Leandro de Oliveira Rodrigues Arrivetti

**Investigação das alterações no metaboloma/metabonoma
da carne de animais suplementados com *Ilex*
*paraguariensis***

Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade
de São Paulo como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

São Carlos

2017

*Aos meus pais, família, namorada e amigos que
sempre me apoiaram com muito amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Edson e Fátima, a minha irmã Jaqueline, aos meus avós, tios, tias, primos e toda a minha família e a minha namorada Bruna por me apoiarem e acreditarem em mim durante todo o tempo de meus estudos.

Ao meu orientador prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso, pela confiança e dedicação.

Ao prof. Dr. Emanuel Carrilho e a Embrapa pela estrutura fornecida.

Aos amigos do Laboratório da Química Analítica e Inorgânica do IQSC-USP, Regina, Bezerra, Silmara, Andressa, Carol, Fernanda, Fernando, Silvia, Naná, Tiagão, Willy, Augusto, Marcella, Jonatan, Jenifer, Patrícia, João, Carlos, Henrique, todos os amigos que me ajudaram durante este período.

Aos amigos da República Voadores, Albis, Michael, Matheus, Allan, Bronha, Dú, Ituverava, Leitoso, Luiz, Marisco, Pirikito, Rolinha, Tiago, Turn, Vitão, Vô e Zá que dividiram esses bons momentos.

Aos amigos Igor, João, Zé, Gustavão, Buda, Galinhão, Gabi, Daia, Naiara, Bia, Isaura,

Aos amigos de Mogi, Cris, Lu, Pé, Rê, Furlan, Bia, Mucho, Stela, Kenji, Monique, Fábio, Laís, Glub, Gi, Ju, Pati, Naira, Rodrigo.

Aos funcionários do IQSC-USP por estarem prontos a ajudar, em especial as secretárias Veroneide, Silvia e Andreia.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida.

“Cada segundo é tempo para mudar tudo para sempre”

Charles Chaplin

RESUMO

A alimentação humana requer o suprimento de nutrientes de uma forma balanceada. A carne vermelha é uma perfeita fonte de proteína de alta qualidade além de fornecer a necessidade diária de ferro, zinco e de várias vitaminas. Porém, a carne vermelha aumenta o risco de induzir estresse oxidativo no organismo através da formação de radicais livres e espécies reativas através de reações catalisadas por ferro, elevando a incidência de câncer gastrointestinal. Lipídeos e proteínas são os principais alvos de tais processos oxidativos, levando à formação de produtos potencialmente mutagênicos, pró-oxidantes e substâncias de aroma indesejado no produto cárneo. Com o aumento da população mundial, há uma projeção de acentuado aumento do consumo de carne no mundo e conseqüentemente uma maior demanda por produtos de maior qualidade e estabilidade de prateleira. A produção de carne e derivados de superior qualidade sensorial e nutricional é mandatário e configurar um desafio científico e tecnológico para suprir essa demanda e fornecer aos consumidores uma ingestão saudável de carne. Estudos recentes revelaram que as folhas da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) possuem propriedades antioxidantes e anti-coccídeas. A utilização de metodologias modernas analíticas, de acordo com abordagens “ômicas”, permite a caracterização de matrizes complexas por determinação do "perfil metabólito ou metabólico". Sendo assim, o presente trabalho se propôs a investigar o padrão metabólico e metabonômico da carne proveniente de animal suplementado com extrato de erva-mate a fim de verificar seu impacto na estabilidade redox do produto. O perfil qualitativo de metabólitos não apresentou alteração em função da dieta do animal. No entanto, observa-se claramente uma dependência do perfil quantitativo dos metabólitos na carne em função da dieta do animal. Em relação à influência da dieta dos animais no *status* redox de carne bovina, amostras provenientes de animais alimentados sem suplementação e com 1,5 % de extrato de erva-mate apresentaram, respectivamente, as taxas de formação de radicais mais altas e mais baixas. De fato, o claro aumento na concentração de peptídeos derivados da histidina, creatina, e CLA, na carne de animais suplementados com extrato de mate promoveu uma carne com uma maior estabilidade redox.

ABSTRACT

Human nutrition requires the supply of nutrients in a balanced way. Red meat is a perfect source of high quality protein in addition to providing the daily requirement of iron, zinc and various vitamins. However, red meat increases the risk of inducing oxidative stress in the body through the formation of free radicals and reactive species by iron catalyzed reactions, increasing the incidence of gastrointestinal cancer. Lipids and proteins are the main targets of such oxidative processes, leading to the formation of potentially mutagenic products, pro-oxidants and undesired aroma substances in the meat product. With the increase in the world population, there is a projection of an marked increase in worldwide meat consumption and as a consequence an demand for high quality products with increased shelf-life. The production of meat and meat products of superior sensory and nutritional quality is mandatory and is an scientific and technological challenge to meet this demand and provide consumers with healthy meat intake. Recent studies have revealed that leaves of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) shown antioxidant and anti-coccyte properties. The usage of modern analytical methodologies, according to omic approaches, allows the characterization of complex matrices by the determination of the “metabolite or metabolic profile”. In this view, the present study aims to investigate the metabolic and metabonomic pattern of meat from animals supplemented with mate extract in order to verify its impact on the redox stability of the product. It was not observed a qualitative variation of the metabolic profile as functional of the animal diet. However, there is a clear dependence on the quantitative profile of the metabolites in the meat as a function of the animal's diet. In relation to the influence of the diet of the animals on the redox status of beef, samples from animals fed without supplementation and supplemented with 1.5% of mate extract presented, respectively, the higher and lowest rates of radical formation. In fact, a clear increase in the concentration of the histidine peptides, creatine, and CLA in meat from animals supplemented with mate extract promoted a lower tendency of free radical formation leading to a meat with higher redox stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo da cor da carne fresca.....	19
Figura 2. Exemplo de aminoácidos presentes na carne.	20
Figura 3. Estrutura química do 9Z,11E-CLA.	21
Figura 4. Tumorigênese e o papel da inflamação no desenvolvimento do câncer. ROS = espécies reativas de oxigênio; RNS = espécies reativas de nitrogênio; NO = óxido nítrico; PGs = prostaglandinas; ODC = ornitina descarboxilase; MMP = matriz metaloproteinase; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular.	23
Figura 5. Erva-mate: (a) folhagem e (b) árvore	25
Figura 6. Compostos fenólicos presentes no extrato e folhas de erva-mate.	27
Figura 7. Formação do aduto radical pelo uso de <i>spin traps</i>	40
Figura 8. (A) Corte transversal e (B) vista superior do dispositivo microfluídico. As ampliações apresentam o adaptador utilizado para o fornecimento de metanol para a formação de um spray mais robusto e uniforme.....	43
Figura 9. (a) Sistema de bombeamento ligado ao dispositivo microfluídico conectado ao sistema de ionização por <i>electrospray</i> e monitorado por microcâmeras e (b) detalhe do posicionamento do dispositivo em frente à entrada do espectrômetro de massas.....	44
Figura 10. Cromatogramas de íons totais (TIC) da amostra de extrato e folhas de mate: (a) extrato do lote 110113.81, (b) extrato do lote 120412.571, (c) extrato do lote 130712.1039, (d) caixa, (e) folhas cultivadas com exposição direta ao sol, (f) folhas cultivadas sob sombra da mata e (g) sobreposição dos cromatogramas (e) e (f).	47
Figura 11. Espectros de ¹ H-RMN (500 MHz) das folhas de erva-mate cultivadas com exposição direta ao sol (vermelho), folhas cultivadas sob sombra da mata (preto), a sobreposição entre ambos e um zoom na região dos polifenóis aromáticos.	54

Figura 12. Espectro de ^1H -RMN (600 MHz) de extrato de carne bovina. A referência utilizada foi TMSP-d4 (0 ppm). Os picos majoritários identificados: (A) leucina/isoleucina/valina; (B) lactato; (C) alanina; (D) glutamina/glutamato; (E) aspartato; (F) creatina; (G) região de carboidratos (glucose, adenosina, ribose); (H) carnosina; (I) adenina/hipoxantina; (J) adenosina/inosina/carnosina; (K) ATP.56

Figura 13. Análise de Componentes Principais (PCA) realizada sobre os espectros de ^1H -NMR dos extratos de carne dos animais alimentados com diferentes teores de extrato de mate (0 %, 0,5 %, 1,0 % e 1,5 %). Cada amostra de carne é representada por um número colorido de acordo com o nível de extrato de mate na dieta e uma letra foi usada para diferenciar animais com o mesmo tratamento. (A) PC1 vs PC2; (B) PC1 vs PC3; (C) PC2 vs PC3. Gráfico de *loadings* para as correlações PC-variáveis (D) PC1, (E) PC2 e (F) PC3.58

Figura 14. (A) Espectro de massas de alta resolução do padrão de prolina, (B) Espectro de MS^2 de alta resolução do padrão de prolina, (C) Espectro de MS^2 de alta resolução da amostra de carne referente à prolina, (D) Curva de calibração externa do padrão de prolina.63

Figura 15. (A) Espectro de massas de alta resolução do padrão de aspartato, (B) Espectro de MS^2 de alta resolução do padrão de aspartato, (C) Espectro de MS^2 de alta resolução da amostra de carne referente à aspartato, (D) Curva de calibração externa do padrão de aspartato.65

Figura 16. (A) Espectro de massas de alta resolução do padrão de glutatona, (B) Espectro de MS^2 de alta resolução do padrão de glutatona, (C) Espectro de MS^2 de alta resolução da amostra de carne referente à glutatona, (D) Curva de calibração externa do padrão de glutatona.67

Figura 17. Ilustração dos metabólitos polares e CLA identificados e sujeitos à quantificação pelas técnicas de ^1H -RMN e HESI-HRMS e do conjunto de metabólitos passíveis de identificação e dosagem por ambas as técnicas.70

Figura 18. Análise de Componentes Principais (PCA) do perfil quantitativo dos metabólitos dos animais alimentados com diferentes teores de extrato de mate. Cada amostra de carne é representada por um número colorido de acordo com o nível de extrato de mate na dieta e uma letra

foi usada para diferenciar animais com o mesmo tratamento. As concentrações dos metabólitos determinadas por $^1\text{H-NMR}$ e HESI-HRMS foram selecionadas como variáveis. (A) PC1 vs PC2 (B) Gráfico de <i>loadings</i> para as correlações PC-variáveis.....	74
Figura 19. Espectro de RPE dos homogenatos de carne com a adição de PBN (400 mmol L^{-1}) obtidos em diferentes tempos de incubação a 65°C	76
Figura 20. (A) Formação de radicais medida pela intensidade relativa média ($n=3$) do sinal de RPE do aduto radical PBN formado em homogenatos de carne incubada a 65°C . A intensidade relativa de RPE foi calculada pela dupla integração do sinal RPE e pela relação $\text{Área}_{T=x \text{ min}} / \text{Área}_{T_0=60 \text{ min}}$. (B) Taxa de formação de radicais determinada por regressão linear dos gráficos de intensidade relativa de RPE.....	77
Figura 21. Dispositivo microfluídico desenvolvido e utilizado para os experimentos cinéticos de oxidação de metabólitos.....	80
Figura 22. Canais de reação desenhados com ângulos de 90° e cavidades circulares.....	81
Figura 23. Fotos tiradas por microscopia ótica da mistura de duas soluções de corantes que percorrem os canais do dispositivo microfluídico em etapas distintas (a) encontro das soluções, (b) cavidade situada durante o percurso das soluções e (c) saída do dispositivo microfluídico.	82
Figura 24. Imagem do monitor de observação da formação do cone de Taylor necessário para a ionização dos compostos em frente à entrada do espectrômetro de massas	83
Figura 25. Espectro de massas inicial da solução contendo carnosina $5,0 \mu\text{M}$ e serina foi $100 \mu\text{M}$	84
Figura 26. (a) Intensidade relativa do sinal da carnosina $7,5 \mu\text{M}$ em relação ao sinal da serina $100 \mu\text{M}$ em função do aumento do tempo de reação (s) e do excesso de ferrilmioglobina, (b) $\ln$ da intensidade relativa do sinal da carnosina $7,5 \mu\text{M}$ em relação ao sinal da serina $100 \mu\text{M}$ em função do aumento do tempo de reação.....	86

Figura 27. (a) Intensidade relativa do sinal da carnosina 5,0 μM em relação ao sinal da serina 100 μM em função do aumento do tempo de reação (s) e do excesso de ferrilmioglobina, (b) $\ln$ da intensidade relativa do sinal da carnosina 5,0 μM em relação ao sinal da serina 100 μM em função do aumento do tempo de reação.....	87
Figura 28. Correlação linear entre k_{obs} obtida pelo ajuste linear das curvas da Figura 26b e a concentração total de ferrilmioglobina.	87
Figura 29. Correlação linear entre k_{obs} obtida pelo ajuste linear das curvas da Figura 27b e a concentração total de ferrilmioglobina.	88
Figura 30. Espectro de massas da solução contendo carnosina 5,0 μM e serina 100 μM durante a reação com ferrilmioglobina 40 μM	89
Figura 31. Espectro de MS^2 referente à fragmentação do íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ 150 m/z.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente de eluição utilizado na identificação dos compostos fenólicos presentes no extrato e folhas de mate.	35
Tabela 2. Gradiente de eluição utilizado na identificação dos compostos fenólicos presentes no extrato e folhas de mate.	39
Tabela 3. Compostos fenólicos identificados no extrato e folhas de erva-mate.	51
Tabela 4. Compostos fenólicos identificados e quantificados no extrato (mg g^{-1} de extrato) e folhas de erva-mate (mg g^{-1} de folha).	53
Tabela 5. Concentração de metabólitos polares ($n = 12$, $\mu\text{mol g}^{-1}$ carne) analisados por HESI-HRMS de extratos em metanol/água (1:1) de carne de animais com diferentes concentrações de extrato de erva-mate na dieta.	60
Tabela 6. Concentração de metabólitos polares ($n = 12$, $\mu\text{mol g}^{-1}$ carne) analisados por HESI-HRMS de extratos em metanol/água (1:1) de carne de animais com diferentes concentrações de extrato de erva-mate na dieta utilizando-se uma coluna RAM-C8-BSA ($10 \mu\text{m}$, $100 \text{ \AA}$) de albumina sérica imobilizada.	61
Tabela 7. Concentração de metabólitos polares ($n = 3$, $\mu\text{mol g}^{-1}$ carne) analisados por $^1\text{H-NMR}$ de extratos em metanol/água de carne de animais com diferentes concentrações de extrato de erva-mate na dieta.	69
Tabela 8. Concentrações de CLA total em amostras analisadas de carne de animais suplementados com diferentes concentrações de extrato de erva-mate por APCI-HRMS em modo negativo utilizando injeção direta em fluxo de $300 \mu\text{L min}$ de ACN/ H_2O (90:10).	79
Tabela 9. Intensidade relativa do sinal da carnosina $7,5 \mu\text{M}$ em relação ao sinal da serina $100 \mu\text{M}$ em função do aumento do tempo de reação (s) e do excesso de ferrilmioglobina.	85

Tabela 10. Intensidade relativa do sinal da carnosina 5,0 μM em relação ao sinal da serina 100 μM em função do aumento do tempo de reação (s) e do excesso de ferrilmioglobina.85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACG	Ácido clorogênico
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina do soro bovino
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CLA	Ácido clorogênico conjugado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.E.	Diâmetro externo
D. I.	Diâmetro interno
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
HESI	Ionização por <i>electrospray</i> com aquecimento
G6P	Glucose-6-fosfato
GSSG	Glutathione oxidada
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução
IMP	Inosina monofosfato
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
PBN	N-tert-butil- α -fenilnitrona
PC	Polycarbonato
PCA	Análise de Componentes Principais

PDMS	Polidimetil-siloxano
PFP	Pentafluorfenil
PMMA	Polimetil-metacrilato
RAM	Material de acesso restrito
RMN	Ressonância magnética de elétrons
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPE	Ressonância paramagnética de elétrons
TIC	Cromatograma de íons totais
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência

SUMÁRIO

1. Introdução	17
1.1. Composição química da carne vermelha	18
1.2. Processos oxidativos em produtos cárneos	22
1.3. Consumo de carne e saúde pública	22
1.4. Espécies reativas de oxigênio (ROS)	23
1.5. Antioxidantes	24
1.6. Erva-Mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	25
1.7. Estudos do perfil metabólico e metabonômico dos animais	28
1.8. Estudo cinético de processos oxidativos via dispositivos microfluídicos acoplados a espectrômetro de massas	29
2. Objetivos	31
2.1. Objetivos específicos	31
3. Materiais e Métodos	33
3.1. Materiais utilizados	33
3.2. Animais e dieta	33
3.3. Extração dos compostos fenólicos presentes no extrato e nas folhas de mate	34
3.4. Análise dos compostos fenólicos via UHPLC-HESI-HRMS	35

3.5.	Extração dos metabólitos polares da carne	36
3.6.	Análises por ^1H -RMN de alto campo	36
3.6.1.	Metabolômica <i>untargeted</i>	36
3.6.2.	Metabolômica <i>targeted</i>	37
3.7.	Espectrometria de massas de alta resolução (HESI-HRMS)	38
3.8.	Análise de componentes principais do perfil metabólico	39
3.9.	Investigação da estabilidade redox de carne por ressonância paramagnética de elétrons	39
3.10.	Extração de CLA da carne.....	41
3.11.	Quantificação de CLA total via APCI-HRMS	41
3.12.	Desenvolvimento e aplicação de dispositivo microfluídico e estudo cinético de reações de oxidação do monitoradas por NSI-MS.....	42
4.	Resultados e Discussão	46
4.1.	Análise dos compostos fenólicos dos extratos de erva-mate via UHPLC-HESI-HRMS	46
4.2.	Investigação do perfil metabolômico dos animais suplementados com extrato de erva-mate	56
4.3.	Análise de componentes principais dos perfis metabólicos quantitativos de ^1H -RMN e HESI-HRMS	73
4.4.	Investigação da estabilidade redox de carne por ressonância paramagnética de elétrons	75
4.5.	Quantificação do CLA total dos animais suplementados com extrato de erva-mate.....	79

4.6. Desenvolvimento e aplicação do dispositivo microfluídico acoplado ao espectrômetro de massas	80
4.7. Estudo cinético de reações de oxidação monitoradas por NSI-MS	84
4.8. Detecção de produtos de degradação das reações de oxidação utilizando o dispositivo microfluídico acoplado ao espectrômetro de massas	88
5. Conclusão	91
6. Referências	92

1. Introdução

Como uma consequência do aumento da população mundial, juntamente com a crescente demanda de carne nos países em desenvolvimento ao longo das próximas décadas, é esperado o dobro do consumo mundial de carne em 2050. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) preveem que a produção brasileira de carne bovina, frango e carne de porco crescerá até 30% na próxima década. Estima-se que a produção atual de 24,6 milhões de toneladas por ano deva crescer para um volume de 31,2 milhões de toneladas nesse período. A carne de frango deve liderar com um crescimento de 30%, passando de 12,1 milhões de toneladas para 15,7 milhões de toneladas/ano. A produção de carne bovina é esperada ser a segunda em crescimento com aumento de 24%, de 9,2 milhões de toneladas para 11,4 milhões de toneladas e, em terceiro, a carne de porco, 20,6% dos 3,4 milhões de toneladas para 4,1 milhões de toneladas/ano. Quanto ao mercado internacional, hoje o Brasil exporta 1,8 milhões toneladas de carne bovina e 3,9 milhões de toneladas de carne de frango, sendo previsto aumento para 2,4 milhões de toneladas de carne bovina e 5,2 milhões de toneladas de frango para 2020/2021. De acordo com o Ministério da Agricultura - Brasil, as expectativas são de que antes de 2020, o Brasil se tornará responsável por 45% do mercado internacional de carne bovina e aproximadamente 48% da carne de frango (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil, 2012).

Tendo em vista este grande mercado em que o país está inserido é essencial que haja um grande controle de qualidade dos produtos cárneos em todos os aspectos, desde o nascimento do animal até o produto na prateleira do supermercado.

1.1. Composição química da carne vermelha

A carne vermelha é uma importante fonte de diversos nutrientes e parte essencial de uma dieta balanceada que apresenta em sua composição química proteínas (22%), lipídeos, água e micronutrientes como ferro, selênio, zinco e vitamina B12. A proteína da carne vermelha é altamente digestível e fonte de aminoácidos essenciais (Pereira e Vicente, 2013 e Biesalski, 2005).

As proteínas presentes no tecido muscular podem ser classificadas em sarcoplasmáticas, miofibrilares e tecido conjuntivo. Proteínas sarcoplasmáticas são solúveis e formadas principalmente por enzimas e mioglobina. Proteínas miofibrilares são constituídas por actina e miosina e são as proteínas musculares mais abundantes e são responsáveis pela contração muscular (Estévez, 2011). O tecido conjuntivo é principalmente constituído de fibras de colágeno e elastina responsáveis por proteger e sustentar outros tecidos (Purslow, 2005).

A mioglobina é uma proteína globular hidrossolúvel e componente majoritário do sarcoplasma do tecido muscular, sua função principal biológica é armazenar e transportar oxigênio (O₂) do sarcolema para as mitocôndrias (Arcon *et al.*, 2015). A mioglobina é composta por 8 α -hélices(A-H), apresenta um grupo prostético contendo um íon de ferro coordenado no plano equatorial aos grupos pirrólicos do anel porfirínico e no sítio axial coordenado ao aminoácido histidina-93 localizado dentro de sua cavidade hidrofóbica (Mancini e Hunt, 2005).

A mioglobina é um pigmento responsável pela coloração vermelha da carne (**Figura 1**), que está relacionada à presença da molécula de oxigênio ligada ao íon complexo de ferro heme da proteína.

Figura 1. Ciclo da cor da carne fresca.

Fonte: Autoria própria.

A carne vermelha apresenta em sua composição moléculas de baixo peso molecular conhecidas como metabólitos, que são produtos do metabolismo animal. Os metabólitos presentes na carne podem ser classificados em polares e apolares.

Metabólitos podem ser encontrados comercialmente em suas formas isoladas como suplementos alimentares utilizados por praticantes de atividade física com o intuito de aumento de desempenho, reposição muscular, redução de fadiga, perda de peso e outros benefícios para o organismo.

Os metabólitos polares podem ser aminoácidos (**Figura 2**), peptídeos, ácidos orgânicos, nucleotídeos, açúcares e atuam nas mais variadas funções como: antioxidantes endógenos, biomarcadores de estresse, intensificadores de sabor, iniciadores de síntese protéica, etc.

Figura 2. Exemplo de aminoácidos presentes na carne.

Fonte: Autoria própria.

Os lipídeos são uma importante fonte de energia e facilitam a absorção de vitaminas lipossolúveis como A, D, E e K (Daley *et al*, 2010).

Os metabólitos apolares presentes na carne são os triglicerídeos e ácidos graxos e em especial podemos destacar o CLA, ácido linoleico conjugado (**Figura 3**).

Figura 3. Estrutura química do 9Z,11E-CLA.

Fonte: Autoria própria.

CLA é o termo genérico usado para descrever a mistura de isômeros geométricos e posicionais do ácido linoleico com duplas ligações conjugadas (Larsen *et al*, 2003 e Crumb, 2001). O CLA é um ácido graxo insaturado encontrado naturalmente em carne bovina, ovina e laticínios, é formado majoritariamente por biorredução no rúmen por isomerização do ácido linolênico e seu teor é associado ao teor de seu precursor na dieta e à atividade de bactérias biorredutoras *Butyrivibrio fibrisolvens* (Devillard *et al*, 2006, Dilzer e Park, 2012, Workshop on the Role of Conjugated Linoleic Acid in Human Health, 2003). O teor total de CLA na carne também pode variar consideravelmente de acordo com a dieta animal dado que, por exemplo, carne de animais alimentados com pastagem e forragem apresentam maiores teores de CLA que animais alimentados com ração (Prema *et al*, 2015). Essa bactéria não é a única fonte da biossíntese do CLA, pois suínos, aves, frutos do mar e óleos vegetais também contêm pequenas quantidades de CLA. (Workshop on the Role of Conjugated Linoleic Acid in Human Health, 2003).

O CLA está envolvido em inúmeros benefícios à saúde humana, como atividade anticolesterol, anti-hipertensiva, antiaterosclerótica, redução da gordura corporal e também tem se demonstrado eficaz na prevenção de vários tipos de câncer (Belury, 2002 e Dilzer e Park, 2012). Vários trabalhos demonstraram uma diminuição dos níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade), colesterol total, triglicerídeos de animais com a suplementação de CLA (Kritchevsky *et al*, 2004 e Bhattacharya *et al*, 2006) que também pode atuar na inibição da iniciação e progresso de câncer de mama, cólon, pele e próstata (Field e Schley, 2004).

1.2. Processos oxidativos em produtos cárneos

Os processos oxidativos que ocorrem no músculo dos animais são importantes fatores envolvidos na deterioração global da carne. Essas reações oxidativas que envolvem proteínas e lipídios são, juntamente com o crescimento microbiano, responsáveis por tal deterioração. A oxidação de proteínas é considerada um fator determinante para a maciez e suculência da carne durante seu armazenamento além de ser responsável pela deterioração dos sabores e descoloração (Lund *et al.*, 2007 e Lund *et al.*, 2011).

A oxidação de proteínas pode causar a formação de hidroperóxido, *crosslink* inter e intramolecular das cadeias polipeptídicas pela formação de pontes dissulfeto e ditirosina, fragmentação da estrutura peptídica e diminuição da solubilidade proteica que impactam diretamente nas propriedades nutricionais e sensoriais da carne (Lund *et al.*, 2007)

1.3. Consumo de carne e saúde pública

Em conjunto com o crescente aumento do consumo de carne em todo o mundo, especialmente o de carne vermelha, um problema de saúde pública revelado através de recentes estudos de meta-análise. Tais estudos mostram que o elevado consumo de carne vermelha e curada com nitrito de sódio aumenta significativamente (entre 20 % e 30 %) a incidência de câncer colorretal (Corpet, 2011 e Kim *et al.*, 2013). O ferro é um forte pró-oxidante e durante a digestão da mioglobina, o pigmento ferro porfirina, pode tornar-se ativado às espécies hipervalentes, um eficiente gerador de radicais. Acredita-se que o pigmento ferro-heme da carne vermelha é uma das principais causas para o câncer de colorretal, uma vez que o teor de ferro-heme da carne vermelha é 10 vezes mais elevado em comparação com a carne branca (Ishikawa *et al.*, 2010). O ferro heme pode participar na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), e as reações intracelulares, incluindo ROS, podem resultar na iniciação e progressão da carcinogênese por indução de mutações do gene cromossômico, danos e outros efeitos citotóxicos. Uma vez que ROS regulam a expressão de genes ativos durante a diferenciação e proliferação celular, podem provavelmente desempenhar um papel importante na fase de promoção da produção de tumor. Outro agente

de promoção para o cancro no trato-gastrointestinal é o íon nitrito que, por sua vez, pode causar nitroação em biomoléculas conduzindo às alterações oxidativas, danos no DNA e mutação adicional, **Figura 4**.

Figura 4. Tumorigênese e o papel da inflamação no desenvolvimento do câncer. ROS = espécies reativas de oxigênio; RNS = espécies reativas de nitrogênio; NO = óxido nítrico; PGs = prostaglandinas; ODC = ornitina descarboxilase; MMP = matriz metaloproteinase; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular.

Fonte: Adaptação de Pan *et al.* (2010)

1.4. Espécies reativas de oxigênio (ROS)

As espécies reativas de oxigênio são produzidas em células de mamíferos principalmente pela cadeia de transporte de elétrons pelo processo onde a molécula de oxigênio sofre redução via um elétron, produzindo o radical ânion peróxido ($O_2^{\cdot-}$) que é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) enzimaticamente pela superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio pode reagir com metais de transição e gerar o radical hidroxila ($\cdot OH$). O radical hidroxila é o mais reativo das espécies radicais de oxigênio e rapidamente pode oxidar proteínas, lipídeos, carboidratos, DNA e RNA devido seu alto potencial de oxidação ($E = 2,31 \text{ V vs NHE}$) (Buettner, 1993, Davies, 1995 e Nile *et al.*, 2012).

O peróxido de hidrogênio também pode reagir com a metmioglobina e oxidá-la a intermediários perferrilmioglobina (MbFe(IV)=O) que apresentam o íon complexo de ferro (IV) na forma de um cátion radical centrado no anel porfirínico. Na ausência de agentes redutores, a perferrilmioglobina é convertida a ferrilmioglobina (MbFe(IV)=O) que apresenta um longo tempo de vida (tempo de meia vida de cerca de algumas horas) (Jongberg *et al*, 2014). Ambas as espécies hipervalentes estão envolvidas em danos oxidativos em sistemas biológicos Jørgensen *et al*, 1997).

1.5. Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações, reduzem ou inibem a oxidação de biomoléculas facilmente oxidáveis, como lipídeos e proteínas em produtos cárneos, deste modo aumentando a qualidade e o tempo de prateleira destes produtos protegendo-os contra a deterioração causada pela oxidação (Karre *et al*, 2013).

Antioxidantes podem prevenir a peroxidação lipídica inibindo reações em cadeia capturando radicais, decompondo peróxidos, diminuindo a concentração de oxigênio localizado. Inúmeros compostos podem ser conhecidos por sua capacidade antioxidante, mas apenas parte deles pode ser usada em produtos alimentares (Shah *et al*, 2014).

A origem dos antioxidantes pode ser natural ou sintética. Antioxidantes sintéticos como butirato de hidroxianisol (BHA), butirato de hidroxitoluol (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propilgalato (PG) são usados largamente em produtos cárneos mas existe uma crescente demanda pelo uso de antioxidante naturais, especialmente de origem de plantas tem crescido recentemente devido a crescente preocupação dos consumidores sobre o uso de antioxidantes sintéticos devido seus potenciais efeitos toxicológicos (Shah *et al*, 2014).

1.6. Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*)

Estudos recentes demonstraram que as folhas da planta nativa brasileira, erva-mate (*Ilex paraguariensis*), possuem propriedades antioxidantes. O extrato de mate tem sido utilizado para melhorar a estabilidade da carne de aves de frangos de corte com alimentação suplementada com 0,5% de extrato de mate aquoso e surge como alternativa natural ao uso de antioxidantes sintéticos usados em produtos cárneos (Racanicci *et al.*, 2011). O mecanismo de proteção através de suplementação da alimentação animal com mate ainda é desconhecido.

A erva-mate (**Figura 5**) é uma árvore da família das aquifoliáceas, originária da região subtropical da América do Sul, cuja presença se faz no sul do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai, sendo que cerca de 80% da sua área de ocorrência pertence ao Brasil, distribuindo-se entre os Estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A região Sul é a maior produtora, onde a erva-mate é explorada por pequenos produtores que se reúnem em cooperativas para processá-la ou comercializá-la (Heck e Mejia 2007).

Figura 5. Erva-mate: (a) folhagem e (b) árvore

(a)

(b)

Fonte: Imagens de domínio público.

O consumo de bebidas à base de erva-mate é conhecido há centenas de anos, povos indígenas das nações Guarani e Quíchua tinham o hábito de beber infusões com suas folhas. Atualmente os produtos da erva-mate são como chá quente ou gelado, como chimarrão (Brasil) ou tereré (Mato Grosso do Sul e Paraguai). A *Ilex paraguariensis* é utilizada na medicina popular e por herboristas, recomendada para artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorroidas, obesidade, fadiga, retenção de líquido, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas. Os principais compostos presentes na erva-mate são os compostos fenólicos (**Figura 6**), as saponinas e as metilxantinas. Entre os compostos fenólicos destaca-se o elevado conteúdo de derivados cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico (ACGs) e seus isômeros, aos quais se atribui a ação adstringente e antioxidante do produto (Clifford e Ramirez-Martinez, 1990 e Cardozo-Junior *et al.*, 2007). Além do ácido clorogênico, os flavonóides rutina, quercetina, diglicosídeo de luteolina, taninos e a cafeoilglicose também estão presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (Ricco *et al.*, 1991, Carini *et al.*, 1998, Filip *et al.*, 2001).

Figura 6. Compostos fenólicos presentes no extrato e folhas de erva-mate.

Fonte: Autoria própria.

Dentre a classe de saponinas, encontram-se as agliconas, os ácidos ursólico e oleanólico. Tais substâncias são responsáveis pelo amargor e espuma do mate e pela atividade anti-inflamatória, além de outras inúmeras propriedades biológicas (Gnoatto *et al.*, 2000). A cafeína, a teobromina e a teofilina são componentes da classe das metilxantinas, substâncias de reconhecida ação sobre o sistema nervoso central, que possuem a ação estimulante do mate, à parte de também apresentarem ações protetoras contras doenças e propriedades antioxidantes (Zhao *et al.*, 2015).

Há um esforço para estimular a produção de compostos cárneos bioativos (como ácido linoleico conjugado, carnitina, anserina, a carnosina, a creatina, leucina) no tecido muscular apenas manipulando a dieta dos animais (Arihara, 2006 e Zhang *et al*, 2010).

Em alimentos e sistemas biológicos, os antioxidantes apresentam um papel importante na desativação de radicais e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Para alimentos, esse fato fica mais evidente na atualidade, já que aparentemente antioxidantes que protegem lipídeos não necessariamente protegem proteínas, pelo menos em produtos cárneos, conforme estudos apresentados por Lund *et al*. (2007).

1.7. Estudos do perfil metabólico e metabonômico dos animais

A alimentação de ruminantes com uma dieta contendo polifenóis pode melhorar a qualidade da carne aumentando a quantidade de antioxidantes em seu sistema circulatório, que podem ser distribuídos e depositados na carne, aprimorando sua qualidade sensorial, nutricional e suculência (Zhong *et al*, 2015).

A utilização de metodologias modernas analíticas, de acordo com abordagens ômicas, permite a caracterização de matrizes complexas (ou seja, alimentos) por determinação do "perfil metabólito ou metabólico". Neste contexto, as técnicas mais importantes e usualmente utilizadas são a ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrometria de massas (MS).

A ressonância magnética nuclear é uma técnica que proporciona uma visão mais ampla do metaboloma pelo fato de gerar grande quantidade de dados em um curto período e pode ser usada em misturas muito complexas (Picone *et al*, 2011).

A espectrometria de massas de alta resolução é uma técnica analítica poderosa para a identificação e quantificação de inúmeras substâncias em amostras complexas (Kalli *et al*, 2013 e Makarov *et al*, 2006). Sua aplicação dentro da bioquímica moderna é bastante notável e, nos últimos anos, vem sendo empregada com sucesso para estudar o metabolismo e "perfil metabólico" (Madalinski *et al*, 2008). Neste âmbito, os termos metaboloma e metabonoma se destacam, sendo o primeiro a descrição sistemática dos níveis naturais de metabólitos dentro dos compartimentos biológicos de um organismo e o último o estudo das respostas desses

níveis a estímulos externos, como alimentação, doenças, stress, idade ou administração de fármacos.

1.8. Estudo cinético de processos oxidativos via dispositivos microfluídicos acoplados a espectrômetro de massas

Grande parte dos estudos cinéticos é realizada utilizando técnicas espectroscópicas como UV-vis e fluorescência. Essas técnicas têm a grande vantagem de rápida aquisição de dados, porém a espectrometria de massas apresenta uma grande sensibilidade e a informação adicional sobre forma estrutural das moléculas alvo para determinações qualitativas e quantitativas (Lin *et al*, 2012).

Um grande avanço em ESI-MS foi a implementação do nanospray, com o fluxo de solução abaixo de 50 nL min^{-1} ter apresentado a possibilidade de melhorias no sensibilidade e quantificação de amostras (Kelly *et al*, 2006).

A miniaturização dos sistemas de bombeamento possibilitou a criação e uso de dispositivos microfluídicos (microchips). Dispositivos microfluídicos utilizam um volume de amostra bem reduzido (10^{-9} a 10^{-18} litros) (Whitesides, 2006) e podem ser fabricados em diversas formas e em diversos materiais como vidro, materiais poliméricos como polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC) e elastômeros como polidimetil-siloxano (PDMS) (Iliescu *et al*, 2012 e Berry e Kedzierski, 2008).

O uso do microchip de cromatografia líquida vem sendo recentemente utilizado por diversos grupos de pesquisa (Reyes *et al*, 2002) e para inúmeras aplicações farmacêuticas e bioanalíticas devido às vantagens do reduzido consumo de reagentes e a grande sensibilidade para a determinação de pequenas moléculas quando acoplado com espectrômetro de massas (Lin *et al*, 2012).

Estudos demonstraram que a o diâmetro interno de um emissor de *electrospray* pode ser reduzido a poucos micrômetros para uma ionização de nanospray eficiente sem perder sensibilidade (Lin *et al*, 2012) e vários grupos de pesquisa fizeram uso do capilar de sílica fundida em emissores de nanospray para aumentar a eficiência da ionização (Kelly *et al*, 2006). Outro fator importante para o uso dos dispositivos microfluídicos é garantir a

eficiência da mistura que está relacionada diretamente às formas e tamanhos dos canais gravados. Para que haja uma mistura eficaz da solução é necessária a formação de turbulência no caminho a ser percorrido pela solução.

2. Objetivos

Neste contexto, o presente projeto propõe-se a investigar o padrão metabólico e metabonômico da carne proveniente de animal suplementado com extrato de erva-mate empregando-se a técnica de HRMS, a fim de verificar seu impacto na estabilidade redox da carne. Ademais, pretende-se avaliar se alterações no metabolôma ou metabonôma são responsáveis pelo efeito ou se, no caso de animais monogástricos, os compostos bioativos ou metabólitos são transferidos para o tecido alterando sua propriedade redox.

2.1. Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente os principais compostos fenólicos nos extratos de erva-mate e nas folhas trituradas cultivadas em diferentes luminosidades (sol e sombra) via UHPLC-HESI-HRMS;
- Aplicação da técnica de ^1H -RMN *untargeted* para a seleção dos metabólitos de interesse;
- Desenvolver método analítico via HESI-HRMS para identificar e dosar metabólitos de interesse em tecido muscular (carne);
- Investigar o perfil metabolômico do tecido muscular (carne) proveniente de ruminantes (bovinos) tratados com 0,0%, 0,5%, 1,0% e 1,5% m/m de extrato de mate na ração através da técnica de HESI-HRMS;
- Investigar a estabilidade redox da carne proveniente de animais suplementados com 0,0%, 0,5%, 1,0% e 1,5% m/m de extratos aquosos e etanólicos de mate na ração por RPE utilizando a técnica de *spin-trapping* e correlacionar com possíveis alterações no padrão metabonômico e metabolômico da carne;
- Desenvolver método analítico para a extração do CLA da carne;

- Quantificar o CLA total do tecido muscular (carne) proveniente de ruminantes (bovinos) tratados com 0,0%, 0,5%, 1,0% e 1,5% m/m de extrato de mate na ração através da técnica de APCI-HRMS via injeção em fluxo.
- Identificar as alterações dos padrões metabólicos e metabonômicos da carne em função do tratamento animal através de técnicas quimiométricas.
- Desenvolver e aplicar dispositivo microfluídico acoplado ao espectrômetro de massas com ionização por nanospray para o acompanhamento de reações de oxidação de metabólitos e estudo cinético;
- Identificar possíveis produtos da reação de oxidação de metabólitos no dispositivo microfluídico via espectrometria de massas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais utilizados

- Extrato e folhas de erva-mate (Grupo Centroflora).
- Ácido 1,3-dicafeoilquínico, ácido 1,5-dicafeoilquínico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido quínico, ácido chiquímico, kaempferol, quercetina, rutina, glicina, ácido láctico, alanina, serina, cloreto de colina, creatinina, prolina, ácido succínico, treonina, homoserina, ácido aspártico, creatina, asparagina, hipoxantina, ácido glutâmico, glutamina, lisina, metionina, hidrocloreto de carnitina, fenilalanina, arginina, citrulina, ácido nicotinúrico, glucose, tirosina, ácido cítrico, triptofano, carnosina, nitrato de anserina, uridina, inosina, glutatona reduzida e oxidada, ácido (9Z, 11E)-linoleico conjugado, *N*-tert-butil- α -fenilnitrona, peróxido de hidrogênio, mioglobina do tecido muscular estriado de equino ($\geq 95\%$) (Sigma-Aldrich).
- Ácido acético, metanol, etanol e acetonitrila (Panreac).
- Água deionizada (18,2 M Ω . cm a 25 °C) - Sistema Milli-Q (Millipore).

3.2. Animais e dieta

Os experimentos de alimentação animal foram realizados por estudos de confinamento de 48 animais da raça Nelore (*Bos indicus*) com mínima variação genética devido a um doador de sêmen comum. Os animais foram abatidos com idade média de 21 meses e peso inicial de 419 kg e foram alimentados individualmente durante 94 dias com a mesma dieta base com rações apropriadamente aditivadas com extratos de erva-mate (0,0%, 0,5%, 1,0% e 1,5% m/m). O confinamento foi realizado seguindo os princípios éticos de experimentação animal na EMBRAPA Pecuária Sudeste (São Carlos – SP, Brasil). A dieta era composta de grão de milho moído (51,3% m/m), silagem de milho (43,0% m/m), suplemento mineral (1,2% m/m), farelo de soja (1,0% m/m), ureia (1,0% m/m), bicarbonato de sódio (1,0% m/m)

e monensina (0,030% m/m). A dieta final era constituída por 11% de proteína bruta e 72% dos nutrientes digestíveis totais. A dieta foi balanceada utilizando 0%, 0,5%, 1,0% e 1,5% m/m de caulinita (caulim), um componente inerte. Os extratos de mate (partículas de 40 mesh, máximo de 6 % de teor de água, 6% de matéria orgânica, e um teor máximo de 6 % de cafeína) sem a adição de excipientes, foram produzidos de folhas frescas de mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) pela extração água:etanol 75:25 v/v a 90 °C e foram gentilmente processados e fornecidos pelo Grupo Centroflora (Botucatu – SP, Brasil) (Dr. Ricardo Luis Araújo Dias).

Após o confinamento, os animais foram sacrificados e suas carcaças foram refrigeradas durante a noite a 2°C. Decorridas 24 horas do abate, a meia-carcaça esquerda foi cortada entre as costelas 12 e 13 e foram coletadas duas fatias de 2,5 cm do músculo *Longissimus thoracis et lumborum* de cada animal para posterior análise. Os tecidos coletados foram transportados sob refrigeração, embalados a vácuo e armazenados em freezer biológico a -80°C. O grupo do Laboratório de Análise de Carnes localizado na Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos - SP, Brasil) avaliou o desempenho dos animais e realizou experimentos para análise descritiva sensorial e aceitação da carne proveniente de animais alimentados com extrato de erva-mate.

Todos os tratamentos e procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais da EMBRAPA Pecuária Sudeste (CEUA protocolo 06/2014) e os animais foram atordoados por pistola pneumática e exsanguinados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA).

3.3. Extração dos compostos fenólicos presentes no extrato e nas folhas de mate

Os compostos fenólicos caracterizados foram provenientes das folhas e extratos de erva-mate. As amostras de folhas de erva-mate estavam divididas em dois lotes, o primeiro foi cultivado em áreas com exposição direta ao sol e o segundo em áreas sob a sombra da vegetação local. As amostras de extrato de erva-mate estavam divididas em quatro diferentes lotes, três lotes de amostragem e o lote utilizado como suplemento na ração animal.

A extração dos compostos fenólicos foi feita utilizando um homogeneizador FastPrep®-24, MP Biomedicals (Solon, OH, EUA). Foram pesados 10 mg de amostra em um tubo extrator e adicionados 1,5 mL de solução gelada de água/metanol (1:1) v/v e uma pérola de porcelana. As amostras foram agitadas a uma velocidade de 5,0 ms⁻¹ durante 120 s. Após a extração, as amostras foram filtradas usando membranas de nylon de 0,45 µm de porosidade e armazenadas a -20°C até a análise por UHPLC-HESI-MS.

3.4. Análise dos compostos fenólicos via UHPLC-HESI-HRMS

Os experimentos para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos foram realizados em um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência Accela 1250 pump acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução da Thermo Scientific modelo LTQ Orbitrap Velos (Bremen, Alemanha) com ionização por *electrospray* com aquecimento (HESI) operando no modo negativo. As amostras foram injetadas por um amostrador automático Accela Open. A coluna utilizada foi uma Phenomenex Kinetex PFP (2,6 µm; 150 x 3.00 mm), o fluxo da fase móvel de 500 µL min⁻¹ e o volume de injeção de 10 µL. A fase móvel utilizada consistiu em um gradiente de água/ácido fórmico 0,1% v/v (A) e metanol/ácido fórmico 0,1% v/v (B) descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1. Gradiente de eluição utilizado na identificação dos compostos fenólicos presentes no extrato e folhas de mate.

Tempo (minutos)	% da fase B
0	5
30	80
35	100
38	100
42	5
45	5

3.5. Extração dos metabólitos polares da carne

O perfil metabólico foi investigado após o abate dos indivíduos e coleta do tecido muscular por espectrometria de massas de alta resolução e ^1H -RMN. Assim sendo, foi possível a identificação inequívoca de metabólitos na carne, metabólitos secundários e compostos bioativos transferidos do trato gastrointestinal para o tecido muscular.

A extração dos metabólitos polares foi feita utilizando um homogeneizador MP Biomedicals FastPrep®-24, MP Biomedicals (Solon, OH, EUA) . Foram pesados aproximadamente 0,20 g de carne congelada em um tubo extrator e adicionado 1,0 mL de solução gelada de água/metanol (1:1) v/v e uma pérola de porcelana. As amostras foram agitadas a uma velocidade de $5,0 \text{ ms}^{-1}$ durante 120 s e, em seguida, foram centrifugadas a 10000 g por 10 min a 10 °C para a remoção de tecido conjuntivo, gordura e proteínas precipitadas. Os sobrenadantes foram secos por 12 horas no sistema a vácuo Speed-Vac, modelo SPD131DDA-115 da Thermo Savant (Holbrook, NY, EUA). O pellet foi dissolvido em 1 mL de tampão D_2O , pH 7,2 contendo a referência interna TMSP-d4 (ácido 3-(trimetilsilil)-3,3,2,2-tetradutério-propiónico) para proceder às análises.

3.6. Análises por ^1H -RMN de alto campo

3.6.1. Metabolômica *untargeted*

Os extratos de carne foram analisados por espectroscopia de ^1H -RMN de alta resolução. Os espectros de ^1H -RMN das soluções dos extratos de carne foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance III 600 MHz, Bruker BioSpin (Rheinstetten, Alemanha) equipado com uma sonda PABBI de 5 mm com gradiente de campo, ajuste automático e acessório de alinhamento (ATMATM), BCU-I para a regulação da temperatura e um trocador de amostras Sample-Xpress. Os experimentos foram realizados a 300 K em modo automático sem a rotação de amostra. Anteriormente à aquisição dos espectros de ^1H -RMN, um atraso de 5 min foi dado para cada amostra no magneto para equilíbrio da temperatura. O ajuste automático, alinhamento (ATMATM), travamento (LOCK), fase, *shimming* (TOPSHIM), e

saturação do pulso (25 Hz) foram obtidos utilizando-se um padrão Bruker routines pela interface ICON-NMR.

Foram realizadas 32 varreduras e quatro varreduras previas dummy de 65536 pontos foram adquiridas com uma largura espectral de 20,5524 ppm, um receptor de ganho de 90,5, um tempo de aquisição de 3.98 s, um atraso de relaxamento de 4 s, e um tempo de mistura de 10 ms. A supressão do sinal da água foi feita com a sequência de pulso para pré-saturação NOESY (Bruker 1D noesygprr1d) com irradiação para a frequência da água ($\nu_1 = 1881,95$ Hz) durante os tempos de relaxamento e mistura. FIDs foram multiplicados por uma função exponencial prévia de 0,3 Hz para transformada de Fourier, somente uma correção de fase de ordem zero foi permitida e o sinal TMSP-d4 foi calibrado para 0,0 ppm.

Os dados espectrais foram exportados para a versão Amix 3.9.3 para a triagem das amostras. Uma *bucketing* foi feita entre 0,90 – 9,00 ppm, dividindo-se a região em 400 segmentos sequenciais ou “compartimentos” obtendo-se uma integral para cada segmento. As regiões da carnosina (8,50 – 8,30 ppm), água residual (5,00 – 4,65 ppm), e ambas regiões vazias, esquerda (9,00 – 15,00 ppm) e direita (0,90 – -5,00 ppm) foram excluídas. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada por dois diferentes métodos: dimensionamento para variância de unidade e Pareto e sem dimensionamento. Os melhores resultados para as análises foram alcançados utilizando-se o método sem dimensionamento com largura de buckets de 0,05 ppm.

3.6.2. Metabolômica *targeted*

Para fins de comparação e complemento das informações sobre os valores de concentração dos metabólitos quantificados por HESI-HRMS, foram realizadas análises de ^1H -RMN *targeted* em parceria com a doutoranda Andressa de Zawadzki.

Os extratos de carne foram analisados por espectroscopia de ^1H -RMN de alta resolução. Os espectros de ^1H -RMN das soluções dos extratos de carne foram obtidos a 25 °C em um espectrômetro Agilent DD2 500 MHz, Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA), fazendo-se a supressão do sinal da água com a sequência de pulso para pré-saturação zgpcpr. Foram recolhidos 256 transientes em 32 K pontos abrangendo uma largura espectral de 20,55

ppm, sendo o *delay* de relaxamento utilizado para a pré-saturação de 4 s. As correções de fase e de linha de base dos espectros foram feitas automaticamente usando o software VnmrJ 4.0 da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA), sendo o deslocamento químico da referência interna (TMSP-d4) calibrado para 0,0 ppm.

A atribuição dos sinais nos espectros foi feita por comparação dos espectros da base de dados presente no software Chenomx NMR Suite 7.7 (Chenomx Inc., Edmonton, AB, Canadá), a fim de identificar os metabólitos polares nos extratos de carne. A partir das informações do banco de dados, o “*fingerprinting*” do espectro de metabólitos foi gerado usando-se um modelo Lorentziano de sinais por comparação com o espectro real. As concentrações individuais de metabólitos foram determinadas utilizando a biblioteca de 500 MHz do software Chenomx NMR Suite 7.7, tomando como referência a concentração TMSP-d4 como 1 mM. A concentração média de metabólitos foi calculada utilizando os valores de três amostras de cada dieta animal. A atribuição dos espectros de ^1H -RMN foi obtida por dados na literatura (Graham *et al*, 2010) ou adição de compostos padrão na amostra.

3.7. Espectrometria de massas de alta resolução (HESI-HRMS)

Os experimentos para a identificação dos metabólitos polares foram realizados em um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência Accela 1250 pump, acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução da Thermo Scientific modelo LTQ Orbitrap Velos (Bremen, Alemanha) com ionização por *electrospray* com aquecimento (HESI) operando no modo positivo e negativo. As amostras foram injetadas por um amostrador automático Accela Open via injeção direta. Para prevenir o efeito matriz foi utilizada uma coluna RAM-BSA C8 (50 x 4,6 mm, 10 μm e 100 Å) de albumina sérica imobilizada, o fluxo da fase móvel de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ e o volume de injeção de 10 μL . A fase móvel utilizada consistiu em um gradiente de água/ácido fórmico 0,1% v/v (A) e metanol/ácido fórmico 0,1% v/v (B) descrito na **Tabela 2**.

Tabela 2. Gradiente de eluição utilizado na identificação dos compostos fenólicos presentes no extrato e folhas de mate.

Tempo (minutos)	% da fase B
0	0
2	0
11	100
12	0
13	0

3.8. Análise de componentes principais do perfil metabólico

As análises dos dados multivariados foram realizadas pelo software Statistica, versão 12 da StatSoft (Tulsa, OK, EUA) usando o método de correlação sobre os dados obtidos da abordagem metabolômica quantitativa determinada por espectroscopia de ^1H -RMN e espectrometria de massas em conjunto. As variáveis foram pré-selecionadas baseadas na variabilidade dos valores dos dados utilizando a análise de variância (ANOVA, $p = 0,05$). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada pelo uso da média dos dados para as concentrações dos metabólitos determinadas nos extratos de carne como x-variáveis. Cada tratamento foi representado pela amostra de três animais para a investigação de qualquer agrupamento dos dados.

3.9. Investigação da estabilidade redox de carne por ressonância paramagnética de elétrons

O uso de *spin-traps* (armadilha química de radicais) vem sendo empregado eficientemente para avaliar a estabilidade redox de compostos submetidos a condições oxidativas. Sob essas condições, componentes do tecido muscular podem formar radicais altamente reativos e com tempos de vida curtos, os quais se ligam quimicamente ao *spin-trap* (**Figura 7**) e formar adutos radicais mais estáveis e com tempo de vida maior, que podem ser

monitorados à temperatura ambiente por RPE, fornecendo espectros com perfis característicos.

Figura 7. Formação do aduto radical pelo uso de *spin traps*.

Fonte: Autoria própria.

A estabilidade redox da carne foi investigada pela técnica de *spin-trapping* monitorando-se a formação do aduto radical PBN (*N-tert*-butil- α -fenilnitrona) (Bolumar *et al*, 2012) formado em homogenatos de carne durante a incubação térmica a 65 ° C. Aproximadamente 1 g de carne foi homogeneizado em 6 mL de tampão MES pH 5,7 usando um homogeneizador Ultra Turrax da Janke & Kunkel (Staufen, Alemanha). Em seguida, 450 uL de solução 395 mM de PBN dissolvido em etanol foram adicionados aos homogenatos obtidos, que foram então centrifugados por 10 minutos a 10 °C e a 10000 rpm. Aliquotas de 1 mL dos centrifugados (sobrenadante e *pellet*) foram incubadas a 65° C antes de obterem-se os espectros de RPE. A cada 1 hora, uma alíquota de 1 mL foi recolhida, resfriada à temperatura ambiente e transferida a um capilar de 50 uL da Blaubrand Intramark (Wertheim, Alemanha) alocado no interior da cavidade do espectrômetro de EPR Bruker, modelo EMXplus (Rheinstetten, Alemanha) por meio de um sistema em fluxo usando-se uma bomba peristáltica e cânulas de teflon. Os espectros de RPE dessas soluções foram obtidos a temperatura ambiente e os parâmetros utilizados no experimento foram: campo magnético central: 3490,0 G; frequência: 9,8 GHz; potência: 10,0 mW; modulação de frequência: 100,00 kHz; modulação da amplitude: 2,00 G. Foram acumulados 16 varreduras para cada espectro.

3.10. Extração de CLA da carne

Aproximadamente 5,0 g de carne foram liofilizados por 24 horas em um ModulyoD 115 da Thermo Electron Corporation (Asheville, NC, EUA). A carne liofilizada foi macerada, dividida em duas porções de 0,50 g para uma melhor extração e adicionados 3,0 mL de solução clorofórmio/metanol (2:1) v/v. As amostras foram homogeneizadas utilizando um homogeneizador Ultra 80 da Ultra Stirrer e, posteriormente, foram centrifugadas a 10000 g por 10 min a 10 °C para a remoção de proteínas precipitadas, gordura e tecido conjuntivo. O sobrenadante foi coletado para ambas as porções, transferido para um mesmo tubo Eppendorf e seco por 24 horas em um concentrador Speed-Vac, modelo SPD131DDA-115 da Thermo Savant (Holbrook, NY, EUA). O extrato de carne seco foi ressuspensionado em 1 mL de etanol e filtrado.

3.11. Quantificação de CLA total via APCI-HRMS

Os experimentos para a identificação de CLA total foram realizados via injeção em fluxo em um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência Accela 1250 pump acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução da Thermo Scientific modelo LTQ Orbitrap Velos (Bremen, Alemanha) com ionização química à pressão atmosférica (APCI) operando no modo negativo. As amostras foram injetadas por um amostrador automático Accela Open via injeção direta. Para prevenir o efeito matriz foi utilizada uma coluna RAM-BSA C8 (50 x 4,6 mm, 10 µm e 100 Å) de albumina sérica imobilizada, o fluxo da fase móvel de 300 µL min⁻¹ e o volume de injeção de 10 µL. A fase móvel utilizada consistiu em uma eluição isocrática (1/9, v/v) de água/ácido fórmico (0,1% v/v) (A) e acetonitrila/ácido fórmico (0,1% v/v) (B).

3.12. Desenvolvimento e aplicação de dispositivo microfluídico e estudo cinético de reações de oxidação do monitoradas por NSI-MS

A fabricação dos dispositivos microfluídicos foi modificada de métodos previamente reportados (Duarte *et al*, 2011, Duarte *et al*, 2012, Nge *et al*, 2013 e Thompson *et al*, 2015). O dispositivo microfluídico foi confeccionado em várias camadas (**Figura 8**). Os componentes utilizados na fabricação do microchip, as entradas e canais foram desenhados utilizando-se o software LibreCAD (*open source*) e cortados utilizando-se uma cortadora a laser a CO₂ de alta potência Kawai Laser 600 x 400 da Kawai Advanced Technology (China). A base do dispositivo, a base para a entrada de reagentes e o suporte de saída do capilar de ionização foram fabricados em polimetil-metacrilato (PMMA). O canal onde ocorre a mistura das soluções, foi feito em fita dupla-face. Após o corte dos canais, a fita foi posta entre duas folhas de transparência, uma inferior, formando a base e outra superior, formando a tampa. Na tampa, foram feitos cortes (em formato circular) para entrada de reagentes e para o eletrodo (platina). Sobre as entradas de reagente foram conectadas as ponteiros coladas às bases de PMMA e para garantir a perfeita fixação eletrodo de platina foi utilizado adesivo cianoacrilato. A base inferior de poliéster foi fixada a uma chapa de PMMA (2 mm) utilizando-se fita dupla face. No final do canal de reação foi introduzido um capilar de sílica-fundida com 200 e 75 µm (d.i. e d.e., respectivamente). A função desse capilar foi a de produzir um *spray* mais constante e robusto. O fornecimento de metanol (que auxilia na diminuição da tensão superficial da solução e na desolvatação dos analitos) foi realizado colocando-se um adaptador feito em PMMA (ampliação apresentada na **Figura 8**) ao redor do capilar de 200 µm. O metanol era levado a esse adaptador através de um capilar de sílica-fundida com 360 e 75 µm (d.i. e d.e., respectivamente) (Hoffman e Stroobant, 2007).

Figura 8. (A) Corte transversal e (B) vista superior do dispositivo microfluídico. As ampliações apresentam o adaptador utilizado para o fornecimento de metanol para a formação de um spray mais robusto e uniforme.

Fonte: Autoria própria.

A tensão para a formação do *spray* foi aplicada por uma fonte de alta voltagem (1,7 kV) proveniente do espectrômetro de massas e que foi conectada ao eletrodo de platina do microchip com o auxílio de um conector tipo jacaré. A distância do capilar de ionização à entrada do espectrômetro de massas LTQ XL da Thermo Scientific (Bremen, Alemanha) operando no modo positivo de ionização foi controlada por um posicionador XYZ. Para monitorar a formação do nanospray com maior precisão foi conectado um sistema de microcâmeras e monitor à fonte de ionização que permitiu (**Figura 9**).

Figura 9. (a) Sistema de bombeamento ligado ao dispositivo microfluídico conectado ao sistema de ionização por *electrospray* e monitorado por microcâmeras e (b) detalhe do posicionamento do dispositivo em frente à entrada do espectrômetro de massas.

(a)

(b)

Fonte: Autoria própria.

Os experimentos para o estudo cinético foram realizados pelo bombeamento dos reagentes no dispositivo microfluídico utilizando-se bombas seringa modelo NE-1000 da New

Era Pump Systems (Farmingdale, NY, EUA) e pelo monitoramento dos sinais dos íons formados e consumidos durante a reação.

O reagente A consistiu em uma solução de serina 100 μM como referência interna e carnosina 5,0 e 7,5 μM como o substrato a ser oxidado e o reagente B consistiu em uma solução de ferrilmioglobina 40 μM como oxidante. A solução de ferrilmioglobina foi preparada através da reação entre uma solução de mioglobina com peróxido de hidrogênio em duas vezes o excesso molar com relação à mioglobina.

Os reagentes foram bombeados em fluxos de 1600, 1400, 1200, 1000, 800, 600, 400 nL min^{-1} que devido ao volume constante do canal, levaram à variação dos tempos de reação de 26 a 170 s.

Para o estudo cinético da reação de oxidação foi monitorado o consumo do íon $[\text{M}+\text{H}]^+ 227 \text{ m/z}$ referente à carnosina em relação ao íon $[\text{M}+\text{H}]^+ 106 \text{ m/z}$ referente à serina, utilizada com referência interna, em função do aumento da concentração da ferrilmioglobina com o tempo de reação.

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise dos compostos fenólicos dos extratos de erva-mate via UHPLC-HESI-HRMS

A primeira etapa dos estudos da suplementação animal consistiu em caracterizar os compostos fenólicos presentes nas folhas e extratos de erva-mate. Para tanto se procedeu com o desenvolvimento do método de extração dos componentes fenólicos presentes nas folhas de erva-mate e no extrato processado. Foram avaliadas diversas condições de extração empregando-se um homogeneizador de ruptura mecânica de tecido biológico FastPrep®-24 MP Biomedicals. Obteve-se a melhor condição de extração empregando-se 1,5 mL de solução água/metanol (1:1) v/v e uma pérola de porcelana. Foram pesados 10 mg de amostra em um tubo extrator e adicionados 1,5 mL de solução água/metanol (1:1) v/v, 10 mg de amostra e uma esfera sextavada de cerâmica. As amostras foram agitadas a uma velocidade de $5,0 \text{ ms}^{-1}$ durante 120 s em banho de gelo. Os extratos foram então submetidos à análise qualitativa utilizando o sistema UHPLC-HESI-MS de alta resolução, que propiciou a identificação de 35 compostos fenólicos presentes no extrato e folhas de erva-mate processados e fornecidos pela empresa Centroflora. A **Figura 10** ilustra os cromatogramas de íon total registrados para os extratos processados e folhas de erva-mate.

Figura 10. Cromatogramas de íons totais (TIC) da amostra de extrato e folhas de mate: **(a)** extrato do lote 110113.81, **(b)** extrato do lote 120412.571, **(c)** extrato do lote 130712.1039, **(d)** caixa, **(e)** folhas cultivadas com exposição direta ao sol, **(f)** folhas cultivadas sob sombra da mata e **(g)** sobreposição dos cromatogramas (e) e (f).

Fonte: Autoria própria.

Os compostos positivamente identificados nos cromatogramas da **Figura 10**, com base nos espectros de massa exata e nos padrões de fragmentação foram reportados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Compostos fenólicos identificados no extrato e folhas de erva-mate.

Compostos fenólicos	Íon Pseudo-Molecular	T _R (min)	[M-H] ⁻ calculada	[M-H] ⁻ obtida	Erro (ppm)
Ácido gentísico	C ₇ H ₅ O ₄ ⁻	7,7	153,01933	153,01945	0,80
Ácido <i>p</i> -cumárico	C ₉ H ₇ O ₃ ⁻	15,5	163,04007	163,04015	0,48
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	C ₈ H ₇ O ₄ ⁻	6,2	167,03498	167,03508	0,57
Ácido gálico	C ₇ H ₅ O ₅ ⁻	4,8	169,01425	169,01433	0,48
Ácido chiquímico	C ₇ H ₉ O ₅ ⁻	1,4	173,04555	173,04552	-0,17
Ácido cafeico	C ₉ H ₇ O ₄ ⁻	12,8	179,03498	179,03487	-0,65
Ácido quínico	C ₇ H ₁₁ O ₆ ⁻	1,4	191,05611	191,05597	-0,74
Ácido ferúlico	C ₁₀ H ₉ O ₄ ⁻	16,6	193,05063	193,05057	-0,33
Xantoxilina	C ₁₀ H ₁₁ O ₄ ⁻	4,4	195,06628	195,06644	0,79
Kaempferol	C ₁₅ H ₉ O ₆ ⁻	26,4	285,04046	285,04053	0,23
Catequina/Epicatequina	C ₁₅ H ₁₃ O ₆ ⁻	17,5	289,07176	289,07172	-0,15
Ácido Elágico	C ₁₄ H ₅ O ₈ ⁻	19,9	300,99899	300,99863	-1,21
Quercetina	C ₁₅ H ₉ O ₇ ⁻	24,4	301,03538	301,03522	-0,53
Galocatequina	C ₁₅ H ₁₃ O ₇ ⁻	16,5	305,06662	305,06625	1,38
Ácido cafeoiltartárico	C ₁₃ H ₁₁ O ₉ ⁻	11,3	311,04086	311,04019	-2,13
Ácido cafeoilchiquímico	C ₁₆ H ₁₅ O ₈ ⁻	14,9	335,07724	335,07733	0,27
Ácido cumaroilquínico	C ₁₆ H ₁₇ O ₈ ⁻	13,6	337,09289	337,09280	-0,26
Ácido Dicafeico	C ₁₈ H ₁₃ O ₇ ⁻	13,8	341,06668	341,06650	-0,52
Ácido 4-feruloilchiquímico	C ₁₇ H ₁₇ O ₈ ⁻	17,4	349,09289	349,09253	-1,04
Ácido cafeoilquínico	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ ⁻	11,9	353,08781	353,08688	-2,61
Ácido feruloilquínico	C ₁₇ H ₁₉ O ₉ ⁻	14,6	367,10346	367,10303	-1,17
Epicatequina galato	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₀ ⁻	20,8	441,08272	441,08179	-2,11
Kaempferol-3- <i>o</i> -glicosídeo	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	16,6	447,09328	447,09328	0,22
Epicatequina metilgalato	C ₂₃ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	13,0	455,09837	455,09738	-2,17
Quercetina-3- <i>o</i> -glicosídeo	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	19,2	463,08820	463,08777	-0,93
Metilepigalocatequina galato	C ₂₃ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	17,9	471,09328	471,09317	-0,24
Ácido dicafeoilchiquímico	C ₂₅ H ₂₁ O ₁₁ ⁻	23,5	497,10893	497,10907	0,27
Ácido <i>p</i> -cumaroilcafeoilquínico	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₁ ⁻	22,2	499,12458	499,12469	0,22
Ácido dicafeoilquínico	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂ ⁻	18,5	515,11950	515,11950	-0,81
Ácido cafeoilferuloilquínico	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	22,4	529,13515	529,13495	-0,38
Ácido diferuloilquínico	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₂ ⁻	21,5	543,15080	543,15039	-0,75
Ácido cafeoilsinapoilquínico	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₃ ⁻	21,2	559,14571	559,14508	-1,13
Rutina	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	19,0	609,14611	609,14490	-1,99
Ácido 3,4,5-tricafeoilquínico	C ₃₄ H ₂₉ O ₁₅ ⁻	24,4	677,15119	677,15021	-1,46
Ácido 3,4-di-cafeoil-5-feruloilquínico	C ₃₅ H ₃₁ O ₁₅ ⁻	26,6	691,16684	691,16656	-0,40

Com base na intensidade dos picos cromatográficos dos compostos identificados no extrato de mate (**Tabela 3**) e na disponibilidade comercial dos padrões de referência, os compostos fenólicos majoritários identificados e selecionados para quantificação foram: ácido

1,3-dicafeoilquínico, ácido 1,5-dicafeoilquínico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido quínico, ácido chiquímico, kaempferol, quercetina e rutina (**Figura 6**).

A **Tabela 4** reporta os dados quantitativos referentes à análise dos compostos fenólicos majoritários nos diferentes extratos de folha de mate e no extrato processado.

As folhas de erva-mate provenientes da exposição direta ao sol apresentaram maiores quantidades de compostos fenólicos totais quando comparadas às folhas de erva-mate cultivadas sob a sombra da mata, como era esperado, já que exposição à radiação UV aciona a via do ácido chiquímico do metabolismo secundário para produzir substâncias fenólicas para a proteção do organismo dos efeitos prejudiciais da radiação UV (Azmir *et al*, 2013 e Cartea *et al*, 2011). Mudanças qualitativas não foram observadas nos cromatogramas gerados por UHPLC-HESI-MS, que sugerem que a diferença entre os dois tipos de cultivo são principalmente devido à quantidade total de compostos fenólicos.

Os extratos de erva-mate também não apresentaram mudanças qualitativas nos cromatogramas gerados por UHPLC-HESI-MS. As diferenças observadas nos extratos analisados são referentes apenas aos teores de compostos fenólicos que apresentaram concentrações na mesma ordem de grandeza. Os compostos fenólicos mais abundantes em todos os extratos de erva-mate analisados foram o ácido clorogênico e o ácido 1,5-dicafeoilquínico que representam mais de 75% do teor total de compostos fenólicos quantificados para todos os extratos.

Com o intuito de investigar a biodisponibilidade e a absorção destes compostos fenólicos pelos animais, foram realizadas análises destes compostos nos extratos de carne, entretanto não foi identificado nenhum destes compostos presentes nos extrato de erva-mate ou seus conhecidos metabólitos bacterianos (Gronthier *et al*, 2003) como o ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido fenilpropanoico e ácido benzoico nos extratos de carne com um limite de detecção de 200 nmol L⁻¹, que sugere claramente que o local de ação dos compostos fenólicos é no rúmen.

Tabela 4. Compostos fenólicos identificados e quantificados no extrato (mg g⁻¹ de extrato) e folhas de erva-mate (mg g⁻¹ de folha).

Composto Fenólico	Extrato Lote 110113.81 (mg g ⁻¹ de extrato)	Extrato Lote 120412.571 (mg g ⁻¹ de extrato)	Extrato Lote 130712.1039 (mg g ⁻¹ de extrato)	Extrato Projeto BEAM (mg g ⁻¹ de extrato)	Folhas Sol (mg g ⁻¹ de folha)	Folhas Sombra (mg g ⁻¹ de folha)
ácido 1,3-dicafeoilquinico	9,41 ± 0,34 10 ⁻²	4,18 ± 0,42 10 ⁻²	4,40 ± 0,38 10 ⁻²	9,14 ± 0,43 10 ⁻²	LLQ	LLQ
ácido 1,5-dicafeoilquinico	5,21 ± 0,01	5,24 ± 0,01	4,91 ± 0,01	6,01 ± 0,01	4,50 ± 0,01	4,40 ± 0,01
ácido cafeico	5,78 ± 0,01 10 ⁻¹	4,78 ± 0,02 10 ⁻¹	5,19 ± 0,02 10 ⁻¹	8,13 ± 0,02 10 ⁻¹	6,42 ± 0,16 10 ⁻²	5,51 ± 0,15 10 ⁻²
ácido clorogênico	10,15 ± 0,01	9,26 ± 0,01	8,66 ± 0,01	12,30 ± 0,01	3,81 ± 0,01	3,83 ± 0,01
ácido <i>p</i> -cumárico	8,56 ± 1,44 10 ⁻³	LLQ	LLQ	6,25 ± 1,80 10 ⁻³	LLQ	LLD
ácido elágico	1,31 ± 0,38 10 ⁻²	1,35 ± 0,46 10 ⁻²	LLQ	LLQ	LLQ	LLQ
ácido ferúlico	1,70 ± 0,07 10 ⁻²	1,09 ± 0,08 10 ⁻²	1,04 ± 0,07 10 ⁻²	5,45 ± 0,08 10 ⁻²	LLQ	LLQ
ácido gálico	9,83 ± 3,43 10 ⁻³	1,31 ± 0,41 10 ⁻²	LLQ	1,79 ± 0,43 10 ⁻²	LLQ	LLQ
ácido quínico	8,77 ± 0,06 10 ⁻¹	7,79 ± 0,08 10 ⁻¹	7,05 ± 0,07 10 ⁻¹	8,77 ± 0,06 10 ⁻¹	5,22 ± 0,07 10 ⁻¹	5,16 ± 0,07 10 ⁻¹
ácido chiquímico	LLQ	LLQ	LLQ	1,17 ± 0,01 10 ⁻²	LLQ	LLQ
kaempferol	LLD	LLD	LLD	LLD	LLQ	LLQ
quercetina	1,50 ± 0,03 10 ⁻¹	3,72 ± 0,38 10 ⁻²	5,75 ± 0,35 10 ⁻²	1,12 ± 0,04 10 ⁻¹	2,60 ± 0,03 10 ⁻¹	1,37 ± 0,03 10 ⁻¹
rutina	6,34 ± 0,02 10 ⁻¹	8,10 ± 0,02 10 ⁻¹	7,55 ± 0,02 10 ⁻¹	8,55 ± 0,02 10 ⁻¹	1,02 ± 0,01	2,98 ± 0,02 10 ⁻¹
Total	17,74 ± 0,04	16,68 ± 0,05	15,66 ± 0,04	21,15 ± 0,04	10,18 ± 0,04	9,24 ± 0,03

LQ = 6,09 10⁻³ mg g⁻¹ de extrato ou folha de mate

LD = 3,10 10⁻⁶ mg g⁻¹ de extrato ou folha de mate

Em complemento às análises por UHPLC-HESI-HRMS, foram feitas análises de ^1H -RMN do perfil metabolômico das folhas de erva-mate que igualmente não demonstraram diferenças qualitativas entre os dois tipos de cultivo. A diferença entre as folhas de erva-mate colhidas entre os dois tipos de cultivo é, sobretudo ao teor total de compostos fenólicos como pode ser verificado pelos espectros de ^1H -RMN contidos na **Figura 11**.

Figura 11. Espectros de ^1H -RMN (500 MHz) das folhas de erva-mate cultivadas com exposição direta ao sol (vermelho), folhas cultivadas sob sombra da mata (preto), a sobreposição entre ambos e um zoom na região dos polifenóis aromáticos.

Fonte: Imagens cedidas por Andressa Zawadzki

4.2. Investigação do perfil metabolômico dos animais suplementados com extrato de erva-mate

Para a investigação do perfil metabolômico foram analisadas 48 amostras de carne na forma de extrato água/metanol (1:1) v/v suplementadas com diferentes quantidades de extrato de mate, que foram caracterizadas pelo teor de seus compostos bioativos. A carne do músculo *Longissimus thoracis et lumborum* foi coletada e foram preparados os extratos de carne dos diferentes tratamentos que foram submetidos a uma triagem por ^1H -RMN para uma análise metabolômica qualitativa (**Figura 12**).

Figura 12. Espectro de ^1H -RMN (600 MHz) de extrato de carne bovina. A referência utilizada foi TMSP-d4 (0 ppm). Os picos majoritários identificados: (A) leucina/isoleucina/valina; (B) lactato; (C) alanina; (D) glutamina/glutamato; (E) aspartato; (F) creatina; (G) região de carboidratos (glucose, adenosina, ribose); (H) carnosina; (I) adenina/hipoxantina; (J) adenosina/ inosina/carnosina; (K) ATP.

Fonte: Imagem cedida por Andressa Zawadzki

Com o intuito de verificar diferença do perfil metabolômico entre as carnes de animais suplementados com diferentes níveis de extrato de mate, foi efetuada uma análise exploratória através do emprego da análise de componentes principais (PCA) dos espectros de ^1H -RMN

dos extratos das carnes. Foram identificados três significantes PC's, que juntas explicam 96% da variância total observada no espectro (PC1 85%, PC2 7%, e PC3 4%). **Figura 13 (A, B e C)** ilustra o agrupamento e comportamento dos extratos de carne de animais suplementados com diferentes quantidades de extrato de mate em função do perfil qualitativo do espectro de ^1H -RMN. As **Figuras 13 D (PC1), 13 E (PC2) e 13 F (PC3)** apresentam o gráfico de *loadings* para as variáveis representativas para o agrupamento e separação em função da dieta do animal.

As amostras dos extratos de carne dos animais que não foram alimentados com extrato de mate apresentaram uma grande variabilidade nos resultados das PCA's, porém, estas amostras demonstraram uma tendência em ficar na região positiva da PC1 (**Figuras 13 A e B**) e PC2 (**Figura 13 C**). As **Figuras 13 D e 13 E** sugerem que os sinais da anserina, carnosina, lactato e carnitina são responsáveis pela alta variabilidade destas amostras. As amostras dos extratos de carne do gado alimentado com extrato de erva-mate apresentaram uma tendência na formação de agrupamentos menores. As amostras com animais suplementados com 1,0 % de extrato de mate formaram um agrupamento pequeno e na região positiva da PC1 e PC2 e negativa na PC3. Os sinais de anserina, carnitina, carnosina, lactato, creatina, glicerol e IMP foram identificados nos gráficos de *loadings* (**Figuras 13 D, E e F**) como responsáveis por esse pequeno agrupamento. Diferentemente das amostras com animais suplementados com 1,0 % de extrato de mate, as amostras dos tratamentos com 0,5 e 1,5 % de extrato de mate demonstraram uma alta variabilidade nas PCA's das **Figuras 13 A e B**. Entretanto, as amostras dos animais suplementados com 1,5 % de extrato de mate agruparam-se mais vagamente na região positiva da PC3 próxima ao centro da PCA (**Figura 13 C**). Os sinais dos metabólitos creatina, carnitina, lactato, carnosina, glicerol, anserina e IMP foram responsáveis pelas informações principais das amostras dos grupos dos tratamentos com 0,5 e 1,5 % de extrato de mate. Portanto, seguindo as análises dos espectros de ^1H -RMN dos extratos das carnes como uma triagem inicial de dados, foi realizada a quantificação individual das amostras para cada amostra de carne.

Figura 13. Análise de Componentes Principais (PCA) realizada sobre os espectros de ^1H -NMR dos extratos de carne dos animais alimentados com diferentes teores de extrato de mate (0 %, 0,5 %, 1,0 % e 1,5 %). Cada amostra de carne é representada por um número colorido de acordo com o nível de extrato de mate na dieta e uma letra foi usada para diferenciar animais com o mesmo tratamento. **(A)** PC1 vs PC2; **(B)** PC1 vs PC3; **(C)** PC2 vs PC3. Gráfico de *loadings* para as correlações PC-variáveis **(D)** PC1, **(E)** PC2 e **(F)** PC3.

Fonte: Autoria própria.

Mais de 30 metabólitos polares foram identificados e quantificados pela técnica de espectroscopia de massas de alta resolução nos extrato de carne. Destes compostos, os metabólitos asparagina, glicina, colina, lisina e arginina mostraram variação significativa ($p < 0,05$) para os extratos de carne dos animais com diferentes tratamentos com extrato de mate. Os outros metabólitos apresentaram desvios padrão para os tratamentos maiores que a variabilidade dos valores das variáveis entre os extratos de carne dos diferentes grupos de tratamento.

As amostras de extratos de carne foram injetadas seguindo duas metodologias diferentes. Primeiramente a injeção das amostras foi feita em fluxo contínuo de solvente para uma análise extremamente rápida e o outro método consistiu na adição de uma coluna RAM-C8-BSA como etapa adicional onde o tempo de análise foi acrescentado em poucos minutos. A técnica cromatográfica de análise empregando-se o uso da coluna RAM-C8-BSA utilizando detecção de massas de alta resolução mostrou-se uma técnica eficaz, rápida e abrangente para o estudo do perfil metabólico. A metodologia implementada além de diminuir drasticamente o tempo de análise se comparada à cromatografia tradicional, elimina o efeito matriz causado em decorrência da presença de proteínas presentes na amostra. A **Tabela 5** mostra as concentrações dos metabólitos polares encontrados nos extratos de carne suplementados com diferentes quantidades de extrato de erva-mate utilizando a injeção em fluxo contínuo de solvente e na **Tabela 6** as mesmas amostras foram quantificadas com uso de uma etapa adicional de limpeza, utilizando-se de colunas RAM-C8-BSA que apresentam alta capacidade de exclusão de componentes macromoleculares presentes na matriz.

Tabela 5. Concentração de metabólitos polares (n = 12, $\mu\text{mol g}^{-1}$ carne) analisados por HESI-HRMS de extratos em metanol/água (1:1) de carne de animais com diferentes concentrações de extrato de erva-mate na dieta.

	Concentração de extrato de erva-mate (%)			
	0,0	0,5	1,0	1,5
Lactato	1,357 $\pm$ 0,083	1,367 $\pm$ 0,086	1,399 $\pm$ 0,107	1,396 $\pm$ 0,099
Alanina	0,858 $\pm$ 0,016	0,844 $\pm$ 0,013	0,805 $\pm$ 0,010	0,793 $\pm$ 0,007
Prolina	0,033 $\pm$ 0,003	0,032 $\pm$ 0,002	0,031 $\pm$ 0,003	0,030 $\pm$ 0,003
Succinato	0,075 $\pm$ 0,005	0,110 $\pm$ 0,008	0,152 $\pm$ 0,006	0,117 $\pm$ 0,005
Metionina	LLQ	LLQ	LLQ	LLQ
Aspartato	0,012 $\pm$ 0,002	0,010 $\pm$ 0,001	0,007 $\pm$ 0,002	0,009 $\pm$ 0,002
Glutamina	1,663 $\pm$ 0,007	1,661 $\pm$ 0,013	1,221 $\pm$ 0,011	1,487 $\pm$ 0,017
Asparagina	LLQ	LLQ	LLQ	LLQ
Glutamato	0,091 $\pm$ 0,001	0,081 $\pm$ 0,001	0,064 $\pm$ 0,001	0,077 $\pm$ 0,001
Creatina	17,69 $\pm$ 0,21	17,56 $\pm$ 0,19	19,06 $\pm$ 0,23	17,14 $\pm$ 0,23
Creatinina	0,070 $\pm$ 0,002	0,063 $\pm$ 0,003	0,087 $\pm$ 0,003	0,067 $\pm$ 0,004
Glicina	0,104 $\pm$ 0,003	0,097 $\pm$ 0,002	0,095 $\pm$ 0,003	0,092 $\pm$ 0,002
Treonina	LLQ	LLQ	LLQ	LLQ
Colina	0,020 $\pm$ 0,002	0,021 $\pm$ 0,002	0,016 $\pm$ 0,002	0,018 $\pm$ 0,002
Uridina	0,0020 $\pm$ 0,0001	0,0018 $\pm$ 0,0001	0,0016 $\pm$ 0,0001	0,0017 $\pm$ 0,0001
Serina	0,058 $\pm$ 0,004	0,055 $\pm$ 0,003	0,048 $\pm$ 0,004	0,048 $\pm$ 0,003
Tirosina	LLQ	LLQ	LLQ	LLQ
Lisina	0,047 $\pm$ 0,001	0,045 $\pm$ 0,001	0,039 $\pm$ 0,001	0,036 $\pm$ 0,001
Carnosina	2,198 $\pm$ 0,022	2,226 $\pm$ 0,025	2,612 $\pm$ 0,027	2,131 $\pm$ 0,024
Carnitina	1,642 $\pm$ 0,009	1,644 $\pm$ 0,009	1,585 $\pm$ 0,008	1,535 $\pm$ 0,012
Inosina	0,065 $\pm$ 0,007	0,067 $\pm$ 0,006	0,067 $\pm$ 0,006	0,056 $\pm$ 0,006
Arginina	0,0528 $\pm$ 0,0003	0,0554 $\pm$ 0,0004	0,0430 $\pm$ 0,0005	0,0453 $\pm$ 0,0005
Citrato	0,047 $\pm$ 0,003	0,050 $\pm$ 0,005	0,028 $\pm$ 0,003	0,046 $\pm$ 0,003
Anserina	0,299 $\pm$ 0,002	0,292 $\pm$ 0,002	0,368 $\pm$ 0,002	0,300 $\pm$ 0,002
Homosserina	LLQ	LLQ	LLQ	LLQ
Glutationa	0,091 $\pm$ 0,001	0,081 $\pm$ 0,004	0,077 $\pm$ 0,002	0,074 $\pm$ 0,002
Citrulina	0,0018 $\pm$ 0,0004	0,0019 $\pm$ 0,0004	0,0021 $\pm$ 0,0004	0,0018 $\pm$ 0,0005
Fenilalanina	0,010 $\pm$ 0,001	0,009 $\pm$ 0,001	0,008 $\pm$ 0,001	0,008 $\pm$ 0,001
Hipoxantina	0,089 $\pm$ 0,005	0,085 $\pm$ 0,006	0,084 $\pm$ 0,006	0,077 $\pm$ 0,007
Nicotinurato	LLQ	LLQ	LLQ	LLQ
Triptofano	LLQ	LLQ	LLQ	LLQ

LLD = 0,0001 $\mu\text{mol g}^{-1}$ carne; LLQ = 0,0025 $\mu\text{mol g}^{-1}$ carne

Tabela 6. Concentração de metabólitos polares (n = 12, $\mu\text{mol g}^{-1}$ carne) analisados por HESI-HRMS de extratos em metanol/água (1:1) de carne de animais com diferentes concentrações de extrato de erva-mate na dieta utilizando-se uma coluna RAM-C8-BSA (10 μm , 100 Å) de albumina sérica imobilizada.

	Concentração de extrato de erva-mate (%)				Valor-P
	0,0	0,5	1,0	1,5	
Alanina	1,743±0,027	1,732±0,028	1,706±0,018	1,701±0,022	0,817
Prolina	0,104±0,001	0,106±0,001	0,099 ±0,001	0,103±0,001	0,420
Succinato	0,177±0,006	0,182±0,003	0,211 ±0,009	0,216±0,006	0,553
Metionina	0,036±0,001	0,036±0,001	0,027±0,001	0,035±0,001	0,363
Aspartato	0,011±0,003	0,014±0,003	0,012±0,002	0,009±0,003	0,253
Glutamina	0,965±0,014	1,125±0,018	0,818±0,019	0,894±0,011	0,151
Asparagina	0,0115±0,0002	0,0122±0,0001	0,0096±0,0001	0,0105±0,0002	0,006
Glutamato	0,084±0,006	0,096±0,006	0,084±0,003	0,101±0,007	0,498
Creatina	4,896±0,045	4,827±0,047	5,081±0,042	5,024±0,045	0,073
Creatinina	0,146±0,002	0,144±0,001	0,146±0,002	0,155±0,002	0,074
Glicina	0,522±0,009	0,502±0,012	0,440±0,007	0,482±0,010	0,008
Treonina	0,050±0,003	0,053±0,002	0,051±0,002	0,053±0,003	0,843
Colina	0,0094±0,0002	0,0084±0,0001	0,0070±0,0001	0,0073±0,0001	0,023
Uridina	0,006±0,001	0,006±0,001	0,006±0,001	0,006±0,001	0,736
Serina	0,161±0,009	0,176±0,008	0,159±0,004	0,170±0,011	0,607
Tirosina	0,042±0,001	0,043±0,001	0,034±0,001	0,041±0,001	0,097
Lisina	0,046±0,001	0,045±0,004	0,037±0,002	0,039±0,001	0,013
Carnosina	3,477±0,035	3,372±0,037	3,712±0,037	3,601±0,038	0,114
Carnitina	1,375±0,016	1,408±0,012	1,337±0,012	1,346±0,017	0,531
Inosina	0,973 ±0,014	0,912 ±0,018	0,942 ±0,013	0,982 ±0,012	0,483
Arginina	0,053±0,001	0,059±0,001	0,045±0,001	0,050±0,001	0,036
Anserina	0,391±0,005	0,360±0,004	0,418±0,004	0,403±0,005	0,519
Homosserina	0,0188±0,0002	0,0201±0,0002	0,0176±0,0001	0,0177±0,0001	0,119
Glutationa	0,624±0,015	0,660±0,017	0,578±0,011	0,595±0,015	0,086
Citrulina	0,0043±0,0003	0,0042±0,0003	0,0049±0,0003	0,0048±0,0003	0,501
Fenilalanina	0,036±0,005	0,038±0,005	0,030±0,005	0,036±0,005	0,512
Hipoxantina	0,210±0,003	0,198±0,003	0,189±0,002	0,197±0,002	0,189
Nicotinurato	LLQ	LLQ	LLQ	LLQ	-
Triptofano	0,061±0,001	0,062±0,001	0,052±0,001	0,057±0,001	0,071
GSSG	0,102±0,039	0,092±0,038	0,105±0,038	0,086±0,037	0,836

LLQ = 0,001 $\mu\text{mol g}^{-1}$ carne

Observando-se as **Tabelas 5 e 6** verificou-se uma drástica melhora no efeito matriz utilizando a coluna RAM-C8-BSA, aumentando a intensidade dos sinais e tornando a quantificação adequada de vários metabólitos de interesse possível.

Utilizando-se a coluna RAM-C8-BSA, a análise de cada amostra durou 13 minutos, possibilitando a execução de uma grande quantidade de amostras em um curto período de tempo, o que é extremamente valioso em uma análise exploratória de alta demanda. Conjuntamente, o alto poder de resolução da detecção por HESI-HRMS torna a técnica extremamente eficiente para a identificação de metabólitos em matrizes complexas.

A análise das amostras demonstrou boa reprodutibilidade na detecção (RSD de 0,08% para a carnitina a 2,15% para a GSSG) e uma resposta linear que permitiu a caracterização simultânea de diversos metabólitos com aceitáveis limites de detecção (LD 0,00001 $\mu\text{mol g}^{-1}$ carne para a carnitina a 0,005 $\mu\text{mol g}^{-1}$ carne para a GSSG).

As **Figuras 14, 15 e 16** apresentam alguns exemplos de espectros de MS e MS² das amostras de extrato de carne comparadas aos padrões. Para a certificação da identificação dos metabólitos encontrados nas amostras de extratos de carne foram obtidos os espectros de massas e de fragmentação dos padrões de metabólitos juntamente aos espectros de massas de íons extraídos e suas correspondentes fragmentações nas amostras. Os 32 metabólitos encontrados apresentaram o perfil de fragmentação correspondente aos padrões além de apresentarem a mesma fórmula molecular com erros de massa exata inferiores a 5 ppm.

O **Anexo I** contém os espectros de MS e MS² de 32 padrões de metabólitos polares identificados e quantificados e amostras de extratos de carne suplementadas com erva mate

Figura 14. (A) Espectro de massas de alta resolução do padrão de prolina, (B) Espectro de MS² de alta resolução do padrão de prolina, (C) Espectro de MS² de alta resolução da amostra de carne referente à prolina, (D) Curva de calibração externa do padrão de prolina.

MS2prof+30 #19 RT: 0.28 AV: 1 NL: 1.25E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 116.00@cid35.00 [50.00-800.00]

Fonte: Autoria própria.

Figura 15. (A) Espectro de massas de alta resolução do padrão de aspartato, (B) Espectro de MS² de alta resolução do padrão de aspartato, (C) Espectro de MS² de alta resolução da amostra de carne referente à aspartato, (D) Curva de calibração externa do padrão de aspartato.

mix1 10 6-#4 RT: 0.13 AV: 1 NL: 1.78E5
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS2aspt #7 RT: 0.09 AV: 1 NL: 3.32E5
T: FTMS - p ESI Full ms2 132.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS2asptt-30 #24 RT: 0.36 AV: 1 NL: 1.36E4
T: FTMS - p ESI Full ms2 132.00@dd35.00 [50.00-800.00]

Fonte: Autoria própria.

Figura 16. (A) Espectro de massas de alta resolução do padrão de glutatona, (B) Espectro de MS² de alta resolução do padrão de glutatona, (C) Espectro de MS² de alta resolução da amostra de carne referente à glutatona, (D) Curva de calibração externa do padrão de glutatona.

mix1 10 6+ 140827210459 #6 RT: 0.21 AV: 1 SB: 1 1.31 NL: 1.21E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS2glut+ #55 RT: 0.85 AV: 1 NL: 5.90E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 148.00@cid35.00 [50.00-800.00]

Fonte: Autoria própria.

Em outra linha de pesquisa do grupo conduzida pela doutoranda Andressa Zawadzki, as amostras dos extratos de carne foram analisadas por espectroscopia de ¹H-NMR para uma maior e melhor investigação dos metabólitos além de, quando possível, para comparar análises com HESI-HRMS. A **Tabela 7** apresenta metabólitos quantificados por ¹H-NMR que

não puderam ser quantificados e metabólitos que não apresentaram variância significativa ($p < 0.05$) por HESI-HRMS e metabólitos que foram identificados em ambas as técnicas que apresentam valores de concentração próximos aos valores das amostras analisadas por HESI-HRMS.

Tabela 7. Concentração de metabólitos polares ($n = 3$, $\mu\text{mol g}^{-1}$ carne) analisados por $^1\text{H-NMR}$ de extratos em metanol/água de carne de animais com diferentes concentrações de extrato de erva-mate na dieta.

	Concentração de extrato de erva-mate (%)				Valor p
	0,0	0,5	1,0	1,5	
Leucina	0,183 $\pm$ 0,032	0,197 $\pm$ 0,006	0,230 $\pm$ 0,010	0,233 $\pm$ 0,010	0,109
Isoleucina	0,118 $\pm$ 0,003	0,128 $\pm$ 0,002	0,166 $\pm$ 0,011	0,143 $\pm$ 0,010	0,002
Valina	0,166 $\pm$ 0,030	0,184 $\pm$ 0,006	0,201 $\pm$ 0,024	0,133 $\pm$ 0,010	0,085
Lactato	36,93 $\pm$ 3,18	40,21 $\pm$ 3,49	52,43 $\pm$ 2,29	49,15 $\pm$ 1,60	0,071
β-Alanina	0,217 $\pm$ 0,040	0,231 $\pm$ 0,047	0,209 $\pm$ 0,139	0,298 $\pm$ 0,050	0,251
Alanina	1,52 $\pm$ 0,35	1,93 $\pm$ 0,06	2,37 $\pm$ 0,12	2,14 $\pm$ 0,17	0,034
Creatina	5,695 $\pm$ 1,410	8,477 $\pm$ 0,440	20,271 $\pm$ 1,980	10,210 $\pm$ 0,290	2,9 10^{-5}
Glicerol	1,737 $\pm$ 0,417	2,113 $\pm$ 0,216	2,470 $\pm$ 0,473	2,361 $\pm$ 0,070	0,452
Glicina	0,666 $\pm$ 0,037	0,688 $\pm$ 0,076	0,794 $\pm$ 0,085	0,941 $\pm$ 0,09	0,047
Carnosina	5,821 $\pm$ 0,561	7,995 $\pm$ 0,566	9,057 $\pm$ 1,007	9,075 $\pm$ 0,830	0,047
Carnitina	2,80 $\pm$ 0,09	2,65 $\pm$ 0,25	2,19 $\pm$ 0,39	3,57 $\pm$ 0,21	0,007
Betaína	0,507 $\pm$ 0,051	0,565 $\pm$ 0,089	0,513 $\pm$ 0,021	0,700 $\pm$ 0,080	0,078
Anserina	0,626 $\pm$ 0,061	0,890 $\pm$ 0,074	0,772 $\pm$ 0,141	0,879 $\pm$ 0,040	0,113
Glucose-6-fosfato	1,579 $\pm$ 0,966	2,385 $\pm$ 0,260	2,761 $\pm$ 0,632	2,498 $\pm$ 0,460	0,417
NADH	0,251 $\pm$ 0,073	0,071 $\pm$ 0,011	0,516 $\pm$ 0,025	0,491 $\pm$ 0,050	0,002
Adenosina	0,411 $\pm$ 0,091	0,288 $\pm$ 0,035	0,326 $\pm$ 0,018	0,367 $\pm$ 0,030	0,236
IMP	1,294 $\pm$ 0,131	1,870 $\pm$ 0,305	2,027 $\pm$ 0,365	2,296 $\pm$ 0,140	0,041
ATP/ADP/AMP	0,335 $\pm$ 0,067	1,556 $\pm$ 0,107	0,921 $\pm$ 0,105	1,843 $\pm$ 0,410	0,001

A **Figura 17** ilustra o esquema demonstrando a capacidade das técnicas de ^1H -RMN e HESI-HRMS para a identificação e dosagem de metabólitos polares e CLA em extratos de carne. Observa-se que a técnica de ^1H -RMN é uma ferramenta poderosa principalmente no quesito referente à análise exploratória *untargeted*, visto que o ^1H -RMN é capaz de identificar e quantificar pequenas moléculas sem a necessidade de um padrão de referência e é livre da influência do efeito matriz. A técnica de HESI-HRMS por outro lado, mostra-se limitada para análises exploratórias e é sensível a efeitos de matriz, porém, ao contrário da técnica de ^1H -RMN, é uma ferramenta sensível para a detecção e quantificação sendo uma poderosa ferramenta em análises metabolômicas *targeted*. Desta forma, em nossa opinião, ambas as técnicas apresentam vantagens complementares e devem ser utilizadas em conjunto quando possível.

Figura 17. Ilustração dos metabólitos polares e CLA identificados e sujeitos à quantificação pelas técnicas de ^1H -RMN e HESI-HRMS e do conjunto de metabólitos passíveis de identificação e dosagem por ambas as técnicas.

Fonte: Autoria própria.

Os perfis metabólicos das amostras de extratos de carne não apresentaram alterações qualitativas significativas para os animais alimentados com as diferentes dietas tanto quando

analisados por HESI-HRMS quanto por ^1H -RMN. As alterações observadas são referentes à alteração na concentração dos metabólitos. Entre os compostos quantificados por ^1H -RMN, as concentrações de isoleucina, alanina, creatina, glicina, carnosina, carnitina, NADH, IMP e ATP/ADP/AMP mostraram variação significativa ($p < 0,05$) para os extratos de carne dos animais com diferentes tratamentos com extrato de mate. As maiores concentrações de metabólitos, na maioria das amostras, foram encontradas em animais suplementados com teores de 1,0% e 1,5% de extrato de erva-mate na dieta, apontando uma influência desta no metabolismo animal.

A presença de maiores níveis de carnosina e anserina em amostras obtidas de animais alimentados com maiores quantidades de extrato de erva-mate está relacionada ao aumento dos níveis de β -alanina no músculo, já que a carnosina e anserina estão relacionados ao metabolismo da β -alanina (Harris *et al*, 2006, Derave *et al*, 2010 e Culbertson *et al*, 2010), entretanto, como mostrado na **Tabela 7**, a suplementação com diferentes teores de extrato de mate não alterou significativamente a concentração de β -alanina nos extratos de carne. A carnosina e anserina são dipeptídeos que possuem atividades antioxidantes, atuando como captadores de radicais (Guiotto *et al*, 2005). A carnosina reduz determinadas reações proteolíticas associadas ao envelhecimento celular (Jayasena *et al*, 2015). A suplementação de β -alanina por praticantes de atividades físicas tem demonstrado vários benefícios no desempenho de atletas e um efeito sinérgico na performance dos exercícios é observado quando ingerida juntamente com creatina (Culbertson *et al*, 2010).

As amostras de carne de animais suplementados com maiores teores de extrato de mate também apresentaram maiores níveis de creatina e creatinina. A creatina tem um importante papel no metabolismo energético e amplas evidências que suplementos à base de creatina atuam no aumento do desempenho muscular (Purchas *et al*, 2004). Maiores quantidades de creatinina estão relacionadas ao fato de que a creatinina é formada pela conversão não enzimática da creatina através da perda de água e sua ciclização (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000).

O aumento das concentrações de lactato e succinato nas amostras dos extratos de carne de animais com teores mais elevados de extrato de erva-mate na dieta animal pode ser relacionado com uma melhora da coloração da carne. O lactato é um conhecido estabilizador da coloração em carnes e sua atividade pode estar ligada à regeneração do NADH, que

também apresentou aumento em sua concentração na dieta com maiores teores de extrato de mate, via lactato desidrogenase que aumenta redução da metmioglobina (Kim *et al*, 2006 e Ramanathan *et al*, 2011). O succinato é utilizado para manter a mioglobina em sua forma reduzida. Os elétrons da ETC (Cadeia transportadora de elétrons) provenientes da oxidação do succinato são responsáveis pela redução da metmioglobina (Tang *et al*, 2005).

Metabólitos como betaína, metionina, leucina, isoleucina, glicerol e IMP apresentaram maiores quantidades nas amostras de animais com dietas suplementadas com 1,0% e 1,5% de extrato de erva-mate. A betaína e a metionina estão envolvidas no metabolismo de hidrólise de triglicerídeos a glicerol e ácidos graxos (Zhan *et al*, 2006). Maiores níveis de betaína e metionina encontrados acompanhados por um nível significativo de glicerol pressupõem um aumento da lipólise, podendo levar à oxidação de ácidos graxos que pode fornecer energia para vias biossintéticas tais como a síntese de proteínas (Zhan *et al*, 2006 e Trabi *et al*, 2013). Conjuntamente, o aumento nos níveis de leucina e isoleucina, aminoácidos de cadeia ramificada, que participam como fundamentais reguladores na iniciação da síntese de proteínas miofibrilares (Norton e Layman, 2006 e Churchward-Venne *et al*, 2012). Essas observações podem indicar uma redução no teor de gordura intramuscular e um aumento na síntese de proteínas, inferindo uma carne mais saudável.

Altos níveis de IMP observados juntamente com baixos níveis de inosina sugerem que a carne dos animais alimentados com maiores teores de extrato de mate apresenta um metabolismo *post-mortem* mais lento que animais que foram menos suscetíveis ao estresse e consequentemente uma carne mais saudável (Straadt *et al*, 2014). A inosina e hipoxantina são produtos de degradação da IMP e estão relacionadas negativamente ao sabor azedo e amargo na carne, apresentaram uma diminuição em seus teores em amostras da dieta com maiores níveis de extrato de erva-mate. A IMP é um agente importante na percepção do sabor da carne, aumentando o efeito da característica do sabor umami, além de, juntamente com a G6P, que também apresentou maiores níveis na dieta com maiores teores de extrato de erva-mate, responsável pelo sabor de “assado” na carne (Flores *et al*, 1999 e Muroya *et al*, 2014).

Um fato interessante foi a redução dos níveis de glutathione, reconhecido antioxidante endógeno *in vivo*, em amostras de animais alimentados com teores crescentes de extrato de mate (Schafer e Buettner, 2001).

4.3. Análise de componentes principais dos perfis metabólicos quantitativos de ¹H-RMN e HESI-HRMS

Com o intuito de verificar padrões em função das concentrações dos metabólitos entre os quatro tratamentos dos animais suplementados com diferentes níveis de extrato de mate, foi efetuada uma análise exploratória através do emprego da análise de componentes principais (PCA) das análises quantitativas de ¹H-RMN e HESI-HRMS dos extratos das carnes. As variáveis foram pré-selecionadas em função da variabilidade dos valores das concentrações dos metabólitos principais entre os grupos de amostras (ANOVA, $p = 0,05$).

Foram identificados duas significantes PC's, que juntas explicam 66,3 % da variância total observada no espectro (PC1 48,8 % e PC2 17,5%). A **Figura 18 (A)** ilustra o agrupamento e comportamento dos extratos de carne de animais suplementados com diferentes quantidades de extrato de mate em função do perfil quantitativo de ¹H-RMN e HESI-HRMS e apresenta uma boa discriminação entre os diferentes tratamentos alimentares. A **Figura 18 (B)** apresenta o gráfico de *loadings* para as variáveis representativas para o agrupamento e separação em função da dieta do animal. Em PC1 observa-se uma maior diferenciação entre os animais suplementados com maiores teores de extrato de mate (1,0 % e 1,5 %) dos animais do grupo sem suplementação e dos animais suplementados com menor teor de extrato de mate (0,5 %). A carne dos animais suplementados com maiores teores de extrato de mate foi associada com altos teores de glutamina, leucina, isoleucina, homoserina, lisina, NADH, creatina, glicina, IMP, hipoxantina e carnosina. Em PC2 observa-se uma pequena distinção em as amostras dos animais suplementados com teores de extrato de mate de 1,0 % e 1,5 %.

Figura 18. Análise de Componentes Principais (PCA) do perfil quantitativo dos metabólitos dos animais alimentados com diferentes teores de extrato de mate. Cada amostra de carne é representada por um número colorido de acordo com o nível de extrato de mate na dieta e uma letra foi usada para diferenciar animais com o mesmo tratamento. As concentrações dos metabólitos determinadas por $^1\text{H-NMR}$ e HESI-HRMS foram selecionadas como variáveis. **(A)** PC1 vs PC2 **(B)** Gráfico de *loadings* para as correlações PC-variáveis.

Fonte: Autoria própria.

Os animais suplementados com teores de extrato de mate de 1,0 % foram caracterizados pelos altos teores de glutamina, leucina, e isoleucina e os a animais

suplementados com teores de extrato de mate de 1,5 % pelos altos teores de NADH, creatina, glicina, IMP, hipoxantina, carnosina e carnitina. As amostras dos animais suplementados com teores de extrato de mate de 0 % e 0,5 % foram agrupadas ao longo da parte positiva do eixo da PC1 que é caracterizada pelo alto teor de succinato, arginina, alanina, inosina, glucose e ATP/ADP/AMP em comparação às amostras de animais suplementados com teores de extrato de mate de 1,0 % e 1,5 %.

4.4. Investigação da estabilidade redox de carne por ressonância paramagnética de elétrons

A estabilidade redox de carne bovina foi determinada por meio da técnica de *spin-trapping* monitorando o desenvolvimento de radicais em homogenatos de carne submetidos à incubação a 65 °C na presença de PBN. Sob estas condições ocorre a formação do PBN aduto radical, nos quais os radicais dos componentes de carne, que são extremamente reativos e com tempo de vida curto (como radicais lipídicos ou radicais de proteínas, produzidos durante a incubação térmica, por exemplo), são adicionados à dupla ligação do *spin trap* produzindo um aduto radical mais estável, que pode ser detectado por RPE (Polovka, 2006). Os espectros de RPE, operando na banda X (~9,4 GHz), dos homogenatos de carne apresentaram o padrão característico de seis linhas relacionado ao PBN aduto radical (**Figura 19**), com $g_{\text{factor}} = 2,0235$ e $a_N = 15,6$ G, sendo esse sinal integrado duas vezes para obter-se a área referente à concentração da espécie. A cinética da formação de radicais na carne dos animais dos diferentes tratamentos com extrato de mate foi investigada baseada na intensidade do sinal de RPE.

Figura 19. Espectro de RPE dos homogenatos de carne com a adição de PBN (400 mmol L^{-1}) obtidos em diferentes tempos de incubação a 65°C .

Fonte: Autoria própria.

A **Figura 20** mostra o desenvolvimento do aduto radical PBN nas suspensões de carne em 4 horas de incubação a 65°C . A formação de radicais pode ser associada com uma reação de ordem zero e foi feita uma regressão linear com os pontos de intensidade RPE para determinar a taxa de formação de radicais (Polovka, 2006). Para que o desenvolvimento de radicais se iniciasse nessas amostras, foi necessário um tempo de indução, que no caso foi maior que 30 minutos. Ao final do período de indução, a produção de radicais se manteve a taxas constantes, cujos valores foram determinados por regressão linear dos pontos em todas as amostras. Uma diminuição na intensidade relativa de RPE, após cinco horas, foi notada (dados não mostrados) e pode ser justificada pelo fato de que a formação de radicais atingiu o estado estacionário e manteve-se constante após algum tempo de incubação. Em seguida, o excesso de radicais foi consumido em reações entre si produzindo produtos finais inertes não radicalares e não paramagnéticos.

Figura 20. (A) Formação de radicais medida pela intensidade relativa média (n=3) do sinal de RPE do aduto radical PBN formado em homogenatos de carne incubada a 65 ° C. A intensidade relativa de RPE foi calculada pela dupla integração do sinal RPE e pela relação $\text{Área}_{T=x \text{ min}} / \text{Área}_{T_0=60 \text{ min}}$. (B) Taxa de formação de radicais determinada por regressão linear dos gráficos de intensidade relativa de RPE.

Fonte: Autoria própria.

Em relação à influência da dieta dos animais no status redox de carne bovina, amostras provenientes de animais alimentados sem suplementação e com 1,5 % de extrato de erva-mate apresentaram, respectivamente, as taxas de formação de radicais mais altas e mais baixas. De fato, houve uma tendência de gerar uma menor concentração de radicais a uma menor taxa em conformidade com o aumento do nível de extrato de erva-mate na dieta. A maior estabilidade redox está relacionada, aparentemente, à composição de carne, devido à presença de aminoácidos e peptídeos captadores de radicais, que é afetada tanto pelo metabolismo animal quanto pelo período de envelhecimento (Saiga *et al*, 2003 e Carlsen *et al*, 2005). Na carne, as espécies de ferro não-heme e ferro heme desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de radicais e em processos oxidativos (Bolumar *et al*, 2012, Carlsen *et al*, 2005 e Frederiksen *et al*, 2008). Durante o processo de cozimento e de acordo com o aumento do tempo de incubação, o ferro é liberado da porfirina do grupo heme, dando início à oxidação e à formação de radicais (Kingston *et al*, 1998 e Lee *et al*, 1998). No entanto, alguns metabólitos, peptídeos e proteínas podem retardar ou prevenir a formação de radicais, uma vez que prontamente eliminam os radicais promovendo um efeito antioxidante (Saiga *et al*, 2003). Por exemplo, carnosina, anserina e glutathione têm sido amplamente estudadas como “scavengers” de radicais (Guiotto *et al*, 2005, Kohen *et al*, 1988 e Schafer e

Buettner, 2001). Outros metabolitos têm sido considerados biomarcadores para vias de oxidação e degradação. Desse modo, o estudo metabolômico sobre carne, tal como descrito a partir dos dados coletados de ^1H RMN e HESI-HRMS no presente estudo, foi correlacionado com os resultados da RPE para extrair as espécies que levam às diferenças na estabilidade redox de carne. A alta concentração alcançada por vários metabólitos usando 1,5% de extrato de erva-mate na dieta pode justificar a maior estabilidade redox comparada a outros tratamentos. Os dipeptídeos relacionados com a histidina, como a carnosina, foram encontrados como eficazes captadores de radicais e inibidores de processos de oxidação, principalmente peroxidação lipídica (Decker e Crum, 1993, Djenane *et al*, 2004 e Wu *et al*, 2003). Além do poder redutor e a capacidade de captação de radicais (Kohen *et al*, 1988), a carnosina possui a capacidade quelante para íons metálicos, o que também contribui para a atividade protetora contra a oxidação. A capacidade quelante do metabólito foi relacionada com a capacidade do grupo imidazol de compostos relacionados à histidina ligar metais (Wu *et al*, 2003). Outros aminoácidos e peptídeos, como glicina, alanina, β -alanina e carnitina podem coordenar íons de metais de transição impedindo que eles participem de reações de oxidação (Chan *et al*, 1994, Gülçin, 2006, Kohen *et al*, 1988 e Wu *et al*, 2003). A combinação de todos estes compostos mencionados em concentrações mais altas, como encontrado na carne dos animais alimentados com 1,5% de extrato de erva-mate, pode prevenir a formação de radicais em carne mais pronunciadamente.

Embora a concentração de glutathione tenha diminuído com o aumento do nível de suplemento na dieta animal, outros compostos inibem efetivamente a oxidação. Dada a versatilidade de a carnosina evitar a oxidação (Wu *et al*, 2003), sugerimos que este metabólito contribuiu majoritariamente para a estabilidade redox de carne. O status redox de carne reflete a sua susceptibilidade à deterioração oxidativa que resulta em “*off-flavours*” e perda de maciez. A oxidação lipídica é uma fonte primária de perda de qualidade na carne, responsável pela deterioração do sabor, cor, textura, e valor nutricional do alimento (Carlsen *et al*, 2005 e Zhang *et al*, 2010). A oxidação dos grupos tiol das proteínas miofibrilares leva à formação de *cross-linking* que afeta negativamente a maciez da carne (Jongberg *et al*, 2011). Portanto, a suplementação com extrato de mate pode induzir mudanças na concentração metabólitos da carne melhorando sua estabilidade redox e, conseqüentemente, impede a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas, o que colabora para a melhoria da qualidade sensorial e nutricional do produto.

4.5. Quantificação do CLA total dos animais suplementados com extrato de erva-mate

A formação do CLA ocorre majoritariamente por biorredução no rúmen por isomerização do ácido linolênico devido à atividade de bactérias biorredutoras *Butyrivibrio fibrisolvens* (Devillard *et al*, 2006, Dilzer e Park, 2012). A biorredução no rúmen poder ser alterada por compostos fenólicos e taninos que provocam uma inibição seletiva de algumas bactérias como *Fusocillus* spp e *Clostridium proteoclasticum* que convertem ácido vacênico em ácido esteárico, consequentemente, é fornecida uma maior quantidade de ácido vacênico para a conversão à CLA (Patra e Saxena, 2011).

A suplementação da dieta animal com extrato de mate promoveu alterações positivas significativas nas concentrações de CLA na carne. Pôde-se observar uma elevação no teor de CLA na carne à medida que se aumentou o teor de extrato de mate na ração (**Tabela 8**).

Tabela 8. Concentrações de CLA total em amostras analisadas de carne de animais suplementados com diferentes concentrações de extrato de erva-mate por APCI-HRMS em modo negativo utilizando injeção direta em fluxo de 300 $\mu\text{L min}$ de ACN/ H_2O (90:10).

Trat. Mate (% m/m)	CLA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de carne <i>in natura</i>)
0	0,073 $\pm$ 0,007
0,5	0,081 $\pm$ 0,013
1,0	0,088 $\pm$ 0,014
1,5	0,117 $\pm$ 0,015

O aumento do teor de CLA na carne nos animais suplementados sugere que o extrato de mate altera a microbiota ruminal, favorecendo a biorredução do ácido linolênico presente na dieta do animal.

A suplementação animal com extrato de erva-mate proporcionou uma carne com maior teor de CLA, demonstrando que é possível melhorar sua qualidade nutricional da carne apenas com a manipulação da dieta animal, utilizando-se de um suplemento natural que

estímule a produção de compostos bioativos que fornecem uma carne mais saudável, ao invés de adicionar compostos bioativos diretamente na alimentação do animal.

4.6. Desenvolvimento e aplicação do dispositivo microfluídico acoplado ao espectrômetro de massas

O experimento teve o objetivo de desenvolver um dispositivo que permitisse a investigação das reações de oxidação de metabólitos em tempo real frente à ação da ferrilmioglobina (**Figura 21**), utilizando detecção por espectrometria de massas, que fornece alta sensibilidade para determinação da formação de produtos.

Figura 21. Dispositivo microfluídico desenvolvido e utilizado para os experimentos cinéticos de oxidação de metabólitos

Fonte: Autoria própria.

A primeira etapa do experimento consistiu no desenvolvimento do dispositivo microfluídico que pudesse ser acoplado ao espectrômetro de massas. Foram testados diversos materiais que pudessem ser utilizados e optou-se pelo uso de polímeros como o PMMA e a transparência de poliéster pelo baixo custo e a maleabilidade do material que permitiam a rápida fabricação de diversos modelos para testes de aplicabilidade. A escolha do uso da fita dupla face foi feita devido ao seu alto poder de aderência e fixação nos componentes poliméricos utilizados bem superiores a outras colas líquidas e fitas adesivas que não eram tão eficientes e levavam ao surgimento de inúmeros vazamentos e descolamento de peças constantes. A forma escolhida para os canais por onde ocorre a reação consistiu em ângulos de 90° e cavidades circulares (**Figura 22**).

Figura 22. Canais de reação desenhados com ângulos de 90° e cavidades circulares.

Fonte: Autoria própria.

Durante o processo de desenvolvimento das formas dos canais foram elaborados diversos modelos, porém modelos com ângulos abaixo de 90° e com pouca alternância de direção não proporcionavam misturas eficientes que mantinham o fluxo laminar. Para a verificação da eficiência de mistura foi utilizado um microscópio Olympus CKX41 equipado

com uma câmera digital Olympus Q Color 5 (Tóquio, Japão) que possibilitou a visualização da eficiência da mistura de soluções de corantes bombeados pelo dispositivo microfluídico em tempo real no mesmo intervalo de fluxo bombeado nos experimentos de oxidação. (**Figura 23**). Em um primeiro momento (**Figura 23 A**) observou-se o encontro das soluções de cores diferentes que formam um fluxo laminar onde ainda não ocorre mistura. À medida que a solução vai percorrendo os canais do dispositivo, a alternância de direção e a entrada em cavidades provocam a mistura das soluções (**Figura 23 B**) e ao final do percurso pôde-se observar a completa mistura delas (**Figura 23 C**).

Figura 23. Fotos tiradas por microscopia ótica da mistura de duas soluções de corantes que percorrem os canais do dispositivo microfluídico em etapas distintas (a) encontro das soluções, (b) cavidade situada durante o percurso das soluções e (c) saída do dispositivo microfluídico.

Fonte: Autoria própria.

Um fator importante para a obtenção de resultados com sinal mais estável foi o uso do capilar de sílica fundida de ionização na saída do microchip que colaborou para a formação mais estável do *electrospray* devido à forma mais regular do capilar. Outro fator importante que contribuiu para a formação do *electrospray* foi a adição perpendicular de outro capilar de sílica fundida para a entrada de metanol, necessária para diminuir a tensão superficial da solução. O metanol foi bombeado constantemente por uma bomba seringa do próprio espectrômetro de massas e foi inserido separadamente de modo que só entrasse em contato com a solução para a ionização (**Figura 24**), pois provocaria a desnaturação da ferrilmioglobina que acarretaria problemas na reação (Kalli *et al*, 2013).

Figura 24. Imagem do monitor de observação da formação do cone de Taylor necessário para a ionização dos compostos em frente à entrada do espectrômetro de massas

Fonte: Autoria própria.

4.7. Estudo cinético de reações de oxidação monitoradas por NSI-MS

O estudo cinético da reação de oxidação foi acompanhado pela variação da intensidade relativa do sinal do íon $[M+H]^+$ 227 m/z referente à carnosina em relação ao íon $[M+H]^+$ 106 m/z referente à serina (**Figura 25**), utilizada com referência interna, em função do aumento da concentração da ferrimioglobina com o tempo de reação.

Figura 25. Espectro de massas inicial da solução contendo carnosina 5,0 μ M e serina foi 100 μ M.

Fonte: Autoria própria.

As concentrações iniciais de carnosina utilizadas foram 7,5 e 5,0 μ M e a concentração inicial de serina foi 100 μ M. Pode-se observar nas **Tabelas 9 e 10** que a intensidade relativa do sinal da carnosina diminui em relação ao sinal da serina de acordo com o aumento do tempo de reação. A reação demonstrou seguir a cinética de pseudo-primeira ordem com excesso de MbFe(IV)=O (10^{-5} M) em relação a concentração de carnosina (10^{-6} a 10^{-7} M). Com base na observação do consumo da carnosina em função do aumento da concentração de ferrimioglobina pode-se concluir que ocorre a reação de oxidação da carnosina e a redução do centro metálico de ferro (IV) a ferro (III) (**Equação 1**).

A velocidade da reação em função das concentrações de carnosina e ferrilmioglobina
(Equação 2):

$$v = k_2 [\text{Carnosina}] [\text{MbFe(IV)=O}] \quad (2)$$

Em condições de pseudo-primeira ordem com excesso de MbFe(IV)=O:

$$v = k_{\text{obs}} [\text{Carnosina}] \quad (3)$$

Onde:

$$k_{\text{obs}} = k_2 [\text{MbFe(IV)=O}] \quad (4)$$

Tabela 9. Intensidade relativa do sinal da carnosina 7,5 µM em relação ao sinal da serina 100 µM em função do aumento do tempo de reação (s) e do excesso de ferrilmioglobina.

Tempo de reação (s)	I_{227}/I_{106} [Car] 7,5 µM e [FerrilMb] 0 M	I_{227}/I_{106} [Car] 5,63 µM e [FerrilMb] 10 µM	I_{227}/I_{106} [Car] 3,75 µM e [FerrilMb] 20 µM	I_{227}/I_{106} [Car] 1, µM e [FerrilMb] 30 µM	I_{227}/I_{106} [Car] 1, µM e [FerrilMb] 35 µM
26	4,27	4,08	3,55	2,84	2,61
32	4,24	3,77	3,21	2,68	2,37
42	4,32	3,43	3,26	2,67	2,09
55	4,27	3,14	2,85	2,36	1,74
80	4,14	3,02	2,60	1,97	1,64
110	4,12	2,31	1,86	1,88	1,50
170	4,14	2,19	1,76	1,77	1,50

Tabela 10. Intensidade relativa do sinal da carnosina 5,0 µM em relação ao sinal da serina 100 µM em função do aumento do tempo de reação (s) e do excesso de ferrilmioglobina.

Tempo de reação (s)	I_{227}/I_{106} [Car] 5,0 µM e [FerrilMb] 0 M	I_{227}/I_{106} [Car] 3,75 µM e [FerrilMb] 10 µM	I_{227}/I_{106} [Car] 2,5 µM e [FerrilMb] 20 µM	I_{227}/I_{106} [Car] 1,25 µM e [FerrilMb] 30 µM	I_{227}/I_{106} [Car] 7,14 µM e [FerrilMb] 35 µM
26	2,54	2,41	2,00	1,74	1,65
32	2,50	2,23	1,86	1,67	1,51
42	2,50	2,20	1,75	1,56	1,43
55	2,51	2,17	1,77	1,40	1,32
80	2,45	2,14	1,64	1,49	1,24
110	2,42	1,81	1,54	1,47	1,22
170	2,53	1,70	1,52	1,41	1,21

As constantes de pseudo-primeira ordem foram determinadas a partir da linearização das curvas de decaimento da intensidade relativa do sinal da carnosina em relação à serina em função do tempo de reação (**Figuras 26 e 27**).

A relação entre k_{obs} e a concentração total de MbFe(IV)=O permitiu a determinação da constante de velocidade de segunda ordem k_2 (**Figuras 27 e 28**).

Figura 26. (a) Intensidade relativa do sinal da carnosina 7,5 μM em relação ao sinal da serina 100 μM em função do aumento do tempo de reação (s) e do excesso de ferrilmioglobina, (b) $\ln$ da concentração inicial da carnosina em relação à concentração de carnosina em função do aumento do tempo de reação.

Fonte: Autoria própria.

Figura 27. (a) Intensidade relativa do sinal da carnosina 5,0 μM em relação ao sinal da serina 100 μM em função do aumento do tempo de reação (s) e do excesso de ferrilmioglobina, (b) $\ln$ da concentração inicial da carnosina em relação a concentração de carnosina em função do aumento do tempo de reação.

Fonte: Autoria própria.

Figura 28. Correlação linear entre k_{obs} obtida pelo ajuste linear das curvas da Figura 26b e a concentração total de ferrilmioglobina.

Fonte: Autoria própria.

Figura 29. Correlação linear entre k_{obs} obtida pelo ajuste linear das curvas da Figura 27b e a concentração total de ferrilmioglobina.

Fonte: Autoria própria.

Os valores obtidos para k_2 foram $9,71 \pm 4,32 \times 10^1 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a concentração inicial de carnosina de $7,5 \text{ } \mu\text{M}$ e $k_2 = 5,43 \pm 2,20 \times 10^1 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a concentração inicial de carnosina de $5,0 \text{ } \mu\text{M}$.

Uma das limitações do dispositivo microfluídico foi trabalhar com tempo de reação superior a 110 s devido a baixa eficiência mecânica da presente bomba seringa para trabalhar com fluxos muito baixos, sendo necessário a utilização de uma bomba de nano-LC.

4.8. Detecção de produtos de degradação das reações de oxidação utilizando o dispositivo microfluídico acoplado ao espectrômetro de massas

Uma grande vantagem apresentada pelo uso de espectrometria de massas como ferramenta de monitoramento de reações de oxidação é a possibilidade de observar além da diminuição de sinais dos substratos serem consumidos, o surgimento de produtos referentes à

oxidação desses substratos e conseqüentemente permitir a determinação de rotas de degradação desses compostos.

Ao analisar os espectros de massas antes e após o início das reações de oxidação promovidas pela ferrilmioglobina pôde-se observar a formação de um composto que apresentou o sinal do íon $[M+H]^+$ 150 m/z (**Figura 30**) com tempo de reação de 80 segundos.

Figura 30. Espectro de massas da solução contendo carnosina 5,0 μ M e serina 100 μ M durante a reação com ferrilmioglobina 40 μ M. Tempo de reação de 80 segundos.

Fonte: Autoria própria.

Com a finalidade de obter-se mais informações sobre a forma estrutural do produto encontrado e o provável mecanismo da reação de oxidação da carnosina pela ferrilmioglobina foi realizado isolamento e fragmentação do íon $[M+H]^+$ 150 m/z (**Figura 31**).

Figura 31. Espectro de MS² referente à fragmentação do íon [M+H]⁺ 150 m/z.

Fonte: Autoria própria.

Após a primeira fragmentação do íon [M+H]⁺ 150 m/z, os íons gerados foram novamente fragmentados originando os íons m/z 134, 114, e 88. Entretanto, não foi possível atribuir a identidade do intermediário da reação de oxidação bem como o produto de degradação oxidativa da carnosina.

5. Conclusão

A produção de carne vermelha tem recebido uma atenção pública crescente devido a problemas em questões ambientais relacionadas especialmente à pecuária e devido a indicações epidemiológicas do aumento de riscos à saúde em consequência do alto consumo de carne vermelha. A carne produzida do gado alimentado com ração suplementada com extrato de mate, uma planta localmente abundante em uma das mais importantes regiões de produção mundial de carne, mostrou-se ter um aumento na estabilidade oxidativa e pode resultar em um maior tempo de prateleira e ao mesmo tempo apresentar uma melhor análise sensorial e aceitação do consumidor. A carne proveniente do animal alimentado com uma ração suplementada com extrato de mate poderia então resultar em produtos carneos com maior tempo de prateleira sem a utilização de aditivos no produto. A carne produzida proveniente do animal alimentado com uma ração suplementada com extrato de mate apresentou um significativo aumento no teor de peptídeos derivados da histidina (carnosina, carnitina e anserine), ácido linoleico conjugado (CLA) e creatina, que aumentam o valor nutritivo da carne e sua estabilidade redox. Pode ser ainda considerado que a carne com aumento da estabilidade redox também apresentará uma menor tendência à formação de radicais levando um produto mais estável, com maior tempo de prateleira e menos susceptível a deterioração oxidativa.

Foi desenvolvido, de forma satisfatória, um dispositivo microfluídico para análise cinética em fluxo de reações rápidas, com constante de velocidade da ordem de $10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o que permitiu estimar a constante de velocidade de reação para a redução da espécie de ferro hipervalente ferrilmioglobina pela carnosina em meio aquoso.

6. Referências

- ARCON, J. P.; ROSI, P. E.; PETRUK, A. A.; MARTI, M. A.; ESTRIN, D. A. Molecular mechanism of myoglobin autoxidation: insights from computer simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119 n. 5, p. 1802-1813, 2015.
- ARIHARA, K. Strategies for designing novel functional meat products. **Meat Science**, v. 74, p. 219-229, 2006.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plants materials. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426-436, 2013.
- BHATTACHARYA, A.; BANU, J.; RAHMAN, M.; CAUSEY, J.; FERNANDES, G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 789-810, 2006.
- BIESALSKI, H. –K. Meat as a component of healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet?. **Meat Science**, v. 70, p. 509-524, 2005.
- BELURY, M. A. Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 505-31, 2002.
- BERRY, S.; KEDZIERSKI, J. New methods to transport fluids in micro-sized devices. **Lincoln Laboratory Journal**, v. 17, n. 2, 2008.
- BOLUMAR, T.; SKIBSTED, L. H.; ORLIEN, V. Kinetics of the formation of radicals in meat during high pressure processing. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2114-2120, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: 20 jun. 2012.
- BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, p. 535-543, 1993.

CARINI, M.; FACINO R. M.; ALDINI, G.; CALLONI, M.; COLOMBO, L. Characterization of phenolic antioxidants from Mate (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/Tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, p. 1813-1819, 1998.

CARLSEN, C. U.; MØLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Heme-iron in lipid oxidation. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 485-498, 2005.

CARTEA, M. E.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P.; VELASCO, P. Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. **Molecules**, v. 16, p. 251-280, 2011.

CHAN, W. K. M.; DECKER, E. A.; LEE, J. B.; BUTTERFIELD, D. A. EPR spin-trapping studies of the hydroxyl radical scavenging activity of carnosine and related dipeptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1407-1410, 1994.

CHURCHWARD-VENNE, T.A.; BURD, N. A.; MITCHELL, C. J.; WEST, D. W. D.; PHILIP, A.; MARCOTTE, G. R.; BAKER, S. K.; BAAR, K.; PHILLIPS, S. M. Supplementation of a suboptimal protein dose with leucine or essential amino acids: effects on myofibrillar protein synthesis at rest and following resistance exercise in men. **The Journal of Physiology**, v. 590, p. 2751-2765, 2012.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents on mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v. 35, p. 13-21, 1990.

CORPET, D. E. Red meat and colon cancer: should we become vegetarians, or can we make meat safer?. **Meat Science**, v. 89, n. 3, p. 310-316, 2011.

CRUMB, D. J. Conjugated Linoleic Acid (CLA)-An Overview. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 4, n. 3, p. 12-18, 2011.

CULBERTSON, J. Y.; KREIDER, R. B.; GREENWOOD, M.; COOKE, M. Effects of beta-alanine on muscle carnosine and exercise performance: A review of the current literature. **Nutrients**, v. 2, p. 75-98, 2010.

DALEY, C. A.; ABBOTT, A.; DOYLE, P. S.; NADER, G. A.; LARSON, S. A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. **Nutrition Journal**, v. 9, p. 10, 2010.

DAVIES, K. J. A. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochemistry Society Symposia**, v. 61, p. 1-31, 1995.

DECKER, E. A.; CRUM, A. D. Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork. **Meat Science**, v. 34, p. 245-253, 1993.

DERAVE, W.; EVERAERT, I.; BEECKMAN, S.; BAGUET, A. Muscle carnosine metabolism and β -alanine supplementation in relation to exercise and training. **Sports Medicine**, v. 40, n. 3, p. 247-263, 2010.

DEVILLARD, E.; McINTOSH, F. M.; NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J. Rumen ciliate protozoa contain high concentrations of conjugated linoleic acids and vaccenic acid, yet do not hydrogenate linoleic acid or desaturate stearic acid. **British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 697-704, 2006.

DJENANE, D.; MARTÍNEZ, L.; SÁNCHEZ-ESCALANTE, A.; BELTRÁN, J. A.; RONCALÉS, P. Antioxidant effect of carnosine and carnitine in fresh beef steaks stored under modified atmosphere. **Food Chemistry**, v. 85, p. 453-459, 2004.

DILZER, A.; PARK, Y. Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in Human Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 488-513, 2012.

DUARTE, G. R. M.; COLTRO, W. K. T.; BORBA, J. C.; PRICE, C. W.; LANDERS, J. P.; CARRILHO, E. Disposable polyester-toner electrophoresis microchips for DNA analysis. **Analyst**, v. 137, p. 2692-2698, 2012.

DUARTE, G. R. M.; PRICE, C. W.; AUGUSTINE, B. H.; CARRILHO, E.; LANDERS, J. P. Dynamic solid phase DNA extraction and PCR amplification in polyester-toner based microchip. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 5182-5189, 2011.

ESTÉVEZ, M. Protein carbonyls in meat systems: a review. **Meat Science**, v. 89, p. 259-279, 2011.

FIELD, C. J.; SCHLEY, P. D. Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 1190S-1198S, 2004.

FILIP, R.; LOTITO, S. B.; FERRARO, G.; FRAGA, C. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.

FLORES, M.; ARMERO, E.; ARISTOY, M. -C.; TOLDRA, F. Sensory characteristics of cooked pork loin as affected by nucleotide content and post-mortem meat quality. **Meat Science**, v. 51, p. 53-59, 1999.

FREDERIKSEN, A. M.; LUND, M. N.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Oxidation of porcine myosin by hypervalent myoglobin: the role of thiol groups. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3297-3304, 2008.

GNOATTO, S. C.; DASSONVILLE-KLIMPT, A.; DA NASCIMENTO, S.; GALÉRA, P.; BOUMEDIENE, K.; GOSMANN, G.; SONNET, P.; MOSLEMI, S. Evaluation of ursolic acids isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1865-1877, 2000.

GRAHAM, S. F.; KENNEDY, T.; CHEVALLIER, O.; GORDON, A.; FARMER, L.; ELLIOTT, C.; MOSS, B. The application of NMR to study changes in polar metabolite concentrations in beef *longissimus dorsi* stored for different periods post mortem. **Metabolomics**, v. 6, p. 395-404, 2010.

GONTHIER, M. P.; VERNY, M. A.; BESSON, C.; RÉMÉSY, C.; SCALBERT, A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1853-1859, 2003.

GUIOTTO, A.; CALDERAN, A.; RUZZA, P.; BORIN, G. Carnosine and carnosine-related antioxidants: A review. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, p. 2293-2315, 2005.

GÜLÇİN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. **Life Sciences**, v. 78, p. 803-811, 2006.

HARRIS, R.C.; TALLON, M. J.; DUNNETT, M.; BOOBIS, L.; COAKLEY, J.; KIM, H. J.; FALLOWFIELD, J. L.; HILL, C. A.; SALE, C.; WISE, J. A. The absorption of orally supplied β -alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. **Amino Acids**, v. 30, p. 279-289, 2006.

HECK, I.; MEJIA, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3rd ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd, 2007.

ILIESCU, C.; TAYLOR, H.; AVRAM, M.; MIAO, J.; FRANSSILA, S. A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon. **Biomicrofluidics**, v. 6, p. 16505-1650516, 2012.

ISHIKAWA, S.; TAMAKI, S.; OHATA, M.; ARIHARA, K.; ITOH, M. Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells *via* hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: A possible mechanism of heme-induced colon cancer. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 1-10, 2010.

JAYASENA, D. D.; JUNG, S.; BAE, Y. S.; PARK, H. B.; LEE, J. H.; JO, C. Comparison of the amounts of endogenous bioactive compounds in raw and cooked meats from commercial broilers and indigenous chickens. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 37, p. 20-24, 2015.

JONGBERG, S.; LUND, M. N.; SKIBSTED, L. H.; DAVIES, M. J. Competitive reduction of perferferrylmyoglobin radicals by protein thiols and plant phenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 46, p. 11279-11288, 2014.

JONGBERG, L. V.; ANDERSEN, H. J.; SKIBSTED, L. H. Kinetics of reduction of hypervalent iron in myoglobin by crocin in aqueous solution. **Free Radical Research**, v. 27, p. 73-87, 1997.

JØRGENSEN, L. V.; SKOV, S. H.; TØRNGREN, M. A.; SKIBSTED, L. H.; LUND, M. N. Effect of white grape extract and modified atmosphere packaging on lipid and protein oxidation in chill stored beef patties. **Food Chemistry**, v. 128, p. 276-283, 2011.

KALLI, A.; SMITH, G. T.; SWEREDOSKI, M. J.; HESS, S. Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 7, p. 3071-3086, 2013.

KARRE, L.; LOPEZ, K.; GETTY, K. J. K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Science**, v. 94, p. 220-227, 2013.

KELLY, R. T.; PAGE, J. S.; LUO, Q.; MOORE, R. J.; ORTON, D. J.; TANG, K.; SMITH, R. D. Chemically etched open tubular and monolithic emitters for nanoelectrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 7796-7801, 2006.

KINGSTON, E. R.; MONAHAN, F. J.; BUCKLEY, D. J.; LYNCH, P. B. Lipid oxidation in cooked pork as affected by vitamin E, cooking and storage conditions. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 2, p. 386-389, 1998.

KIM, E.; COELHO, D.; BLACHIER, F. Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. **Nutrition Research**, v. 33, p. 983-994, 2013.

KIM, E.; HUNT, M.; MANCINI, R. A.; SEYFERT, M.; LOUGHIN, T. M.; KROPF, D. H.; SMITH, J. S. Mechanism for lactate-color stabilization in injection-enhanced beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7856-7862, 2006.

KOHEN, R.; YAMAMOTO, Y.; CUNDY, K. C.; AMES, B. N. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 85, p. 3175-3179, 1988.

KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S. A.; WRIGHT, S.; CZARNECKI, S. K.; WILSON, T. A.; NICOLSI, R. J. Conjugated linoleic acid isomer effects in atherosclerosis: Growth and regression of lesions. **Lipids**, v. 39, p. 611-616, 2004.

LARSEN, T. M.; TOUBRO, S.; ASTRUP, A. Efficacy and safety of dietary supplements containing CLA for the treatment of obesity: evidence from animal and human studies. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 2234-2241, 2003.

LEE, B. J.; HENDRICKS, D. G.; CORNFORTH, D. P. Antioxidant effects of carnosine and phytic acid in a model beef system. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 3, p. 394-398, 1998.

LIN, S. -L.; BAI, H. -Y.; LIN, T. -Y.; FUH, M. -R. Microfluidic chip-based liquid chromatography coupled to mass spectrometry for determination of small molecules in bioanalytical applications. **Electrophoresis**, v. 33, p. 635-643, 2012.

LUND, M. N.; HEINONEN, M.; BARON, C. P.; ESTÉVEZ, M. Protein oxidation in muscle foods: A review. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 1, p. 83-95, 2011.

LUND, M. N.; HVIID, M. S.; SKIBSTED, L. H. The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. **Meat Science**, v. 76, p. 226-233, 2007.

MADALINSKI, G.; GODAT, E.; ALVES, S.; LESAGE, D.; GENIN, E.; LEVI, P.; LABARRE, J.; TABET, J.; EZAN, E.; JUNOT, C. Direct introduction of biological samples into a LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer as a tool for fast metabolome analysis. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 3291-3303, 2008.

MANCINI, R. A.; HUNT, M. C. Current research in meat color. **Meat Science**, v. 71, p. 100-121, 2005.

MAKAROV, A.; DENISOV, E.; LANGE, O.; HORNING, S. Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer. **Journal of American Society of Mass Spectrometry**, v. 17, p. 977-982, 2006.

MUROYA, S.; OE, M.; NAKAJIMA, I.; OJIMA, K.; CHIKUNI, K. CE-TOF-MS-based metabolomic profiling revealed characteristic metabolic pathways in postmortem porcine fast and slow type muscles. **Meat Science**, v. 98, p. 726-735, 2014.

NGE, P. N.; ROGERS, C. I.; WOOLLEY, A. T. Advances in microfluidic materials, functions, integration, and applications. **Chemical Reviews**, v. 113, p. 2550-2583, 2013.

NILE, H. S.; KHOBRADE, C. N.; PARK, S. W. Optimized and comparative antioxidant assays and its applications in herbal and synthetic drug analysis as an antioxidants. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1007-1014, 2012.

NORTON, L. E.; LAYMAN, D. K. Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise. **The Journal of Nutrition**, v. 136, p. 533S-537S, 2006.

PAN, M.; LAI, C.; HO, C. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food & Function**, v. 1, p. 15-31, 2010.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 1, p. 24-37, 2011.

PEREIRA, P. M. C. C.; VICENTE, A. F. R. B. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. **Meat Science**, v. 93, p. 586-592, 2013.

PICONE, G.; ENGELSEN, S. B.; SAVORANI, F.; TESTI, S.; BADIANI, A.; CAPOZZI, F. Metabolomics as a powerful tool for molecular quality assessment of the fish *Sparus aurata*. **Nutrients**, v. 3, n. 2, p. 212-227, 2011.

POLOVKA, M. EPR spectroscopy: A tool to characterize stability and antioxidant properties of foods. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 45, p. 1-11, 2006.

PREMA, D.; TURNER, T. D.; JENSEN, J.; PILFOLD, J. L.; CHURCH, J. S.; DONKOR, K. K.; CINEL, B. Rapid determination of total conjugated linoleic acid concentrations in beef by ¹H NMR spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 54-57, 2015.

PURCHAS, R. W.; RUTHERFURD, S. M.; PEARCE, P. D.; VATHER, R.; WILKINSON, B. H. P. Concentration in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q₁₀ and creatine. **Meat Science**, v. 66, p. 629-637, 2004.

PURSLOW, P. P. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. **Meat Science**, v. 70, p. 435-447, 2005.

RACANICCI, A. M. C.; MENTEN, J. F. M.; ALENCAR, S. M.; BUISSA, R. S.; SKIBSTED, L. H. Mate (*Ilex paraguariensis*) as dietary additive for broilers : performance and oxidative stability of meat. **European Food Research and Technology**, v. 232, n. 4, p. 655-661, 2011.

RAMANATHAN, R.; MANCINI, R. A.; DADY, G. A. Effects of pyruvate, succinate, and lactate enhancement on beef *longissimus* raw color. **Meat Science**, v. 88, p. 424-428, 2011.

REYES, D. R.; IOSSIFIDIS, D.; AUROUX, P. -A.; MANZ, A. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 2623-2636, 2002.

RICCO, R. A.; WAGNER, M. L.; GURNI, A. A. Estudio comparativo de flavonoides en seis especies austrosudamericanas del género *Ilex*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 35, p. 29-35, 1991.

SAIGA, A.; TANABE, S.; NISHIMURA, T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3661-3667, 2003.

SHAH, M. A.; DON BOSCO, S. J.; MIR, S. A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. **Meat Science**, v. 98, p. 21-33, 2014.

STRAADT, I. K.; AASLYNG, M. D.; BERTRAM, H. C. An NMR-based metabolomics study of pork from different crossbreeds and relation to sensory perception. **Meat Science**, v. 96, p. 719-728, 2014.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, 2001.

THOMPSON, B. L.; OUYANG, Y.; DUARTE, G. R. M.; CARRILHO, E.; KRAUSS, S. T.; LANDERS, J. P. Inexpensive, rapid prototyping of microfluidic devices using overhead transparencies and a laser print, cut and laminate fabrication method. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 875-886, 2015.

TANG, J.; FAUSTMAN, C.; MANCINI, R. A.; SEYFERT, M.; HUNT, M. C. Mitochondrial reduction of metmyoglobin: dependence on the electron transport chain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5449-5455, 2005.

TRABI, M.; KELLER, M. D.; JONSSON, N. N. NMR-based metabolomics of bovine blood: an investigation into the effects of long term storage on plasma samples. **Metabolomics**, v. 9, p. 1041-1047, 2013.

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 27, p. 368-373, 2006.

WORKSHOP ON THE ROLE OF CONJUGATED LINOLEIC ACID IN HUMAN HEALTH, 2003, Winnipeg. **Proceedings on the Role of CLA in Human Health**. Winnipeg: DRTC, 2003

WU, H; SHIAU, C.; CHEN, H.; CHIOU, T. Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 11, n. 2, p. 148-153, 2003.

WYSS, M; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and Creatinine Metabolism. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 1107-1213, 2000.

ZHAN, X. A.; LI, J. X.; XU, Z. R.; ZHAO, R. Q. Effects of methionine and betaine supplementation on growth performance, carcass composition and metabolism of lipids in male broilers. **Meat Science**, v. 11, n. 2, p. 148-153, 2006.

ZHAO, E. H.; ERGUL, B.; ZHAO, W. Caffeine's antioxidant potency optically sensed with double-stranded DNA-encased single-walled carbon nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, p. 4068-4075, 2015.

ZHANG, W.; SHAN, X.; SAMARAWEERA, H.; LEE, E. J.; AHN, D. U. Improving functional value of meat products. **British Poultry Science**, v. 47, n. 5, p. 576-580, 2006.

ZHONG, R. Z.; LI, H. Y.; FANG, Y.; SUN, H. X.; ZHOU, D. W. Effects of dietary supplementation with green tea polyphenols on digestion and meat quality in lambs infected with *Haemonchus contortus*. **Meat Science**, v. 105, p. 1-7, 2015.

ANEXO I

Espectros de MS e MS² dos padrões de metabólitos polares e amostras de extratos de carne suplementadas com erva mate

MS (-) Lactato Padrão

mix1_10_6-#71 RT: 3.01 AV: 1 NL: 2.71E5
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Lactato Padrão

MS2_lac_padrao_150305143450 #13 RT: 0.13 AV: 1 NL: 2.26E1
T: ITMS - p ESI Full ms2 89.00@cid15.00 [20.00-100.00]

MS (-) Lactato Carne

2_-140829123317 #71 RT: 3.00 AV: 1 NL: 2.31E7
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Lactato Carne

MS2_lac_carne_150305143450 #15 RT: 0.14 AV: 1 NL: 2.45E2
T: ITMS - p ESI Full ms2 89.00@cid18.00 [20.00-95.00]

MS (+) Alanina Padrão

mix1_10_6+ 140827210459 #6 RT: 0.21 AV: 1 NL: 7.12E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Alanina Padrão

MS2_ala_padrao 150305143450 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 6.30E3
T: ITMS + p ESI Full ms2 90.00@cid15.00 [20.00-100.00]

MS (+) Alanina Carne

28(+) #4 RT: 0.12 AV: 1 NL: 6.91E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Alanina Carne

MS2_ala_carne_150305143450 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.15E3
T: ITMS + p ESI Full ms2 90.00@cid15.00 [20.00-95.00]

MS (+) Prolina Padrão

mix1_10_6+ 140827210459 #9 RT: 0.34 AV: 1 NL: 6.00E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Prolina Padrão

MS2prol+ #29 RT: 0.43 AV: 1 NL: 3.70E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 116.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Prolina Carne

28(+) #4 RT: 0.12 AV: 1 NL: 1.55E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Prolina Carne

MS2prol+30 #19 RT: 0.28 AV: 1 NL: 1.25E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 116.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (-) Succinato Padrão

mix1_10_6-#6 RT: 0.21 AV: 1 NL: 4.55E5
T: FTMS -p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Succinato Padrão

MS2succ-#14 RT: 0.20 AV: 1 NL: 3.51E5
T: FTMS -p ESI Full ms2 117.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (-) Succinato Carne

2- 140829123317 #5 RT: 0.17 AV: 1 NL: 1.40E5
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Succinato Carne

MS2succ-30 #15 RT: 0.22 AV: 1 NL: 5.15E4
T: FTMS - p ESI Full ms2 117.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Metionina Padrão

mix1_10_6+ 140827210459 #7 RT: 0.25 AV: 1 NL: 1.26E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Metionina Padrão

MS2met+ #33 RT: 0.50 AV: 1 NL: 3.39E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 150.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Metionina Carne

28(+) #3 RT: 0.08 AV: 1 NL: 1.43E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Metionina Carne

MS2met+31 #31 RT: 0.47 AV: 1 NL: 1.70E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 150.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (-) Aspartato Padrão

mix1_10_6-#4 RT: 0.13 AV: 1 NL: 1.78E5
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Aspartato Padrão

MS2asptt-#7 RT: 0.09 AV: 1 NL: 3.32E5
T: FTMS - p ESI Full ms2 132.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (-) Aspartato Carne

2- 140829123317 #5 RT: 0.17 AV: 1 NL: 2.19E4
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Aspartato Carne

MS2asptt-30 #24 RT: 0.36 AV: 1 NL: 1.36E4
T: FTMS - p ESI Full ms2 132.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Glutamina Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #6 RT: 0.21 AV: 1 NL: 7.91E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Glutamina Padrão

MS2glutn+ #37 RT: 0.56 AV: 1 NL: 9.35E4
T: FTMS + p ESI Full ms2 147.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Glutamina Carne

28(+) #19 RT: 0.75 AV: 1 NL: 6.57E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Glutamina Carne

MS2glut+31 #39 RT: 0.60 AV: 1 NL: 1.08E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 147.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Asparagina Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #3 RT: 0.08 AV: 1 NL: 7.72E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Asparagina Padrão

MS2aspag+ #9 RT: 0.12 AV: 1 NL: 2.10E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 133.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Asparagina Carne

28(+) #12 RT: 0.46 AV: 1 NL: 5.99E4
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Asparagina Carne

MS2aspag+31 #17 RT: 0.24 AV: 1 NL: 1.09E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 133.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (-) Glutamato Padrão

mix1_10_6-#6 RT: 0.21 AV: 1 NL: 1.81E5
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Glutamato Padrão

MS2glutt-#20 RT: 0.30 AV: 1 NL: 1.01E6
T: FTMS - p ESI Full ms2 146.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (-) Glutamato Carne

2- 140829123317 #10 RT: 0.38 AV: 1 NL: 1.59E5
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Glutamato Carne

MS2glutt-30 #26 RT: 0.39 AV: 1 NL: 2.25E5
T: FTMS - p ESI Full ms2 146.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Creatina Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #8 RT: 0.29 AV: 1 NL: 1.13E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Creatina Padrão

MS2creat+ #13 RT: 0.18 AV: 1 NL: 1.45E8
T: FTMS + p ESI Full ms2 132.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Creatina Carne

28(+) #6 RT: 0.21 AV: 1 NL: 2.47E8
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Creatina Carne

MS2creat+31 #18 RT: 0.25 AV: 1 NL: 2.02E8
T: FTMS + p ESI Full ms2 132.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Creatinina Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #9 RT: 0.34 AV: 1 NL: 1.05E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Creatinina Padrão

MS2creatinina+ #24 RT: 0.33 AV: 1 NL: 2.67E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 114.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Creatinina Carne

28(+) #7 RT: 0.25 AV: 1 NL: 1.91E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Creatinina Carne

MS2creatinina+30 #17 RT: 0.23 AV: 1 NL: 2.33E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 114.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Glicina Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #8 RT: 0.29 AV: 1 NL: 6.68E4
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Glicina Padrão

MS2_gly_padrao_150305143450 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.23E2
T: ITMS + p ESI Full ms2 76.00@cid17.00 [20.00-80.00]

MS (+) Glicina Carne

28(+) #36 RT: 1.48 AV: 1 NL: 6.41E4
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Glicina Carne

MS2_Gly_carne_150305143450 #39 RT: 0.10 AV: 1 NL: 9.71
T: ITMS + p ESI Full ms2 76.00@cid19.00 [20.00-95.00]

MS (-) Treonina Padrão

mix1_10_6-#8 RT: 0.30 AV: 1 NL: 2.02E5
T: FTMS -p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Treonina Padrão

MS2treo-#23 RT: 0.35 AV: 1 NL: 5.59E4
T: FTMS -p ESI Full ms2 118.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (-) Treonina Carne

2- 140829123317 #7 RT: 0.25 AV: 1 NL: 1.43E5
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Treonina Carne

MS2treo-30 #20 RT: 0.30 AV: 1 NL: 2.66E4
T: FTMS - p ESI Full ms2 118.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Colina Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #9 RT: 0.34 AV: 1 NL: 4.91E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Colina Padrão

MS2colin+ #12 RT: 0.16 AV: 1 NL: 9.01E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 104.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Colina Carne

28(+) #5 RT: 0.17 AV: 1 NL: 1.00E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Colina Carne

MS2colin+30 #12 RT: 0.17 AV: 1 NL: 8.93E4
T: FTMS + p ESI Full ms2 104.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (-) Uridina Padrão

mix1_10_6-#4 RT: 0.13 AV: 1 NL: 2.16E6
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Uridina Padrão

MS2uridin-#12 RT: 0.17 AV: 1 NL: 5.41E6
T: FTMS - p ESI Full ms2 243.00@cid35.00 [65.00-800.00]

MS (-) Uridina Carne

2- 140829123317 #11 RT: 0.42 AV: 1 NL: 1.48E4
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Uridina Carne

MS2uridin-30 #20 RT: 0.30 AV: 1 NL: 1.55E5
T: FTMS - p ESI Full ms2 243.00@cid35.00 [65.00-800.00]

MS (-) Serina Padrão

mix1_10_6_-140827213241 #4 RT: 0.13 AV: 1 NL: 2.32E5
T: FTMS -p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Serina Padrão

MS2serin- #18 RT: 0.27 AV: 1 NL: 5.77E4
T: FTMS -p ESI Full ms2 104.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (-) Serina Carne

2- 140829123317 #5 RT: 0.17 AV: 1 NL: 1.19E5
T: FTMS -p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Serina Carne

MS2serin-30 #18 RT: 0.27 AV: 1 SB: 2 0.87, 2.06 NL: 1.66E4
T: FTMS -p ESI Full ms2 104.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Tirosina Padrão

MS² (+) Tirosina Padrão

MS (+) Tirosina Carne

28(+)#4 RT: 0.12 AV: 1 NL: 1.60E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Tirosina Carne

MS2tyr+31 #33 RT: 0.50 AV: 1 SB: 2 1.09, 2.77 NL: 9.87E4
T: FTMS + p ESI Full ms2 182.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Lisina Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #9 RT: 0.34 AV: 1 NL: 2.74E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Lisina Padrão

MS2lys+ #38 RT: 0.58 AV: 1 NL: 5.57E4
T: FTMS + p ESI Full ms2 147.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Lisina Carne

28(+) #13 RT: 0.50 AV: 1 NL: 9.79E4
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Lisina Carne

MS2lys+31 #134 RT: 2.10 AV: 1 NL: 9.75E3
T: FTMS + p ESI Full ms2 147.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Carnosina Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #8 RT: 0.29 AV: 1 SB: 2 0.93 , 2.25 NL: 1.23E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Carnosina Padrão

MS2caro+ #9 RT: 0.12 AV: 1 NL: 6.26E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 227.00@cid20.00 [60.00-260.00]

MS (+) Carnosina Carne

28(+)#4 RT: 0.12 AV: 1 NL: 7.90E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Carnosina Carne

MS2caro+31 #26 RT: 0.36 AV: 1 NL: 1.20E8
T: FTMS + p ESI Full ms2 227.00@cid35.00 [60.00-800.00]

MS (+) Carnitina Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #7 RT: 0.25 AV: 1 NL: 7.29E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Carnitina Padrão

MS2carnit+ #44 RT: 0.65 AV: 1 NL: 1.55E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 162.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Carnitina Carne

28(+) #4 RT: 0.12 AV: 1 NL: 2.26E8
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Carnitina Carne

MS2carn+31 #12 RT: 0.16 AV: 1 NL: 6.14E7
T: FTMS + p ESI Full ms2 162.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Inosina Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #6 RT: 0.21 AV: 1 NL: 1.27E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Inosina Padrão

MS2_ino_269 #20 RT: 0.30 AV: 1 NL: 6.80E3
T: FTMS + p ESI Full ms2 269.00@cid35.00 [70.00-800.00]

MS (+) Inosina Carne

28(+) #10 RT: 0.37 AV: 1 NL: 1.91E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Inosina Carne

MS2Inos+31 #7 RT: 0.09 AV: 1 SB: 2 1.44 , 4.63 NL: 2.40E3
T: FTMS + p ESI Full ms2 269.00@cid35.00 [70.00-800.00]

MS (+) Arginina Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #3 RT: 0.08 AV: 1 SB: 2 0.72 , 1.87 NL: 3.94E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Arginina Padrão

MS2_arg_175 #9 RT: 0.12 AV: 1 NL: 9.94E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 175.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Arginina Carne

28(+)#10 RT: 0.37 AV: 1 NL: 2.30E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Arginina Carne

MS2argin+31 #28 RT: 0.42 AV: 1 NL: 5.06E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 175.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (-) Citrato Padrão

mix1_10_6_-140827213241 #11 RT: 0.43 AV: 1 NL: 6.94E3
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Citrato Padrão

MS2cit-30 #28 RT: 0.43 AV: 1 NL: 2.06E5
T: FTMS - p ESI Full ms2 191.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (-) Citrato Carne

2_140829123317 #10 RT: 0.38 AV: 1 NL: 4.47E5
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Citrato Carne

MS2cit- #10 RT: 0.14 AV: 1 NL: 2.44E6
T: FTMS - p ESI Full ms2 191.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Anserina Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #3 RT: 0.08 AV: 1 SB: 2 0.85 , 2.25 NL: 3.15E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Anserina Padrão

MS2anser+ #9 RT: 0.12 AV: 1 NL: 3.47E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 241.00@cid20.00 [65.00-270.00]

MS (+) Anserina Carne

28(+) #10 RT: 0.37 AV: 1 NL: 1.36E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Anserina Carne

MS2Anse+31 #20 RT: 0.29 AV: 1 NL: 5.05E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 241.00@cid35.00 [65.00-800.00]

MS (+) Homoserina Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #8 RT: 0.29 AV: 1 SB: 1 1.57 NL: 1.00E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Homoserina Padrão

MS2homos+ #17 RT: 0.24 AV: 1 NL: 5.67E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 120.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Homoserina Carne

28(+) #11 RT: 0.42 AV: 1 NL: 3.55E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Homoserina Carne

MS2homos+31 #32 RT: 0.49 AV: 1 SB: 1 4.44 NL: 5.36E4
T: FTMS + p ESI Full ms2 120.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Glutathiona Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #6 RT: 0.21 AV: 1 SB: 1 1.31 NL: 1.21E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Glutathiona Padrão

MS2glutt+ #55 RT: 0.85 AV: 1 NL: 5.90E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 148.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Glutaciona Carne

28(+) #13 RT: 0.50 AV: 1 NL: 7.33E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Glutaciona Carne

MS2glutt+31 #44 RT: 0.68 AV: 1 NL: 5.38E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 148.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Citrulina Padrão

mix1 10 6+ 140827210459 #3 RT: 0.08 AV: 1 SB: 1 0.01 NL: 1.71E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Citrulina Padrão

MS2citru+ #27 RT: 0.41 AV: 1 SB: 1 3.68 NL: 6.42E3
T: FTMS + p ESI Full ms2 176.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Citrulina Carne

28(+) #11 RT: 0.42 AV: 1 NL: 5.13E4
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Citrulina Carne

MS2citru+31 #11 RT: 0.16 AV: 1 NL: 3.74E3
T: FTMS + p ESI Full ms2 176.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Fenilalanina Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #10 RT: 0.38 AV: 1 NL: 4.79E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Fenilalanina Padrão

MS2fenyl+ #42 RT: 0.63 AV: 1 NL: 2.86E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 166.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Fenilalanina Carne

28(+) #8 RT: 0.29 AV: 1 NL: 1.45E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Fenilalanina Carne

MS2fenyl+31 #27 RT: 0.41 AV: 1 NL: 1.49E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 166.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+)Hipoxantina Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #11 RT: 0.42 AV: 1 SB: 1 0.93 NL: 2.52E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Hipoxantina Padrão

MS2hipox+ #22 RT: 0.31 AV: 1 SB: 2 0.01, 0.06 NL: 7.95E3
T: FTMS + p ESI Full ms2 137.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Hipoxantina Carne

28(+) #10 RT: 0.37 AV: 1 NL: 9.00E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Hipoxantina Carne

MS2hipox+ #22 RT: 0.31 AV: 1 SB: 2 0.01, 0.06 NL: 7.95E3
T: FTMS + p ESI Full ms2 137.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (-) Nicotinurato Padrão

mix1_10_6_-140827213241 #4 RT: 0.13 AV: 1 SB: 1 1.20 NL: 1.60E6
T: FTMS -p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Nicotinurato Padrão

MS2nicot-gluc- #21 RT: 0.31 AV: 1 NL: 3.03E6
T: FTMS -p ESI Full ms2 179.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (-) Nicotinurato Carne

2- 140829123317 #13 RT: 0.51 AV: 1 NL: 5.09E3
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (-) Nicotinurato Carne

MS2nicot-gluc-30 #34 RT: 0.52 AV: 1 SB: 1 0.63 NL: 3.86E3
T: FTMS - p ESI Full ms2 179.00@cid35.00 [50.00-800.00]

MS (+) Triptofano Padrão

mix1_10_6+_140827210459 #6 RT: 0.21 AV: 1 SB: 2 1.48 , 2.21 NL: 1.68E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Triptofano Padrão

MS2tryp+ #87 RT: 1.36 AV: 1 NL: 3.63E3
T: FTMS + p ESI Full ms2 205.00@cid35.00 [55.00-800.00]

MS (+) Triptofano Carne

28(+) #10 RT: 0.37 AV: 1 NL: 6.48E4
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) Triptofano Carne

MS2tryp+31 #21 RT: 0.31 AV: 1 NL: 2.24E3
T: FTMS + p ESI Full ms2 205.00@cid35.00 [55.00-800.00]

MS (+) GSSG Padrão

mix2_10_5+d #134 RT: 5.64 AV: 1 NL: 4.65E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) GSSG Padrão

MS2 (+) #251 RT: 5.37 AV: 1 NL: 1.59E7
F: FTMS + p ESI Full ms2 613.15@cid35.00 [155.00-620.00]

MS (+) GSSG Carne

48(+) 151016052401 #134 RT: 5.62 AV: 1 NL: 1.48E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

MS² (+) GSSG Carne

46(+) MS2 #262 RT: 5.54 AV: 1 NL: 2.35E6
F: FTMS + p ESI Full ms2 613.15@cid35.00 [155.00-620.00]