

Artigo

Metabolômica do Exercício Físico: Uma Poderosa Ferramenta de Avaliação

Sasaqui, C. S.; Lima, K. S. C.; Sousa, R. B.; Araújo, N. A.; Pinto, J. C. C. S.; Pierucci, A. P.; Lima, A. L. S.*

Rev. Virtual Quim., 2018, 10 (5), 1207-1224. Data de publicação na Web: 15 de outubro de 2018

<http://rvq.sbq.org.br>

Metabolomics of Physical Exercise: A Powerful Assessment Tool

Abstract: This work aims to determine the metabolic profile of athletes, relating metabolites present in the human body to variables such as age, gender and physical effort to which they were submitted. Chromatographic and spectrometric methods (such as GC-MS and HPLC-MS) are used to separate, identify and quantify metabolites in serum and plasma samples. The obtained data are analyzed using multivariate statistics, using principal component analysis (PCA) and partial least squares regression for discriminant analysis (PLS-DA). In this way, the metabolites identified in the samples can be correlated with the studied variables, such as age, gender and physical effort. The results show the potential of metabolomics as an important tool to be used in the study of a variety of unknowns that may interfere in athlete's performance.

Keywords: Chromatography; PCA; PLS-DA; metabolites; athletes.

Resumo

Este trabalho procura determinar o perfil metabólico de atletas, relacionando metabólitos presentes no corpo humano a variáveis como idade, sexo e esforço físico a que foram submetidos. Métodos cromatográficos e espectrométricos (como CG-EM e CLAE-EM) são usados para separar, identificar e quantificar metabólitos em amostras de soro sanguíneo e plasma. Os dados obtidos são analisados por meio de estatística multivariada, usando análise de componentes principais (PCA) e mínimos quadrados parciais para análises de discriminantes (PLS-DA). Dessa forma, pode-se correlacionar os metabólitos identificados nas amostras às variáveis estudadas, como a idade, o sexo e o esforço físico dos atletas. Os resultados mostram o potencial da metabolômica como uma importante ferramenta a ser usada no estudo de uma variedade de incógnitas que podem interferir no desempenho dos atletas.

Palavras-chave: Cromatografia; PCA; PLS-DA; metabólitos; atletas.

* Instituto Militar de Engenharia, Seção de Engenharia Química, Divisão de Ensino e Pesquisa, Praça General Tibúrcio 80, CEP 22290-270, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

✉ santoslima@ime.eb.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20180084](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180084)

Metabolômica do Exercício Físico: Uma Poderosa Ferramenta de Avaliação

Celso S. Sasaqui,^a Keila S. C. Lima,^b Roberto B. Sousa,^c Nicolis A. de Araújo,^d José Carlos C. S. Pinto,^d Anna P. Pierucci,^e Antonio Luís S. Lima^{a,*}

^a Instituto Militar de Engenharia, Seção de Engenharia Química, Divisão de Ensino e Pesquisa, Praça General Tibúrcio 80, CEP 22290-270, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^b Instituto de Biologia do Exército, Departamento de Ensino e Pesquisa, Rua Francisco Manuel, 102, CEP 20911-270, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^c Instituto de Defesa Química, Biológica, Radiológica e Nuclear, Avenida das Américas, 28705, CEP 23020-470, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^d Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Bloco F, sala F-214, Caixa Postal 68505, CEP 21941-972, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

^e Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

* santoslina@ime.eb.br

Recebido em 28 de novembro de 2017. Aceito para publicação em 5 de outubro de 2018

1. Introdução

2. Esforço Físico

2.1. Nutrição

2.2. Genética

2.3. Fisiologia

3. Metabolômica

4. Métodos Analíticos

4.1. Moléculas orgânicas volatilizáveis

4.2. Moléculas orgânicas solúveis

5. Tratamento dos Dados

6. Preparação das Amostras e Análise dos Metabólitos

7. Considerações Finais

1. Introdução

Em todos os tipos de esportes, o objetivo do treinamento atlético é fazer com que o

corpo se adapte a um estímulo intensivo, elevar a capacidade dos vários sistemas para realizar cargas de trabalho aumentadas e, portanto, melhorar o desempenho.¹ Teoricamente, deve-se manter um equilíbrio

entre cargas de trabalho e períodos de repouso suficientes para que o regime de treinamento seja bem-sucedido. Se um volume de treinamento for muito intenso, mas os períodos de descanso forem insuficientes, poderá ocorrer um desequilíbrio entre a tensão geral experimentada durante o treinamento e a tolerância do atleta a esse esforço que pode levar o atleta a uma situação de *overreaching* ou *overtraining*,^{2,3} caracterizado por redução do desempenho, excesso de fadiga, sintomas subjetivos de estresse e inflamação transitória.^{3,4} O surgimento do estado de *overtraining* é comum no atleta de alto desempenho. Isto se deve principalmente à falta de marcadores de estresse para orientar com segurança a aplicação de cargas e garantir um período adequado de descanso.⁵ Portanto, é importante avaliar de forma abrangente o estado físico e a adaptação de um atleta, para dirigir o programa de treinamento, prevenir os distúrbios acima mencionados e melhorar o desempenho.

Embora tenham sido estudados muitos parâmetros, incluindo marcadores comportamentais e biológicos não invasivos, marcadores bioquímicos e marcadores hormonais e imunológicos, para avaliar o estado físico dos atletas e evitar o *overreaching* e o *overtraining* durante um programa de treinamento,^{6,7} não existe um método universal para o diagnóstico e monitoramento do estado físico dos atletas. Para superar esses problemas, os profissionais de educação física buscam o apoio da

nutrição, para otimizar a alimentação dos atletas, de forma que eles tenham aporte necessário de energia para suportar a carga de treinos; da estatística, para mostrar se os treinos estão sendo eficientes; da medicina, para prevenir contusões; da psicologia, para manter o foco dos atletas e, atualmente, da bioquímica, que pode fornecer informações auxiliares a todas as outras áreas. Dentro das áreas da bioquímica, temos a metabolômica, que pode medir as respostas do organismo a estímulos fisiológicos, como aumento do esforço, ou modificações genéticas,⁸ a partir da análise de sangue, urina, saliva ou outra secreção qualquer do organismo. A identificação do perfil metabólico de cada atleta pode auxiliar na identificação de problemas que podem prejudicá-los, como esforços excessivos, por exemplo.

O objetivo deste artigo é mostrar como a metabolômica pode auxiliar, de uma forma eficiente, no aperfeiçoamento dos treinos dos atletas de alto-rendimento. A metabolômica pode apresentar um perfil metabólico⁹ e identificar quais metabólitos estão relacionados com cada ação praticada pelo atleta. Pode-se relacionar o tipo e quantidade de metabólitos com a carga física dos treinos, com a alimentação do atleta, com seu gênero ou com o estado psicológico do atleta.

A seguir será apresentado como a metabolômica pode auxiliar na determinação de um perfil metabólico em atletas de alto rendimento e como esse perfil pode otimizar a performance desses atletas, de acordo com o processo da Figura 1.

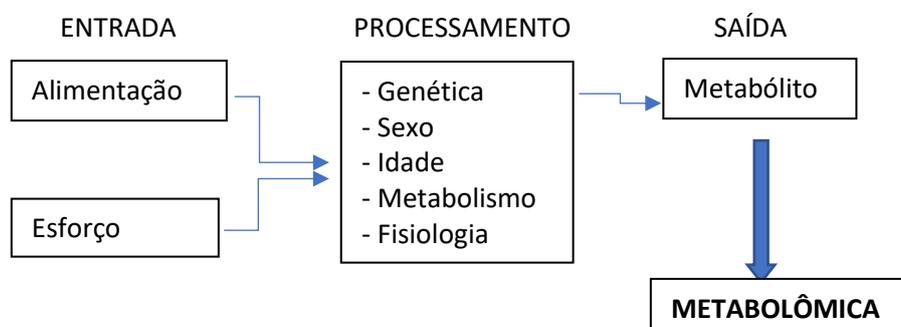


Figura 1. Processo para a análise metabolômica

2. Esforço Físico

A alta carga de treinamento a que os atletas de alto-rendimento são submetidos diariamente gera um estresse oxidativo no organismo. Isso pode ocasionar prejuízos à evolução técnica e física do atleta. Os efeitos provocados pelo estresse oxidativo podem ser minimizados com a adaptação do organismo, por meio da progressividade na evolução dos treinos¹⁰ e por um programa de treinamento adequado para cada tipo de atleta, período de treinamento e pelo esporte praticado; pela nutrição, que determinará a dieta adequada para cada período de treinamento; pela genética e fisiologia de cada atleta.

2.1. Nutrição

Nos processos metabólicos de transformação dos alimentos em energia, são gerados inúmeros metabólitos, como mostra as Figuras 2 e 3, que ilustram o papel da cadeia

respiratória das mitocôndrias na conversão dos alimentos em energia e o ciclo de Krebs ou Ácido Cítrico, respectivamente, que variam de acordo com a dieta aplicada e as atividades desenvolvidas por cada atleta. Na dieta de qualquer pessoa, devem ser ingeridas quantidades adequadas de: carboidratos, gerando glicídios; proteínas, dando origem aos peptídeos e aminoácidos; lipídeos, que fornecem os ácidos graxos; além de diversos micronutrientes que fazem o trabalho de regulação do metabolismo.¹¹ Assim sendo, a alimentação saudável e adequada à quantidade de trabalho deve ser entendida e compreendida pelos atletas de alto-rendimento como sendo o ponto de partida para que se obtenha a melhor *performance* possível e as dietas nutricionais caracterizam a estratégia complementar necessária para alcançar essa *performance*. Para os indivíduos que praticam exercícios físicos sem maiores preocupações com o desempenho, uma dieta balanceada, que atenda às recomendações dadas à população em geral, é suficiente para a manutenção da saúde e possibilitar bom desempenho físico.¹¹

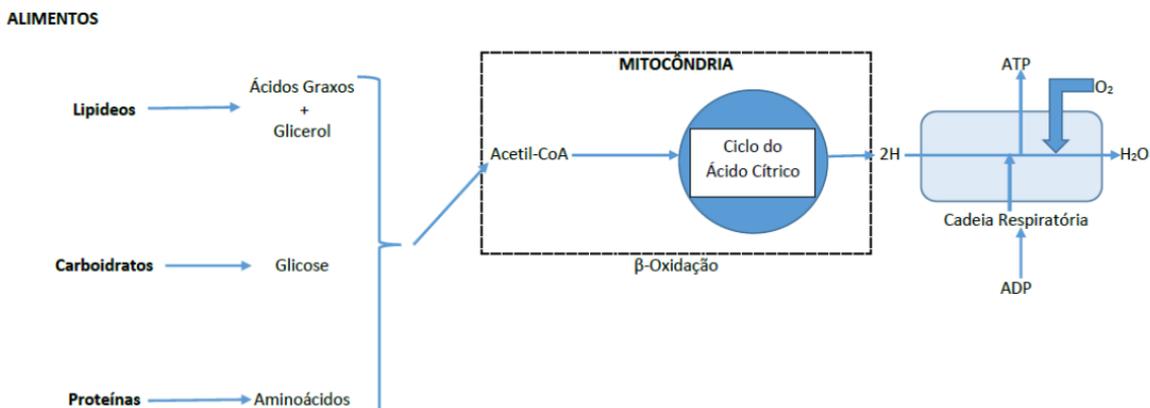


Figura 2. Oxidação dos principais nutrientes na mitocôndria¹²

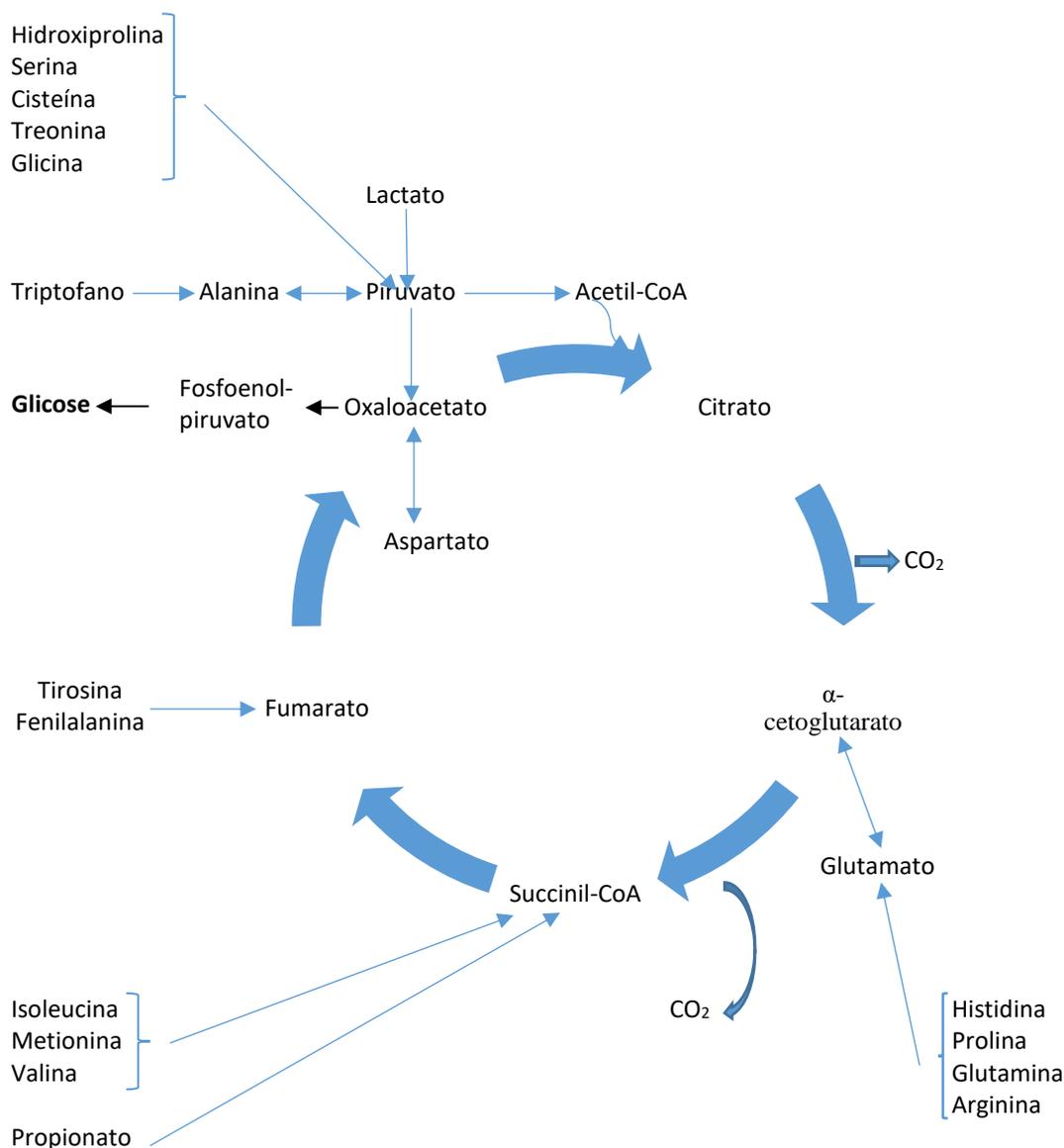


Figura 3. Destinos das cadeias carbônicas dos aminoácidos no ciclo de Krebs ou Ácido Cítrico¹²

Para se montar a dieta, deve-se ter conhecimento das características dos treinos e da rotina de cada atleta para que se possa calcular as necessidades nutricionais através de protocolos apropriados, sendo estimadas por meio de tabelas próprias. Também devem ser levados em consideração a modalidade esportiva praticada, a fase de treinamento, o calendário de competições e os objetivos da equipe técnica em relação ao desempenho, dados referentes ao metabolismo basal, demanda energética de treino, necessidades de modificação da composição corporal e fatores clínicos presentes, como as condições

de mastigação, digestão e absorção. As necessidades energéticas são calculadas por meio da soma da necessidade energética basal (protocolo de livre escolha), gasto energético médio em treino e consumo extra ou reduzido para controle de composição corporal. Levando-se em consideração o consumo calórico total e o tempo entre digestão e aproveitamento metabólico, determina-se a quantidade necessária de macronutrientes, ou seja, carboidratos, proteínas e lipídeos, essenciais na manutenção ou melhora do desempenho esportivo e saúde do corpo humano. Em

relação aos micronutrientes, ou seja, vitaminas, minerais e oligoelementos, permanece o conceito de que, quando presentes em dietas balanceadas e com diversidade de alimentos, são suficientes para a demanda requerida pelos praticantes de atividade física regular, ficando a suplementação para ocasiões especiais, como em praticantes de atividade física com anemia ferropriva e gestantes, por exemplo. O ajuste das dietas, em termos de macronutrientes, às maiores necessidades calóricas decorrentes das atividades desportivas, deve proporcionar um concomitante ajuste no consumo dos micronutrientes. Recomenda-se que sejam consideradas as orientações nutricionais destinadas à população em geral, calculadas proporcionalmente à cada 1.000 quilocalorias ingeridas. Desse modo, o incremento na oferta de micronutrientes é proporcional ao aumento calórico da dieta, mantendo-se o equilíbrio ou balanço nutricional em níveis adequados.¹¹

Por isso a Nutrição passa a ter um valor maior para a evolução do desempenho dos atletas, permitindo que os atletas tenham condições de realizar e concluir os períodos de treinamento com sucesso e não sejam atingidos por contusões, *overtrainigs* ou qualquer outro problema que afete a evolução nos treinamentos. O nutricionista é o profissional indicado, pois possui os conhecimentos para elaborar dietas alimentares específicas para cada atleta, considerando sexo, idade, período de treinamento e outros fatores individualizados.¹³

2.2 Genética

Os atletas de cada esporte apresentam características físicas semelhantes, por exemplo, os jogadores de vôlei e basquete são mais altos; os arremessadores de peso, disco e dardo são mais fortes; os corredores de longa distância são bem leves e vários outros esportes tem características físicas próprias. Por muito tempo, as grandes potências

esportivas escolhem seus atletas de acordo com as características e valências físicas verificadas em medidas antropométricas, composição corporal, testes de flexibilidade; capacidade de força de resistência e aptidão aeróbica.¹⁴ Porém esses testes podem excluir bons talentos que não se enquadram nos padrões pré-definidos para cada esporte, com base nesse testes, provavelmente não teríamos visto *Usain Bolt* quebrando todos os recordes mundiais em provas de 100 e 200 metros no atletismo.

Porém, o sequenciamento do Genoma Humano pela Biologia Molecular em 2001¹⁵ possibilitou resultados promissores no tratamento e na prevenção de diversos males, abrindo caminho para a utilização da genética na melhoria do desempenho no âmbito esportivo. No esporte de alto rendimento a biologia molecular pode ter papel importante na pré-seleção e na seleção de talentos esportivos, na manipulação genética visando ao aumento ou à diminuição da produção de determinadas substâncias pelo organismo, na prescrição do treinamento e na recuperação de lesões.¹⁶

2.3 Fisiologia

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas durante o metabolismo normal, por processos enzimáticos e não-enzimáticos, e, cronicamente, causam danos a lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos celulares.¹⁷ Durante uma atividade física a captação de oxigênio pode aumentar em até 20 vezes quando comparado ao repouso, e o fluxo de elétrons para as mitocôndrias dos músculos esqueléticos é elevado de 100 a 200 vezes, o que inevitavelmente aumentará a formação de ERO.¹⁷ O aumento das contrações musculares gerado pelo exercício pode aumentar também a formação de óxido nítrico (NO), uma vez que altos níveis de óxido nítrico sintase (NOS) foram encontrados em fibras musculares.¹⁸ A excessiva produção de ERO e NO pelas fibras musculares durante o mecanismo de contração contribui,

significativamente, para a redução da força contrátil,¹⁹ acelera os processos de fadiga²⁰ e concorre para o aumento de lesões musculares.²¹

Para se proteger dessas agressões, o organismo possui mecanismos químicos e enzimáticos que o protegem dos danos oxidativos provocados pelas ERO.²² Mas quando esses mecanismos são insuficientes, gera-se um estresse oxidativo entre os sistemas pró e antioxidantes, sendo o primeiro sistema dominante. Quando o estresse excede a capacidade de defesa do organismo, observam-se danos às moléculas biológicas.²³ Observa-se também, que o sistema antioxidante parece responder de maneira adaptativa, elevando suas atividades nos tecidos e órgãos de indivíduos treinados,²⁴ embora haja contradições.²⁵

As principais lesões constatadas são: peroxidação lipídica (LPO), carbonilação de proteínas e danos ao DNA, que ocasiona alteração da função celular.²⁶

A LPO consiste numa série de reações em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação, como mostra a Figura 4:

- Iniciação: corresponde à fase em que uma espécie reativa abstrai um átomo de hidrogênio do grupo metileno formando um radical lipídico instável, que se transforma em um dieno conjugado;²⁷

- Propagação: onde o radical alquila, formado pela abstração de um hidrogênio, reage com oxigênio formando um radical peroxila, que abstrai um hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado, presente na membrana celular, formando um novo radical alquila;

- Terminação: ocorre quando os radicais alquila e peroxila se propagam até se destruírem, originando produtos não-radicalares.²⁸

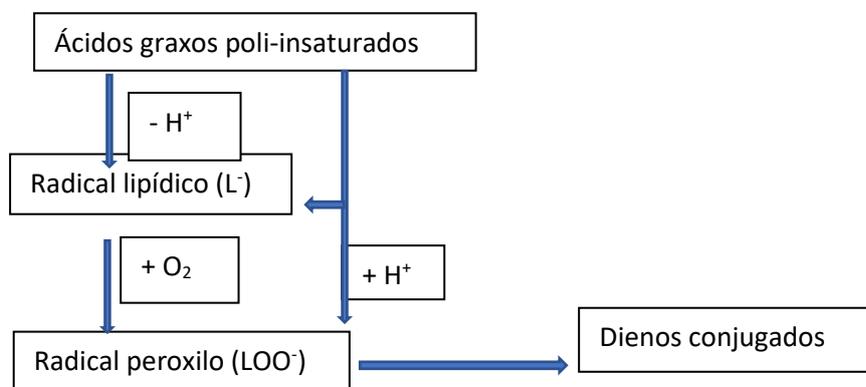


Figura 4. Etapas da LPO

Na ocorrência de estresse oxidativo e agressão aos lipídeos, as fosfolipases A e C podem ser ativadas, promovendo a degradação de fosfolipídios da membrana celular e liberando grande quantidade de ácidos graxos livres, como o ácido araquidônico, cuja liberação está diretamente relacionada ao tempo de lesão oxidativa local.²⁹

Exercícios físicos de alta intensidade criam ambiente favorável para a ativação enzimática de xantina oxidase (XO). Estudos mostram um acúmulo na concentração plasmática de hipoxantina e ácido úrico após intensa contração muscular, principalmente durante a fase de recuperação pós-exercício, sugerindo que a XO foi acionada.³⁰

O aumento das ERO em exercícios anaeróbicos está relacionado com a síntese

ácido láctico, catecolaminas e o elevado processo inflamatório após exercícios anaeróbicos com intensidades máximas.³¹

Várias estratégias têm sido utilizadas em estudos com humanos e animais na tentativa de aumentar a capacidade antioxidante do indivíduo, tais como a suplementação de antioxidantes, restrições dietéticas e fármacos. Autores sugerem que a estratégia mais eficiente em estimular os mecanismos antioxidantes pode ser a maior indução do próprio estresse oxidativo, que, gradativamente, aumentaria a quantidade de antioxidantes endógenos e aumentaria a resistência a lesões induzidas pelo exercício. Isso ocorre, porque, dependendo da quantidade e intensidade de realização do exercício, ocorre um equilíbrio no sistema oxidante-antioxidante e assim, o sistema antioxidante repara os tecidos e os prepara para o organismo para uma nova agressão.³²

No estudo de Child *et al.*,³³ indivíduos treinados foram submetidos a uma prova de meia maratona simulada; observou-se, através da medida da capacidade antioxidante total e do ácido úrico, uma maior habilidade *scavenger* (capacidade de neutralizar os radicais livres formando compostos menos reativos) sobre os radicais livre do soro. Mesmo assim, o exercício induziu aumento das concentrações de malondialdeído, sugerindo que tais respostas foram insuficientes para prevenir a LPO induzida pelo exercício. Powers *et al.*³⁴ afirmam que o treinamento habitual de alta intensidade que é necessário para o nível de competição de elite é capaz de aumentar as defesas antioxidantes. Nesta linha de pesquisa, Halliwell¹⁷ refere que atletas têm altas concentrações de ceruloplasmina no plasma. A ceruloplasmina é uma α -globulina que está envolvida no transporte e na regulação do cobre, podendo reduzir diretamente o oxigênio sem intermediários conhecidos, e, portanto, participante no sistema de defesa antioxidante extracelular

O processo de adaptação ao treinamento é capaz de proteger o atleta a maioria das situações de exposição ao exercício exaustivo,

mas é indicado que os atletas sejam submetidos a uma dieta rica em antioxidantes e vitaminas para reduzir os efeitos do estresse oxidativo gerado pelo exercício exaustivo.³²

3. Metabolômica

Os metabólitos são resultados das reações bioquímicas que ocorrem no organismo e desempenham um papel muito importante na conexão das diferentes vias metabólicas que operam dentro de uma célula viva. O nível dos metabólitos de uma célula ou tecido é determinado pela concentração e propriedades das enzimas, função de um complexo sistema regulatório operante dentro das células. A identificação do nível dos metabólitos é um complemento fundamental na determinação da função gênica.³⁵ Assim, surge a metabolômica, que utiliza a tecnologia para fornecer uma visão geral compreensiva quantitativa e qualitativa dos metabólitos presentes em um organismo.³⁶

Atualmente, a metabolômica desenvolve-se devido às novas configurações de equipamentos, como espectrômetros de massas (EM), de ressonância magnética (RMN) e de fluorescência induzida por laser (FIL), que possibilitam a identificação e quantificação de metabólitos com precisão. A escolha da melhor técnica depende dos metabólitos, dos objetivos e dos recursos disponíveis. O RMN é altamente seletivo, não destrutivo, mas de baixa sensibilidade;³⁷ o FIL é mais sensível, mas possui baixa seletividade química e o EM é o que oferece a melhor combinação de seletividade e sensibilidade.³⁸ As estratégias de análise por espectrometria de massas são um componente crítico em metabolômica e tem sido as mais utilizadas, pois são as que oferecem melhores sensibilidade e seletividade, principalmente acoplando o EM, com sistemas de separação, como cromatografia líquida e gasosa, sendo indispensáveis quando são analisadas matrizes biológicas.³⁹ A espectrometria de massas detecta a razão entre massa e carga

(m/z) de íons, os quais são provenientes de uma fonte de ionização. Esta fonte gera íons na fase gasosa, a partir de moléculas neutras ou de moléculas carregadas. Com o decorrer dos anos, a espectrometria de massas vem obtendo grandes avanços, nos campos instrumentais e de aplicação. Um grande marco na evolução da EM foi o desenvolvimento de novas fontes de ionização, como ESI (*Electrospray Ionization*) e MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization*), sendo métodos de ionização à temperatura ambiente.⁴⁰

A partir do desenvolvimento destes novos métodos de ionização, uma ampla faixa de compostos químicos passou a ser analisada por espectrometria de massas, desde pequenas moléculas polares até macromoléculas. Até então, somente compostos pequenos, voláteis e estáveis à temperatura ambiente eram analisados por um espectrômetro de massas. Este desenvolvimento possibilitou o acoplamento de EM com outros sistemas de separação, como cromatografia líquida, como ESI e APCI (*Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*), e impulsionou o uso de EM para a detecção de diversas moléculas.⁹

Na metabolômica, pode-se fazer a análise da amostra por análise direta no EM ou utilizar uma técnica de separação, como cromatografia, antes do EM quando a amostra for complexa, como é o caso das amostras biológicas, como sangue e urina.⁴¹

A análise metabolômica envolve a determinação dos níveis de compostos químicos de baixa massa molecular (menor que 1000 Da), que estejam presentes dentro e fora das células.⁴¹ A metabolômica pode ser dividida em análise direcionada (para moléculas alvo) ou perfil metabólico (identificação total dos metabólitos presentes). Na determinação de um perfil metabólico são utilizadas técnicas de análise de dados multivariados ou quimiometria.⁴²

Dessa forma, a metabolômica tem se mostrado eficiente na identificação de biomarcadores em diversas áreas. A alanina e a tirosina foram identificadas como

marcadores de idade em remadores, analisados em a 2 semanas consecutivas de treinamento¹⁰ e o ácido láctico, a progesterona, a homocisteína, o 3-hidroxitirato, o ácido linoleico, o ácido esteárico e a valina se mostraram potenciais biomarcadores para câncer do endométrio.⁴³ Maruyama *et al.* Sugere que seja estudado a relação entre os fragmentos das titina, que são filamentos que mantém as estruturas dos sarcômeros, com as distrofias musculares, principalmente as causadas por doenças musculares quanto as provocadas por exercício físico e, também, o processo de recuperação.⁴⁴

4. Métodos Analíticos

Os métodos analíticos mais utilizados para determinação e quantificação de metabólitos em fluidos biológicos são os métodos cromatográficos, com destaque para a cromatografia gasosa (CG)⁴² e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).⁴⁶ A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes que sofrerão forte interação com uma das fases em duas fases: uma móvel e uma estacionária. A fase móvel é responsável por interagir diferentemente com cada componente por meio de diferentes interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas ou forças de Van der Waals.⁴⁷

Na cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás de arraste. Os mais utilizados são o hélio, o nitrogênio e o hidrogênio. Na cromatografia líquida, a fase móvel é uma mistura de solventes líquidos, como por exemplo: água, metanol, acetonitrila e outros. Em ambos os casos, a fase estacionária pode consistir de uma camada microscópica de líquido adsorvido em um sólido inerte, de espécies quimicamente ligadas a uma superfície sólida ou, ainda, de um sólido.⁴⁷

Ao se escolher entre a utilização de CG ou de CLAE, devem-se considerar inicialmente

algumas diferenças nos requisitos das duas técnicas quanto ao tipo de amostra a ser analisada. Para cromatografia gasosa, a amostra ou seu derivado deve ser volátil e termicamente estável. Para cromatografia líquida, a amostra necessita ser solúvel na fase móvel utilizada.

Tanto a cromatografia gasosa (CG) quanto a líquida (CLAE) podem ser acopladas à espectrometria de massas (EM), formando as técnicas hífenizadas CG-EM e CLAE-EM, respectivamente. Desse modo, as substâncias químicas separadas no cromatógrafo podem ser identificadas por seus espectros de massas. A separação cromatográfica antes da espectrometria de massas possibilita a redução do efeito da matriz, a supressão de íons, a separação de isômeros e uma quantificação mais precisa dos metabólitos.⁴⁵

O acoplamento dos equipamentos de CG-EM é facilitado pelo fato de a amostra já se encontrar em fase gasosa na saída da coluna cromatográfica, podendo assim, ser inserida diretamente sob vácuo na fonte de íons do espectrômetro de massas. Utiliza-se normalmente fonte de ionização por elétrons (EI) ou ionização química (CI). No CLAE-EM, a amostra líquida não poderia ser inserida diretamente em uma fonte EI ou CI sob vácuo, por isso as fontes mais empregadas usam ionização por electrospray (ESI) ou ionização química a pressão atmosférica (APCI).^{47, 48}

Após as moléculas da amostra serem convertidas em íons, esses são conduzidos por um analisador de massas, onde são separados em função da razão entre massa e carga (m/z) de cada íon, atingindo, em seguida, detector. Dentre os analisadores de massa mais comuns, podem-se citar os do tipo quadrupolo, armadilha de íons, tempo de voo e campo magnético, dentre outros.^{47, 48}

4.1. Moléculas orgânicas volatilizáveis

A cromatografia gasosa (CG) é uma das técnicas analíticas mais utilizadas, pois possui um alto poder de resolução e tem grande

sensibilidade, podendo identificar substâncias em pictogramas, separando misturas complexas com até 200 substâncias bem semelhantes. Porém, tem o inconveniente de só separar substâncias voláteis e com alta estabilidade térmica.⁵⁰ A cromatografia gasosa se caracteriza por utilizar um gás como fase móvel.

Para melhorar as condições de cromatografia e possibilitar que mais compostos possam ser separados pela cromatografia gasosa, usa-se a técnica da derivatização química, que consiste na substituição dos hidrogênios das funções químicas (funções polares) por grupamentos mais apolares que não formem ligações de hidrogênio,⁵¹ que pode aumentar a sensibilidade na detecção e a melhora do comportamento cromatográfico dos compostos, aumentando sua volatilidade, melhorando a estabilidade térmica e melhoria da resolução cromatográfica.⁵² As três principais formas de derivatização química são:

- Alquilação: É uma reação de Friedel-Crafts, onde ocorre a substituição do hidrogênio alifático ou alifático-aromático, por um radical alquila, em um processo de esterificação, diminuindo a polaridade do composto,⁵³

- Acilação: É uma reação de Friedel-Crafts que consiste na introdução de um grupo acila na molécula do composto, trocando o hidrogênio reativo, transformando o composto em amida, ésteres, tio-ésteres, ácido carboxílico ou derivado carboxílico;⁵³

- Sililação: É uma reação onde existe uma troca do hidrogênio reativo por um grupo silil. É a mais usada por ser simples, rápida e versátil. A reação ocorre em uma única etapa e apresentam alto-rendimento mesmo em condições brandas. Os principais agentes sililantes são trimetilclorosilano (TCMS); N,Obis-trimetilsilil-acetamida (BSA); N,Obis-trimetilsililtriacetamida (BSTFA); hexametilsililazano (HMDS) e N-metil,N-trimetilsililtriacetamida (MSTFA).⁵³

Com a utilização da derivatização, que aumenta a quantidade de compostos polares que podem ser analisados, a cromatografia gasosa se torna uma poderosa ferramenta de

análise na metabolômica, e quando combinada com um espectrômetro de massas (CG-EM) se torna a técnica de análise menos sujeita a equívocos (Figura 5).⁵³

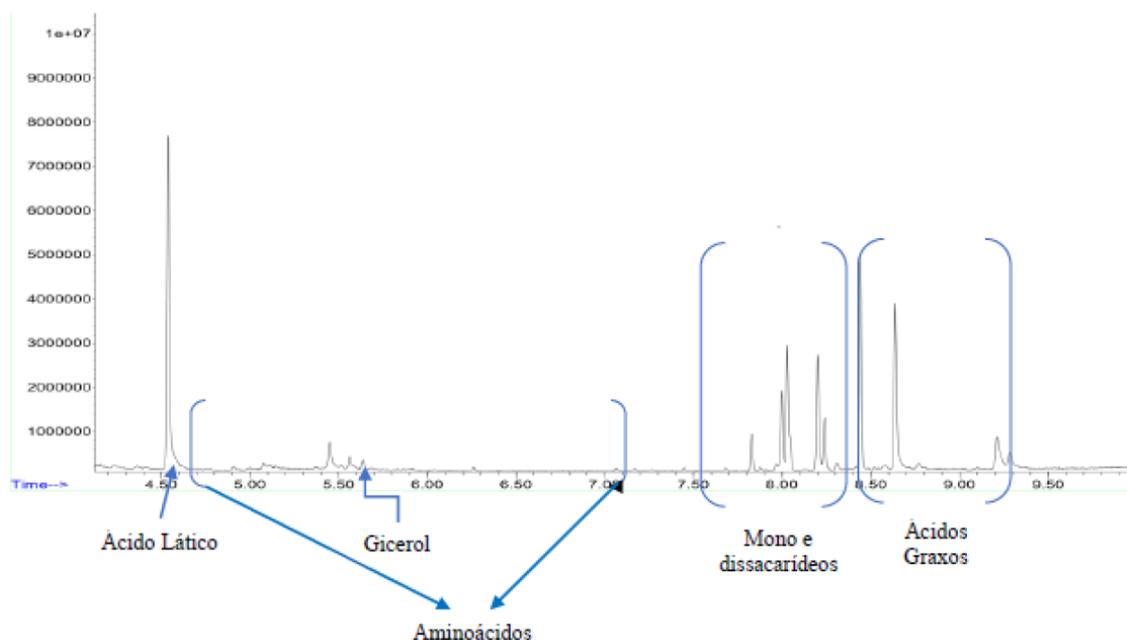


Figura 5. Cromatograma de íons totais obtidos em amostra de soro sanguíneo, derivatizado com BSTFA, de um atleta de pentatlo moderno. Estão destacadas as regiões dos aminoácidos, mono e dissacarídeos, ácidos graxos, bem como os picos de ácido láctico e glicero

O uso de CG-EM na identificação do perfil metabólico apresenta a desvantagem da necessidade de derivatização, quando comparado ao emprego de CLAE-EM. Contudo, a técnica de CG-EM possui a vantagem por proporcionar maior facilidade para identificação dos diversos compostos presentes na amostra, principalmente na ausência de padrões das substâncias. Além de considerar a interpretação dos fragmentos gerados na ionização por elétrons, o analista também pode comparar os resultados obtidos com os dados das principais e mais completas bibliotecas de espectros de massas disponíveis.

4.2. Moléculas orgânicas solúveis

A cromatografia líquida (CLAE) é uma técnica que possibilita as análises e separações com alta eficiência de uma ampla gama de compostos. As separações em CLAE podem se dar por adsorção, partição ou ambos os meios. A versatilidade dessa técnica reside no grande número de fases estacionárias existentes.⁵⁰ Os métodos baseados na CLAE são adequados para uma variedade de compostos orgânicos que apresentam polaridade mais alta e volatilidade mais baixa ou ainda elevada instabilidade térmica, características de muitos compostos orgânicos produzidos pelo nosso organismo.⁵⁴

A área forense é a que mais tem apresentado trabalhos de utilização da técnica de CLAE na área de toxicologia, principalmente envolvendo drogas de abuso em matrizes biológicas. Isso é devido à possibilidade de identificação de metabólitos

derivados do consumo de drogas em casos de dopagem na área esportiva; de envenenamentos; acidentes de trânsito e outros. Para a análise de um perfil químico, normalmente se utiliza o CG-EM, por causa da vasta biblioteca eletrônica de espectros de massas disponíveis, porém as limitações como volatilidade e instabilidade térmica, que exigem a utilização da derivatização, tem propiciado um incremento na utilização do CLAE-EM.⁵¹

De forma a obter uma maior eficiência na separação dos compostos, desenvolveu-se uma nova técnica de cromatografia líquida, a cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC). Esta técnica se assenta nos princípios da cromatografia líquida de alta pressão, mas com algumas diferenças que vão facilitar o método de separação. O desenvolvimento da técnica de UPLC veio trazer claras vantagens à separação cromatográfica de analitos. Esta técnica permite uso de colunas com um comprimento mais reduzido, assim como das partículas que compõem a fase estacionária, a aplicação de pressões mais elevadas, que podem ser superiores aos 14.000 psi, o consumo de solvente é relativamente inferior e o fluxo aplicado para a passagem das amostras pela fase estacionária pode ser mais elevado. Para além disso, o cromatograma apresenta uma maior resolução (grau de separação entre os picos) e uma maior sensibilidade de detecção dos compostos presentes nas amostras. Todas estas vantagens vieram contribuir para uma redução do tempo de análise, uma das principais dificuldades aplicadas à cromatografia líquida de alta pressão.⁵⁵

5. Tratamento dos Dados

Após os resultados terem sido apresentados pela técnica escolhida, esses resultados devem ser analisados e como o objetivo é a determinação de um perfil metabólico, espera-se uma quantidade significativa de metabólitos, então deve-se

separar quais os metabólitos são importantes e para isso deve-se recorrer a ferramentas estatísticas adequadas. Isso para que se possa identificar e quantificar os diferentes metabólitos detectados nas amostras.⁵⁶

Para determinar a técnica adequada, deve ser verificado o que se quer analisar, se forem metabólitos específicos pode-se utilizar o teste “t”, quando forem analisados pares de substâncias, ou análise de variância (ANOVA ou MANOVA), já que se deseja verificar se ocorreram variações significativas nos metabólitos e foi possível realizar uma quantidade de experimentos suficiente para tornar as variações significativas; porém quando se quer analisar uma quantidade grande de componentes, como no caso de perfil metabólico, devem ser utilizados métodos mais poderosos e versáteis como a análise dos componentes principais (PCA) e a análise dos mínimos quadrados parciais para análises de discriminantes (PLS-DA).^{10, 57}

O teste “t” de *Student* é recomendado quando se deseja comparar a média de dois tratamentos, onde faz-se uma análise da variância e se ela for menor do que um valor pré-definido (p) considera-se que os tratamentos aplicados são diferentes e o nível de confiança do teste será de (1-p), porém quando existem muitos pares a serem analisados o nível de confiança do teste será reduzido, inviabilizando a utilização deste teste.⁵⁷

A análise de variância objetiva analisar a variação média entre os resultados encontrados e inferir quais os fatores são realmente importantes e produzem efeitos significativos nas respostas de um sistema. Essa análise é um processo de decomposição da variação total entre todas as unidades experimentais, identificando as fontes das variações. A variação total pode ser decomposta em três grupos de causas ou fontes de variação: (i) relacionada com os tratamentos; (ii) relacionada com causas controladas pelo delineamento experimental; e (iii) relacionada com o erro experimental.⁵⁸

A técnica de PCA consiste em uma transformação linear ortogonal para um novo sistema de coordenadas, onde os novos eixos coordenados serão os componentes que maximizam as variâncias e esses componentes serão os componentes principais. Já a técnica dos mínimos quadrados parciais, relacionam os componentes com uma resposta. Essa técnica encontra hiperplanos que maximizam a variância com alguma variável que se deseja como resposta.⁵⁷

As técnicas de PCA e PLS-DA são amplamente utilizadas na metabolômica, ainda mais quando se trabalha para definir perfis metabolômicos em amostras biológicas, que apresentam uma grande quantidade de

metabólitos tornando muito complexa sua análise.⁵⁷

A PCA define componentes ortogonais, sendo que a primeira explica a maior variância entre todas as variáveis e, ainda possibilita a identificação de mais componentes ortogonais para explicar melhor as variâncias. Quanto maior for a complexidade do sistema, maior será a quantidade de componentes necessárias para explicar a variabilidade do sistema. Já PLS identifica variáveis latentes que apontam na direção de maior variância sobre uma dada informação fornecida ao sistema.⁵⁵ Essas técnicas reduzem a dimensão de análise conseguindo indicar possíveis marcadores no perfil metabolômico analisado. A ordem de aplicação das técnicas está na tabela 1.

Tabela 1. Ordem de aplicação das técnicas de PCA, PLS-DA e PLS

	ETAPAS	DETERMINAÇÃO DO MODELO	MÉTODO
		Seleção dos grupos representativos:	
1	Visão dos dados	- Entrada de dados e determinação dos componentes principais	PCA
2	Separação por importância	Comparação dos metabólitos	PLS-DA
3	Correlação com uma resposta	Especificação dos efeitos metabólicos	PLS

Alguns trabalhos publicados confirmam a utilidade dessas duas técnicas na metabolômica, especialmente quando envolve esforço físico. Yan *et al*⁸ fez uma investigação metabolômica em remadores sêniores e juniores comparados a homens não-atletas, analisando o soro sanguíneo em GC/TOF-MS fazendo uma análise estatística com PCA e PLS-DA identificando a alanina; o lactato; o β -d-metilglucopiranoside; o ácido piroglutâmico; a cisteína (Figura 6); o ácido glutâmico; o ácido cítrico; ácidos graxos; a valina; a glutamina; a fenilamina; a tirosina e outros, que se relacionavam com o metabolismo da glicose; o estresse oxidativo;

o metabolismo energético, lipídico e de aminoácidos. Chorell *et al*,⁶⁰ fez uma investigação sobre o efeito da ingestão de carboidratos combinado proteínas na geração de uma resposta metabólica diferente comparado com uma ingestão de água sem qualquer complemento após o exercício. Participaram do experimento 24 homens que tiveram o soro sanguíneo analisado e a análise de curva de resolução hierárquica multivariada (HCMR) e PLS identificaram que a pseudorina é um marcador de uma bebida com carboidrato de baixa-complexidade e proteína, além de ter determinado sinais de resistência à insulina.

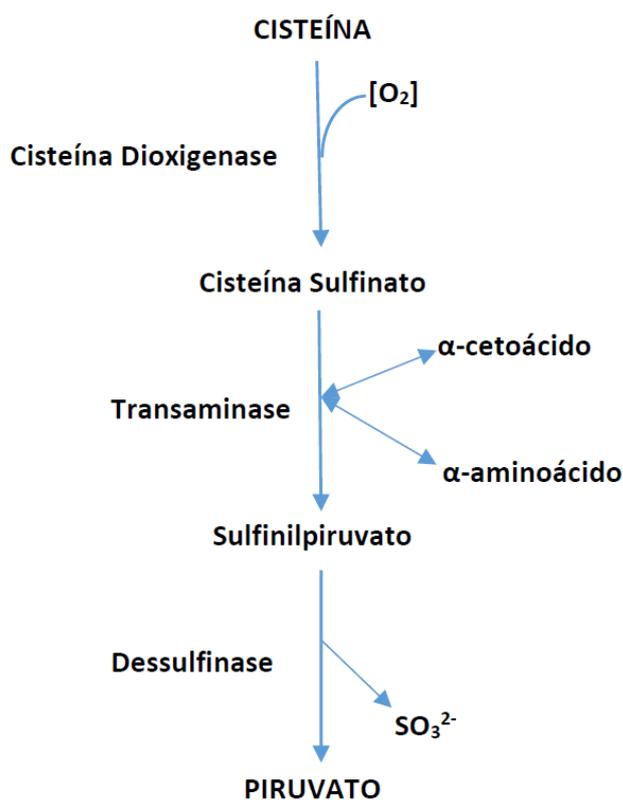


Figura 6. Catabolismo da L-cisteína¹²

6. Preparação das Amostras e Análise dos Metabólitos

Nessa etapa, deve-se definir qual será a matriz biológica que será analisada, sangue ou saliva, por exemplo, que será definido de acordo com os metabólitos desejados. Para assim definir qual a forma de interromper a atividade bioquímica, pois os níveis metabólicos variam muito rapidamente em função de quaisquer alterações no ambiente da célula. Existem muitas formas para realizar essa interrupção e depende do que será analisado e quais serão os extratos analisados. Depois da interrupção, é necessário que se separe os metabólitos que se deseja analisar, definido se serão analisados os componentes polares ou apolares, por exemplo. Assim, define-se quais os solventes serão utilizados e quais os equipamentos serão utilizados.

Se a matriz biológica escolhida for o sangue, deve-se definir se será analisado o

plasma ou o soro no sangue, mas independentemente de ser plasma ou soro, é necessário que se removam as proteínas, que podem ser precipitadas com metanol; acetonitrila ou ácido perclórico.⁶¹ Após essa etapa, extrai-se a parte sobrenadante e prepara-se a amostra para utilização no RMN ou no EM acoplado a um sistema de separação, normalmente cromatografia.

7. Considerações Finais

Com essa revisão, verifica-se que a metabolômica é uma ferramenta muito útil para determinar o perfil metabólico ou identificar um metabólito específico com o objetivo de incrementar os treinos, e consequentemente, os resultados de atletas de alto rendimento. Os resultados virão porque os treinadores terão em mãos um instrumento capaz de identificar o nível de esforço dispendido pelos atletas e, assim,

otimizar e personalizar os treinos de cada atleta. O atleta terá em mão um detalhamento de seus gastos energéticos, permitindo que os nutricionistas indiquem dietas balanceadas por período de treinamento e os médicos e fisioterapeutas terão à disposição indicadores de lesão, para que possam indicar tratamentos para minimizar esses problemas. Assim, tem-se a demonstração de que a metabolômica pode ser uma ferramenta poderosa na avaliação das condições físicas de um atleta de alto rendimento ou, mesmo de um atleta amador que deseje praticar o esporte como meio de manter uma vida saudável.

Referências Bibliográficas

- ¹ David, J. S.; Delia, R. Effects of high volume and/or intense exercise on selected blood chemistry parameters. *Clinical Biochemistry* **1994**, *27*, 435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ² Polito, L. F. T.; Figueira Jr, A. R.; Miranda, M. L. J.; Chtourou, H.; Miranda; J. M; Brandão, M. R. F.; Psychophysiological indicators of fatigue in soccer players: A systematic review. *Science & Sports* **2017**, *32*, 1. [[CrossRef](#)]
- ³ Fry, R. W.; Morton, A. R.; Keast, D. Overtraining in athletes. An update. *Sports Medicine* **1991**, *12*, 32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴ Margonis K.; Fatouros, I. G.; Jamurtas, A. Z.; Nokolaidis, M. G.; Douroudos, I.; Chatzinikolaou, A.; Mitrakou, A.; Mastorakos, G.; Papassoutiriou, I; Taxildaris, K; Kouretas, D. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free Radical Biology Medicine* **2007**, *43*, 901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵ Paiva, R. S. Overtraining, possíveis marcadores de estresse e o processo de dessensibilização. *Movimento & Percepção* **2005**, *5*, 118. [[Link](#)]
- ⁶ Lac, G.; Maso, F. Biological markers for the follow-up of athletes throughout the training season. *Pathologie Biologie* **2004**, *52*, 43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷ Rietjens, G. J. W. M.; Kuipers, H.; Adam, J. J.; Saris, W.H.M.; van Breda, E.; van Hamont, D.; Keiser, H.D.; Physiological, biochemical and psychological markers of strenuous training-induced fatigue. *International Journal of Sports and Medicine* **2005**, *26*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸ Nicholson, J. K.; Connely, J.; Lindon, J. C.; Holmes, E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nature Reviews Drug Discover* **2002**, *1*, 153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹ Abdelnur, P. V. *Metabolômica e Espectrometria de Massas*; EMBRAPA, Circular Técnica nº 10, Brasília, 2011. [[Link](#)]
- ¹⁰ Yan, B.; Jiye, A.; Guangji, W.; Huali, L.; Xiaoping, H.; Weibin, Z.; Haiping, H.; Ying, Z.; Linsheng, L.; Shenghua, G.; Qing, H.; Yuanting, Z.; Jianguo, S. Metabolomic Investigation into Variation of Endogenous Metabolites in Professional athletes Subject to Strength-Endurance Training. *Journal of Applied Physiology* **2009**, *106*, 521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹¹ Hernandez, J. A.; Nahas, R. M. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. *Revista Brasileira Medicina do Esporte* **2009**, *15*, 3. [[CrossRef](#)]
- ¹² Murray, R. K.; Granner, D. K.; Rodwell, V. W.; *Harper Bioquímica Ilustrada*. Editora AMGH Ltda.: Porto Alegre, 2007. [[Link](#)]
- ¹³ Diretriz da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte; Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* **2003**, *9*, 43. [[Link](#)]
- ¹⁴ Carnaval, P. E.; *Medidas e avaliação em ciências do esporte*, 7.ed. Sprint: Rio de Janeiro, 2008. [[Link](#)]
- ¹⁵ Venter, J. C. A part of the human genome sequence. *American Society of Advancement of Science* **2003**, *299*, 1183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ¹⁶ Bueno Júnior, C. R.; Pereira, M. G.; Biologia molecular como ferramenta no esporte de alto rendimento: possibilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Ciências do Esporte* **2010**, *31*, 231. [CrossRef]
- ¹⁷ Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5ª Ed., Oxford University Press: Oxford, 2015. [CrossRef]
- ¹⁸ Chambers, M. A.; Moylan, J. S.; Smith, J. D.; Reid, M. D.; Stretch-stimulated Glucose Uptake in Skeletal Muscle is Mediated by Reactive Oxygen Species and P38 MAO-Kinase. *Journal of Physiology* **2009**, *587*, 3363. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁹ Kobzik, L.; Reid, M. B.; Bredt, D. S.; Stamler, J. S. Nitric Oxide in Skeletal Muscle. *Nature* **1994**, *372*, 546. [CrossRef]
- ²⁰ Reid, M. B.; Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **2001**, *33*, 371. [CrossRef] [PubMed]
- ²¹ Andrade, F. H.; Reid, M. B.; Allen, D. G.; Westerblad, H. Effect of Hydrogen Peroxide and Dithiothreitol on Contractile Function of Single Skeletal Muscle Fibres from the Mouse. *Journal of Physiology* **1998**, *509*, 565. [CrossRef] [PubMed]
- ²² Clanton, T. L.; Klawitter, P. Oxidants and Skeletal Muscle Function: Physiologic and Pathophysiologic Implications. *Proceedings of Experimental Biology Medicine* **1999**, *222*, 253. [CrossRef]
- ²³ Araújo, M. B.; Voltarelli, F. A.; Manchado-Gobatto, F. B.; Moura, F. P.; Mello, F. A. R.; Treinamento em Diferentes Intensidades e Biomarcadores de Estresse Oxidativo e do Metabolismo Glicídico Musculoesquelético de Ratos. *Revista da Educação Física* **2010**, *21*, 695. [CrossRef]
- ²⁴ Alves, A. A.; *Tese de Doutorado*, Universidade de Campinas, Brasil, 2002. [Link]
- ²⁵ Avula, R. C. P.; Fernandes, G.; Modulation of Antioxidant and Lipid Peroxidation in Salivary Gland and Other Tissues in Mice by Moderate treadmill Exercise. *Aging Clinical and Experimental Research* **1999**, *11*, 246. [Link]
- ²⁶ Prada, F. J. A.; Voltarelli, F. A.; Oliveira, C. A. M.; Gobatto, C. A.; Macedo, D. V.; Mello, M. A. R. Condicionamento aeróbio e Estresse Oxidativo em Ratos Treinados por Natação em Intensidade Equivalente ao Limiar Anaeróbio. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento* **2004**, *12*, 29. [Link]
- ²⁷ Schneider, C. D.; Oliveira, A. R.; Radicais Livres de Oxigênio e Exercício: Mecanismos de Formação e Adaptação ao Treinamento Físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* **2004**, *10*, 30. [Link]
- ²⁸ Silveira, M.; Yoshida, W. B.; Isquemia e Reperfusão em Músculo Esquelético: Mecanismos de Lesão e Perspectiva de Tratamento. *Jornal Vasculoso Brasileiro* **2004**, *3*, 367. [Link]
- ²⁹ Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* **1997**, *43*, 68. [CrossRef]
- ³⁰ Odorizzi, V. F.; *Tese de doutorado*, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Brasil, 2006. [Link]
- ³¹ Cruzat, V. F.; Rogero, M. M.; Borges, M. C.; Tirapegui, J. Aspectos Atuais sobre Estresse Oxidativo, Exercícios Físicos e Suplementação. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* **2007**, *13*, 336. [CrossRef]
- ³² Schneider, C. D.; Silveira, M. M.; Moreira, J. C. F.; Belló-Klein, A.; Oliveira, A. R. Efeito do exercício de ultrarresistência sobre parâmetros de estresse oxidativo. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* **2009**, *15*, 89. [CrossRef]
- ³³ Child, R. B.; Wilkinson, D. M.; Fallowfield, J. M.; Donnelly, A. E. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **1998**, *30*, 1603. [CrossRef] [PubMed]

- ³⁴ Powers, S. K.; Ji, L. L.; Leeuwenburgh, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **1999**, *31*, 987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁵ Villas-Boas, S. G.; Gombert, A. K.; *Metabolome analysis: An introduction*, John Wiley & Sons: New Jersey, 2007. [[Link](#)]
- ³⁶ Hall, R. D. Plant Metabolomics: from Holistic Hope, to Hype to Hot Topic. *New Phytologist* **2006**, *169*, 453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁷ Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. Analytical Technologies for Metabonomics and Metabolomics, and Multi-omic Information Recovery. *Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27*, 194. [[CrossRef](#)]
- ³⁸ Abdelnur, P. V.; *Imageamento químico por espectrometria de massas utilizando MALDI (MALDI Imaging Mass Spectrometry) aplicado a tecidos vegetais*, EMBRAPA, Circular Técnica nº 6, 2011. [[Link](#)]
- ³⁹ Bedair, M.; Summer, L. W. Current and emerging mass spectrometry technologies for metabolomics. *Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27*, 238. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁰ Lei, Z.; Huhman, D. V.; Summer, L. W. Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 25435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴¹ Villas-Boas, S. G.; Mas, S.; Akesson, M.; Smedsgaard, J. Mass Spectrometry in Metabolome Analysis. *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, *24*, 613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴² Kim, J. Y.; Shin, S. H.; Lee, J. I.; In, M. K. Rapid and simple determination of psychotropic phenylalkylamine derivatives in human hair by gas chromatography–mass spectrometry using micro-pulverized extraction. *Forensic Science International* **2010**, *196*, 43. [[CrossRef](#)]
- ⁴³ Troisi, J., Sarno, L., Landolfi, A., Scala, G., Martinelli, P., Venturella, R., Di Cello, A., Zullo, F., Guida, M. A metabolomic signature of endometrial cancer. *Journal of Proteome Research* **2017**, *17*, 804. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁴ Maruyama, N.; Asai, T.; Abe, C.; Inada, A.; Kawauchi, T.; Miyashita, K.; Maeda, M.; Matsuo, M.; Nabeshima, Y. Establishment of highly sensitive sandwich ELISA for the N-terminal fragment of titin in urine. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 39375. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁵ Salamone, A.; Gerace, E.; Brizio, P.; Gennaro, M. C.; Vincenti, M. A fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, *56*, 582. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁶ Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; *Fundamentos de Cromatografia*, Editora Unicamp: Campinas, 2006. [[Link](#)]
- ⁴⁷ Wilson, K.; Walker, J.; *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, 7ª ed., Cambridge University Press: Cambridge, 2010. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁸ Munaretto, J. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2012. [[Link](#)]
- ⁴⁹ Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de análise instrumental*, 5a Ed. Bookman: Porto Alegre, 2002. [[Link](#)]
- ⁵⁰ Segura, J.; Ventura, R.; Jurado, C. Derivatization procedures for gas-chromatography mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Application* **1998**, *713*, 61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Botelho, E. D.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Brasília, Brasil, 2011. [[Link](#)]
- ⁵² Donadel, J. Z.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Santa Maria, Brasil, 2015. [[Link](#)]
- ⁵³ da Silva, C. G. A.; Collins, C. H. Aplicações de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para o Estudo de Poluentes Orgânicos Emergentes. *Química Nova* **2011**, *34*, 665. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁴ Jin, Y.; Xingya, X.; Hui, S.; Yuansheng, X.; Feifang, Z.; Xinmiao, L. HPLC and UPLC switch for TCM analysis. *World Science and Technology* **2008**, *10*, 80. [[CrossRef](#)]

- ⁵⁵ Bino, R. J.; Hall, R. D.; Fiehn, O.; Kopka, J.; Saito, K.; Draper, J.; Nikolau, B. J.; Mendes, P.; Rossner-Tunali, U.; Beale, M. H.; Tretheway, R. N.; Lange, B. M.; Wurtele, E. S.; Sumner, L. W. Potential of Metabolomics as a Functional Genomics Tool *Trends in Plant Science* **2004**, *9*, 418. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁶ Schwaab, M. M.; Pinto, J. C.; *Análise de Dados Experimentais I: Fundamentos da Estatística e Estimação de Parâmetros*, e-papers: Rio de Janeiro, 2007. [[Link](#)]
- ⁵⁷ Montgomery, D. C.; *Design and Analysis of Experiments*, 4th ed, John Wiley & Sons: New Jersey, 1997. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁸ Gasterger, J.; Engel, T.; *Cheminformatics*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.: Weinheim, 2003. [[Link](#)]
- ⁵⁹ Chorell, E.; Moritz, T.; Branth, S.; Antti, H.; Svensson, M. B. Predictive Metabolomics Evaluation of Nutrition-Modulated Metabolic Stress Responses in Human Blood Serum During the Early Recovery Phase of Strenuous Physical Exercise. *Journal of Proteome Research* **2009**, *8*, 2966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁰ Gowda, G. A. N.; Raftery, D. Quantitating Metabolites in Protein Precipitated Serum Using NMR Spectroscopy. *Analytical Chemistry* **2014**, *86*, 5433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]