



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
Escola de Farmácia - EFAR



Flávia de Carvalho Pedrosa

## Cromatografia Gasosa aplicada em Estudos de Metabolômica

Ouro Preto, 2018

Flávia de Carvalho Pedrosa

## **Cromatografia Gasosa aplicada em Estudos de Metabolômica**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Farmácia.

**Área de concentração:** CG em metabolômica

**Orientador:** Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho

Ouro Preto  
Escola de Farmácia - UFOP  
Fevereiro/2018

*Dedico este trabalho à minha família, pela cumplicidade e apoio nesta difícil tarefa e grande realização. Ao meu pai Rosélio Cândido Pedrosa, à minha mãe Ita de Lourdes Carvalho Pedrosa, ao meu irmão Filipe de Carvalho Pedrosa por sempre me auxiliar nas minhas dificuldades e ao Denis Oliveira Cruz pela compreensão e por estar ao meu lado durante esta trajetória.*

# AGRADECIMENTOS

A Deus, meu mentor maior, por permitir que a minha trajetória chegasse ao fim e por trilhar comigo este caminho de tantas batalhas. Gratidão pela minha vida e da minha família. Gratidão pela saúde pra lutarmos. Gratidão pelas pessoas que conheci e tive o privilégio de conviver. Gratidão sempre!

Ao Professor Dr. Sidney Augusto Vieira Filho, um ser humano incrível que de maneira tão gentil e acolhedora dirigiu este trabalho. O que me deu o prazer de considerá-lo um amigo, meu amigo Bibó, sempre com as palavras certas, bons conselhos e uma boa prosa. O que nunca diz não, e que de forma tão bondosa oferece refúgio em sua salinha pra quem dele necessitar.

À Universidade Federal de Ouro Preto e à Escola de Farmácia, professores e funcionários pela oportunidade da realização do curso de graduação e pela boa convivência. Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e aceitação do convite.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Gratidão!



## MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

### TERMO DE APROVAÇÃO

Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas  
(CG-EM), aplicada em estudos de metabolômica

Trabalho de conclusão de Curso defendido por **FLÁVIA DE CARVALHO PEDROSA**, matrícula 13.1.2169 em 08 de fevereiro de 2018, e aprovado pela comissão examinadora:

Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho  
Orientador, DEFAR-EF-UFOP

Profa. Dra. Eleonice Moreira Santos  
ENUT

Profa. Dra. Sônia Maria de Figueiredo  
ENUT

# RESUMO

Este trabalho tem como objetivo principal apresentar as principais características da metabolômica, uma das áreas das ciências ômicas que é utilizada em estudos de metabólitos, principalmente aqueles que contribuem para diagnósticos. Dentre as técnicas utilizadas para a avaliação da produção destes metabólitos, a cromatografia gasosa se destaca principalmente por contribuir para estudos de compostos voláteis ou que possam ser derivatizados. Trata-se de uma técnica que possibilita uma eficiente separação e identificação de constituintes de misturas biológicas complexas. Quando a cromatografia gasosa é acoplada a um espectrômetro de massas, obtêm-se resultados ainda mais precisos para estudos de metabolômica. Diante disso, o trabalho consiste em realizar um estudo desta técnica cromatográfica para determinação de metabólitos que são produzidos por diferentes sistemas biológicos. A metodologia utilizada envolveu um levantamento e compilação das principais informações disponíveis na literatura científica e em banco de dados. Finalizando este trabalho, foram apresentadas as principais aplicações da CG em estudos de metabolômica.

**Palavras-chave:** *Metabolômica, Metabólitos, Cromatografia gasosa, Aplicações da CG*

# ABSTRACT

The focal point of this thesis is to present the main characteristics of Metabolomics, a branch of the omics sciences involved in the study of chemical processes concerning metabolites, mainly those which contribute to diagnose. Amongst the techniques utilized for evaluating the production of such metabolites, gas chromatography stands out mainly due to its contribution to the study of volatile or derivatized compounds. It is an efficient technique for separating and identifying constituents of complex biological mixtures. When gas chromatography is coupled to a mass spectrometer, it yields even more accurate results for metabolomics studies. This work is concerned about the study of this chromatographic technique for the determination of metabolites which are produced by different biological systems. The methodology used in this thesis involved a survey and compilation of the main information available in the scientific literature and databases. Lastly, the main applications of GC in metabolomics studies were concisely presented for the sake of completeness.

**Keywords:** *Metabolomics, metabolites, gas chromatography, GC applications*

# Lista de figuras

Figura 1 – Áreas das ciências ômicas utilizadas para estudos de impactos ambientais sobre sistemas biológicos . . . . .	15
Figura 2 – Número de publicações envolvendo metabolômica em diferentes áreas e da sua associação com a área Farmacêutica, de 1999 a 2015 . . . . .	17
Figura 3 – Sistemas biológicos e utilização de CG-EM na determinação de metabólitos em estudos de metabolômica . . . . .	18
Figura 4 – Esquema do processo de separação desenvolvido por Mikchael Semenovich Tswett em 1906 . . . . .	20
Figura 5 – Esquema de separação por migração diferencial de constituintes de uma mistura, entre a fase estacionária e a fase móvel gasosa . . . . .	21
Figura 6 – Esquema de um cromatógrafo a gás. . . . .	23
Figura 7 – Esquema de colunas capilares tubulares abertas, utilizadas em CG, com parede revestida ou com suporte revestido . . . . .	25
Figura 8 – Os quatro principais tipos de detectores utilizados em CG . . . . .	28
Figura 9 – Esquema simplificado de metodologia utilizada em estudos de metabolômica aplicando CG . . . . .	31
Figura 10 – Aplicações da CG em metabolômica utilizada em estudos envolvendo diferentes áreas . . . . .	32
Figura 11 – Esquema simplificado de estudo de uma questão biológica envolvendo a aplicação de CG-EM . . . . .	33

# Lista de tabelas

Tabela 1 – Faixa de concentração utilizada nos diversos tipos de cromatografia . .	20
Tabela 2 – Classificação da cromatografia de acordo com suas fases . . . . .	20
Tabela 3 – Dimensões e vazões mais empregadas em colunas de CG . . . . .	26

# Lista de siglas e abreviaturas

**CG:** Cromatografia gasosa

**CG-EM:** Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

**NIST:** *National Institute of Standards and Technology*

**CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**PUBMED:** *National Center for Biotechnology Information, U.S. Library of Medicine*

**RMN:** Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

**CGL:** Cromatografia gás-líquido

**CGS:** Cromatografia gás-sólido

**FM:** Fase móvel

**FE:** Fase estacionária

**PTFE:** Politetrafluoretileno

**WCOT:** *Wall Coated Open Tubular*

**PLOT:** *Porous layer open tubular column*

**SCOT:** *Support-coated*

**TCD:** *Thermal conductivity detector*

**FID:** *Flame ionization detector*

**ECD:** *Mass spectrometer detector*

**EM:** Espectrometria de massas

**m/z:** Razão massa/carga

# Sumário

<b>Lista de figuras</b> . . . . .	<b>8</b>
<b>Lista de tabelas</b> . . . . .	<b>9</b>
<b>Sumário</b> . . . . .	<b>11</b>
<b>1 Introdução</b> . . . . .	<b>12</b>
1.1 Objetivo Geral . . . . .	12
1.1.1 Objetivos Específicos . . . . .	13
1.2 Justificativa . . . . .	13
1.3 Metodologia . . . . .	14
<b>2 Metabolômica</b> . . . . .	<b>15</b>
2.1 Conceituação de Metabolômica . . . . .	16
<b>3 Cromatografia Gasosa</b> . . . . .	<b>19</b>
3.1 Características da CG . . . . .	19
3.2 Aparelhagem em CG . . . . .	23
3.2.1 Reservatório de gás(es) . . . . .	24
3.2.2 Reguladores de pressão e válvulas de controle de fluxo . . . . .	24
3.2.3 Sistema de injeção da amostra . . . . .	24
3.2.4 Coluna cromatográfica e forno da coluna . . . . .	24
3.2.5 Detector . . . . .	27
3.2.6 Detector de condutividade térmica (DTC) . . . . .	27
3.2.7 Detector por ionização em chama (DIC) . . . . .	28
3.2.8 Amplificador de sinal e registrador . . . . .	29
3.2.9 Controle de temperatura da coluna, injetor e detector . . . . .	30
3.3 Análises . . . . .	30
3.4 CG em Metabolômica . . . . .	31
<b>4 CG em Metabolômica</b> . . . . .	<b>32</b>
<b>5 Conclusão e perspectivas</b> . . . . .	<b>36</b>
<b>Referências</b> . . . . .	<b>37</b>

# 1 Introdução

Metabólitos são compostos do metabolismo de organismos vivos que refletem a condição fisiológica individual e são gerados como produtos intermediários ou finais de processos celulares podendo ser identificados e quantificados. É sabido que as substâncias que são produzidas pelos organismos ou que estão presentes em fluidos biológicos refletem a sua condição individual. O diagnóstico de doenças, a avaliação do funcionamento de órgãos vitais e do comportamento bioquímico são realizados a partir de níveis de creatinina, ureia, ácido úrico, e/ou da presença de marcadores de função presentes em amostras biológicas (FUNARI *et al.*, 2013).

Metabólitos são produzidos de acordo com características fenotípicas e hábitos de vida, em resposta à exposição a agentes químicos, físicos ou biológicos permitindo que sejam identificados uma variedade deles. Fármacos como penicilina, importante para o tratamento de infecções bacterianas, é um exemplo de metabólito gerado por fungos do gênero *Penicillium*. Antibióticos que tem grande importância do ponto farmacológico tem a propriedade de inibir crescimento ou promover a morte de microrganismos. Os microrganismos são os principais produtores de metabólitos secundários, seguido de plantas, dando origem à antibióticos de estrutura química variada (FIEHN *et al.*, 2000).

A metabolômica, ciência que estuda esses metabólitos, é uma ferramenta importante que tem aplicação em farmacologia, nutrição, genômica, proteômica e outras. Na determinação desses tipos de substâncias são utilizadas técnicas analíticas para identificação e quantificação de metabólitos. Entre estes métodos tem-se a cromatografia gasosa (CG) que ocupa um lugar de destaque na separação, identificação e quantificação de espécies químicas de uma mistura. Esta técnica apresenta excelente poder de resolução e tem a vantagem de se utilizar pequenas quantidades de amostras. Este é um dos fatores que pode limitar a utilização de outras técnicas em detrimento desta (ABDELNUR, 2011).

Neste contexto, o presente estudo tem como propósito rever e avaliar a aplicação desta técnica com aplicações na metabolômica visto que, esta é uma área de pesquisa de sistemas biológicos, estudada nos últimos tempos que tem gerado bons resultados principalmente na área da biotecnologia.

## 1.1 Objetivo Geral

Estudar a técnica de cromatografia gasosa aplicada em estudos de metabolômica.

### 1.1.1 Objetivos Específicos

- Descrever o processo de CG;
- Estudar os principais componentes do aparelho de CG;
- Citar as principais colunas e detectores utilizados em estudos de metabolômica,
- Verificar análise qualitativa e quantitativa nas determinações de metabólitos;
- Conceituar metabolômica e apresentar suas principais características;
- Aplicações da CG em metabolômica.

## 1.2 Justificativa

A Cromatografia Gasosa é uma das técnicas mais sensíveis, capaz de detectar metabólitos de baixa massa molecular voláteis ou passíveis de derivatização, na ordem de  $10^{-12}g$ . Portanto é uma técnica mais sensível que a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) que detecta constituintes na ordem de  $10^{-9}g$ . O fato da CG poder estar acoplado a Espectrometria de Massas (EM) permite a utilização de banco de dados, como por exemplo o NIST (*National Institute of Standards and Technology*) onde o composto é identificado por meio de probabilística. A identificação é feita pela razão massa/carga dos íons presentes na amostra oriundos de uma fonte de ionização (PENG *et al.*, 2003).

A CG é aplicável para compostos que sejam voláteis, de média e baixa polaridade e que tenham baixo peso molecular. A amostra e seus componentes também devem ser termo-estáveis devido as altas temperaturas alcançadas durante o processo de separação cromatográfica (LANÇAS, 1993). Para permear membranas biológicas as substâncias devem possuir como característica, além de certa hidrofobicidade e mínima hidrofiliidade que permite a sua excreção, baixo peso molecular. Então para determinação de compostos encontrados em fluidos biológicos, essa técnica tem importante aplicação. E quando acoplada ao espectrômetro de massas permite alta seletividade e eficiência de separação, obtenção de informação sobre estrutura química do metabólito, massa molar além do aumento adicional de seletividade (KAR, 2005).

Atualmente a técnica apresentada possui uma vasta aplicação, além da determinação de metabólitos presentes no organismo, é um dos principais recursos utilizados em laboratórios na determinação de pesticidas em frutas, vegetais e cereais que geralmente estão presentes em quantidades muito baixas e que torna possível a confirmação e determinação de um grande número de compostos simultaneamente. A CG também tem sua aplicação no controle de qualidade em laboratórios farmacêuticos, na determinação da pureza de compostos orgânicos específicos em medicamentos, determinação de impurezas em drogas de abuso e outros (NICKLER *et al.*, 2015).

Para a identificação de compostos em misturas complexas, além da Espectrometria de Massas, a CG pode ser acoplada ainda a outras técnicas como Espectroscopia no Infravermelho e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. Isto oferece ao instrumentista mais possibilidades de trabalho na identificação desses compostos, pois além da separação cromatográfica permite também uma análise qualitativa e quantitativa dos elementos. Esta combinação de técnicas que tem princípios diferentes é capaz de tornar o método ainda mais sensível e eficiente (LEI *et al.*, 2011).

### 1.3 Metodologia

Este trabalho foi desenvolvido com base em pesquisa de natureza exploratória através do levantamento de informações disponíveis na literatura científica. Os bancos de dados utilizados para análise e compilação de dados mais importantes tais como, o Portal Periódicos CAPES, ScinFinder, ChemWeb, PubMed, Scielo e outros são fontes seguras e confiáveis. A metodologia de desenvolvimento do trabalho é dividida nas seguintes etapas:

**Etapa 1:** Análise na literatura focando nas seguintes áreas: metabolômica e cromatografia a gás.

**Etapa 2:** Conceituação do termo metabolômica, exposição da sua importância e averiguação de publicações existentes na literatura.

**Etapa 3:** Descrição sobre o método cromatográfico como um processo de separação, apresentação das principais características da cromatografia a gás e tipo de aparelhagem utilizada.

**Etapa 4:** Avaliação das análises qualitativas e quantitativas desse tipo de técnica analítica.

**Etapa 5:** Sondagem de áreas de estudos que envolvem cromatografia gasosa em estudos de metabolômica e suas aplicações.

**Etapa 6:** Avaliação dos resultados obtidos por meio do estudo de revisão da literatura segundo proposto para o referido trabalho.

## 2 Metabolômica

Nas últimas décadas, novas formas de pesquisa de impactos ambientais sobre sistemas biológicos têm sido realizadas em áreas que estão intimamente correlacionadas, denominadas ciências ômicas. As ciências ômicas compreendem a área de genômica, epigenômica, transcriptômica, proteômica, lipidômica e metabolômica (vide figura 1) (ABDELNUR, 2011).

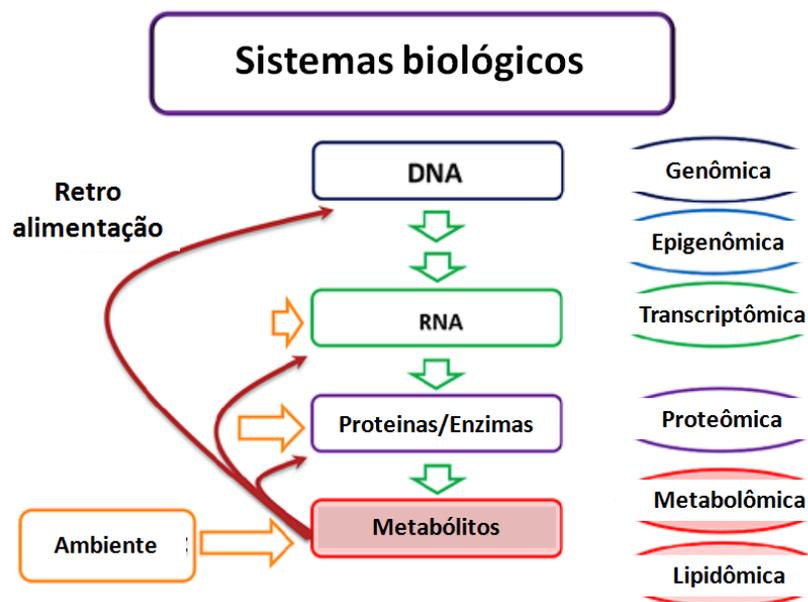


Figura 1 – Áreas das ciências ômicas utilizadas para estudos de impactos ambientais sobre sistemas biológicos. Fonte: adaptado de <<https://www.embrapa.br>>

As ciências ômicas surgem com uma abordagem de estudo de organismos biológicos com o objetivo de um melhor entendimento do funcionamento celular. A metabolômica consiste no estudo em larga escala de moléculas que em geral são conhecidas como metabólitos e que estão presentes no interior das células, nos fluidos biológicos, nos tecidos ou organismos. Este tipo de abordagem tem relevância a partir do momento em que se projeta para o entendimento de cada sistema individualmente mais a relação existente entre todos os outros que juntos compreendem o organismo vivo e dialogam entre si (FUNARI *et al.*, 2013).

A transcriptômica estuda e faz uma comparação dos RNAs que são o produto do DNA a partir da replicação, identificando os genes que estão sendo expressos neste momento da transcrição. Esses RNAs são traduzidos em proteínas que constituem objeto de estudo da proteômica através da análise das suas interações com o sistema biológico. O material genético e sua sequenciação é o que é estudado na área de genômica, envolvendo a ve-

rificação da variação de genes e também da identificação de novos genes (ABDELNUR, 2011).

Dentre as ciências ômicas, a metabolômica, objeto do presente trabalho, é aplicada para identificar e quantificar metabólitos que são produzidos em um determinado momento pelo organismo (PINZON, 2009; FUNARI *et al.*, 2013; HEINNER, 2015).

## 2.1 Conceituação de Metabolômica

A metabolômica é definida como “a análise do metabolismo como um todo, sob um conjunto de condições fisiológicas, ambientais ou clínicas”. O metaboloma é considerado como o “complemento quantitativo de todos os compostos orgânicos de baixa massa molecular ( $MM < 1500u.m.a$ ) em um determinado estado fisiológico ou de desenvolvimento” de uma célula, tecido ou organismo (NICKLER *et al.*, 2015). Portanto, é uma área de grande aplicação em estudos de biotecnologia.

A biotecnologia tem influenciado grandemente no desenvolvimento de setores industriais através da profunda importância desta ciência na sociedade e na economia. Metabolômica foi um termo introduzido por Oliver Fiehn e seus colaboradores nos anos 2000 quando descreveram o perfil metabólico de plantas como uma nova estratégia de avaliação da função de genes investigando a relação existente entre o genótipo e o fenótipo resultante (FIEHN *et al.*, 2000; ABDELNUR, 2011).

O uso do termo metabolômica surgiu na década de 90 e tem sido utilizado para definir “o conjunto de dados qualitativos e quantitativos sobre os metabólitos secundários de uma determinada matriz de origem biológica” (FUNARI *et al.*, 2013).

Metabólitos secundários são substâncias naturais produzidas pelas células em resposta a uma determinada condição. Por meio do metabolismo são formados diferentes metabólitos, que estão relacionados com a defesa da célula frente a uma situação adversa. Assim sendo, através da metabolômica é possível efetuar um mapeamento de determinados tipos de metabólitos que são os produtos finais do metabolismo celular e que refletem a expressão final do genótipo de um organismo (PINZON, 2009). Utilizando a metabolômica é possível estudar o comportamento dos sistemas biológicos diante de influências genética, nutricional e ambiental. Ou seja, é possível avaliar a resposta de células ou do organismo submetidos a estresse causado por agentes físicos, químicos ou biológicos (FUNARI *et al.*, 2013). Possíveis alterações são comparadas entre perfis metabólicos individuais e situações onde amostras são expostas a frequentes e distintas condições ambientais, mudanças naturais drásticas ou gradativas provocadas ao meio, causando alterações sobre a biodiversidade (FUNARI *et al.*, 2013).

Muitos metabólitos secundários produzidos por microrganismos, plantas, pequenos artrópodes e outros organismos são de grande utilidade para os seres humanos, tais como fármacos, fragrâncias, alimentos, cosméticos e outros (NICKLER *et al.*, 2015).

Os microrganismos são os principais produtores de antibióticos que são tipos de metabólitos secundários produzidos como uma forma de defesa do organismo em relação a uma situação adversa. Antibióticos são compostos de grande importância farmacológica e representam o maior valor de mercado em termos de indústria farmacêutica. O metabolismo secundário está diretamente relacionado à especificidade, proporcionando diferentes tipos de antibióticos produzidos por diferentes mecanismos, gerando diferentes espectros de ação farmacológica. (NICKLER *et al.*, 2015)

Metabólitos farmacologicamente ativos também são produzidos mediante a utilização de um fármaco ou um tóxico, sendo formados durante o processo de biotransformação dessas substâncias (PINZON, 2009; FUNARI *et al.*, 2013).

A metabolômica é aplicada em estudos que envolvem o desenvolvimento de novos fármacos, tais como antibióticos e outros, sua eficácia farmacológica, a caracterização de marcadores químicos de espécies vegetais, monitoração de nutrientes, bioquímica de microrganismos e outros (KAR, 2005).

Com base em dados publicados no PubMed (*National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*), desde 2002, além das descobertas de novos fármacos, a aplicação da metabolômica vem crescendo de forma exponencial envolvendo áreas tais como a de terapêutica específica, segurança biológica, diagnóstico e determinação de níveis da gravidade de doenças (vide figura 2).

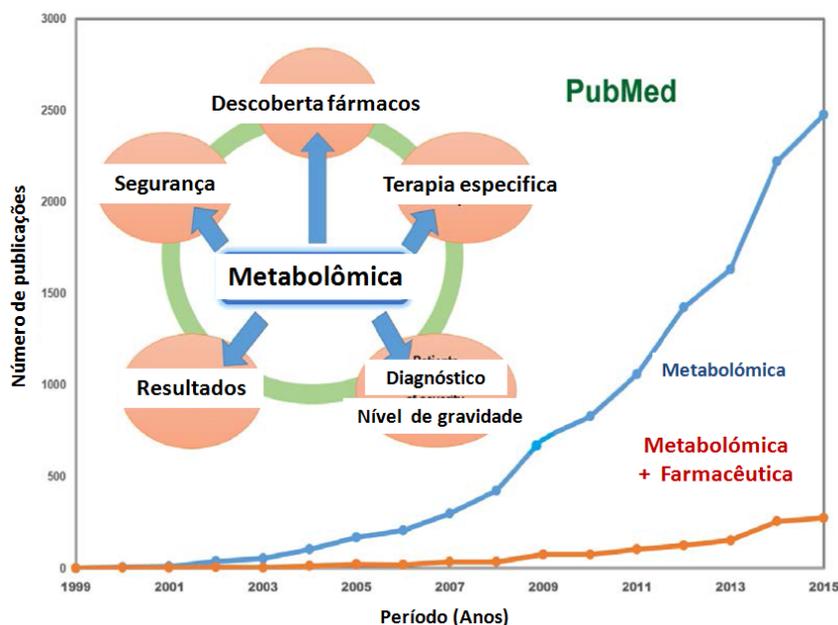


Figura 2 – Número de publicações envolvendo metabolômica em diferentes áreas e da sua associação com a área Farmacêutica, durante o período de 1999 a 2015. Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Metabolômica também é utilizada para estudar perturbações causadas por doenças, pelo uso de medicamentos ou por intervenções nutricionais. Aplicações da metabolômica

em pesquisas na área de Nutrição têm aumentado e envolvem a descoberta de novos biomarcadores da alimentação dietética (BRENNAN, 2013).

Para a obtenção de perfis metabólicos a partir de amostras complexas de fluidos biológicos, extratos vegetais, animais ou microrganismos, é necessário empregar técnicas analíticas e espectroscópicas de identificação e quantificação dos metabólitos secundários presentes em amostras que revelem características bioquímicas do organismo de origem.

Desde os seus primórdios, várias dessas técnicas têm sido empregadas nos estudos de metabolômica, como por exemplo, a espectrometria de massas com ionização branda [*Soft Ionization Mass Spectrometry* (SIMS)] (GREEF, 1986), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) (TANAKA *et al.*, 1988) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (NICHOLSON *et al.*, 1983). Neste contexto, perfis metabólicos são estabelecidos de acordo com o resultado de sinais cromatográficos ou espectroscópicos representativos da amostra em análise.

Segundo Nicholson a espectroscopia de RMN é uma técnica muito sofisticada mas que apresenta alta seletividade, porém baixa sensibilidade (NICHOLSON *et al.*, 1983). Por outro lado, a CG-EM, que também envolve uma instrumentação sofisticada, proporciona simultaneamente uma alta seletividade e sensibilidade (LEI *et al.*, 2011; ABDELNUR, 2011; FUNARI *et al.*, 2013). Utilizando CG-EM é possível realizar estudos de sistemas bioquímicos e fisiológicos, envolvendo a identificação e quantificação de metabólitos que caracterizem estudos de metabolômica (vide figura 3).

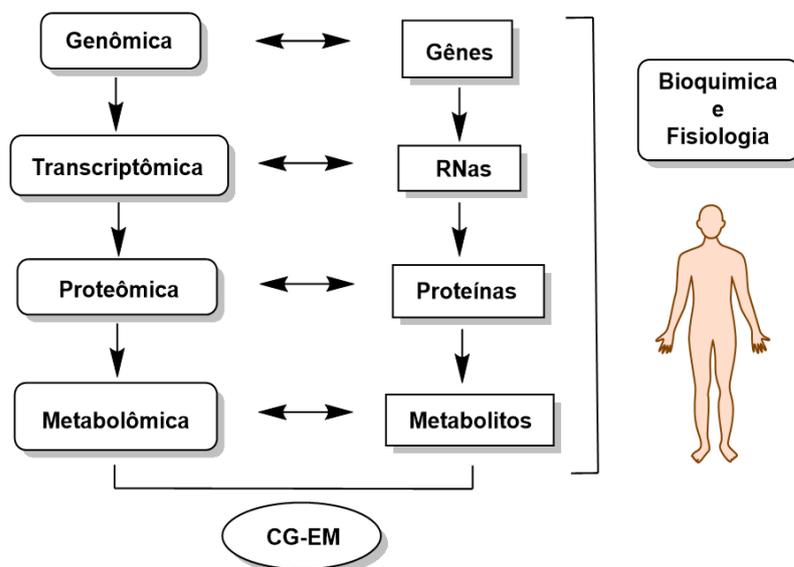


Figura 3 – Sistemas biológicos e utilização de CG-EM na determinação de metabólitos em estudos de metabolômica. Fonte: adaptado de <<https://scielo.conicyt.cl>>

## 3 Cromatografia Gasosa

Entre os métodos de análise de misturas a cromatografia ocupa um lugar de destaque graças a sua versatilidade para efetuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas. A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura. Ela é constituída de uma fase móvel e outra estacionária. A fase móvel é utilizada para transportar a amostra sobre a fase estacionária, de modo que graças às diferentes propriedades dos componentes da mistura elas são separadas (COLLINS *et al.*, 2006).

Os termos “cromatografia”, “cromatograma” e “método cromatográfico” são atribuídos ao botânico russo Mikhael Semenovich Tswett, que, em 1906, os utilizou na descrição de dois trabalhos relacionados à separação de componentes de extratos de folhas. A expressão cromatografia deriva das palavras gregas *chrom* (cor) e *graphie* (escrever), embora tenha explicado que o processo não depende da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes separados. Ele percebeu que, quando um pingo de tinta caía no papel, sendo esta uma mistura de pigmentos com o solvente, à medida que esse solvente ia passando pelo papel ocorria a formação de halos com diferentes nuances de cores. Posteriormente, num tubo de vidro contendo carbonato de cálcio, Tswett colocou o pigmento da planta e passou éter de petróleo resultando na separação de substâncias de diferentes cores, o que ocorreu em função da polaridade de cada uma delas (vide figura 4). Este pesquisador concluiu que cores diferentes correspondiam a diferentes componentes da mistura e denominou o resultado obtido como um cromatograma (GREEF, 1986).

O trabalho de Tswett constitui a base dos atuais métodos de separação de substâncias, que envolvem a cromatografia preparativa e a cromatografia analítica. A cromatografia preparativa tem como objetivo separar as frações de misturas em colunas grandes e a analítica além de separar possibilita a identificação e quantificação de compostos específicos (GROB; BARRY, 1995; COLLINS *et al.*, 2006; SKOOG, 2006). A cromatografia gasosa tem mais de 45 anos de existência, tendo provado ser, a técnica mais importante da química analítica instrumental.

Atualmente, dependendo do método cromatográfico utilizado é possível efetuar a análise de dezenas de constituintes de uma mesma amostra com a obtenção de resultados quantitativos em concentrações que variam de picogramas a miligramas (Tabela 1).

### 3.1 Características da cromatografia a gás

Os processos cromatográficos consistem na separação de solutos baseado na migração diferencial através de um meio sólido poroso causado pelo fluxo de um solvente. A cro-

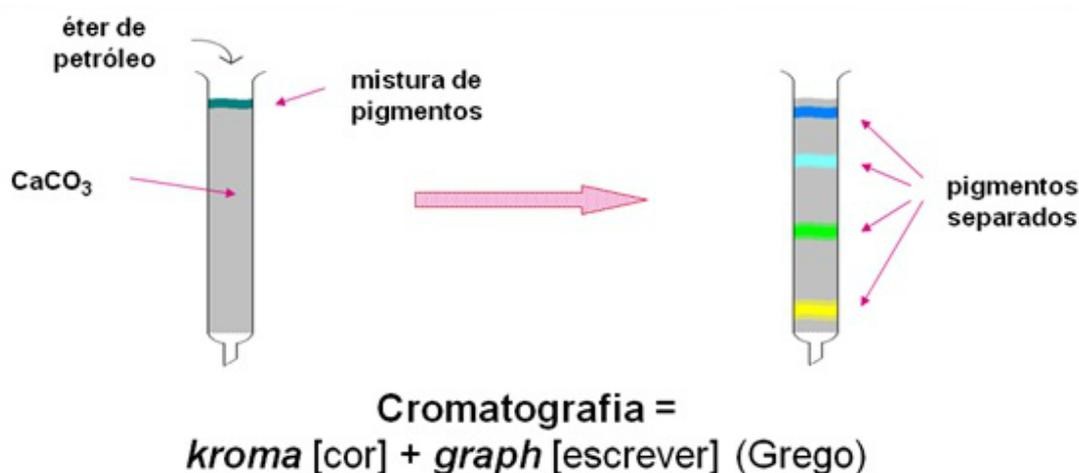


Figura 4 – Esquema do processo de separação desenvolvido por Mikchael Semenovich Tswett em 1906. Fonte: adaptado de <<http://slideplayer.com.br>>

Tabela 1 – Faixa de concentração utilizada nos diversos tipos de cromatografia

Cromatografia	Concentração do soluto
Em coluna (CC)	Gramas ( <i>g</i> ) a miligramas ( <i>mg</i> )
Em camada delgada de sílica gel (CCD)	Microgramas ( $\mu g$ )
Em papel (CP)	Microgramas ( $\mu g$ )
Gasosa (CG)	Nanogramas ( $\eta g$ )

matografia a gás é uma técnica de separação de misturas onde a fase móvel é constituída por um gás de arraste inerte, enquanto que a fase estacionária pode ser composta de um líquido fixado em um sólido, cromatografia gás-líquido (CGL) ou uma mistura de sólidos, cromatografia gás-sólido (CGS) (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação da cromatografia de acordo com suas fases

Fase móvel	Fase estacionária	Cromatografia	Sigla
Gás	Sólido	Gás-sólido	CGS
Gás	Líquido	Gás-líquido	CGL
Líquido	Sólido	Líquido-sólido	CLS
Líquido	Líquido	Líquido-Líquido	CLL

FE = sólido (Adsorção), líquido (Partição)

O sólido na CGS é geralmente alumínio, sílica-gel, carvão ou filtro molecular e a adsorção seletiva nestes sólidos permite a separação de certos gases e hidrocarbonetos de baixo peso molecular. Através deste método, gases ou substâncias volatilizáveis são separados de acordo com a distribuição diferencial das substâncias da amostra entre as fases. A CGL é a mais utilizada daí dar-se maior ênfase em seu estudo (KAR, 2005).

Comparando com os demais tipos de cromatografia, a CG possui excelente poder de se-

paração ou resolução de constituintes de uma mistura, possibilitando a análise de dezenas de substâncias presentes na amostra. Também possui um grau elevado de sensibilidade na detecção dos componentes permitindo o estudo de substâncias em concentrações da ordem de nanogramas. Essa característica faz com que haja necessidade de apenas pequenas quantidades de amostra, o que, em certos casos, é um fator crítico e limita a utilização de outras técnicas. É uma técnica muito sensível, chegando a detectar uma quantidade de cerca de  $10^{-12}$  g, o que exige utilização de pequenas quantidades de amostras. De acordo com a quantidade de amostra utilizada em cromatografia gasosa, existe a possibilidade de utilizá-la como técnica preparativa, apenas na faixa de microgramas ( $10^{-6}$ ) a miligramas ( $10^{-3}$ ) (SKOOG, 2006; COLLINS *et al.*, 2006).

Através deste método, gases ou substâncias volatilizáveis são separados de acordo com a distribuição diferencial de seus componentes fase móvel (FM), que é um gás de arraste inerte e a fase estacionária (FE) é composta de um líquido ou um sólido (vide figura 5) (SKOOG, 2006).

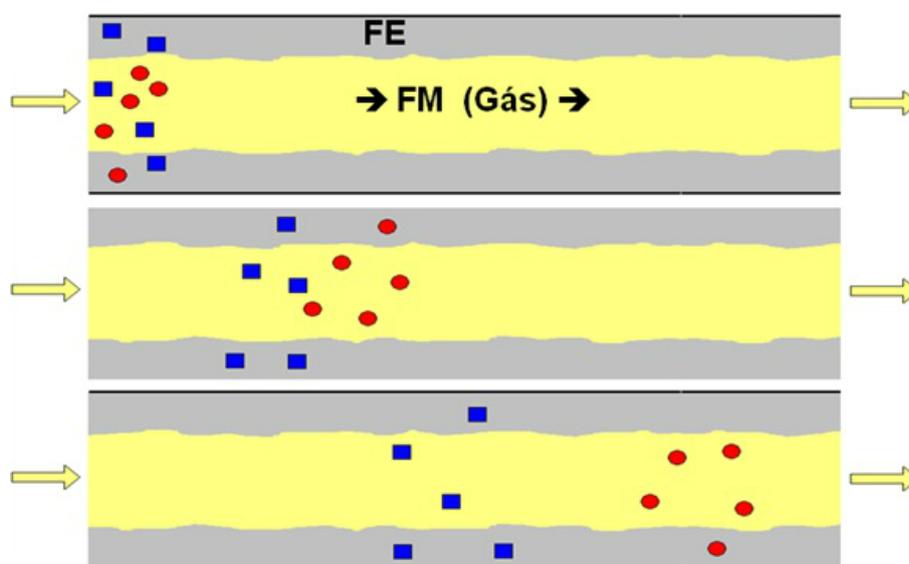


Figura 5 – Esquema de separação por migração diferencial de constituintes de uma mistura, entre a fase estacionária (FE) líquida, revestindo a parede de um tubo capilar, e a fase móvel (FM) gasosa. Fonte: <<https://upload.wikimedia.org>>

A CG também apresenta algumas limitações. Para serem analisadas as substâncias devem ser voláteis e termicamente estáveis, caso contrário, é necessário formar um derivado com essas características, o que nem sempre é viável. Em alguns casos, existe a necessidade de preparação da amostra antes dela ser analisada, para evitar interferências e contaminação da coluna cromatográfica. Essa etapa pode ser demorada e complexa e isso leva a um aumento de custo e tempo de análise. Além disso, a CG muitas vezes necessita de técnicas auxiliares para a identificação segura das substâncias presentes na amostra (GROB; BARRY, 1995).

A separação da amostra ocorre por eluição da seguinte forma: através de um sistema de injeção, a amostra é introduzida em uma coluna contendo a FE; por meio de uma corrente contínua de gás, que a arrasta após a vaporização, a amostra terá seus componentes introduzidos na coluna cromatográfica (vide figura 5). A vaporização acontece sob temperaturas adequadas no local de injeção das amostras, bem como na coluna. Desta forma, de acordo com as propriedades dos diferentes componentes da amostra em relação às da FE, constituintes vão sendo retidos por tempos determinados, chegando à saída da coluna em tempos diferentes (CIOLA, 1985). Logo após saírem da coluna, cada constituinte passa por um detector adequado, que emite um sinal para um registrador, gerando um gráfico denominado cromatograma. Um cromatograma ideal deve apresentar picos separados e simétricos. Contudo, pode ocorrer sobreposição parcial dos picos, devido a uma separação deficiente de constituintes na coluna. Para se obter a concentração de um constituinte da amostra deve-se obter a área do pico relacionado a ele, de tal modo: (CIOLA, 1985; COLLINS *et al.*, 2006)

$$A = \frac{1}{2}(a \times Wb) \quad A(\%) = \frac{1}{2}(A \times Wb) \quad (3.1)$$

onde,

**A:** área do pico

**a:** altura do pico

**Wb:** largura do pico na linha da base

Através da análise do cromatograma é possível detectar e quantificar diversos componentes da amostra. A identificação de um composto é feita comparando-se o tempo ou o volume de retenção de um padrão com o da amostra. Esta comparação não é conclusiva, pois numa análise qualitativa duas substâncias podem ter o mesmo tempo de retenção, dependendo das condições da análise (GREEF, 1986).

O melhor método a ser utilizado é comparar o tempo de retenção ajustado de uma amostra em relação ao tempo de retenção de um padrão com o tempo de retenção de um composto conhecido e relacioná-lo com este mesmo padrão (GROB; BARRY, 1995).

Uma análise qualitativa torna-se mais sofisticada se o cromatógrafo estiver acoplado a outros equipamentos, como, por exemplo, a um espectrômetro de massas. Isso possibilita que o composto seja identificado com mais precisão e em nível de microgramas. Este tipo de método, denominado hifenado, em geral não proporciona uma identificação adequada de alguns isômeros (PENG *et al.*, 2003).

Para evitar erros, em toda análise quantitativa deve-se tomar cuidado em todas as etapas, ou seja, desde o preparo da amostra até a sua análise. A amostra a ser analisada deve ser representativa do todo; devem-se evitar perdas e contaminações durante seu preparo. A etapa de separação dos componentes da amostra no cromatógrafo também

constitui uma fonte de erros, tais como: adsorção irreversível por parte da amostra na fase estacionária ou suporte; resposta do detector afetada por alterações de temperatura e vazão; quantidade de amostra injetada fora da faixa linear do detector e outros parâmetros (CIOLA, 1985; LANÇAS, 1993; SKOOG, 2006; COLLINS *et al.*, 2006).

O emprego de colunas capilares tornou o processo de cromatografia a gás mais eficiente para a separação de constituintes. Atualmente, devido aos avanços na área de computação e o desenvolvimento de novos dispositivos para a introdução da amostra e detecção de seus constituintes, a CG tornou-se a melhor ferramenta analítica para a análise de compostos voláteis e de não-voláteis que possam ser transformados em um derivado volátil (PENG *et al.*, 2003; LANÇAS, 1993).

## 3.2 Aparelhagem utilizada em cromatografia gasosa

Todo cromatógrafo a gás é basicamente constituído de cilindro(s) contendo o gás(es) de arraste, controlador de vazão e regulador de pressão, injetor com termostato para inserção da amostra, coluna cromatográfica dentro do forno para controle de temperatura, sistema de detecção termostato, registrador, amplificador de sinal, programa para processamento dos dados e geração do cromatograma (vide figura 6).

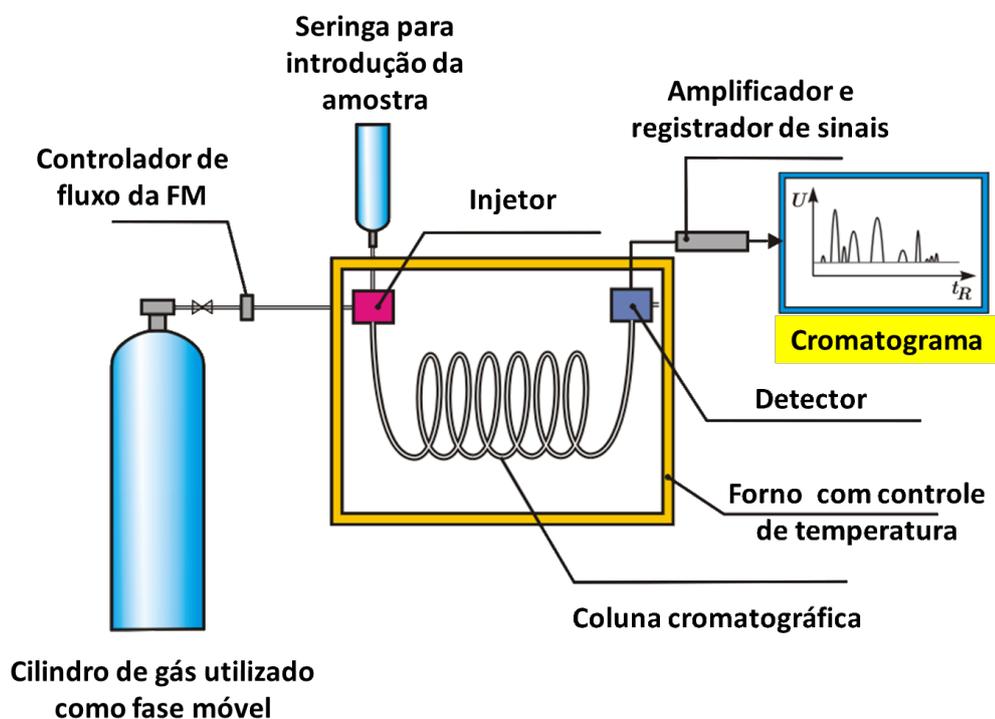


Figura 6 – Esquema de um cromatógrafo a gás. Fonte: <<https://lidiakonlaquimica.wordpress.com>>

### 3.2.1 Reservatório de gás(es)

Um ou mais cilindros contendo gás sob alta pressão, sendo que um deles serve como transportador (FM), que levará as substâncias presentes na amostra para fora da coluna quando elas não estiverem interagindo com a FE. Os gases mais utilizados como fases móveis são nitrogênio, argônio, hélio e hidrogênio. O gás deverá ser adequado ao tipo do detector empregado e também ser inerte e de alto grau de pureza. A presença de impurezas no gás de arraste afeta as propriedades da coluna, a estabilidade e a resposta dos detectores (CIOLA, 1985; LANÇAS, 1993; SKOOG, 2006; COLLINS *et al.*, 2006).

### 3.2.2 Reguladores de pressão e válvulas de controle de fluxo

São utilizados para se obter um fluxo uniforme de gás. Por meio dos reguladores de pressão efetua-se um controle manual do fluxo de gás para manter constante a pressão na entrada do sistema cromatográfico. A faixa de fluxo mais utilizada é de 25 a 125 mL de gás por minuto. O fluxo ideal necessário para uma boa resolução da amostra é obtido variando-se gradativamente a velocidade e mantendo os demais parâmetros com valores constantes (LEI *et al.*, 2011).

### 3.2.3 Sistema de injeção da amostra

As amostras são aplicadas por meio de seringas especiais para gases, líquidos e sólidos dissolvidos em um líquido. A injeção de gases é comumente feita através de uma seringa ou de válvulas. Pode ser utilizado também injeção de gases em solução. A injeção de líquidos é feita utilizando-se microseringas e, mais raramente válvulas. Substâncias sólidas geralmente são dissolvidas em solventes adequados e analisadas sob a forma de solução. Essas injeções são feitas introduzindo-se a agulha através de um septo feito de silicone e/ou politetrafluoretileno (PTFE) (LANÇAS, 1993).

A quantidade de amostra injetada não deve ultrapassar a capacidade da coluna, determinada pela quantidade de fase estacionária. A eficiência de uma coluna é influenciada pela quantidade de amostra injetada, se o volume injetado for menor a eficiência da coluna será maior. O volume da amostra a ser injetado (capacidade da coluna) depende do volume da fase líquida e das dimensões da coluna (GROB; BARRY, 1995).

### 3.2.4 Coluna cromatográfica e forno da coluna

A coluna cromatográfica é um tubo longo que contém a fase estacionária. Pode ser feita de cobre, aço inoxidável, alumínio, vidro, sílica fundida, politetrafluoretileno (Teflon ou PTFE) e outros. O material da coluna não deve interagir com a FE e nem com os componentes da amostra. Os tipos de colunas cromatográficas são classificadas em

recheadas (analíticas e preparativas) e capilares (analíticas) (CIOLA, 1985; LANÇAS, 1993; SKOOG, 2006; COLLINS *et al.*, 2006).

**Colunas recheadas:** São de aço inox ou vidro. O vidro pode reagir com grupos silanol, provocando o alargamento dos picos; isso é evitado sinalizando-se a coluna antes de seu enchimento. As colunas recheadas analíticas possuem diâmetro interno de cerca de 1 a 4mm e comprimento de 1 a 3m (geralmente as medidas são dadas em pés ou polegadas). As colunas recheadas preparativas apresentam diâmetro interno de cerca de 5 a 100mm, o que possibilita a injeção de mais amostra (GROB; BARRY, 1995; COLLINS *et al.*, 2006).

**Colunas capilares:** Têm diâmetro interno variando de 0,15 a 0,75mm e comprimento de 10 a 100m. Podem ser de níquel, aço inox ou vidro. São preferidas as colunas capilares de sílica fundida, porque este material é altamente inerte e flexível. Estas colunas podem ser dos tipos (vide figura 7). **Wcot:** Parede interna recoberta com um filme da fase estacionária; **Plot:** Parede interna recoberta com uma camada adsorvente ou própria fase estacionária, dando assim uma porosidade ao capilar; **Scot:** Parede interna recoberta com uma camada adsorvente recoberta com a fase estacionária líquida (GROB; BARRY, 1995; COLLINS *et al.*, 2006).

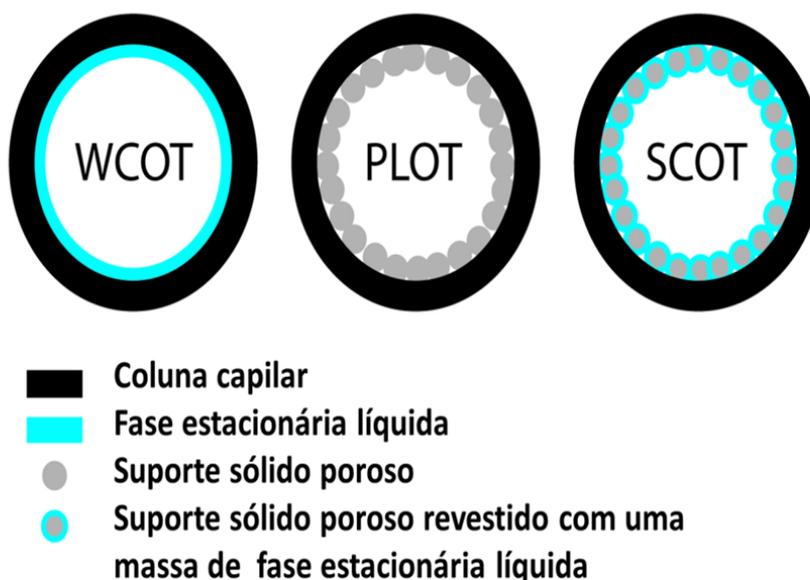


Figura 7 – Esquema de colunas capilares tubulares abertas, utilizadas em cromatografia gasosa, com parede revestida = WCOT (*Wall Coated Open Tubular*), porosa = PLOT (*Porous layer open tubular column*) ou com suporte revestido = SCOT (*Support-coated*). Fonte: <<http://community.asdlib.org>>

De acordo com o aparelho, as colunas variam de formato, mas na maioria das vezes elas são espirais, com a finalidade de ocuparem um menor espaço. O tipo de análise a ser feita é que determina o diâmetro, comprimento, o material do tubo utilizado como suporte, o tipo de FE e FM e a temperatura da coluna a serem utilizados (Tabela 3) (GROB; BARRY, 1995; CIOLA, 1985).

Tabela 3 – Dimensões e vazões mais empregadas em colunas de CG

Colunas CG	Recheadas	Capilares
Diâmetro interno ( $mm$ )	2 a 4	0.1 a 0.5
Comprimento ( $m$ )	1 a 8	10, 25, 50, 100
Material do tubo	Inox, vidro, alumínio	Sílica fundida
FE (%)	0.5 a 35 ( $10 \pm 1$ )	Filme: 0.1 a $5 \mu m$
FM (vazão em $mL \times min^{-1}$ )	25 a 60	0.5 a 1.0
Temperatura de operação ( $^{\circ}C$ )	25 a 350	25 a 250

A eficiência da coluna aumenta com o aumento do comprimento e a diminuição do seu diâmetro interno. Essa eficiência é medida em termos de número de “pratos teóricos”. Um prato teórico corresponde a uma etapa de equilíbrio entre o analito, a fase móvel e a fase estacionária (CIOLA, 1985; LANÇAS, 1993; SKOOG, 2006; COLLINS *et al.*, 2006). Quanto maior for o número de pratos teóricos, maior será a eficiência do processo e os picos gerados serão mais simétricos. O número de pratos teóricos é definido por:

$$N = 16 \left( \frac{d_R}{w_b} \right)^2 \quad (3.2)$$

onde,

$N$ : número de pratos teóricos

$d_R$ : distância de retenção

$w_b$ : largura do pico na linha da base

Devido à pequena espessura das colunas capilares, obteve-se um aumento significativo no número de pratos teóricos (equilíbrio entre a fase estacionária e a fase móvel), pois a pressão é muito menor do que as utilizadas em colunas recheadas. Conseqüentemente, o comprimento da coluna torna-se maior. Além disso, com colunas capilares ocorre a eliminação do alargamento de bandas devido a irregularidades do enchimento, e obtém-se análises mais rápidas, mesmo em temperaturas baixas (GROB; BARRY, 1995).

Existem vários fatores que afetam a eficiência de uma coluna, tais como o comprimento, diâmetro interno, temperatura, vazão da fase móvel, volume de amostra, técnica da injeção, características das substâncias, e outros fatores. A altura de prato teórico (H)

é utilizada para comparar duas colunas de comprimentos diferentes e é determinada pela equação:

$$H = \frac{L}{N} \quad (3.3)$$

onde  $L$  é o comprimento da coluna cromatográfica.

O conhecimento de fatores que aumentam ou diminuem a eficiência de uma coluna são utilizados para se obter uma melhor separação dos constituintes de uma amostra. Em altas temperaturas a FE sofre reações em contato com a superfície do capilar, formando produtos que são arrastados para fora da coluna causando uma instabilidade da linha da base, originando mudanças nas características de retenção. Nas colunas preparativas a injeção de amostra é feita em maior quantidade que em colunas analíticas. Em colunas capilares, a amostra injetada é dividida fazendo com que apenas uma pequena porção dela entre na coluna (COLLINS *et al.*, 2006; CIOLA, 1985).

### 3.2.5 Detector

Detectores são dispositivos que transformam em sinais elétricos as variações na composição do gás de arraste (vide figura 6). Os componentes da amostra que são separados na coluna chegam ao sistema de detecção alterando a constituição do gás de arraste. Um bom detector deve ser altamente sensível, mostrando uma resposta linear a uma ampla faixa de concentrações e relativamente insensível às variações de fluxo e de temperatura. Deve-se eleger um detector mais adequado ao tipo de análise a ser realizada. Existem dezenas de detectores utilizados em CG, sendo que quatro deles são os mais utilizados para analisar a maioria dos compostos de interesse na área de Farmácia e de Química Analítica (Figura 8) (SKOOG, 2006).

### 3.2.6 Detector de condutividade térmica (DTC)

O DCT é utilizado em análises de compostos orgânicos, inorgânicos, derivados de petróleo e outros compostos orgânicos. Consiste em duas células de metal idênticas contendo um filamento de tungstênio, níquel ou platina que são aquecidos por corrente elétrica. À medida que o gás passa pelos filamentos há transferência de calor, o tempo da passagem do gás, mais a condutividade térmica são registrados, efetuando-se assim a análise. Esta análise é feita comparando-se o gás de arraste puro (que passa por um conjunto de filamentos) com o gás de arraste juntamente com a amostra (que passa por outro conjunto de filamentos) (SKOOG, 2006; GROB; BARRY, 1995).

Quando um gás puro atinge ambas as células, as temperaturas se igualam e o detector é balanceado. Um gás com baixa condutividade térmica atingindo uma célula gera uma diferença que é detectada e registrada (LANÇAS, 1993).

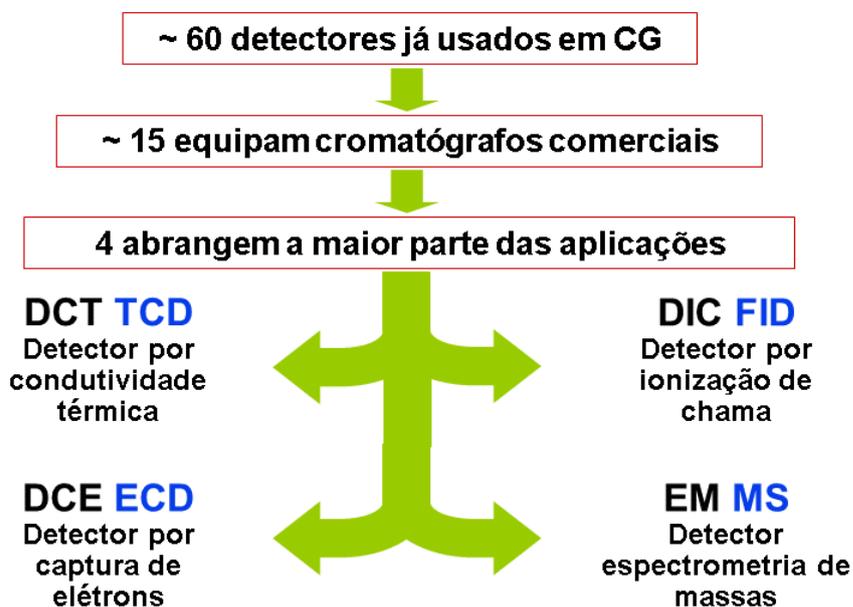


Figura 8 – Os quatro principais tipos de detectores utilizados em CG. TCD = *Thermal conductivity detector*, FID = *Flame ionization detector*, ECD = *Electron capture detector*, MS = *Mass spectrometer detector*. Fonte: adaptado de <<http://slideplayer.com.br>>

### 3.2.7 Detector por ionização em chama (DIC)

O DIC é utilizado exclusivamente para análises de compostos orgânicos, ou seja que possuem átomos de carbono e de hidrogênio. Os componentes no efluente da coluna são ionizados através de queima numa chama de hidrogênio-ar (ou oxigênio para aumentar a sensibilidade) e os íons formados são coletados por um eletrodo. Quando um gás puro sofre combustão, poucos íons são formados e a corrente elétrica é pequena. A combustão dos compostos orgânicos aumenta a condutividade e a corrente resultante é potencialmente detectada, amplificada e registrada (COLLINS *et al.*, 2006; LANÇAS, 1993) Outros tipos de detectores são:

**Detector termiônico (DT):** Detectores termoiônicos são mais adequados para a análises de sais de metais alcalinos pelo plasma gerado através da aplicação de um potencial elétrico num fluxo de ar e hidrogênio. O sal é colocado entre o queimador e o eletrodo coletor que captura os íons formados, gerando uma corrente elétrica. Esse detector é utilizado em análises ambientais e biomédicas para a determinação de pesticidas e fármacos (PRESTES *et al.*, 2009; GREEF, 1986).

**Detector por captura de elétrons (DCE):** O DCE é um detector seletivo que oferece boa resposta para compostos halogenados, aldeídos conjugados, nitrilas, nitratos e organometálicos. Praticamente não apresenta sensibilidade para hidrocarbonetos, alcoóis e cetonas. É usado principalmente na detecção de pesticidas, herbicidas e drogas devido a essa resposta seletiva a haletos (GREEF, 1986). O gás de arraste é ionizado por partículas beta em corrente constante. O gás de arraste com a amostra é comparado com o gás de arraste puro, que é chamado de corrente de fundo. Quanto maior o valor da corrente de fundo, maior é a sensibilidade do detector. A diminuição deste valor (inferior à faixa mínima) é sinal de impureza, vazamento da fonte, sujeira ou coluna mal condicionada. O gás de arraste usado é o  $N_2$ , livre de  $H_2$  e  $O_2$  (SKOOG, 2006).

**Espectrômetro de massas (EM):** é ajustável a diferentes espécies e é um dos detectores mais eficientes para a CG. A combinação da cromatografia a gás e espectrometria de massas é denominada CG-EM. Um espectrômetro de massas mede a razão massa/carga ( $m/z$ ) de íons que são gerados pela amostra, o espectrômetro faz uma varredura repetida das massas durante a determinação (PRESTES *et al.*, 2009; PENG *et al.*, 2003). No espectrômetro de massas, a amostra é ionizada por uma fonte de ionização que quebra as ligações químicas da amostra, mas sem decompô-la em seus átomos constituintes. A fonte de ionização então produz fragmentos que podem ser ionizados e que são extraídos da fonte de ionização por uma bomba de vácuo que produz baixa pressão. Essa fragmentação leva a uma interpretação difícil de espectros da mistura e por isso as amostras de espectrometria de massas devem ser puras (PRESTES *et al.*, 2009; TANAKA *et al.*, 1988). Os componentes da amostra são separados pela CG antes de serem introduzidos no espectrômetro de massas, por isso a CG é considerada uma forma ideal de introdução de misturas. As moléculas de gás presentes são então fragmentadas, ionizadas, detectadas e analisadas (CIOLA, 1985; LANÇAS, 1993; SKOOG, 2006; COLLINS *et al.*, 2006).

### 3.2.8 Amplificador de sinal e registrador

O sinal gerado por um detector é de baixa intensidade, por isso sofre uma amplificação antes de ser transmitido para o registrador. Os sinais amplificados são processados por computadores e transformados em registro gráfico, denominado cromatograma. Os cromatogramas são registrados correlacionando as intensidades do sinal com o tempo de retenção de cada um dos componentes da amostra e as áreas ou alturas de cada pico possibilitam que sejam feitos os cálculos de concentração (GREEF, 1986).

### 3.2.9 Controle de temperatura da coluna, injetor e detector

As temperaturas do injetor, da coluna e do detector devem ser controladas. Na maioria das vezes o injetor é aquecido a uma temperatura elevada suficiente para vaporizar a amostra, porém ela não deve ser alta a ponto de decompor a amostra injetada. A temperatura da coluna também é um fator importante e que é levado em consideração. É desejável que se programe a temperatura de acordo com a faixa de ponto de ebulição da amostra a medida em que a separação ocorre. Dessa maneira é possível obter uma melhor resolução do cromatograma mesmo se o tempo para que se complete a análise for estendido. A temperatura deve ser suficientemente alta para que não haja condensação da amostra mas isto é feito dentro dos limites do detector (COLLINS *et al.*, 2006; GROB; BARRY, 1995).

## 3.3 Análises qualitativas e quantitativas na determinação de metabólitos

Cromatogramas obtidos por CG são utilizados para determinar a pureza de compostos orgânicos, onde contaminantes são determinados pela presença de picos adicionais. Na determinação qualitativa o tempo de retenção de cada substância é comparado com o de um padrão utilizado como referencial para a identificação dos componentes da mistura (LANÇAS, 1993). Porém, pode ocorrer algumas variações neste tempo em função dos fatores limitantes da técnica. Essas limitações podem ser contornadas por meio de técnicas hífenadas, ou seja, quando colunas são acopladas a espectrômetros de ultravioleta, infravermelho ou de massas que constituem ferramentas complementares, importantes para a identificação de misturas complexas (GREEF, 1986; PENG *et al.*, 2003).

Pode ocorrer também alguma falha na geração de um pico com o mesmo tempo de retenção que o padrão sob as mesmas condições de trabalho. Isto é uma evidência de que o composto está ausente ou que esteja em concentrações abaixo do limite de detecção daquele procedimento (SKOOG, 2006).

As informações quantitativas sobre as espécies identificadas são obtidas ao se comparar a altura ou a área de um pico com os padrões. Esses dois parâmetros variam linearmente com as concentrações se as condições de trabalho forem devidamente controladas. Portanto a área do pico é um parâmetro analítico mais confiável do que a altura apesar de a altura ser medida de forma mais fácil. A medida da área relativa é fornecida por computadores que são acoplados ou pode ser feita também uma estimativa manual (CIOLA, 1985).

Análises quantitativas são feitas baseadas em um gráfico que é gerado pelo método do padrão externo. Esse método envolve a preparação de soluções padrão em que a composição dessas soluções se aproxima da amostra. Os cromatogramas gerados para

esse padrão por meio de injeções deste em concentrações crescentes são utilizados para a construção de uma curva analítica. O método de calibração com padrões é o mais direto em análises cromatográficas gasosas quantitativas (SKOOG, 2006).

### 3.4 Aplicação da CG em estudos de metabolômica

Estudos de metabolômica utilizando cromatografia gasosa CG envolvem um planejamento experimental bem elaborado, obtenção de amostras representativas, o tratamento laboratorial das amostras coletadas, a aquisição de dados seguida de tratamento e processamentos estatísticos adequados (vide figura 9). Por meio dos resultados obtidos são estabelecidas conclusões que servem de orientação para medidas futuras (JENSEN *et al.*, 1995).

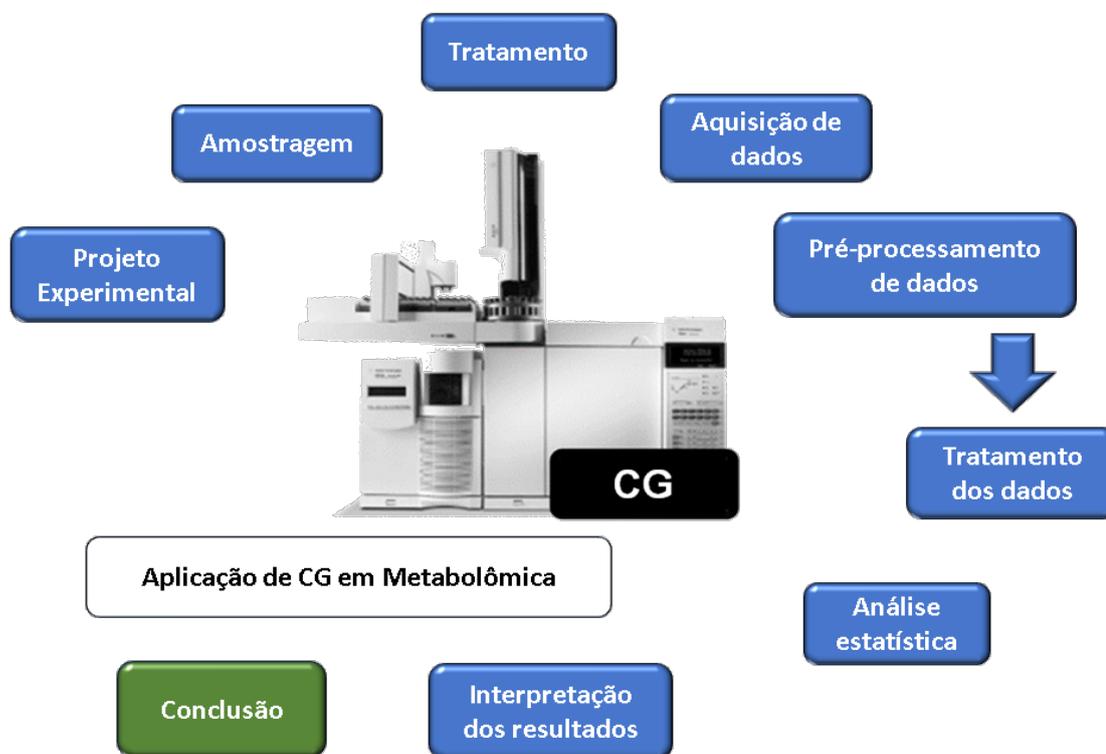


Figura 9 – Esquema simplificado de metodologia utilizada em estudos de metabolômica aplicando cromatografia gasosa (CG). Fonte: <<http://www.cipf.es>>

## 4 Cromatografia Gasosa em Metabolômica

Atualmente a cromatografia gasosa é umas das técnicas analíticas de maior uso. É utilizada para a separação e quantificação de produtos diversos, sendo adotada como técnica de identificação, em casos especiais, principalmente quando acoplada um espectrômetro de massas (CG-EM). Os recentes avanços na área de utilização de colunas capilares fazem da CG uma técnica altamente atrativa. Assim, a CG está sendo utilizada em diferentes áreas, como em análise ambiental, nas indústrias petroquímicas, químicas e farmacêuticas, na análise de alimentos, na medicina, em diferentes tipos de pesquisas e outras (vide figura 10).

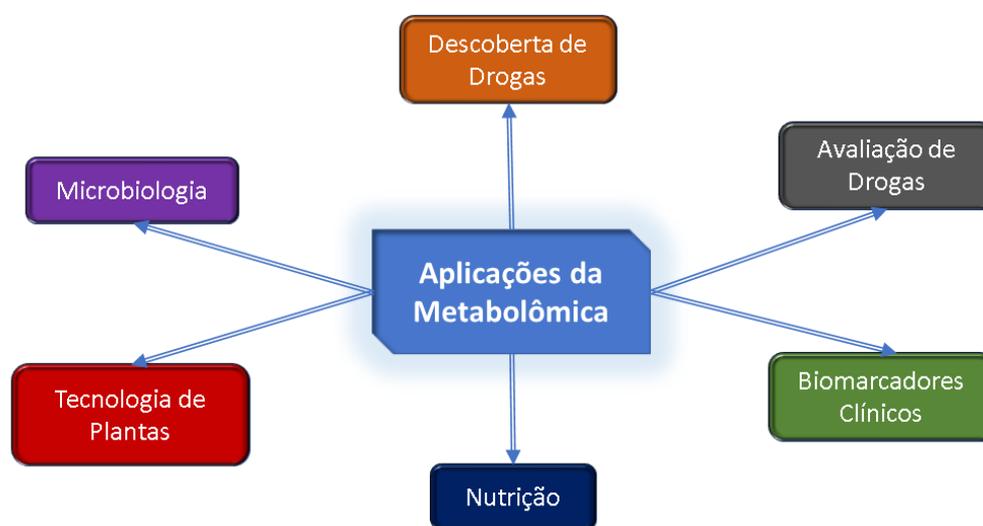


Figura 10 – Aplicações da CG em metabolômica utilizada em estudos envolvendo diferentes áreas. Fonte: adaptado de <<http://www.sebbm.es>>

As aplicações da metabolômica têm expandido e isso pode gerar impacto futuro. Através de técnicas de separação e identificação é possível obter análises de vias metabólicas de diversos organismos (ABDELNUR, 2011). Em clínicas de reprodução assistida, por exemplo, o principal objetivo é obter o maior número de tratamentos que possibilitem filhos saudáveis e gestações seguras para as mães. Nesses casos a ocorrência de gestações múltiplas com riscos à saúde é recorrente, uma vez que isto pode desencadear partos prematuros, os bebês podem apresentar baixo peso ao nascer, portanto deseja-se melhorar o processo de seleção embrionária (PINZON, 2009).

Antes da implantação do embrião avalia-se a viabilidade, a saúde e integridade do feto na evolução de uma gestação. O que tem sido usado para essa avaliação são procedimentos diagnósticos invasivos e limitantes, como seleção genética obtida por meio da extração de blastômeros, critérios morfológicos observados ao microscópio óptico, mas que também

não permite uma avaliação mais profunda. Daí surge a necessidade de um método pré-implantacional não invasivo e que aumente a precisão dos critérios de avaliação para a implantação do embrião (PINZON, 2009).

A metabolômica surge como uma resposta para necessidades dessa natureza porque possibilita observar o comportamento metabólico do embrião. É possível avaliar o consumo e utilização de nutrientes pelo blastocisto e o produto gerado pelo metabolismo, tais como carboidratos, aminoácidos, amônio, oxigênio e compostos voláteis expelidos pela respiração. A avaliação simultânea do consumo e produção de metabólitos permite avaliar também se ocorreu algum dano no processo de congelamento do embrião ou ocorreram alterações na integridade de membranas (PINZON, 2009).

O processo analítico mais utilizado para a quantificação de compostos presentes em amostras biológicas é a espectrometria de massas por ser mais rápida, sensível, precisa e mais específica. Como a espectrometria de massas possui a propriedade de detectar massas este método é de grande utilidade para o estudo de metabolismo e suas desordens e ainda pode ser combinado a outras técnicas como a CG (JENSEN *et al.*, 1995). A análise é desencadeada a partir da descoberta de uma questão biológica, que leva a elaboração de um projeto de pesquisas. Após a coleta e preparo das amostras busca-se separar e purificar ao máximo os metabólitos de interesse. Não sendo voláteis estes metabólitos tem de ser derivatizados para serem analisados por CG-EM. Os resultados são interpretados e as conclusões obtidas são correlacionadas com a questão biológica estudada (vide figura 11).

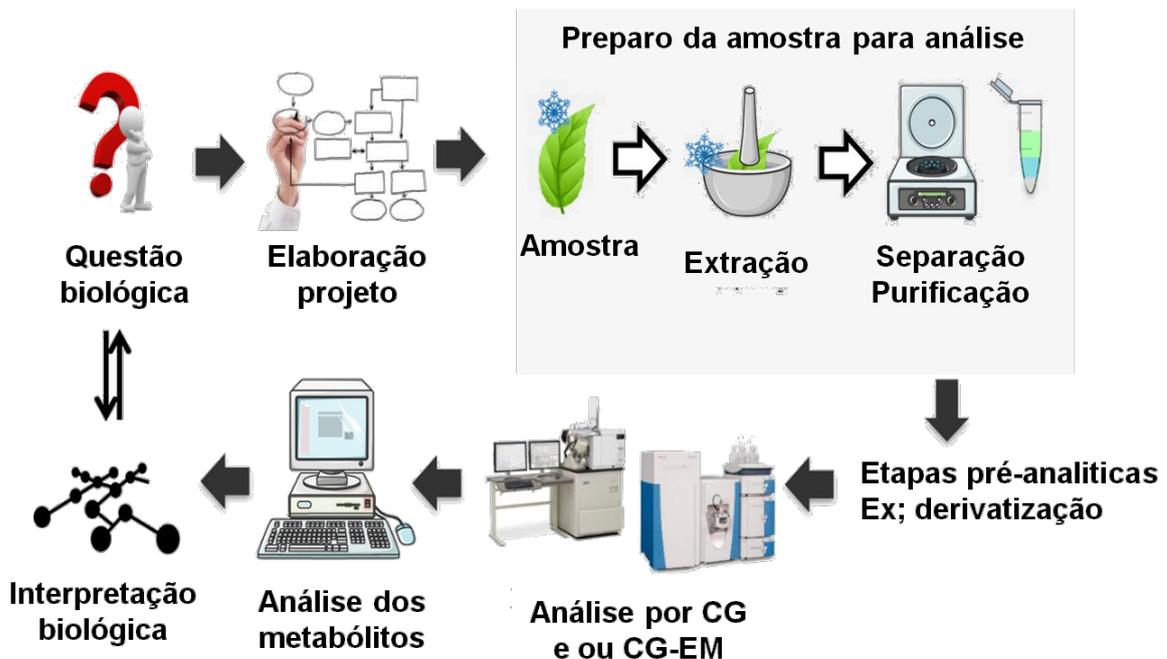


Figura 11 – Esquema simplificado de estudo de uma questão biológica envolvendo a aplicação de CG-EM

O uso da CG-EM permite também a determinação de metabólitos presentes no sangue gerados pela biotransformação de um medicamento. A área médica também encontra na CG uma ferramenta poderosa, tanto no estudo de substâncias endógenas, como no controle terapêutico de certos medicamentos ou de tóxicos em casos de intoxicação. No caso de um paciente inconsciente em que é preciso determinar a substância que causou uma intoxicação devido ao uso excessivo, é possível obter um cromatograma do plasma sanguíneo e os picos encontrados serem identificados. Quando esse extrato do plasma é submetido a uma análise por CG-EM o pico gerado no espectro de massas com uma determinada razão massa-carga ( $m/z$ ), representa uma correlação correta do íon molecular daquela substância presente no sangue, permitindo assim a sua identificação (SKOOG, 2006, pg. 916).

A busca de novos modelos moleculares a partir da biodiversidade terrestre ou marinha para o isolamento e identificação de um composto inédito ativo a partir de uma espécie ou um organismo, também é feita através do mapeamento e identificação de substâncias bioativas em quantidades mínimas de extratos (FUNARI *et al.*, 2013).

É fato que o tempo necessário para o desenvolvimento de um produto farmacêutico e outros produtos de interesse comercial é muito longo. Neste contexto, as indústrias químicas e farmacêuticas utilizam a cromatografia gasosa desde a análise da matéria prima, até a do produto acabado (KAR, 2005).

Na análise ambiental cita-se, como exemplo, a utilização de cromatografia gasosa no controle da poluição de ar, água, solos, e outros meios. Exemplos interessantes estão ligados à análise de resíduos de pesticidas, herbicidas e fungicidas, em estudos de plantas, na investigação metabólica de variedades vegetais, comparação de plantas geneticamente modificadas e também no controle de qualidade de produtos naturais de consumo humano como os fitoterápicos, suplementos alimentares e cosmeceuticos (FUNARI *et al.*, 2013).

A determinação de resíduos de pesticidas em alimentos é de grande importância tendo em vista que esses compostos oferecem risco à saúde humana, além de permanecerem no meio ambiente e tenderem a biomagnificação e bioacumulação. Essa determinação permite avaliar se a produção agrícola está em conformidade com as Boas Práticas Agrícolas para que sejam adotadas decisões regulatórias comerciais adequadas e que proporcionem maior segurança alimentar. A CG-EM é uma das principais técnicas utilizadas em análises de resíduos de pesticidas. Ela é uma técnica altamente seletiva e é particularmente utilizada na análise de amostras complexas por possibilitar a determinação de diferentes analitos (PRESTES *et al.*, 2009).

Na indústria alimentícia utiliza-se a cromatografia gasosa na análise de alguns constituintes de alimentos, como lipídeos e carboidratos. Em alguns casos, com técnicas adequadas de concentração de amostra, são detectados constituintes alimentícios em nível de traços, como exemplo, esteróides e vitaminas. A CG-EM é uma das áreas de grande avanço que auxilia e complementa uma avaliação nutrológica e que está dentro do conceito

de um Centro em Excelência e Referência em Nutrologia (CERSÓSIMO *et al.*, 2015).

É fato que o estado nutricional pode elevar a saúde de um indivíduo ou então causar doenças. A nutrologia estuda o relevante papel dos nutrientes no diagnóstico clínico, funcional, bioquímico, no tratamento farmacológico e dietético e na prevenção de nutropatias. Nesta análise procura-se integrar os processos de ingestão, absorção e metabolismo dos nutrientes, assim como a utilização, o armazenamento e a eliminação e o metabolismo nutricional individual (PENG *et al.*, 2003).

A CG-EM também é utilizada na identificação de metabólitos anormais no diagnóstico de desordens metabólicas desde recém-nascidos até adultos. Pequenas quantidades, da ordem de nano ou picomoles do substrato orgânico, presentes no plasma sanguíneo podem ser mensurados após a sua derivatização. A derivatização de aminoácidos, por exemplo, é feita através da adição de um grupo propil nas partes polares dos aminoácidos e o produto gerado é injetado no cromatógrafo (PENG *et al.*, 2003; ROSS *et al.*, 1996).

Enfim, identificar componentes em uma amostra complexa e compreender as inter-relações no organismo que o produz é um grande desafio. Pesquisas nas mais diversas áreas utilizam a cromatografia gasosa e a consideram uma excelente ferramenta de uso nos laboratórios. Na abordagem metabolômica o acesso a técnicas analíticas que sejam eficientes também se torna fundamental (FUNARI *et al.*, 2013). Essas abordagens sistêmicas no mapeamento dos metabólitos contribuem muito para o avanço tecnológico e para aumentar o impacto de pesquisas por cientistas. A biotecnologia tem o potencial de transformar a vida dos seres humanos e tem despontado como uma verdadeira oportunidade de progresso (JENSEN *et al.*, 1995).

## 5 Conclusão e perspectivas

A técnica analítica CG-EM empregada em metabolômica permite além da separação dos componentes da amostra, a identificação do perfil de metabólitos presentes no organismo e também a sua quantificação. Todo método cromatográfico apresenta limitações de uso. A principal limitação do processo de cromatografia gasosa reside no fato da necessidade do analito ser volátil ou passível de ser derivatizado, ou seja, transformado em um derivado volátil. Se a substância não apresentar estas propriedades, não tem como ser identificada e quantificada por meio deste método.

Feito o estudo da literatura científica evidenciou-se a importância de substâncias produzidas pelo metabolismo secundário. Uma compreensão do metabolismo permite identificar o comportamento fenotípico dos organismos vivos onde o metabolismo é integral à saúde e ao funcionamento apropriado. Tais substâncias possibilitam a identificação de anormalidades fisiológicas que contribuem para o diagnóstico de doenças.

A diversidade química encontrada nos milhares de metabólitos produzidos por microorganismos são recursos de grande relevância para a descoberta de novos compostos microbianos. São produzidos como vantagem competitiva no seu ambiente suprimindo o crescimento da espécie vizinha e que podem ter aplicações para o ser humano. Têm importância também na indústria alimentícia, na produção de fragâncias, fármacos, pigmentos, inseticidas, com aplicações na agricultura e indústrias farmacêuticas e cosméticas.

Dada a importância comercial do tema abordado observou-se que esses produtos despertam um grande interesse para as indústrias biotecnológicas. As ferramentas da biotecnologia permitem estudar também o metabolismo vegetal, em especial os processos regulatórios de sua biossíntese, além de outras áreas que podem ser exploradas. Os produtos gerados são de alto valor de mercado e interesse econômico com grandes projeções futuras promovendo impacto em diversos setores industriais.

# Referências

- ABDELNUR, P. *Metabolômica e espectrometria de massas*. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011., 2011. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/917736/metabolomicae-espectrometria-de-massas>> Citado 5 vezes nas páginas 12, 15, 16, 18 e 32.
- BRENNAN, L. *Metabolomics in nutrition research: current status and perspectives*. 2013. Acesso em: 10 nov. 2017. Disponível em: <<http://www.biochemsoctrans.org/content/41/2/670.article-info>>. Citado na página 18.
- CERSÓSIMO, E.; FRANCO, M. V. M. J.; OLIVEIRA, J. E. D. de. Nutrologia: Análise e avaliação da composição e cinética de nutrientes em diversos compartimentos e tecidos do organismo humano. *International Journal of Nutrology*, v. 8, n. 3, p. 85–94, 2015. Citado na página 35.
- CIOLA, R. *Fundamentos da cromatografia a gás*. [S.l.: s.n.], 1985. Citado 8 vezes nas páginas 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29 e 30.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. In: *Fundamentos de cromatografia*. [S.l.]: Unicamp, 2006. Citado 11 vezes nas páginas 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30.
- FIGHN, O.; KOPKA, J.; DÖRMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHERWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature biotechnology*, Nature Publishing Group, v. 18, n. 11, p. 1157–1161, 2000. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 16.
- FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. d. S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. *Química Nova*, Sociedade Brasileira de Química, p. 1605–1609, 2013. Citado 7 vezes nas páginas 12, 15, 16, 17, 18, 34 e 35.
- GREEF, J. Van der. Field desorption mass spectrometry in bioanalysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Elsevier, v. 5, n. 9, p. 241–246, 1986. Citado 6 vezes nas páginas 18, 19, 22, 28, 29 e 30.
- GROB, R. L.; BARRY, E. F. *Modern Practice of Gas Chromatography*. 2. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 1995. Citado 8 vezes nas páginas 19, 21, 22, 24, 25, 26, 27 e 30.
- HEINNER, G. Hacia la medicina personalizada: implicancias de las ciencias básicas y las "ómicas" en la práctica clínica. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, Instituto Nacional de Salud, v. 32, n. 4, p. 629–632, 2015. Citado na página 16.
- JENSEN, M. D.; KANALEY, J. A.; REED, J. E.; SHEEDY, P. F. Measurement of abdominal and visceral fat with computed tomography and dual-energy x-ray absorptiometry. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Am Soc Nutrition, v. 61, n. 2, p. 274–278, 1995. Citado 3 vezes nas páginas 31, 33 e 35.
- KAR, A. *Pharmaceutical drug analysis*. [S.l.]: New Age International, 2005. Citado 4 vezes nas páginas 13, 17, 20 e 34.

LANÇAS, F. M. *Cromatografia em fase gasosa*. [S.l.]: Acta, 1993. v. 1. Citado 9 vezes nas páginas 13, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30.

LEI, Z.; HUHMANN, D. V.; SUMNER, L. W. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *Journal of Biological Chemistry*, ASBMB, v. 286, n. 29, p. 25435–25442, 2011. Citado 3 vezes nas páginas 14, 18 e 24.

NICHOLSON, J. K.; BUCKINGHAM, M. J.; SADLER, P. J. High resolution 1h nmr studies of vertebrate blood and plasma. *Biochemical Journal*, Portland Press Limited, v. 211, n. 3, p. 605–615, 1983. Citado na página 18.

NICKLER, M.; OTTIGER, M.; STEUER, C.; HUBER, A.; ANDERSON, J. B.; MÜLLER, B.; SCHUETZ, P. Systematic review regarding metabolic profiling for improved pathophysiological understanding of disease and outcome prediction in respiratory infections. *Respiratory research*, BioMed Central, v. 16, n. 1, p. 125, 2015. Citado 3 vezes nas páginas 13, 16 e 17.

PENG, J.; ELIAS, J. E.; THOREEN, C. C.; LICKLIDER, L. J.; GYGI, S. P. Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (lc/lc-ms/ms) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. *Journal of proteome research*, ACS Publications, v. 2, n. 1, p. 43–50, 2003. Citado 6 vezes nas páginas 13, 22, 23, 29, 30 e 35.

PINZON, A. C. *Metabolómica aplicada al diagnóstico preimplantacional no invasivo*. Dissertação (Mestrado) — ADEIT - Fundacion Universidad - Empresa de la Universitat de Valencia, Sevilla, España, 2009. Citado 4 vezes nas páginas 16, 17, 32 e 33.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Quechers—um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009. Citado 3 vezes nas páginas 28, 29 e 34.

ROSS, R.; RISSANEN, J.; PEDWELL, H.; CLIFFORD, J.; SHRAGGE, P. Influence of diet and exercise on skeletal muscle and visceral adipose tissue in men. *Journal of Applied Physiology*, Am Physiological Soc, v. 81, n. 6, p. 2445–2455, 1996. Citado na página 35.

SKOOG, D. A. *Fundamentos de Química Analítica*. 8. ed. [S.l.]: Grupo Editorial Norma, 2006. Citado 11 vezes nas páginas 19, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31 e 34.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T.; MATSUO, T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, Wiley Online Library, v. 2, n. 8, p. 151–153, 1988. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 29.



ESCOLA DE FARMÁCIA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
Escola de Farmácia

---

### ATESTADO DE CORREÇÃO

Atesto que FLÁVIA DE CARVALHO PEDROSA, matrícula 13.1.2169 realizou todas as correções exigidas pela Banca examinadora no manuscrito do Trabalho de Conclusão de Curso: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), aplicada em estudos de metabolômica.

Ouro Preto, 08 de fevereiro de 2018.

---

Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho  
Orientador - DEFAR-EF-UFOP