeos e de leite em pó (50 μ L) foram adicionadas para gerar uma concentração final de substrato de 0.30 mg.mL⁻¹ de dissacarídeos, 0,50 mg.mL⁻¹ de trissacarídeos, 0,64 mg.mL⁻¹ de leite em pó (LP350 e LP364). As amostras “brancas” foram preparadas substituindo-se a enzima, o sacarídeo de referência, ou o leite em pó pelo volume equivalente de água deionizada. As

⁹⁷ Enzymatic assay of α -glucosidase (EC 3.2.1.20). Sigma quality control test procedure for product Nos. G-5003, G-6136, G-7256, G-8889, G0660, and G-3651. Sigma:St. Louis, MO, 3 p., **1996**.

⁹⁸ Enzymatic assay of β -galactosidase (EC 3.2.1.23). Sigma quality control test procedure for product No. G-5160. Sigma:St. Louis, MO, 3 p., **2001**.

soluções tampão e as enzimas foram misturadas através de agitação em Vórtex. Após esta etapa as soluções foram deixadas em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente (22 – 25 °C) antes da adição da solução dos substratos. As soluções dos substratos foram adicionadas as soluções dos ensaios enzimáticos através da agitação em Vórtex e deixadas em temperatura ambiente por 60 minutos antes que alíquotas fossem coletadas e infundidas diretamente no espectrômetro de massas. Nos casos em que a reação era negativa após 60 minutos, estas amostras eram reanalisadas após novo período de 60 minutos (completando 120 minutos de reação).

4.2.5. Infusão direta no espectrômetro de massas

A caracterização das amostras padrão de lactose e maltodextrina foram realizadas em um equipamento híbrido *FT-ICR MS* de 9-Tesla (Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer) (Thermo Scientific, Alemanha) equipado com uma fonte de nano-electrospray em um chip (Triversa; Advion Biosciences, USA). As condições do nano-electrospray foram: fluxo de 200 nL.min⁻¹, 0,3 psi de pressão, e 1,5 a 2,0 kV de voltagem da fonte. Os espectros foram adquiridos durante 10 segundos entre a faixa de massa de 150 e 2000 *m/z*.

Um Q-TOF (Micromass, Inglaterra) foi utilizado para as análises de *fingerprinting*. As condições gerais utilizadas foram: fluxo de 10 mL.min⁻¹, temperatura da fonte em 100 °C, voltagem do capilar em 3,0 kV e voltagem do cone em 35 V. Para as análises no modo positivo 10.0 µL de uma solução concentrada de ácido fórmico foi adicionado a solução das amostras até um volume total de 1000 µL e concentração final do ácido de 0,1%. O ESI-MS foi realizado através de infusão direta. Os espectros foram adquiridos durante 60 segundos entre a faixa de massa de 50 a 1500 *m/z*.

4.3. Resultados e Discussão

A lactose, o principal açúcar presente no leite, é um dissacarídeo resultante da condensação da glicose com a galactose, e possui uma massa molecular de 342 Da. A maltodextrina é um oligossacarídeo obtido industrialmente a partir da hidrólise ácida ou enzimática do amido. O produto resultante é uma mistura com vários graus de ligações (n)

entre unidades simples de açúcar. As frações com $n=2$ apresentam a mesma massa molecular da lactose (**FIGURA 13**).

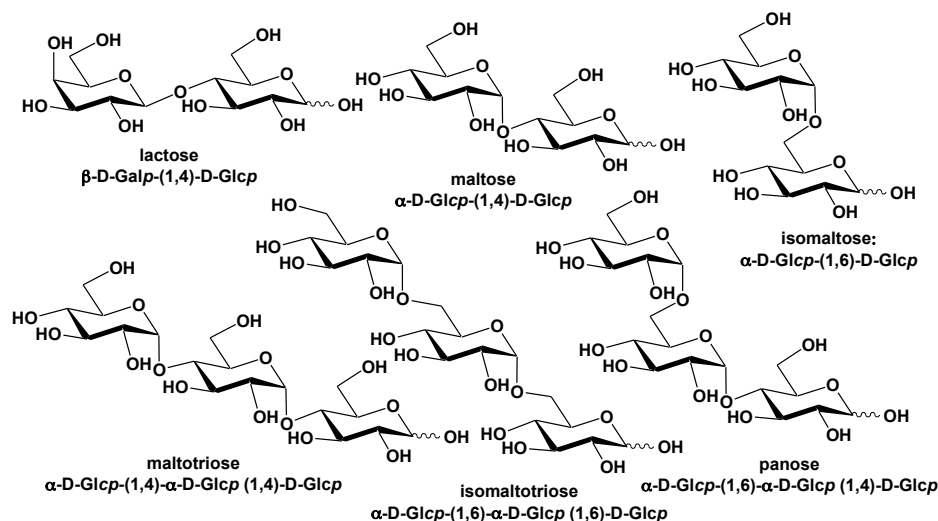


FIGURA 13. Estruturas dos di e trissacarídeos estudados

Visando testar a capacidade do ESI-MS para diferenciar lactose de maltodextrina, amostras padrões foram analisadas. A **FIGURA 14** apresenta os resultados obtidos.

As análises das amostras padrões apresentaram os íons de m/z 365 e 381, respectivamente os íons sodiados e potassiadados da lactose e da maltose (unidade com $n=2$ da maltodextrina). Além disso, o padrão de lactose apresentou o dímero deste açúcar (íons de m/z 707 e 723, respectivamente as formas sodiadas e potassiadadas), enquanto que a amostra de maltodextrina apresentou um perfil de polimerização. A

Tabela 2 apresenta as atribuições dos íons identificados. Sendo assim, pode-se concluir que através da técnica de ESI-MS é possível obter uma assinatura química capaz de diferenciar a lactose da maltodextrina.

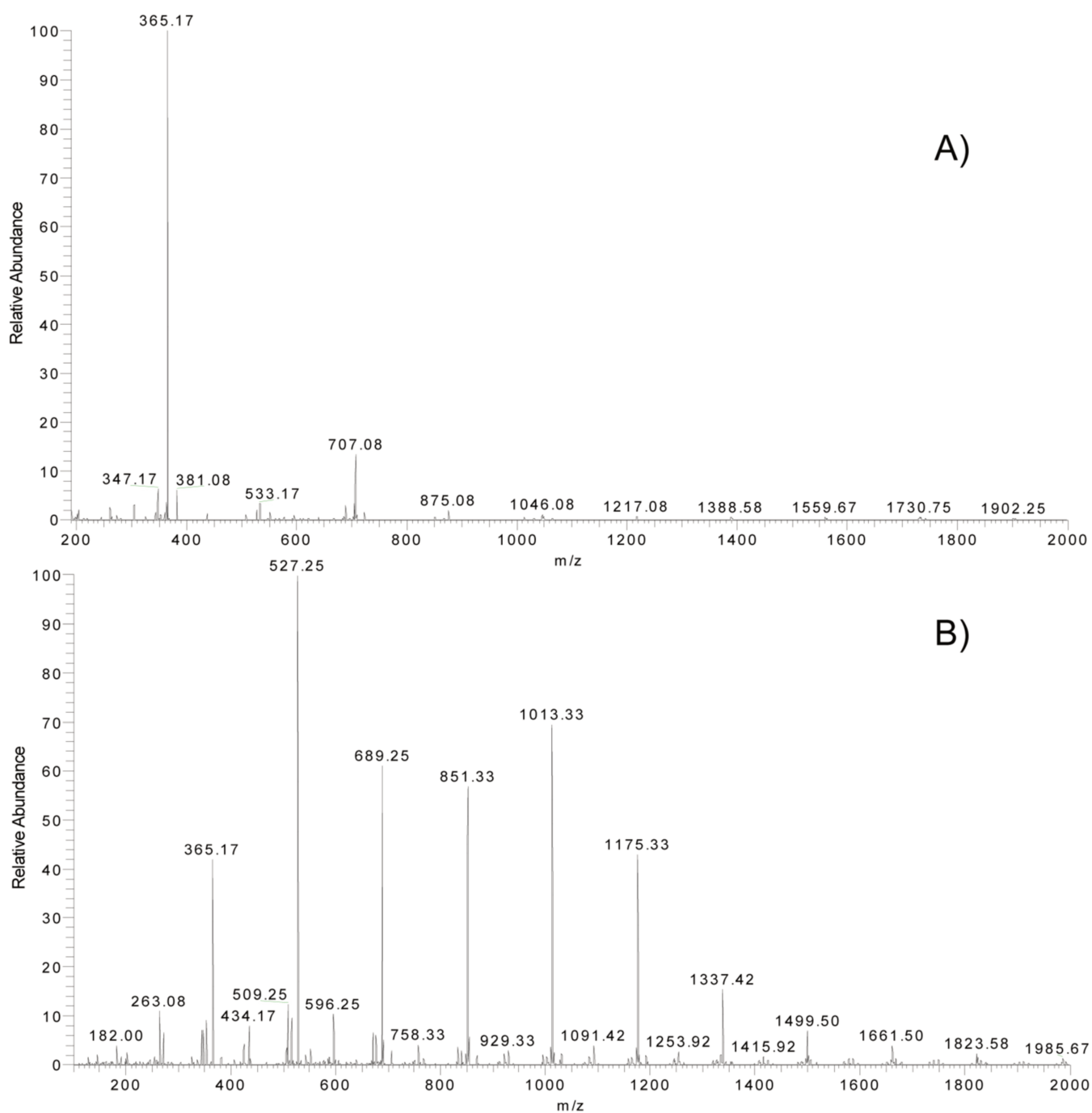


FIGURA 14. ESI(+)-MS fingerprints de **A)** lactose e **B)** maltodextrina

TABELA 2. Atribuições dos íon identificados nos padrões

Fórmula Molecular	H ⁺	Na ⁺	K ⁺
G ₂ - H ₂ O ⁺	343	365	381
2(G ₂ - H ₂ O ⁺)	685	707	723
G ₃ - 2H ₂ O ⁺	505	527	543
G ₄ - 3H ₂ O ⁺	667	689	705
G ₅ - 4H ₂ O ⁺	829	851	867
G ₆ - 5H ₂ O ⁺	991	1013	1029
G ₇ - 6H ₂ O ⁺	1153	1175	1191
G ₈ - 7H ₂ O ⁺	1315	1337	1353
G ₉ - 8H ₂ O ⁺	1477	1499	1515
G ₁₀ - 9H ₂ O ⁺	1639	1661	1677
G ₁₁ - 10H ₂ O ⁺	1801	1823	1839
G ₁₂ - 11H ₂ O ⁺	1963	1985	2001

* G = glicose (para maltodextrina) e glicose ou galactose (para lactose).

4.3.1. ESI-MS em leite em pó

Para testar a habilidade do ESI-MS para detectar adulterações por adição de maltodextrina em leite em pó, 16 amostras deste produto foram analisadas. Como observado na **FIGURA 15**, os *fingerprintings* por ESI-MS, mesmo em uma matriz tão complexa como o leite em pó, são capazes de detectar a adição de maltodextrina, como observado pela presença dos íons de *m/z* 527 e 543 nas amostras adulteradas (**FIGURA 15**).

Em função da composição do leite em pó, mais rico em K do que em Na, há uma maior abundância dos íons potassados. Como a amostra adulterada é uma matriz mais complexa do que o padrão de maltodextrina, era esperado que seu perfil fosse diferente da do padrão, como foi confirmado. Além disso, é necessário considerar que a maltodextrina é utilizada em leite em pó para mascarar problemas provenientes de outras adulterações em leite em pó, sendo usada para ajustar a densidade e a viscosidade do produto adulterado, e, sendo assim, está presente em pequenas quantidades e em conjunto com uma quantidade maior de lactose.

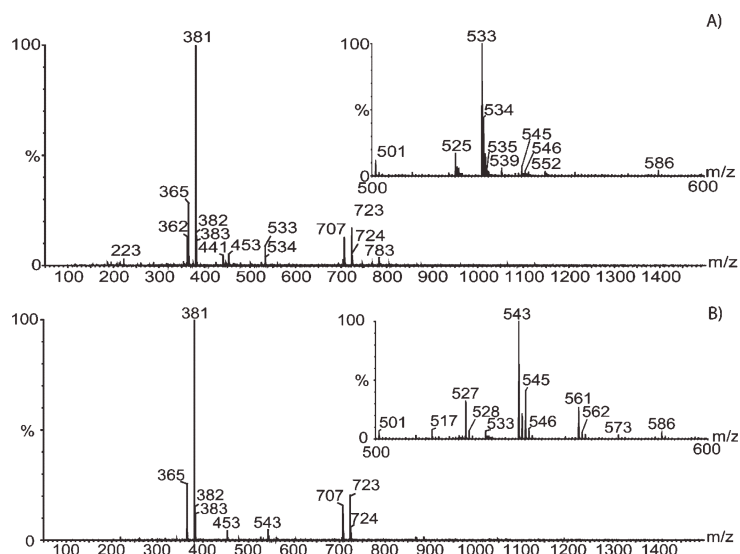


FIGURA 15. Fingerprints de ESI(+)-MS (LTQ FT) de amostras de leite em pó **a)** não adulterado e **b)** adulterado. Observa-se na expansão (m/z 500-600) que a presença dos íons de m/z 527 $[\text{Hex}_3 + \text{Na}]^+$ e 543 $[\text{Hex}_3 + \text{K}]^+$ só é detectada na amostra adulterada

4.3.2. Confirmação da adulteração por adição de maltodextrina por digestão enzimática

Para confirmar os resultados obtidos pelos ESI-MS fingerprints, digestões enzimáticas foram realizadas nos padrões e nas amostras de leite em pó.

Nesta etapa, todas as amostras foram infundidas diretamente na fonte de ESI sem dessalinização prévia ou limpeza cromatográfica.

As estruturas dos sacarídeos investigados são apresentadas na **FIGURA 13** e suas massas moleculares e de seus fragmentos estão compiladas na **TABELA 3**. Em função das soluções tampões utilizadas com a α -glucosidase e com a β -galactosidase, os íons preferencialmente formados serão, respectivamente, os potassíados e os sodíados

TABELA 3. Valores de massa calculados dos fragmentos, monohexoses, hexobioses e hexotrioses

m/z	$[\text{M} + \text{H}]^+$	$\text{B}(\text{H})^+$	$[\text{M} + \text{Na}]^+$	$\text{B}(\text{Na})^+$	$[\text{M} + \text{K}]^+$	$\text{B}(\text{K})^+$
Hex	181.07	163.05	203.05	185.04	219.03	201.02
Hex ₂	343.12	325.11	365.11	347.10	381.08	363.07
Hex ₃	505.18	487.16	527.16	509.15	543.13	525.12

4.3.2.1. Análises dos padrões de carboidratos com α -glucosidase (**FIGURA 16**).

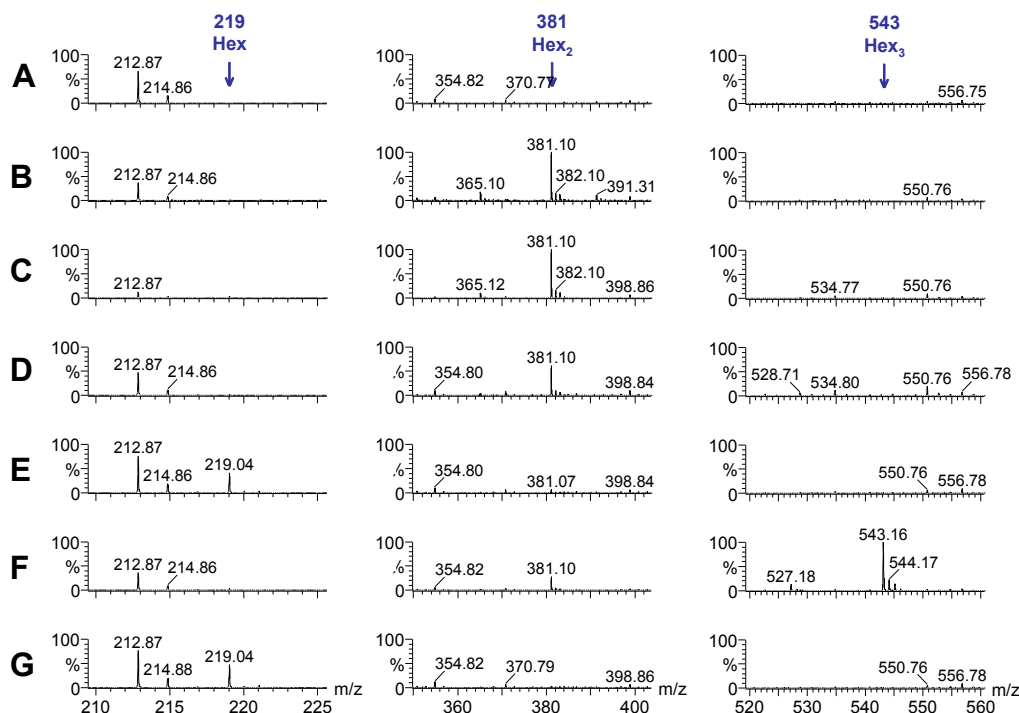


FIGURA 16. Espectro de massa de ESI(+)-MS dos padrões de carboidratos com e sem a enzima α -glucosidase, **A)** branco: tampão com α -glucosidase, **B)** lactose em tampão, sem α -glucosidase, **C)** lactose em tampão, com α -glucosidase, **D)** maltose em tampão, sem α -glucosidase, **E)** maltose em tampão, com α -glucosidase, **F)** maltotriose em tampão, sem α -glucosidase, **G)** maltotriose em tampão, com α -glucosidase

* Solução tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$

A solução do branco com tampão com α -glucosidase não apresentou qualquer íon que pudesse interferir com as análises das Hex, Hex₂ e Hex₃. A lactose não é hidrolisada pela α -glucosidase, como visto pela similaridade dos espectros obtidos na ausência e na presença da enzima, que apresentam unicamente os sinais dos dissacarídeos de m/z 365 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e 381 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (**FIGURA 16 B e C**). A enzima α -glucosidase hidrolisa a maltose, como observado pelo surgimento do íon Hex de m/z 219 (**FIGURA 16 E**), não presente antes da adição da enzima (**FIGURA 16 D**). O espectro de massa da maltotriose na ausência da enzima apresenta o íon Hex₃ de m/z 543 $[\text{M}+\text{K}]^+$ e, em pequena quantidade o íon Hex₂ de m/z 381 $[\text{M}+\text{K}]^+$ que poderia ser tanto um fragmento da Hex₃ ou um contaminante presente no

trissacarídeo comercial (**FIGURA 16 F**). A maltotriose foi completamente hidrolisada com α -glucosidase, não restando sinais da Hex₃ e Hex₂ (**FIGURA 16 G**).

4.3.2.2. Análises dos padrões de carboidratos com β -galactosidase (**FIGURA 17**)

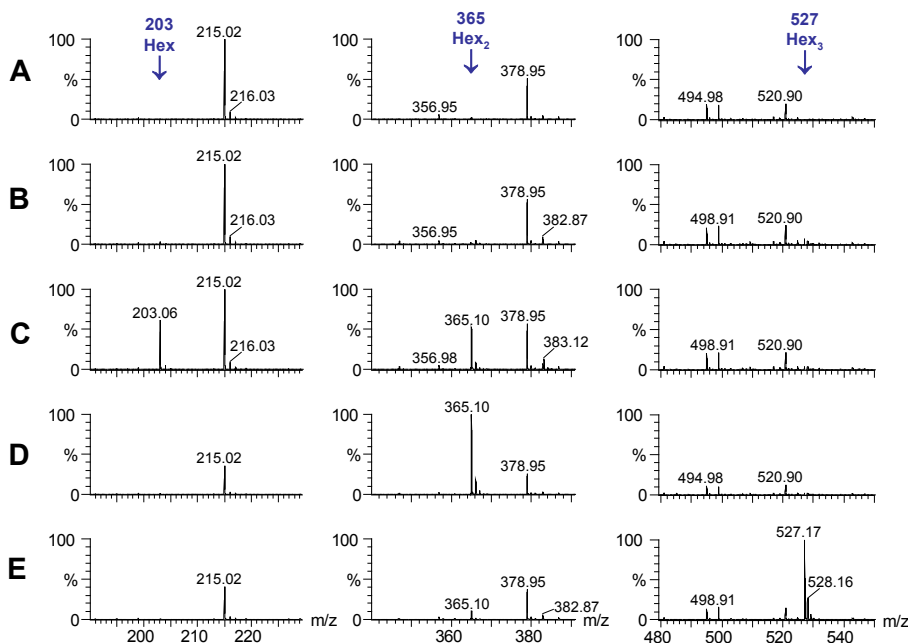


FIGURA 17. Espectro de massa de ESI(+)-MS dos padrões de carboidratos com e sem a enzima β -galactosidase, **A)** branco: tampão sem β -galactosidase, **B)** branco: tampão com β -galactosidase, **C)** lactose com β -galactosidase, **D)** maltose com β -galactosidase, **E)** maltotriose com β -galactosidase

* Solução tampão de Na₂HPO₄/citrato

A solução do branco com tampão com β -galactosidase não apresentou qualquer íon que pudesse interferir com as análises das Hex, Hex₂ e Hex₃ (**FIGURA 17 A e B**). O espectro de massa da lactose com β -galactosidase apresentou um intenso íon de m/z 203 [M+Na]⁺, referente ao aparecimento da Hex, consistente com a hidrólise da lactose formando galactose e glicose (**FIGURA 17 C**). Como esperado, o tratamento da maltose e da maltotriose com a enzima β -galactosidase não resultou no aparecimento de íons referentes a hexose no espectro de massas (**FIGURA 17 D e E**).

4.3.2.3. Análises das amostras de leite em pó com α -glucosidase (**FIGURA 18**)

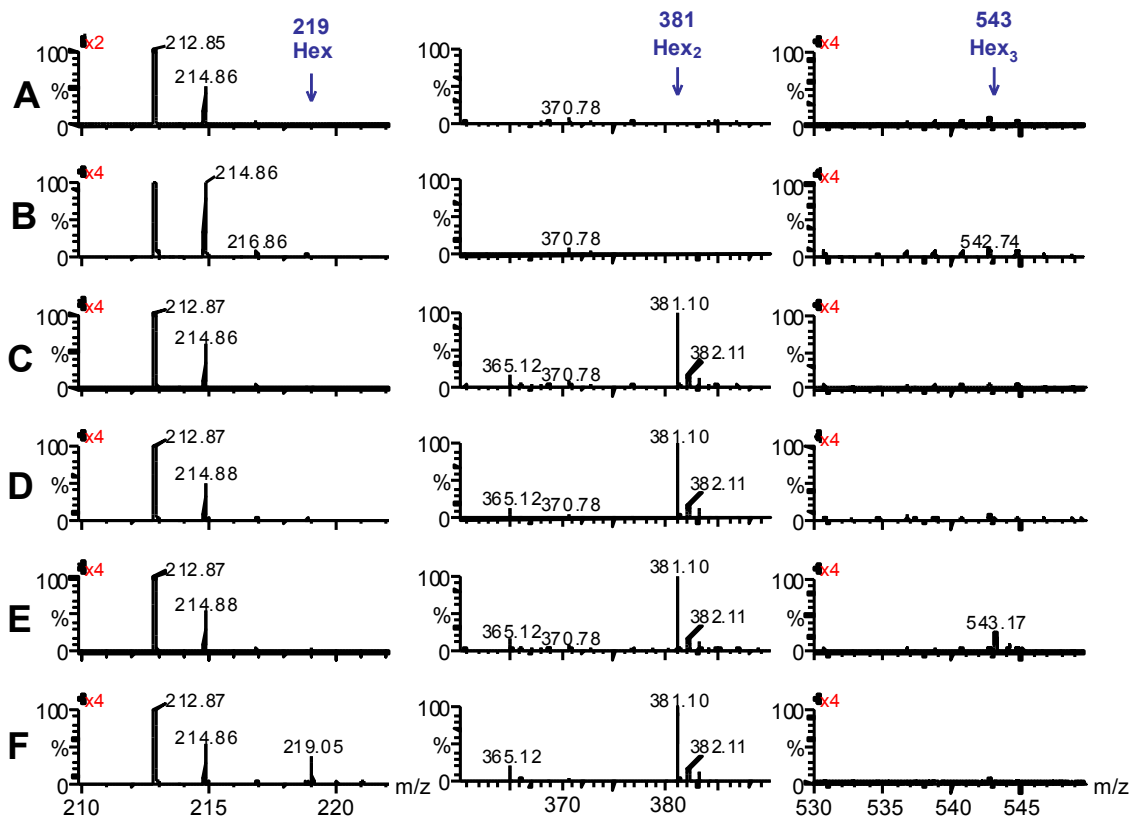


FIGURA 18. Espectro de massa de ESI(+)-MS das amostras de leite em pó com e sem a enzima α -glucosidase, **A)** branco: tampão sem α -glucosidase, **B)** branco: tampão com α -glucosidase, **C)** LP350 sem α -glucosidase, **D)** LP350 com α -glucosidase, **E)** LP364 sem α -glucosidase, **F)** LP364 com α -glucosidase

* Solução tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$

A solução do branco com tampão com α -glucosidase não apresentou qualquer íon que pudesse interferir com as análises das Hex, Hex₂ e Hex₃ (**FIGURA 18 A e B**). O espectro de massas das amostras de leite em pó 350 e 364, respectivamente LP350 e LP364, apresentaram, tanto na ausência quanto na presença da enzima α -glucosidase, íons referentes à Hex₂ em m/z 365 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e 381 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (**FIGURA 18 C – F**). Na ausência de α -glucosidase, nenhuma das amostras continham a hexose que seria detectável com m/z 219 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (**FIGURA 18 C e E**). Entretanto, o íon de m/z 219 foi encontrado na amostra LP364 após o tratamento enzimático com α -glucosidase (**FIGURA 18 F**). Ainda, um pequeno, mas significativo sinal da Hex₃ pode ser visto no espectro da amostra LP364 na ausência da α -

glucosidase com m/z 543.17 $[M+K]^+$ (**FIGURA 18 E**), mas não foi vista na amostra LP350 (**FIGURA 18 C**). O tratamento enzimático da amostra LP364 com α -glucosidase resultou no completo desaparecimento deste sinal, comprovando este ser proveniente da Hex₃ (**FIGURA 18 F**). Esses resultados comprovam que o trissacarídeo presente na amostra LP364 é proveniente da maltotriose e que seu sinal de dissacarídeo é, provavelmente, uma mistura de lactose e maltose.

4.3.2.4. *Análises das amostras de leite em pó com β -galactosidase (FIGURA 19)*

A solução do branco com tampão com β -galactosidase não apresentou qualquer íon que pudesse interferir com as análises das Hex, Hex₂ e Hex₃ (**FIGURA 19 A e B**). O sinal da Hex₃ esta presente na amostra LP364 tanto na ausência quanto na presença da enzima β -galactosidase com m/z 527 $[M+Na]^+$, mas não ocorre na amostra LP350 (**FIGURA 19 C – F**, e **Figura 20 A e B**). O tratamento de ambas as amostras de leite em pó, LP350 e LP364, com a enzima β -galactosidase resultou no aparecimento do sinal da Hex com m/z 203 $[M+Na]^+$. Sendo assim, comprovou-se que ambas as amostras continham lactose, e que o adulterante em questão é adicionado a amostra fraudada, mas não substitui o açúcar principal do leite.

O resumo dos dados obtidos em todas as digestões enzimáticas é apresentado na

TABELA 4. Como se pode observar, ambas as amostras de leite em pó apresentam lactose em suas composições, entretanto a amostra LP350 não apresenta adição de maltodextrina, enquanto que a amostra 364 apresenta, concluindo-se assim que esta se trata de uma amostra fraudada.

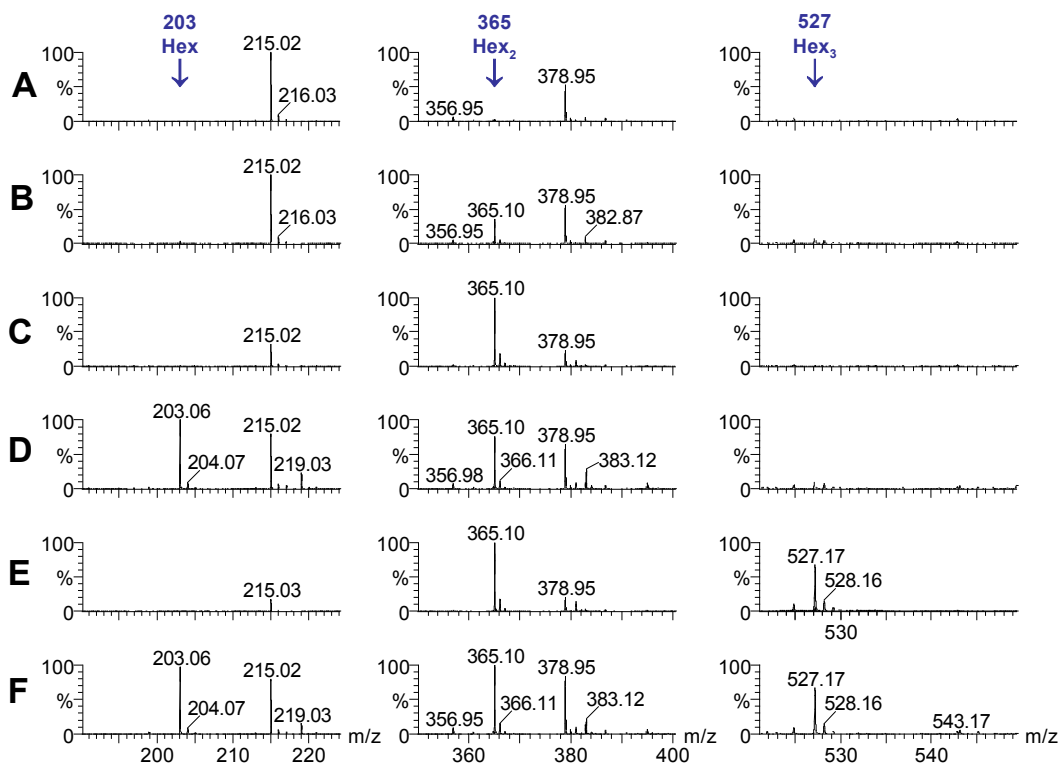


FIGURA 19. Espectro de massa de ESI(+)-MS das amostras de leite em pó com e sem a enzima β -galactosidase, **A)** branco: tampão sem β -galactosidase, **B)** branco: tampão com β -galactosidase, **C)** LP350 sem β -galactosidase, **D)** LP350 com β -galactosidase, **E)** LP364 sem β -galactosidase, **F)** LP364 com β -galactosidase

* Solução tampão de Na_2HPO_4 /citrato

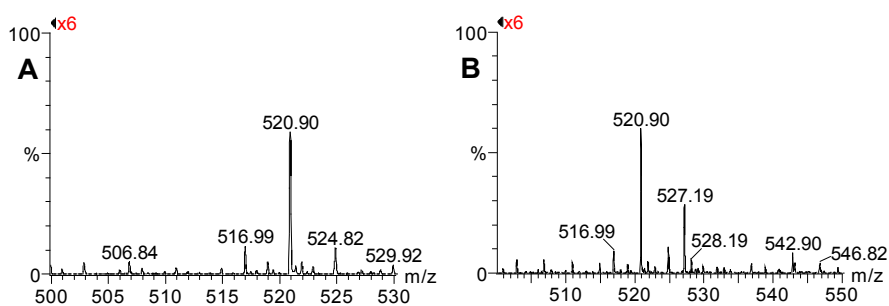


Figura 20. Espectro de massa de ESI(+)-MS das amostras de leite em pó na faixa de m/z 500 – 550, **A)** LP350 sem β -galactosidase, **B)** LP364 sem β -galactosidase

TABELA 4. Digestão de padrões e amostras de leite em pó

Substrato	Enzima	Hex	Hex ₂	Hex ₃
		Intensidade Relativa (%)		
maltotriose	β -Galactosidase	0	10	100
maltotriose	α -Glucosidase	48	3	0
lactose	β -Galactosidase	61	52	0
lactose	α -Glucosidase	0	100	0
lactose + maltose	β -Galactosidase	20	100	8
lactose + maltose	α -Glucosidase	34	100	0
MP 350	β -Galactosidase	100	76	0
MP 350	α -Glucosidase	0	100	0
MP 364	β -Galactosidase	97	100	68
MP 364	α -Glucosidase	10	100	2

4.4. Conclusão

Como exemplificado neste estudo, o uso da técnica de *fingerprinting* por espectrometria de massas proporciona um método direto, simples, sensível, robusto e altamente seletivo para uma rápida identificação da adição de maltodextrina em leite em pó, como foi comprovado pelos ensaios de digestão enzimática, podendo ainda ser utilizado como método de controle de qualidade e controle de matéria prima.

CAPÍTULO 5:

DETECÇÃO DE ÓLEOS

VEGETAIS E GORDURAS

EM LEITE EM PÓ

5. CAPÍTULO 5

5.1. Introdução

Por séculos o leite bovino tem sido amplamente consumido pelos humanos em função de sua grande relevância nutricional, particularmente na infância⁹⁹. O leite bovino contém cerca de 3-4% de gordura, sendo que esta é formada por cerca de 98% de TAG e 2% de outros lipídios como diacilgliceróis, fosfolipídios e colesterol¹⁰⁰. Em leite em pó de origem bovina, devido a evaporação da fase aquosa, há a concentração dos compostos do leite, e as suas quantidades médias são (em massa): 28% de proteína, 51% de carboidratos e 27% de gordura¹⁰¹.

A adição de óleos e gorduras não lácteas ao leite e seus derivados é uma prática antiga, apesar de ilegal, em muitos países^{102,103}, e tem se tornado cada vez mais comum e sofisticada. Criminosos tem por vezes conseguido escapar de condenações ao questionarem a confiabilidade das metodologias usadas para a detecção de adulteração de leite. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de novos métodos, mais rápidos, sensíveis e inquestionáveis. Normalmente, o leite não adulterado e aqueles adulterados pela adição de gordura não lácteas são investigadas utilizando técnicas cromatográficas líquidas e gasosas^{103,104}. Goudjil, *et al.*¹⁰⁵ reportaram que a determinação das classes de TAG por cromatografia gasosa é um critério efetivo para a avaliação da origem do leite (espécie de mamífero produtora) e para detectar a mistura de gorduras exógenas em leite. O GC é também utilizado como o método oficial para a análise da pureza da gordura do leite na comunidade europeia¹⁰⁵. No entanto, nestas abordagens são necessárias diversas etapas de preparo de amostra como saponificação de lipídios, extração do lipídios não saponificáveis,

⁹⁹ FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London:Blackie Academic & Professional, **1998**.

¹⁰⁰ BOTARO, B.G.; LIMA, Y.V.R.; AQUINO, A.A. *et al. Journal of Dairy Research*. **2008**, 75:176-181.

¹⁰¹ KIM, E.H.J.; CHEN, X.D.; PEARCE, D. *Colloid Surface B-Biointerfaces*. **2005**, 46:182-187.

¹⁰² MOKKENTIN, J. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2007**, 109:505-510.

¹⁰³ GUTIÉRREZ, R.; VEGA, S.; DÍAZ, G. *et al. Journal of Dairy Science*. **2009**, 92:1846-1855.

¹⁰⁴ PICARIELLO, G.; SACCHI, R.; ADDEO, F. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2007**, 109:511-524.

¹⁰⁵ GOUDJIL, H.; FONTECHA, J.; FRAGA, M.J. *et al. Journal of American Oil Chemists Society*. **2003**, 80:219-222.

pré-separação e derivatização^{106,107}. A espectrometria de massas tem sido cada vez mais utilizada para identificar adulterações em alimentos e leite^{108,109}, devido a sua simplicidade e a necessidade de mínimo preparo de amostras (muitas vezes somente a extração com algum solvente orgânico). Entre as técnicas de espectrometria de massas, o MALDI-MS tem se mostrado uma valiosa ferramenta para a análise de óleos e gorduras ao fornecer perfis característicos de TAG^{67,104}. O presente estudo avaliou o uso de MALDI-MS para a detecção de adulteração de leite em pó com gorduras não lácteas através do perfil de TAG intacto de amostras extraídas com *n*-hexano.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Reagentes

A matriz 2,5-ácido dihidroxibenzóico (2,5-DHB) foi adquirida da Sigma Aldrich (USA). Metanol (HPLC-grade) e ácido fórmico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA) e utilizados sem purificação. A água deionizada foi obtida em um sistema Milli-Q (Millipore, USA).

5.2.2. Preparo das soluções de leite em pó

A gordura do leite foi extraída utilizando-se *n*-hexano. Para isso, 100 mg de leite em pó foram pesados em um tubo ao qual 1mL de *n*-hexano foi adicionado. A amostra foi agitada em Vórtex. Após esta etapa as amostras foram centrifugadas por 2 minutos. Para a identificação do perfil de tri-glicerídeos (TAGs), 2 µL da fase do *n*-hexano foram esgotados em uma placa de MALDI-TOF a qual foi deixada em temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente da amostra. A matriz de MALDI (1 µL) foi depositada sobre a amostra, e a placa foi novamente deixada em temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente da matriz. A matriz de MALDI foi preparada com 1% (m.v⁻¹) de 2,5-DHB dissolvido em 1000 µL de metanol.

¹⁰⁶ KAMM, W.; DIONISI, F.; HISCHENHUBER, C. *et al. European Journal of Lipid Science and Technology*. **2002**, 104:756-761.

¹⁰⁷ KAROUI, R.; BAERDEMAEKER, J. *Food Chemistry*. **2007**, 102:621-640.

¹⁰⁸ HUANG, G.M.; ZHENG, O.Y.; COOKS, R.G. *Chemical Communications*. **2009**, 5:556-558.

¹⁰⁹ ZHU, L.; GAMEZ, G.; CHEN, H. *et al. Chemical Communications*. **2009**, 5:559-561.

5.2.3. Análise por MALDI-QTOF MS

Um MALDI-QTOF Premier (Waters – Micromass, Inglaterra) foi utilizado para a realização deste experimento. Os espectros de massa foram obtidos no modo positivo (LDI+) com um LASER de nitrogênio, utilizando-se os seguintes parâmetros gerais: faixa de massa entre 700,0 e 1000,0 Da, aquisição automática de dados e resolução de 10000. Cada espectro foi adquirido em ciclos de 1 segundo e acumulados por 1 minuto.

Para classificar as amostras após a obtenção dos fingerprintings no MALDI-QTOF MS, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) com os dados obtidos, utilizando-se o software Piroutte v.3.11 (Infometrix, USA). Para isso a abundância relativa dos principais íons dos TAGs foram utilizados.

5.3. Resultados e Discussão

A **FIGURA 21** apresenta os espectros obtidos por MALDI-QTOF MS das amostras de leite em pó no modo positivo.

O espectro de massa revela a presença de TAGs que são detectados como adutos de sódio¹¹⁰ e suas identificações e abundâncias relativas estão listadas na TABELA 5. As amostras controles apresentam um perfil diferente das amostras adulteradas, como pode ser visto na **FIGURA 21**. A falsificação de amostras de leite pela adição de óleos ou gorduras alteram seu *fingerprinting*, através do aumento dos íons de m/z 881 e 907. De acordo com Picariello *et al.*¹¹¹, os sinais de m/z 881,8, 907,8, 909,8 e 911,8 correspondem aos TAGs POO, OOO, OSO e SSO (ácidos P=palmitico, O=oléico, e S=esteárico), respectivamente.

As diferenças observadas entre os espectros das **FIGURA 21 B e C** são um indicativo que as amostras são adulteradas utilizando diferentes níveis de óleos ou gorduras.

Os espectros de MALDI-QTOF das amostras analisadas foram comparados com dados previamente obtidos e cedidos pela Polícia Federal constantes da **TABELA 6** que apresentam

¹¹⁰ SARAIVA, S. A.; CATHARINO, R. R.; CABRAL, E. C. *et al. Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2009**, 57:4030-4034.

¹¹¹ PICARIELLO, G.; SACCHI, R.; ADDEO, F. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **2007**, 109:511-524.

os principais parâmetros em termos de qualidade de leite. Os parâmetros que apresentaram diferenças significativas nas amostras analisadas estavam relacionados com os níveis de proteína e Caseino-macro-peptídeo (CMP). Geralmente o nível de proteína de um leite em pó integral é de cerca de 25-28% $\mu\text{g g}^{-1}$ ¹¹². Além disso, os altos níveis de CMP indicam uma adulteração, uma vez que o CMP é um componente específico do soro de leite¹¹³. Esses dados presentes na **TABELA 6** colaboraram para a classificação das amostras nos grupos controle e adulterado.

Para testar o desempenho do *fingerprinting* por MALDI-QTOF MS para a classificação de amostras de leite em pó, foi realizada a análise de PCA. A FIGURA 22 apresenta o gráfico de PC1 por PC2 dos dados obtidos por MALDI-QTOF MS das amostras de leite em pó (controle e adulterada). As amostras controle ficaram claramente agrupadas e separadas das amostras adulteradas. O gráfico bidimensional (PC1 por PC2) conseguiu explicar mais de 99% da variação entre as amostras.

¹¹² BOTARO, B. G., LIMA, Y. V. R., AQUINO, A. A., SANTOS, M. V. *Journal of Dairy Research*. **2007**, 75:176-181.

¹¹³ LÓPEZ-FADINO, R., OLANO, A. *Food Science and Technology International*, **1999**, 5:121-137.

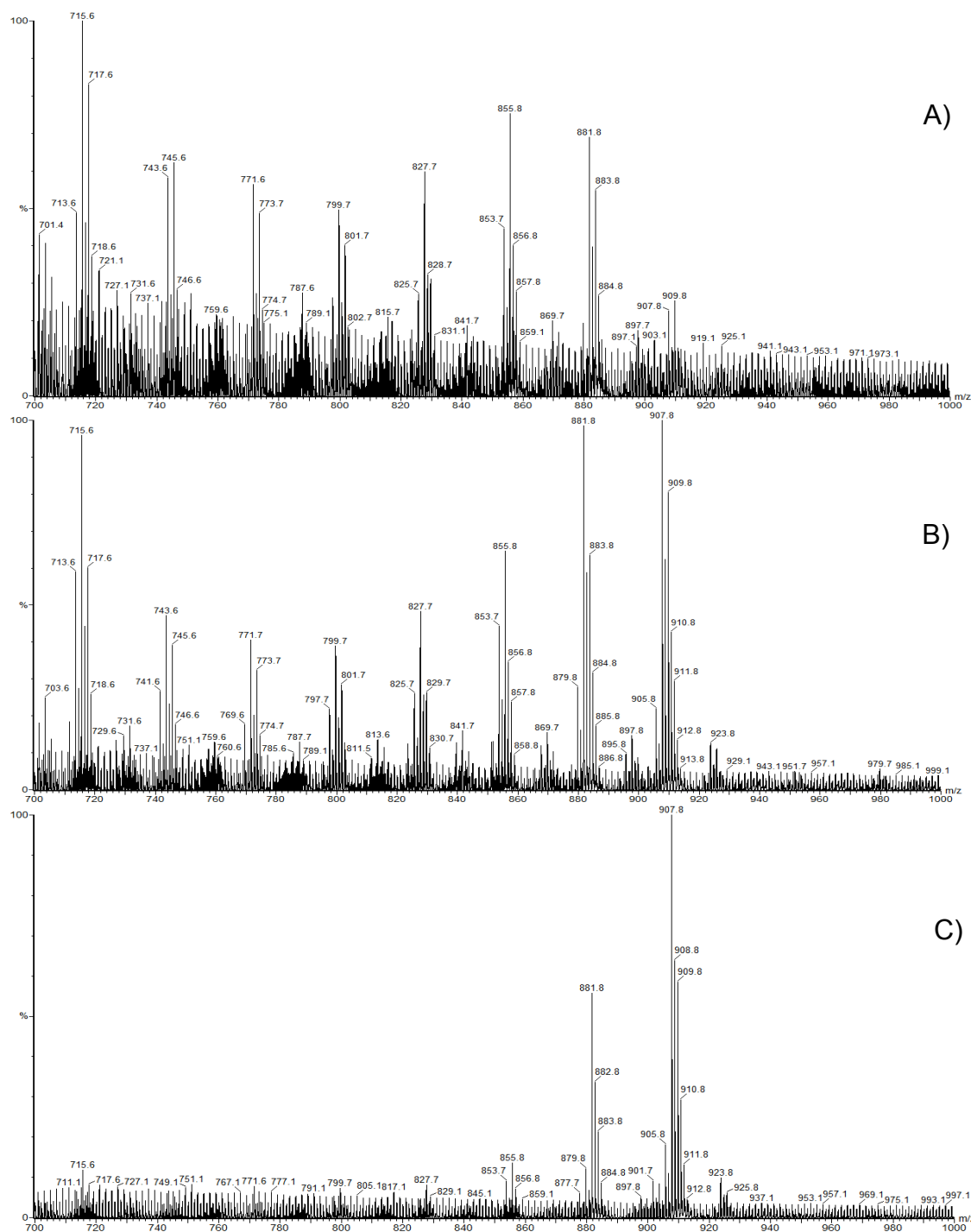


FIGURA 21. Espectro de MALDI-QTOF(+) de **a)** leite em pó sem adulteração, **b)** leite em pó com nível médio de adulteração e **c)** leite em pó com nível alto de adulteração

TABELA 5. Atribuição e abundância relativa (%) dos principais íons observados no espectro de MALDI-QTOF(+) nas amostras de leite em pó

m/z [M + Na] ⁺	Fórmula Molecular	NC/LD ¹	Amostras controle ²		Amostras Adulteradas ²	
			D ³	K ³	E ³	I ³
713.6	C ₃₉ H ₇₄ O ₆	36:0	54	55	42	5
715.6	C ₄₁ H ₇₈ O ₆	38:0	100	100	74	9
717.6	C ₄₃ H ₈₂ O ₆	40:0	67	74	51	6
743.7	C ₄₅ H ₈₄ O ₆	42:1	58	53	40	5
745.7	C ₄₅ H ₈₆ O ₆	42:0	51	49	39	5
771.7	C ₄₇ H ₈₈ O ₆	44:1	51	48	34	5
799.7	C ₄₉ H ₉₂ O ₆	46:1	52	45	37	5
825.7	C ₅₁ H ₉₄ O ₆	50:6	33	27	25	4
827.7	C ₅₁ H ₉₆ O ₆	50:5	69	58	44	6
829.7	C ₅₁ H ₉₈ O ₆	50:4	44	26	31	4
851.8	C ₅₃ H ₉₆ O ₆	50:3	19	13	12	11
853.8	C ₅₃ H ₉₈ O ₆	50:2	57	47	44	6
855.8	C ₅₃ H ₁₀₀ O ₆	50:1	86	71	66	12
857.8	C ₅₃ H ₁₀₂ O ₆	50:0	42	24	30	4
881.8	C ₅₅ H ₁₀₂ O ₆	52:2	32	70	100	52
883.8	C ₅₅ H ₁₀₄ O ₆	52:1	83	52	68	21
905.8	C ₅₇ H ₁₀₂ O ₆	54:4	32	9	22	19
907.8	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	54:3	33	27	94	100
909.8	C ₅₇ H ₁₀₆ O ₆	54:2	20	30	79	64
911.8	C ₅₇ H ₁₀₈ O ₆	54:1	18	14	30	15

¹ Número de carbonos (NC)/ligações duplas das unidades de ácidos graxos (LD);

² Abundância relativa (comparada ao íon de maior intensidade e normalizado para 100%);

³ Identificação das amostras (veja TABELA 6).

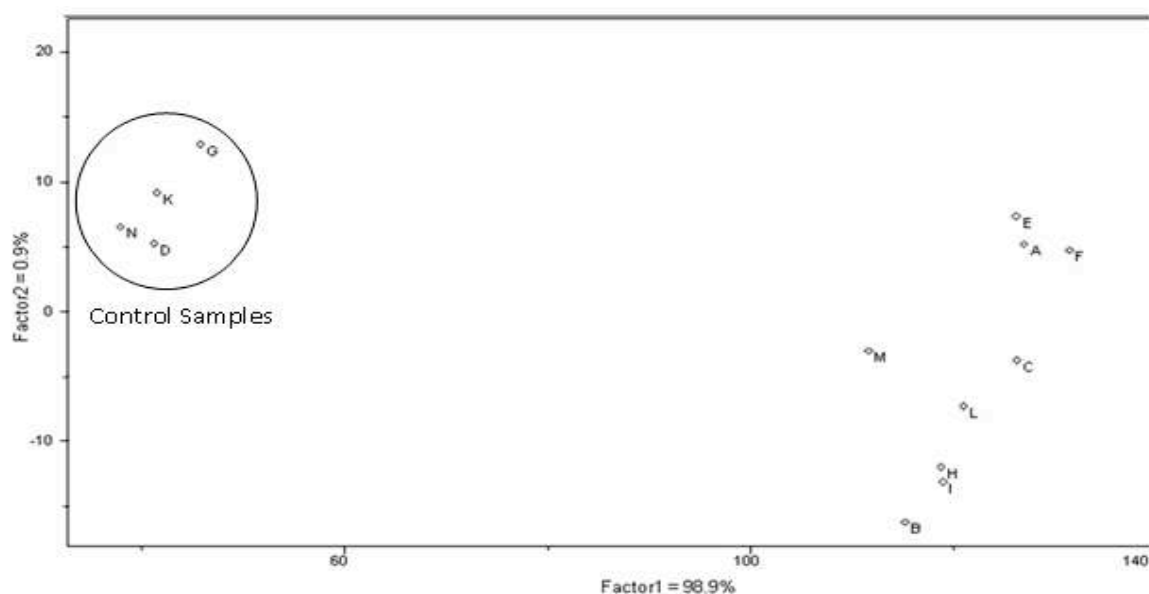


FIGURA 22. PCA das amostras de leite em pó (n=14) obtido a partir dos dados de MALDI-QTOF(+)-MS

TABELA 6. Resultados de análises prévias das amostras estudadas

Identificação da Amostra	Lactose % (m/m)	Umidade % (m/m)	Gordura % (m/m)	Proteína % (m/m)	CMP ¹
A	48.0	3.1	26.1	15.0	469
B	49.8	3.8	27.4	15.9	578
C	50.9	3.5	26.5	13.2	594
D ²	38.0	2.8	28.3	25.3	24
E	43.3	3.3	27.0	20.3	222
F	46.0	2.4	28.0	15.0	478
G ²	38.3	2.4	28.8	25.1	40
H	47.4	2.9	28.5	15.0	550
I	47.0	2.5	28.5	14.6	486
J	45.9	2.7	26.8	16.1	396
K ²	37.7	3.4	28.1	25.7	0
L	44.8	2.4	28.3	17.5	320
M	56.9	2.6	23.3	10.7	626
N ²	37.6	3.7	27.0	24.8	42

¹ Caseino-macro-peptídeo

² Amostra controle

5.4. Conclusão

A técnica de fingerprint por MALDI-QTOF MS conseguiu detectar, com precisão a adição de óleo/gordura exógena em leite em pó, utilizando um procedimento simples e rápido. Este procedimento proporcionou um método robusto e seletivo para a classificação e o controle de qualidade do leite em pó. As amostras puderam ser claramente diferenciadas entre dois grupos distintos de *fingerprintings*, tanto visualmente (avaliação dos espectros), quanto mais profundamente (através do emprego de ferramentas estatísticas – PCA). A análise por MALDI-MS possibilita a aquisição de dados informativos para a detecção de gordura/óleo exógeno presente no leite em pó. Desta forma, a detecção destes tipos de fraudes em leite em pó pode ser realizada sem qualquer hesitação, através da metodologia desenvolvida neste trabalho.

CAPÍTULO 6:

CONCLUSÃO GERAL

6. CAPÍTULO 6

Nos últimos anos, estudos envolvendo MS tem se expandido em ritmo impressionante no campo das ciências biológicas. As novas exigências de qualidade e segurança dos mercados consumidores impulsionam a busca de métodos analíticos capazes de buscarem limites de detecção e quantificação cada vez menores. Devido a grande versatilidade da técnica de MS, foi possível, neste trabalho, o desenvolvimento de métodos analíticos em duas áreas distintas (reprodução animal e qualidade de produtos de origem animal), dentro de um mesmo tema (produção animal), com grande eficiência.

Vantagens como a velocidade das análises e o pouco ou nenhum preparo de amostra, bem como a redução do volume de amostras e a facilidade de interpretação de resultados também são vantagens obtidas nestes métodos analíticos.

Esta tese se enquadra em um campo de fronteira, se dispondo a abrir um diálogo mais profundo entre a química e a medicina veterinária. Sendo assim ela não se apresenta como ponto final deste assunto, pelo contrário, ela inicia uma linha de pesquisa na qual diversos novos desafios ainda estão por vir.

Fica claro então que é de fundamental importância desenvolver experiência científica nesta área em grupos multidisciplinares de modo a criar competências para estes novos desafios e resolver problemas na área de agronegócios.

CAPÍTULO 7:

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

7. CAPÍTULO 7:

- ¹ GROSS, J.H. *Mass Spectrometry – A Textbook*. Berlin: Springer, 2004.
- ² NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th Edition, USA:W.H. Freeman, 1100 p., **2004**.
- ³ SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. *Organic Chemistry*. 8th Edition, New York:John Wiley & Sons Inc., 1272p., **2004**.
- ⁴ THIBIER M. *IETS Embryo Transfer Newsletter*. **2006**, 24:12-18.
- ⁵ PONTES, J.H.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V. *et al. Theriogenology*. **2009**, 71:690-697.
- ⁶ BONI, R.; TOSTI, E.; ROVIELLO, S. *et al. Biology of Reproduction*, **1999**, 61:1050-1055.
- ⁷ RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S. *et al. Biology of Reproduction*, **2003**, 68:236-243.
- ⁸ WRENZYCKI, C.; HERRMAN, D.; LUCAS-HAHN, A. *et al. Reproduction, Fertility and Development*. **2005**, 17:23-35, 2005.
- ⁹ KHANDOKER, M.; TSUJII, H. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences*. **1999**, 12:169-173.
- ¹⁰ FLYNN, T.J.; HILLMAN, N. *Biology of Reproduction*. **1978**, 19:922-926.
- ¹¹ FLYNN, T.J.; HILLMAN, N. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*. **1980**, 56:157-168.
- ¹² KIM, J.Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M. *et al. Reproduction*. **2001**, 122:131-138.
- ¹³ Khandoker MAMY, Tsujii H, Karasawa D. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences*. **1997**, 10:523-527.
- ¹⁴ Khandoker MAMY, Tsujii H, Karasawa D. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences*. **1998**, 11:60-64.
- ¹⁵ MCEVOY, T.G.; COULL, G.D.; BROADBENT, P.J. *et al. Journal of Reproduction & Fertility*. **2000**, 118:163-170.
- ¹⁶ BRENNAN, J.T. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. **1997**, 57:467-472.
- ¹⁷ HAGGARTY, P.; WOOD, M.; FERGUSON, E. *et al. Human Reproduction*. **2006**, 21:766-773.
- ¹⁸ PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I. *et al. Animal Reproduction Science*. **2007**, 98:293-301.
- ¹⁹ PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J. *et al. Animal Reproduction Science*. **2008**, 106:322-332.
- ²⁰ FUCHS, B.; NIMPTSCH, A.; SUSS, R. *et al. Journal of AOAC International*. **2008**, 9:1227-1236.

- ²¹ FUCHS, B.; SCHILLER, J.; SUSS, R. *et al. Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2008**, 392:849-860.
- ²² FUCHS, B.; JAKOP, U.; GÖRITZ, F. *et al. Theriogenology*. **2009**, 71:568-575.
- ²³ SCHILLER, J.; SUSS, R.; FUCHS, B. *et al. Frontiers in Bioscience*. **2007**, 1:2568-2579.
- ²⁴ SCHILLER, J.; SUSS, R.; ARNHOLD, J. *et al. Progress in Lipid Research*. **2004**, 43:449-488.
- ²⁵ CARERI, M.; BIANCHI, F.; CORRADINI, C. *Journal of Chromatography A*. **2002**, 970:3-64.
- ²⁶ FERNANDES, V.C.; DOMINGUES, V.F.; MATEUS, N. *et al. Journal of Chromatographic Science*. **2011**, 49:715-730.
- ²⁷ MERCADANTE, A.Z. *Ciência de Alimentos - Avanços e Perspectivas. Volume II*. cap. 19, Campinas: UNICAMP, p. 65-67, **2001**.
- ²⁸ CECCHI, H.M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. Campinas:UNICAMP, 212 p., **1999**.
- ²⁹ CARBONE, V.; MONTORO, P.; TOMMASI, N. *et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2004**, 34:295-304.
- ³⁰ RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; PASTORE, G.M. *Ciência de Alimentos: Avanços e Perspectivas na América Latina*. Campinas: Fundação Cargil, **1997**.
- ³¹ GODOY, H.T. II Seminário sobre Alimentos Enriquecidos. ITAL, p. 43, **1997**.
- ³² STOKES, P.; WEBB, K. *Journal of Chromatography A*. **1999**, 864:59-67.
- ³³ COLE, R.B., Editor. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*. New York: Wiley, 577 p., **1997**.
- ³⁴ NIESSEN, W.M.A. In: NIESSEN, W.M.A., Editor. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. 2ed. Chromatographic Science Series Vol. 79*. New York: Marcel Dekker, 648 p., **1999**.
- ³⁵ STEWART, I.I. *Spectrochimica Acta Part B*. **1999**, 54:1649-1695.
- ³⁶ LOO, J.A. *Mass Spectrometry Reviews*. **1997**, 16:1-23.
- ³⁷ KUSSMANN, M.; NORDHOFF, E.; RAHBK-NIELSEN, H. *et al. Journal of Mass Spectrometry*. **1997**, 32:593–601.
- ³⁸ KARAS, M.; HILLENKAMP, F. *Analytical Chemistry*. **1988**, 60:2299-2301.
- ³⁹ VAN MEER, M.; VOELKER, G.D.R.; FEIGENSON, G.W. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2008**, 9:112-124.
- ⁴⁰ EDIDIN, M. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2003**, 4:414-418.
- ⁴¹ ROBERTS, L.D.; MCCOMBIE, G.; TITMAN, C.M. *et al. Journal of Chromatography B*. **2008**, 871:174-181.
- ⁴² EJSING, C.S.; SAMPAIO, J.L.; SURENDRANATH, V *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2009**, 106:2136-2141.
- ⁴³ LI, L.; GARDEN, R.W.; SWEEDLER, J.V. *Trends in Biotechnology*. **2000**, 18:151-160.

- ⁴⁴ FUCHS, B.; SCHILLER, J. *Subcellular Biochemistry*. **2008**, 49:541-565.
- ⁴⁵ TAO, T.; DEL VALLE, A. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. **2008**, 25:287-296.
- ⁴⁶ PEREIRA, R.M.; MARQUES, C.C. *Cell Tissue Bank*. **2008**, 9:267-277.
- ⁴⁷ ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T. *et al. Molecular Reproduction and Development*. **2002**, 61:57-66.
- ⁴⁸ BARCELO-FIMBRES, M.; SEIDEL, G.E. *Molecular Reproduction and Development*. **2007**, 74:1406-1418.
- ⁴⁹ GEORGE, F.; DANIAUX, C.; GENICOT, G.; *et al. Theriogenology*. **2008**, 69:612-623.
- ⁵⁰ DINNYES, A.; NEDAMBALE, T.L. *Reproduction, Fertility and Development*. **2009**, 21:45-59.
- ⁵¹ DESAI, N.; BLACKMON, H.; SZEPTYCKI, J. *et al. Reproductive BioMedicine Online*. **2007**, 14:208-213.
- ⁵² COBO, A.; KUWAYAMA, M.; Perez, S. *et al. Fertility and Sterility*. **2008**, 89:1657-1664.
- ⁵³ HIRAOKA, K.; FUCHIWAKI, M.; HORIUCHI, T.; *et al. Reproductive BioMedicine Online*. **2008**, 17:689-694.
- ⁵⁴ MATORRAS, R.; RUIZ, J.I.; MENDOZA, R. *et al. Human Reproduction*. **1998**, 13:2227-2230.
- ⁵⁵ NETO, A.S.C.; SANCHES, B.V.; BINELLI, M. *et al. Theriogenology*. **2005**, 63:1249-1255.
- ⁵⁶ FERREIRA, C.R.; SOUZA, G.H.M.F.; RICCIO, M.F. *et al. Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2009**, 23:1313-1320.
- ⁵⁷ SCHILLER, J.; ARNHOLD, J.; BENARD, S. *et al. Analytical Biochemistry*. **1999**, 267:46-56.
- ⁵⁸ RECKS, M.A.; SEABORN, G.T. *Fish Physiology and Biochemistry*. **2008**, 34:275-287.
- ⁵⁹ TROY, S.; ANDERSON, W.A.; SPIELMAN, A. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. **1975**, 50:457-461.
- ⁶⁰ BRIEGEL, H. *Journal of Insect Physiology*. **1990**, 36:165-172.
- ⁶¹ KAWOOYA, J.K.; OSIR, E.O.; LAW, J.H. *The Journal of Biological Chemistry*. **1988**, 263:8740-8747.
- ⁶² BRUGGER, B.; ERBEN, G.; SANDHOFF, R. *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1997**, 94:2339-2344.
- ⁶³ PETKOVIC, M.; SCHILLER, J.; MULLER, M. *et al. Analytical Biochemistry*. **2001**, 289:202-216.
- ⁶⁴ FUCHS, B.; JAKOP, U.; GORITZ, F. *et al. Theriogenology*. **2009**, 71:568-575.
- ⁶⁵ HAYASAKA, T.; GOTO-INOUE, N.; SUGIURA, Y. *et al. Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2008**, 22:3415-3426.
- ⁶⁶ BURNUM, K.E.; CORNETT, D.S.; PUOLITAIVAL, S.M. *et al. Journal of Lipid Research*. **2009**, 50:2290-2298.

- ⁶⁷ SARAIVA, S.A.; CABRAL, E.C.; EBERLIN, M.N. *et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, 57:4030-4034.
- ⁶⁸ WEHR, M.; FRANK, J.F. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. APHA:Washington, D.C., 2004.
- ⁶⁹ RAMOS, M.; JUÁREZ, M. *Bulletin of the International Dairy Federation*. **1986**, 202:175-187.
- ⁷⁰ CSERHÁTI, T.; FORGÁCS, E.; DEYL, Z. *et al. Biomedical Chromatography*. **2005**, 19:183-190.
- ⁷¹ DE LA FUENTE, M.A.; JUÁREZ, M. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2005**, 45:563-585.
- ⁷² KAROUI, R.; DE BAERDEMAEKER, J. *Food Chemistry*. **2007**, 102:621-640.
- ⁷³ FELIGINI, M.; BONIZZI, I.; CURIK, V.C. *et al. Food Technology and Biotechnology*. **2005**, 43:91-95.
- ⁷⁴ CHENG, Y.H.; CHEN, S.D.; WENIG, C.F. *Journal of Animal Science*. **2006**, 19:1503-1507.
- ⁷⁵ YUE, Q.; CHEN, D.; WU, C. *et al. Shipin Kexue (Beijing, China)*. **2009**, 30:190-193. [Chemical Abstracts. **2009**].
- ⁷⁶ DI PINTO, A.; CONVERSANO, M.C.; FORTE, V.T. *et al. Journal of Food Quality*. **2004**, 27:428-435.
- ⁷⁷ MULLER, L.; BARTAK, P.; BEDNAR, P. *et al. Electrophoresis*. **2008**, 29:2088-2093.
- ⁷⁸ FANTON, C.; DELOGU, G.; MACCIONI, E. *et al. Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **1998**, 12:1569-1573.
- ⁷⁹ COZZOLINO, R.; PASSALACQUA, S.; SALEMI, S. *et al. Journal of Mass Spectrometry*. **2002**, 37:985-991.
- ⁸⁰ CHEN, R.K.; CHANG, L.W.; CHUNG, Y.Y. *et al. Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2004**, 18:1167-1171.
- ⁸¹ ZUCKSCHWERDT, J.B.; NIXON, C.E.; CINER, F.L. *et al. Journal of Food Protection*. **2008**, 71:1007-1014.
- ⁸² CORDEWENER, J.H.G.; LUYKX, D.M.A.M.; FRANKHUIZEN, R. *et al. Journal of Separation Science*. **2009**, 32:1216-1223.
- ⁸³ SACCO, D.; BRESCIA, M.A.; SGARAMELLA, A. *et al. Food Chemistry*. **2009**, 114:1559-1563.
- ⁸⁴ PIASENTIER, E.; VALUSSO, R.; CAMIN, F. *et al. Meat Science*. **2003**, 64:239-247.
- ⁸⁵ DANE, A.J.; CODY, R. B. *Analyst*. **2010**, 135:696-699.
- ⁸⁶ HUANG, G.; XU, W.; VISBAL-ONUFRAC, M.A. *et al. Analyst*. **2010**, 135:705-711.
- ⁸⁷ MAURI, P.; PIETTA, P. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2000**, 23:61-68.
- ⁸⁸ SAWAYA, A.C.H.F.; TOMAZELA, D.M.; CUNHA, I.B.S. *et al. Analyst*. **2004**, 129:739-744.
- ⁸⁹ COOPER, H.J.; MARSHALL, A.G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, 49:5710-5718.

- ⁹⁰ MØLLER, J.K.S.; CATHARINO, R.R.; EBERLIN, M.N. *Analyst*. **2005**, 130, 890–897.
- ⁹¹ SOUZA, P.P.; OLIVEIRA, L.C.A.; CATHARINO, R.R. *et al. Food Chemistry*. **2009**, 115:1064-1068.
- ⁹² SOUZA, P.P.; SIEBALD, H.G.L.; AUGUSTI, D.V. *et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55:2094-2012.
- ⁹³ SOUZA, P.P.; CATHARINO, R.R.; AUGUSTI, D.V. *et al. Journal of Mass Spectrometry*. **2007**, 42:1294-1299.
- ⁹⁴ FERRÃO, M.F.; MELLO, C.; BORIN, A. *et al. Química Nova*. **2007**, 30:852-859.
- ⁹⁵ MORALES, V.; OLANO, A.; CORZO, N. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52:6732-6736.
- ⁹⁶ MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Instrução Normativa No. 14 de 27 de abril de 2007: Métodos Analíticos Físico-Químicos para Detecção da Maltodextrina em leite*. **2007**.
- ⁹⁷ Enzymatic assay of α -glucosidase (EC 3.2.1.20). Sigma quality control test procedure for product Nos. G-5003, G-6136, G-7256, G-8889, G0660, and G-3651. Sigma:St. Louis, MO, 3 p., **1996**.
- ⁹⁸ Enzymatic assay of β -galactosidase (EC 3.2.1.23). *Sigma quality control test procedure for product No. G-5160*. Sigma:St. Louis, MO, 3 p., **2001**.
- ⁹⁹ FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London:Blackie Academic & Professional, **1998**.
- ¹⁰⁰ BOTARO, B.G.; LIMA, Y.V.R.; AQUINO, A.A. *et al. Journal of Dairy Research*. **2008**, 75:176-181.
- ¹⁰¹ KIM, E.H.J.; CHEN, X.D.; PEARCE, D. *Colloid Surface B-Biointerfaces*. **2005**, 46:182-187.
- ¹⁰² MOLKENTIN, J. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2007**, 109:505-510.
- ¹⁰³ GUTIÉRREZ, R.; VEGA, S.; DÍAZ, G. *et al. Journal of Dairy Science*. **2009**, 92:1846-1855.
- ¹⁰⁴ PICARIELLO, G.; SACCHI, R.; ADDEO, F. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2007**, 109:511-524.
- ¹⁰⁵ GOUDJIL, H.; FONTECHA, J.; FRAGA, M.J. *et al. Journal of American Oil Chemists Society*. **2003**, 80:219-222.
- ¹⁰⁶ KAMM, W.; DIONISI, F.; HISCHENHUBER, C. *et al. European Journal of Lipid Science and Technology*. **2002**, 104:756-761.
- ¹⁰⁷ KAROUI, R.; BAERDEMAEKER, J. *Food Chemistry*. **2007**, 102:621-640.
- ¹⁰⁸ HUANG, G.M.; ZHENG, O.Y.; COOKS, R.G. *Chemical Communications*. **2009**, 5:556-558.
- ¹⁰⁹ ZHU, L.; GAMEZ, G.; CHEN, H. *et al. Chemical Communications*. **2009**, 5:559-561.
- ¹¹⁰ SARAIVA, S. A.; CATHARINO, R. R.; CABRAL, E. C. *et al. Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2009**, 57:4030-4034.
- ¹¹¹ PICARIELLO, G.; SACCHI, R.; ADDEO, F. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **2007**, 109:511-524.

¹¹² BOTARO, B. G., LIMA, Y. V. R., AQUINO, A. A., SANTOS, M. V. *Journal of Dairy Research*. **2007**, 75:176-181.

¹¹³ LÓPEZ-FADINO, R., OLANO, A. *Food Science and Technology International*, **1999**, 5:121-137.