



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**VINICIUS VERI HERNANDES**

**METABOLÔMICA MULTIPLATAFORMA APLICADA AO ESTUDO DAS  
ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM JOGADORAS DE FUTEBOL DURANTE  
COMPETIÇÃO INTERNACIONAL**

**CAMPINAS**

**2019**

**VINICIUS VERI HERNANDES**

**METABOLÔMICA MULTIPLATAFORMA APLICADA AO ESTUDO DAS  
ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM JOGADORAS DE FUTEBOL DURANTE  
COMPETIÇÃO INTERNACIONAL**

**Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade Estadual de Campinas  
como parte dos requisitos exigidos para a  
obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin**

**Coorientadora: Profa. Dra. Alessandra Sussulini**

**O arquivo digital corresponde à versão final da Tese defendida pelo aluno  
Vinicius Veri Hernandes e orientada pelo Prof. Dr. Marcos Nogueira  
Eberlin.**

**CAMPINAS**

**2019**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

H43m Hernandes, Vinicius Veri, 1990-  
Metabolômica multiplataforma aplicada ao estudo das alterações metabólicas em jogadoras de futebol durante competição internacional / Vinicius Veri Hernandes. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin.  
Coorientador: Alessandra Sussulini.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Metabolômica. 2. Futebol - Aspectos fisiológicos. 3. Teste em amostras de sangue seco. 4. Espectrometria de massa. I. Eberlin, Marcos Nogueira, 1959-. II. Sussulini, Alessandra, 1981-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Untargeted multiplatform metabolomics applied to female soccer players study case during international competition

**Palavras-chave em inglês:**

Metabolomics

Football - Physiological aspects

Dried blood spot testing

Mass spectrometry

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Marcos Nogueira Eberlin [Orientador]

Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Ana Valéria Conalghi Simionato Cantú

Marina Franco Maggi Tavares

Jandyson Machado Santos

**Data de defesa:** 23-08-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Química

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3057-6460>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8361023494697123>

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin

Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya (IB-UNICAMP)

Profa. Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú (IQ-UNICAMP)

Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares (IQ-USP)

Prof. Dr. Jandyson Machado Santos (DQ-UFRPE)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pelo aluno **Vinicius Veri Hernandes**, aprovada pela Comissão Julgadora em 23 de Agosto de 2019.

Dedico esta tese a minha mãe,  
Regina, professora de química e  
inspiração para minha curiosidade e  
paixão pela ciência

You say the hill's too steep to climb

Chiding

You say you'd like to see me try

Climbing

You pick the place and I'll choose the time

And I'll climb

The hill in my own way

Just wait a while for the right day

**Fearless – Pink Floyd**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a minha família, sem a qual não poderia não somente ultrapassar essa etapa, mas antes de mais nada, chegar a ela. Em especial, à minha mãe Regina, que desde a 8<sup>a</sup> série do Ensino Fundamental me ensinou, como minha professora de Química, a beleza por trás das simples explicações dos fenômenos naturais, da química da pilha à estereoquímica da talidomida, da separação de soluções homogêneas à destilação do petróleo, fazendo brotar a minha paixão pela ciência.

A todos que permitiram o desenvolvimento deste projeto dentro e fora da Confederação Brasileira de Futebol: Juninho, Vanessa, Guilherme, Daniel, Sérgio e Dena, obrigado por todo o suporte.

A todos que estiveram presentes durante meu período na Espanha. Primeiramente à Professora Marina por aceitar meu pedido de visita ao seu laboratório na USP e em seguida aceitar minha participação nesse programa de intercâmbio. A todos do Centro de Excelencia em Metabolómica y Bioanalisis (CEMBIO) em Madrid: à Professora Coral Barbas por acreditar no projeto apresentado e abrir as portas do seu laboratório. Ao Professor Javier Rupérez pela supervisão, discussões científicas e tutoria. Ao grupo em geral, pelo suporte e ensinamento, não somente científico, mas também de vida. Às pessoas que estiveram sempre presentes, Elena, Miguel, Maria, Luka, Carolina, Annalaura e Alma, dentro e fora do laboratório, meu muito obrigado. Vocês tornaram meu aprendizado mais fácil e minha estadia, adaptação e convivência muito mais alegre. Agradeço também à Carol Carranza, por ter me recebido tão bem durante esse período e se tornado alguém sempre disponível e com quem eu podia contar. Por fim, agradeço imensamente a essa pessoa que estava na Espanha quando cheguei e me ajudou desde antes da minha chegada até esse exato momento da defesa, Andréa Faccio. Andréa, muito obrigado por ser tão solícita inicialmente e amiga logo em seguida. Sou muito grato por ter conhecido uma pessoa tão boa e que me ensinou (e ainda me ensina) cientificamente e com quem eu tenho o prazer de ter uma amizade.

A todos do meu laboratório, principalmente o Prof. Marcos Eberlin, por ter proporcionado um ambiente propício ao desenvolvimento do projeto. Agradeço também à minha co-orientadora, Alessandra Sussulini, por quem tenho grande

admiração profissional no campo da metabolômica e que tem estado desde sempre disponível. Por fim, agradeço também ao Gustavo Duarte, parceiro de laboratório, presencial ou não, a quem agradeço pelas constantes discussões na área de metabolômica.

Aos meus amigos que tanto me deram suporte nessa etapa. Aos que conviveram comigo durante a época de república, Bruno, Guilherme, Henrique, Luiz Felipe, Murilo, Rodrigo, Tupi, obrigado por fazer da LCP um lugar que eu pudesse me sentir em casa e cercado de pessoas que eu gosto. A todos os outros, que seria impossível nomear, mas que tenho certeza que se sentem aqui representados, meu muito obrigado!

Por fim, gostaria também de agradecer à todos do IQ da Unicamp, desde funcionários da limpeza, manutenção, segurança e mais especialmente aos funcionários da CPG pela ajuda e suporte de sempre em qualquer questão relacionada ao programa de pós graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 .

## RESUMO

Sendo o esporte mais popular mundialmente, o futebol impacta diretamente nas condições físicas de seus praticantes e, consequentemente, no seu estado de saúde em geral. Para os jogadores profissionais, o alto nível de treinamento e competição é responsável pela alteração de diversas vias metabólicas, com efeitos benéficos e, algumas vezes, maléficos. Este estudo tem como objetivo investigar as alterações metabólicas causadas por uma competição internacional (o Campeonato Sul-Americano de alta intensidade em jogadoras da seleção brasileira sub-20, considerando-se que poucos estudos tentam focar neste grupo de estudo (provavelmente pela popularização tardia da categoria feminina). Amostras de sangue seco em papel (do inglês DBS, *Dried Blood Spots*) foram coletadas de todas as jogadoras em 4 pontos distintos do campeonato: antes e depois dos Jogos 1 (inicial) e Jogo 7 (último jogo do campeonato). As amostras foram analisadas utilizando-se metabolômica multiplataforma pelas técnicas de CE-MS, GC-MS e LC-MS (para esta última, utilizando-se ionização por eletrospray nas polaridades positiva e negativa), a partir de um extrato comum obtido de cada amostra. Os resultados demonstraram alterações significativas em diversos metabólitos, com especial destaque para a classe dos aminoácidos, que puderam ser estatisticamente correlacionados com indicadores de performance obtidos durante cada partida. Além disso, a metodologia desenvolvida foi capaz de produzir resultados significativos para uma situação de coleta e análise de amostra em caráter real e profissional, podendo ser mais adiante desenvolvida para aplicação *in situ*.

## ABSTRACT

As the world most popular sport, soccer is known to impact players' physical condition and, consequently, their health. When looking at professional players, the high intensity trainings and competitions is responsible to alter many metabolic pathways and to have beneficial as well as prejudicial consequences in some cases. This study aims to investigate the metabolic alterations caused by a high intensity professional and international competition (The 2015 South American Championship) in female players from Brazil Under-20 National Team, as a group of study less considered in the literature probably due to the later popularization of women's soccer. Dried blood spots (DBS) samples were collected from all players at 4 time points, namely before and after the initial and the final game – which they have won. Samples were analyzed in a multiplatform approach, with the use of CE-MS, GC-MS and LC-MS (electrospray ionization used in positive and negative modes) techniques, after specific sample preparation from a common sample extract. Results have shown altered metabolites, especially amino acids, which could be correlated mainly with the performance during the first game. The developed methodology was able to produce meaningful results for a real game situation and can be further employed for routine screening.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b><u>Capítulo 1</u></b>	
<b>Figura 1.</b> Etapas gerais de um estudo metabolômico.	7
<b><u>Capítulo 2</u></b>	
<b>Figura 2.</b> Pontos de coleta de amostra realizados durante o campeonato Sul Americano.	13
<b>Figura 3.</b> Amostra representativa coletada para uma jogadora.	14
<b>Figura 4.</b> Ferramenta utilizada na confecção dos <i>punches</i> a partir das amostras de DBS.	16
<b>Figura 5.</b> Método publicado por Naz e co-autores para análise multiplataforma de tecidos de pulmão.	17
<b>Figura 6.</b> Metodologia final aplicada às amostras coletadas para os Jogos 1 e 7.	19
<b>Figura 7.</b> Aspecto final dos extratos obtidos a partir das diferentes técnicas de extração para os 3 substratos analisados.	23
<b>Figura 8.</b> Diagrama de Venn obtido para os 3 substratos a) em extração por vortex, b) em extração assistida por pérolas e c) utilizando-se os melhores resultados entre as duas extrações para cada substrato.	24
<b><u>Capítulo 3</u></b>	
<b>Figura 9.</b> PCA construído a partir dos dados brutos a) com distribuição por cores apenas e b) com nomes atribuídos para visualização da tendência de separação apresentada pelas amostras de QC.	33
<b>Figura 10.</b> Variação do TUS de acordo com a ordem de injeção na análise por CE-MS.	34

**Figura 11.** PCA construído após a normalização por QC-SVR a) com e b) sem a identificação das amostras. 35

**Figura 12.** Distribuição final das amostras e QC no gráfico de PCA após todas etapas de normalização. 36

**Figura 13.** Aspecto da distribuição das amostras no PCA para dados não-normalizados de CE-MS. 37

**Figura 14.** PCA apresentando o agrupamento das amostras de QC após as etapas de normalização. 37

**Figura 15.** Agrupamento inicial apresentado pelas amostras na análise por LC-MS em modo positivo. 38

**Figura 16.** Distribuição final após normalização por QC-SVR e massas individuais por LC-MS em modo negativo. 39

**Figura 17.** PCA formado a partir dos dados brutos para a análise por LC-MS em modo negativo. 39

**Figura 18.** Variação individual de cada metabólito considerando-se os pontos de coleta no tempo para técnica de GC-MS. 45

**Figura 19.** Variação individual de cada metabólito considerando-se os pontos de coleta no tempo para a técnica de CE-MS. 48

**Figura 20.** Correlação obtida entre os valores de PL do Jogo 1 e a variação de área dos metabólitos Leucina+Isoleucina 50

**Figura 21.** Variação individual de cada metabólito considerando-se os pontos de coleta no tempo para a técnica de LC-MS no modo positivo 51

**Figura 22.** Variação individual de cada metabólito considerando-se os pontos de coleta no tempo para a técnica de LC-MS no modo negativo 53

## Caderno Anexo

**Figura 1.** Cromatogramas representativos para a técnica de GC-MS considerando amostras de a) branco, b) QC, c) amostra e d) comparação com amostra de plasma analisada utilizando-se o mesmo método. 68

**Figura 2.** Eletroferogramas representativos para a técnica de CE-MS considerando amostras de a) branco, b) QC, c) amostra e d) comparação com amostra de plasma analisada utilizando-se o mesmo método. 69

**Figura 3.** Eletroferograma de íons extraídos para a técnica de CE-MS de a) branco, b) QC, c) amostra e d) comparação com amostra de plasma analisada utilizando-se o mesmo método. **69**

**Figura 4.** Cromatogramas representativos para a técnica de LC-MS em modo positivo considerando amostras de a) branco, b) QC, c) amostra e d) comparação com amostra de plasma analisada utilizando-se o mesmo método. **70**

**Figura 5.** Cromatograma de íons extraídos para a técnica de LC-MS(+) de a) branco, b) QC, c) amostra e d) comparação com amostra de plasma analisada utilizando-se o mesmo método. **70**

**Figura 6.** Cromatogramas representativos para a técnica de LC-MS em modo negativo considerando amostras de a) branco, b) QC, c) amostra e d) comparação com amostra de plasma analisada utilizando-se o mesmo método. **71**

**Figura 7.** Cromatograma de íons extraídos para a técnica de LC-MS(-) de a) branco, b) QC, c) amostra e d) comparação com amostra de plasma analisada utilizando-se o mesmo método. **71**

**Figura 8.** Exemplificação dos três resultados possíveis em nível de tentativa de identificação de metabólitos para a técnica de GC-MS através de espectros representativos. a) Identificação do ácido palmítico através da biblioteca FIEHN, b) Identificação do ácido 2-etilexanóico através da biblioteca NIST e c) metabólitos sem identificação correspondente em ambas bibliotecas. Neste último caso, apenas fragmentos não específicos foram encontrados (73 e 147, fragmentos relacionados ao derivatizante e que estão presentes durante toda a aquisição). Além disso, fragmentos que poderiam ser considerados característicos, como o 177, não foram encontrados). Por fim, a maior probabilidade calculada pelo software NIST MS Search, para o ácido glicólico, foi de apenas 30,8%. **74**

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Capítulo 2</b>	
<b>Tabela 1.</b> Resultados obtidos na comparação entre 1 e 3 punches em termos da razão das áreas médias e o coeficiente de variação (CV).	<b>20</b>
<b>Tabela 2.</b> Descrição do conjunto de amostras utilizados nos testes de comparação entre os substratos e os métodos de extração.	<b>22</b>
<b>Tabela 3.</b> Valores de coeficientes de variação e área média normalizada obtidos para triplicatas de amostras de 3 substratos extraídos nas duas metodologias testes (vórtex e assistido por pérolas)	<b>25</b>
<b>Capítulo 3</b>	
<b>Tabela 4.</b> Metabólitos obtidos por GC-MS com valores de $p < 0,05$ para RM-ANOVA, em ordem crescente.	<b>44</b>
<b>Tabela 5.</b> Níveis de correlação significativos obtidos para técnica de GC-MS e os dados de PL obtidos para o Jogo 1.	<b>46</b>
<b>Tabela 6.</b> Metabólitos obtidos por CE-MS com valores de $p < 0,05$ para RM-ANOVA, em ordem crescente.	<b>46</b>
<b>Tabela 7.</b> Níveis de correlação significativos obtidos para técnica de CE-MS.	<b>49</b>
<b>Tabela 8.</b> Lista de <i>features</i> com $p$ -valor inferior a 0,05 para a técnica de LC-MS no modo positivo.	<b>50</b>
<b>Tabela 9.</b> Anotação dos compostos encontrados pela técnica de LC-MS em modo de ionização positivo.	<b>52</b>
<b>Tabela 10.</b> Lista de <i>features</i> com $p$ -valor inferior a 0,05 para a técnica de LC-MS no modo positivo.	<b>52</b>
<b>Tabela 11.</b> Anotação dos compostos encontrados pela técnica de LC-MS em modo de ionização negativo.	<b>53</b>

## **Lista de Anexos**

<b>Tabela 1.</b> Composição descrita para suplemento do tipo Whey Protein (New Millen, Cajamar, São Paulo), em 2 medidas-padrão (44g de produto).	<b>68</b>
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros utilizados na deconvolução dos dados obtidos por GC-MS em software Unknwon.	<b>75</b>
<b>Tabela 3.</b> Parametros de deconvolução, extração, alinhamento e integração de picos para CE-MS e LC-MS em software Profinder.	<b>76</b>
<b>Tabela 4.</b> Valores de massa medidos em balanca analítica para cada amostra. O valor médio foi utilizado como valor de normalizacao das amostras de QC.	<b>77</b>
<b>Tabela 5.</b> Valores de player load (PL) para os Jogos 1 e 7.	<b>78</b>
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros utilizados na correlação entre PL e ΔÁrea dos metabólitos em plataforma Metaboanalyst	<b>79</b>
<b>Tabela 7.</b> Metabólitos identificados na análise multiplataforma das amostras dos Jogos 1 e 7 para a técnica de CE-MS a partir das massas teóricas e dos valores de tempo de retenção relativos ao padrão interno (Metionina Sulfona) armazenados em biblioteca in-house construída a partir dos padrões internos dos compostos em questão. A mesma abordagem foi utilizada na identificação dos metabólitos apresentados na tabela 1 no item 2.2.2. (dados não apresentados)	<b>79</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**HMDB** – *Human Metabolome Database*

**MS** – Espectrometria de Massas (do inglês, *mass spectrometry*)

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**LC-MS** – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

**GC-MS** – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

**CE-MS** – Eletroforese Capilar acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês, *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*)

**DBS** – Amostras de sangue seco (do inglês, *Dried Blood Spots*)

**NBS** – Sigla referente ao popularmente denominado “teste do pezinho” (do inglês, *Newborn Screening*)

**PL** – Carga de jogo (do inglês, *player load*)

**MTBE** – Éter metil-terc-butílico (do inglês, *Methyl tert-butyl ether*)

**CV** – Coeficiente de variação

**EPV** – Extração por vortex

**EAP** – Extração assistida por pérolas

**WT** – Substrato Whatman

**BS** – Substrato Bloodstain

**FP** – Substrato Papel Filtro

**WTv** – Substrato Whatman sob extração por vórtex

**WTT** – Substrato Whatmn sob extração assistida por pérolas (*Tissuelyzer*)

**BSV** – Substrato Bloodstain sob extração por vórtex

**BST** – Substrato Bloodstain sob extração assistida por pérolas (*Tissuelyzer*)

**FPV** – Substrato Papel Filtro sob extração por vórtex

**FPT** – Substrato Papel Filtro sob extração assistida por pérolas (*Tissuelyzer*)

**QC** – Amostra(s) de controle de qualidade (do inglês, *Quality Control*)

**1B** – Amostras coletadas anteriormente ao Jogo 1 (B, do inglês *before*)

**1A** – Amostras coletadas anteriormente ao Jogo 1 (A, do inglês *after*)

**7B** – Amostras coletadas anteriormente ao Jogo 7 (B do inglês *before*)

**7A** – Amostras coletadas anteriormente ao Jogo 1 (A do inglês *after*)

**TOF** – Analisador do tipo tempo de voo (do inglês, *Time-of-flight*)

**ESI** – Ionização por eletrospray (do inglês, *Electrospray Ionization*)

**UHPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *Ultra High Performance Liquid Chromatography*)

**NIST** – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês, *National Institute of Standards and Technology*)

**EIC** – Cromatograma de íon extraído (do inglês, *Extracted Ion Chromatogram*)

**PCA** – Análise de componentes principais (do inglês *Principal Component Analysis*)

**TUS** – Sinal total útil (do inglês, *Total Useful Signal*)

**QC-SVRC** – Normalização por controle de qualidade e regressão por vetores de suporte (do inglês, *Quality Control Support Vector Regression*)

**RM-ANOVA** – Análise de variância de medidas repetidas (do inglês, *Repeated Measurement Analysis of Variance*)

**Y** – Grupo de amostras formado pelas jogadoras que participaram integralmente dos Jogos 1 e 7 (do inglês, *yes*)

**N** – Grupo de amostras formado pelas jogadoras que não participaram dos Jogos 1 e 7 (do inglês, *no*)

**PC** – Fosfatidicolina (do inglês, *Phosphatidylcholine*)

**PE** – Fosfatidiletanamina (do inglês, *Phosphatidylethanolamine*)

**PG** – Fosfatidilglicerol (do inglês, *Phosphatidylglycerol*)

**BCAA** – Aminoácidos de cadeia ramificada (do inglês, *Branched-Chain Amino Acids*)

## SUMÁRIO

	Página
<b><u>Capítulo 1: Aspectos Teóricos</u></b>	
<b>1.1.</b> Introdução	<b>21</b>
<b>1.1.1.</b> Fundamentos da análise metabolômica	<b>21</b>
<b>1.1.2.</b> Amostragem por DBS ( <i>Dried Blood Spot</i> )	<b>27</b>
<b>1.1.3.</b> O futebol e suas alterações metabólicas	<b>28</b>
<b>1.2.</b> Motivação	<b>30</b>
<b>1.3.</b> Objetivos Específicos	<b>30</b>
<b><u>Capítulo 2: Design Experimental e Etapas de Normalização</u></b>	
<b>2.1.</b> Fase pré-analítica	<b>33</b>
<b>2.1.1.</b> Características da competição	<b>33</b>
<b>2.1.2.</b> Coleta de amostras	<b>33</b>
<b>2.1.3.</b> Transporte e armazenamento	<b>34</b>
<b>2.1.4.</b> Dados de campo (Metadata)	<b>35</b>
<b>2.2.</b> Adaptação e otimização do preparo de amostra	<b>35</b>
<b>2.2.1.</b> Descrição do método inicial e otimizações realizadas	<b>36</b>
<b>2.2.2.</b> Otimização do número de punches (CE-MS)	<b>39</b>
<b>2.2.3.</b> Otimização do método de extração e comparação com substratos comerciais	<b>41</b>
<b><u>Capítulo 3: Análise Multiplataforma</u></b>	
<b>3.1.</b> A análise multiplataforma	<b>47</b>
<b>3.1.1.</b> GC-MS	<b>47</b>
<b>3.1.2.</b> CE-MS	<b>48</b>

<b>3.1.3. LC-MS</b>	<b>48</b>
<b>3.2. Pré-processamento</b>	<b>49</b>
<b>3.2.1. GC-MS</b>	<b>49</b>
<b>3.2.2. CE-MS</b>	<b>50</b>
<b>3.2.3. LC-MS</b>	<b>51</b>
<b>3.3. Normalização dos dados</b>	<b>52</b>
<b>3.3.1. Análise por GC-MS</b>	<b>52</b>
<b>3.3.2. Análise por CE-MS</b>	<b>56</b>
<b>3.3.3. Análise por LC-MS (+)</b>	<b>57</b>
<b>3.3.4. Análise por LC-MS (-)</b>	<b>59</b>
<b>3.4. Pré-tratamento</b>	<b>60</b>
<b>3.4.1. GC-MS</b>	<b>60</b>
<b>3.4.2. CE-MS</b>	<b>61</b>
<b>3.4.3. LC-MS (+)</b>	<b>61</b>
<b>3.4.4. LC-MS (-)</b>	<b>61</b>
<b>3.5. Resultados experimentais</b>	<b>62</b>
<b>3.5.1. Resultados obtidos pela técnica de GC-MS</b>	<b>63</b>
<b>3.5.2. Resultados obtidos pela técnica de CE-MS</b>	<b>66</b>
<b>3.5.3. Resultados obtidos pela técnica de LC-MS (+)</b>	<b>70</b>
<b>3.5.4. Resultados obtidos pela técnica de LC-MS (-)</b>	<b>72</b>
<b>3.6. Discussão biológica</b>	<b>74</b>
<b>3.7. Conclusão Final</b>	<b>77</b>
<b>Referências</b>	<b>80</b>
<b>Lista de Anexos</b>	<b>88</b>

# **CAPÍTULO 1.**

# **ASPECTOS TEÓRICOS**

## 1.1. Introdução

### 1.1.1. Fundamentos da análise metabolômica

Há apenas 19 anos, Oliver Fiehn e co-autores introduziram pela primeira vez o termo metabolômica (Fiehn et al., 2000). Neste artigo, os autores apresentam a metabolômica, termo citado apenas 1 vez nas palavras-chave (o termo oficial utilizado no texto e no título é “*metabolite profiling*”) como uma ferramenta capaz de diferenciar fenotipicamente plantas com diferentes bagagens genéticas. Os autores citam:

*“Plant functional genomics couples the generation of transgenic and mutant plants to the multiparallel analysis of gene products such as mRNA and proteins. However, these methods do not provide direct information about how a change in mRNA or protein is coupled to a change in biological function. As a result of a multiplicity of regulatory interactions at all levels in plant cells, a change at one level in the complex network does not necessarily lead to a particular change in function or phenotype.”*

Em suma, o que afirmam os autores desde o primeiro uso da metabolômica é um dos principais pilares responsáveis pelo seu rápido crescimento ao longo dos anos (passando de 1 artigo no ano 2000 para 3826 em 2018, de acordo com a busca pelo termo “*metabolomics*” no campo “Tema” na base de dados “*Web of Science*”). Os genes podem ser considerados o nível biológico mais imutável em nosso (e outros) organismos vivos como animais e plantas, uma vez que poucas (ou nenhuma, em geral) mudança ocorre durante o percurso biológico. No entanto, genes são transcritos em RNAm, que podem sofrer maiores variações ainda levando-se em conta apenas 1 mutação genética. Essa cadeia continua para o nível proteico após a tradução, e mesmo pequenas variações em determinadas proteínas podem resultar em fenótipos diferentes (Nelson & Cox, 2011). Por fim, 1 única proteína tem a capacidade de regular uma cadeia de metabólitos, aqui então definidos como pequenas moléculas, geralmente de massa nominal máxima de 2000 Da. Dessa forma, a sequência genômica – transcriptômica – proteômica – metabolômica vem não só se tornando cada vez mais ampla e interconectada como também se aproximando cada vez mais do resultado fenotípico. Além disso, diversas patologias e síndromes são hoje caracterizadas não pela bagagem genética de determinado indivíduo, mas por fatores

externos como alimentação ou exposição a diferentes fatores ambientais que o circunda, ou seja, não existe nenhuma mudança em relação aos outros níveis biológicos. Como citado por Wishart e co-autores:

*“In contrast to genes and genetic risk scores that can be used to indicate what might happen, metabolic profiling and metabolic phenotyping indicate what is currently taking place. In this regard, metabolomics not only enables the identification of disease biomarkers in the form of endogenous metabolites (gene-derived metabolites) and exogenous metabolites (environmentally derived metabolites)*

Foi desta maneira que a metabolômica se popularizou de maneira tão rápida: devido a sua grande capacidade de encontrar respostas em um contexto mais holístico e relacionado ao fenótipo que as demais técnicas ômicas.

Definir o termo metabolômica atualmente pode não ser ainda trivial. Ainda que muitos termos e conceitos já estejam bem estabelecidos na comunidade científica, ainda existem diversos aspectos a serem discutidos em termos de padronização de nomenclaturas, práticas e divulgação de resultados (Spicer, Salek, & Steinbeck, 2017). Muitos termos foram criados e definidos por diferentes autores, como por exemplo o termo “metabolite profiling”, utilizado pelo próprio Fiehn na sua publicação de origem do termo “metabolomics” e também utilizada até hoje. Outro exemplo é o termo “metabonomics” criado e definido por Nicholson (Nicholson, Lindon, & Holmes, 1999) um ano antes de Fiehn como “a medida quantitativa das respostas dinâmicas e multiparamétricas de organismos vivos a estímulos fisiopatológicos ou modificações genéticas”. A classificação atual aceita é que o termo “metabolomics” é utilizado como um termo global, que abrange uma outra infinidade de termos representando diferentes tipos de estudo. Como entendimento do autor desta tese, a metabolômica pode ser resumida como uma abordagem que visa a análise, quantitativa ou qualitativa de metabólitos em amostras controle *versus* estudo, onde as amostras do grupo estudo são caracterizadas por determinada condição/intervenção a qual se deseja estudar (como uma patologia, uma mudança de dieta, uma exposição a um fármaco, uma alteração genética), não presente/efetuada no grupo controle, com o objetivo de encontrar metabólitos presentes em níveis distintos com base em uma significância estatística entre os dois (ou mais) grupos, como forma de encontrar explicações biológicas que expliquem e/ou

caracterizem tal condição/intervenção. Ainda assim, essa definição não engloba outras subáreas da metabolômica como a denominada fluxômica, que visa medir as taxas de reação de determinada rede de reações que ocorrem em um organismo e é realizada através do uso de padrões marcados isotopicamente (Winter & Krömer, 2013).

Dentro deste conceito, a primeira subclassificação bem estabelecida dos diversos tipos de estudos metabolômicos são os estudos *targeted* e *untargeted*. O primeiro tem como premissa a análise quantitativa (ou semi-quantitativa) de um número de metabólitos relativamente pequeno em relação a abordagem *untargeted*. Isso se deve, normalmente, ao conhecimento prévio de determinados metabólitos ou classes de metabólitos associados com a condição de estudo. Por outro lado, a metabolômica *untargeted* visa analisar o maior número de metabólitos possível, considerando-se os limites impostos pela técnica analítica escolhida em termos de compatibilidade com a vasta diversidade química presente nestas moléculas (Klassen et al., 2017). Atualmente, a principal base de dados responsável por agrupar e descrever todos os metabólitos já reportados na literatura, a *Human Metabolome Database* (HMDB) (Wishart et al., 2017) conta com 113999 moléculas, que variam desde as mais hidrofílicas às mais lipofílicas, das presentes em níveis traços ( $< 1\text{nmolL}^{-1}$ ) a altas concentrações ( $>1\text{ }\mu\text{molL}^{-1}$ ) e ainda de formas isoméricas (e que devem ser diferenciadas muitas vezes por apresentarem diferentes papéis biológicos). Esses fatores explicam a dificuldade (e, até o momento, a impossibilidade) de abranger todo o metaboloma no mesmo estudo *untargeted*.

Para a análise destes metabólitos, distintas amostras biológicas podem ser coletadas. Normalmente, a escolha da amostra é dependente da hipótese científica a ser respondida (por exemplo, utilizar amostras de saliva para busca de biomarcadores de câncer de boca). No entanto, muitas vezes tal escolha não se faz possível, devido a fatores como a dificuldade de determinadas intervenções clínicas (como para uma coleta de tecido, por exemplo), o custo, a disponibilidade e outros fatores logísticos. Amostras típicas utilizadas em análises metabolômicas incluem sangue e seus derivados (plasma e soro), urina e saliva. De acordo com o HMDB (Wishart et al., 2017), existem 25367, 4263 e 1231 descritos para sangue, urina e saliva, respectivamente, o que a princípio tornaria a amostra de sangue a escolha lógica a ser tomada com o objetivo de abranger um espectro maior de metabólitos. No entanto, no caso em que se deseja desenvolver, por exemplo, um teste rápido, barato e não

invasivo e de aplicação em rotina para detectar determinada patologia, a saliva passa a ser um candidato mais interessante.

As principais técnicas utilizadas para a análise destes metabólitos atualmente são a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) e ressonância magnética nuclear (RMN). No caso da MS, a possibilidade de acoplamento com técnicas de separação como cromatografia líquida (LC-MS, do inglês *liquid chromatography-mass spectrometry*), cromatografia gasosa (GC-MS, do inglês *gas chromatography-mass spectrometry*) e eletroforese capilar (CE-MS, do inglês *capillary electrophoresis-mass spectrometry*) amplia a gama de classes de metabólitos passíveis de estudo, além de possibilitar uma diversidade maior de matrizes utilizadas. Além disso, em termos gerais, MS possui a vantagem de apresentar maior sensibilidade em relação a técnica de RMN, possibilitando a detecção de metabólitos em menor concentração. Conjuntamente, é considerado um detector universal, permitindo a análise de uma vasta gama de moléculas. As desvantagens estão, principalmente, no fato de ser menos reproduzível, de não se poder recuperar a amostra após a análise e na maior dificuldade, em geral, de identificação dos metabólitos, parte crucial nos estudos metabolômicos. Por fim, ainda que diversas metodologias com MS tenham sido desenvolvidas utilizando-se infusão direta, separações analíticas são normalmente necessárias para evitar supressão iônica e aumentar a reproduzibilidade. De fato, muitos estudos recentes (Brownfield et al., 2018; Canuto et al., 2017; Du et al., 2018) têm utilizado mais de uma destas técnicas analíticas aplicadas ao mesmo estudo em questão, sendo normalmente denominados então “estudos multiplataforma” na tentativa de ampliar a gama de metabólitos detectados.

Considerando-se a metabolômica *untargeted* e o uso das técnicas analíticas de separação acopladas a MS (foco deste estudo), 4 etapas, em suma, finalizam o ciclo de um estudo em geral. A primeira diz respeito à etapa de adequação dos dados obtidos para posterior análise estatística e pode ser basicamente subdividida em três etapas: pré-processamento, normalização e pré-tratamento. A primeira consiste na extração, a partir dos dados brutos, dos denominados *features*, elementos caracterizados pelo par formado por um tempo de retenção (ou tempo de migração no caso da técnica de CE-MS) e um valor de *m/z*. Nesta etapa, são utilizados algoritmos capazes de realizar a extração destes *features* através do conjunto de amostra, bem como o alinhamento dos valores de tempo de retenção e *m/z*. Assim, cada *feature*

obtido é associado a um valor de intensidade (normalmente a área) correspondente a ele em cada amostra do conjunto de dados (Karaman, 2017). A segunda etapa consiste na normalização dos dados. Esta etapa visa dividir os valores de intensidade por um fator de normalização, com o objetivo de eliminar-se variações analíticas entre tais intensidades que foram virtualmente criadas e, portanto, não representam as variações biológicas. Diversas técnicas podem ser encontradas na literatura, dependendo da aplicação e da característica do conjunto de dados. Por fim, o pré-tratamento dos dados finaliza a etapa pré-estatística, utilizando-se também de transformações matemáticas que visam reduzir os efeitos de erros técnicos e de medida e, assim como na etapa de normalização, dependem da questão biológica em si e da técnica estatística a ser utilizada a seguir (Karaman, 2017).

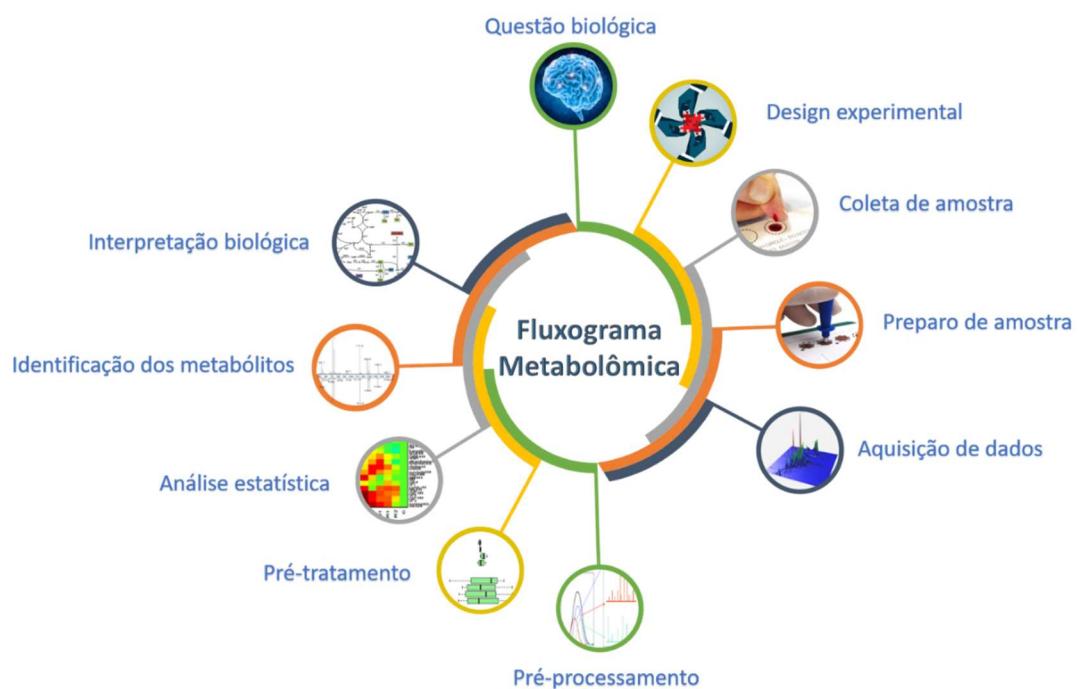
A sequência do tratamento de dados se dá na parte estatística. Para avaliar quais metabólitos apresentam efetivamente uma diferença entre os grupos de estudo, análises estatísticas multi (Yi et al., 2016) e univariada (Vinaixa et al., 2012) podem ser empregadas. O uso de cada opção depende do design experimental e, de fato, o uso de ambas é extremamente recomendado (Vinaixa et al., 2012). Como exemplificado por Considine e Salek (Considine & Salek, 2019), a análise univariada pode ser extremamente útil e direta para a identificação dos metabólitos que diferenciam ambos os grupos ao passo que a análise multivariada pode ser utilizada para a identificação de *outliers* ou metabólitos correlacionados (não-supervisionada) ou ainda para o desenvolvimento de modelos de predição (supervisionada).

Após a descoberta dos possíveis metabólitos diferenciais, faz-se necessário transformar o sinal analítico obtido em um metabólito devidamente identificado. Esta etapa, na verdade, pode ser realizada após a análise estatística (para o caso de LC-MS) ou anteriormente a ela, para os casos de GC-MS e RMN, onde a identificação se faz de maneira mais direta e segura. Em 2007, um grupo de pesquisadores dentro da Sociedade Internacional de Metabolômica, publicou algumas orientações com o objetivo de padronizar diversas questões referentes a essa ciência (Sumner et al., 2007), incluindo a etapa de identificação. Desde então, 4 níveis de identificação são aceitos e utilizados na literatura, iniciando-se com compostos não identificados (nível 1), passando por metabólitos caracterizados (nível 2, atingido com a obtenção de propriedades físico química que deem ao menos uma ideia da classe a que pertence), metabólitos putativamente anotados (nível 3, através de similaridade com bases de dados) e metabólitos identificados (nível 4, onde faz-se necessário 2 técnicas

analíticas ortogonais aplicadas ao composto de interesse e seu possível padrão de referência).

Por fim, como etapa final de um estudo metabolômico em geral, faz-se necessária a interpretação biológica dos resultados apresentados na etapa estatística, correlacionando-se as observações realizadas com a questão inicial. Diferentes abordagens computacionais podem ser usadas nessa etapa. Uma delas envolve ferramentas capazes de mapear e visualizar os metabólitos de interesse em uma representação gráfica do metabolismo, ou seja, das rotas metabólicas (conhecidas em inglês como *metabolic pathways*) (Chagoyen & Pazos, 2012). Isso pode ser realizado em plataformas *online*s como KEGG (Kanehisa & Goto, 2000) e MetaboAnalyst (Chong et al., 2018). Outra forma muito utilizada, principalmente quando se obtém um conjunto de concentrações de diferentes metabólitos, é a MSEA (do inglês, *Metabolite Set Enrichment Analysis*), que difere também em relação à primeira abordagem no sentido de que não necessita uma lista de metabólitos pré-definidos como significativos (Xia, 2017).

Desta forma, as etapas descritas para um estudo metabolômico (*untargeted*) podem ser sintetizadas no fluxograma de trabalho apresentado na **Figura 1**.



**Figura 1.** Etapas gerais de um estudo metabolômico.

Assim, a metabolômica pode ser vista como uma ciência extremamente interdisciplinar, capaz de correlacionar em todo seu processo áreas como a química, a biologia, a estatística, a computação (mais especificamente, a bioinformática), e a medicina. Essa característica explica também o seu uso nas mais diferentes áreas, inclusive com sub-denominações específicas dentro de cada uma devido à sua grande difusão no meio científico. Exemplos são a lipidômica (do inglês, *lipidomics*) (Wang, Wang, & Han, 2019), caracterizada pelo estudo metabolômico da classe de lipídios, especificamente; a foodômica (do inglês, *foodomics*) (Botcherby, 2019), referentes às aplicações na área de alimentos e bebidas em geral; a esportômica (do inglês, *sportomics*) (Bassini & Cameron, 2014), aplicada ao estudo do impacto de diferentes atividades físicas no metaboloma, além das diversas aplicações no ramo da medicina, como na busca por marcadores de doenças (Srivastava & Creek, 2019), no prognóstico de enfermidades (Ascha et al., 2016) e na avaliação dos efeitos causados por determinados tratamentos (Jobard et al., 2017).

### **1.1.2. Amostragem por DBS (*Dried Blood Spot*)**

Uma forma particular de coleta de amostras de sangue vem sendo particularmente estudada por apresentar uma série de vantagens frente ao método de coleta mais comum, a venipuntura. Tal técnica consiste em coletar apenas uma gota de sangue da extremidade do dedo indicador ou ainda do calcaneo em um substrato de celulose, sendo denominada DBS (do inglês, *dried blood spots*). Este procedimento minimiza o desconforto do paciente, coleta uma quantidade inferior de amostra e facilita o transporte e armazenamento, resultando em menores custos operacionais (Antunes, Charão, & Linden, 2016). Por esse motivo, essa técnica tem se difundido a diversas aplicações como epidemiologia, pesquisa ambiental, forense e a toxicologia, dentre outros (Hannon & Therrell, 2014). Sua principal aplicação, no entanto, encontra-se hoje no chamado NBS (do inglês, *newborn screening*), conhecido no Brasil popularmente como “teste do pezinho”, um teste de rotina presente na grande maioria dos hospitais brasileiros (e mundiais) que permite a predição de forma rápida, simples, barata e indolor de uma ampla gama de doenças metabólicas tratáveis com antecedência suficiente para uma intervenção que levará a resultados satisfatórios. O teste é realizado através da análise do perfil metabólico de amino ácidos e outros compostos, sendo capaz de detectar 35 doenças metabólicas primárias e 26 secundárias (Fabie, Pappas, & Feldman, 2019).

Por outro lado, as amostras de DBS apresentam também algumas desvantagens em termos analíticos. A variação biológica em termos do nível de células vermelhas (Lawson, Bernstone, & Hall, 2015) (conhecido como hematócrito), que altera a viscosidade sanguínea e, consequentemente, a quantidade de amostra coletada e a dispersão da amostra no substrato é uma delas. Além disso, a interferência do substrato (Rottinghaus et al., 2014) e a estabilidade de alguns metabólitos a temperatura ambiente vêm sendo reportados (Prentice, Turner, Wong, & Dalton, 2013) como aspectos a serem superados. Ainda assim, o sistema segue sendo vantajoso no sentido de que, primeiramente, simplifica e minimiza o custo da coleta para casos em que a coleta por venipuntura se torna custosa ou impossibilitada, somado ao fato de que suas desvantagens são passíveis de controle e monitoramento em termos de análises química e estatística (Sharma, Jaiswal, Shukla, & Lal, 2014).

### **1.1.3. O futebol e suas alterações metabólicas**

O futebol é o esporte mais popular mundialmente. De maneira amadora ou profissional, um grande número de praticantes é diariamente exposto aos efeitos provocados por esse esporte a nível de saúde. De maneira geral, o futebol é um esporte de alta demanda, cobrindo distâncias ao redor de 10km por jogo (90min), utilizando-se frequentemente de 80 a 90% da frequência cardíaca máxima, incluindo inúmeras atividades de explosão muscular (Stølen, Chamari, Castagna, & Wisloff, 2005). Ademais, é considerado um esporte intermitente, no qual esforços de alta e baixa intensidade são intercalados, exigindo uma alta resposta do sistema energético (Bangsbo, Mohr, & Krstrup, 2006). Nestas condições, diversas transições metabólicas agudas e transientes são esperadas devido ao alto nível de estresse ao qual o corpo é submetido (Carling et al., 2018). Desta forma, o entendimento das diversas alterações metabólicas e alterações sofridas por praticantes deste esporte, principalmente a nível profissional, é parte fundamental em aspectos como fadiga (aguda e prolongada), recuperação pós-jogo ou treino, risco de lesões e outras, possibilitando a intervenção, quando necessária, em termos de dieta, suplementação, fisioterapia, ou qualquer outra necessária para evitar o desgaste de tais atletas (Marqués-Jiménez, Calleja-González, Arratibel, Delextrat, & Terrados, 2017).

Diversos trabalhos publicados já descreveram diversos compostos que puderam ser relacionados com este tipo de atividade física. Em um *review* publicado por Bangsbo e co-autores (Bangsbo et al., 2006), foram descritas as alterações

metabólicas já estabelecidas até o momento, incluindo quebra de creatina-fosfato, aumento na produção de lactato, elevação nos níveis de amônia nos músculos e redução nos níveis de glicogênio. Todas estas alterações podem ser, de determinada maneira, correlacionadas com a condição de fadiga em jogadores deste esporte. Além disso, os níveis de glicose, ácidos graxos livres e hormônios também foram descritos como alterados em amostras de sangue. Atualmente, mais de 10 anos após a publicação deste *review*, novos estudos vem sendo conduzidos com o objetivo de investigar algumas questões relacionadas a este esporte, como o processo de fadiga (Carling et al., 2018; Prado et al., 2017), a recuperação dos atletas (Nédélec et al., 2012; Rey, Padrón-Cabo, Barcala-Furelos, Casamichana, & Romo-Pérez, 2018) e até mesmo os eventos de morte cardíaca súbita (SCD, do inglês *sudden cardiac death*) (Malhotra et al., 2018; Panhuyzen-Goedkoop, Wellens, & Piek, 2018; Santos-Lozano et al., 2017), já que, ainda que raros, acontecem inclusive no decorrer de partidas e, até o momento, não são inteiramente compreendidos cientificamente e nem podem ser detectados de maneira eficaz antes de sua ocorrência.

Assim, novos marcadores podem ser destacados como descobertas de importante destaque no processo de fadiga/recuperação dos atletas, como lactato, adenosina trifosfato, amônia, ureia, creatina quinase, mioglobina, dentre outros (Marqués-Jiménez et al., 2017) . Porém, o fato de um espectro tão amplo de metabólitos ser utilizado, demonstra que as alterações causadas por esse esporte recaem sobre diversas rotas metabólicas e o monitoramento se torna mais complexo. Além disso, a maioria destes resultados foram obtidos em indivíduos do sexo masculino, devido a maior popularidade do esporte e, portanto, podem não se comportar da mesma forma em indivíduos do sexo feminino. Da mesma forma, metabólitos não correlacionados anteriormente em estudos desse tipo podem apresentar um papel importante em atletas do sexo feminino. Por fim, existe ainda um falta de consenso a respeito dos testes atualmente utilizados para monitorar a cinética de fadiga e recuperação (Marqués-Jiménez et al., 2017), assim como algumas limitações na conversão das novas descobertas em aprimoramento em campo (Carling et al., 2018) e muitas razões podem ser apresentadas. A primeira, como já citada, é que os marcadores de avaliação dos estados de fadiga e recuperação ainda são pouco específicos (Kume et al., 2015; Rey et al., 2018). Segundamente, a natureza multifatorial da condição de fadiga, evidenciada pelas diversas categorias em que pode ser subdividida – como física ou mental, temporária ou duradoura – e a

dependência das condições ambientais (Marqués-Jiménez et al., 2017), dificultando assim sua caracterização. Em seguida, temos o fator da variação inter-indíviduo natural do corpo humano, refletido em fatores como idade, condição física e diferentes tipologias musculares entre jogadores (Nédélec et al., 2012). Este último fator, por exemplo, possui uma grande influência nas condições de fadiga/recuperação (Marqués-Jiménez et al., 2017), bem como na incidência de lesões, onde demonstrou ser mais influente do que a carga de jogo (PL, do inglês *player load*) (Carling et al., 2018) – que pode ser compreendida como uma medida do nível de esforço produzido por cada jogador. Por fim, além da variabilidade inter-indivíduo, há também uma diferença em termos de esforço e mecânica de jogo (número de acelerações, corridas longas/curtas, distância total percorrida, saltos) entre as diferentes posições a que cada jogador pertence em campo, significando que muitas vezes se torna difícil uma generalização (Martín-García, Casamichana, Díaz, Cos, & Gabbett, 2018)

### **1.2. Motivação**

A principal motivação deste projeto é, portanto, combinar os elementos apresentados nos itens anteriores, realizando pela primeira vez na literatura, um estudo metabolômico abrangente através do uso de diferentes plataformas analíticas (multiplataforma) no monitoramento das alterações metabólicas de jogadoras de futebol sub-20 em um tipo de amostra também subutilizada e que, no entanto, pode apresentar grande potencial como possível método de amostragem de rotina em situações de jogo.

### **1.3. Objetivos Específicos**

- I.** Adaptar e otimizar um método de análise metabolômica multiplataforma *in-house* desenvolvido inicialmente para amostras de tecido de pulmão na aplicação em amostras de DBS.
- II.** Aplicar o método desenvolvido de forma eficaz em amostras de DBS coletadas durante o Campeonato Sul-Americano Sub-20 de Futebol Feminino.
- III.** Investigar as melhores formas de pré-processamento dos dados, bem como as estratégias de normalização, a fim de controlar-se/eliminar-se variações indesejadas (não-biológicas).

- IV. Executar a análise dos dados através de modelos univariados capazes de fornecer resultados significativos para o design experimental desenhado.
- V. Interpretar, biologicamente, as alterações apresentadas pelas jogadoras e correlacioná-las com parâmetros de esforço obtidos durante cada jogo.

## **CAPÍTULO 2.**

# **DESIGN EXPERIMENTAL E ETAPAS DE OTIMIZAÇÃO**

## 2.1. Fase pré-analítica

### 2.1.1. Características da competição

O Campeonato Sul-Americano Sub-20 de 2015 contou com a participação de 10 seleções e teve sede em Santos, São Paulo, entre os dias 18 de novembro e 03 de dezembro. Durante este período, a equipe brasileira ficou concentrada e todas as jogadoras obtiveram acesso às mesmas opções de alimento durante todo o período do dia (ainda que a quantidade de comida individual não fosse controlada ou imposta). Além disso, após cada jogo, foi ministrado uma dose de suplemento composto por aminoácidos (Whey Protein Premium, New Millen, Cajamar, São Paulo) apenas para as jogadoras que participaram daquela determinada partida. A composição deste suplemento é detalhada na **Tabela 1 do Caderno Anexo**. Por fim, vale ressaltar a alta intensidade da competição, já que em média o Brasil participou de 1 jogo a cada 2 dias (7 jogos em 15 dias).

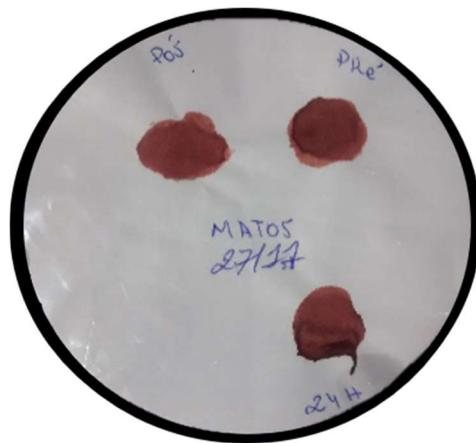
### 2.1.2. Coleta de amostras

As amostras de DBS foram coletadas em papel filtro tipo TP40 (Inlab, Cajamar, São Paulo) durante o Campeonato Sulamericano de Futebol Feminino Sub-20 em três momentos, anteriormente, posteriormente e 24h após os jogos 1 e 7. No entanto, por razões analíticas e limitações no preparo de amostra (largo tempo na confecção dos punches a partir das amostras de DBS, grande número de amostras, tempo de equipamento inviável) apenas as amostras coletadas nos tempos antes e depois puderam ser analisadas. Assim, o cronograma de coleta das amostras analisadas pode ser resumido na **Figura 2**.



**Figura 2.** Pontos de coleta de amostra realizados durante o campeonato Sul Americano.

Anteriormente à coleta, seguiu-se o mesmo procedimento descrito por Song-Gyu Ra (Ra, Maeda, Higashino, Imai, & Miyakawa, 2014) e colaboradores: em um ambiente silencioso, o atleta deveria permanecer em repouso por pelo menos 5 minutos para em seguida realizar-se a coleta. A coleta e demais procedimentos foi realizada segundo orientações descritas por Mei e Lee (Mei & Lee, 2014). Após a coleta, a amostra permaneceu em repouso por no mínimo 3 horas, em ambiente com temperatura entre 18 e 25°C, na posição horizontal, até que o sangue adquirira um aspecto amarronzado, comprovando a secagem por completo da amostra. Uma amostra representativa é apresentada na **Figura 3**. Faz-se necessário ressaltar que a amostra descrita como 24h não fez parte do estudo em questão (apenas as amostras pré e pós).



**Figura 3.** Amostra representativa coletada para uma jogadora.

### 2.1.3. Transporte e armazenamento

Após a coleta e secagem, as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente. Após o campeonato, o transporte ao laboratório foi realizado da mesma maneira, onde em seguida foram armazenadas a -80°C. Após cerca de 1 ano armazenadas, as amostras foram enviadas à Espanha em gelo seco (-20°C), local onde foram realizadas todas as etapas analíticas. Até o momento do preparo, todas as amostras foram mantidas em -80 °C.

#### **2.1.4. Dados de campo (Metadata)**

Durante o Campeonato, dados referentes a performance e desempenho das atletas foram coletados (metadados). Valores de distância total percorrida e PL foram obtidos com o uso de um GPS (do inglês, *global positioning system*) operando a 10Hz (MinimaxX GPS units, Team S5, Catapult Innovations, Melbourne, Australia). Considerando-se que os valores de PL tendem a representar de uma forma mais completa o nível de esforço individual, foram utilizados tais valores em detrimento da distância total percorrida como modelo de correlação com as variações metabólicas observadas. Como destacado por Dalen, ainda que muitos estudos apresentem as demandas fisiológicas baseadas em distância e velocidade, tais parâmetros apenas não cobrem todo o espectro movimentacional e, portanto, podem ser obtidos resultados subestimados. No caso do PL, valores de aceleração são também categorizados e incluídos ao modelo, tornando-o mais consistente (Dalen, Jørgen, Gertjan, Havard, & Ulrik, 2016). Os valores de PL aqui descritos foram detalhados e estudados por Ramos e co-autores em publicações na área (Guilherme P. Ramos et al., 2017; Guilherme Passos Ramos et al., 2017).

#### **2.2. Adaptação e otimização do preparo de amostra**

Nos seguintes subitens serão descritas as etapas de adaptação do método de extração das amostras, desenvolvido a partir do método apresentado por Naz e coautores (Shama Naz, García, & Barbas, 2013) na análise de tecidos de pulmão. Após algumas adaptações devido à natureza distinta da amostra, 2 parâmetros principais foram otimizados de maneira a obter-se uma maior relação sinal/ruído e melhor extração. Esses parâmetros foram os únicos submetidos a um processo mínimo de otimização já que foram considerados os mais influentes no resultado do processo de preparo de amostra. O primeiro diz respeito ao número de *punches* utilizados. *Punches* é a denominação que se dá a pequenos cortes ou “picotes” realizados em amostras de DBS para análise. De acordo com Wong e James (Wong & James, 2014) estes picotes podem variar de 0,35 mm a 12 mm de diâmetro (já que são realizados em formato circular). O diâmetro mais comum na literatura e aplicado neste estudo é o de 3 mm. Para realização desta etapa, estão disponíveis equipamentos para realização automática e sequencial ou ferramentas para execução manual. Ainda que as ferramentas manuais possam apresentar uma menor reprodutibilidade, um tempo maior e o risco de lesões de movimento repetitivo, esta

escolha ainda é utilizada devido ao seu baixo custo. Neste estudo em particular, duas ferramentas manuais foram testadas: o *Harris Uni-Core®* (Sigma-Aldrich) utilizando-se como suporte para execução do corte o *Harris cutting mat* (Sigma-Aldrich) ou suporte de vidro e uma ferramenta manual, não-específica para esse uso, porém que mostrou-se mais eficiente quando comparadas em termos de velocidade de aquisição dos *punches* e qualidade do corte. A ferramenta em questão é apresentada na **Figura 4**. É importante salientar que entre cada amostra cortada, a ferramenta era limpa com papel seco, ainda que problemas de *carry-over* não sejam geralmente notados neste tipo de procedimento (Wong & James, 2014).

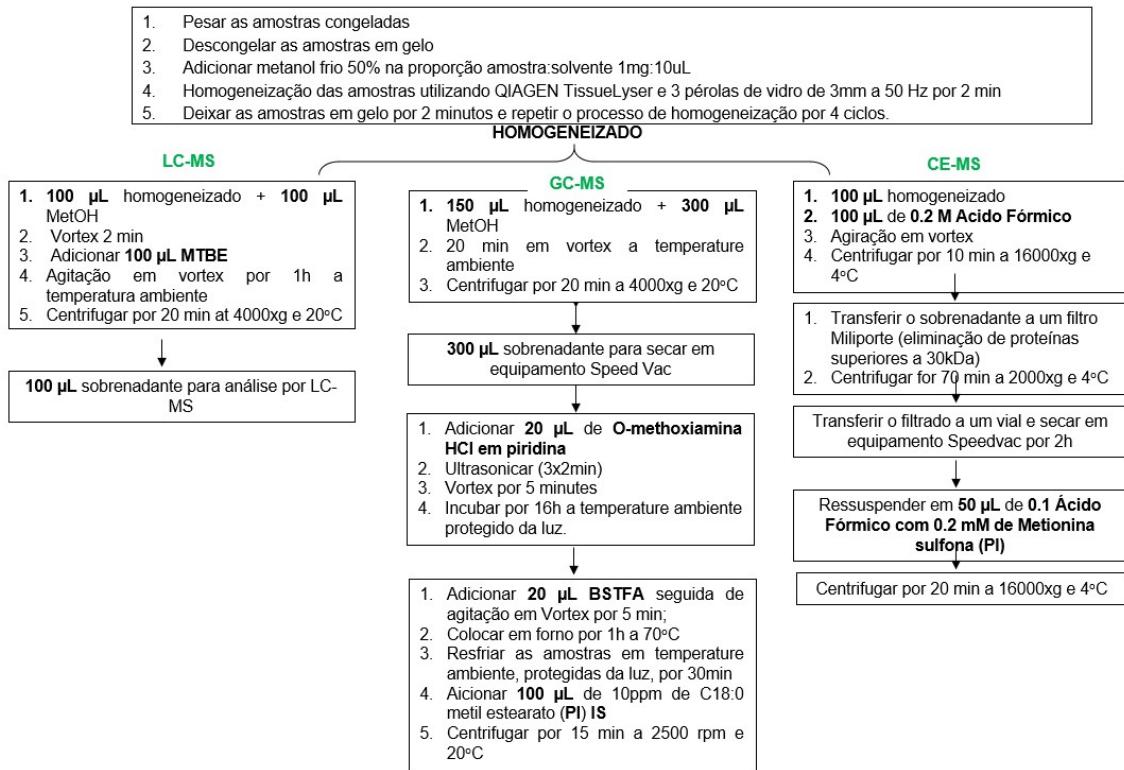


**Figura 4.** Ferramenta utilizada na confecção dos *punches* a partir das amostras de DBS.

Além do número de *punches*, verificou-se também o desempenho de dois métodos de extração distintos (extração por vortex e extração assistida por pérolas). Conjuntamente com esta etapa, foi realizada também uma comparação em relação ao desempenho 2 dos substratos comerciais comumente utilizados na literatura.

### 2.2.1. Descrição do método inicial e otimizações realizadas

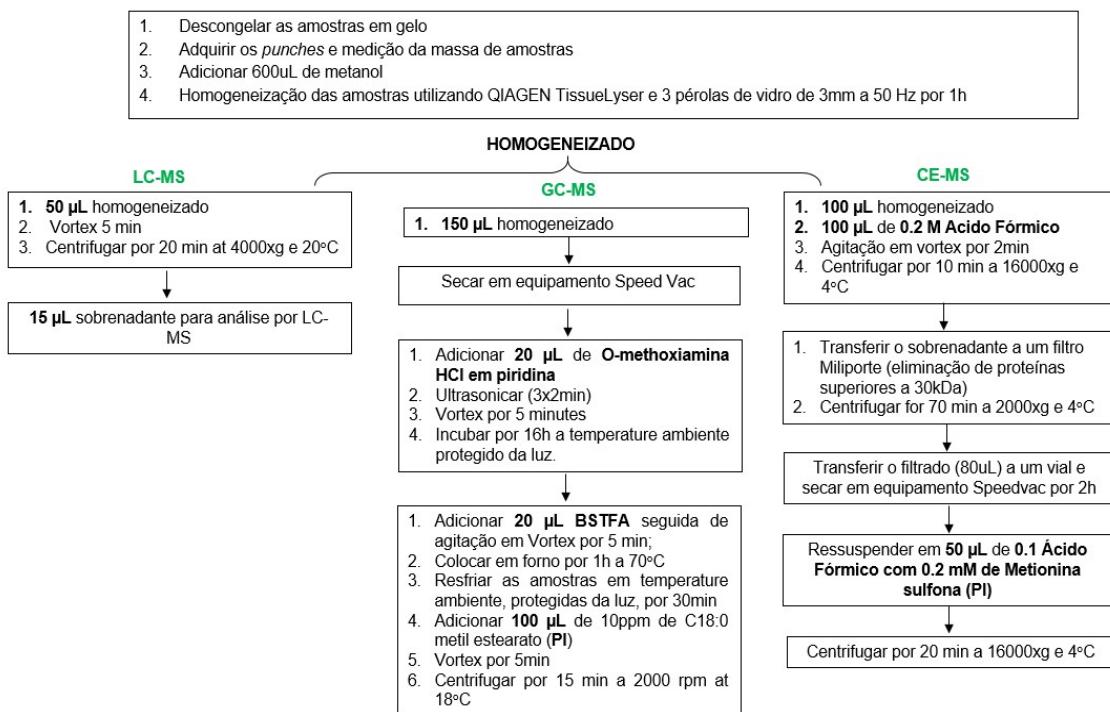
O método de preparo de amostra baseou-se no método publicado por Naz e co-autores (S. Naz, Garcia, & Barbas, 2013), apresentado na **Figura 5**. Este método foi desenvolvido no grupo CEMBIO, supervisionado pela Profa. Dra. Coral Barbas, local onde a adaptação deste mesmo método foi realizada para a análise de DBS neste estudo.



**Figura 5.** Método publicado por Naz e co-autores para análise multiplataforma de tecidos de pulmão.

A primeira adaptação realizada foi a alteração do solvente de extração. O uso de apenas um solvente (em detrimento de uma mistura metanol água) sugeriria um método mais simples pelo fato de não necessitar uma etapa adicional de preparo de solução. Dessa forma, optou-se pelo uso de metanol puro pelo fato de que a maior parte dos metabólitos geralmente detectados pelas técnicas de CE-MS e GC-MS são também solúveis em metanol e mais bem estabelecidos na literatura no uso de DBS (como os aminoácidos, por exemplo). O uso de metanol deu-se, portanto, devido a consideração de que tais metabólitos seriam igualmente extraídos e, o uso de um solvente com menor polaridade poderia eventualmente efetuar uma extração mais eficaz dos compostos apolares (lipídios), analisados pela técnica de LC-MS com fase reversa. Além disso, James e Wong afirmam que a dissolução das células vermelhas e, consequentemente, o efeito matriz, tendem a aumentar de acordo com o aumento da proporção de água no solvente de extração (Wong & James, 2014). Em seguida, definiu-se o volume de extração como fixo, uma vez que ainda que a massa total dos punches fosse medida, seu erro seria relativamente alto já que este valor está em torno de 10 vezes apenas o limite mínimo da balança disponível. Com isso, fixou-se o volume em 600 $\mu\text{L}$ , por motivos apresentados também no item 2.2.3. e, mais tarde,

utilizou-se da massa medida como fator de normalização. Por fim, o último parâmetro a ser alterado diz respeito ao tempo de extração. Tipicamente, utiliza-se a extração por vortex com tempos entre 0,5 min e 60 min (Wong & James, 2014). Isso se deve pois o tempo de extração necessário para diferentes analitos pode ser distinto. Além disso, ainda que um aumento no tempo de extração não resulta, necessariamente, um aumento no valor de recuperação, um maior tempo de extração é capaz de aumentar a reprodutibilidade (Wong et al., 2011) . Dessa forma, por não se conhecer as características dos metabólitos a serem extraídos e desejar-se obter uma maior reprodutibilidade do método, optou-se por definir o tempo de extração em 60 min. Posteriormente, no procedimento apresentado para a análise por LC-MS optou-se por não acrescentar o solvente orgânico (MTBE). No caso do protocolo descrito acima, o objetivo da adição deste solvente é extrair os compostos apolares do homogeneizado (uma mistura de solvente e tecido rompido) e concentrá-los na fase orgânica. No caso descrito aqui, o homogeneizado em questão não possui resíduos do substrato (papel) e, portanto, qualquer metabólito a ser extraído já está em solução após a extração com metanol. Por fim, eliminou-se da primeira etapa de preparo para a técnica de GC-MS a adição de metanol ao homogeneizado, tendo em vista que a única consequência desta etapa seria uma diluição (o que não era desejado em nosso caso). O protocolo para CE-MS seguiu praticamente da mesma maneira. Tais alterações podem ser vistas na **Figura 6**, que apresenta o método de preparo de amostra final utilizado para as amostras coletadas. Os parâmetros do método de extração escolhido (assistida por pérolas) e o número de *punches* utilizado serão descritos nos subitens seguintes.



**Figura 6.** Metodologia final aplicada às amostras coletadas para os Jogos 1 e 7.

### 2.2.2. Otimização do número de *punches* (CE-MS)

Inicialmente avaliou-se o resultado obtido para 1 ou 3 *punches* considerando-se os resultados obtidos para a razão média da área relativa dos picos e o coeficiente de variação (CV) obtido para cada metabólito. Para isso, amostras teste foram preparadas utilizando-se sangue obtido através de doação voluntária. Para tanto, diversas amostras foram confeccionadas adicionando-se 80 $\mu$ L de sangue e aguardando-se 3h para secagem em posição horizontal. O mesmo preparo de amostra foi aplicado, considerando-se o uso de apenas 1 *punch* retirado do centro da amostra ou 3 *punches* retirados também de maneira central. Para a análise, utilizou-se a técnica de CE-MS pelo fato de ser uma técnica analiticamente eficiente na análise de aminoácidos, classe de metabólitos muito bem descrita na literatura como estável e robusta a partir de amostras de DBS. A **Tabela 1** apresenta os resultados para cada composto baseando-se na média das 5 replicatas realizadas para cada grupo, considerando-se os valores de área totais e os valores de área normalizados a partir das intensidades do padrão interno (metionina sulfona, adicionada ao sangue anteriormente a confecção das amostras, em concentração final de 80mmol.L<sup>-1</sup>). A

escala de cores representa uma redução (verde), uma equidade (amarelo) ou um aumento (vermelho) no valor de CV

**Tabela 1.** Resultados obtidos na comparação entre 1 e 3 *punches* em termos da razão das áreas médias e o coeficiente de variação (CV).

Composto	1 <i>punch</i>		3 <i>punches</i>	Razão da área média (3P/1P)	
	CV Área Total	CV Área Relativa ao Padrão Interno			
Alanina	11%	5%	10%	6%	1.84
Ácido 2-Aminobutírico	15%	7%	14%	7%	2.17
Colina	15%	11%	16%	10%	3.10
Serina	10%	18%	10%	5%	1.99
Creatinina	13%	5%	8%	5%	2.24
Prolina	13%	8%	10%	5%	1.91
Valina	8%	8%	9%	3%	1.94
Betaína	8%	11%	10%	3%	1.96
Treonina	12%	6%	10%	6%	2.27
Trans-4-hidroxiprolina	16%	2%	11%	3%	2.13
Creatina	10%	7%	10%	4%	1.74
Isoleucina	10%	5%	12%	3%	2.26
Asparagina	19%	4%	7%	6%	2.59
Ornитина	10%	8%	13%	7%	2.25
Ácido Aspártico	10%	6%	10%	5%	2.23
Hipoxantina	61%	57%	8%	5%	2.91
Acetilcolina	7%	18%	16%	18%	1.89
Glutamina	16%	4%	10%	5%	2.39
Lisina	18%	4%	12%	4%	2.37
Glutamato	14%	6%	10%	5%	2.33
Metionina	20%	5%	10%	7%	2.62
Histidina	10%	6%	12%	7%	1.96
Carnitina	14%	12%	19%	25%	2.05
Fenialalanina	12%	6%	10%	3%	2.33
Arginina	8%	10%	13%	4%	2.11
Citrulina	13%	5%	12%	3%	2.24
<b><i>Metionina Sulfona</i></b>	16%	0	12%	0	2.35
Tirosina	12%	4%	10%	4%	2.34
Acetilcarnitina	6%	11%	8%	4%	1.69
Triptofano	14%	6%	12%	6%	2.02

Os resultados apresentados demonstram haver um ganho significativo na área total obtida para cada um dos metabólitos descritos. Na média, é possível notar que as razões obtidas se encontram acima de 2, representando um ganho de mais de 2 vezes em área total (ainda que, se considerarmos o valor teórico para 100% de eficiência de extração, deveríamos ter este valor próximo a 3). Além disso, pela escala de cores é possível notar uma melhora nos valores de CV para a maior parte dos metabólitos encontrados (16 apresentam valores mais baixos de CV, enquanto apenas 8 apresentam um aumento, se considerarmos o valor de área relativa) e, se considerarmos os metabólitos que apresentaram um valor maior de CV nota-se que os valores obtidos para as amostras de 3 *punches* encontram-se muito próximos aos encontrados para apenas 1 *punch*. Desta forma, preferiu-se acrescentar ao método final para análise multiplataforma o maior número de *punches* disponível a fim de obter um extrato mais concentrado e com um menor CV médio, definindo assim o uso de 5 *punches* (limite máximo encontrado visualmente para as amostras coletadas).

### **2.2.3. Otimização do método de extração e comparação com substratos comerciais**

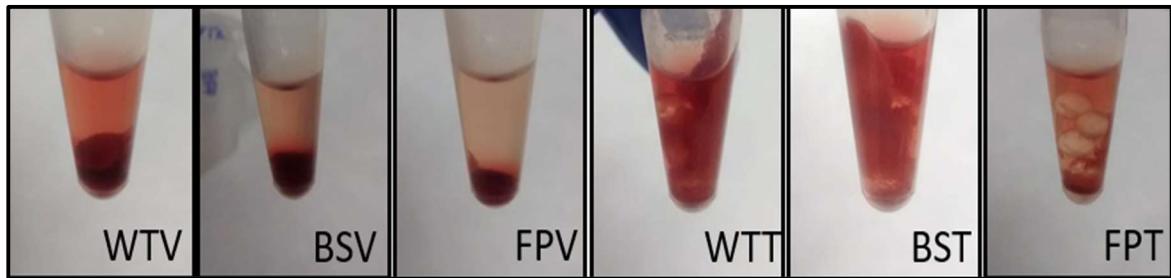
O objetivo desta etapa foi verificar os resultados obtidos em termos da natureza dos metabólitos extraídos, suas áreas relativas e o coeficiente de variação considerando-se as replicatas utilizadas, assim como avaliar a natureza e o CV dos metabólitos detectados no substrato utilizado para este estudo e os substratos comerciais disponíveis. Além disso, decidiu-se comparar 2 tipos de extração: utilizando-se vortex (EPV) ou a extração assistida por pérolas (EAP) com o uso do equipamento *Tissulyzer*, considerando-se o mesmo tempo de extração para as duas técnicas. Para isso, foram adquiridos 2 substratos comerciais muito utilizados em aplicações na literatura, nominalmente Whatman 903™ (WT) e Blood Stain Cards™ (BS) da empresa GE Healthcare Life. O substrato utilizado na coleta de amostras foi denominado FP (do inglês, *filter paper*). As amostras utilizadas nesta etapa foram confeccionadas a partir de uma mesma amostra de sangue – já que a diferença a ser analisada está na composição do substrato e no método de extração. Para tal, uma bolsa de sangue foi cedida pelo Bialystok Blood Donation Center, localizado na Polônia. O envio foi realizado em isopor contendo gelo seco e, quando da chegada,

aliquotada em frascos de 10 mL para armazenamento a 4°C. A partir destas alíquotas, utilizando um único tubo, adicionou-se 50 µL de solução aquosa de metionina sulfona 80 mmolL<sup>-1</sup> (utilizada como padrão interno) a um volume de 2 mL de sangue. O conjunto de amostras foi preparado depositando-se 80 uL de sangue, incluindo, para cada tipo de substrato e de extração, três replicatas de amostras, conforme apresentado na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Descrição do conjunto de amostras utilizados nos testes de comparação entre os substratos e os métodos de extração

Substrato	Método de Extração	Código
WT	Vortex (V)	WT1
		WT2
		WT3
	Assistida por pérolas de vidro (T)	WTT1
		WTT2
		WTT3
BS	Vortex (V)	BSV1
		BSV2
		BSV3
	Assistida por pérolas de vidro (T)	BST1
		BST2
		BST3
FP	Vortex (V)	FPV1
		FPV2
		FPV3
	Assistida por pérolas de vidro (T)	FPT1
		FPT2
		FPT3

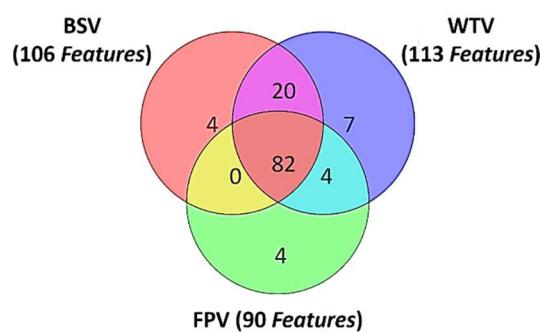
Inicialmente, observou-se que, as amostras WTT e BST formaram homogeneizados em que houve total ruptura do substrato, o que dificultou a coleta do sobrenadante (**Figura 7**). No entanto, o mesmo não ocorreu para o substrato FP, onde houve pequena ou nenhuma ruptura em sua estrutura. Além disso, a diferença de cor indicava uma maior concentração das amostras extraídas a utilizando-se a EAP em relação a EPV.



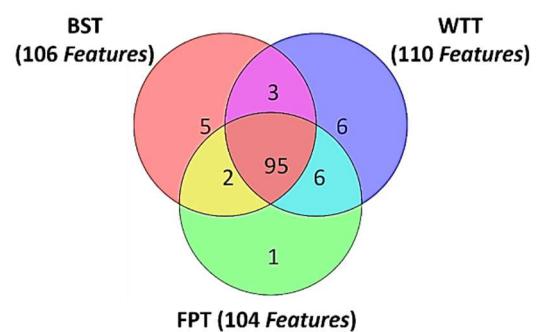
**Figura 7.** Aspecto final dos extratos obtidos a partir das diferentes técnicas de extração para os 3 substratos analisados.

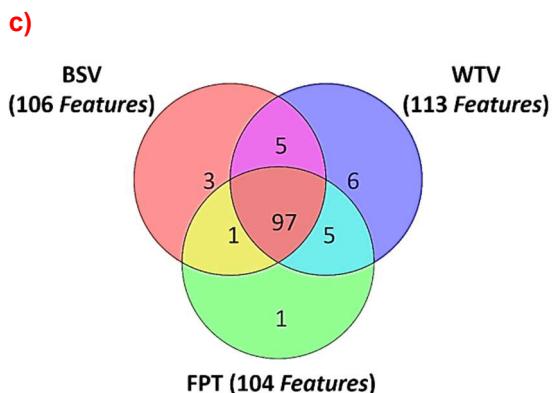
Com os resultados obtidos foram construídos diagramas de Venn com o objetivo de comparar o número total de *features* (termo definido como sinais analíticos pré-processados segundo critérios de extração que, futuramente, poderão ser identificados como metabólitos) entre os tipos de substrato, separadamente para cada tipo de extração. É possível observar na **Figura 8a** uma maior diferença entre o número de *features* para a amostras FPV em comparação com os demais substratos. No entanto, ao utilizar-se a EAP (**Figura 8b**), esta diferença se torna muito menos expressiva, com poucas diferenças no número total e nos metabólitos em comum, o que indica uma melhora em níveis analíticos. Por fim, se compararmos a natureza dos metabólitos considerando dentro de cada tipo de substrato aquele com o maior número de *features* (**Figura 8c**), observa-se uma grande correlação entre o número de *features* totais, bem como um alto número de metabólitos em comum entre os 3 substratos analisados

a)



b)





**Figura 8.** Diagrama de Venn obtido para os 3 substratos a) em extração por vortex, b) em extração assistida por pérolas e c) utilizando-se os melhores resultados entre as duas extrações para cada substrato.

Além disso, verificou-se também, como critério de seleção, o coeficiente de variação (**Tabela 3**) para determinados metabólitos que puderam ser identificados (a identificação foi feita baseando-se no valor de  $m/z$  e no tempo de retenção relativo, listados em biblioteca *in-house*). Ao comparar-se os 6 grupos, as amostras FPV apresentaram os piores resultados, com altos valores de CV. Por outro lado, as amostras BSV e WTV apresentaram, em geral, valores mais baixos em relação ao mesmo substrato extraído pela EAP, corroborando o fato de que tal tipo de extração é a mais presente na literatura na extração de amostras de DBS (Wong & James, 2014). Por fim, as amostras FPT apresentaram valores de CV muito inferiores as amostras FPV e próximos aos valores apresentados pelas amostras BSV e WTV (ainda que no geral, superiores). Desta forma, ficou evidente a vantagem do uso da técnica de EAP para o FP, seguindo-se a otimização do método com esta técnica. No entanto, a escolha dessa técnica evidencia uma segunda mudança no método inicial: o volume de extração deve ser de 600uL para que se possa coletar os volumes exigidos por cada técnica analítica, o volume necessário para as amostras de controle de qualidade (QC) e reste uma margem de segurança com relação ao *bulk* formado pelo substrato extraído e as pérolas de vidro. Além disso, considerando-se que o extrato formado se apresentará provavelmente extremamente diluído devido ao alto volume de extração e a baixa quantidade de amostra presente ainda que se utilizem 5 punches, decidiu-se elevar o tempo total de extração para 1 hora com o objetivo de se maximizar a extração dos metabólitos do substrato.

**Tabela 3.** Valores de coeficientes de variação e área média normalizada obtidos para triplicatas de amostras de 3 substratos extraídos nas duas metodologias testes (vórtex e assistido por pérolas)

Baixo  Alto

Composto	$\Delta$ (ppm)	Coeficiente de variação						Área média normalizada (Padrão interno e massa)		
		BSV	BST	WTV	WTT	FPV	FPT	WTV	BSV	FPT
1-metilhistidina	14	16%	16%	14%	22%	61%	21%	$6.10^{-4}$	$6.10^{-4}$	$4.10^{-4}$
Acetilcarnitina	3	8%	12%	5%	19%	30%	12%	$5.10^{-3}$	$5.10^{-3}$	$3.10^{-3}$
Acetilcolina	3	7%	11%	2%	17%	28%	8%	$4.10^{-3}$	$3.10^{-3}$	$2.10^{-3}$
Alanina	9	1%	10%	1%	18%	26%	3%	$1.10^{-1}$	$1.10^{-1}$	$7.10^{-2}$
Arginina	17	31%	6%	11%	31%	28%	12%	$2.10^{-3}$	$2.10^{-3}$	$1.10^{-3}$
Asparagina	4	5%	13%	11%	19%	29%	0%	$2.10^{-2}$	$2.10^{-2}$	$1.10^{-2}$
Ácido Aspártico	0	3%	15%	4%	19%	24%	11%	$4.10^{-2}$	$3.10^{-2}$	$2.10^{-2}$
Betaína	0	1%	12%	10%	18%	27%	4%	$2.10^{-2}$	$2.10^{-2}$	$1.10^{-2}$
Carnitina	1	8%	7%	9%	18%	29%	8%	$5.10^{-3}$	$4.10^{-3}$	$3.10^{-3}$
Colina	3	6%	15%	10%	15%	32%	2%	$5.10^{-2}$	$4.10^{-2}$	$3.10^{-2}$
Creatina	1	5%	14%	1%	18%	30%	4%	$5.10^{-2}$	$5.10^{-2}$	$3.10^{-2}$
Creatinina	1	2%	2%	13%	16%	26%	4%	$2.10^{-2}$	$1.10^{-2}$	$9.10^{-3}$
Dimetilarginina	2	11%	13%	3%	15%	36%	10%	$2.10^{-3}$	$1.10^{-3}$	$8.10^{-4}$
Glicina	13	3%	5%	5%	17%	22%	3%	$6.10^{-2}$	$5.10^{-2}$	$3.10^{-2}$
Glutamina	0	7%	18%	2%	22%	28%	7%	$2.10^{-2}$	$2.10^{-2}$	$1.10^{-2}$
Histidina	1	11%	7%	11%	19%	30%	16%	$6.10^{-2}$	$5.10^{-2}$	$3.10^{-2}$
Hipoxantina	1	5%	13%	4%	19%	21%	4%	$2.10^{-1}$	$2.10^{-1}$	$1.10^{-1}$
Isoleucina	0	6%	14%	2%	20%	26%	7%	$3.10^{-1}$	$2.10^{-1}$	$2.10^{-1}$
Lisina	1	13%	10%	11%	20%	30%	10%	$1.10^{-1}$	$9.10^{-2}$	$6.10^{-2}$
<b>Metionina Sulfona (IS)</b>	0	5%	22%	1%	22%	27%	5%	$2.10^{-2}$	$2.10^{-2}$	$1.10^{-2}$
Ornitina	1	9%	9%	12%	19%	26%	8%	$6.10^{-2}$	$5.10^{-2}$	$3.10^{-2}$
Fenilalanina	2	6%	14%	1%	21%	24%	2%	$8.10^{-2}$	$7.10^{-2}$	$5.10^{-2}$
Prolina	1	3%	15%	3%	18%	28%	5%	$1.10^{-1}$	$9.10^{-2}$	$6.10^{-2}$
Serina	2	1%	11%	2%	21%	23%	14%	$5.10^{-2}$	$4.10^{-2}$	$3.10^{-2}$
Treonina	0	1%	12%	1%	21%	24%	5%	$5.10^{-2}$	$4.10^{-2}$	$3.10^{-2}$
Triptofano	0	13%	21%	2%	22%	22%	3%	$1.10^{-2}$	$1.10^{-2}$	$9.10^{-3}$
Tirosina	1	7%	13%	3%	21%	37%	22%	$3.10^{-2}$	$3.10^{-2}$	$2.10^{-2}$
Valina	0	5%	13%	1%	19%	23%	9%	$1.10^{-1}$	$1.10^{-1}$	$8.10^{-2}$

## **CAPÍTULO 3.**

# **ANÁLISE MULTIPLATAFORMA**

### 3.1. A análise multiplataforma

O design de coleta de amostras descrito no item 2.1.2. resultou em um total de 88 amostras, oriundas das 22 jogadoras coletadas durante os 4 tempos descritos: anteriormente ao Jogo 1 (conjunto 1B, do inglês, *before*), após o Jogo 1 (conjunto 1A, do inglês *after*), anteriormente ao Jogo 7 (7B) e após o Jogo 7 (7A). O conjunto de amostras em questão foi submetido ao preparo de amostra também anteriormente descrito no método de otimização para a análise multiplataforma. Em seguida, deu-se andamento às diferentes técnicas analíticas conforme descritas nas metodologias a seguir.

#### 3.1.1. GC-MS

As análises foram realizadas em sistema 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), equipado com um auto amostrador 7693 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas com detector do tipo mono quadrupolo, modelo 5975C (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). Dois microlitros da amostra derivatizada foram injetados através de uma coluna DB5-MS (comprimento: 30 m, diâmetro interno: 0,25 mm) integrada a uma pré-coluna (10m J&W, Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). Utilizou-se He como gás de arraste, ajustado a 1 mL/min e temperatura do injetor em 250 °C. O split foi fixado em 1:5 a 1:10 com 3 a 10 mL/min de He em uma liner Restek 20782 (Bellefonte, PA, USA). A temperatura do gradiente foi configurada como descrito a seguir: a temperatura inicial foi ajustada a 60 °C por 1 min, aumentada a 325 °C a uma taxa de 10 °C/min (dentro de 26,5 min) e mantida a 325 °C por 10 min. O tempo total de análise era de 37,5 min. Entre cada análise, um período de resfriamento era aplicado durante 10 min. As temperaturas da linha de transferência do detector, do filamento da fonte e do quadrupolo foram ajustadas em 280 °C, 230 °C e 150 °C, respectivamente. A detecção foi feita utilizando-se uma fonte de ionização por elétrons a 70 eV. O espectrômetro de massas foi operado no modo scan em uma faixa de *m/z* 50-600 em uma taxa de 2,7 scans/s. Vale ressaltar que o método utilizado é empregado em diversas aplicações na literatura, pois permite obter tempos de retenção constantes para identificação através da biblioteca Fiehn (FiehnLib) (Kind et al., 2009), como descrito no item 3.2.1.

A análise foi realizada randomizando-se as amostras presentes. Além disso, foram adicionadas amostras brancas (produzidas a partir do mesmo método de

extração a partir de 5 *punches* sem sangue) e amostras de QC foram analisadas a cada 5 amostras. Uma seleção de cromatogramas representativos de um branco, uma amostra e um QC, bem como uma amostra de plasma analisada no mês anterior no mesmo equipamento são apresentadas na **Figura 1 do Caderno Anexo**.

### 3.1.2. CE-MS

Em termos gerais, a análise por CE-MS foi realizada em um equipamento de eletroforese capilar Agilent 7100 acoplado a um espectrômetro de massas TOF Agilent 6224 (do inglês, *Time-Of-Flight*). Anterior à separação dos íons, um capilar de sílica fundida (100cm, diâmetro interno 50  $\mu\text{m}$ ) foi condicionado por 300 s utilizando eletrólito de ácido fórmico 1molL<sup>-1</sup> em solução de metanol 10% (v/v) aplicando-se 950 mbar de pressão. A injeção da amostra foi realizada pelo método hidrodinâmico, aplicando-se 50 mbar por 50 s. A etapa de separação ocorreu por 30min sob potencial de 30 kV e pressão de 25 mbar. Para a ionização, empregou-se um líquido auxiliar composto de metanol:água 50:50 (v/v) com vazão de 0,6 mL/min em split de 1:100. Empregou-se ionização do tipo ESI (do inglês, *electrospray ionization*) com voltagem do capilar ajustada para 3500 V e gás de secagem a 10 psi e 200 °C. O espectro de massas foi adquirido na faixa de *m/z* 70-1000, na frequência de 1 espectro/s. O método descrito foi otimizado anteriormente e vem sendo utilizado como um método padrão em diversas publicações (Armitage et al., 2018; Barbas-Bernardos et al., 2016; Gonzalez-Riano et al., 2019) para análise de amostra de plasma e permite realizar uma identificação putativa mais confiável através do uso do parâmetro de tempo de migração relativo, em relação ao padrão interno (neste caso, metionina sulfona em concentração final de 0,2mmol L<sup>-1</sup>), em cada amostra. As amostras foram analisadas de maneira aleatória após randomização em Excel e uma amostra de QC foi inserida a cada 5 amostras.

Os eletroferogramas obtidos para o branco, QC e uma amostra representativa, bem como para uma amostra de plasma analisada utilizando-se o mesmo método, são apresentadas na **Figura 2 do Caderno Anexo**. Além disso, os eletroferogramas de íon extraídos (EIE, do inglês *Extracted Ion Electropherogram*) para o mesmo conjunto de amostras é apresentado na **Figura 3 do Caderno Anexo**.

### 3.1.3. LC-MS

Os dados foram adquiridos em sistema UHPLC (1290 Infinity – Agilent Technologies) acoplada a sistema QTOF 6550 (Agilent Technologies). No total, 15  $\mu\text{L}$

de amostra foram injetados em coluna de fase reversa (Zorbax Extended C18; 2.1 x 50 mm; 1,8  $\mu$ m). A fase móvel foi composta de água + 0,1% (v/v) de ácido fórmico (Fase móvel A) e acetonitrila + 0,1% (v/v) de ácido fórmico (Fase móvel B). O gradiente de eluição foi definido da seguinte forma, considerando-se a proporção da fase móvel A: 0-35 min (de 75 a 5 %), 35-36 min (de 5 a 75%), 36-45 (constante a 75%), sob uma vazão constante de 0,6 ml.min<sup>-1</sup>. A coluna foi mantida em forno a temperatura de 40 °C. A ionização dos compostos foi realizada com o uso de uma fonte de ionização do tipo ESI com aquisição em ambos os modos de ionização (positivo e negativo) em uma faixa de *m/z* de 50-1000 para ambos os casos. Durante a análise, compostos de referência foram infundidos constantemente na formação do spray para posteriores correções nos valores de *m/z*, a saber: *m/z* 121,0509 (purina protonada) e *m/z* 922,0098 (1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoxifosfazina protonada) em modo positivo e *m/z* 112,9856 (ácido trifluoroacético desprotonado) e *m/z* 966,0007 (1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoxifosfazina em aduto com formiato) em modo negativo. A voltagem do capilar foi ajustada em 3000 V para modo positivo e 4000 V para o modo negativo. Demais parâmetros incluem: vazão do gás de nebulização (10,5 Lmin<sup>-1</sup>), temperatura do gás (330 °C), voltagem do fragmentor (175 V) e a voltagem de radiofrequência do octápolo (750 V). Da mesma forma, as amostras foram randomizadas e uma amostra de QC foi analisada a cada 6 amostras. O cromatograma obtidos em modo positivo, bem como o EIC correspondente, são apresentados nas **Figuras 4 e 5 do Caderno Anexo**, respectivamente. Em seguida, nas **Figuras 6 e 7 do Caderno Anexo** é apresentado o cromatograma obtido para o mesmo conjunto de amostras em modo negativo e seu EIC correspondente, respectivamente.

### 3.2. Pré-processamento

#### 3.2.1. GC-MS

Os dados obtidos pela técnica de GC-MS foram submetidos ao processo de deconvolução utilizando-se software Unknown (Agilent Technologies). Os principais parâmetros são descritos na **Tabela 2 do Caderno Anexo**. Com os *features* obtidos, realizou-se a etapa de alinhamento dos tempos de retenção e agrupamento de compostos através do software Mass Profiler Professional (Agilent Technologies), agrupando-se os valores de *m/z* iguais e gerando tempos de retenção médio. Essas

etapas foram realizadas apenas nas amostras de QC, com o fim de criar uma tabela utilizada como método base para posterior extração e quantificação dos *features* em todo o conjunto das amostras. Ainda nesta etapa, os *features* foram identificados a partir, primeiramente, da biblioteca Fiehn e, em caso de não haver correspondência de determinado *feature* com algum composto presente nesta biblioteca, a busca na biblioteca NIST era realizada automaticamente. Vale salientar que, ao utilizarmos o método Fiehn, podemos realizar a identificação dos compostos não somente pelo espectro de fragmentação de EI (do inglês, *electron ionization*) como no caso da biblioteca NIST, mas também pelo valor do tempo de retenção, que pouco deve variar. Além disso, uma conferência manual executada por toda a extensão do cromatograma com uma amostra de QC buscou possíveis compostos não extraídos e que puderam ser identificados com precisão (alta similaridade espectral). Tais compostos foram também adicionados ao método. Em seguida, para a quantificação em todo o conjunto amostral, utilizou-se software Mass Hunter Quantitative (Agilent Technologies), cujos parâmetros principais foram importados do método de deconvolução criado no software Unknown. Além disso, nesta etapa é possível também selecionar não apenas o principal fragmento do espectro de EI para quantificação (denominado *quantifier*) como também um segundo íon (geralmente o segundo mais intenso, excluindo-se alguns fragmentos oriundos do derivatizante), denominado *qualifier*, e que permite atestar a presença de determinado composto não apenas por 1 mas por 2 fragmentos, aumentando ainda mais a confiabilidade. Exemplos de identificações de metabólitos realizadas pela técnica de GC-MS são apresentados na **Figura 8 do Caderno Anexo**. Os dados identificados foram então extraídos no formato amostras em linhas e metabólitos em colunas, com os valores de área, para as etapas de normalização.

### 3.2.2. CE-MS

Para as amostras de CE-MS (bem como para as amostras de LC-MS, a seguir, no item 3.2.3), utilizou-se software Profinder (Agilent Technologies) para o pré-processamento dos dados. Neste *software* é possível realizar todas as etapas de pré-processamento (como as realizadas em GC-MS utilizando diversos softwares) em apenas uma plataforma. Dessa forma, muitos parâmetros são listados. Além disso, diversos modos de busca de *features* está disponível. Neste caso, dois modos em específico foram utilizados. Inicialmente, utilizou-se o modo “*Batch Molecular Feature Extraction*” que permite uma primeira extração dos compostos, de maneira mais

sucinta, já que possui aproximadamente metade dos parâmetros totais para ajuste disponíveis. Inicialmente, pode-se testar tais parâmetros de acordo com recomendações do fabricante ou de acordo com experiência prévia. Tal etapa pode ser feita repetidas vezes, ajustando-se os parâmetros disponíveis de acordo com os resultados obtidos. Tais resultados podem ser avaliados a partir de uma lista de todos os *features* extraídos que permite uma inspeção visual do eletroferograma/cromatograma de íon extraído para cada amostra analisada. Após certo ajuste com tais parâmetros, realiza-se o segundo modo de extração, denominado “*Batch Recursive Molecular Feature Extraction (small molecules/peptides)*”, já que a mesma opção para “*large molecules*” também está disponível. Nesta opção, além dos parâmetros utilizados na primeira etapa teste, estão disponíveis para alteração cerca de 2 vezes mais parâmetros, a fim de obter-se então uma extração e integração mais refinada. A lista destes parâmetros está disponível na **Tabela 3 do Caderno Anexo**. Em seguida, seguiu-se com a inspeção visual de cada EIC, para cada metabólito, em cada amostra, com a possibilidade de correção manual de integrações errôneas. Ao final, os dados foram exportados em formato Excel, organizado da mesma maneira descrita para os dados de GC-MS no item anterior.

A partir desta tabela, foi realizada a identificação dos *features* anteriormente às etapas de normalização e análise estatística. Para isso, dois parâmetros foram utilizados como elementos para a anotação dos compostos: a massa exata e os valores de tempo de migração (de fato, o tempo de migração relativo, obtido dividindo-se o tempo de migração do metabólito em questão pelo tempo de migração da metionina sulfona, utilizada como padrão interno). Assim, foram calculados os erros de massa em ppm e as diferenças em relação aos tempos de migração relativo de acordo com biblioteca *in-house* construída a partir de padrões analíticos.

### 3.2.3. LC-MS

O pré-processamento aplicado para as amostras de LC-MS (em ambas polaridades) foi muito similar ao realizado para CE-MS, em *software* Profinder. Devido às diferenças apresentadas entre as duas técnicas, alguns parâmetros utilizados foram alterados, principalmente os relacionados ao tempo de retenção, considerando-se que o deslocamento (variação) no tempo de migração é muito elevado em

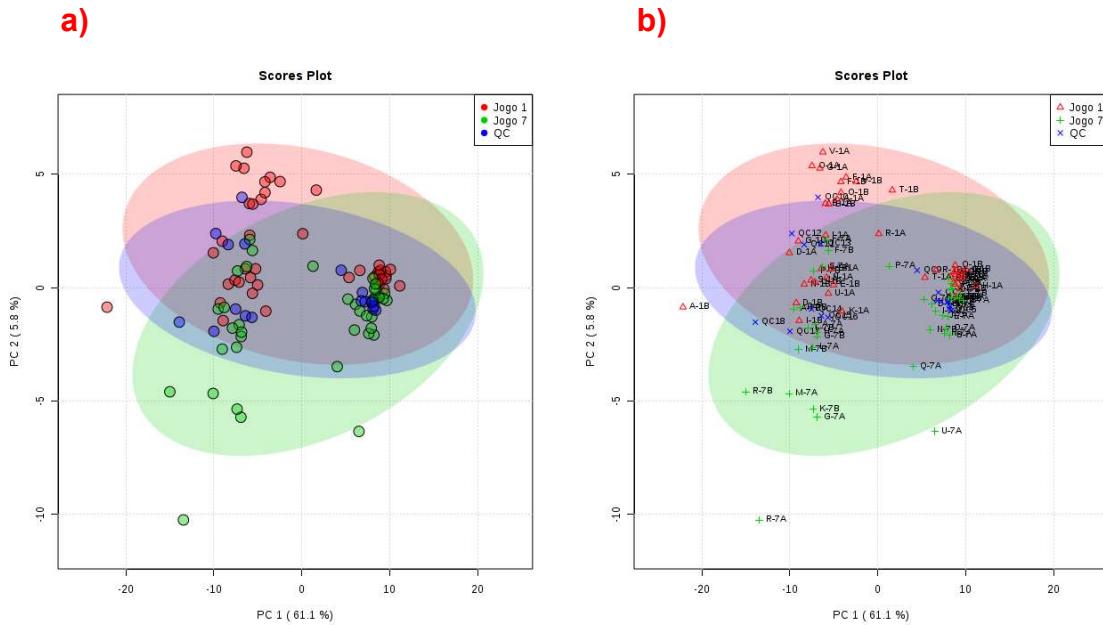
comparação ao tempo de retenção na técnica de LC-MS. Os valores detalhados utilizados são descritos conjuntamente aos valores de CE-MS na **Tabela 3 do Caderno Anexo**. No entanto, a maior diferença em relação aos dados de LC-MS se dá nesta etapa, na qual os *features*, diferentemente das demais técnicas, não são identificados. Isso se dá pelo fato de que a identificação por LC-MS se dá de maneira mais complexa, com diversos compostos encontrados se utilizada apenas a massa exata. Além disso, não existe a possibilidade de uso do tempo de retenção já que as bases de dados são geradas a partir de distintas metodologias. Assim, experimentos adicionais, como de espectrometria de massas *tandem* (MS/MS) são geralmente necessários e realizados posteriormente ao tratamento estatístico apenas para os metabólitos significativos. Desta forma, os resultados exportados em Excel apresentaram o mesmo formato em linhas e colunas, porém com os *features* nas colunas em vez dos metabólitos.

### 3.3. Normalização dos dados

Nesta seção serão apresentadas as estratégias empregadas na normalização dos dados obtidos (segundo foi necessário para cada técnica). O objetivo central desta etapa é garantir a qualidade dos dados através da análise e a correção de variações analíticas. A maneira aceita e utilizada neste trabalho para definir a eficácia de uma etapa de normalização se dá através do agrupamento das amostras de QC na análise de componentes principais (PCA), demonstrando assim sua similaridade analítica (uma vez que tais amostras são replicatas analíticas entre si), bem como seu posicionamento central na análise por PCA, considerando-se o fato de que tais amostras representam uma média (*pool*) de todas as amostras analisadas.

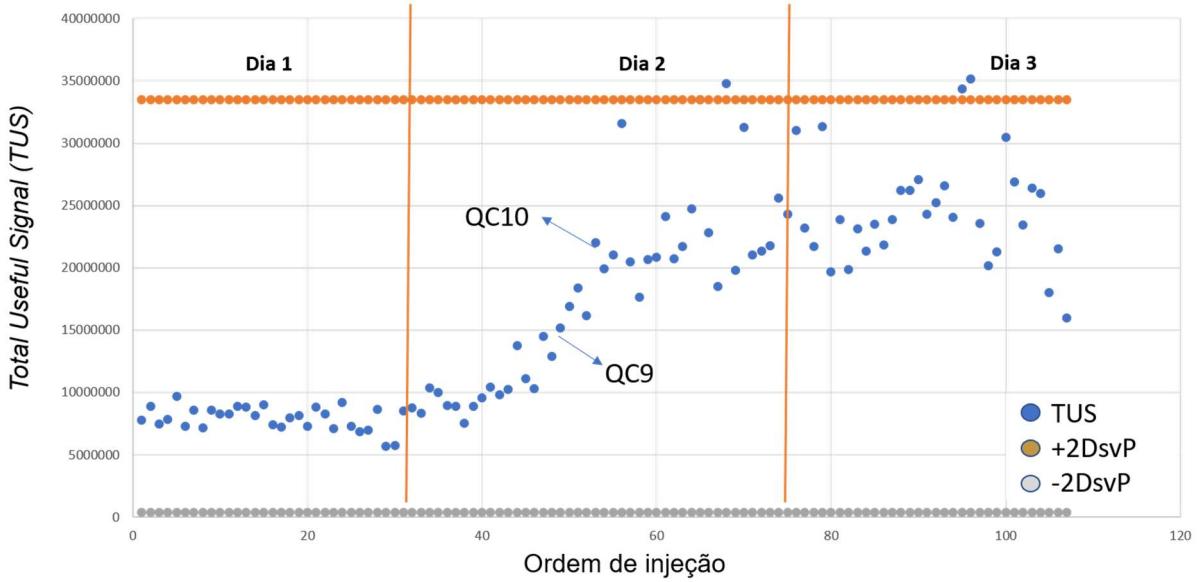
#### 3.3.1. Análise por GC-MS

Com os dados pré-processados e identificados, verificou-se a distribuição das amostras a partir de uma análise de componentes principais, sem nenhum tipo de processamento dos dados (**Figura 9**).



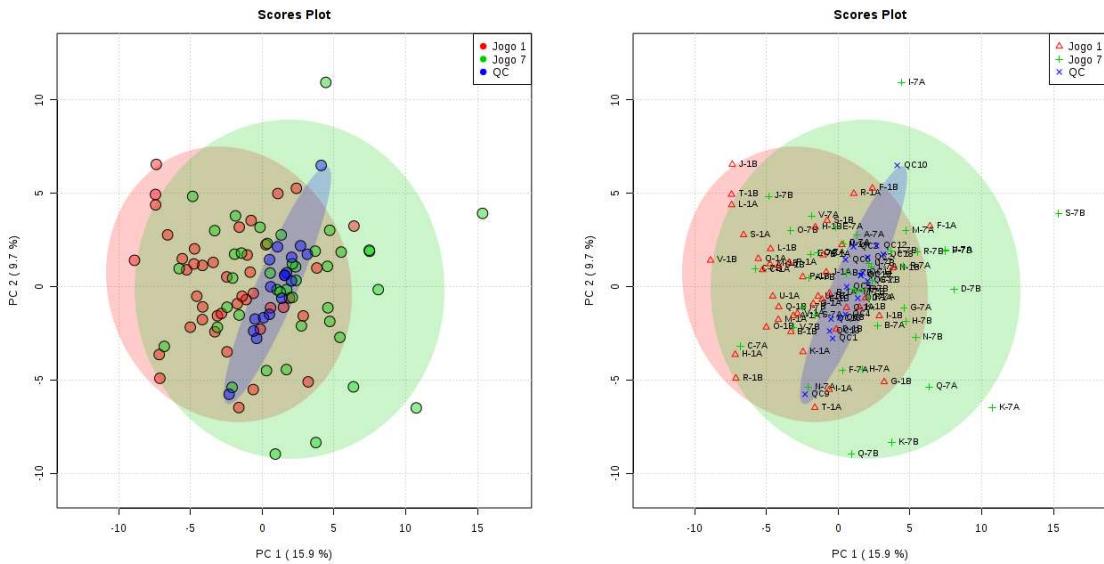
**Figura 9.** PCA construído a partir dos dados brutos a) com distribuição por cores apenas e b) com nomes atribuídos para visualização da tendência de separação apresentada pelas amostras de QC

Analizando-se a Figura 9(a) é possível verificar uma separação das amostras de QC em dois grupos, quando consideramos a primeira componente. É possível verificar, ao observarmos a Figura 9(b), que os diferentes grupos são separados entre as amostras de QC 9 e 10, ou seja, o grupo formado mais à direita da PC1 é formado pelos QC de 1 a 9 e o grupo mais à esquerda é formado pelos QC de 10 a 18 (considerando-se a ordem de injeção crescente). Com o objetivo de avaliar possíveis tendências durante a análise, construiu-se um gráfico somando-se, para cada amostra, os valores de área obtidos para cada metabólito, resultando no denominado TUS (do inglês, *Total Useful Signal*). A **Figura 10** apresenta os valores de TUS de acordo com a ordem de injeção das amostras, acompanhado dos limites de  $\pm 2$  vezes o desvio padrão.



**Figura 10.** Variação do TUS de acordo com a ordem de injeção na análise por CE-MS

É possível verificar, a partir da imagem apresentada, uma tendência no aumento do valor de TUS durante o tempo total de análise. Tal fenômeno pode ser explicado pelo fato de a fonte de ionização por elétrons apresentar um acúmulo de resíduos amostrais e, portanto, resultar em uma maior intensidade das áreas devido à interferência de outros compostos. Ademais, observa-se que dois *plateaus* são formados, anteriormente ao QC9 e posteriormente ao QC10, coincidindo com a separação observada no PCA dos dados brutos. Desta forma, decidiu-se empregar uma primeira etapa de normalização baseada especificamente nas amostras de QC, segundo a ordem de injeção no equipamento. Seguiu-se então o procedimento descrito por Kuligowski (Kuligowski, Sánchez-Illana, Sanjuán-Herráez, Vento, & Quintás, 2015), porém, desenvolvido internamente em software MatLab. . Este procedimento visa minimizar a variação intra-batch considerando-se as amostras de QC conjuntamente com o uso de regressão por vetores de suporte (SVR, do inglês *support vector regression*). O resultado é apresentado nas **Figura 11 a) e b)**, as quais apresentam o mesmo PCA construído sem e com identificação das amostras, respectivamente.

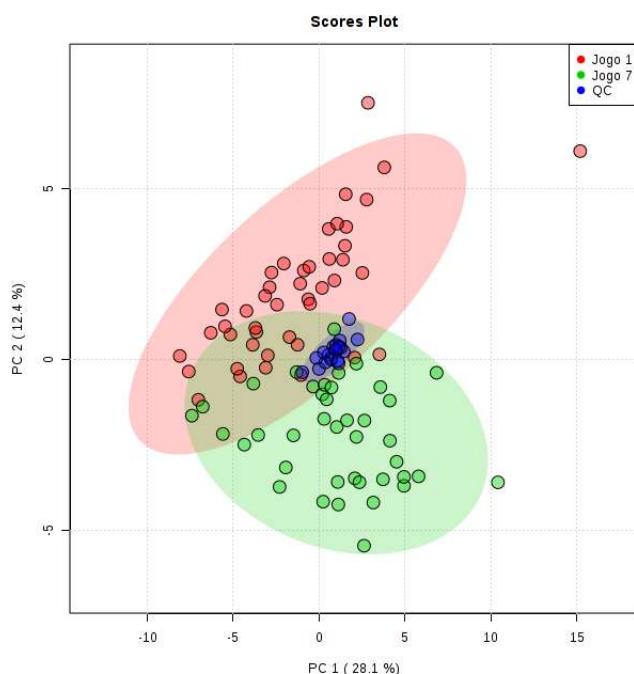


**Figura 11.** PCA construído após a normalização por QC-SVR a) com e b) sem a identificação das amostras.

É possível observar na Figura 11a um melhor agrupamento das amostras de QC, principalmente em relação a PC1. Além disso, constata-se que as amostras separadas anteriormente dentro dos dois grupos (QC1-9 e QC10-18) já se mesclam de maneira mais aleatória, conforme melhor apresentado na Figura 11b, demonstrando um comportamento não influenciado pela ordem de injeção. Para corrigir eventuais diferenças não biológicas ainda presentes nas amostras, decidiu-se aplicar mais 2 tipos de normalização. A primeira visa corrigir a variação inerente ao tipo de amostra, ou seja, a diferença na massa de sangue absorvido no papel entre as diferentes amostras. Este fenômeno é observado e descrito para substratos comerciais, já fabricados com o objetivo de minimizar o problema, e ocorre devido a pequenas heterogeneidades no papel, mas, principalmente, às diferenças na viscosidade do sangue de cada indivíduo, existente por sua vez devido aos distintos níveis de células vermelhas no sangue (denominado hematócrito). Tais níveis podem variar entre 28 e 67%, dependendo do gênero, idade, ambiente ou condição de saúde em geral (O'Mara et al., 2011). Neste trabalho, o efeito hematócrito resultou em diferenças de massas consideráveis visto que o papel filtro utilizado na coleta possuía menor espessura, aumentando o efeito do espalhamento para as amostras com níveis mais baixos de hematócrito. Assim, utilizou-se as massas individuais medidas para cada amostra anteriormente ao preparo (a massa dos 5 *punches*) e dividiu-se os valores de área. Para as amostras de QC, preparadas após a extração apenas,

utilizou-se o valor de massa média. Os valores obtidos para cada amostra são apresentados na **Tabela 4 do Caderno Anexo**.

Em seguida, optou-se também pela normalização através dos valores de área do padrão interno (metil estearato), aplicada para fins de correção das possíveis flutuações no volume de injeção das amostras. Após efetuadas ambas normalizações, construiu-se o PCA da **Figura 12**.



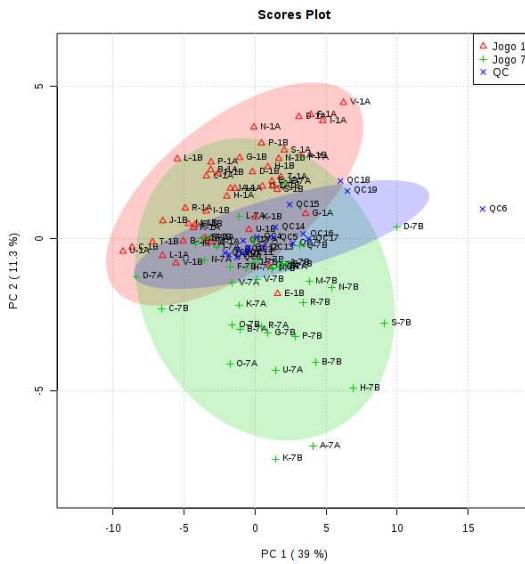
**Figura 12.** Distribuição final das amostras e QC no gráfico de PCA após todas etapas de normalização.

Aplicando-se as normalizações corretas e necessárias, observa-se que as amostras de QC se agrupam (o que é esperado, já que são replicatas analíticas) e se posicionam no centro do PCA, uma vez que representam todas as demais amostras dos Jogos 1 e 7, ou seja, são um *pool* de tais amostras.

### 3.3.2. Análise por CE-MS

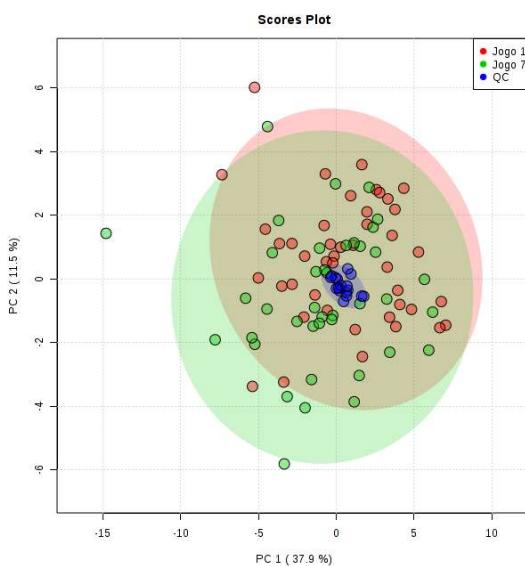
Similar ao ocorrido com os dados obtidos para GC-MS, após o pré-processamento e a identificação dos metabólitos, observou-se a ausência de um agrupamento conciso para as amostras de QC considerando-se os dados brutos. Conforme apresentado na **Figura 13**, há uma tendência de afastamento das amostras

de QC do centro do PCA conforme o aumento do seu índice, ou seja, com a ordem de injeção.



**Figura 13.** Aspecto da distribuição das amostras no PCA para dados não-normalizados de CE-MS

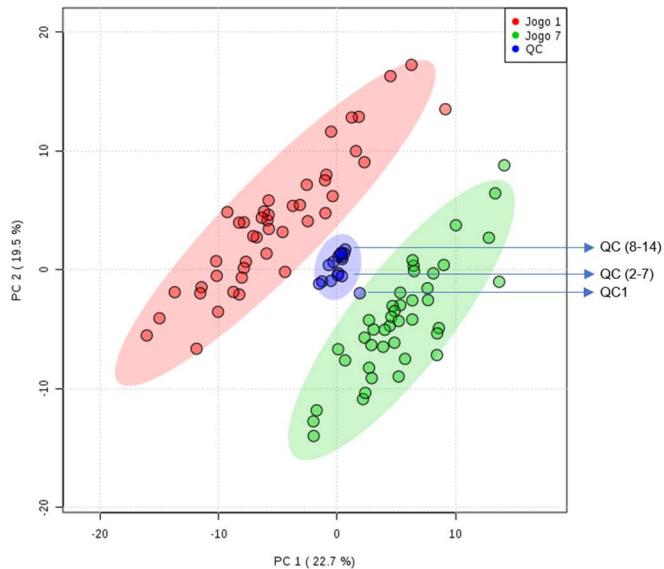
Seguindo-se a mesma lógica apresentada para os dados obtidos por GC-MS, optou-se por realizar os mesmos tipos de correção, uma vez que um não agrupamento e uma tendência ao afastamento do centro do gráfico foi observado, considerando-se também a ordem de injeção. O resultado é apresentado na **Figura 14**.



**Figura 14.** PCA apresentando o agrupamento das amostras de QC após as etapas de normalização

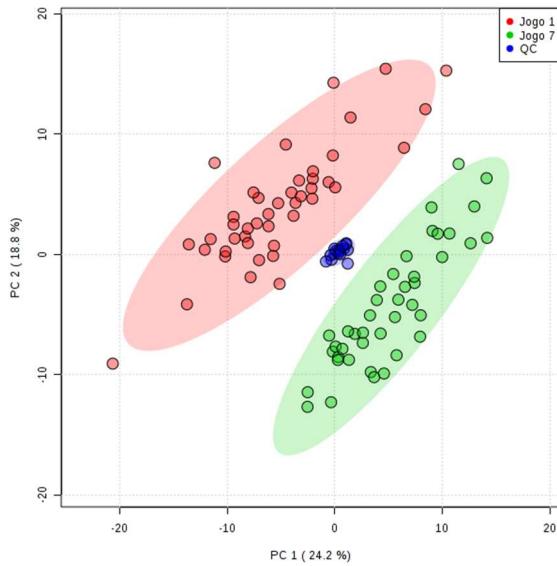
### 3.3.3. Análise por LC-MS (+)

A análise por LC-MS no modo positivo apresentou um melhor agrupamento inicial das amostras de QC já a partir dos dados brutos. No entanto, ainda que de maneira menos evidente, foi possível observar uma separação entre os QCs de acordo com a sequência de análise em 3 grupos, sendo primeiramente apenas o QC1, seguido dos QC entre 2 e 7 e finalmente dos QC de 8 a 14, conforme apresentado na **Figura 15**.



**Figura 15.** Agrupamento inicial apresentado pelas amostras na análise por LC-MS em modo positivo

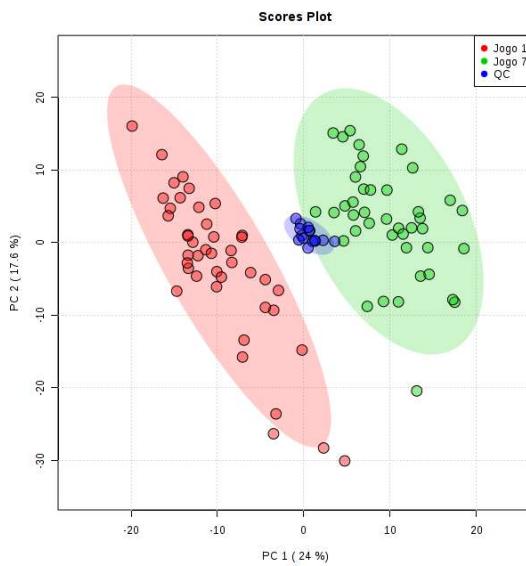
Portanto, decidiu-se aplicar o mesmo tipo de normalização utilizados para as técnicas anteriores, incluindo-se também a normalização pela massa total de cada amostra. Neste caso, a normalização pelo padrão não foi possível, já que o protocolo de preparo e análise por LC-MS não inclui um padrão interno. De qualquer maneira, como apresentado na **Figura 16**, possíveis diferenças no volume de injeção não foram observadas para os QC.



**Figura 16.** Distribuição final após normalização por QC-SVR e massas individuais por LC-MS em modo negativo.

### 3.3.4. Análise por LC-MS(-)

A tabela de resultados obtida com as áreas dos *features* apresentou um bom agrupamento dos QC a partir dos dados brutos extraídos, sem aparente tendência em relação à ordem de injeção, conforme apresentado na **Figura 17**.



**Figura 17.** PCA formado a partir dos dados brutos para a análise por LC-MS em modo negativo.

Desta forma, apenas a normalização pela massa das amostras foi aplicada, necessária para correção das diferentes quantidades iniciais de sangue presente. A análise de PCA após tal normalização não é apresentada, uma vez que

não influí no agrupamento das amostras de QC (visto que todos são divididos pelo mesmo número, a média das massas).

### **3.4. Pré-tratamento**

Após a normalização dos dados, duas etapas de pré-tratamento foram aplicadas com diferentes objetivos. A primeira consistiu na eliminação dos *features/metabólitos* que apresentaram um coeficiente de variação maior a 30%. Dunn e co-autores (Dunn et al., 2011) recomendam este valor máximo para a técnica de GC-MS e o valor de 20% para a técnica de LC-MS. No entanto, devido ao fato de que, primeiramente, esta recomendação é feita para amostras de plasma (que possuem um comportamento mais estável) e sem interferência do substrato, decidiu-se padronizar o valor mais elevado (sendo portanto, um pouco mais permissivo com as técnicas de LC-MS e CE-MS). Em seguida, avaliou-se o efeito matriz causado pelo substrato, utilizando-se uma comparação da média dos valores de área para cada *feature/metabólito* no branco em relação ao mesmo valor nas amostras de QC. Adotou-se então como critério limite uma intensidade média no branco em relação à média dos QC de 75%, eliminando-se os *features/metabólitos* que se encontravam acima desse valor. Por fim, para cada *feature/metabólito* restante, subtraiu-se o valor médio dos brancos dos valores encontrados nas amostras. Caso um *feature/metabólito* apresentasse valores negativos após a subtração, este *feature/metabólito* era excluído para o caso de o número de valores negativos apresentados ser superior a 10% em relação ao número total de amostras.

#### **3.4.1. GC-MS**

Para GC-MS, 108 metabólitos foram extraídos na primeira etapa, a partir dos dados brutos. Após a normalização, realizou-se inicialmente a eliminação dos metabólitos com coeficiente de variação (CV, também denominado desvio padrão relativo) superior a 30%, excluindo-se 12 metabólitos dos quais 6, na verdade, não haviam sido identificados em nenhuma das bibliotecas disponíveis. Em seguida, avaliou-se a influência dos brancos em relação aos QC. Dos 96 metabólitos restantes, 41 metabólitos foram excluídos por apresentarem área média superior a 75% da área média presente nos QC, dos quais 63% também representavam metabólitos sem identificação. Assim, foram subtraídas as médias de área do branco da lista de metabólitos final, excluindo-se ainda 8 metabólitos que apresentaram valores

negativos de área. Tais números representam um forte efeito matriz do substrato nesta técnica. Dessa forma, puderam ser utilizados no tratamento estatístico 47 entidades, dos quais 41 eram metabólitos identificados e 6 “*unknowns*”.

### **3.4.2. CE-MS**

O mesmo procedimento descrito anteriormente foi aplicado as amostras de CE-MS. Dos 41 metabólitos extraídos inicialmente, apenas 3 ultrapassaram o valor limite de 30%. Do restante 5 metabólitos foram excluídos a partir da relação de áreas brancos/QC e 4 foram adicionalmente excluídos após apresentaram valores negativos.

### **3.4.3. LC-MS (+)**

Para o modo positivo, 191 *features* puderam ser extraídos inicialmente. Deste total, apenas 4 apresentaram valores de QC superiores a 30% após normalização. Em seguida, 11 metabólitos foram excluídos a partir dos brancos. Tal número representa uma influência menor do substrato nos *features* encontrados em relação, principalmente, à técnica de GC-MS. Isso pôde ainda ser verificado uma vez que, do total inicial de 191, 71% apresentaram média nula no branco e 84% abaixo de 30% da média dos QC. Desta forma, optou-se para a técnica de LC-MS em prosseguir com o tratamento de dados sem a etapa de subtração do branco.

### **3.4.4. LC-MS (-)**

No total, 431 *features* foram extraídos. Deste total, apenas 9 *features* foram excluídos baseados no CV nos QC. Para o branco, seguiu-se o mesmo padrão observado no modo positivo: 39 *features* foram excluídos (9% do total apenas) e 74% dos compostos apresentaram média inferior a 30%. No entanto, o grande número de *features* extraídos em relação ao modo positivo (que em geral apresentam um maior número de compostos considerando-se uma mesma amostra) levou-se à uma maior inspeção destes dados. Por fim, observou-se que, dos *features* restantes (383), 182 deles (48%) apresentavam tempo de retenção inferior a 1,5 min (valor que parecia diferenciar de todo o restante já que após este valor, o próximo *feature* detectado em termos de tempo de retenção apresentava o valor de 6,13 min). Tais compostos foram então extraídos no denominado “tempo morto” da coluna, ou seja, são compostos não retidos pela coluna (provavelmente, com polaridade mais alta) que eluem no tempo

necessário apenas para que a fase móvel percorra o sistema, sem qualquer tipo de retenção ou interação com a coluna. Assim, possuem também um forte efeito de supressão iônica visto que não existe separação analítica entre eles, acarretando uma “disputa” por carga dentro da fonte de ionização. Desta forma, optou-se por eliminar-se também tais compostos com o objetivo de manter uma maior robustez dos possíveis *features/metabólitos* atribuídos como significativos na análise estatística.

### 3.5. Resultados experimentais

Nesta seção, serão apresentados os resultados adquiridos após a normalização e o pré-processamento dos dados, individualmente para cada técnica empregada e seguindo-se os diferentes *workflows* característicos de cada técnica. Em suma, serão apresentados os resultados das análises estatísticas por ANOVA de medidas repetidos (RM-ANOVA, do inglês, *Repeated Measurements Analysis of Variance*), realizadas a partir de algoritmo desenvolvido também no CEMBIO para MatLab, bem como os resultados obtidos para as análises de correlação efetuadas entre os *features/metabólitos* em questão e os valores de PL obtidos durante os jogos.

Para RM-ANOVA, fez-se necessário a escolha de quais amostras seriam comparadas. Isso se deve ao fato de que, de fato, podemos dividir o grupo formado pelas 22 jogadoras em 3 grupos: jogadoras que iniciaram a partida e seguiram até seu término (aqui denominadas grupo Y, do inglês *yes*, com o intuito de denominar o grupo de jogadoras que participaram do Jogo inteiro); jogadoras que jogaram parcialmente a partida (ou seja, jogadoras que entraram/saíram devido à substituição e que não serão utilizadas para fins de comparação); e, por fim, as jogadoras que estiveram no banco durante todo o jogo (aqui denominadas grupo N, do inglês *no*). Dessa forma, a comparação utilizando-se RM-ANOVA foi realizada considerando-se os grupos Y e N, por representarem grupos mais homogêneos e que, portanto, formariam uma melhor comparação controle versus alterado. Assim, considerando-se a escalação e as substituições realizadas, temos 7 jogadoras que estiveram presentes durante todo o Jogo 1 e 7, e 8 jogadoras que não participaram de nenhum deles. No entanto, durante o preparo de amostra, é possível que a perda de alguma dessas amostras por qualquer motivo prático tenha acontecido. Dessa forma, serão descritas, para cada técnica, os grupos finais comparados. Além disso, o algoritmo em questão apresenta como resultado 3 valores de p distintos. O primeiro,  $p_{tempo}$ , representa metabólitos que variaram de acordo com o tempo, sem considerar diferenças entre as jogadoras que

jogaram ou não. Um segundo valor de  $p$  ( $p_{grupo}$ ) representa diferenças significativas entre as jogadoras que jogaram ou não, desconsiderando-se o tempo. Por fim, o terceiro valor,  $p_{inter}$  ou  $p$  de interação, apresenta metabólitos que se demonstraram alterados em determinado espaço de tempo considerando-se cada grupo. Como neste estudo estamos interessados não só nas diferenças entre tempos ou jogadoras em si, mas na interação entre esses dois fatores, todos os valores de  $p$  reportados serão valores de  $p_{inter}$ .

Já para as análises de correlação, foram utilizados os valores de PL descritos na **Tabela 5 do Caderno Anexo**. Considerando-se que estes valores são calculados apenas para as jogadoras que participaram do jogo, foi utilizado na correlação apenas o conjunto de amostra Y. Além disso, tais valores são absolutos e únicos para cada jogo. Dessa maneira, decidiu-se correlacioná-los com a variação de cada metabólito em cada jogo, ou seja, para o Jogo 1, por exemplo, criou-se uma tabela em que as linhas representavam cada jogador do grupo Y e as colunas o delta de cada metabólito para o Jogo 1 apenas, conforme descrito na **Equação 1**.

$$\Delta\text{Metabólito A} = \text{Área}(\text{Metabólito A})_{\text{DEPOIS DO JOGO 1}} - \text{Área}(\text{Metabólito A})_{\text{ANTES JOGO 1}}$$

### Equação 1

Em seguida, criou-se uma coluna extra com os valores de PL, mimetizando o delta de um metabólito. Os valores de correlação foram então obtidos utilizando-se o programa MetaboAnalyst, seguindo os critérios descritos na **Tabela 6 do Caderno Anexo**.

#### 3.5.1. Resultados obtidos pela técnica de GC-MS

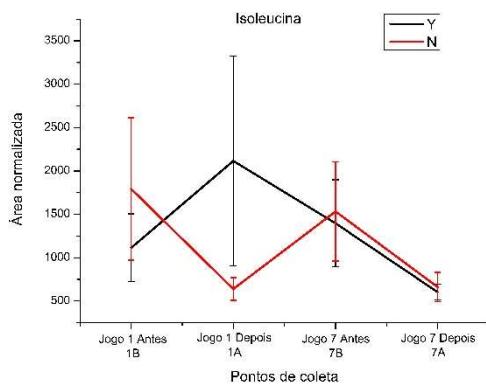
Para a técnica de GC-MS, foi possível utilizar-se todo o conjunto de dados (Y: 7 jogadoras, N: 8 jogadoras). A **Tabela 4** apresenta os resultados obtidos para RM-ANOVA, ordenados por valor crescente de  $p$ .

**Tabela 4.** Metabólitos obtidos por GC-MS com valores de  $p < 0,05$  para RM-ANOVA, em ordem crescente

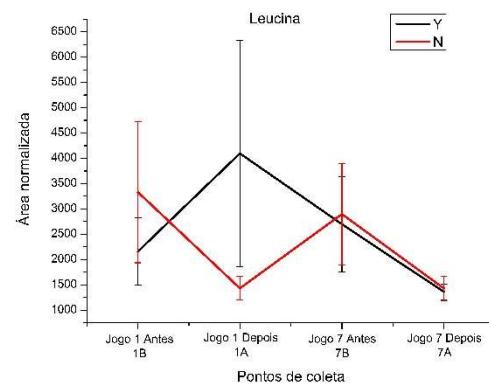
Metabólito	p-valor
Isoleucina	0,00010
Leucina	0,00013
Valina	0,00533
Ácido $\alpha$ -hidroxibutírico	0,00557
Mioinositol	0,03457
Prolina	0,04476
Ácido 2-Etilexanóico	0,04816

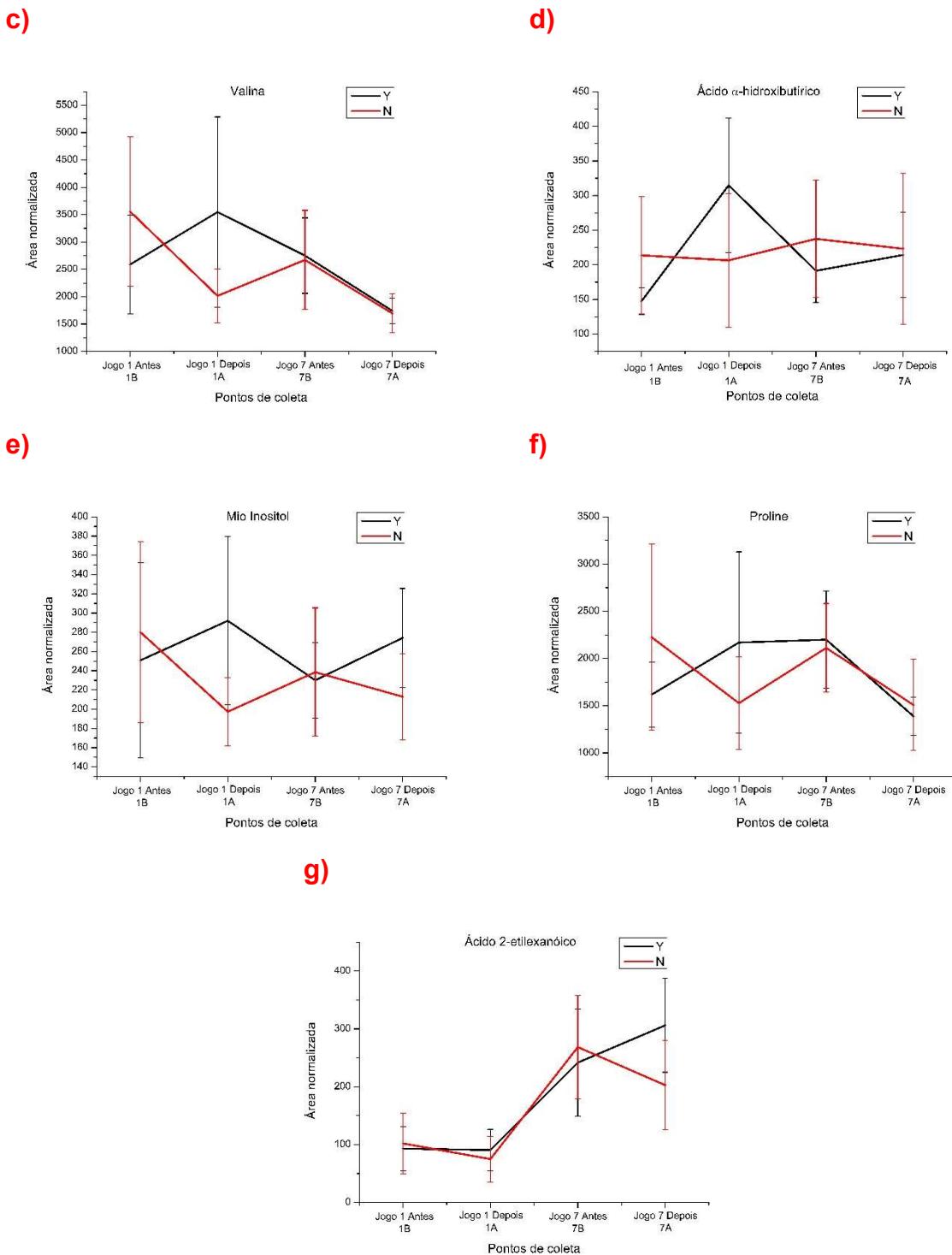
A fim de melhor analisarem-se as variações apresentadas por esses metabólitos de acordo com o tempo em cada grupo, foram gerados gráficos de área normalizada média (com seus respectivos valores de desvio padrão) para cada grupo (Y e N) durante os 4 tempos de coleta. Os perfis são apresentados nas **Figuras de 18(a) a 18(g)**.

a)



b)





**Figura 18.** Variação individual de cada metabólito considerando-se os pontos de coleta no tempo para técnica de GC-MS. Perfil apresentado para a) Isoleucina, b) Leucina, c) Valina, d) Ácido  $\alpha$ -hidroxibutírico, e) Mio inositol, f) Prolina e g) Ácido 2-etylhexanóico

A análise de correlação entre a variação de cada metabólito e o valor de PL foi realizado para os Jogos 1 e 7. Utilizando-se os dados de PL coletados durante o Jogo 7, não foi possível correlacionar estatisticamente os valores de  $\Delta$ Área e PL. No

entanto, 6 metabólitos foram correlacionados com os valores obtidos para o Jogo 1 e são apresentados na **Tabela 5**. Valores negativos indicam uma correlação oposta, ou seja, maior o valor de  $\Delta$ Área, menor o valor de PL

**Tabela 5.** Níveis de correlação significativos obtidos para técnica de GC-MS e os dados de PL obtidos para o Jogo 1

Metabólito	Nível de Correlação	Valor de p
Ácido Propanóico	-0.8372	0.018777
Leucina *	0.8284	0.021312
Ácido Lático	-0.82724	0.02166
Alanina	-0.82316	0.022908
Isoleucina *	0.79714	0.031807
Valina *	0.78759	0.035488

\*Metabólito significativo também por RM-ANOVA

### 3.5.2. Resultados obtidos pela técnica de CE-MS

Os resultados obtidos para a técnica de CE-MS utilizando-se RM-ANOVA (Grupo Y: 7 indivíduos, Grupo N: 6 indivíduos) apresentou um total de 10 metabólitos significativos **Tabela 6**). A identificação dos metabólitos foi realizada como descrita anteriormente no item 3.2.2., utilizando-se dos valores de massa exata e tempo de migração (de fato, o tempo de migração relativo, obtido dividindo-se o tempo de migração do metabólito em questão pelo tempo de migração da metionina sulfona, utilizada como padrão interno) e comprando os erros de massa em ppm e as diferenças em relação aos tempos de migração relativo de acordo com biblioteca *in-house* construída a partir de padrões analíticos. Os resultados em detalhes são apresentados na **Tabela 7 do Caderno Anexo**.

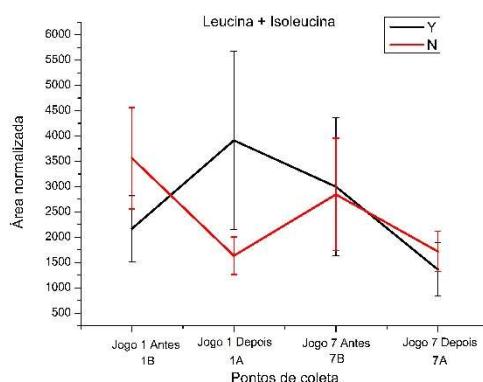
**Tabela 6.** Metabólitos obtidos por CE-MS com valores de  $p < 0,05$  para RM-ANOVA, em ordem crescente

Metabólito	Valor de p
Leucina/Isoleucina	0,0069
Valina	0,0194

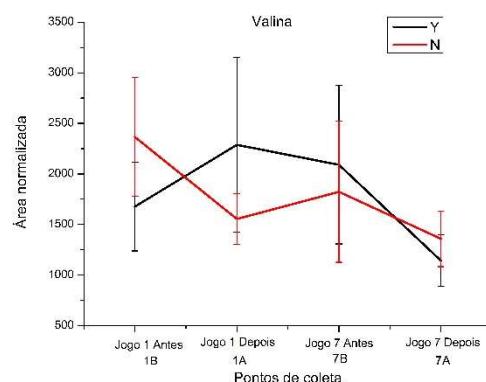
Acetilcolina	0,0240
Metilhistidina	0,0266
Ácido Glutâmico	0,0281
Trans-4-Hidroxiprolina	0,0446
Triptofano	0,0468
Treonina	0,0483
Creatina	0,0499

Da mesma forma à técnica de GC-MS, gráficos com as variações médias de cada metabólitos (conjuntamente com o desvio padrão da média) em relação ao tempo foram construídos a fim de verificar-se as tendências de mudança dentro de cada grupo. Os perfis são apresentados nas **Figuras 19(a) a 19(i)**.

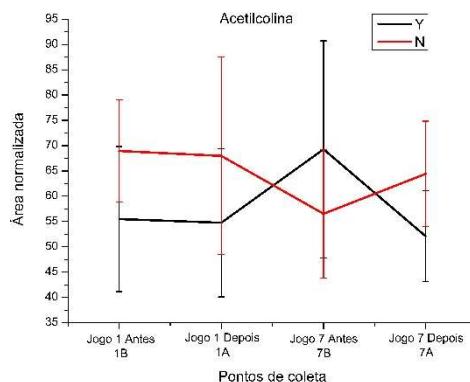
a)



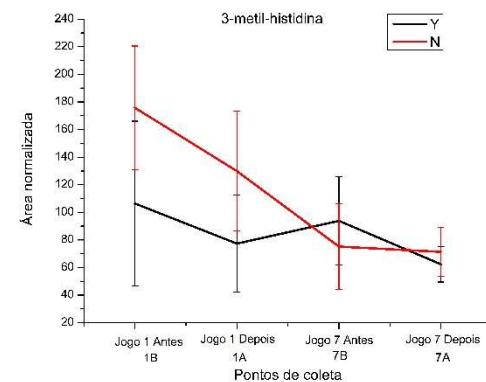
b)



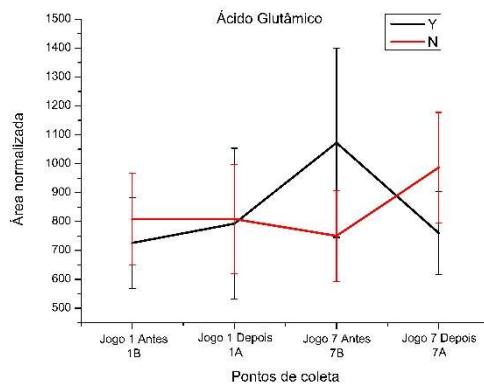
c)



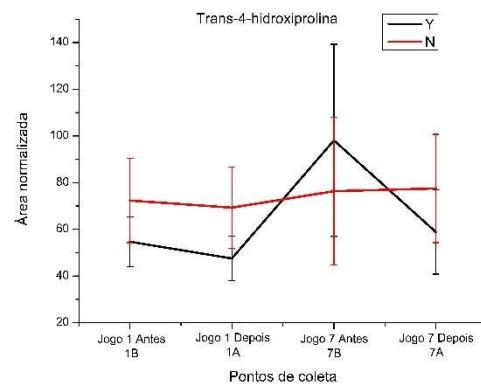
d)



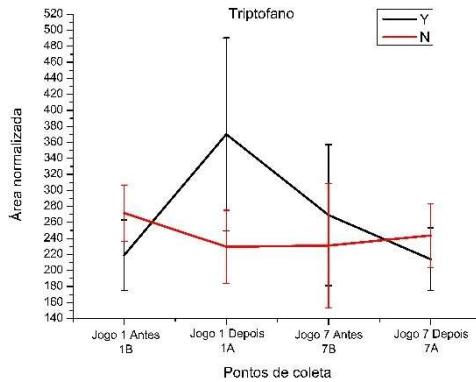
e)



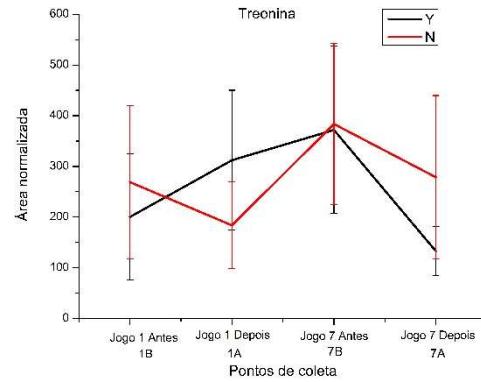
f)



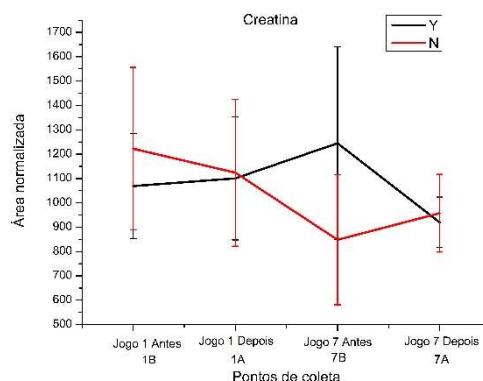
g)



h)



i)



**Figura 19.** Variação individual de cada metabólito considerando-se os pontos de coleta no tempo para a técnica de GC-MS. Perfil apresentado para a) Isoleucina+Leucina, b) Valina, c) Acetilcolina, d) 3-metil-histidina e) Ácido Glutâmico, f) Trans-4-hidroxiprolina, g) Triptofano, h) Treonina e i) Creatina

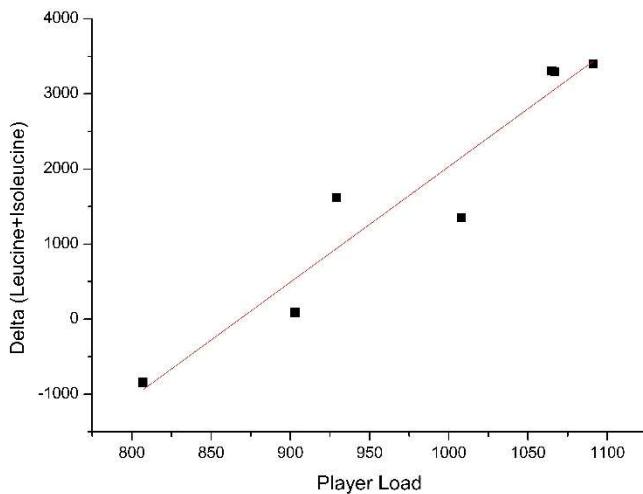
A análise de correlação entre a variação de cada metabólito e o valor de PL foi realizado para os Jogos 1 e 7. Curiosamente, nenhum metabólito pôde ser correlacionado de maneira significativa estatisticamente com os dados de PL obtidos para o Jogo 7, assim como ocorrido para a técnica de GC-MS. A **Tabela 7** apresenta os metabólicos correlacionados ( $p < 0,05$ ), bem como o nível de correlação apresentado para os valores de PL do Jogo 1.

**Tabela 7.** Níveis de correlação significativos obtidos para técnica de CE-MS

Metabólito	Nível de Correlação	Valor de p
Leucina + Isoleucina *	0,95674	0,0007
Ácido 4-Aminobutírico	0,91606	0,0037
Valina *	0,89779	0,0060
Prolina	0,86463	0,0120
Lisina	0,81785	0,0246
Fenilalanina	0,77157	0,0422
Tirosina	0,76078	0,0470

\*Metabólito significativo também por RM-ANOVA

É possível verificar um alto nível de correlação entre todos os metabólitos com especial destaque para o par Leucina + Isoleucina, que apresenta uma correlação superior a 95%, com um valor de  $p$  muito baixo (da ordem de  $10^{-4}$ ), além de apresentar-se como o composto com menor valor de  $p$  nos resultados obtidos por RM-ANOVA. Esse resultado aponta uma forte dependência entre o esforço realizado durante o Jogo 1 e a variação nos níveis (ainda que não quantitativos) destes metabólitos, como demonstra a **Figura 20**.



**Figura 20.** Correlação obtida entre os valores de PL do Jogo 1 e a variação de área dos metabólitos Leucina+Isoleucina

### 3.5.3. Resultados obtidos pela técnica de LC-MS (+)

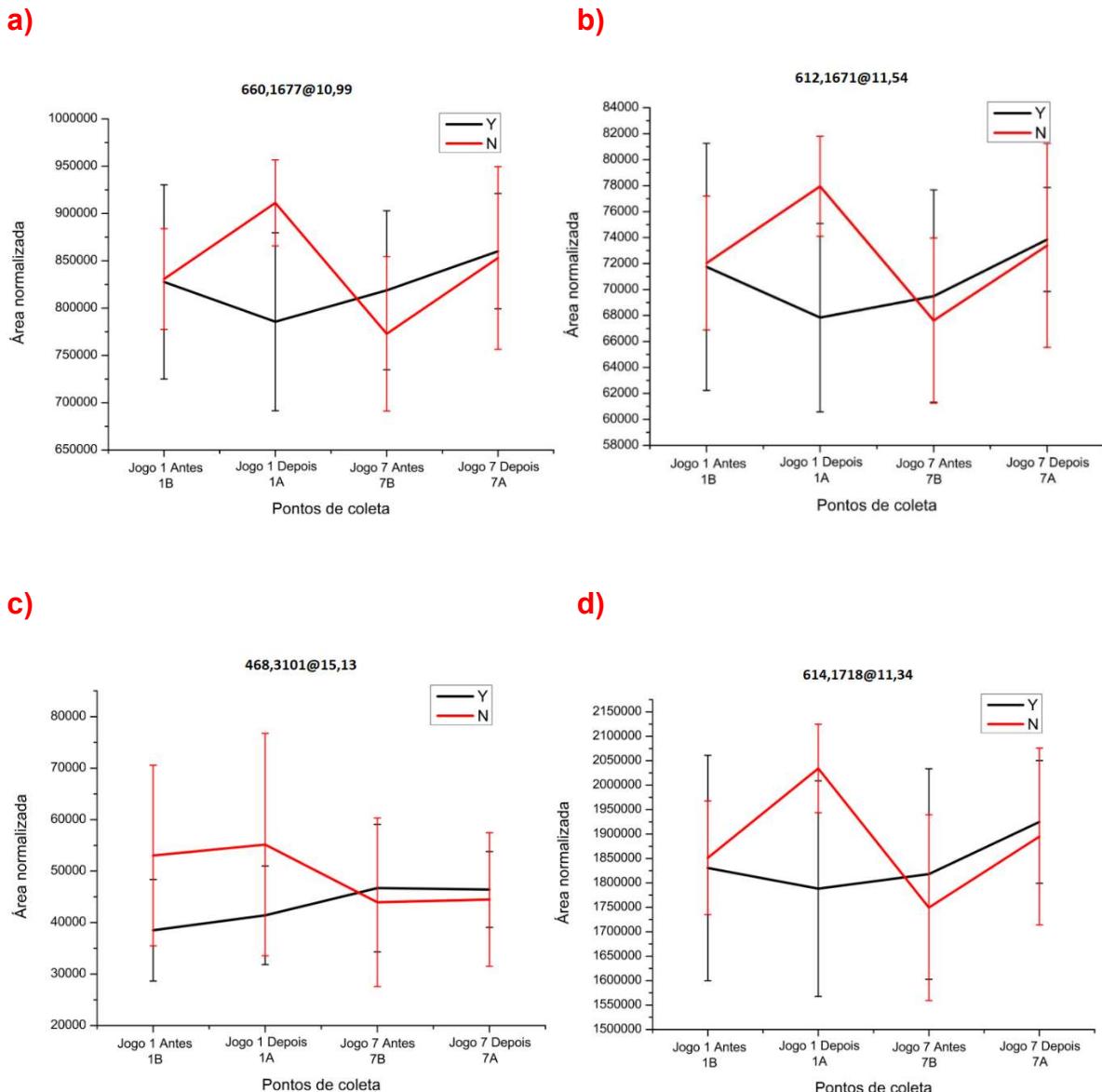
Apesar de resultar em um número de compostos superior às técnicas anteriores, o número de compostos significativos obtidos para a técnica de LC-MS foi pequeno. Em modo positivo, apenas 4 *features* apresentaram um valor de *p* inferior a 0,05, conforme apresentado na **Tabela 8**

**Tabela 8.** Lista de *features* com *p*-valor inferior a 0,05 para a técnica de LC-MS no modo positivo

Feature*	Valor de <i>p</i>
660,1677@10,99	0,014
612,1671@11,54	0,026
468,3101@15,13	0,043
614,1718@11,34	0,049

\*Representado pelo valor de *m/z* e o tempo de retenção, separados pelo símbolo “@”

Nenhum destes metabólitos pôde ser significativamente correlacionado com os valores de PL para os Jogos 1 ou 7. Ainda assim, suas alterações médias foram analisadas de acordo com o tempo a fim de observar-se possíveis tendências. Os perfis são apresentados nas **Figura 21(a) a 21(d)**.



**Figura 21.** Variação individual de cada metabólito considerando-se os pontos de coleta no tempo para a técnica de LC-MS no modo positivo. Perfil apresentado para os *features* a) 660,1677@10,99; b) 612,1671@11,54; c) 468,3101@15,13 e d) 614,1718@11,34.

A análise por MS/MS para tentativa de identificação dos *features* em questão não pôde ser realizada por problemas logísticos e, dessa maneira, a anotação dos metabólitos em questão foi feita de forma putativa, baseando-se exclusivamente nos valores de massa exata obtidos (o que também ocorreu para os dados a seguir, em modo negativo). Portanto, recorreu-se ao uso de bases de dados de compostos *online* com o objetivo de encontrar possíveis correspondências. A plataforma CEU Mass Mediator (disponível em: <http://ceumass.eps.uspceu.es/mediator/index.xhtml>) (Gil-de-la-Fuente et al., 2018) foi

também desenvolvida no laboratório CEMBIO e possui, primeiramente, uma compilação de busca entre três das maiores bases de dados disponíveis, o HMDB, o LipidMaps (Sud et al., 2007) e o KEGG (do inglês, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Kanehisa & Goto, 2000). Além disso, inclui o cálculo de um *score* de acordo com a probabilidade de determinado composto formar ou não o aduto em questão, entre outras propriedades.

Dessa forma, a **Tabela 9** apresenta os principais resultados obtidos para cada *feature* em questão considerando-se os menores valores de erro de massa e diferentes adutos formados. Optou-se por exibir os nomes anotados para cada metabólito de forma resumida, apresentando também as classes a que pertencem e os códigos de identificação de acordo com cada base de dados correspondente, já que tais identificadores são únicos e permitem direcionar ao metabólito em questão com mais segurança do que o nome atribuído (já que diferentes bibliotecas podem utilizar diferentes sinônimos para o mesmo composto, além de possibilitar a confusão com isótopos de nomes similares).

**Tabela 9.** Anotação dos compostos encontrados pela técnica de LC-MS em modo de ionização positivo

<b><i>m/z</i></b>	<b>Composto Anotado</b>	<b>Erro (ppm)</b>	<b>Aduto</b>	<b>Base de dados</b>	<b>Identificador</b>
<b>468,3101</b>	LisoPC(14:0/0:0)	3	[M+H] <sup>+</sup>	HMDB	HMDB0010379
<b>612,1671</b>	Glutationa Oxidada	12	[M+NH <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	HMDB	HMDB0003337
<b>614,1718</b>	Sem correspondência	-	-	-	-
<b>660,1677</b>	Sem correspondência	-	-	-	-

### 3.5.4. Resultados obtidos pela técnica de LC-MS(-)

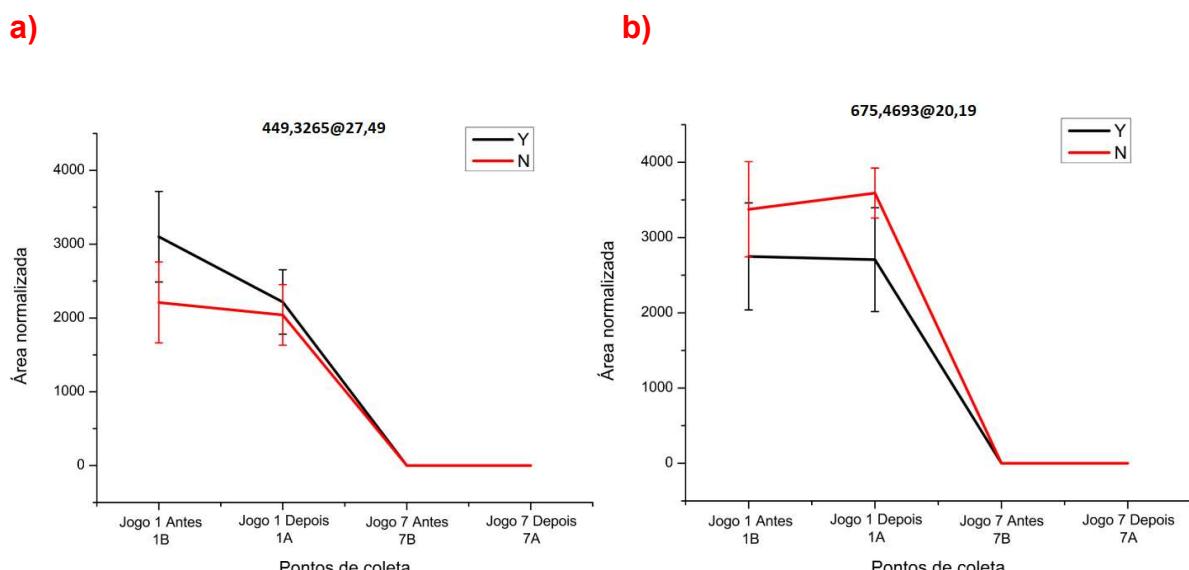
Similarmente ao modo positivo, a análise em modo negativo apresentou apenas 2 *features* como resultado da RM-ANOVA.

**Tabela 10.** Lista de *features* com p-valor inferior a 0,05 para a técnica de LC-MS no modo positivo

<b>Feature*</b>	<b>Valor de p</b>
449,3265@27.49	0,037
675,4693@20.19	0,039

\*Representado pelo valor de  $m/z$  e o tempo de retenção, separados pelo símbolo “@”

Da mesma forma observada para a técnica de LC-MS em modo positivo de ionização, nenhum composto significativo por RM-ANOVA pôde ser estatisticamente correlacionado com os valores de PL obtidos para os jogos 1 e 7. Assim, suas variações são apresentadas a seguir nas Figuras 22(a) e 22(b).



**Figura 22.** Variação individual de cada metabólito considerando-se os pontos de coleta no tempo para a técnica de LC-MS no modo negativo. Perfil apresentado para os fatores **a)** 449,3265@27,49; **b)** 675,4693@20,19.

Em seguida, partiu-se para a tentativa de anotação destes compostos a fim de possibilitar uma melhor interpretação biológica (**Tabela 11**).

**Tabela 11.** Anotação dos compostos encontrados pela técnica de LC-MS em modo de ionização negativo

<b><math>m/z</math></b>	<b>Composto Anotado</b>	<b>Erro (ppm)</b>	<b>Aduto</b>	<b>Base de dados</b>	<b>Identificador</b>
<b>449,3265</b>	Ácido Coprocólico	2	[M-H] <sup>-</sup>	HMDB	HMDB0000601
<b>675,4693</b>	PG(P-16:0/14:1(9Z))	14	[M-H] <sup>-</sup>	LipidMaps	LMGP04030004

### 3.6. Discussão Biológica

De maneira geral, os resultados apontam uma forte correlação entre as variações apresentadas pelos compostos leucina, isoleucina e valina, uma vez que tais compostos aparecem como estatisticamente alterados não somente nos resultados obtidos por RM-ANOVA para GC-MS como também para CE-MS. Além disso, em ambas as técnicas, tais aminoácidos foram também correlacionados em maior ou menor escala aos valores de PL coletados no Jogo 1. Tal correlação condiz também com a variação observada nos gráficos de área normalizada, uma vez que tais compostos apresentam comportamentos muito semelhantes, aumentando consideravelmente no Jogo 1 para as jogadoras do grupo Y enquanto diminuem para as jogadoras do grupo N. Se observamos o intervalo entre o Jogo 7, vemos um comportamento similar (o que pode explicar a não correlação das alterações destes metabólitos com os valores de PL para o Jogo 7). O que parece ocorrer, se observamos o intervalo Jogo 1A e Jogo 7B, é um equilíbrio no nível destes metabólitos durante o campeonato (entre os jogos 2 e 6), o que pode ser explicado pela mesma dieta aproximada, os mesmos treinos regulares entre os jogos oficiais e o fato de que as jogadoras que não participaram dos jogos inicial e final participaram esporadicamente dos jogos que os intermedium.

Sabe-se que a prática de exercício aumenta o gasto de energia e promove o catabolismo de proteínas e aminoácidos (Shimomura, Murakami, Nakai, Nagasaki, & Harris, 2004). Além disso, tais aminoácidos acima descritos podem ser oxidados no músculo esquelético. Dessa forma, espera-se um nível inferior no músculo esquelético, ao menos, de tais metabólitos, o que também é justificado pela suplementação pós-jogo aplicada a estas jogadoras com o intuito de recuperar a carga muscular e descrita amplamente na literatura (Patterson, Waldron, & Jeffries, 2019). No entanto, o catabolismo de proteínas aumenta a disponibilidade de tais metabólitos em plasma e, portanto, diversos estudos já encontraram efeitos similares aos aqui descritos (Henriksson, 1991; Kingsbury, Kay, & Hjelm, 1998). No entanto, os níveis de tais metabólitos em plasma após uma corrida de 30km e uma maratona permaneceram inalterados (Blomstrand & Newsholme, 1992). Isto pode ser explicado pelos fenômenos antagônicos da degradação de proteínas e a oxidação destes metabólitos (Ishikura, Ra, & Ohmori, 2013). Se observarmos os tempos analisados após o tempo 1A, há uma queda nos níveis destes metabólitos para os jogadores

titulares, o que pode representar uma maior oxidação destes metabólitos em relação a degradação de proteínas.

No caso dos aminoácidos tirosina e fenilalanina, ainda que tais metabólitos não tenham sido encontrados como significativos por RM-ANOVA, é possível ver uma correlação significativa com os valores de PL pela técnica de CE-MS. Tais metabólitos possuem em comum o fato de que não são sintetizados nem metabolizados no músculo, um aumento de suas concentrações é geralmente um indicativo de degradação de proteínas (Ishikura et al., 2013). Suas alterações estarem correlacionadas com os valores de PL e, consequentemente com o nível de esforço, pode indicar uma maior degradação de proteínas entre o início e o fim do Jogo 1 em relação aos demais pontos estudados, possivelmente correlacionado ao maior desgaste e ao fato de o organismo estar menos habituado no jogo inicial ao ritmo da competição em relação aos demais jogos.

Quanto ao ácido glutâmico, independentemente de seu comportamento anterior ao tempo 7B, pode-se notar uma queda em relação ao seu nível antes e depois do Jogo 7 para o grupo Y, contrária ao comportamento observado no grupo durante os demais tempos (de elevação). Ainda que o tempo total deste estudo e do descrito por Leibowitz (Leibowitz et al., 2012) seja extremamente diferente (já que neste estudo os níveis de glutamato são medidos dentro de 4h entre onde 60min de *spinning* é realizado a partir do tempo 0), um comportamento semelhante pôde ser observado, com uma elevação nos níveis iniciais e um retorno ao nível basal ao final do exercício. Além disso, o autor conclui que exercício físico intenso resulta em um aumento no nível de glutamato, como um reflexo de dano muscular. Isso é observado desde o Jogo 1 até a amostra coletada anteriormente ao Jogo 7, demonstrando um possível dano muscular acumulado. O mesmo ocorre para a creatina (Kindermann, 2016) outro indicador de dano muscular.

Por fim, as técnicas de LC-MS apresentaram, principalmente, alterações nos compostos anotados como flavonoides. É possível verificar, pelo perfil apresentado, que se tratam de compostos realmente correlacionados, visto que apresentam comportamento idêntico ao longo do campeonato. Flavonoides são compostos encontrados em plantas e já foram atribuídos anteriormente como benéficos para a prática de exercício e a performance (Malaguti, Angeloni, & Hrelia, 2013). Ao mesmo tempo, estudos com quercetina, por exemplo, apontaram não haver uma correlação entre a suplementação com esse composto e efeitos benéficos a longo prazo

(Angeloni, Spencer, Leoncini, Biagi, & Hrelia, 2007; McAnulty et al., 2008). Dessa forma, há ainda uma falta de consenso e, mais que isso, uma elucidação dos mecanismos envolvidos entre o consumo e a variação dos flavonoides em geral e o seu resultado em relação aos aspectos ligados as diferentes atividades físicas.

Já as fosfatidicolinas são compostos utilizados também como suplementação para atividades físicas. Isso ocorre pois tais compostos possuem a capacidade de evitar a diminuição nos níveis de colina, precursor na produção de acetilcolina (outro composto significativo por CE-MS), um neurotransmissor capaz de afetar a performance em baixos níveis. Curiosamente, os perfis de variação apresentados por estes dois metabólitos em técnicas analíticas distintas, parecem ser similares.

Observando-se os resultados obtidos por LC-MS em modo de ionização negativo, nota-se, além da semelhança entre ambas variações, um comportamento muito drástico de mudança (destacado pelos valores nulos de tais *features* nas amostras do Jogo 7). Ainda que tal comportamento seja possível, deve-se destacar a possibilidade de que tais compostos venham a ser produtos de degradação de algum outro metabólito presente, visto que as amostras do Jogo 7 foram coletadas em média 15 dias depois as amostras do Jogo 1, e tais produtos podem haver sido formados durante este período nas amostras do Jogo 1.

## **CAPÍTULO 4.**

## **CONCLUSÃO FINAL**

#### 4.1. Conclusão final

O estudo em questão apresentou, pela primeira vez, um estudo metabolômico neste formato. Não há, até onde se tem conhecimento, nenhum estudo na literatura que possua o mesmo design experimental, incluindo além do uso de DBS em uma competição de futebol internacional, a análise metabolômica realizada em três plataformas distintas. Desta forma, em termos analíticos, foi possível contribuir com um primeiro passo ao que parece ter a capacidade de ser aplicado como um método de *screening*, de rotina, na avaliação das alterações metabólicas ao longo não só de um campeonato, individualmente, mas também de um histórico metabólico informativo.

Os resultados obtidos apontam, principalmente, três aminoácidos que possuem em comum sua estrutura de cadeia ramificada, e, de fato, compõe a classe conhecida como BCAA (do inglês, *branched-chain amino acids*). De acordo com um estudo realizado por Ruiz-Canela e colaboradores (Ruiz-Canela et al., 2016), maiores concentrações de BCAA foram associados com um maior risco de doenças cardiovasculares em uma população com alto risco cardiovascular. Já Ferguson e Wang (Ferguson & Wang, 2016) afirmam: “estudos têm encontrado relações intrigantes entre BCAA e risco cardiom metabólico, com concentrações aumentadas de BCAA circulante nas artérias coronárias de pacientes doentes comparados a grupos controle e níveis de BCAA predizendo o risco de diabetes. No entanto, muitas questões permanecem em relação ao fato de se esses biomarcadores são causais ou correlacionados e, se causal, qual o mecanismo envolvido”. Desta forma é possível notar que diversos trabalhos anteriores, em outras áreas de aplicação, já vêm relacionando o risco de eventos cardiovasculares com o aumento nos níveis de BCAA presente e tais descobertas permitem a geração de diversas outras questões em relações aos níveis destes metabólitos e suas suplementações, incluindo os casos de morte cardíaca súbita.

Focando na literatura presente para o estudo de jogadores(as) de futebol e suas alterações metabólicas, podemos encontrar um estudo realizado por Ra e colaboradores (Ra et al., 2014) cujo desenho experimental e abordagem são os mais similares já publicados quando comparado a este estudo. Naquele caso, os autores coletaram amostras de saliva de 122 jogadores de futebol participantes de uma temporada de 3 dias seguidos de jogos. Destes, 37 foram identificados ao final como em estado de fadiga (acessada de acordo com questionários e outros parâmetros

físicos). Ao comparar os perfis metabólicos destes 37 participantes utilizando CE-MS, foram encontrados como significativos, dentre outros, os três BCAA, em concordância com as alterações observadas para este estudo.

Ademais, faz-se necessário também discutir as limitações deste estudo. Primeiramente, o longo tempo entre a coleta de amostras e a análise final faz com que, ainda que armazenadas em temperatura de -80 °C, exista a possibilidade de degradação e outras alterações (como oxidação) neste período. Além disso, faz-se necessário um aumento na concentração final dos extratos, evidenciado pelos perfis cromatográficos/eletroforéticos apresentados no Caderno Anexo. É possível notar que não existe diferença entre o cromatograma de íons totais (ainda que exista considerando-se o EIC). Isso pode ser feito de diversas maneiras, aumentando-se a quantidade de amostra coletada, utilizando-se substratos mais espessos e, portanto, capazes de absorver uma maior quantidade de sangue, dentre outros.

Por outro lado, também deve-se destacar a capacidade do método, ainda que muito simples e barato em termos de coleta de amostra, de fornecer resultados robustos e condizentes com o estabelecido na literatura, demonstrando assim seu potencial para aplicação como método de rotina quando realizados os devidos ajustes citados. Isso possibilitaria um acompanhamento mais que a nível de competição, a nível diário, jogo a jogo, treino a treino, suplementação a suplementação, e no acompanhamento a longo prazo em termos de necessidades metabólicas, fadiga, recuperação muscular ou ainda, riscos cardíacos.

## Referências

- Angeloni, C., Spencer, J. P. E., Leoncini, E., Biagi, P. L., & Hrelia, S. (2007). Role of quercetin and its in vivo metabolites in protecting H9c2 cells against oxidative stress. *Biochimie*, 89(1), 73-82.
- Antunes, Marina Venzon, Charão, Mariele Feiffer, & Linden, Rafael. (2016). Dried blood spots analysis with mass spectrometry: Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring. *Clinical Biochemistry*, 49(13), 1035-1046.
- Armitage, Emily G., Godzien, Joanna, Peña, Imanol, López-González, Ángeles, Angulo, Santiago, Gradillas, Ana, . . . Barrett, Michael P. (2018). Metabolic clustering analysis as a strategy for compound selection in the drug discovery pipeline for leishmaniasis. *ACS chemical biology*, 13(5), 1361-1369.
- Ascha, Mona, Wang, Zeneng, Ascha, Mustafa S., Dweik, Raed, Zein, Nizar N., Grove, David, . . . Hanouneh, Ibrahim A. (2016). Metabolomics studies identify novel diagnostic and prognostic indicators in patients with alcoholic hepatitis. *World journal of hepatology*, 8(10), 499.
- Bangsbo, Jens, Mohr, Magni, & Krstrup, Peter. (2006). Physical and metabolic demands of training and match-play in the elite football player. *Journal of sports sciences*, 24(07), 665-674.
- Barbas-Bernardos, Cecilia, Armitage, Emily G., García, Antonia, Mérida, Salvador, Navea, Amparo, Bosch-Morell, Francisco, & Barbas, Coral. (2016). Looking into aqueous humor through metabolomics spectacles- exploring its metabolic characteristics in relation to myopia. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 127, 18-25.
- Bassini, Adriana, & Cameron, L. C. (2014). Sportomics: Building a new concept in metabolic studies and exercise science. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445(4), 708-716.
- Blomstrand, E., & Newsholme, E. A. (1992). Effect of branched-chain amino acid supplementation on the exercise-induced change in aromatic amino acid concentration in human muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 146(3), 293-298.
- Botcherby, Lewis. (2019). The Rising Role of Foodomics: Ten years since its official definition, foodomics continues to expand the scientific knowledge of food and nutrition while resolving many analytical challenges along the way.

- |  |                       |                  |            |
|--|-----------------------|------------------|------------|
| <p><i>Chromatography</i></p> <p><a href="http://www.chromatographyonline.com/rising-role-foodomics">http://www.chromatographyonline.com/rising-role-foodomics.</a></p> | <p><i>Online.</i></p> | <p>Available</p> | <p>in:</p> |
|--|-----------------------|------------------|------------|
- Brownfield, Callan, Clendinen, Chaevien, Gaul, David, Arnold, Rebecca, Edison, Arthur, Fernandez, Facundo, & Petros, John. (2018). PD38-07 Multiplatform metabolomics reveals predictive prostate cancer recurrence phenotypes following radical prostatectomy. *The Journal of Urology*, 199(4, Supplement), e738-e739.
- Canuto, Gisele André Baptista, Dörr, Fabiane, Lago, João Henrique Ghilardi, Tempone, André Gustavo, Pinto, Ernani, Pimenta, Daniel Carvalho, . . . Tavares, Marina Franco Maggi. (2017). New insights into the mechanistic action of methyldehydroeugenol B towards Leishmania (L.) infantum via a multiplatform based untargeted metabolomics approach. *Metabolomics*, 13(5), 56.
- Carling, Christopher, Lacome, Mathieu, McCall, Alan, Dupont, Gregory, Le Gall, Franck, Simpson, Ben, & Buchheit, Martin. (2018). Monitoring of post-match fatigue in professional soccer: welcome to the real world. *Sports Medicine*, 1-8.
- Chagoyen, Monica, & Pazos, Florencio. (2012). Tools for the functional interpretation of metabolomic experiments. *Briefings in Bioinformatics*, 14(6), 737-744.
- Chong, Jasmine, Soufan, Othman, Li, Carin, Caraus, Iurie, Li, Shuzhao, Bourque, Guillaume, . . . Xia, Jianguo. (2018). MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W486-W494.
- Considine, Elizabeth C., & Salek, Reza M. (2019). A Tool to Encourage Minimum Reporting Guideline Uptake for Data Analysis in Metabolomics. *Metabolites*, 9(3), 43.
- Dalen, Terje, Jørgen, Ingebrigtsen, Gertjan, Ettema, Havard, Hjelde Geir, & Ulrik, Wisløff. (2016). Player load, acceleration, and deceleration during forty-five competitive matches of elite soccer. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 30(2), 351-359.
- Du, Dan, Gu, Haiwei, Djukovic, Danijel, Bettcher, Lisa, Gong, Meng, Zheng, Wen, . . . Raftery, Daniel. (2018). Multiplatform Metabolomics Investigation of Antidiapogenic Effects on 3T3-L1 Adipocytes by a Potent Diarylheptanoid. *Journal of Proteome Research*, 17(6), 2092-2101.

- Dunn, Warwick B., Broadhurst, David, Begley, Paul, Zelena, Eva, Francis-McIntyre, Sue, Anderson, Nadine, . . . Haselden, John N. (2011). Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature protocols*, 6(7), 1060.
- Fabie, Noelle Andrea V., Pappas, Kara B., & Feldman, Gerald L. (2019). The current state of newborn screening in the United States. *Pediatric Clinics*, 66(2), 369-386.
- Ferguson, Jane F., & Wang, Thomas J. (2016). Branched-chain amino acids and cardiovascular disease: does diet matter? In: Clinical Chemistry.
- Fiehn, Oliver, Kopka, Joachim, Dörmann, Peter, Altmann, Thomas, Trethewey, Richard N., & Willmitzer, Lothar. (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature biotechnology*, 18(11), 1157.
- Gil-de-la-Fuente, Alberto, Godzien, Joanna, Saugar, Sergio, Garcia-Carmona, Rodrigo, Badran, Hasan, Wishart, David S., . . . Otero, Abraham. (2018). CEU Mass Mediator 3.0: a metabolite annotation tool. *Journal of proteome research*, 18(2), 797-802.
- Gonzalez-Riano, Carolina, León-Espinosa, Gonzalo, Regalado-Reyes, Mamen, García, Antonia, DeFelipe, Javier, & Barbas, Coral. (2019). Metabolomic study of hibernating syrian hamster brains: In search of neuroprotective agents. *Journal of proteome research*, 18(3), 1175-1190.
- Hannon, W. Harry, & Therrell, B. L. (2014). Overview of the history and applications of dried blood samples. *Dried blood spots: applications and techniques*, 1-15.
- Henriksson, J. (1991). Effect of exercise on amino acid concentrations in skeletal muscle and plasma. *Journal of Experimental Biology*, 160(1), 149.
- Ishikura, Keisuke, Ra, Song-Gyu, & Ohmori, Hajime. (2013). Exercise-induced changes in amino acid levels in skeletal muscle and plasma. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, 2(3), 301-310.
- Jobard, Elodie, Trédan, Olivier, Bachelot, Thomas, Vigneron, Arnaud M., Aït-Oukhatar, Céline Mahier, Arnedos, Monica, . . . Elena-Herrmann, Bénédicte. (2017). Longitudinal serum metabolomics evaluation of trastuzumab and everolimus combination as pre-operative treatment for HER-2 positive breast cancer patients. *Oncotarget*, 8(48), 83570-83584.

- Kanehisa, Minoru, & Goto, Susumu. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30.
- Karaman, Ibrahim. (2017). Preprocessing and Pretreatment of Metabolomics Data for Statistical Analysis. In Alessandra Sussulini (Ed.), *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications* (pp. 145-161). Cham: Springer International Publishing.
- Kind, Tobias, Wohlgemuth, Gert, Lee, Do Yup, Lu, Yun, Palazoglu, Mine, Shahbaz, Sevini, & Fiehn, Oliver. (2009). FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 81(24), 10038-10048.
- Kindermann, Wilfried. (2016). Creatine Kinase Levels After Exercise. *Deutsches Arzteblatt international*, 113(19), 344-344.
- Kingsbury, K. J., Kay, L., & Hjelm, M. (1998). Contrasting plasma free amino acid patterns in elite athletes: association with fatigue and infection. *British Journal of Sports Medicine*, 32(1), 25.
- Klassen, Aline, Faccio, Andréa Tedesco, Canuto, Gisele André Baptista, da Cruz, Pedro Luis Rocha, Ribeiro, Henrique Caracho, Tavares, Marina Franco Maggi, & Sussulini, Alessandra. (2017). Metabolomics: definitions and significance in systems biology. In *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications* (pp. 3-17): Springer.
- Kuligowski, Julia, Sánchez-Illana, Ángel, Sanjuán-Herráez, Daniel, Vento, Máximo, & Quintás, Guillermo. (2015). Intra-batch effect correction in liquid chromatography-mass spectrometry using quality control samples and support vector regression (QC-SVRC). *Analyst*, 140(22), 7810-7817.
- Kume, Satoshi, Yamato, Masanori, Tamura, Yasuhisa, Jin, Guanghua, Nakano, Masayuki, Miyashige, Yukiharu, . . . Iwai, Kazuhiro. (2015). Potential biomarkers of fatigue identified by plasma metabolome analysis in rats. *PLoS one*, 10(3), e0120106.
- Lawson, A. J., Bernstone, L., & Hall, S. K. (2015). Newborn screening blood spot analysis in the UK: influence of spot size, punch location and haematocrit. *Journal of Medical Screening*, 23(1), 7-16.
- Leibowitz, Akiva, Klin, Yael, F Gruenbaum, Benjamin, Gruenbaum, Shaun, Kuts, Ruslan, Dubilet, Michael, . . . Zlotnik, Alexander. (2012). *Effects of strong*

- physical exercise on blood glutamate and its metabolite 2-ketoglutarate levels in healthy volunteers* (Vol. 72).
- Malaguti, Marco, Angeloni, Cristina, & Hrelia, Silvana. (2013). Polyphenols in exercise performance and prevention of exercise-induced muscle damage. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 825928-825928.
- Malhotra, Aneil, Dhutia, Harshil, Finocchiaro, Gherardo, Gati, Sabiha, Beasley, Ian, Clift, Paul, . . . Oxborough, David. (2018). Outcomes of cardiac screening in adolescent soccer players. *New England Journal of Medicine*, 379(6), 524-534.
- Marqués-Jiménez, Diego, Calleja-González, Julio, Arratibel, Iñaki, Delextrat, Anne, & Terrados, Nicolás. (2017). Fatigue and recovery in soccer: evidence and challenges. *The Open Sports Sciences Journal*, 10(1).
- Martín-García, Andrés, Casamichana, David, Díaz, Antonio Gómez, Cos, Francesc, & Gabbett, Tim J. (2018). Positional Differences in the Most Demanding Passages of Play in Football Competition. *Journal of Sports Science & Medicine*, 17(4), 563.
- McAnulty, Steven R., McAnulty, Lisa S., Nieman, David C., Quindry, John C., Hosick, Peter A., Hudson, Matthew H., . . . Morrow, Jason D. (2008). Chronic quercetin ingestion and exercise-induced oxidative damage and inflammation. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 33(2), 254-262.
- Mei, Joanne, & Lee, M. S. (2014). Dried blood spot sample collection, storage, and transportation. *Dried Blood Spots: Applications and Techniques*, 21-31.
- Naz, S., Garcia, A., & Barbas, C. (2013). Multiplatform Analytical Methodology for Metabolic Fingerprinting of Lung Tissue. *Analytical Chemistry*, 85(22), 10941-10948.
- Naz, Shama, García, Antonia, & Barbas, Coral. (2013). Multiplatform Analytical Methodology for Metabolic Fingerprinting of Lung Tissue. *Analytical Chemistry*, 85(22), 10941-10948.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2011). *Lehninger Principles of Biochemistry*: W. H. Freeman.
- Nicholson, Jeremy K., Lindon, John C., & Holmes, Elaine. (1999). 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29(11), 1181-1189.

- Nédélec, Mathieu, McCall, Alan, Carling, Chris, Legall, Franck, Berthoin, Serge, & Dupont, Gregory. (2012). Recovery in Soccer. *Sports Medicine*, 42(12), 997-1015.
- O'Mara, M., Hudson-Curtis, B., Olson, K., Yueh, Y., Dunn, J., & Spooner, N. (2011). The effect of hematocrit and punch location on assay bias during quantitative bioanalysis of dried blood spot samples. *Bioanalysis*, 3(20), 2335-2347.
- Panhuyzen-Goedkoop, N. M., Wellens, H. J., & Piek, J. J. (2018). Early recognition of sudden cardiac arrest in athletes during sports activity. *Netherlands Heart Journal*, 26(1), 21-25.
- Patterson, Stephen D., Waldron, Mark, & Jeffries, Owen. (2019). Proteins and Amino Acids and Physical Exercise. In *Nutrition and Skeletal Muscle* (pp. 183-196): Elsevier.
- Prado, Eduardo, Souza, Gustavo H. M. F., Pegurier, Marcelle, Vieira, Camila, Lima-Neto, Abelardo Barbosa Moreira, Assis, Marcio, . . . Macedo, Andrea Furtado. (2017). Non-targeted sportomics analyses by mass spectrometry to understand exercise-induced metabolic stress in soccer players. *International Journal of Mass Spectrometry*, 418, 1-5.
- Prentice, Philippa, Turner, Charles, Wong, Max C. Y., & Dalton, R. Neil. (2013). Stability of metabolites in dried blood spots stored at different temperatures over a 2-year period. *Bioanalysis*, 5(12), 1507-1514.
- Ra, Song-Gyu, Maeda, Seiji, Higashino, Ryota, Imai, Tomoko, & Miyakawa, Shumpei. (2014). Metabolomics of salivary fatigue markers in soccer players after consecutive games. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 39(10), 1120-1126.
- Ramos, Guilherme P., Nakamura, FÁBio Y., Penna, Eduardo M., Wilke, C. F., Pereira, L. A., Loturco, I., . . . Coimbra, C. C. (2017). Activity profiles in U17, U20 and senior women's Brazilian National soccer teams during international competitions: Are there meaningful differences? *Journal of strength and conditioning research*.
- Ramos, Guilherme Passos, Nakamura, Fábio Yuzo, Pereira, Lucas Adriano, Junior, Wanderley Brilhante, Mahseredjian, Fábio, Wilke, Carolina Franco, . . . Coimbra, Cândido Celso. (2017). Movement patterns of a U-20 national women's soccer team during competitive matches: influence of playing position

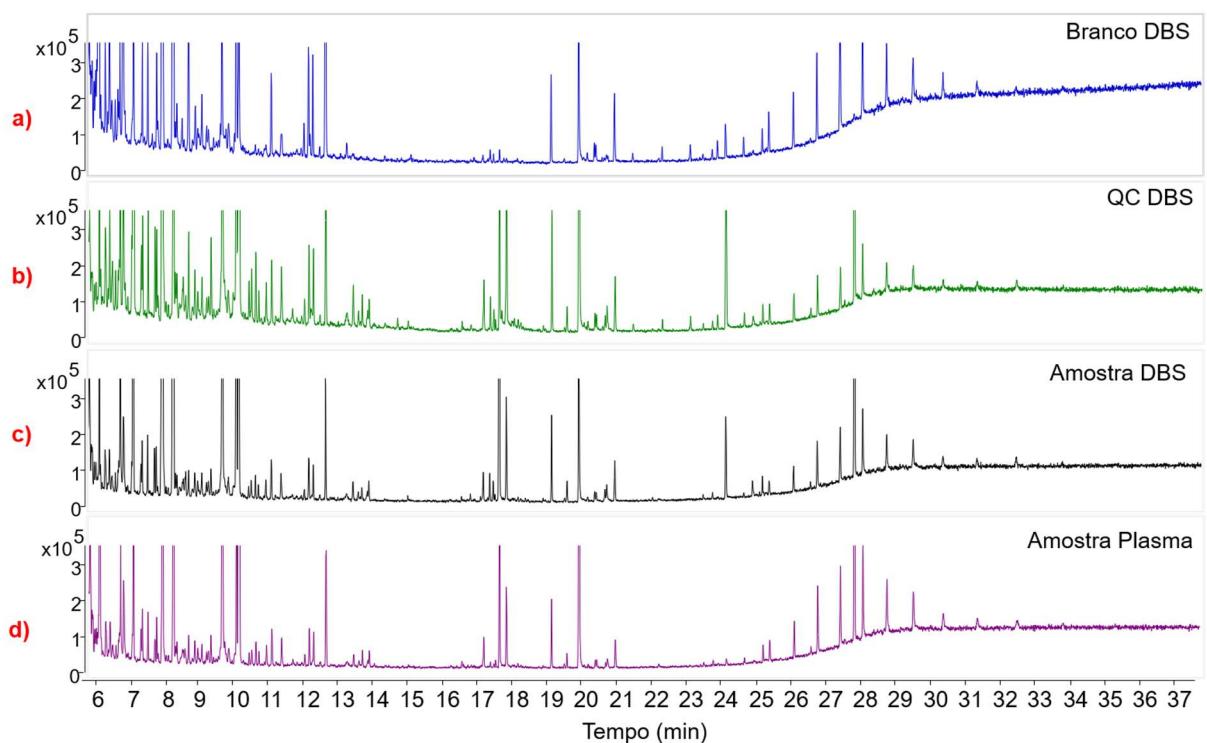
- and performance in the first half. *International journal of sports medicine*, 38(10), 747-754.
- Rey, Ezequiel, Padrón-Cabo, Alexis, Barcala-Furelos, Roberto, Casamichana, David, & Romo-Pérez, Vicente. (2018). Practical active and passive recovery strategies for soccer players. *Strength & Conditioning Journal*, 40(3), 45-57.
- Rottinghaus, Erin K., Beard, R. Suzanne, Bile, Ebi, Modukanele, Mosetsanagape, Maruping, Maruping, Mine, Madisa, . . . Yang, Chunfu. (2014). Evaluation of Dried Blood Spots Collected on Filter Papers from Three Manufacturers Stored at Ambient Temperature for Application in HIV-1 Drug Resistance Monitoring. *PLoS ONE*, 9(10), e109060.
- Ruiz-Canela, Miguel, Toledo, Estefania, Clish, Clary B., Hruby, Adela, Liang, Liming, Salas-Salvadó, Jordi, . . . Ros, Emilio. (2016). Plasma branched-chain amino acids and incident cardiovascular disease in the PREDIMED trial. *Clinical chemistry*
- Santos-Lozano, Alejandro, Martín-Hernández, Juan, Baladrón, Carlos, Turrado-Sevilla, María Ángeles, Arrarás-Flores, Ángel, Villacastín, Julián P., . . . Lucia, Alejandro. (2017). Sudden cardiac death in professional soccer players. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(11), 1420-1421.
- Sharma, Abhishek, Jaiswal, Swati, Shukla, Mahendra, & Lal, Jawahar. (2014). Dried blood spots: Concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis. *Drug Testing and Analysis*, 6(5), 399-414.
- Shimomura, Yoshiharu, Murakami, Taro, Nakai, Naoya, Nagasaki, Masaru, & Harris, Robert A. (2004). Exercise Promotes BCAA Catabolism: Effects of BCAA Supplementation on Skeletal Muscle during Exercise. *The Journal of Nutrition*, 134(6), 1583S-1587S.
- Spicer, Rachel A., Salek, Reza, & Steinbeck, Christoph. (2017). A decade after the metabolomics standards initiative it's time for a revision. *Scientific Data*, 4, 170138.
- Srivastava, Anubhav, & Creek, Darren John. (2019). Discovery and validation of clinical biomarkers of cancer: a review combining metabolomics and proteomics. *Proteomics*, 19(10), 1700448.
- Stølen, Tomas, Chamari, Karim, Castagna, Carlo, & Wisløff, Ulrik. (2005). Physiology of Soccer. *Sports Medicine*, 35(6), 501-536.

- Sud, Manish, Fahy, Eoin, Cotter, Dawn, Brown, Alex, Dennis, Edward A., Glass, Christopher K., . . . Subramaniam, Shankar. (2007). LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Research*, 35(Database issue), D527-D532.
- Sumner, Lloyd W., Amberg, Alexander, Barrett, Dave, Beale, Michael H., Beger, Richard, Daykin, Clare A., . . . Griffin, Julian L. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, 3(3), 211-221.
- Vinaixa, Maria, Samino, Sara, Saez, Isabel, Duran, Jordi, Guinovart, Joan J., & Yanes, Oscar. (2012). A guideline to univariate statistical analysis for LC/MS-based untargeted metabolomics-derived data. *Metabolites*, 2(4), 775-795.
- Wang, Jianing, Wang, Chunyan, & Han, Xianlin. (2019). Tutorial on lipidomics. *Analytica chimica acta*.
- Winter, Gal, & Krömer, Jens O. (2013). Fluxomics—connecting ‘omics analysis and phenotypes. *Environmental microbiology*, 15(7), 1901-1916.
- Wishart, David S., Feunang, Yannick Djoumbou, Marcu, Ana, Guo, An Chi, Liang, Kevin, Vázquez-Fresno, Rosa, . . . Karu, Naama. (2017). HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic acids research*, 46(D1), D608-D617.
- Wong, Philip, & James, Christopher A. (2014). Punching and Extraction Techniques for Dried Blood Spot Sample Analysis. *Dried Blood Spots: Applications and Techniques*, 160-167.
- Wong, Philip, Pham, Roger, Whately, Carl, Soto, Marcus, Salyers, Kevin, James, Christopher, & Bruenner, Bernd A. (2011). Application of automated serial blood sampling and dried blood spot technique with liquid chromatography–tandem mass spectrometry for pharmacokinetic studies in mice. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 56(3), 604-608.
- Xia, Jianguo. (2017). Computational Strategies for Biological Interpretation of Metabolomics Data. In Alessandra Sussulini (Ed.), *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications* (pp. 191-206). Cham: Springer International Publishing.
- Yi, Lunzhao, Dong, Naiping, Yun, Yonghuan, Deng, Baichuan, Ren, Dabing, Liu, Shao, & Liang, Yizeng. (2016). Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Analytica chimica acta*, 914, 17-34.

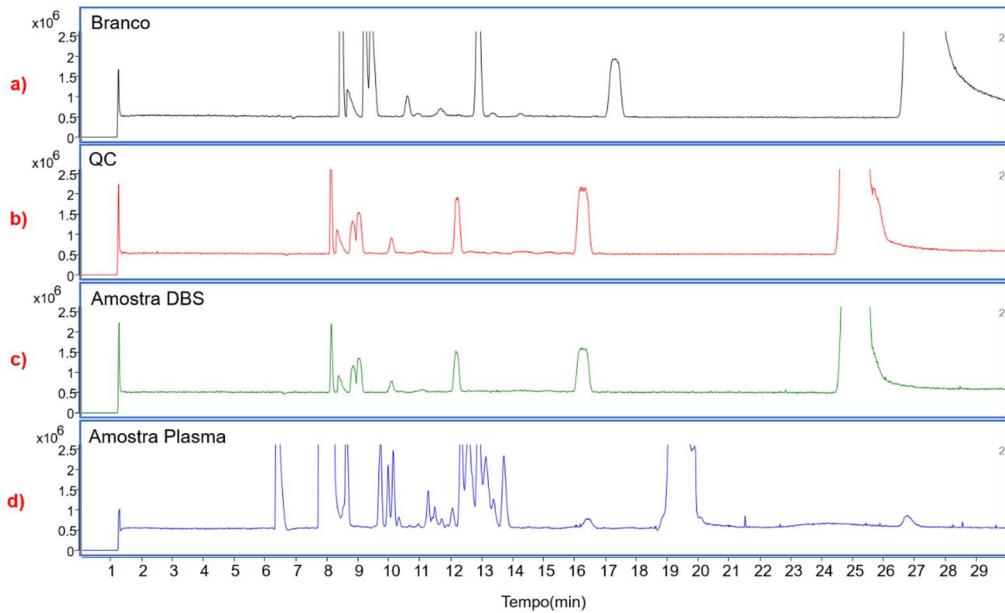
## **LISTA DE ANEXOS**

**Tabela 1.** Composição descrita para suplemento do tipo Whey Protein (New Millen, Cajamar, São Paulo), em 2 medidas-padrão (44g de produto).

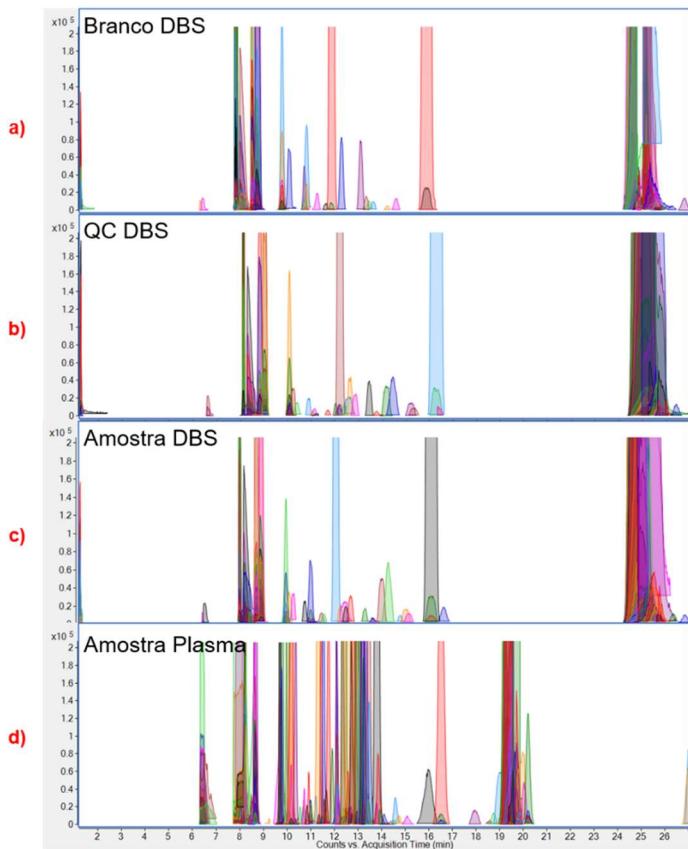
Aminoácido	Massa (mg)	Aminoácido	Massa (mg)
Ácido Aspártico	1635	Leucina	1660
Ácido Glutâmico	2523	Lisina	1441
Alanina	735,1	Metionina	285,1
Arginina	315,6	Prolina	870,0
Cisteína	345,3	Serina	705,6
Fenilalanina	495,8	Tirosina	271,3
Glicina	271,3	Treonina	1080
Histidina	345,0	Triptofano	315,9
Isoleucina	870,4	Valina	870,3



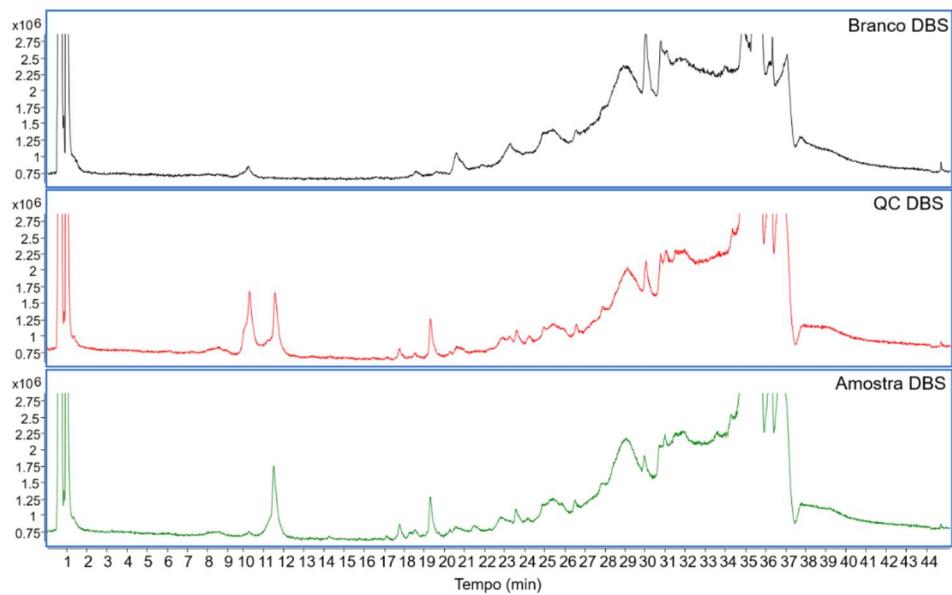
**Figura 1.** Cromatogramas representativos para a técnica de GC-MS considerando amostras de a) branco, b) QC, c) amostra e d) comparação com amostra de plasma analisada utilizando-se o mesmo método.



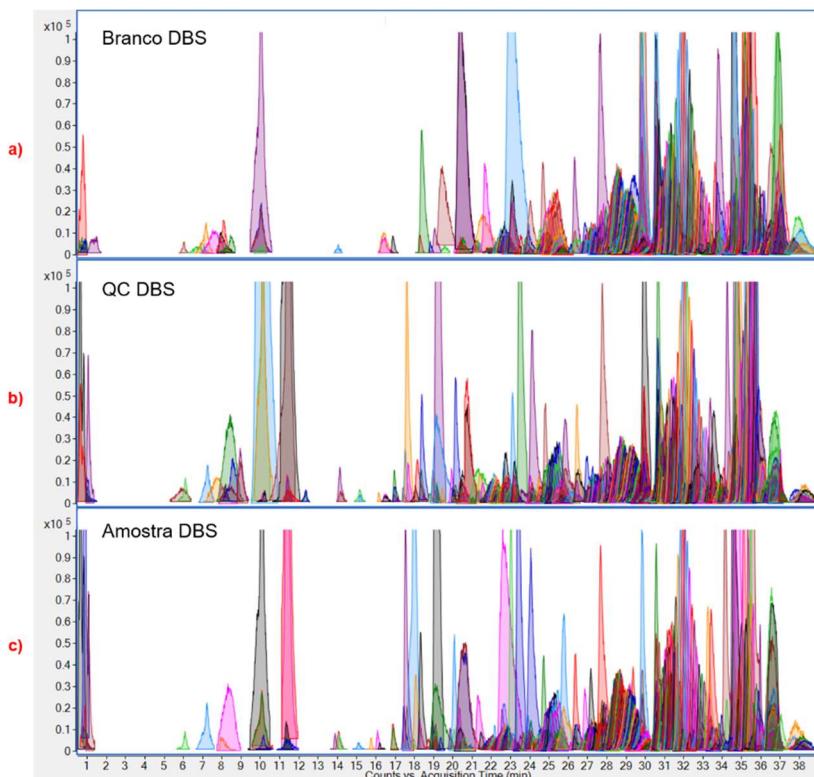
**Figura 2.** Eletroferogramas representativos para a técnica de CE-MS considerando amostras de a) branco, b) QC, c) amostra e d) comparação com amostra de plasma analisada utilizando-se o mesmo método.



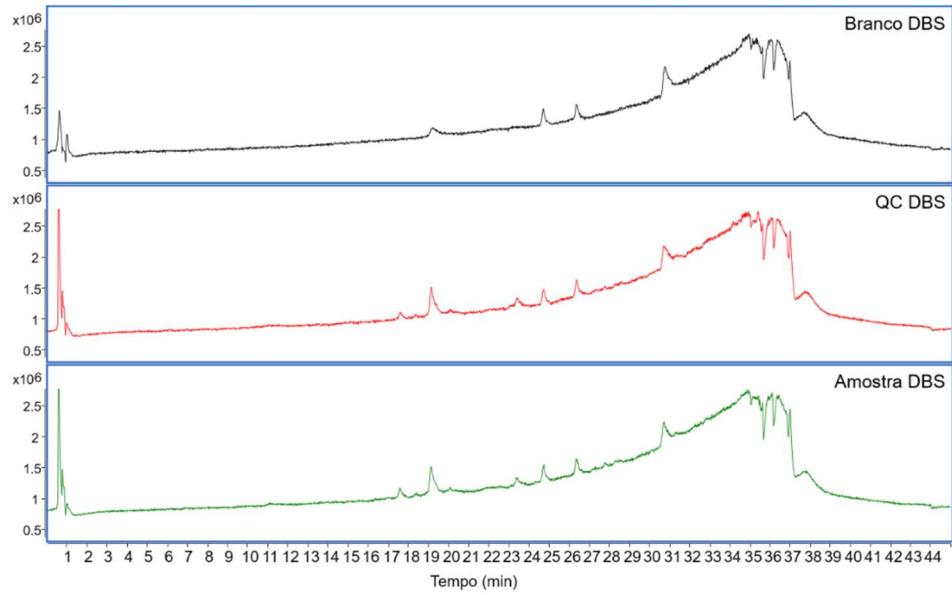
**Figura 3.** Eletroferograma de íons extraídos para a técnica de CE-MS de a) branco, b) QC, c) amostra e d) comparação com amostra de plasma analisada utilizando-se o mesmo método.



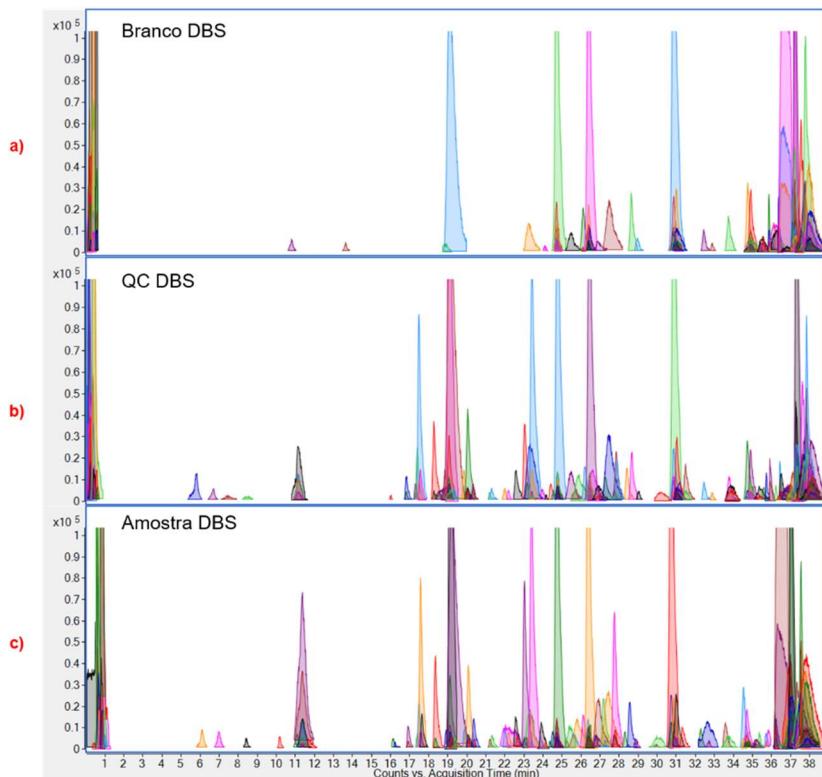
**Figura 4.** Cromatogramas representativos para a técnica de LC-MS em modo positivo considerando amostras de a) branco, b) QC, c) amostra e d) comparação com amostra de plasma analisada utilizando-se o mesmo método.



**Figura 5 –** Cromatograma de íons extraídos para a técnica de LC-MS(+) de a) branco, b) QC, c) amostra e d) comparação com amostra de plasma analisada utilizando-se o mesmo método.

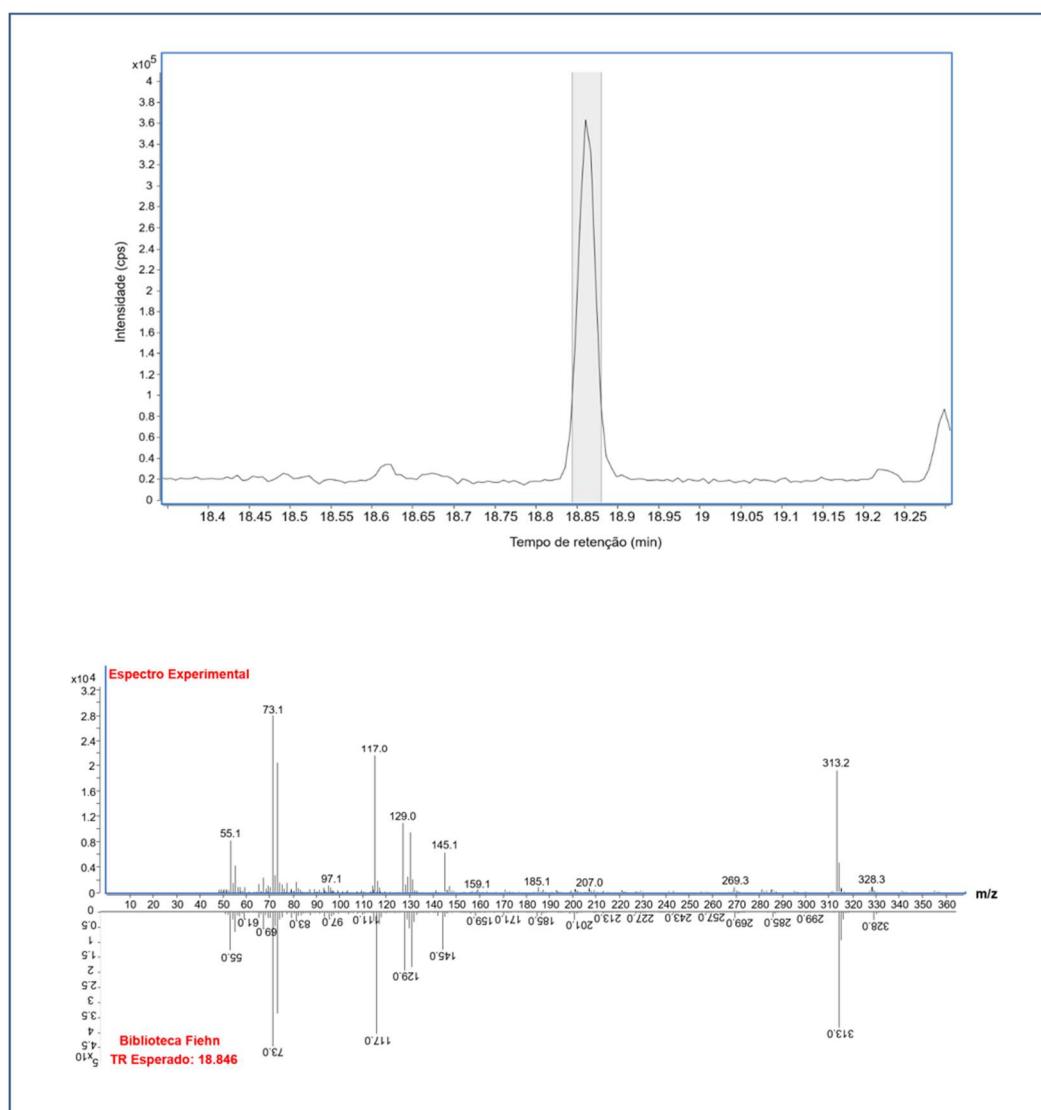


**Figura 6.** Cromatogramas representativos para a técnica de LC-MS em modo negativo considerando amostras de a) branco, b) QC, c) amostra e d) comparação com amostra de plasma analisada utilizando-se o mesmo método.

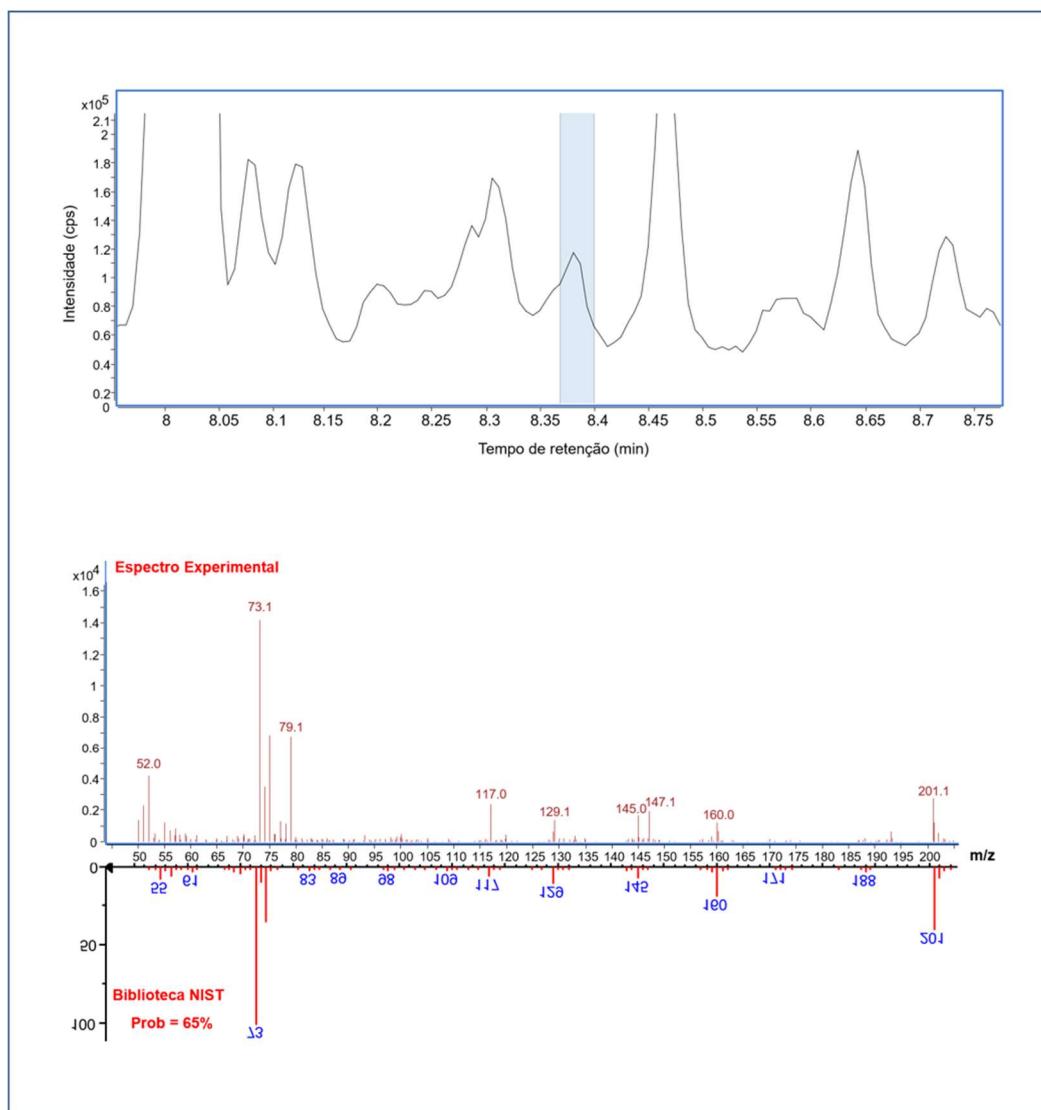


**Figura 7.** Cromatograma de íons extraídos para a técnica de LC-MS(-) de a) branco, b) QC, c) amostra e d) comparação com amostra de plasma analisada utilizando-se o mesmo método.

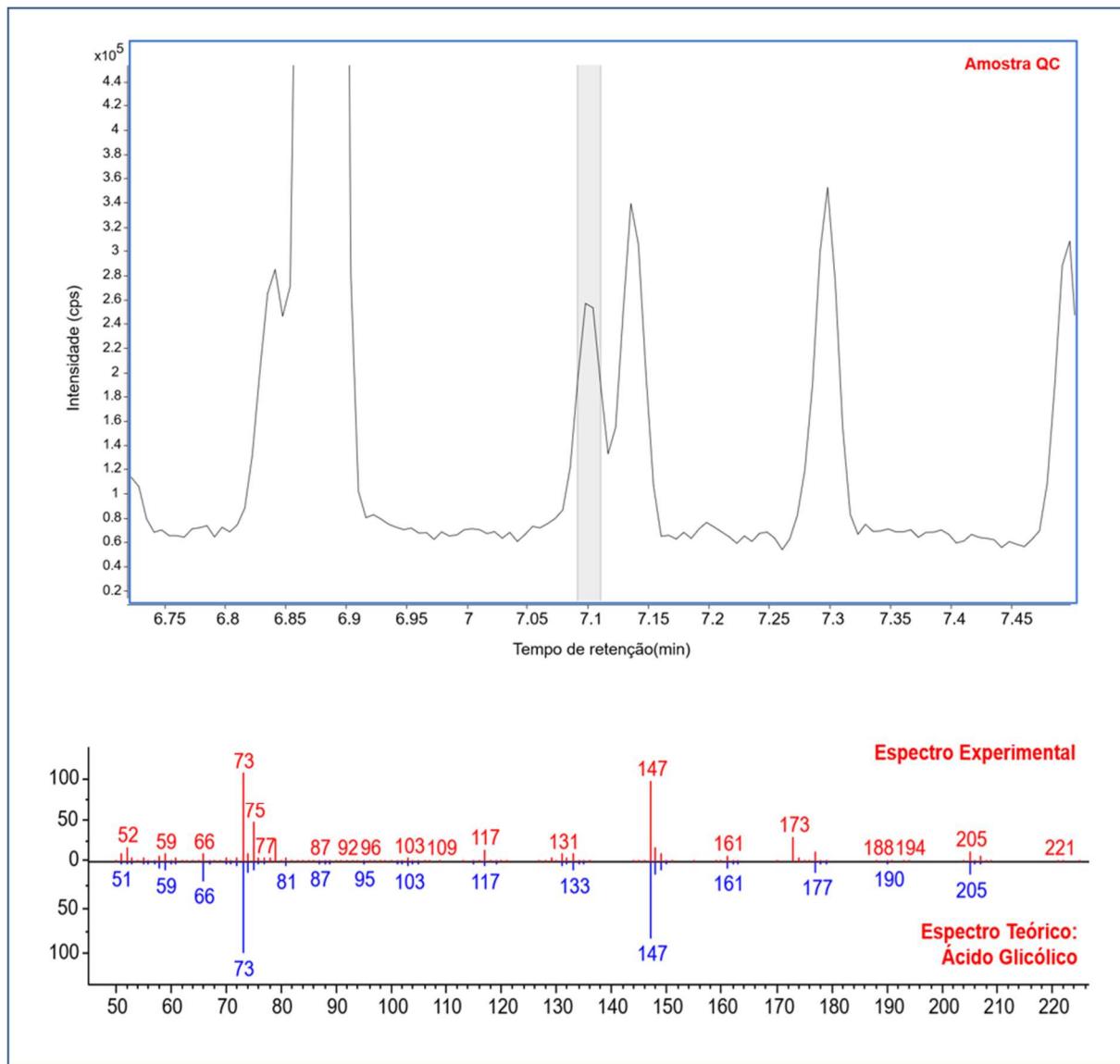
a)



b)



c)



**Figura 8.** Exemplificação dos três resultados possíveis em nível de tentativa de identificação de metabólitos para a técnica de GC-MS através de espectros representativos. **a)** Identificação do ácido palmítico através da biblioteca FIEHN, **b)** Identificação do ácido 2-etilexanóico através da biblioteca NIST e **c)** metabólitos sem identificação correspondente em ambas bibliotecas. Neste último caso, apenas fragmentos não específicos foram encontrados (73 e 147, fragmentos relacionados ao derivatizante e que estão presentes durante toda a aquisição). Além disso, fragmentos que poderiam ser considerados característicos, como o 177, não foram encontrados). Por fim, a maior probabilidade calculada pelo software *NIST MS Search*, para o ácido glicólico, foi de apenas 30,8%.

**Tabela 2.** Parâmetros utilizados na deconvolução dos dados obtidos por GC-MS em *software* Unknwon

	Parâmetro	Valor utilizado
Deconvolution	Retention window size fator	50
	Excluded <i>m/z</i>	28,43,44,45
	SNR Treshold	3
	Left <i>m/z</i> window	0,5 AMU
	Left <i>m/z</i> window	0,5 AMU
Library Search	Bibliotecas	FIEHN/NIST
	Match Factor	Use RT Match
	RT Penalty Function	Gaussian (7s standard deviation)
	RT Mismatch Penalty	Additive (Max: 20)
Compound Identification	Max Hit Count	1
	Min Match Factor	40
	Min <i>m/z</i>	30
	Ratio Percent Uncertainty	40
	Multi-Library Search Type	Stop When Found

**Tabela 3.** Parâmetros de deconvolução, extração, alinhamento e integração de picos para CE-MS e LC-MS em software Profinder

Step	Subitem	CE-MS	LC-MS(+/-)
Step 1: Extraction Parameters	Extraction	Peak height > 300 counts	Peak height > 500 counts
	Ion Species	+H	(+) = +H, +Na, +K (-) = -H
	Charge State	Isotope model: common organic (no halogens)	Isotope model: common organic (no halogens)
Step 2: Compound Filters		Limit assigned charge states to a range of: 1-2	Limit assigned charge states to a range of: 1-2
	Mass Filters	None	None
	Mass Defect	Default	Default
Step 3: Compound Binning and Alignment	Advanced	Compound ion count threshold: Include all Compounds with indeterminate neutral mass: Exclude	Compound ion count threshold: Include all Compounds with indeterminate neutral mass: Exclude
	RT Window	5% + 3min	1% + 0.1min
Step 4: MFE - Post-Processing Filters	Mass Window	30ppm + 2mDa	20ppm + 2mDa
	Score MFE	50	50
	A compound must satisfy the checked MFE in	50% of the total sample number	50% of the total sample number
Step 5: Find by Ion - Matching Tolerance and Scoring	Global Filters	Limit to the largest 2000 compounds	Limit to the largest 2000 compounds
	EIC Tolerance	Possible <i>m/z</i> : symmetric (35ppm) Limit EIC extraction range to expected retention time: $\pm 5\text{min}$	Possible <i>m/z</i> : symmetric (35ppm) Limit EIC extraction range to expected retention time: $\pm 5\text{min}$
	Scoring	Default	Default
Step 6: EIC Pea	Result Filters	Default	Default
	Integration	Agile 2	Agile 2

	Smoothing	Default	Default
	Peak Filters	Absolute Height: 1000 counts	Absolute Height: 1000 counts
	Chromatogram Format	Centroid	Centroid
Step 7: Spectrum Extraction and Centroiding	Peak Spectrum	Default	Default
	Centroiding	Default	Default
	Spectrum Format	Default	Default
Step 8: Find by ion - Post-Processing Filters	Score (Tgt)	50	40
	A compound must satisfy the checked MFE in	50% of the total sample number	50% of the total sample number
	Global Filters	Limit to the largest 2000 compounds	Limit to the largest 2000 compounds

**Tabela 4.** Valores de massa medidos em balanca analítica para cada amostra. O valor médio foi utilizado como valor de normalizacao das amostras de QC.

Amostra	Massa (mg)	Amostra	Massa (mg)	Amostra	Massa (mg)
<b>A-1A</b>	5,1	<b>H-7A</b>	5,2	<b>P-1A</b>	5,6
<b>A-1B</b>	5,7	<b>H-7B</b>	5,4	<b>P-1B</b>	5,3
<b>A-7A</b>	4,8	<b>I-1A</b>	5,0	<b>P-7A</b>	5,6
<b>A-7B</b>	5,0	<b>I-1B</b>	4,8	<b>P-7B</b>	5,3
<b>B-1A</b>	4,8	<b>I-7A</b>	5,4	<b>Q-1A</b>	5,3
<b>B-1B</b>	4,9	<b>I-7B</b>	6,0	<b>Q-1B</b>	5,1
<b>B-7A</b>	4,9	<b>J-1A</b>	6,1	<b>Q-7A</b>	5,2
<b>B-7B</b>	4,7	<b>J-1B</b>	3,8	<b>Q-7B</b>	4,6
<b>C-1A</b>	4,3	<b>J-7A</b>	5,2	<b>R-1A</b>	4,6
<b>C-1B</b>	5,3	<b>J-7B</b>	5,6	<b>R-1B</b>	4,6
<b>C-7A</b>	6,3	<b>K-1A</b>	5,0	<b>R-7A</b>	4,5
<b>C-7B</b>	4,6	<b>K-1B</b>	5,3	<b>R-7B</b>	4,7

<b>D-1A</b>	5,3	<b>K-7A</b>	5,5	<b>S-1A</b>	5,4
<b>D-1B</b>	5,2	<b>K-7B</b>	5,1	<b>S-1B</b>	5,9
<b>D-7A</b>	5,3	<b>L-1A</b>	5,2	<b>S-7A</b>	4,9
<b>D-7B</b>	4,9	<b>L-1B</b>	5,0	<b>S-7B</b>	4,9
<b>E-1A</b>	5,1	<b>L-7A</b>	5,3	<b>T-1A</b>	5,9
<b>E-1B</b>	4,6	<b>L-7B</b>	4,7	<b>T-1B</b>	4,4
<b>E-7A</b>	5,1	<b>M-1A</b>	5,3	<b>U-1A</b>	5,2
<b>E-7B</b>	5,0	<b>M-1B</b>	6,4	<b>U-1B</b>	4,7
<b>F-1A</b>	5,5	<b>M-7A</b>	5,1	<b>U-7A</b>	5,7
<b>F-1B</b>	4,7	<b>M-7B</b>	4,5	<b>U-7B</b>	5,2
<b>F-7A</b>	5,0	<b>N-1A</b>	5,4	<b>V-1A</b>	5,2
<b>F-7B</b>	4,9	<b>N-1B</b>	5,5	<b>V-1B</b>	4,7
<b>G-1A</b>	5,4	<b>N-7A</b>	5,0	<b>V-7A</b>	5,3
<b>G-1B</b>	5,9	<b>N-7B</b>	5,7	<b>V-7B</b>	6,3
<b>G-7A</b>	4,9	<b>O-1A</b>	5,1	<b>Média</b> 5,1	
<b>G-7B</b>	5,0	<b>O-1B</b>	4,5	<b>Desvio padrão relativo</b> 8,9%	
<b>H-1A</b>	4,8	<b>O-7A</b>	4,8		
<b>H-1B</b>	4,9	<b>O-7B</b>	5,3		

**Tabela 5.** Valores de player load (PL) para os Jogos 1 e 7

Player ID	Player Load Jogo 1	Player Load Jogo 7
D	1008	986
E	929	821
F	1091	1031
I	1065	906
L	903	914
M	807	845

V

1067

944

**Tabela 6.** Parâmetros utilizados na correlação entre PL e ΔÁrea dos metabólitos em plataforma Metaboanalyst

Parâmetro	Seleção utilizada
Missing value estimation	Replace by min
Filtering	None
Sample Normalization	None
Data Transformation	None
Data Scaling	Auto scaling
Correlation Used	Pearson r

**Tabela 7.** Metabólitos identificados na análise multiplataforma das amostras dos Jogos 1 e 7 para a técnica de CE-MS a partir das massas teóricas e dos valores de tempo de retenção relativos ao padrão interno (Metionina Sulfona) armazenados em biblioteca *in-house* construída a partir dos padrões internos dos compostos em questão. A mesma abordagem foi utilizada na identificação dos metabólitos apresentados na tabela 1 no item 2.2.2. (dados não apresentados)

ID	Massa Teórica (Da)	Massa Exp (Da)	Δ (ppm)	TM* (min)	TMR** Exp	TMR Teórico	Relative Difference
Glicina	75,0320	75,0333	17,3	12,299	0,75	0,75	0%
Sarcosina	89,0477	89,0483	6,7	13,198	0,80	0,79	1,2%
Metilalanina	103,0633	103,0652	18,4	13,872	0,84	0,88	4,5%
Colina	103,0997	103,1	2,9	10,345	0,63	0,58	8,6%
Serina	105,0426	105,0428	1,9	14,288	0,87	0,89	2,2%
Creatinina	113,0589	113,059	0,9	11,023	0,67	0,73	8,2%

Prolina	115,0633	115,0634	0,9	15,281	0,93	0,92	1,1%
Valina	117,0789	117,079	0,9	14,328	0,87	0,89	2,3%
Betaína	117,0790	117,0792	1,7	15,866	0,97	0,96	1,0%
Treonina	119,0582	119,0582	0,0	14,843	0,90	0,91	1,1%
Ácido Piroglutâmico	129,0426	129,0427	0,8	26,621	1,62	1,75	7,4%
Trans-4-Hidroxiprolina	131,0582	131,059	6,1	16,641	1,01	1,01	0%
Creatina	131,0695	131,0695	0,0	12,994	0,79	0,83	4,8%
Leucina+Isoleucina	131,0946	131,0946	0,0	14,591	0,89	0,91	2,2%
Ornitina	132,0899	132,0895	3,0	10,5	0,64	0,61	4,9%
Ácido Aspártico	133,0375	133,0372	2,3	15,977	0,97	0,97	0%
Hipoxantina	136,0385	136,0389	2,9	16,462	1,00	1,01	1,0%
Glutamina	146,0691	146,0691	0,0	15,171	0,92	0,94	2,1%
Lisina	146,1055	146,1053	1,4	10,573	0,64	0,62	3,2%
Ácido Glutâmico	147,0532	147,0535	2,0	15,346	0,93	0,92	1,1%
Histidina	155,0695	155,0694	0,6	11,092	0,68	0,73	6,9%
Alantoína	158,0440	158,0474	21,5	25,658	1,56	1,57	0,6%
Ácido 2-Aminoadípico	161,0688	161,0692	2,5	13,446	0,82	0,93	11,8%
Carnitina	161,1052	161,1054	1,2	12,536	0,76	0,73	4,1%
Fenilalanine	165,0790	165,0797	4,2	15,497	0,94	0,96	2,1%
Metilhistidina	169,0851	169,0856	3,0	11,344	0,69	0,67	3,0%
Arginina	174,1117	174,1115	1,1	10,897	0,66	0,72	8,3%
Citrulina	175,0957	175,0991	19,4	15,54	0,95	0,95	0%

<b>Metionina Sulfona (IS)</b>	181,0409	181,0417	4,4	16,429	1,00	1	0%
Tirosina	181,0739	181,0741	1,1	15,808	0,96	0,95	1,1%
Dimetilarginine	202,1430	202,1416	6,9	11,913	0,73	0,76	4,0%
Acetylcarnitine	203,1158	203,1163	2,5	13,134	0,80	0,78	2,6%
Triptofano	204,0899	204,0897	1,0	15,409	0,94	0,93	1,1%

\*Tempo de migração

\*\* Tempo de migração relativo

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação das possíveis alterações dos ritmos biológicos de mulheres atletas de futebol submetidas a condições de treinamento físico e competição.

**Pesquisador:** Cândido Celso Coimbra

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

**Versão:** 1

**CAAE:** 30514414.5.0000.5149

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Patrocinador Principal:** CNPQ

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 648.430

**Data da Relatoria:** 14/05/2014

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um estudo prospectivo, longitudinal e observacional com uma casuística de 22 mulheres atletas de futebol pertencentes à categoria de base da Confederação Brasileira de Futebol, com idades de 18 e 19 anos, as quais serão avaliadas durante o período de treinamento físico por medida de frequência cardíaca, avaliação clínica de percepção de esforço, taxa de sudorese, temperatura axilar e coleta de saliva e sangue para dosagens hormonais e RNAm. Há critérios de inclusão e exclusão, descrição da análise estatística, cronograma adequado e custo de R\$ 49.689,60, com apoio financeiro do CNPq, segundo o pesquisador.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário: "Avaliar as respostas fisiológicas e a modulação dos ritmos biológicos de mulheres submetidas ao exercício físico em condições de treinamento e competição".

Objetivos Secundários: "Investigar as demandas fisiológicas, as respostas hormonais cíclicas e a modulação dos ritmos biológicos em atletas de alto rendimento (Futebol Feminino) durante um período de treinamento e competição".

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores, aos riscos são "lesões músculo-esqueléticas, distúrbios e incômodos

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II

**CEP:** 31.270-901

**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 648.430

causados pelo cansaço durante a atividade. No entanto, todos os voluntários serão atletas acostumados com a prática da modalidade esportiva avaliada. Além disso, todos os procedimentos a serem realizados durante o experimento são de uso rotineiro na equipe em questão. Ademais, em todas as situações de exercício físico, as voluntárias estarão acompanhadas de uma médica disponível para qualquer atendimento emergencial. Punção venosa: ao ser submetido à punção venosa, o voluntário estará sujeito à ocorrência de flebites, infiltrações, hematomas, desconforto e infecções associadas ao procedimento. No entanto, para minimizar qualquer uma dessas complicações esse procedimento será realizado por um profissional treinado que realizará a devida higienização do local a ser punctionado e sempre fará uso de materiais estéreis e descartáveis. Além disso, todo o procedimento será supervisionado pela médica responsável da Confederação Brasileira de futebol. Com esses cuidados, o único risco possível é um leve desconforto gerado pela punção. Coleta de amostras de saliva: O procedimento de coleta salivar pode gerar constrangimento por parte das voluntárias no momento da colheita passiva de amostra, no entanto esse procedimento será realizado em ambiente privado e apropriado, o que minimiza esse possível desconforto". E quanto aos benefícios, "os testes indicarão a sua condição física e auxiliarão para programação de treinamento".

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Mulheres submetidas ao treinamento físico de alta intensidade podem sofrer algumas alterações no ciclo menstrual. Esta pesquisa contribuirá para mais conhecimentos sobre estas alterações biológicas em mulheres atletas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Anexados além do projeto de pesquisa, TCLE, parecer consubstanciado da Escola de Educação Física, também com a ciência com assinatura e carimbo do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB (setor responsável pelo laboratório, no qual serão feitas as dosagens hormonais) e folha de rosto. O TCLE está em forma de convite, com objetivos, descrição dos procedimentos e riscos, benefícios e direitos.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto está adequado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 648.430

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 15 de Maio de 2014

---

Assinado por:

**Maria Teresa Marques Amaral**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br