

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Exatas**

**Departamento de Química**

Josimar Marques Batista

**APLICAÇÃO DE CROMATOGRAFIA A GÁS E EXTRAÇÃO POR mNTC EM  
ESTUDO METABOLÔMICO DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR  
POLUENTES EMERGENTES**

Belo Horizonte

2020

UFMG/ICEX/DQ.1424  
D. 771

Josimar Marques Batista

**APLICAÇÃO DE CROMATOGRAFIA A GÁS E EXTRAÇÃO POR mNTC EM  
ESTUDO METABOLÔMICO DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR  
POLUENTES EMERGENTES**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Analítica.

Orientadora: Profa. Zenilda de Lourdes Cardeal

Belo Horizonte

2020

Ficha Catalográfica

B328a Batista, Josimar Marques  
2020 Aplicação de cromatografia a gás e extração por mNTC  
D em estudo metabolômico de contaminação ambiental por  
poluentes emergentes [manuscrito] / Josimar Marques  
Batista. 2020.  
82 f. : il.

Orientadora: Zenilda de Lourdes Cardeal.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses. 2. Aminoácidos -  
Metabolismo - Teses. 3. *Saccharomyces cerevisiae* -  
Teses. 4. Nanotubos de carbono - Teses. 5. Química  
ambiental - Teses. 6. Cromatografia de gás - Teses. 7.  
Espectrometria de massa - Teses. 8. Poluição - Aspectos  
ambientais - Teses. I. Cardeal, Zenilda de Lourdes,  
Orientadora. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**"Aplicação de Cromatografia a Gás e Extração por mNTC em Estudo Metabólico de Contaminação Ambiental por Poluentes Emergentes"**

**Josimar Marques Batista**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Zenilda de Lourdes Cardeal - Orientadora  
UFMG

Profa. Adriana Nori de Macedo  
UFMG

Prof. Evandro Piccin  
UFMG

Belo Horizonte, 30 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Zenilda de Lourdes Cardeal, Coordenador(a)**, em 30/11/2020, às 17:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Nori de Macedo, Professora do Magistério Superior**, em 30/11/2020, às 18:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Evandro Piccin, Professor do Magistério Superior**, em 09/12/2020, às 09:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0438323** e o código CRC **69F9468C**.

---

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais e avós.  
À Ciência.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela iluminação e por não deixar que os momentos de solidão superassem os de solitude.

Aos meus pais, Marlene e José Adão, pelo amor, carinho e compreensão. Aos meus avós, Jasmira e Sebastião, pelo aconchego das palavras e dos atos. Aos meus irmãos, Josiene e Josiney, pelo companheirismo.

À Vânia, pela amizade e conhecimento compartilhado em metabolômica e pelo enorme coração que tem.

À Édila, amiga e gerente das Moradias universitárias da UFMG, por ter me ajudado a permanecer na Moradia de Belo Horizonte nos primeiros sete meses que fiquei sem bolsa de mestrado.

À Josiane, pela amizade verdadeira, companheirismo, espiritualidade, generosidade e pelo apoio constante.

À professora Zenilda, pela orientação de longa data, companheirismo e pelo compartilhamento do seu vasto conhecimento em cromatografia gasosa.

Ao professor Helvécio, pela ajuda e compartilhamento do seu conhecimento em estatística.

À professora Maria José, pela parceria nos experimentos biológicos e pela paciência em me ensinar microbiologia e bioquímica nos mínimos detalhes.

Às professoras Lucienir, Lúcia (Química Orgânica), Cláudia (Química Analítica) e ao professor Guilherme (Química Inorgânica), pelas excelentes aulas que me ajudaram na preparação para o exame de seleção de doutorado e pelo carinho nesses tempos difíceis.

À professora Dayse, pela linda experiência em Redação Científica e pela sua imensa dedicação ao aprendizado dos estudantes.

Aos colegas da Rede Mineira de Cromatografia Avançada, por promoverem um ambiente laboratorial saudável e descontraído.

À Nayara, pela amizade, carinho e grande apoio durante o período de quarentena. À Ana Maciel, pela linda amizade que se iniciou na graduação e por sempre me incentivar a lutar pelos meus objetivos. À Cássia, pelo carinho, apoio e pelas conversas que me ajudaram sempre a acreditar que meus sonhos se realizarão.

Ao Giovany Oliveira, pela amizade que supera distâncias, eras e pandemias; aos amigos Dian, Icaro e Fabiane, pelo suporte, afeto e aprendizados compartilhados.

À UFMG, que me acolhe e permite crescer humana e profissionalmente. À Capes, pelo auxílio financeiro. E a todas e todos que me apoiaram direta ou indiretamente e contribuíram para que este momento se torne verdade.

*“O caminho do progresso não é rápido nem fácil.”*  
Marie Curie



## RESUMO

A metabolômica investiga modificações de metabólitos em uma célula, tecido ou organismo. Os aminoácidos representam uma classe de metabólitos importantes em estudos voltados para o diagnóstico precoce de doenças, incluindo o câncer, cujo principal modelo experimental celular é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O benzo[*a*]pireno (BaP) é considerado um contaminante prioritário para diferentes agências de controle ambiental por ser um composto comprovadamente carcinogênico para humanos. Portanto, é importante avaliar a interferência de BaP no metabolismo de aminoácidos com a finalidade de encontrar biomarcadores de câncer. Neste trabalho, foi desenvolvido e otimizado um novo procedimento de extração de aminoácidos (derivatizados com propil cloroformato/propanol) usando nanotubos de carbono magnéticos funcionalizados. Foi possível concluir que o nanotubo híbrido A15E15 e a dessorção sem aquecimento promoveram a melhor extração dos analitos. Nos estudos de exposição de *Saccharomyces cerevisiae*, verificou-se, através de curvas de crescimento celular, que a concentração de BaP de 25,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  provocou alterações na viabilidade celular, indicando alterações metabólicas. Um método de cromatografia a gás com detector de espectrometria de massas utilizando coluna Phenomenex ZB-AAA foi otimizado possibilitando a determinação de 16 aminoácidos (AA) em leveduras expostas e não expostas ao BaP. O estudo de alguns parâmetros de mérito mostrou que o método apresentou boa seletividade e linearidade na faixa de 0,004 a 50,00  $\text{mg L}^{-1}$  ( $R^2 > 0,9800$ ). Os limites de detecção (LOD) ficaram na faixa de 0,002 a 0,31  $\text{mg L}^{-1}$  e os limites de quantificação (LOQ), na faixa de 0,004 a 0,41  $\text{mg L}^{-1}$ . A determinação de AA em células expostas e não expostas ao BaP mostrou, por meio de ANOVA com teste *post-hoc* de Bonferroni, com intervalo de confiança de 95%, que os aminoácidos glicina (Gly), serina (Ser), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), tirosina (Tyr) e leucina (Leu) diferenciaram estatisticamente os dois grupos de amostras. Esse resultado confirmou estudos anteriores que revelaram o potencial desses AA como candidatos a biomarcadores de câncer.

**Palavras-chave:** Metabolômica de aminoácidos. Nanotubos de carbono. GC/MS. Benzo[*a*]pireno. *Saccharomyces cerevisiae*.

## ABSTRACT

Metabolomics investigates changes in metabolites in a cell, tissue or organism. Amino acids represent a class of important metabolites in studies aimed at the early diagnosis of diseases, including cancer, whose main experimental cellular model is the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Benzo[a]pyrene (BaP) is considered a priority contaminant for different environmental control agencies because it is a proven carcinogenic compound for humans. Therefore, it is important to evaluate the BaP interference in the metabolism of amino acids in order to find cancer biomarkers. In this work, a new amino acid extraction procedure (derivatized with propyl chloroformate/propanol) using functionalized magnetic carbon nanotubes was developed and optimized. It was possible to conclude that the hybrid nanotube A15E15 and desorption without heating promoted the best analytes extraction. In studies of exposure of *Saccharomyces cerevisiae*, it was found, through cell growth curves, that the BaP concentration of 25.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  caused changes in cell viability, indicating metabolic changes. A gas chromatography method with mass spectrometry detector using a Phenomenex ZB-AAA column was optimized, enabling the determination of 16 amino acids (AA) in yeasts exposed and not exposed to BaP. The study of some parameters of merit showed that the method showed good selectivity and linearity in the range of 0.004 to 50.00  $\text{mg L}^{-1}$  ( $R^2 > 0.9800$ ). The limits of detection (LOD) were in the range of 0.002 to 0.31  $\text{mg L}^{-1}$  and the limits of quantification (LOQ) in the range of 0.004 to 0.41  $\text{mg L}^{-1}$ . The AA determination in cells exposed and not exposed to BaP showed, through ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test, with a confidence interval of 95%, that the amino acids glycine (Gly), serine (Ser), phenylalanine (Phe), proline (Pro), asparagine (Asn), aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu), tyrosine (Tyr) and leucine (Leu) statistically differentiated the two groups of samples. This result confirmed previous studies that revealed the potential of these AAs as cancer biomarkers candidates.

**Key-words:** Amino acid metabolomics. Carbon nanotubes. GC/MS. Benzo[a]pyrene. *Saccharomyces cerevisiae*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biotransformação do benzo(a)pireno formando adutos de DNA como produtos finais (adaptada de [20]).	21
Figura 2. Registros de artigos encontrados no portal <i>Web of Science</i> , de 2010 a 2020, com os termos de busca “nanomaterials” e “sample preparation”. Acessado em 5/10/2020.	23
Figura 3. Registros de artigos encontrados no portal <i>Web of Science</i> , de 2010 a 2020, com os termos de busca “ <i>S. cerevisiae</i> ” e “gas chromatography”. Acessado em 5/10/2020.	24
Figura 4. Registros de artigos encontrados no portal <i>Web of Science</i> , de 2010 a 2020, com os termos de busca “amino acid derivatization” e “gas chromatography”. Acessado em 5/10/2020.	27
Figura 5. Montagem experimental utilizada na purificação de mNCTs.	33
Figura 6. Fluxograma do procedimento de derivatização dos aminoácidos por propil cloroformato/propanol seguida de extração dos derivados usando mNCTs.	37
Figura 7. Curva de crescimento celular teórica.	39
Figura 8. Curva de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> na presença de BaP na faixa de $1,0 \times 10^{-3}$ a $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ .	40
Figura 9. Curva de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> na presença de BaP na faixa de 75,0 a $500,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ .	41
Figura 10. Curva de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> na presença de BaP na faixa de 12,5 a $75,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ .	41
Figura 11. Imagens de MET dos nanotubos: a) A15E15, b) E15A15, c) A30, d) E30.	43
Figura 12. Espectro de Raman para os quatro tipos de mNCTs.	44
Figura 13. Estudo comparativo da extração de aminoácidos derivatizados com propil cloroformato/propanol usando quatro tipos de mNCTs e extração líquido-líquido.	45
Figura 14. Influência da dessorção com e sem aquecimento para análise dos aminoácidos derivatizados com propil cloroformato/propanol e extraídos com mNCTs A15E15.	46
Figura 15. (A) Cromatograma obtido no modo SIM dos 17 padrões de aminoácidos, cada um na concentração de $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ : 1-Ala, 2-Sar, 3-Gly, 4-Val, PI (padrão interno), 5-Leu, 6-Ile, 7-Thr, 8-Ser, 9-Pro, 10-Asn, 11-Asp, 12-Met, 13-Glu, 14-Phe, 15-Lys, 16-Tyr, 17-Trp. (B) Cromatograma de extrato de leveduras expostas ao BaP ( $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).	48
Figura 16. Aminoácidos derivatizados que apresentaram diferença estatística entre os grupos de amostras “células + BaP”, “células + acetona” e “células controle”, segundo ANOVA, com intervalo de confiança de 95%, $n = 3$ .	56
Figura 17. Ciclo do glioxilato.	57
Figura 18. Estruturas dos 17 aminoácidos envolvidos neste trabalho.	80
Figura 19. Curvas de calibração dos derivados de aminoácidos determinados por GC/MS que se adequaram à regressão linear por MQO.	81

Figura 20. Curvas de calibração dos derivados de aminoácidos determinados por GC/MS que se adequaram à regressão linear por MQP. ....82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estruturas químicas dos produtos de reações de derivatização de aminoácidos com MSTFA e alquilcloroformatos (adaptada de [68]).	26
Tabela 2. Sequência de produção dos nanotubos de carbono magnéticos.	32
Tabela 3. Resultado da análise elementar para os mNTCs.	44
Tabela 4. Tempos de retenção cromatográfica e razões $m/z$ dos derivados de aminoácidos analisados por GC/MS.	47
Tabela 5. Análise exploratória por GC/MS da concentração de aminoácidos em extrato não diluído de levedura controle por comparação direta com solução padrão de aminoácidos 20,0 mg L <sup>-1</sup> .	50
Tabela 6. Faixas lineares, equações das retas, coeficientes de determinação das curvas de calibração e LOD/LOQ de cada derivado de aminoácido analisado.	52
Tabela 7. Concentrações de aminoácidos ( $\pm$ desvio padrão, $n = 3$ ) derivatizados por propil cloroformato/propanol, extraídos por mNTCs e analisados por GC/MS nos extratos <i>S. cerevisiae</i> .	53
Tabela 8. Concentrações de aminoácidos ( $n = 3$ ) derivatizados por propil cloroformato/propanol, extraídos por mNTCs e quantificados por GC/MS em extratos de <i>S. cerevisiae</i> (com correção de diluições).	54
Tabela 9. Teste de Bonferroni aplicado a concentrações de AA ( $n = 3$ ) que apresentaram resultados estatisticamente diferentes no teste ANOVA ( $p = 0,05$ ).	55
Tabela 10. Principais trabalhos de metabolômica da exposição de organismos ao BaP e suas metodologias.	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	aminoácido
Ala	alanina
ANOVA	Análise de Variância
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>
BaP	benzo[ <i>a</i> ]pireno
BSTFA	<i>N,O</i> -bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CE/MS	<i>capillary electrophoresis/mass spectrometry</i>
CHN	carbono, hidrogênio e nitrogênio
CoA	coenzima-A
COVID-19	<i>Coronavirus disease-2019</i>
CVD	<i>chemical vapour deposition</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DQ-UFMG	Departamento de Química-Universidade Federal de Minas Gerais
DR1	reagente derivatizante 1
DR2	reagente derivatizante 2
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EUROSCARF	<i>European Saccharomyces cerevisiae Archive for Functional Analysis</i>

GC/MS	<i>gas chromatography/mass spectrometry</i>
GC/TOF-MS	<i>gas chromatography/time of flight-mass spectrometry</i>
Glu	ácido glutâmico
Gly	glicina
GRUTAM	Grupo de Tecnologias Ambientais
HPA	hidrocarboneto policíclico aromático
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
Ile	isoleucina
LC/MS	<i>liquid chromatography/mass spectrometry</i>
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography - tandem mass spectrometer</i>
Leu	leucina
LOD	<i>limit of detection</i>
LOQ	<i>limit of quantification</i>
Lys	lisina
Met	metionina
MET	microscopia eletrônica de transmissão
mNTC	nanotubo de carbono magnético
MQO	mínimos quadrados ordinários
MQP	mínimos quadrados ponderados
MSTFA	<i>N</i> -metiltrimetilsililtri-fluoroacetamida
MWNT	<i>multi-walled nanotubes</i>

NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Norv	norvalina
P5C	ácido 1-pirrolina-5-carboxílico
Phe	fenilalanina
PI	padrão interno
PMSF	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
Pro	prolina
RMCA	Rede Mineira de Cromatografia Avançada
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
Sar	sarcosina
Ser	serina
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
SPME	<i>solid phase micro-extraction</i>
SWNT	<i>single-walled nanotubes</i>
Thr	treonina
TMCS	<i>trimethylchlorosilane</i>
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
UPLC-MS/MS	<i>ultra-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer</i>
US EPA	<i>United States Environmental Protection</i>
Val	valina



YNB

*yeast nitrogen base*

YPG

*yeast extract, peptone, glucose*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>18</b>
1.1	Metabolômica .....	18
1.2	Benzo[ <i>a</i> ]pireno .....	20
1.3	Nanomateriais de carbono .....	22
1.4	GC/MS em metabolômica aplicada a <i>S. cerevisiae</i> .....	24
1.5	Derivatização de aminoácidos .....	25
1.6	Aminoácidos como biomarcadores .....	28
<b>2</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>29</b>
2.1	Objetivo geral .....	29
2.2	Objetivos específicos .....	29
<b>3</b>	<b>Materiais e métodos</b> .....	<b>30</b>
3.1	Suprimentos e equipamentos .....	30
3.2	Reagentes, solventes, soluções e gases.....	30
3.3	Soluções padrão .....	31
3.4	Síntese e purificação de nanotubos de carbono .....	32
3.5	Sistema cromatográfico .....	33
3.6	Cultivo de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>quenching</i> metabólico, exposição ao benzo[ <i>a</i> ]pireno e preparo do extrato celular bruto.....	34
3.7	Derivatização e extração de aminoácidos.....	36
3.8	Validação dos parâmetros de mérito do método .....	38
3.9	Escolha do melhor nanotubo de carbono para a extração dos derivados de aminoácidos .....	38
<b>4</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>39</b>
4.1	Cultivo de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>quenching</i> metabólico, exposição ao benzo[ <i>a</i> ]pireno e preparo do extrato celular bruto.....	39
4.2	Caracterização dos nanotubos de carbono magnéticos.....	42
4.3	Desenvolvimento do procedimento de extração de aminoácidos.....	45
4.4	Avaliação de figuras de mérito do procedimento analítico .....	47
4.5	Análise de amostras reais .....	53
4.6	Interpretações bioquímicas .....	56

4.7	Estudos de metabolômica envolvendo benzo[ <i>a</i> ]pireno .....	58
<b>5</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>63</b>
	<b>Referências .....</b>	<b>65</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>80</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Metabolômica

Metabolômica é o estudo do conjunto de metabólitos<sup>1</sup> e de suas alterações em um sistema vivo, o qual pode ser uma célula (animal ou vegetal), um tecido ou até mesmo um organismo. A metabolômica se divide em dois grandes ramos: alvo e global. Metabolômica alvo é responsável por estudar uma classe específica de metabólitos, como por exemplo, o conjunto de aminoácidos de um sistema vivo; a abordagem global envolve a varredura completa (ou da maior parte) dos metabólitos [1]. Existem diversas áreas de aplicação dos estudos metabolômicos, tais como na análise clínica, nutrição, ciências do esporte, toxicologia e ciências ambientais. Esses estudos são feitos em um organismo modelo que deve ser escolhido criteriosamente para a determinação dos metabólitos seja do organismo como um todo, de suas células específicas, fluidos, tecidos e/ou órgãos. Um organismo modelo interessante é a levedura da espécie *S. cerevisiae*, cuja importância se relaciona aos estudos de câncer, pois suas células tem metabolismo similar ao de células tumorais [2,3]. Além disso, proteínas de *S. cerevisiae* conservam as mesmas funções e sequências de aminoácidos de proteínas humanas [4].

A análise metabolômica segue uma sequência de passos que se iniciam com a interrupção metabólica, conhecida como *quenching*<sup>2</sup> – que é necessária para evitar conversão de metabólitos ao longo do processo de preparo da amostra, pois, caso isso ocorra, poderão surgir problemas na identificação de metabólitos em baixa concentração e/ou erros na quantificação. O *quenching* geralmente é feito utilizando baixas temperaturas ou condições extremas de pH. É importante notar que esse processo é apenas para garantir a interrupção do metabolismo sem destruir a membrana celular, pois, caso contrário, o vazamento de metabólitos prejudica a identificação/quantificação destes. O primeiro e mais conhecido método de *quenching* para *S. cerevisiae* foi o uso de metanol a frio (-40 °C), proposto por De Koning e

---

<sup>1</sup> Produtos intermediários ou finais de processos regulatórios celulares, com massa molar geralmente inferior a 1000 Da.

<sup>2</sup> Processo químico ou físico que inativa as enzimas responsáveis pelas reações bioquímicas de produção e consumo de metabólitos.

van Dam [5]. Nesse procedimento, 10 a 15 mL de leveduras crescidas foram borrifadas (usando seringas sem agulha) com 60 mL de solução metanol/água (60% v/v) a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sob agitação constante. No entanto, trabalhos posteriores mostraram perdas consideráveis de metabólitos intracelulares nesse protocolo original [6,7].

Villas-Bôas *et al.* [8] avaliaram a perda de metabólitos intracelulares através de modificações do protocolo original proposto por van Dam. Para efetuar essa avaliação, metabólitos foram determinados no sobrenadante após centrifugação de leveduras com metanol a frio e também por meio da verificação da integridade da membrana celular, através de coloração com iodeto de propídeo. Foram observadas perdas de metabólitos através da membrana celular, com maior destaque para a classe dos ácidos orgânicos e aminoácidos. Com relação a fosfatos de açúcares, não houveram perdas significativas. A diminuição do tempo de contato das células com a solução de *quenching* promoveu menor vazamento de alguns metabólitos (aminoácidos) e maior vazamento de outros (lactato, critramalato e miristato). Isso indicou que diminuir o tempo de centrifugação pode ser uma boa alternativa para reduzir a perda de aminoácidos intracelulares causada pelo contato da membrana celular com metanol. Os autores destacaram que o método original de *quenching* pode ser utilizado, desde que sejam tomados cuidados em diminuir o tempo de contato das células com a solução de *quenching* e evitar lavar o *pellet* com solução de metanol a frio. Outros protocolos de *quenching* descritos para *S. cerevisiae* usam etanol a quente [9,10] (também usado como método de extração de metabólitos), ácido perclórico [11], nitrogênio líquido [12] e filtração rápida seguida de lavagem com água [7].

Após o *quenching* é feita a extração dos metabólitos através da lise celular, ou seja, da ruptura da membrana celular para disponibilização dos metabólitos. Para *S. cerevisiae*, os protocolos mais comuns usam metanol a frio puro, etanol a quente (extração abrangente de metabólitos) ou clorofórmio/metanol (eficiente na extração de aminoácidos) [6,8]; recentemente também foi proposta a eficiente mistura acetonitrila/água (1:1 v/v), a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  [7]. Feita a liberação dos metabólitos, o passo seguinte é sua identificação e/ou quantificação, que pode ser feita por GC/MS (*Gas Chromatography/Mass Spectrometry*), LC/MS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*), CE/MS (*Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry*)

e NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*). Em sequência, é feita a análise estatística dos dados e, por fim, a interpretação biológica por meio de metabolomas<sup>3</sup> [7].

Quando aplicada a estudos de exposição ambiental, a metabolômica pode fornecer resultados importantes para avaliação toxicológica da exposição a contaminantes. Dessa forma, é possível traçar correlações entre a exposição ambiental e seus efeitos na saúde humana, por exemplo.

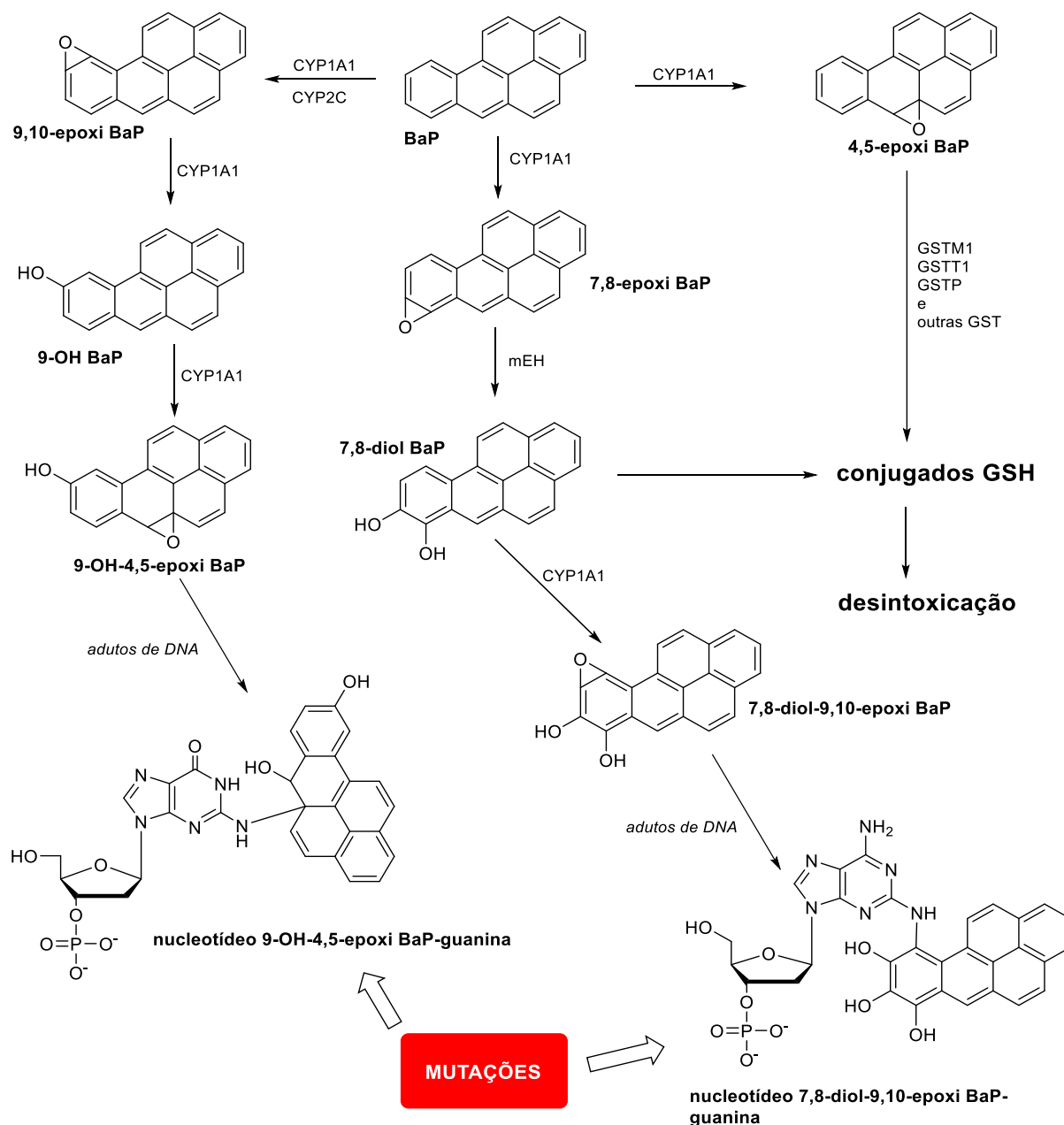
## 1.2 Benzo[*a*]pireno

O benzo[*a*]pireno (BaP) é usado como representante de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), por ser considerado como contaminante ambiental comprovadamente carcinogênico para humanos pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) [13] e classificado como poluente prioritário pela *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) [14]. Os HPAs são constituídos por dois ou mais anéis aromáticos fundidos e são produzidos pela combustão incompleta da matéria orgânica, de forma natural e antropogênica. As principais fontes de HPAs são: queima de combustíveis fósseis, escapamento de veículos, usinas termoeletricas, aquecimento residencial, incineradores, produção de coque de petróleo, fundição de alumínio e derramamento de óleo/gasolina [15]. A inalação do ar ambiente é a principal forma de absorção desses compostos pelo organismo [16], mas também ocorre absorção de HPAs pela ingestão de alimentos contaminados ou por via dérmica [17].

Os HPAs são metabolizados principalmente nos rins e fígado [18], produzindo dihidrodióis e epóxidos, os quais se ligam ao DNA (*deoxyribonucleic acid*), formando adutos (complexos volumosos), desencadeando efeitos carcinogênicos. Quinonas também são metabólitos de HPAs e estão relacionadas com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam danos ao DNA. A metabolização de HPAs é realizada por um conjunto de enzimas do citocromo P450 (CYP1A, CYP1B, CYP2C e CYP2) [19], conforme mostra a Figura 1, que ilustra a biotransformação do BaP.

---

<sup>3</sup> Conjunto dos metabólitos de um sistema vivo.



**Figura 1.** Biotransformação do benzo(a)pireno formando adutos de DNA como produtos finais (adaptada de [20]).

De acordo com a legislação europeia, os níveis máximos permitidos de BaP são: 1,0 ng m<sup>-3</sup> no ar (Agência Ambiental Europeia, 2013) [21]; 2,0 µg kg<sup>-1</sup> em peixes, óleos e gorduras; 5,0 µg kg<sup>-1</sup> em carnes, crustáceos e peixes defumados; 10,0 µg kg<sup>-1</sup> em moluscos e 1,0 µg kg<sup>-1</sup> em alimentos infantis (CE 208, de 04/2005) [22]. Por meio da Regulação (EU)

1272/2013, o limite de BaP em óleos usados na produção de pneus (ou suas partes) é de  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ; em brinquedos, o limite é ainda menor,  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  [23]. Já a Diretiva 98/83/CE, fixa o limite máximo de BaP em  $0,01 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  em água destinada ao abastecimento [24]. No Brasil, não há uma legislação abrangente no controle da exposição ao BaP. Está em vigor a Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde, que estabelece o limite máximo de BaP em água potável como  $0,7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  [25]; além da Resolução RDC nº 2 da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), de 15 de janeiro de 2007, que estabelece a concentração final máxima de BaP de  $0,03 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  em alimentos que sofrem adição de aromatizantes de fumaça [26]. Os HPAs e seus metabólitos são determinados tanto por cromatografia gasosa quanto por cromatografia líquida [19].

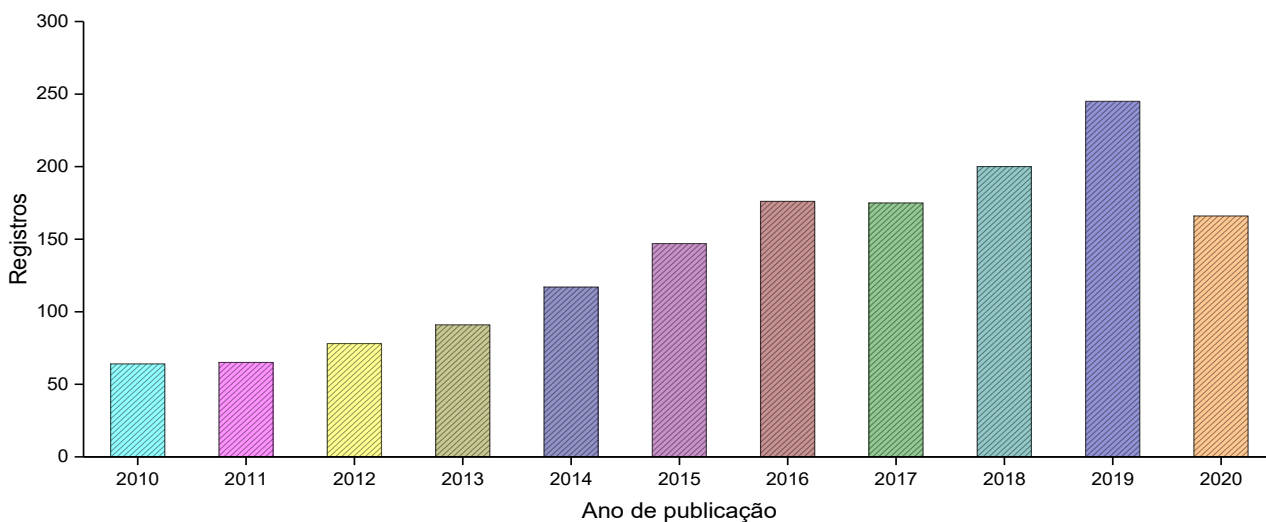
### 1.3 Nanomateriais de carbono

Antes de se fazer uma análise cromatográfica, é necessário garantir que a amostra contenha o mínimo possível de interferentes e impurezas, para se evitar desde problemas de contaminação do instrumento analítico até prejuízos na seletividade da análise. Portanto, métodos aperfeiçoados de preparo de amostras são determinantes para correta determinação instrumental dos analitos. Nesse contexto, os nanomateriais<sup>4</sup> como grafenos [27], nanotubos de carbono (NTCs) [28,29], nanofibras de carbono [30], pontos quânticos de carbono [31], óxidos nanoestruturados [32] e nanoestruturas metalorgânicas [33] surgiram como ferramentas versáteis em química analítica [34,35], principalmente no preparo de amostras complexas, tais como matrizes biológicas [36,37] e ambientais [38,39]. Os nanotubos de carbono têm ganhado ampla aplicação em química analítica, por apresentarem grande área superficial e boa seletividade. Buscando no portal *Web of Science* pelos termos “nanomaterials” e “sample preparation”, foram recuperados 1524 resultados de estudos publicados nos últimos 11 anos, 103 dos quais foram artigos de revisão. Como mostrado na Figura 2, o número de publicações por ano tem aumentando.

---

<sup>4</sup> Estruturas cujo tamanho varia de 1 a 100 nm pelo menos em uma dimensão.





**Figura 2.** Registros de artigos encontrados no portal *Web of Science*, de 2010 a 2020, com os termos de busca “nanomaterials” e “sample preparation”. Acessado em 5/10/2020.

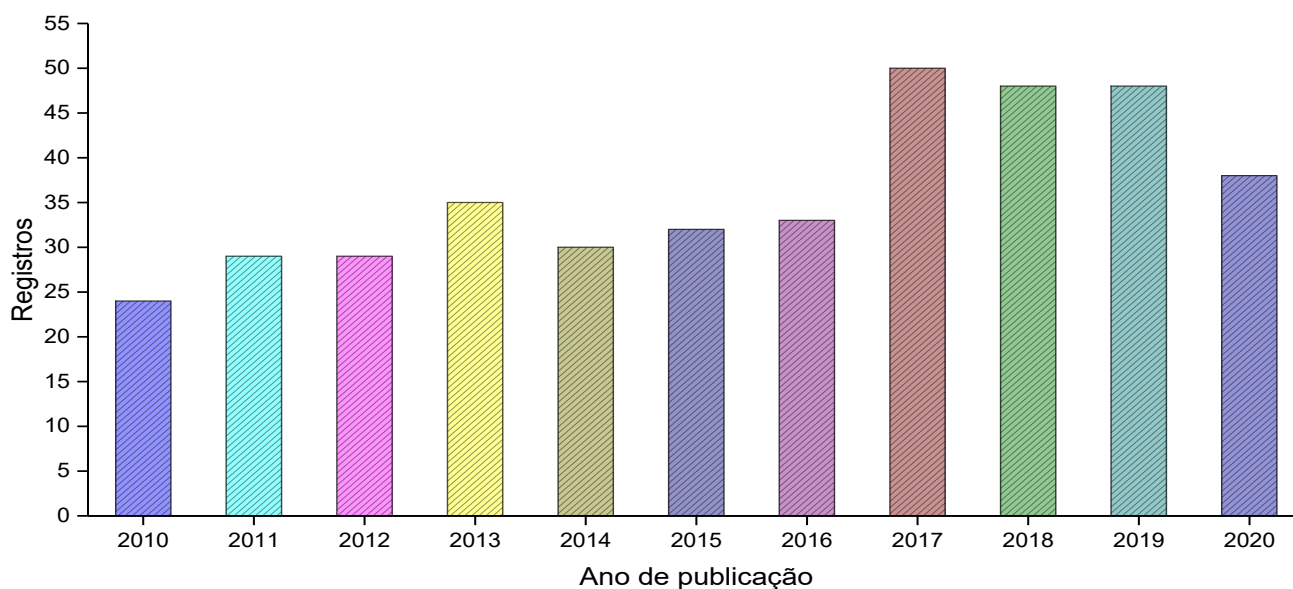
Os NTCs foram primeiramente preparados por Iijama [40] e descritos como tubos em formato de agulha, de 2 a 50 folhas gráficas coaxiais, com hexágonos de átomos de carbono dispostos de forma helicoidal em torno do eixo dos tubos. Após esse estudo pioneiro, novas formas de NTCs e suas aplicações começaram a se difundir. São conhecidos os nanotubos de parede simples (SWNT, *single-walled nanotubes*) e os nanotubos de parede múltipla (MWNT, *multi-walled nanotubes*), com propriedades eletrônicas únicas, alta condutividade térmica, alta rigidez, baixa densidade e demais propriedades mecânicas que permitem a produção de nanomateriais altamente estruturados e úteis em diversas áreas [41].

NTCs funcionalizados, ou seja, que contêm átomos diferentes do carbono ligados ao esqueleto do nanotubo, são de especial interesse em química analítica pois permitem maior seletividade na extração dos analitos de matrizes complexas. Os nanotubos de carbono magnéticos (mNTCs) híbridos dopados com nitrogênio, sintetizados por Purceno *et al.* [42], são anfífilicos: contêm uma parte hidrofílica (região dopada com átomos de nitrogênio) e outra hidrofóbica (esqueleto carbônico livre). A inserção de uma partícula de ferro no interior do nanotubo torna-o magnético e confere facilidade na sua separação do meio em que é disperso. Assim, mNTCs são muito úteis na extração de analitos com ampla faixa de polaridade – muito comuns em amostras biológicas, por exemplo. Desse modo, pela diferença de polaridades das seções do mNTC, esse nanomaterial pode ser aplicado tanto em solventes polares quanto

apolares, assim como na extração de analitos polares e/ou apolares [42]. Os mNTCs garantem, então, alta seletividade na separação de analitos de matrizes variadas, auxiliando no preparo de amostras para análise por GC/MS e demais técnicas analíticas.

#### 1.4 GC/MS em metabolômica aplicada a *S. cerevisiae*

Muitos metabólitos são de natureza volátil (ou podem ser volatilizáveis) e termicamente estáveis, assim, a técnica analítica mais adequada para sua determinação é a GC/MS, cujas principais vantagens são alta sensibilidade e seletividade, a necessidade de pequenos volumes de injeção e o baixo custo de análise [43]. Metabolomas de compostos voláteis de *S. cerevisiae* já foram descritos para avaliar, por exemplo, a interferência do tempo de inoculação na fermentação de leveduras [44], envelhecimento e aroma de cerveja [45], na qualidade da fermentação de vinhos [53] e de pães integrais [48]. Buscando pelos termos “gas chromatography” e “*S. cerevisiae*” no portal *Web of Science*, foram recuperados 396 registros de publicações nos últimos 11 anos (Figura 3), sendo 10 artigos de revisão.



**Figura 3.** Registros de artigos encontrados no portal *Web of Science*, de 2010 a 2020, com os termos de busca “*S. cerevisiae*” e “gas chromatography”. Acessado em 5/10/2020.

Existem estudos metabolômicos de exposição de *S. cerevisiae* a condições de estresse, como hipóxia [49], avaliação da toxicidade de nanopartículas de óxido de zinco [50], exposição aos contaminantes ambientais 4-metilciclohexanometanol e propileno glicol [51] e ao BaP, este com o objetivo de examinar a atividade transcricional da enzima CYP51 do citocromo P450 e de danos ao DNA [52]. *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucariótico a ter seu genoma completamente sequenciado em 1996 [1,53]. Diversos estudos são descritos na literatura envolvendo metabolômica de células de *S. cerevisiae*, com aplicações principalmente na indústria fermentativa [47,54–57], na compreensão do metabolismo celular [58–61] e em engenharia metabólica [62–65].

## 1.5 Derivatização de aminoácidos

Aminoácidos são uma das classes de biomoléculas mais importantes de um organismo, pois, além de serem constituintes básicos das proteínas, são precursores de muitos hormônios e neurotransmissores, estão envolvidos em diagnósticos clínicos, erros inatos do metabolismo, pesquisa biomédica, ciências dos alimentos, dentre outras áreas do conhecimento [66–68]. Os aminoácidos livres<sup>5</sup> são uma classe de metabólitos importantes para o crescimento, manutenção e reparação celular. Apesar de não serem voláteis, é possível que esses compostos sejam analisados por GC/MS, desde que seja feita a derivatização de suas estruturas químicas, ou seja, a substituição de grupos funcionais polares por grupamentos mais apolares, voláteis e termicamente estáveis.


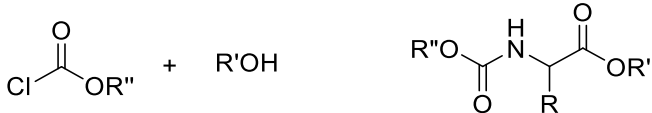
Os dois procedimentos de derivatização de aminoácidos mais usados em GC/MS são a sililação e a alquilação. Na sililação, um átomo de hidrogênio lábil é substituído por um grupo alquilsilil, através de reagente derivatizante. Os principais reagentes sililantes são o *N,O*-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e o *N*-metiltrimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA). Esse procedimento, apesar de ser muito empregado, apresenta problemas de estabilidade para alguns derivados, como para arginina. Outra desvantagem é a necessidade de meios anidros para que a reação ocorra, visto que os reagentes sililantes são instáveis em meio aquoso [68].

---

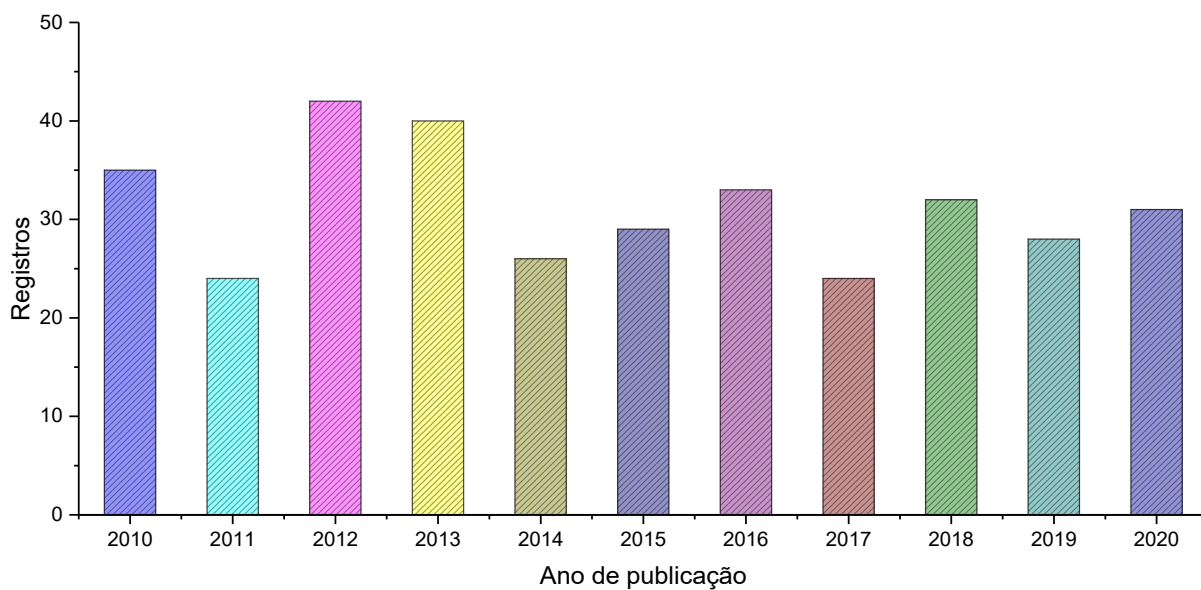
<sup>5</sup> Aminoácidos que não fazem parte das estruturas das proteínas, ou seja, que estão livres nos meios intra e extracelulares.

Outra classe de reagentes derivatizantes que recentemente começou a ser empregada na derivatização de aminoácidos é a de alquil cloroformatos. Nesse tipo de derivatização, uma alquilação converte o grupo carboxílico do aminoácido diretamente a um éster e o grupo amino a um carbamato, na presença do álcool correspondente e piridina [68,69]. Esse procedimento alternativo pode ser empregado em amostras aquosas sem a necessidade de prévia precipitação de proteínas, o que confere maior praticidade na sua execução. Além disso, a reação é rápida e os derivados são coletados em um solvente orgânico que pode ser diretamente injetado no sistema GC/MS [70]. A tabela abaixo mostra as estruturas químicas dos derivados formados pelos dois processos de derivatização.

**Tabela 1.** Estruturas químicas dos produtos de reações de derivatização de aminoácidos com MSTFA e alquilcloroformatos (adaptada de [68]).

Reagente derivatizante	Derivado de aminoácido formado
MSTFA	 <p>The image shows the chemical structure of MSTFA (N-methylsilyl trifluoroacetamide) as a reagent, which is a trifluoroacetyl group attached to a nitrogen atom that is also bonded to a methyl group and a trimethylsilyl group. The corresponding amino acid derivative is shown as a central carbon atom bonded to an R group, a hydrogen atom, a trimethylsilylamino group (NH-SiMe3), and a trimethylsilyloxy carbonyl group (O-C(=O)-SiMe3).</p>
Alquil cloroformato	 <p>The image shows the chemical structure of an alkyl chloroformate reagent (Cl-C(=O)-OR'') reacting with an alcohol (R'OH). The resulting amino acid derivative is shown as a central carbon atom bonded to an R group, a hydrogen atom, a carbamate group (NH-C(=O)-OR''), and another ester group (O-C(=O)-OR').</p>

Diversos estudos de determinação de aminoácidos por GC/MS já foram relatados. Procurando pelos termos “amino acid derivatization” e “gas chromatography” no portal *Web of Science*, filtrando pelos 11 últimos anos de publicações, foram recuperados 344 registros, sendo que 25 destes foram artigos de revisão (Figura 4).



**Figura 4.** Registros de artigos encontrados no portal *Web of Science*, de 2010 a 2020, com os termos de busca “amino acid derivatization” e “gas chromatography”. Acessado em 5/10/2020.

Esses estudos abrangem a determinação de aminoácidos em plasma humano [71–73], urina [74], tabaco [75], extratos de plantas [76], saliva [77], fezes de pacientes [78], metabólitos de aminoácidos em soro e fluido cérebro-espinhal [79], etc. Em *S. cerevisiae*, os estudos envolvendo determinação de aminoácidos avaliaram, em geral, a influência do metabolismo de aminoácidos no sabor e aroma de cervejas/alimentos [80–82], efeitos da assimilação de carbono/nitrogênio [83] e da fermentação alcoólica no metabolismo de aminoácidos [84].

## 1.6 Aminoácidos como biomarcadores

Segundo Hanahan e Weinberg, nas suas duas célebres revisões da área de carcinogênese [85,86], existem características biológicas que funcionam como marcadores de câncer: sustentação da sinalização proliferativa, evasão dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, angiogênese, invasão/metástase, instabilidade do genoma, inflamação e modificação do metabolismo. Essas alterações são observadas ao longo dos estágios de desenvolvimento da doença e são acompanhadas de modificações nos constituintes biomoleculares tumorais. Assim, análises químicas através de ferramentas ômicas, com destaque para a metabolômica, podem apontar substâncias candidatas a biomarcadores<sup>6</sup> de câncer [87,88].

Aminoácidos podem funcionar como candidatos a biomarcadores de câncer [89–93], devido ao fato de células tumorais apresentarem alterações metabólicas específicas, não observadas em células não proliferativas [94]. Estudos já apontaram alguns aminoácidos como candidatos a biomarcadores de tipos específicos de carcinomas, tais como: histidina, prolina, serina, glicina, metionina, isoleucina, alanina, leucina, tirosina, fenilalanina, lisina para câncer de pulmão [95]; serina e asparagina para carcinoma de células escamosas orais; serina para câncer de esôfago; ácido aspártico para câncer colorretal; histidina para câncer pancreático [96], C-manosiltryptofano para câncer de ovário [97], arginina para câncer de mama [98] e sarcosina para câncer de próstata [99–102].

Em geral, o diagnóstico tradicional para identificação de câncer é feito por exames de imagem e/ou por meio de técnicas invasivas de biópsia. Por outro lado, os biomarcadores podem servir como ferramentas de diagnóstico rápido, não invasivo, com alta sensibilidade e baixo custo, auxiliando na melhor qualidade de vida dos pacientes e até mesmo aumentando as chances de cura, visto que através de um diagnóstico a nível molecular as neoplasias podem ser identificadas precocemente [103,104].

---

<sup>6</sup> Entidades (moléculas, células específicas, genes, enzimas, hormônios, etc.) medidas experimentalmente e que indicam alterações em um sistema vivo causadas pela presença de agentes farmacológicos, contaminantes ambientais, patologias, dentre outros fatores.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um procedimento de extração de 17 derivados de aminoácidos usando nanotubos de carbono e aplicar esse procedimento da determinação de aminoácidos por GC/MS em células de *Saccharomyces cerevisiae* expostas e não expostas ao benzo[*a*]pireno.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um método de extração de derivados de aminoácidos usando nanotubos de carbono magnéticos;
- Aplicar o procedimento de extração na determinação por GC/MS de 17 aminoácidos (L-ácido aspártico, L-ácido glutâmico, L-alanina, L-asparagina, L-fenilalanina, glicina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-prolina, sarcosina, L-serina, L-tirosina, L-treonina, L-triptofano e L-valina) em células de *S. cerevisiae* expostas e não expostas ao benzo[*a*]pireno (BaP);
- Avaliar figuras de mérito do método analítico;
- Encontrar aminoácidos candidatos a biomarcadores de câncer causado por BaP.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Suprimentos e equipamentos

- Tubos de ensaio (Prolab, Brasil);
- Frascos de vidro transparente com tampa (2,0 mL; NOVA ANALÍTICA, Brasil);
- Bloco de alumínio com 6 poços (NOVA ANALÍTICA, Brasil);
- Micropipetas (2,0-20,0  $\mu$ L, 50,0-200,0  $\mu$ L e 100,0-1000,0  $\mu$ L; GILSON, USA);
- Agitador de tubos tipo vortex (modelo QL 901; BIOMIXER, USA);
- Agitador magnético com aquecimento (modelo 752A; FISATOM, Brasil);
- Balança analítica, incerteza de medição  $u = \pm 0,00001$  g (modelo AUW220D; SHIMADZU, Japão);
- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas do tipo quadrupolo (modelo QP2010 Plus; SHIMADZU, Japão);
- Analisador de CHN (Perkin Elemer; EUA);
- Espectrômetro Raman (Bruker; EUA);
- Microscópio eletrônico de transmissão (TECNAI G2-20 Super Twin FEI; USA).

#### 3.2 Reagentes, solventes, soluções e gases

- 1-propanol (pureza  $\geq 99,9\%$ ; MERCK, Alemanha)
- 3-metilpiridina (pureza  $\geq 99,0\%$ ; MERCK, Alemanha);
- Água ultrapura (ELGA, PURELAB Classic);
- Benzo[a]pireno (pureza = 99%; MERCK, Alemanha);
- Acetona (pureza  $\geq 99\%$ ; MERCK, Alemanha);
- Clorofórmio (pureza  $\geq 99,8\%$ ; J.T.Baker, USA);
- Etanol comercial 70% m/m (PHARMA, Brasil);
- Gás hélio comprimido, pureza de 99,999% (AIR PRODUCTS);
- Gás nitrogênio industrial comprimido (AIR PRODUCTS);



- Iso-octano (pureza  $\geq 99,5\%$ ; MERCK, Alemanha);
- Propil cloroformato (pureza =  $98\%$ ; MERCK, Alemanha);
- Reagente derivatizante 1 (1-propanol  $77\%$  v/v; 3-metilpiridina  $23\%$  v/v), armazenado a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- Reagente derivatizante 2 (propil cloroformato  $17,4\%$  v/v; iso-octano  $11,0\%$ ; clorofórmio  $71,6\%$  v/v), armazenado a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- Solução aquosa de hidróxido de sódio ( $0,3\text{ mol L}^{-1}$ );
- Solução de detergente neutro,  $5\%$  v/v (CROMOLINE, Brasil);
- Solução estabilizante (1,0 mL de 1-propanol; 1,0 mL de solução fenólica em água;  $328,0\text{ }\mu\text{L}$  de tiodietilenoglicol; água ultrapura até completar o volume de 10,0 mL), armazenada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- Solução fenólica em água ( $6,2\text{ mg mL}^{-1}$ ; MERCK, Alemanha);
- Solução tampão de extração ( $8800,0\text{ }\mu\text{L}$  de água destilada;  $1000,0\text{ }\mu\text{L}$  de tampão fosfato,  $100,0\text{ }\mu\text{L}$  de EDTA;  $100,0\text{ }\mu\text{L}$  de PMSF; meio de cultura até completar o volume de 10,0 mL; MERCK, Alemanha);
- Tiodietilenoglicol (pureza =  $99\%$ ; MERCK, Alemanha).

### 3.3 Soluções padrão

17 padrões analíticos de aminoácidos (Figura 18, Apêndice) foram obtidos da MERCK (pureza  $\geq 99\%$ ), sendo eles L-ácido aspártico (Asp), L-ácido glutâmico (Glu), L-alanina (Ala), L-asparagina (Asn), L-fenilalanina (Phe), glicina (Gly), L-isoleucina (Ile), L-leucina (Leu), L-lisina (Lys), L-metionina (Met), L-prolina (Pro), sarcosina (Sar), L-serina (Ser), L-tirosina (Tyr), L-treonina (Thr), L-triptofano (Trp) e L-valina (Val). O aminoácido L-norvalina (Norv), obtido pela Merck, (pureza  $\geq 99\%$ ), foi utilizado como padrão interno (PI).

Inicialmente foram preparadas soluções-estoque de  $1000,0\text{ mg L}^{-1}$  de cada aminoácido em água, exceto para os aminoácidos Ile, Ser, Phe, Tyr e Trp, que foram dissolvidos em HCl  $0,1\text{ mol L}^{-1}$  devido à sua baixa solubilidade em água pura. Em seguida, diluições adequadas foram realizadas de acordo com a estimativa da concentração de analitos nas amostras. Essa estimativa foi feita por comparação direta com padrões externos de aminoácidos. Devido à grande variação da concentração de aminoácidos nas amostras, foi necessário

construir curvas analíticas com faixas diferentes. As soluções foram preparadas em balões calibrados e armazenadas em refrigerador, a 4 °C.

### 3.4 Síntese e purificação de nanotubos de carbono

Os mNTCs usados neste trabalho foram sintetizados no grupo GRUTAM/DQ-UFMG (sob a supervisão da professora Ana Paula C. Teixeira), através do método de deposição química em fase vapor (*chemical vapour deposition*, CVD) [42]. Foram sintetizados quatro tipos de nanotubos, nomeados como A15E15, E15A15, A30 e E30. Essa nomenclatura foi associada ao tipo de gás (fornecedor de átomos de carbono e/ou nitrogênio) utilizado na síntese de cada mNTC e ao tempo de produção do material, conforme está mostrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Sequência de produção dos nanotubos de carbono magnéticos.

Nanotubo	Processo de produção	Polaridade
A30	acetonitrila (30 min)	caráter polar
E30	etileno (30 min)	totalmente apolar
A15E15	acetonitrila (15 min) → etileno (15 min)	anfifílico
E15A15	etileno (15 min) → acetonitrila (15 min)	anfifílico

A purificação dos nanomateriais ocorreu no Laboratório da RMCA/DQ-UFMG. Para tal, foi medida a massa de 1,000 g de mNTC e transferida para balão de fundo redondo (250 mL) juntamente com 200 mL de mistura ácido sulfúrico concentrado/água (1:1). O balão foi imerso em banho de óleo mineral a 140 °C, por 3 h, sob refluxo (Figura 5). Posteriormente, a mistura foi diluída em água ultrapura aquecida a 80 °C, filtrada e lavada com água quente sob vácuo, para remoção do excesso de ácido. A filtração ocorreu até o pH do filtrado se aproximar a 7,0. Em seguida, o sólido foi seco em estufa, a 100 °C, por 24 h [105].



**Figura 5.** Montagem experimental utilizada na purificação de mNCTs.

### 3.5 Sistema cromatográfico

Foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas do tipo quadrupolo. O programa de aquecimento e as condições do espectrômetro foram otimizadas em trabalho anterior [89]. Foi usada uma coluna Phenomenex ZB-AAA (10 m de comprimento  $\times$  0,25 mm de diâmetro interno  $\times$  0,1  $\mu\text{m}$  de espessura do filme) com volume de injeção de 1,0  $\mu\text{L}$ . Foi empregado hélio como gás de arraste, na vazão de 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ , com injeção no modo *SPLIT* (1:20). A temperatura do injetor foi de 270  $^{\circ}\text{C}$  e o programa de aquecimento do forno se iniciou em 70  $^{\circ}\text{C}$  (por 1 min), com taxa de aquecimento de 30  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 270  $^{\circ}\text{C}$  (por 3 min). A linha de transferência foi mantida em 290  $^{\circ}\text{C}$  e a ionização por elétrons aconteceu na temperatura de 240  $^{\circ}\text{C}$ , na voltagem de 70 eV. A aquisição dos íons ocorreu no modo *SIM* (*selected ion monitoring*).

### 3.6 Cultivo de células de *Saccharomyces cerevisiae*, *quenching* metabólico, exposição ao benzo[a]pireno e preparo do extrato celular bruto

Células de *S. cerevisiae* [linhagem selvagem BY4741, genótipo MATa: his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0; obtida da *European Saccharomyces cerevisiae Archive for Functional Analysis* (EUROSCARF), no Instituto de Biociências da Universidade de Frankfurt, Alemanha] foram cultivadas no Laboratório de Radiobiologia do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), sob a supervisão da Dra. Maria José Neves, em Belo Horizonte. Os experimentos se iniciaram com crescimento de um pré-inóculo de leveduras. Para isso, foi preparado meio de cultura YPG (*yeast extract, peptone, glucose*) em água destilada, com 1% m/v de extrato de levedura, 2% m/v de peptona e 2% m/v de glicose. O meio foi esterilizado em autoclave por 15 min a 121 °C e a ele adicionado um inóculo de leveduras já crescidas. A cultura foi incubada por 48 h a 30 °C, sob agitação de 150 rpm. Após incubação, as células foram contadas via câmara de Neubauer, obtendo-se uma concentração de  $1,02 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>.

Utilizando o pré-inóculo preparado, foram construídas curvas de crescimento das leveduras na presença de BaP com o objetivo de escolher a concentração de BaP que alterasse o crescimento celular, porém sem inibição total. Inicialmente, com base nos estudos de Lee *et al.* [52], foi testada a faixa de BaP de  $1,0 \times 10^{-3}$  a  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , partindo de uma solução estoque de BaP em acetona de  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os experimentos se iniciaram em erlenmeyers de 2 mL. Cada concentração de BaP foi avaliada em triplicata, sendo que cada erlenmeyer representou um ponto. Aos erlenmeyers foram adicionados volumes adequados de solução de BaP e de pré-inóculo de células para atingir a concentração final adequada de BaP e células em cada ponto da curva. A concentração de pré-inóculo foi mantida igual a  $1,27 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> em todos os erlenmeyers. Os frascos foram tampados com chumaços de algodão envolvido em gaze e incubados por 24 h, a 30 °C, sob agitação orbital de 150 rpm. Alíquotas foram retiradas de tempo em tempo, totalizando 72 h de amostragem. A cada tempo, de cada erlenmeyer foram pipetados 100,0  $\mu\text{L}$  de meio para microtubos em gelo, que foram, em sequência, armazenados em freezer (-20 °C). Terminado o período total de 72 h de incubação, foram adicionados 900,0  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril a cada microtubo. Em seguida, volumes de 200,0  $\mu\text{L}$  do conteúdo de cada microtubo foram transferidos para poços de placas de 96 poços. As placas, por sua vez, foram acondicionadas em espectrofotômetro para a medida da turbidez do meio dos poços, no comprimento de onda de 600 nm. Como controle, foi feita uma curva para células

na ausência de BaP e acetona e outra curva para células na presença de apenas acetona (o volume de acetona em cada ponto correspondeu ao respectivo volume de solução de BaP da curva feita na presença de BaP). Esse último controle foi feito para avaliar a interferência do solvente no crescimento celular.

A análise das curvas de crescimento possibilitou a escolha da concentração de BaP de  $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  para ser fixada no preparo dos extratos celulares. Após o preparo de novo meio YPG, as células foram expostas em triplicata ao BaP por 48 h, a  $30^\circ\text{C}$ , sob agitação de 150 rpm. Posteriormente, as células foram centrifugadas (2000 g, por 5 min), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com água destilada estéril (2000 g, por 5 min). O sobrenadante foi descartado e, em seguida, adicionou-se meio YNB (*yeast nitrogen base*)<sup>7</sup> ao frasco, que foi agitado em vortex até a total ressuspensão do *pellet*. A cultura foi então incubada por 24 h, a  $30^\circ\text{C}$ , sob agitação de 150 rpm. Após a incubação, os frascos de cultura foram centrifugados a 2000 g, por 5 min e o meio YNB foi descartado, restando o *pellet* contendo as células de leveduras.

Após o cultivo celular e separação da biomassa bruta de células, foi feito o *quenching* metabólico com nitrogênio líquido. O *quenching* adotado neste trabalho foi adaptado de Kim *et al.* [7]. O *pellet* final foi dividido em porções, as quais foram envolvidas em papel alumínio e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, a biomassa foi submetida ao processo de ruptura celular.

O processo de ruptura do invólucro celular foi feito por meio da adição de 1,5 mL de tampão de extração<sup>8</sup> e 1,0 g de pérolas de vidro ao frasco de cultura, de acordo com protocolo descrito por Lushchak *et al.* [106]. A lise celular consistiu em seis ciclos de 30 s em agitador tipo vortex intercalados com 6 ciclos de 30 s em gelo. Para finalizar, os frascos de cultura foram centrifugados por 5 min a 2000 g. O sobrenadante obtido foi o extrato celular bruto. Os controles (frasco com apenas meio de cultura e células e outro frasco com apenas acetona e meio de cultura contendo células) passaram pelo mesmo procedimento total de preparo dos extratos.

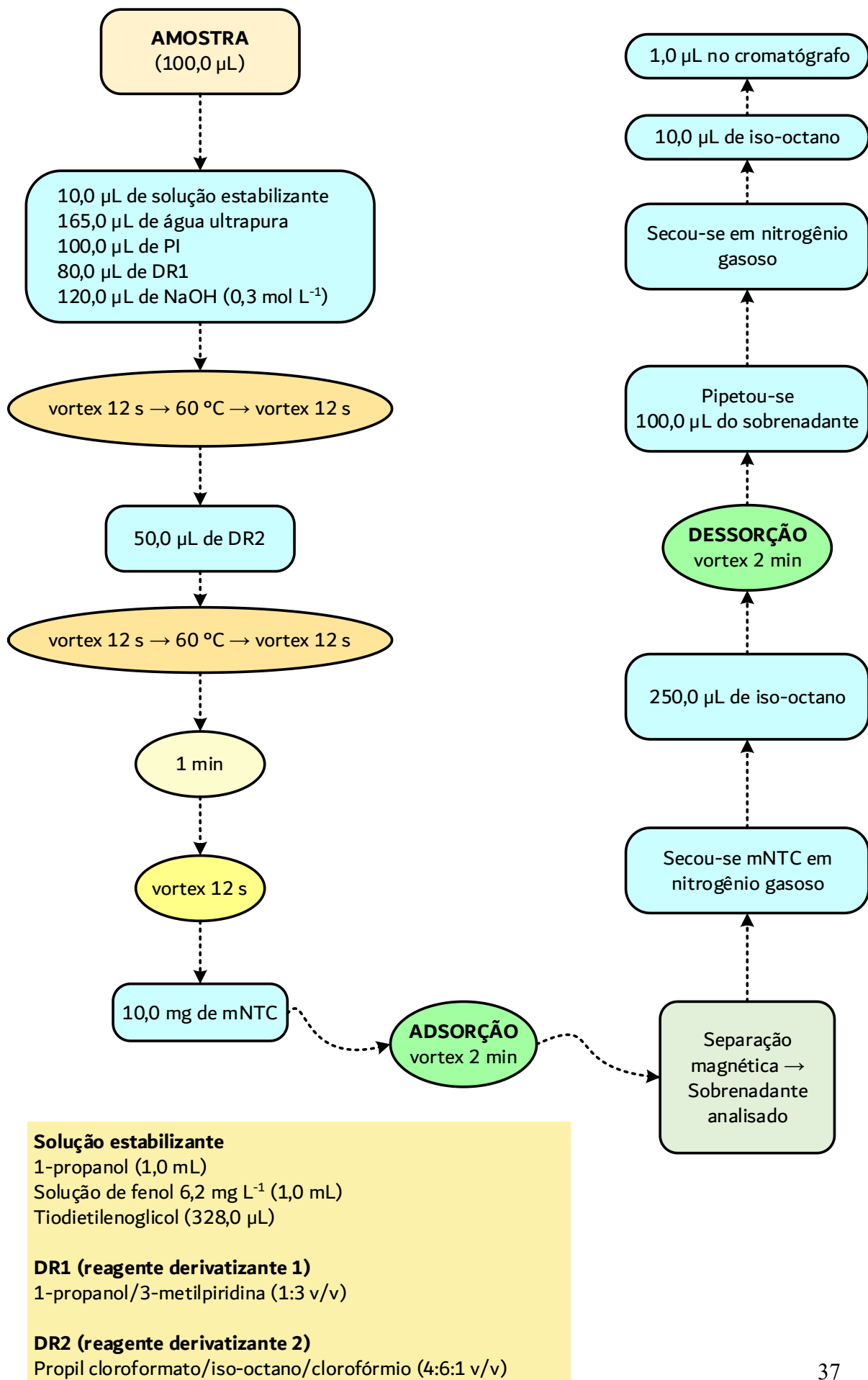
---

<sup>7</sup> 0,67% m/v de base nitrogenada de levedura, 2% m/v de glicose, 0,52% m/v de citrato de sódio, 0,70% m/v de ácido cítrico; histidina, uracila, metionina ( $20,0 \text{ mg L}^{-1}$  cada), leucina ( $60,0 \text{ mg L}^{-1}$ ).

<sup>8</sup> Tampão fosfato de sódio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; EDTA  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  e PMSF  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ .

### 3.7 Derivatização e extração de aminoácidos

A derivatização dos aminoácidos com propil cloroformato/propanol foi feita seguindo um procedimento otimizado em trabalho anterior [89,107] com a substituição da etapa de extração dos derivados de AA por um novo procedimento usando mNTC (Figura 6). Inicialmente, foi pipetado no tubo de ensaio um volume de 100,0  $\mu\text{L}$  de extrato celular. Em seguida, foram adicionados 10,0  $\mu\text{L}$  de solução estabilizante. Posteriormente, o meio foi diluído com 165,0  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e o padrão interno foi adicionado (100,0  $\mu\text{L}$  de Norv na concentração de 23,0  $\text{mg L}^{-1}$ ). Então, 80,0  $\mu\text{L}$  de DR1 (reagente derivatizante 1) foram adicionados ao frasco de reação juntamente com 120,0  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,3  $\text{mol L}^{-1}$ . O tubo de ensaio foi agitado por 12 s, aquecido em bloco térmico a 60 °C por mais 12 s e, novamente, agitado por 12 s (A). Após essa etapa, foram adicionados 50,0  $\mu\text{L}$  de DR2 (reagente derivatizante 2) ao meio, repetiu-se (A) e o tubo foi mantido em repouso por 1 min em temperatura ambiente. Terminado o tempo, efetuou-se mais uma etapa de agitação de 12 s seguida de adição de 10,0 mg de mNTC, com agitação por 2 min em vortex, para adsorção dos analitos (AA). Um ímã foi aproximado do lado de fora dos tubos contendo os mNTCs e o sobrenadante (B) foi vertido em outro tubo de ensaio. Os nanotubos foram secos em atmosfera de nitrogênio e, em seguida, foram adicionados 250,0  $\mu\text{L}$  de iso-octano ao tubo de ensaio. Este foi novamente agitado em vortex por 2 min para a dessorção dos analitos e um volume final de 100,0  $\mu\text{L}$  de sobrenadante foi pipetado e seco em nitrogênio gasoso até a total evaporação da fase líquida. Foi então adicionado um volume de 10,0  $\mu\text{L}$  de iso-octano ao frasco, agitou-se por 12 s e, em seguida, 1,0  $\mu\text{L}$  dessa solução foi injetado no cromatógrafo. O sobrenadante B também passou por todas as etapas de extração para a verificação da eficiência de extração dos nanotubos de carbono.



**Figura 6.** Fluxograma do procedimento de derivatização dos aminoácidos por propil cloroformato/propanol seguida de extração dos derivados usando mNTCs.

### **3.8 Validação dos parâmetros de mérito do método**

Neste trabalho foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, limite de detecção (*limit of detection*, LOD) e limite de quantificação (*limit of quantification*, LOQ). As figuras de precisão intermediária e recuperação não puderam ainda ser avaliadas devido à interrupção do trabalho causada pela pandemia de COVID-19 e pela obediência ao prazo limite de defesa desta dissertação.

A seletividade foi verificada pela separação dos picos nos cromatogramas de amostras. A linearidade foi avaliada com base na regressão linear e nos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das curvas de calibração, construídas em seis níveis de concentração no intervalo de 0,004 a 50,00 mg L<sup>-1</sup>, cada nível em triplicata. Também foi verificado, por meio de Análise de variância (ANOVA) se o método dos mínimos quadrados ordinários (MQO) se mostrou adequado na calibração das curvas. Para o cálculo de LOD e LOQ foram preparadas dez replicatas independentes do branco analítico: água ultrapura isenta de aminoácidos e que passou por todo o procedimento de preparo de amostras.

### **3.9 Escolha do melhor nanotubo de carbono para a extração dos derivados de aminoácidos**

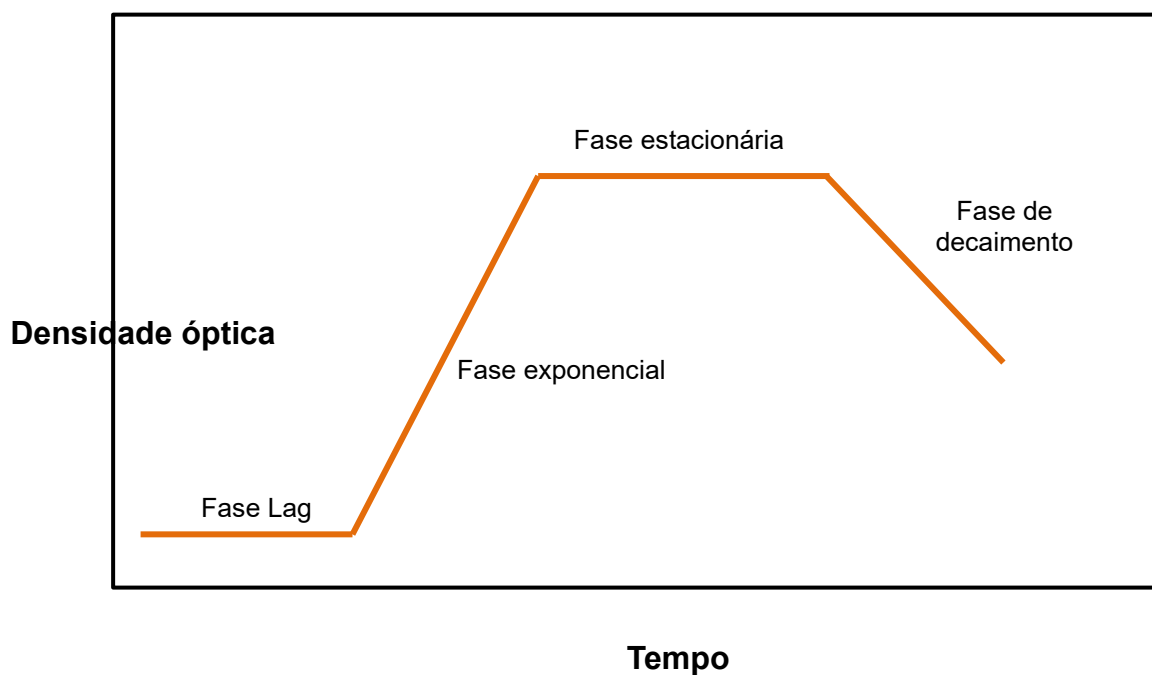
Foram testados quatro tipos de nanotubos de carbono: A30, E30, A15E15 e E15A15. Cada tipo de mNTC foi empregado seguindo o procedimento descrito na seção 3.7. Foram integradas as áreas correspondentes a cada pico cromatográfico de aminoácido, as quais foram utilizadas como padrão de comparação da eficiência de extração dos materiais (maiores áreas, melhor capacidade de extração dos derivados de aminoácidos).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

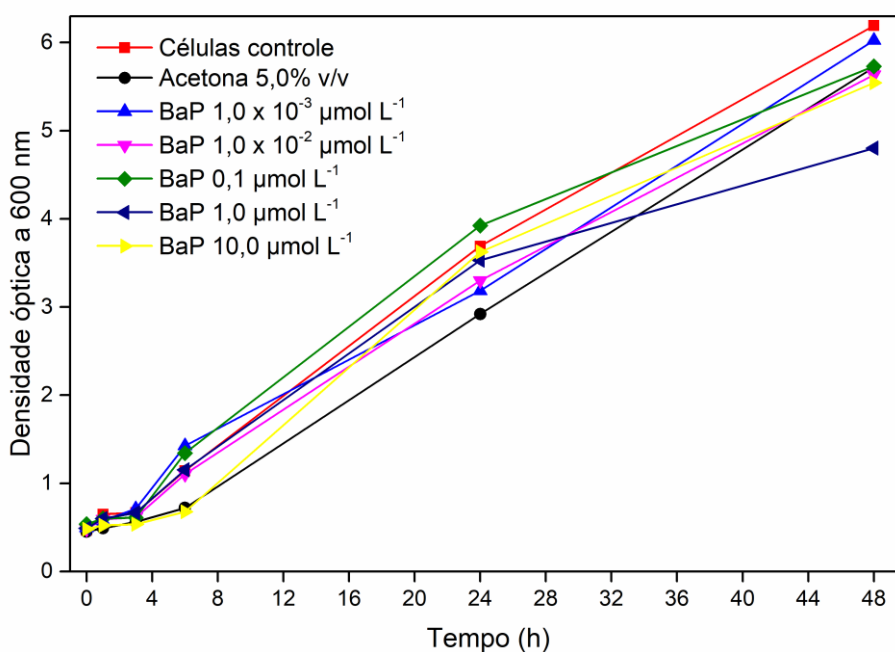
### 4.1 Cultivo de células de *Saccharomyces cerevisiae*, *quenching* metabólico, exposição ao benzo[*a*]pireno e preparo do extrato celular bruto

Curvas de crescimento representam o ciclo de vida da célula e são construídas com base na turbidez do meio celular em função do tempo de cultivo. A turbidez é diretamente proporcional à densidade óptica; quanto maior a densidade óptica, maior a quantidade de células no meio de cultura. A curva de crescimento varia entre linhagem celulares e apresenta um perfil teórico de quatro estágios, conforme mostra a figura abaixo.



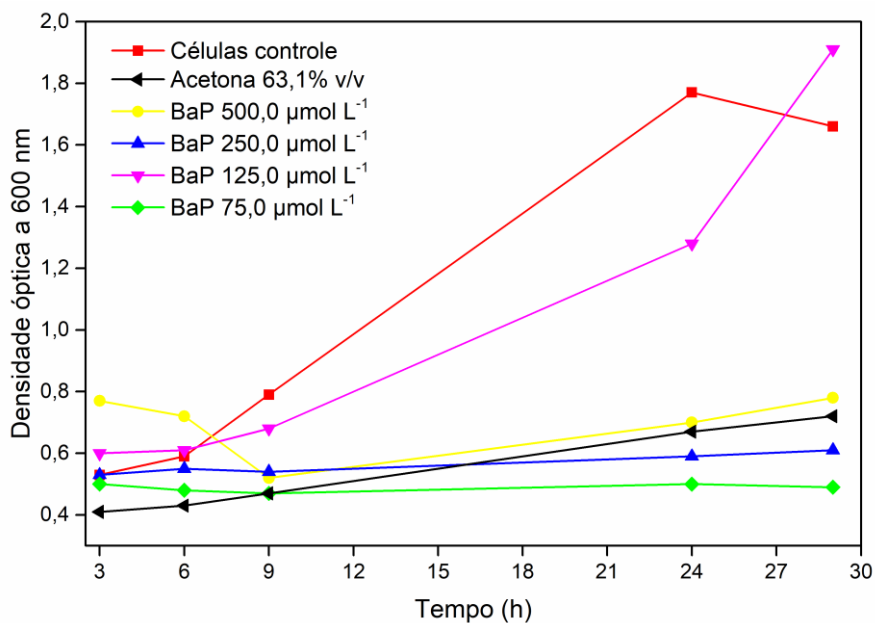
**Figura 7.** Curva de crescimento celular teórica.

Neste trabalho, as curvas de crescimento foram realizadas na presença de diferentes concentrações de BaP, através do registro da turbidez a 600 nm, nos tempos indicados. A concentração de BaP não pode ser alta a ponto de matar todas as células nem muito baixa a ponto de não interferir no crescimento da levedura. Inicialmente, foi testada a faixa de  $1,0 \times 10^{-3}$  a  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BaP. No entanto, foi observado que em todas as concentrações usadas o perfil de crescimento foi semelhante ao controle, conforme mostra a Figura 8. Isto é, o resultado mostrou que, nas concentrações inicialmente estudadas, o BaP não interferiu significativamente no crescimento das leveduras.



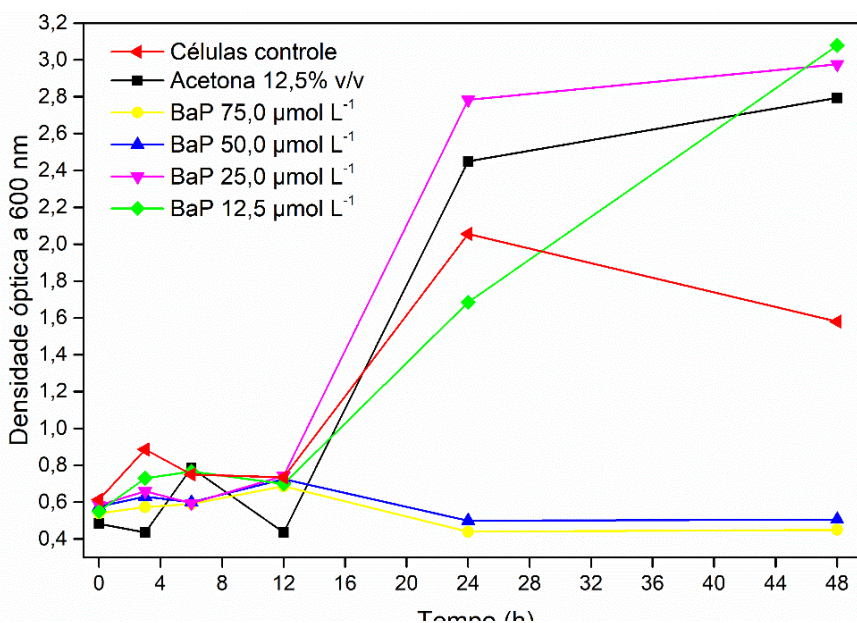
**Figura 8.** Curva de crescimento de *S. cerevisiae* na presença de BaP na faixa de  $1,0 \times 10^{-3}$  a  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Assim, foi testada outra faixa de concentrações de BaP, de  $75,0$  a  $500,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . O resultado obtido está ilustrado na Figura 9.



**Figura 9.** Curva de crescimento de *S. cerevisiae* na presença de BaP na faixa de 75,0 a 500,0 µmol L<sup>-1</sup>.

Os resultados apresentados na Figura 9 mostram que as concentrações maiores do que 75,0 µmol L<sup>-1</sup>, exceto 125,0 µmol L<sup>-1</sup>, impediram o crescimento celular. Esse resultado indicou a necessidade de nova repetição dos experimentos usando outra faixa de concentrações de BaP, de 12,5 a 75,0 µmol L<sup>-1</sup> (Figura 10).



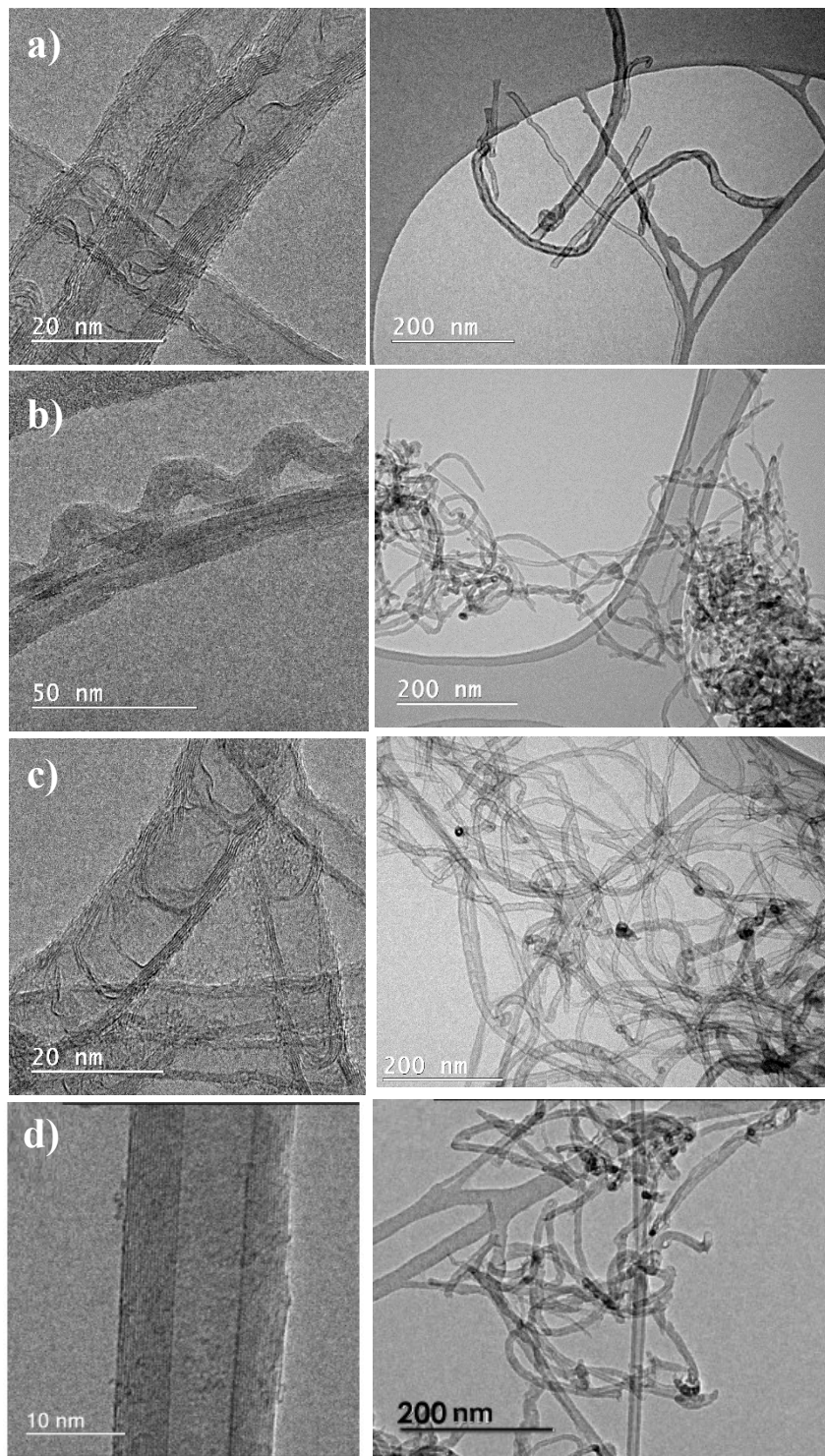
**Figura 10.** Curva de crescimento de *S. cerevisiae* na presença de BaP na faixa de 12,5 a 75,0 µmol L<sup>-1</sup>.

Conforme mostra a Figura 10, o BaP alterou o crescimento celular nas concentrações de 12,5 e 25,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em relação ao controle, sem inibir totalmente o crescimento das células. Houve uma tendência de estabilização do crescimento após 24 h de exposição das células ao BaP na concentração de 25,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . É necessário escolher o período a partir do qual o crescimento celular se estabiliza, pois, dessa maneira, é garantido que o metabolismo celular não sofra grandes variações que, se ocorressem, afetariam a reprodutibilidade da quantificação dos metabólitos. Portanto, a concentração de 25,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foi escolhida para ser fixada nos experimentos de exposição ao BaP e o período de exposição foi fixado em 24 h.

#### **4.2 Caracterização dos nanotubos de carbono magnéticos**

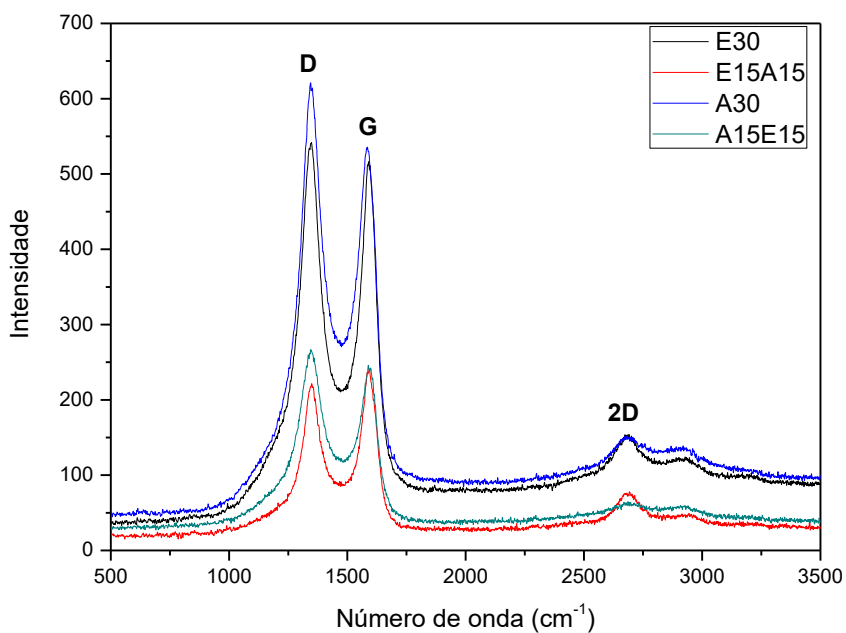
A caracterização dos nanomateriais foi realizada pelo GRUTAM/DQ-UFMG. Foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para os quatro tipos de mNTCs, a 200 kV (Figura 11).

Todas as imagens confirmaram estruturas tubulares para os nanotubos (imagens à direita) e camadas múltiplas (imagens à esquerda). A funcionalização através da inserção de átomos de nitrogênio em A30 foi confirmada pelas imagens em c), que mostram estruturas curvadas em formato de bambu causadas pela presença de nitrogênio; as imagens a) e b) mostram estruturas de bambu apenas em algumas seções dos tubos, o que confirma a funcionalização parcial dos mNTCs híbridos; já as imagens em d) não mostram estruturas em bambu, confirmando a estrutura não funcionalizada de E30 [108].



**Figura 11.** Imagens de MET dos nanotubos: a) A15E15, b) E15A15, c) A30, d) E30.

A espectroscopia Raman foi realizada para confirmar a funcionalização dos nanotubos (laser 532 nm, potência de 2 mV, 1 varredura  $s^{-1}$ ; BRUKER). Como mostra a Figura 12, foram observadas bandas D (*Disorder*) na região próxima a  $1350\text{ cm}^{-1}$ , as quais são associadas a defeitos estruturais causados pela funcionalização de nanotubos. Além disso, também foram observadas bandas G (*Graphite*) de alta frequência em aproximadamente  $1600\text{ cm}^{-1}$  (relacionadas a estruturas altamente organizadas, características de nanotubos). As bandas 2D observadas na região de  $2600\text{ cm}^{-1}$  são harmônicas das bandas D [109,110].



**Figura 12.** Espectro de Raman para os quatro tipos de mNTCs.

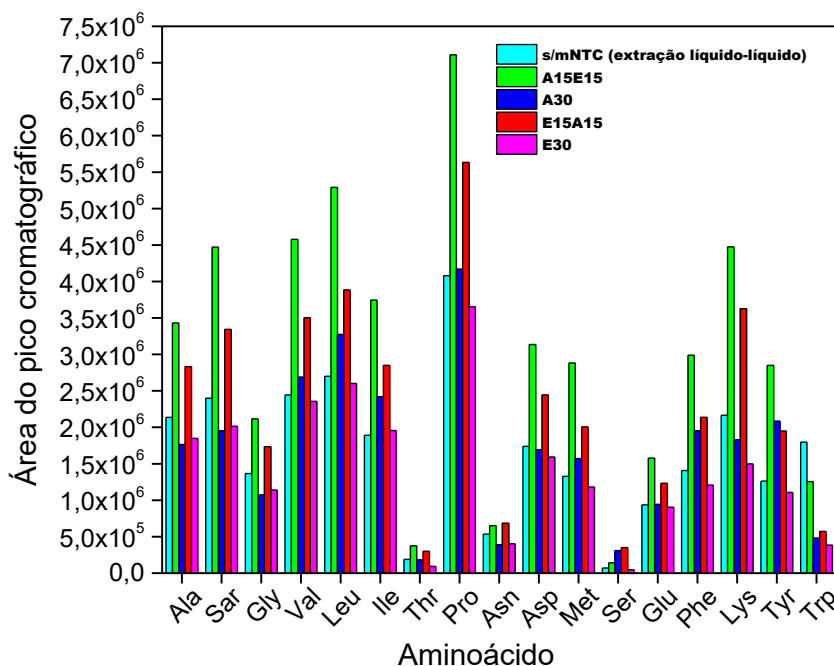
Por fim, a análise por CHN (carbono, hidrogênio e nitrogênio) determinou o conteúdo de nitrogênio nos nanotubos funcionalizados (A15E15, E15A15 e A30) e a inexistência de nitrogênio em E30, o nanotubo não funcionalizado (Tabela 3).

**Tabela 3.** Resultado da análise elementar para os mNTCs.

Nanotubo	% elementar		
	C	H	N
A15E15	82	0	2
E15A15	89	0	1
E30	78	0	0
A30	91	0	4

### 4.3 Desenvolvimento do procedimento de extração de aminoácidos

A reação de derivatização dos aminoácidos foi otimizada em trabalho anterior [89] e, neste trabalho, o foco foi otimizar as etapas de extração dos derivados de aminoácidos usando os quatro tipos de nanotubos de carbono magnéticos (mNTCs). A etapa de extração líquido-líquido do trabalho anterior foi substituída pela extração com nanotubos de carbono, conforme procedimento descrito na seção 3.7. Os passos anteriores a essa etapa foram mantidos, com apenas pequenas variações nos volumes de solvente e soluções feitas para adequação ao tipo de frasco escolhido (tubo de ensaio). Cada tipo de mNTCs foi testado separadamente na extração de 17 aminoácidos de uma mistura padrão (Figura 13). Nesses testes, a dessorção dos analitos foi feita em temperatura ambiente.

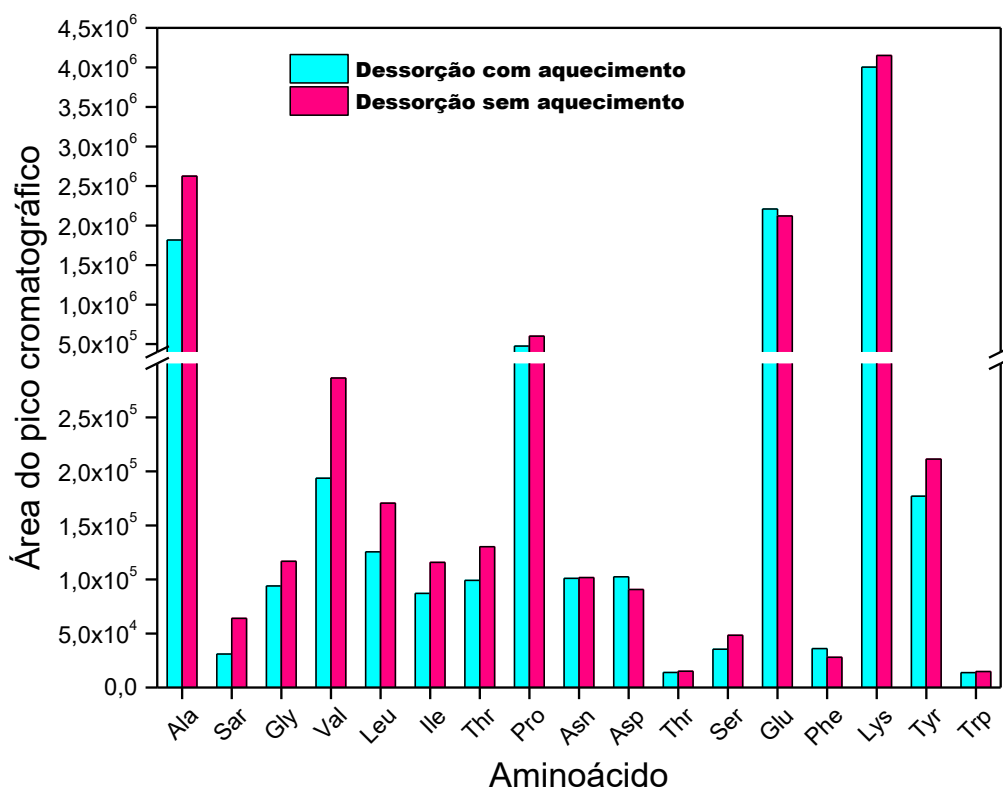


**Figura 13.** Estudo comparativo da extração de aminoácidos derivatizados com propil cloroformato/propanol usando quatro tipos de mNTCs e extração líquido-líquido.

O resultado mostra que o mNTC A15E15 foi o mais eficiente para a extração dos derivados de aminoácidos (com base nas áreas dos picos cromatográficos), exceto para Asn,

Ser e Trp. Para Asn, os mNTCs E15A15 e A15E15 praticamente apresentaram o mesmo desempenho na extração. E15A15 proporcionou o melhor resultado para a Ser; para o Trp, a extração com NTC não foi mais eficiente do que a extração líquido-líquido. O maior rendimento obtido com a extração por nanotubos híbridos pode ser explicado pela interação diferenciada das seções do mNTC com os derivados de aminoácidos. Embora a reação de derivatização tenha adicionado os mesmos grupos funcionais em todos os aminoácidos, estes têm estruturas originais com diferentes polaridades e que são mantidas após a derivatização. Logo, os derivados também apresentam polaridades distintas e o caráter anfifílico dos mNTCs A15E15 e E15A15 promoveu boa interação da seção hidrofílica com os derivados mais polares e da seção hidrofóbica com os derivados mais apolares [42].

Foi estudado o efeito do aquecimento na eficácia da dessorção dos analitos. Cabe ressaltar que o aquecimento pode melhorar a dessorção, mas apresenta como inconveniência o aumento do tempo total do procedimento de preparo de amostras. Temperaturas elevadas podem acarretar perdas dos derivados de aminoácidos por volatilidade, portanto, foi testada a dessorção com aquecimento à temperatura de 60 °C. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 14.



**Figura 14.** Influência da dessorção com e sem aquecimento para análise dos aminoácidos derivatizados com propil cloroformato/propanol e extraídos com mNTCs A15E15.



Nota-se que para a maioria dos aminoácidos a dessorção sem aquecimento implicou em melhor eficiência da extração, comprovando que o aquecimento pode causar perdas por volatilidade para a maioria dos derivados de aminoácidos. Os aminoácidos Pro, Asn, Thr e Trp apresentaram diferença de áreas comparativamente pequena, o que indica que os processos de dessorção com ou sem aquecimento não afetam a quantificação desses analitos. Como o melhor resultado foi a dessorção sem aquecimento, todos os demais experimentos foram realizados usando essa condição de dessorção.

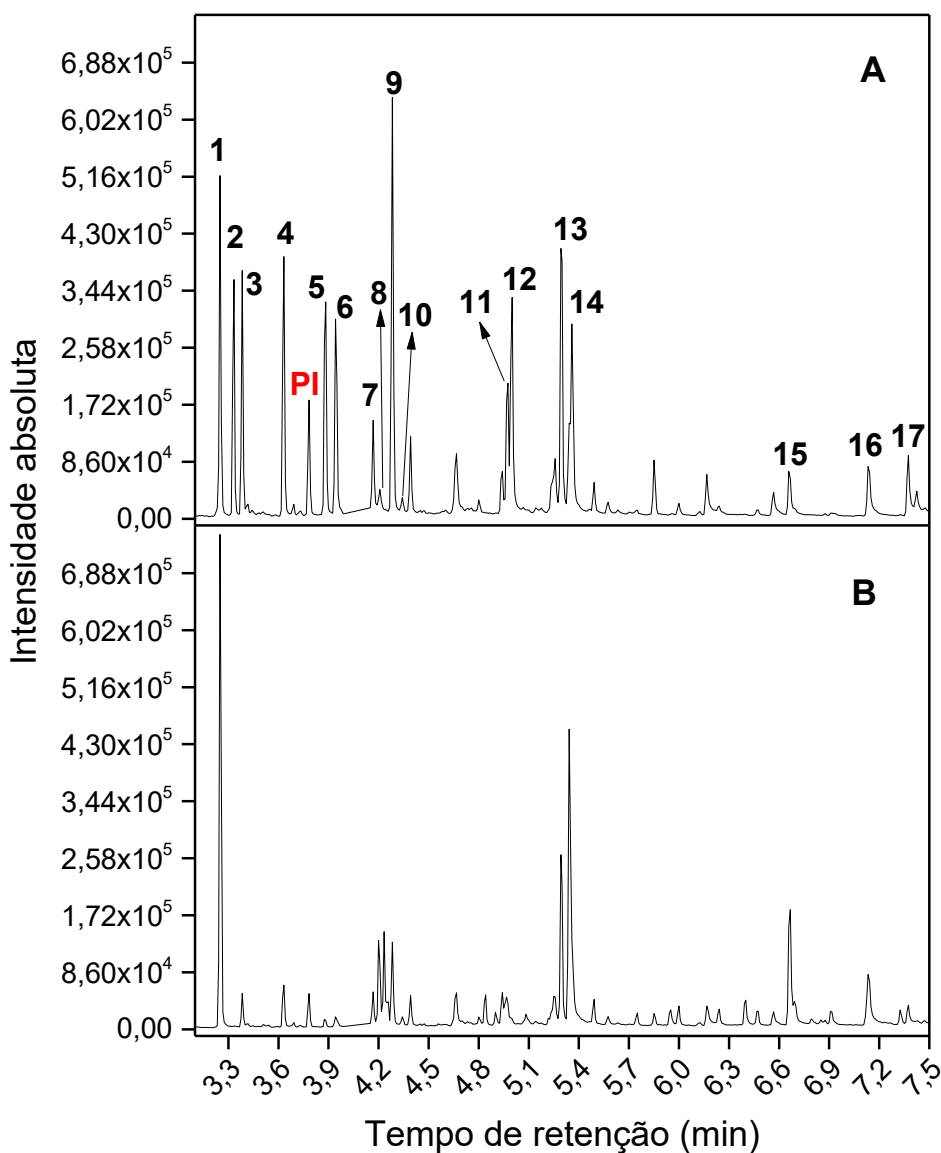
#### 4.4 Avaliação de figuras de mérito do procedimento analítico

A Tabela 4 mostra os tempos de retenção e as respectivas razões massa/carga de cada aminoácido derivatizado na solução padrão de 20,0 mg L<sup>-1</sup>.

**Tabela 4.** Tempos de retenção cromatográfica e razões *m/z* dos derivados de aminoácidos analisados por GC/MS.

Pico	Aminoácido	Tempo de retenção (min)	<i>m/z</i> de identificação		<i>m/z</i> de quantificação
1	Ala	3,251	130	88	70
2	Sar	3,338	130	88	116
3	Gly	3,383	116	74	102
4	Val	3,631	116	158	72
PI	Norv	3,782	158	72	116
5	Leu	3,878	172	86	116
6	Ile	3,943	130	172	74
7	Thr	4,167	101	74	143
8	Ser	4,202	86	73	60
9	Pro	4,283	70	156	114
10	Asn	4,392	69	155	113
11	Asp	4,966	216	88	130
12	Met	4,992	61	101	56
13	Glu	5,343	84	230	170
14	Phe	5,367	74	91	120
15	Lys	6,664	170	84	128
16	Tyr	7,135	107	206	164
17	Trp	7,429	130	131	77

A seletividade do método foi avaliada pela separação cromatográfica e pelas relações  $m/z$  de identificação e quantificação dos íons de cada analito na amostra real. Esses resultados foram comparados com a análise dos aminoácidos contidos na solução padrão (Figura 15).



**Figura 15.** (A) Cromatograma obtido no modo SIM dos 17 padrões de aminoácidos, cada um na concentração de  $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ : 1-Ala, 2-Sar, 3-Gly, 4-Val, PI (padrão interno), 5-Leu, 6-Ile, 7-Thr, 8-Ser, 9-Pro, 10-Asn, 11-Asp, 12-Met, 13-Glu, 14-Phe, 15-Lys, 16-Tyr, 17-Trp. (B) Cromatograma de extrato de leveduras expostas ao BaP ( $25,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

De maneira geral, os picos dos analitos foram bem separados no cromatograma de padrões, com exceção de Asp e Met (picos 11 e 12). No cromatograma de amostras houve boa separação para a maioria dos aminoácidos, porém Sar não foi detectada. Alterações na taxa de aquecimento do forno cromatográfico foram testadas, mas não apresentaram melhorias na separação, pois apesar de melhorarem a coeluição de Asp e Met, prejudicaram a separação dos demais picos. Porém, as razões  $m/z$  para qualificação e quantificação dos AA derivatizados estudados possibilitaram uma boa seletividade para o método.

Para avaliar a linearidade do procedimento analítico, foram plotadas 17 curvas de calibração com padrões externos. As faixas de trabalho foram escolhidas pela análise por GC/MS de uma amostra de extrato de levedura controle com o objetivo de estimar a concentração dos analitos por comparação direta com solução padrão de aminoácidos ( $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ ). O resultado mostrou concentrações extremamente variadas de aminoácidos, na faixa de  $1,0$  a  $250,0 \text{ mg L}^{-1}$  (Tabela 5). Assim, trabalhar com a injeção das amostras sem diluição acarretaria problemas no equipamento, tais como o grande acúmulo de resíduos na câmara de injeção, na fonte de íons, saturação do detector, etc. Para evitar isso e trabalhar com faixas menores de concentração, foi feita a diluição dos extratos de leveduras em um fator de 10 vezes. Desse modo, as faixas de trabalho propostas variaram de  $0,10$  a  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

Foi aplicado o Teste  $F$  para verificar a homogeneidade das variâncias dos valores de áreas utilizados na construção das curvas de calibração de cada AA. Os resultados mostraram que Ser, Met, Glu, Trp, Val e Lys não são homocedásticos, ou seja, que apresentaram heterocedasticidade, portanto foi utilizado o modelo de regressão pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MQP), considerando o intervalo de confiança de 95%. Os gráficos das curvas de todos os AA quantificados estão no apêndice (Figuras 19 e 20).

**Tabela 5.** Análise exploratória por GC/MS da concentração de aminoácidos em extrato não diluído de levedura controle por comparação direta com solução padrão de aminoácidos 20,0 mg L<sup>-1</sup>.

Aminoácido	Acetona + células <i>n</i> = 3			BaP 25 µmol L <sup>-1</sup> + células <i>n</i> = 3			Controle (células) <i>n</i> = 3		
	<i>A</i> <sub>média</sub>	<i>s</i>	<i>C</i> <sub>média</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	<i>A</i> <sub>média</sub>	<i>s</i>	<i>C</i> <sub>média</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	<i>A</i> <sub>média</sub>	<i>s</i>	<i>C</i> <sub>média</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
Ala	16,79	0,88	126,87	14,57	0,30	110,08	16,38	0,58	123,74
Gly	1,03	0,08	11,54	0,85	0,01	9,58	1,32	0,05	14,79
Val	1,46	0,08	12,40	1,39	0,02	11,82	3,09	0,07	26,29
Leu	0,26	0,01	2,32	0,27	0,01	2,39	0,44	0,01	3,87
Ile	0,58	0,07	5,78	0,43	0,01	4,35	0,61	0,03	6,12
Thr	0,82	0,09	22,59	0,72	0,12	19,83	0,65	0,05	17,84
Ser	2,66	0,14	245,80	2,61	0,06	240,98	2,96	0,04	272,97
Pro	2,52	0,16	14,04	2,36	0,04	13,11	2,22	0,08	12,37
Asn	0,77	0,06	24,98	0,82	0,04	26,42	0,54	0,02	17,50
Asp	0,41	0,04	6,40	0,74	0,03	11,65	0,33	0,08	5,21
Met	0,20	0,01	1,77	0,20	0,01	1,77	0,11	0,02	0,93
Glu	10,48	1,09	215,85	9,12	1,01	187,80	9,88	1,18	203,42
Phe	0,87	0,28	11,12	1,96	0,50	25,09	1,67	0,71	21,34
Lys	3,72	0,47	122,28	4,62	0,30	151,97	4,99	1,11	163,87
Tyr	2,08	0,26	47,62	3,10	0,17	71,04	3,56	0,80	81,75
Trp	0,07	0,03	6,45	0,10	0,04	9,65	0,10	0,04	9,66

O AA Trp apresentou comportamento não linear mesmo após a remoção de *outliers* e aplicação dos modelos de regressão por MQP e quadrático aos dados de área e concentração. Portanto, nova curva de calibração será efetuada para Trp.

A sensibilidade do método foi avaliada através do cálculo dos limites de detecção e quantificação usando as equações abaixo, conforme o guia da *Eurachem* [111]:

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= \bar{y} + 3s'_0 & n &= 10 \text{ replicatas de cada amostra analisada} \\ \text{LOQ} &= \bar{y} + 10s'_0 & \bar{y} &= \text{média das áreas dos picos referentes a 10 replicatas do branco} \\ \text{com } s'_0 &= \frac{s_0}{\sqrt{n}} & s_0 &= \text{desvio padrão das áreas dos picos referentes a 10 replicatas do branco} \\ & & s'_0 &= \text{desvio padrão corrigido} \end{aligned}$$

Os resultados dos cálculos de LOD e LOQ para cada analito estão mostrados na Tabela 6. Esses valores ficaram muito inferiores à faixa encontrada no trabalho anterior (LOD entre 0,04 a 1,60 mg L<sup>-1</sup>; LOQ entre 0,08 a 2,76 mg L<sup>-1</sup>) [89]. Isso indica que houve aumento da sensibilidade do método GC/MS otimizado para a análise de derivados alquilados de aminoácidos usando extração por mNTEs em comparação à extração líquido-líquido.

**Tabela 6.** Faixas lineares, equações das retas, coeficientes de determinação das curvas de calibração e LOD/LOQ de cada derivado de aminoácido analisado.

Aminoácido	Faixa linear (mg L <sup>-1</sup> )	Equação da reta	R <sup>2</sup>	LOD (mg L <sup>-1</sup> ) n = 10	LOQ (mg L <sup>-1</sup> ) n = 10
Ala	0,41 a 25,00	$y = 0,1620x + 0,1607$	0,9958	0,31	0,41
Sar	0,30 a 1,00	$y = 0,1104x + 0,0366$	0,9905	0,19	0,30
Gly	0,04 a 5,00	$y = 0,1404x - 0,0987$	0,9949	0,03	0,04
Val	0,04 a 5,00	$y = 0,1929x - 0,1505$	0,98483	0,03	0,04
Leu	0,02 a 1,00	$y = 0,1647x + 0,0627$	0,9964	0,008	0,02
Ile	0,02 a 1,00	$y = 0,8979x + 0,3277$	0,9991	0,01	0,02
Thr	0,16 a 5,00	$y = 0,0437x - 0,0144$	0,9985	0,10	0,16
Ser	0,05 a 50,00	$y = 0,0703x - 0,0553$	0,9931	0,03	0,06
Phe	0,004 a 5,000	$y = 1,2392x - 0,1293$	0,9961	0,002	0,004
Pro	0,03 a 5,00	$y = 0,3018x - 0,2554$	0,9910	0,02	0,03
Asn	0,19 a 5,00	$y = 0,0622x - 0,0417$	0,9937	0,13	0,19
Asp	0,07 a 5,00	$y = 0,0664x - 0,0004$	0,9800	0,03	0,07
Met	0,02 a 1,00	$y = 0,0086x - 0,0116$	0,9807	0,009	0,02
Glu	0,22 a 50,00	$y = 0,0400x - 0,0237$	0,9989	0,15	0,28
Lys	0,19 a 50,00	$y = 0,0424x - 0,0636$	0,9397	0,11	0,22
Tyr	0,004 a 10,000	$y = 0,5925x + 0,0313$	0,9902	0,002	0,004

#### 4.5 Análise de amostras reais

Foram analisados extratos de leveduras em quatro condições: leveduras sem exposição ao BaP (controle), leveduras expostas ao BaP 25,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e leveduras expostas à acetona (solvente do BaP). Os resultados da análise por GC/MS desses extratos diluídos em água, num fator de 10, sem correção da diluição, estão ilustrados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Concentrações de aminoácidos ( $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ ) derivatizados por propil cloroformato/propanol, extraídos por mNTCs e analisados por GC/MS nos extratos *S. cerevisiae*.

Aminoácido	Faixa linear de trabalho (mg L <sup>-1</sup> )	Concentrações de aminoácidos (mg L <sup>-1</sup> )		
		Células com acetona	Células expostas ao BaP 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Células controle
Ala	0,41 a 25,00	34,56 $\pm$ 10,85	33,86 $\pm$ 27,69	43,23 $\pm$ 12,07
Gly	0,04 a 5,00	2,22 $\pm$ 0,14	1,51 $\pm$ 0,24	2,97 $\pm$ 0,05
Val	0,04 a 5,00	3,27 $\pm$ 0,08	2,84 $\pm$ 1,67	6,83 $\pm$ 2,12
Ile	0,02 a 1,00	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ser	0,05 a 50,00	8,05 $\pm$ 0,09	3,32 $\pm$ 0,37	12,16 $\pm$ 0,16
Phe	0,004 a 5,000	0,28 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,00
Pro	0,03 a 5,00	3,06 $\pm$ 0,05	1,91 $\pm$ 0,43	2,81 $\pm$ 0,09
Asn	0,19 a 5,00	3,45 $\pm$ 0,04	2,68 $\pm$ 0,18	3,61 $\pm$ 0,01
Asp	0,07 a 5,00	0,48 $\pm$ 0,14	1,21 $\pm$ 0,45	0,30 $\pm$ 0,06
Met	0,02 a 1,00	0,61 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,02	0,249 $\pm$ 0,003
Glu	0,22 a 50,00	20,20 $\pm$ 2,92	12,22 $\pm$ 0,35	21,17 $\pm$ 0,17
Lys	0,19 a 50,00	7,34 $\pm$ 0,24	7,03 $\pm$ 0,68	7,46 $\pm$ 0,28
Tyr	0,004 a 10,000	0,328 $\pm$ 0,001	0,966 $\pm$ 0,146	0,419 $\pm$ 0,004
Leu	0,02 a 1,00	0,70 $\pm$ 0,04	0,34 $\pm$ 0,11	0,90 $\pm$ 0,03
Thr	0,16 a 5,00	3,93 $\pm$ 0,46	3,12 $\pm$ 0,51	3,97 $\pm$ 0,56

Como está mostrado, alguns aminoácidos (Ala, Val e Ile) não se encaixaram dentro da faixa linear das suas respectivas curvas de calibração. Desse modo, esses analitos foram excluídos da análise quantitativa. Novas faixas de trabalho serão avaliadas para estes AA.

Como mostram os resultados, o perfil de concentrações de aminoácidos nas amostras é muito variado, isso dificultou a otimização de fatores de diluição das amostras e faixas de concentração abrangentes. Além disso, o limite de detecção instrumental também se

mostrou como um fator limitante para que alguns AA pudessem ter na curva de calibração concentrações inferiores a 0,01 mg L<sup>-1</sup>. Na Tabela 8 são mostrados os resultados de concentração para os aminoácidos quantificados, corrigida a diluição.

**Tabela 8.** Concentrações de aminoácidos ( $n = 3$ ) derivatizados por propil cloroformato/propanol, extraídos por mNTCs e quantificados por GC/MS em extratos de *S. cerevisiae* (com correção de diluições).

Aminoácido	Células com acetona (mg L <sup>-1</sup> )	Células expostas ao BaP 25,0 μmol L <sup>-1</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Células controle (mg L <sup>-1</sup> )
Gly	22,16±1,41	15,11±2,38	29,69±0,46
Ser	80,49±0,93	33,17±3,67	121,61±1,57
Phe	2,80±0,08	2,30±0,31	4,34±0,03
Pro	30,59±0,48	19,14±4,28	28,06±0,92
Asn	34,53±0,43	26,83±1,85	36,15±0,13
Asp	4,83±1,37	12,08±4,45	3,04±0,62
Met	6,11±0,55	2,14±0,24	2,49±0,03
Glu	201,96±29,16	122,23±3,46	211,66±1,68
Lys	75,04±2,68	71,66±7,63	76,47±3,13
Tyr	3,28±0,01	9,66±1,46	4,19±0,04
Leu	6,97±0,36	3,38±1,10	9,05±0,30
Thr	39,25±4,65	31,22±5,05	39,72±5,56

O aminoácido Sar não foi detectado no conjunto de aminoácidos, o que pode ser explicado pela sua rápida degradação em Gly pela enzima sarcosina desidrogenase, já relatada na literatura [112], ou por perdas desse aminoácido durante o preparo de amostras.

O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado, verificando-se que os dados de concentração seguiam uma distribuição normal. Em seguida foi feito o teste de Cochran, o qual mostrou que os dados eram homocedásticos. Todos os testes foram feitos no intervalo de confiança de 95%. Sendo os dados normais e homocedásticos, ANOVA *one-way* pôde ser aplicada para verificar se a concentração de aminoácidos estava estatisticamente diferente nas leveduras expostas e não expostas ao BaP e à acetona. Os resultados mostraram que apenas Thr não apresentou concentração com diferença significativa entre as amostras de levedura.

Em seguida, foi aplicado o teste *post-hoc* de Bonferroni, de comparação múltipla de pares de médias, a esses mesmos dados de concentração para identificar quais variáveis



influenciaram na diferença estatística observada na ANOVA. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Teste de Bonferroni aplicado a concentrações de AA ( $n = 3$ ) que apresentaram resultados estatisticamente diferentes no teste ANOVA ( $p = 0,05$ ).

AA	Significância das interações		
	BaP × acetona	Controle × acetona	Controle × BaP
Gly	1	1	1
Ser	1	1	1
Phe	0	1	1
Pro	1	0	1
Asn	1	0	1
Asp	0	0	1
Met	1	1	0
Glu	1	0	1
Tyr	1	0	1
Leu	1	1	1

Significância 1 = níveis diferenciaram amostras

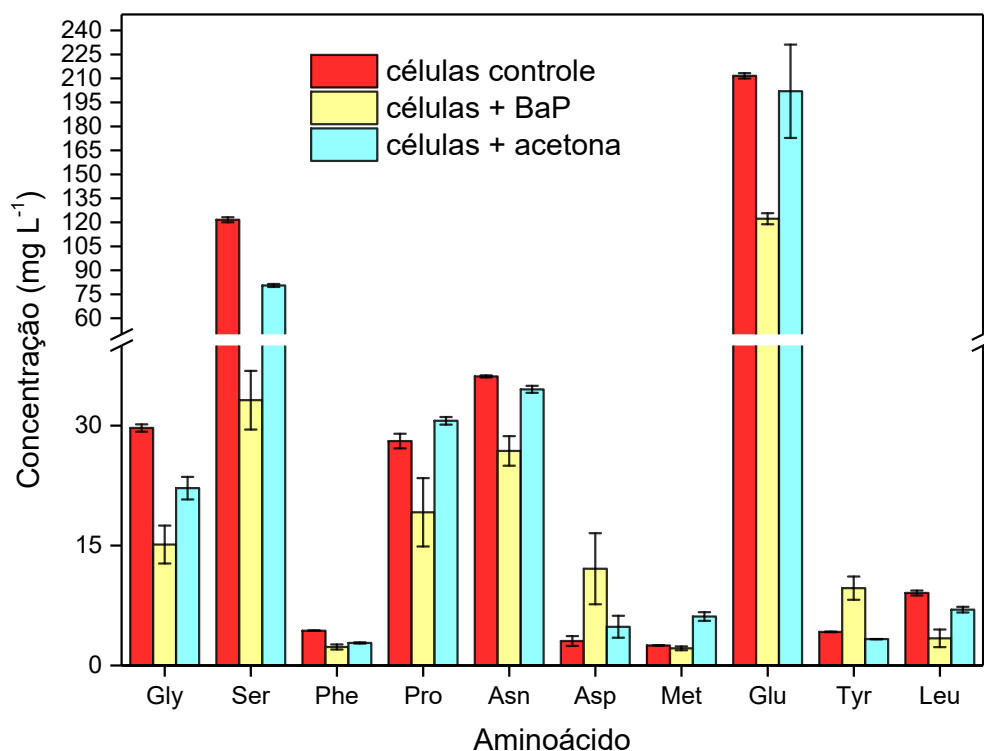
Significância 0 = níveis não diferenciaram amostras

Significância igual a 0 indica que não há diferença estatística entre as médias dos níveis comparados, enquanto 1 significa que há diferença. Portanto, para Gly, por exemplo, o resultado mostra que os três conjuntos de células estudados, “células + BaP”; “células + acetona” e “células controle”, são significativamente diferentes com 95% de confiança.

Através da combinação dos resultados dos dois testes (ANOVA e Bonferroni), foi observado que os aminoácidos Gly, Ser, Phe, Pro, Asn, Asp, Met, Glu, Tyr e Leu foram capazes de diferenciar estatisticamente, em um intervalo de confiança de 95%, leveduras expostas e não expostas a BaP e acetona.

## 4.6 Interpretações bioquímicas

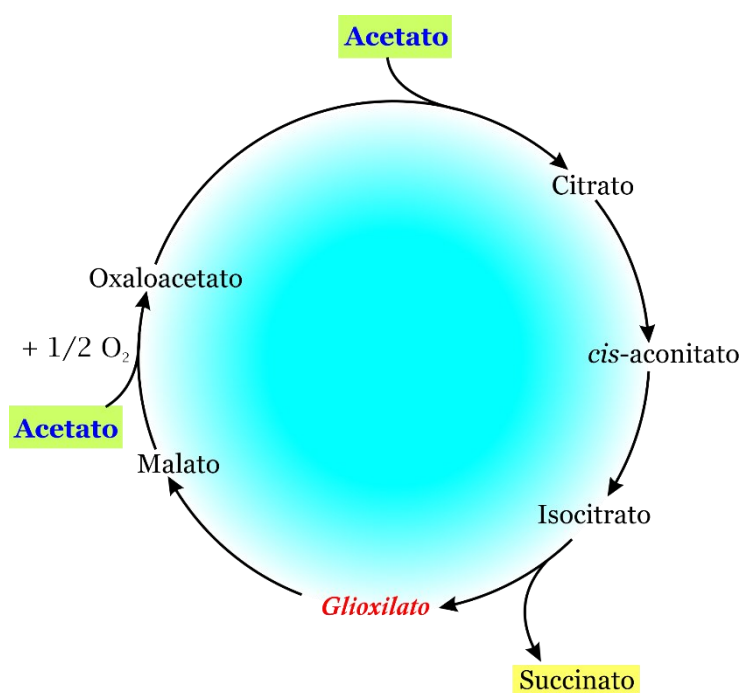
A Figura 16 mostra os valores de concentrações de AA que apresentaram diferença estatística significativa entre os níveis “células + BaP”, “células + acetona” e “células controle” nas amostras de *S. cerevisiae*.



**Figura 16.** Aminoácidos derivatizados que apresentaram diferença estatística entre os grupos de amostras “células + BaP”, “células + acetona” e “células controle”, segundo ANOVA, com intervalo de confiança de 95%,  $n = 3$ .

As amostras de células crescidas na presença de acetona apresentaram maiores valores de concentração para a maioria dos aminoácidos (Gly, Ser, Pro, Asn, Met, Glu e Leu) em relação às células expostas ao BaP, indicando que a acetona provocou aumento na biossíntese desses AA. Isso pode ser explicado pela metabolização de acetona por *S. cerevisiae*, já reportada por Dyrda *et al.* [113]. Embora ainda seja necessário investigar, a biotransformação de acetona pelas leveduras pode gerar acetato. Células de *S. cerevisiae* têm o ciclo do glioxilato

operante (Figura 17) [114], o que pode explicar a maior produção de aminoácidos na presença de acetona. A possível metabolização do solvente pelas leveduras aumenta a biossíntese de acetato que, após esgotada a glicose do meio, na presença de ATP e CoA, produz acetil-CoA. Através da enzima isocitrato liase, glioxilato é formado a partir de ácido isocítrico. Glioxilato, por sua vez, na presença de Acetil-CoA e da enzima malato sintase, forma malato (que é convertido em fosforilpiruvato, fornecendo aminoácidos e vários outros constituintes celulares através da via glicolítica) e oxaloacetato (que continua alimentando o ciclo de Krebs, mantendo a biossíntese de aminoácidos a partir dos intermediários desse ciclo) [115].



**Figura 17.** Ciclo do glioxilato.

Com exceção de Asp e Tyr, todos os outros AA apresentaram maiores valores de concentração nas células controle do que em células expostas ao BaP. Met não teve significância no teste de Bonferroni para o par de níveis controle  $\times$  BaP (Tabela 9), o que mostra que Met não mostrou diferença estatística para esses níveis. Portanto, pode-se sugerir que Met apresentou comportamento bioquímico estatisticamente igual tanto nas células controle quanto nas células expostas ao BaP. Apesar de BaP estar relacionado com a formação de adutos de DNA e de afetar o balanço redox das células, a completa correlação desses processos com o câncer ainda requer maior compreensão do ponto de vista metabólico. Embora em células de *S.*

*cerevisiae* BaP seja cerca de 50 a 100 vezes menos tóxico do que em células de mamíferos, o composto apresenta os mesmos efeitos em células de leveduras: danos ao DNA e perturbação da cadeia transportadora de elétrons [116]. No entanto, ainda não existem estudos que interpretem as modificações nas vias metabólicas de AA causadas pela exposição das leveduras ao BaP. Para propor interpretações bioquímicas que expliquem o efeito de diminuição da concentração da maioria dos AA nas células controle, igualdade para Met e aumento para Asp e Tyr, será necessário correlacionar as vias anabólicas/catabólicas de AA já elucidadas [3] com conclusões obtidas a partir da genômica e transcriptômica da exposição de *S. cerevisiae* ao BaP [116].

Há estudos que apontam alterações de aminoácidos livres em plasma de pacientes com câncer: Gly, Ser, Phe, Pro, Asn, Leu, Met, Tyr e Phe (câncer de pulmão) [95,117,118]; Phe, Asn, Met, Tyr e Leu (câncer de intestino e colorretal); Gly, Ser, Phe, Pro, Met, Tyr (câncer de mama); Leu (câncer de próstata) [117]. E também há estudos comprovando a correlação entre BaP e neoplasias pulmonares [119,120]. O atual trabalho mostrou, pelo teste de Bonferroni, que para Met não há diferença estatística entre células expostas e não expostas ao BaP. Todos os demais AA, em conformidade com a literatura, diferenciaram estatisticamente células de leveduras expostas e não expostas ao BaP e, portanto, são potenciais candidatos a biomarcadores de câncer.

#### **4.7 Estudos de metabolômica envolvendo benzo[*a*]pireno**

Os estudos de metabolômica da exposição ao BaP relatados na literatura buscaram compreender principalmente alterações nas vias de metabolização de aminoácidos, açúcares e lipídeos. Por meio das modificações metabólicas, esses estudos possibilitaram melhor compreensão dos mecanismos de toxicidade do BaP e apontaram candidatos a biomarcadores de exposição, conforme descrito a seguir.

Recentemente, foi investigada a capacidade de degradação de BaP e outros HPAs por micro-organismos presentes em solos corrigidos com biocarvão. Através da análise de metabólitos no solo, foi possível concluir que o efeito conjunto de biocarvão e raízes de plantas pode atuar no metabolismo dos micro-organismos e sua capacidade de degradar HPAs [121]. Também já foi descrito que o estresse causado por HPAs afeta a diversidade dos micro-

organismos do solo *Rhizobacter*, *Sphingobium*, *Mycobacterium*, *Massilia*, *Bacillus* e *Pseudarthrobacter*, os quais podem ser usados como indicadores de contaminação por HPAs [122].

A toxicidade de BaP em células de bexiga foi reportada por Verma *et al.* [123], através de um estudo de metabolômica global, no qual foram identificados mais de 200 metabólitos. Foi observado que um intermediário de biossíntese e degradação do aminoácido prolina, o P5C (ácido 1-pirrolina-5-carboxílico), apresentou alteração significativa em todas as condições de exposição. P5C é conhecido como regulador na manutenção dos estados redox da célula e está envolvido na biossíntese de nucleotídeos, através da produção de fosforil-ribosil-pirosfosfato (PP-ribose-P). Em tumores, a síntese de aminoácidos não essenciais é comum e, através desse estudo, os autores puderam apontar um intermediário da via de metabolização da prolina como candidato a biomarcador de toxicidade do BaP. Zhang *et al.* [124] estudaram o efeito de BaP (um dos contaminantes mais abundantes em partículas de PM<sub>2,5</sub><sup>9</sup>) no metabolismo de células alveolares humanas (A549) e constataram que o contaminante induziu inflamação nas células, ativando o metabolismo de fosfolídeos, esfingolípídeos e ácidos graxos livres. Foi observado aumento da atividade da fosfolipase A2 (PLA2), sugerindo que essa enzima pode ser um alvo de drogas que atuem em lesões pulmonares induzidas pela exposição a PM<sub>2,5</sub>. Alterações metabólicas causadas pelo BaP em material fecal também já foram estudadas com o objetivo de entender a influência do contaminante no desenvolvimento de câncer de intestino, pelo fato de BaP estar presente em alimentos contaminados. Através de um estudo de metabolômica de compostos voláteis (volatoma), Defois *et al.* [125] demonstraram que BaP alterou o volatoma microbiano de maneira dependente da dose de exposição. Outros estudos também avaliaram correlações entre BaP e câncer de bexiga [126,127], câncer de pulmão [128–130] e alterações no metabolismo dos sistemas respiratório, nervoso e hepático humanos [16,131].

Chen *et al.* [132] avaliaram o metabolismo de ostras da espécie *Pinctada martensii* expostas ao BaP (poluente amplamente presente no ambiente marinho). Foi constatado que BaP na concentração de 10 µg L<sup>-1</sup> causou alterações no metabolismo energético, na regulação osmótica e na resposta imune dos micro-organismos. Foi possível estabelecer alguns metabólitos candidatos a biomarcadores de exposição, tais como arginina, treonina, glutamina,

---

<sup>9</sup> Material particulado com diâmetro aerodinâmico inferior a 2,5 µm.

leucina, isoleucina, valina, fosfocolina, malonato, acetoacetato e glicose – os quais podem ajudar a entender melhor os mecanismos de toxicidade do BaP.

A Tabela 10 resume a metodologia envolvida na determinação dos metabólitos estudados nos trabalhos descritos acima e de outros estudos relevantes envolvendo BaP e metabolômica. Embora estudos de genômica da exposição de *S. cerevisiae* ao BaP já foram relatados [52,116], ainda não há estudos que avaliaram as alterações metabólicas em *S. cerevisiae* causadas pela exposição ao BaP, o que torna o atual trabalho inédito e relevante nessa abordagem.

**Tabela 10.** Principais trabalhos de metabolômica da exposição de organismos ao BaP e suas metodologias.

Organismo	Metabólitos	Condições de exposição	Quenching/extração de metabólitos	Reagente derivatizante	Técnica analítica	Referência
<i>Bacteroidetes.p</i> , <i>Alphaproteobacteria.c</i> , <i>Chloroflexi.p</i> , <i>Patescibacteria.p</i> , <i>Actinobacteria.p</i> , <i>Ver rucomicrobia.p</i>	Carboidratos, ácidos benzoicos, ácidos orgânicos, ácidos graxos saturados, aminoácidos (238)	Plantas cultivadas em solo contendo biocarvão e contaminado com BaP 5,0 mg kg <sup>-1</sup> ; 100 dias de cultivo	Metanol/água (3:1 v/v)	Cloridrato de metoxiamina em piridina/BSTFA-TMCS	GC/TOF-MS	Xiaona Li <i>et al.</i> [121]
Células epiteliais primárias de bexiga (isolados de porcos recém abatidos)	Metabólitos de aminoácidos, lipídeos, glutathiona e de degradação de nitrogênio (mais de 200)	Células contaminadas com BaP (0,5, 5 e 10 µmol L <sup>-1</sup> ) por 6, 24 e 48 h.	Metil <i>tert</i> -butil éter/metanol (10:3, v/v); metil <i>tert</i> -butil éter/metanol/água (10:3:2,5 v/v)	Cloridrato de metoxiamina em piridina/MSTFA	GC/MS	Verma <i>et al.</i> [123]
Linhagem de células alveolares humanas do tipo II, A549	79 metabólitos de lipídeos	Células expostas a BaP 4 µmol L <sup>-1</sup> (6 h)	Mistura Clorofórmio/metanol (2:1 v/v) gelada; clorofórmio/metanol (1:1 v/v)	-	UPLC-MS/MS	Zhang <i>et al.</i> [124]
Microbiota fecal de humanos	Mais de 200 compostos orgânicos voláteis	Material fecal incubado com BaP 0,005, 0,05 e 0,5 mg mL <sup>-1</sup> (37 °C, 24 h)	-	-	SPME-GC/MS	Defois <i>et al.</i> [125]
Ostras <i>Pinctada martensii</i> adultas e saudáveis	Aminoácidos, fosfocolina, malonato, acetoacetato e glicose	Ostras expostas ao BaP (1 e 10 µg L <sup>-1</sup> ), água do mar com acetona	Metanol/clorofórmio/água (5:2:1 v/v); tampão fosfato (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> em	-	NMR	Chen <i>et al.</i> [132]

continuação

(0,001 % v/v) e água do mar pura  
3-trimetilsilil-2,2,3,3-d<sub>4</sub> propionato de sódio, pH 7,0)

Mexilhões verdes <i>P. viridis</i>	Ácidos orgânicos, aminoácidos, osmólitos orgânicos e substâncias de armazenamento de energia	Mexilhões expostos ao BaP 10 µg L <sup>-1</sup> por 7 dias; hepatopâncreas foram extraídos após o período de exposição	Metanol/clorofórmio (5:1 v/v); tampão fosfato (pH 7,0)	-	NMR	Song <i>et al.</i> [133]
Células de queratinócito humano, linhagens HaCaT WT e HaCaT AHR-KD	Aminas biogênicas, aminoácidos, acilcarnitinas, esfingomielinas e fosfatidilcolinas	Células foram expostas a BaP (0,1 a 20 µmol L <sup>-1</sup> ) por 48 h	Tampão formiato de amônio (155 mmol L <sup>-1</sup> , pH 7,4); nitrogênio líquido	Fenilisotiocianato	LC-MS/MS	Potratz <i>et al.</i> [134]

---



## 5 CONCLUSÕES

Este trabalho relatou pela primeira vez a extração de derivados alquilados de aminoácidos utilizando nanotubos de carbono magnéticos funcionalizados. Dos quatro mNTCs testados, foi constatado que o nanotubo híbrido A15E15 apresentou a melhor eficiência na extração dos derivados de aminoácidos. Empregando esse mNTC, foi possível desenvolver um procedimento que se mostrou mais eficiente na extração dos derivados de AA do que a extração líquido-líquido tradicionalmente empregada. Nesse novo procedimento, a etapa de dessorção foi otimizada e ficou comprovado que a dessorção sem aquecimento e sob agitação foi mais eficiente para a extração da maioria dos derivados de AA.

A concentração ideal de BaP para exposição de células de *S. cerevisiae* foi investigada por meio de curvas de crescimento celular na presença de diferentes concentrações do contaminante, mostrando que a concentração ideal de BaP foi de 25,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Aplicando o novo protocolo de extração desenvolvido, foi possível identificar por GC/MS 16 aminoácidos em células de *S. cerevisiae* expostas e não expostas ao contaminante ambiental BaP e ao seu solvente acetona (Sar não foi identificada) Dos aminoácidos identificados, 15 foram adequadamente quantificados em todas as amostras de extratos de leveduras. Trp não pôde ser quantificado, indicando que sua curva de calibração precisa ser repetida

O método cromatográfico empregado na determinação dos aminoácidos foi aperfeiçoado e validado por meio das figuras de mérito seletividade, linearidade e sensibilidade (LOD e LOQ). O método se mostrou seletivo para todos os 16 aminoácidos determinados. O intervalo linear apresentou ampla faixa de concentrações, de 0,004 a 50,00  $\text{mg L}^{-1}$ ;  $R^2 > 0,9397$ . Foram obtidos baixos valores de LOD, de 0,002 a 0,31  $\text{mg L}^{-1}$  e de LOQ, de 0,004 a 0,41  $\text{mg L}^{-1}$ ; esses valores foram muito inferiores aos do método anterior (LOD = 0,04 a 1,60  $\text{mg L}^{-1}$ ; LOQ = 0,08 a 2,76  $\text{mg L}^{-1}$ ), comprovando o aumento de sensibilidade conferido pela extração empregando mNTCs. As figuras de repetibilidade, precisão intermediária e recuperação não puderam ser feitas devido às restrições impostas pela COVID-19. Mas serão futuramente avaliadas.

Por fim, aplicando ANOVA e o teste de Bonferroni nas concentrações dos aminoácidos quantificados, foi possível identificar nove AA (Gly, Ser, Phe, Pro, Asn, Asp, Glu, Tyr e Leu) como capazes de diferenciar leveduras expostas e não expostas ao BaP, considerando um intervalo de confiança de 95%. Esse resultado comprovou estudos anteriores

que apontaram esses AA como potenciais candidatos a biomarcadores de diversos tipos de carcinomas. No entanto, para confirmar se esses AA são candidatos a biomarcadores universais de câncer (visto que *S. cerevisiae* é um modelo simplificado para testes *in vitro* da influência de poluentes no metabolismo carcinogênico) são necessários estudos com maior número de amostras de levedura e variedade de condições de amostragem. Além disso, também é necessária a replicação das condições deste estudo em células de mamíferos e linhagens tumorais.

Este trabalho apresentou uma contribuição para o desenvolvimento de ferramentas analíticas para a pesquisa de biomarcadores de câncer e servirá de base para estudos mais abrangentes na busca de metabólitos que sejam capazes de diagnosticar neoplasias de forma precoce, rápida, sensível e seletiva.

## REFERÊNCIAS

- [1] S.G. Villas-Boas, J. Nielsen, J. Smedsgaard, M.A.E. Hansen, U. Roessner-Tunali, *Metabolome Analysis: An Introduction*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2007.
- [2] M.G. Vander Heiden, S.Y. Lunt, T.L. Dayton, B.P. Fiske, W.J. Israelsen, K.R. Mattaini, N.I. Vokes, G. Stephanopoulos, L.C. Cantley, C.M. Metallo, J.W. Locasale, Metabolic Pathway Alterations that Support Cell Proliferation, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 76 (2011) 325–334. <https://doi.org/10.1101/sqb.2012.76.010900>.
- [3] P.O. Ljungdahl, B. Daignan-Fornier, Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*. 190 (2012) 885–929. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>.
- [4] G. Cazzanelli, F. Pereira, S. Alves, R. Francisco, L. Azevedo, P. Dias Carvalho, A. Almeida, M. Côrte-Real, M. Oliveira, C. Lucas, M. Sousa, A. Preto, The Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a Model for Understanding RAS Proteins and their Role in Human Tumorigenesis, *Cells*. 7 (2018) 14. <https://doi.org/10.3390/cells7020014>.
- [5] W. de Koning, K. van Dam, W. de Koning, K. van Dam, A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH, *Anal. Biochem.* 204 (1992) 118–123. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90149-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90149-2).
- [6] A.B. Canelas, A. Ten Pierick, C. Ras, R.M. Seifar, J.C. Van Dam, W.M. Van Gulik, J.J. Heijnen, Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7379–7389. <https://doi.org/10.1021/ac900999t>.
- [7] S. Kim, D.Y. Lee, G. Wohlgemuth, H.S. Park, O. Fiehn, K.H. Kim, Evaluation and optimization of metabolome sample preparation methods for *Saccharomyces cerevisiae*, *Anal. Chem.* 85 (2013) 2169–2176. <https://doi.org/10.1021/ac302881e>.
- [8] S.G. Villas-Bôas, J. Højer-Pedersen, M. Åkesson, J. Smedsgaard, J. Nielsen, Global metabolite analysis of yeast: Evaluation of sample preparation methods, *Yeast*. 22 (2005) 1155–1169. <https://doi.org/10.1002/yea.1308>.
- [9] K.-D. Entian, F.K. Zimmermann, I. Scheel, A partial defect in carbon catabolite repression in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with reduced hexose phosphorylation, *Mol. Gen. Genet. MGG.* 156 (1977) 99–105. <https://doi.org/10.1007/bf00272258>.

- [10] B. Gonzalez, J. François, M. Renaud, A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol, *Yeast*. 13 (1997) 1347–1355. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199711\)13:14<1347::AID-YEA176>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199711)13:14<1347::AID-YEA176>3.0.CO;2-O).
- [11] G. Larsson, M. Törnkvist, Rapid sampling, cell inactivation and evaluation of low extracellular glucose concentrations during fed-batch cultivation, *J. Biotechnol.* 49 (1996) 69–82. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(96\)01534-9](https://doi.org/10.1016/0168-1656(96)01534-9).
- [12] M.R. Mashego, W.M. Van Gulik, J.L. Vinke, J.J. Heijnen, Critical evaluation of sampling techniques for residual glucose determination in carbon-limited chemostat culture of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.* 83 (2003) 395–399. <https://doi.org/10.1002/bit.10683>.
- [13] IARC, (2020). <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/> (accessed October 15, 2020).
- [14] US EPA, (2020). <https://www.epa.gov/> (accessed October 15, 2020).
- [15] A.J. Buczyńska, B. Geypens, R. Van Grieken, K. De Wael, Stable carbon isotopic ratio measurement of polycyclic aromatic hydrocarbons as a tool for source identification and apportionment - A review of analytical methodologies, *Talanta*. 105 (2013) 435–450. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.075>.
- [16] F. Li, B. Xiang, Y. Jin, C. Li, S. Ren, Y. Wu, J. Li, Q. Luo, Hepatotoxic effects of inhalation exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons on lipid metabolism of C57BL/6 mice, *Environ. Int.* 134 (2020) 105000. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105000>.
- [17] M. V. Ruby, Y.W. Lowney, A.L. Bunge, S.M. Roberts, J.L. Gomez-Eyles, U. Ghosh, J.C. Kissel, P. Tomlinson, C. Menzie, Oral Bioavailability, Bioaccessibility, and Dermal Absorption of PAHs from Soil - State of the Science, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 2151–2164. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04110>.
- [18] C.E. Mitchell, Distribution and retention of benzo(a)pyrene in rats after inhalation, *Toxicol. Lett.* 11 (1982) 35–42. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(82\)90102-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(82)90102-3).
- [19] P. Gao, E. da Silva, L. Hou, N.D. Denslow, P. Xiang, L.Q. Ma, Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolomics perspective, *Environ. Int.* 119 (2018) 466–477. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.017>.

- [20] B. Ewa, M.Š. Danuta, Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts, *J. Appl. Genet.* 58 (2017) 321–330. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0380-3>.
- [21] A. Garrido, P. Jiménez-Guerrero, N. Ratola, Levels, trends and health concerns of atmospheric PAHs in Europe, *Atmos. Environ.* 99 (2014) 474–484. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.10.011>.
- [22] M.S.F. Caruso, J. Alaburda, Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão, *Rev. Do Inst. Adolfo Lutz* . 67 (2008) 1–27.
- [23] Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, HBM4EU - Sci. Policy a Heal. Futur. (2020). <https://www.hbm4eu.eu/the-substances/pahs/> (accessed November 2, 2020).
- [24] DIRECTIVA 98/83/CE DO CONSELHO, 1998. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:01998L0083-20151027&from=EN> (accessed November 2, 2020).
- [25] PORTARIA N.º 518, DE 25 DE MARÇO DE 2004, Ministério Da Saúde. (2004). [http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/portaria518\\_25\\_03\\_04.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/portaria518_25_03_04.pdf) (accessed November 2, 2020).
- [26] RESOLUÇÃO - RDC Nº 2, DE 15 DE JANEIRO DE 2007, Anvisa (Ministério Da Saúde). (2007). [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2007/rdc0002\\_15\\_01\\_2007.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2007/rdc0002_15_01_2007.html) (accessed November 2, 2020).
- [27] H.J. Yoo, M. Mohammadniaei, J. Min, C. Baek, Bacterial Isolation by Adsorption on Graphene Oxide from Large Volume Sample, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 20 (2020) 6975–6979. <https://doi.org/10.1166/jnn.2020.18817>.
- [28] L. Steinmetz, J. Bourquin, H. Barosova, L. Haeni, J. Caldwell, A. Milosevic, C. Geers, M. Bonmarin, P. Taladriz-Blanco, B. Rothen-Rutishauser, A. Petri-Fink, Rapid and sensitive quantification of cell-associated multi-walled carbon nanotubes, 12 (2020) 17362. <https://doi.org/10.1039/d0nr03330h>.
- [29] A.A. el-hadi Ahmed, M.A. Korany, M.M. Khalil, Electrochemical determination of verapamil hydrochloride using carbon nanotubes/TiO<sub>2</sub> nanocomposite based potentiometric sensors in surface water and urine samples, *Microchem. J.* 157 (2020) 104909. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104909>.
- [30] A.T.E. Vilian, K.S. Ranjith, S.J. Lee, S.-K. Hwang, R. Umaphathi, C.W. Oh, Y.S. Huh, Y.-K. Han, Controllable synthesis of bottlebrush-like ZnO nanowires decorated on

- carbon nanofibers as an efficient electrocatalyst for the highly sensitive detection of silymarin in biological samples, *Sensors Actuators B Chem.* 321 (2020) 128544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128544>.
- [31] Ł. Janus, J. Radwan-Pragłowska, M. Piątkowski, D. Bogdał, Facile Synthesis of Surface-Modified Carbon Quantum Dots (CQDs) for Biosensing and Bioimaging, *Materials (Basel)*. 13 (2020) 3313. <https://doi.org/10.3390/ma13153313>.
- [32] Y. Liu, C. An, R. Zhang, J. Du, X. Wang, X. Du, Modulating the selectivity of solid-phase microextraction fibers based on morphological, compositional, and size-dependent control of bimetallic oxide nanostructures grown on nickel-titanium alloy substrates, *Microchim. Acta.* 187 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04481-7>.
- [33] J. Qiu, T. Zhang, F. Wang, F. Zhu, G. Ouyang, Sheathed in situ heteroepitaxial growth metal-organic framework probe for detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in river water and living fish, *Sci. Total Environ.* 729 (2020) 138971. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138971>.
- [34] M. Ghorbani, M. Aghamohammadhassan, H. Ghorbani, A. Zabihi, Trends in sorbent development for dispersive micro-solid phase extraction, *Microchem. J.* 158 (2020) 105250. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105250>.
- [35] E. Kanao, T. Kubo, K. Otsuka, Carbon-based nanomaterials for separation media, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 93 (2020) 482–489. <https://doi.org/10.1246/BCSJ.20190372>.
- [36] N. Manousi, E. Rosenberg, E.A. Deliyanni, G.A. Zachariadis, Sample Preparation Using Graphene-Oxide-Derived Nanomaterials for the Extraction of Metals, *Molecules*. 25 (2020) 2411. <https://doi.org/10.3390/molecules25102411>.
- [37] E. González-García, M.L. Marina, M.C. García, Nanomaterials in Protein Sample Preparation, *Sep. Purif. Rev.* 49 (2020) 229–264. <https://doi.org/10.1080/15422119.2019.1581216>.
- [38] M. Singh, S. Singh, S.P. Singh, S.S. Patel, Recent advancement of carbon nanomaterials engrained molecular imprinted polymer for environmental matrix, *Trends Environ. Anal. Chem.* 27 (2020) e00092. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.teac.2020.e00092>.
- [39] H. Liu, H. Qiu, Recent advances of 3D graphene-based adsorbents for sample preparation of water pollutants: A review, *Chem. Eng. J.* 393 (2020) 124691. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124691>.
- [40] S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature*. 354 (1991) 56–58.

<https://doi.org/10.1038/354056a0>.

- [41] E.T. Thostenson, Z. Ren, T.-W. Chou, Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review, n.d. [www.elsevier.com/locate/compscitech](http://www.elsevier.com/locate/compscitech) (accessed October 16, 2020).
- [42] A.D. Purceno, B.F. Machado, A.P.C. Teixeira, T. V. Medeiros, A. Benyounes, J. Beausoleil, H.C. Menezes, Z.L. Cardeal, R.M. Lago, P. Serp, Magnetic amphiphilic hybrid carbon nanotubes containing N-doped and undoped sections: Powerful tensioactive nanostructures, *Nanoscale*. 7 (2015) 294–300. <https://doi.org/10.1039/c4nr04005h>.
- [43] C.H. Collins, G.L. Braga, P.S. Bonato, *Fundamentos de Cromatografia*, Editora Unicamp, Campinas, 2006.
- [44] A. Hranilovic, J.M. Gambetta, D.W. Jeffery, P.R. Grbin, V. Jiranek, Lower-alcohol wines produced by *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentations: The effect of sequential inoculation timing, *Int. J. Food Microbiol.* 329 (2020) 108651. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108651>.
- [45] E. Coelho, M. Azevedo, J.A. Teixeira, T. Tavares, J.M. Oliveira, L. Domingues, Evaluation of multi-starter *S. cerevisiae*/ *D. bruxellensis* cultures for mimicking and accelerating transformations occurring during barrel ageing of beer, *Food Chem.* 323 (2020) 126826. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126826>.
- [46] G. Yan, B. Zhang, L. Joseph, A.L. Waterhouse, Effects of initial oxygenation on chemical and aromatic composition of wine in mixed starters of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Microbiol.* 90 (2020) 103460. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103460>.
- [47] Z. Alves, A. Melo, A.R. Figueiredo, M.A. Coimbra, A.C. Gomes, S.M. Rocha, Exploring the *Saccharomyces cerevisiae* volatile metabolome: Indigenous versus commercial strains, *PLoS One*. 10 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143641>.
- [48] M. Heitmann, E. Zannini, C. Axel, E. Arendt, Correlation of Flavor Profile to Sensory Analysis of Bread Produced with Different *Saccharomyces cerevisiae* Originating from the Baking and Beverage Industry, *Cereal Chem. J.* 94 (2017) 746–751. <https://doi.org/10.1094/cchem-03-17-0044-r>.
- [49] Z. Xia, X. Zhou, J. Li, L. Li, Y. Ma, Y. Wu, Z. Huang, X. Li, P. Xu, M. Xue, Multiple-omics techniques reveal the role of glycerophospholipid metabolic pathway in the response of *Saccharomyces cerevisiae* against hypoxic stress, *Front. Microbiol.* 10 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01398>.

- [50] P. Kumar Babele, Zinc oxide nanoparticles impose metabolic toxicity by de-regulating proteome and metabolome in *Saccharomyces cerevisiae*, *Toxicol. Reports*. 6 (2019) 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.12.001>.
- [51] A. Pupo, K.M. Ku, J.E.G. Gallagher, Effects of MCHM on yeast metabolism, *PLoS One*. 14 (2019) e0223909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223909>.
- [52] H.J. Lee, M.B. Gu, Effect of benzo[a]pyrene on genes related to the cell cycle and cytochrome P450 of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 13 (2003) 624–627.
- [53] A. Goffeau, G. Barrell, H. Bussey, R.W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J.D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E.J. Louis, H.W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, S.G. Oliver, Life with 6000 genes, *Science* (80-. ). 274 (1996) 546–567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>.
- [54] R.M. Callejon, A. Clavijo, P. Ortigueira, A.M. Troncoso, P. Paneque, M.L. Morales, Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains, *Anal. Chim. Acta*. 660 (2010) 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.09.040>.
- [55] A.G. Cordente, C.D. Curtin, C. Varela, I.S. Pretorius, Flavour-active wine yeasts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 (2012) 601–618. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4370-z>.
- [56] I. Blazquez Rojas, P.A. Smith, E.J. Bartowsky, Influence of choice of yeasts on volatile fermentation-derived compounds, colour and phenolics composition in Cabernet Sauvignon wine, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28 (2012) 3311–3321. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1142-y>.
- [57] S.P.H. Azambuja, G.S. Teixeira, M.G.S. Andrietta, P.C. Torres-Mayanga, T. Forster-Carneiro, C.A. Rosa, R. Goldbeck, Analysis of metabolite profiles of *Saccharomyces cerevisiae* strains suitable for butanol production, *FEMS Microbiol. Lett.* 366 (2019). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz164>.
- [58] C. Petitgonnet, G.L. Klein, C. Roullier-Gall, P. Schmitt-Kopplin, B. Quintanilla-Casas, S. Vichi, D. Julien-David, H. Alexandre, Influence of cell-cell contact between *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* on yeast interactions and the exo-metabolome, *Food Microbiol.* 83 (2019) 122–133. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.005>.
- [59] H. Lu, F. Li, B.J. Sánchez, Z. Zhu, G. Li, I. Domenzain, S. Marcišauskas, P.M. Anton, D. Lappa, C. Lieven, M.E. Beber, N. Sonnenschein, E.J. Kerkhoven, J. Nielsen, A consensus *S. cerevisiae* metabolic model Yeast8 and its ecosystem for comprehensively probing cellular metabolism, *Nat. Commun.* 10 (2019) 3586.



<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11581-3>.

- [60] H.C.T. Veras, C.G. Campos, I.F. Nascimento, P. V Abdelnur, J.R.M. Almeida, N.S. Parachin, Metabolic flux analysis for metabolome data validation of naturally xylose-fermenting yeasts, *BMC Biotechnol.* 19 (2019) 58. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0548-0>.
- [61] A. Bhat, R. Chakraborty, K. Adlakha, G. Agam, K. Chakraborty, S. Sengupta, Ncl1-mediated metabolic rewiring critical during metabolic stress, *Life Sci. Alliance.* 2 (2019) e201900360. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900360>.
- [62] J. Dahlin, C. Holkenbrink, E.R. Marella, G. Wang, U. Liebal, C. Lieven, D. Weber, D. McCloskey, B.E. Ebert, M.J. Herrgård, L.M. Blank, I. Borodina, Multi-omics analysis of fatty alcohol production in engineered yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *yarrowia lipolytica*, *Front. Genet.* 10 (2019) 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00747>.
- [63] J. ul Hassan, I. Kaleem, A. Rasool, K. Xu, R. Adnan Tahir, B. Lv, C. Li, Engineered *Saccharomyces cerevisiae* for the de novo synthesis of the aroma compound longifolene, *Chem. Eng. Sci.* 226 (2020) 115799. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ces.2020.115799>.
- [64] T. Yukawa, T. Bamba, G. Guirimand, M. Matsuda, T. Hasunuma, A. Kondo, Optimization of 1,2,4-butanetriol production from xylose in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of NADH/NADPH balance, *Biotechnol. Bioeng.* (2020) bit.27560. <https://doi.org/10.1002/bit.27560>.
- [65] H. Liu, Y. Tian, Y. Zhou, Y. Kan, T. Wu, W. Xiao, Y. Luo, Multi-modular engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-titre production of tyrosol and salidroside, *Microb. Biotechnol.* (2020) 1751-7915.13667. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13667>.
- [66] M.A. Johnson, S. Vidoni, R. Durigon, S.F. Pearce, J. Rorbach, J. He, G. Brea-Calvo, M. Minczuk, A. Reyes, I.J. Holt, A. Spinazzola, Amino Acid Starvation Has Opposite Effects on Mitochondrial and Cytosolic Protein Synthesis, *PLoS One.* 9 (2014) e93597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093597>.
- [67] K. Tian, Y. Wang, L. Li, Y. Liu, Neuronal death/apoptosis induced by intracellular zinc deficiency associated with changes in amino-acid neurotransmitters and glutamate receptor subtypes, *J. Inorg. Biochem.* 179 (2018) 54–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.11.014>.
- [68] H. Kaspar, K. Dettmer, W. Gronwald, P.J. Oefner, Advances in amino acid analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 445–452. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2421-1>.

- [69] P. Hušek, Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 717 (1998) 57–91. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00136-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00136-4).
- [70] P. Husek, P. Simek, Alkyl Chloroformates in Sample Derivatization Strategies for GC Analysis. Review on a Decade Use of the Reagents as Esterifying Agents, *Curr. Pharm. Anal.* 2 (2006) 23–43. <https://doi.org/10.2174/157341206775474007>.
- [71] A. De Luca, A. Küster, I. Tea, D. Darmaun, J.-C. Rozé, R. Robins, R. Hankard, Plasma amino acid pools in the umbilical cord artery show lower <sup>15</sup>N natural isotope abundance relative to the maternal venous pools, *Isotopes Environ. Health Stud.* (2020) 1–8. <https://doi.org/10.1080/10256016.2020.1817914>.
- [72] S. Erarpat, S. Bodur, E. Öztürk Er, S. Bakırdere, Combination of ultrasound-assisted ethyl chloroformate derivatization and switchable solvent liquid-phase microextraction for the sensitive determination of <sc>l</sc>-methionine in human plasma by GC–MS, *J. Sep. Sci.* 43 (2020) 1100–1106. <https://doi.org/10.1002/jssc.201901078>.
- [73] D. Van Harskamp, S.F. Garrelfs, M.J.S. Oosterveld, J.W. Groothoff, J.B. Van Goudoever, H. Schierbeek, Development and Validation of a New Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for the Measurement of Enrichment of Glyoxylate Metabolism Analytes in Hyperoxaluria Patients Using a Stable Isotope Procedure, *Anal. Chem.* 92 (2020) 1826–1832. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03670>.
- [74] E. Hanff, S. Ruben, M. Kreuzer, A. Bollenbach, A.A. Kayacelebi, A.M. Das, F. Von Versen-Höyneck, C. Von Kaisenberg, D. Haffner, S. Ückert, D. Tsikas, Development and validation of GC–MS methods for the comprehensive analysis of amino acids in plasma and urine and applications to the HELLP syndrome and pediatric kidney transplantation: evidence of altered methylation, transamidation, and arginase acti, *Amino Acids.* 51 (2019) 529–547. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-02688-w>.
- [75] Jing Wang, S.M. Liu, J. Long, D.A. Lei, F. Gao, Derivatization Method for the Determination of Amino Acids in Tobacco by Gas Chromatography–mass Spectrometry, *J. Anal. Chem.* 75 (2020) 1046–1053. <https://doi.org/10.1134/S1061934820080171>.
- [76] O. Mykhailenko, L. Ivanauskas, I. Bezruk, R. Lesyk, V. Georgiyants, Comparative Investigation of Amino Acids Content in the Dry Extracts of *Juno bucharica*, *Gladiolus Hybrid Zefir*, *Iris Hungarica*, *Iris Variegata* and *Crocus Sativus* Raw Materials of Ukrainian Flora, *Sci. Pharm.* 88 (2020) 8. <https://doi.org/10.3390/scipharm88010008>.
- [77] P. Martín Santos, M. del Nogal Sánchez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Non-separative method based on a single quadrupole mass spectrometer for the semi-quantitative determination of amino acids in saliva samples. A preliminary study, *Talanta.* 208 (2020) 120381. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120381>.

- [78] K. Trošt, L. Ahonen, T. Suviavaara, N. Christiansen, T. Nielsen, M. Thiele, S. Jacobsen, A. Krag, P. Rossing, T. Hansen, L.O. Dragsted, C. Legido-Quigley, Describing the fecal metabolome in cryogenically collected samples from healthy participants, *Sci. Rep.* 10 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57888-w>.
- [79] A. Pautova, Z. Khesina, M. Getsina, P. Sobolev, A. Revelsky, N. Beloborodova, Determination of Tryptophan Metabolites in Serum and Cerebrospinal Fluid Samples Using Microextraction by Packed Sorbent, Silylation and GC–MS Detection, *Molecules*. 25 (2020) 3258. <https://doi.org/10.3390/molecules25143258>.
- [80] A.G. Cordente, S. Schmidt, G. Beltran, M.J. Torija, C.D. Curtin, Harnessing yeast metabolism of aromatic amino acids for fermented beverage bioflavouring and bioproduction, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (2019) 4325–4336. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09840-w>.
- [81] F. Casu, F.R. Pinu, E. Stefanello, D.R. Greenwood, S.G. Villas-Bôas, The fate of linoleic acid on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism under aerobic and anaerobic conditions, *Metabolomics*. 14 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1399-8>.
- [82] S. Procopio, D. Krause, T. Hofmann, T. Becker, Significant amino acids in aroma compound profiling during yeast fermentation analyzed by PLS regression, *LWT - Food Sci. Technol.* 51 (2013) 423–432. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.022>.
- [83] F.R. Pinu, P.J.B. Edwards, R.C. Gardner, S.G. Villas-Boas, Nitrogen and carbon assimilation by *Saccharomyces cerevisiae* during Sauvignon blanc juice fermentation, *FEMS Yeast Res.* 14 (2014) 1206–1222. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12222>.
- [84] H. Li, M.L. Ma, S. Luo, R.M. Zhang, P. Han, W. Hu, Metabolic responses to ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* using a gas chromatography tandem mass spectrometry-based metabolomics approach, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (2012) 1087–1096. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.03.017>.
- [85] D. Hanahan, R.A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*, Elsevier, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- [86] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell*. 144 (2011) 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [87] A. Zhang, H. Sun, X. Wang, Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for disease: A systematic review, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 1239–1245. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6117-1>.

- [88] B. Yuan, S. Schaffner, Q. Tang, M. Scheffler, J. Nees, J. Heil, S. Schott, M. Golatta, M. Wallwiener, C. Sohn, T. Koal, B. Wolf, A. Schneeweiß, B. Burwinkel, A plasma metabolite panel as biomarkers for early primary breast cancer detection, *Int. J. Cancer*. 144 (2019) 2833–2842. <https://doi.org/10.1002/ijc.31996>.
- [89] J.M. Batista, M.J. Neves, A.G. Pereira, L.S. Gonçalves, H.C. Menezes, Z.L. Cardeal, Metabolomic studies of amino acid analysis in *Saccharomyces* cells exposed to selenium and gamma irradiation, *Anal. Biochem.* 597 (2020) 113666. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113666>.
- [90] V. Vsiansky, M. Svobodova, J. Gumulec, N. Cernei, D. Sterbova, O. Zitka, R. Kostrica, P. Smilek, J. Plzak, J. Betka, D. Kalfert, M. Masarik, M. Raudenska, Prognostic Significance of Serum Free Amino Acids in Head and Neck Cancers, *Cells*. 8 (2019) 428. <https://doi.org/10.3390/cells8050428>.
- [91] M. Cala, J. Aldana, J. Sánchez, J. Guio, R.J.W. Meesters, Urinary metabolite and lipid alterations in Colombian Hispanic women with breast cancer: A pilot study, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 152 (2018) 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.009>.
- [92] A. Synakiewicz, M. Sawicka-Zukowska, N. Adrianowska, G. Galezowska, J. Ratajczyk, A. Owczarzak, L. Konieczna, T. Stachowicz-Stencel, Amino acid profiles as potential biomarkers for pediatric cancers: A preliminary communication, *Biomark. Med.* 11 (2017) 619–627. <https://doi.org/10.2217/bmm-2017-0102>.
- [93] E. Simińska, M. Koba, Amino acid profiling as a method of discovering biomarkers for early diagnosis of cancer, *Amino Acids*. 48 (2016) 1339–1345. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2215-2>.
- [94] S. Mazurek, Pyruvate kinase type M2: A key regulator of the metabolic budget system in tumor cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43 (2011) 969–980. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.02.005>.
- [95] J. Maeda, M. Higashiyama, A. Imaizumi, T. Nakayama, H. Yamamoto, T. Daimon, M. Yamakado, F. Imamura, K. Kodama, Possibility of multivariate function composed of plasma amino acid profiles as a novel screening index for non-small cell lung cancer: a case control study, *BMC Cancer*. 10 (2010) 690. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-690>.
- [96] M. Suzuki, S. Nishiumi, A. Matsubara, T. Azuma, M. Yoshida, Metabolome analysis for discovering biomarkers of gastroenterological cancer, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 966 (2014) 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.02.042>.
- [97] N. Iwahashi, Y. Inai, S. Minakata, S. Sakurai, S. Manabe, Y. Ito, K. Ino, Y. Ihara,

- C-Mannosyl tryptophan increases in the plasma of patients with ovarian cancer, *Oncol. Lett.* (2019). <https://doi.org/10.3892/ol.2019.11161>.
- [98] L. Hu, Y. Gao, Y. Cao, Y. Zhang, M. Xu, Y. Wang, Y. Jing, S. Guo, F. Jing, X. Hu, Z. Zhu, Identification of arginine and its “Downstream” molecules as potential markers of breast cancer, *IUBMB Life*. 68 (2016) 817–822. <https://doi.org/10.1002/iub.1557>.
- [99] A.P. Khan, T.M. Rajendiran, B. Ateeq, I.A. Asangani, J.N. Athanikar, A.K. Yocum, R. Mehra, J. Siddiqui, G. Palapattu, J.T. Wei, G. Michailidis, A. Sreekumar, A.M. Chinnaiyan, The role of sarcosine metabolism in prostate cancer progression, *Neoplasia (United States)*. 15 (2013) 491–501. <https://doi.org/10.1593/neo.13314>.
- [100] A. Sreekumar, L.M. Poisson, T.M. Rajendiran, A.P. Khan, Q. Cao, J. Yu, B. Laxman, R. Mehra, R.J. Lonigro, Y. Li, M.K. Nyati, A. Ahsan, S. Kalyana-Sundaram, B. Han, X. Cao, J. Byun, G.S. Omenn, D. Ghosh, S. Pennathur, D.C. Alexander, A. Berger, J.R. Shuster, J.T. Wei, S. Varambally, C. Beecher, A.M. Chinnaiyan, Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression, *Nature*. 457 (2009) 910–914. <https://doi.org/10.1038/nature07762>.
- [101] N. Cernei, Z. Heger, J. Gumulec, O. Zitka, M. Masarik, P. Babula, T. Eckschlager, M. Stiborova, R. Kizek, V. Adam, Sarcosine as a Potential Prostate Cancer Biomarker—A Review, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 13893–13908. <https://doi.org/10.3390/ijms140713893>.
- [102] D. Uhlirova, M. Stankova, M. Docekalova, B. Hosnedlova, M. Kepinska, B. Ruttkay-Nedecky, J. Ruzicka, C. Fernandez, H. Milnerowicz, R. Kizek, A Rapid Method for the Detection of Sarcosine Using SPIONs/Au/CS/SOX/NPs for Prostate Cancer Sensing, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 3722. <https://doi.org/10.3390/ijms19123722>.
- [103] K.K. Pasikanti, K. Esuvaranathan, P.C. Ho, R. Mahendran, R. Kamaraj, Q.H. Wu, E. Chiong, E.C.Y. Chan, Noninvasive urinary metabonomic diagnosis of human bladder cancer, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 2988–2995. <https://doi.org/10.1021/pr901173v>.
- [104] S. Nishiumi, M. Shinohara, A. Ikeda, T. Yoshie, N. Hatano, S. Kakuyama, S. Mizuno, T. Sanuki, H. Kutsumi, E. Fukusaki, T. Azuma, T. Takenawa, M. Yoshida, Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer, *Metabolomics*. 6 (2010) 518–528. <https://doi.org/10.1007/s11306-010-0224-9>.
- [105] R.R. dos Santos, Extração de Cocaína e Benzoilecgonina de Leite Materno com Nanotubos de Carbono Magnéticos e Determinação por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas, UFMG, 2016.
- [106] V. Lushchak, H. Semchyshyn, O. Lushchak, S. Mandryk, Diethyldithiocarbamate

- inhibits in vivo Cu,Zn-superoxide dismutase and perturbs free radical processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 (2005) 1739–1744. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.147>.
- [107] K. Dettmer, A.P. Stevens, S.R. Fagerer, H. Kaspar, P.J. Oefner, *Amino Acid Analysis*, 828 (2012). <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-445-2>.
- [108] R.A.G. Haro, *Novo método para determinação de poluentes orgânicos persistentes (POPs) em água usando DI-SPMEGC/MS e estudo de remediação com eficientes nanomateriais*, UFMG, 2018.
- [109] T. Belin, F. Epron, *Characterization methods of carbon nanotubes: A review*, *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* 119 (2005) 105–118. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2005.02.046>.
- [110] S.A. Alexandre, *Dispersão de nanotubos de carbono e nanocristais de celulose em diferentes quitosanas: estudos das suspensões e propriedades de nanocompósitos poliméricos*, UFMG, 2015.
- [111] *The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd ed., Eurachem, 2014. <https://doi.org/978-91-87461-59-0>.
- [112] R.H. Allen, S.P. Stabler, J. Lindenbaum, Serum betaine, N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism, *Metabolism*. 42 (1993) 1448–1460. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(93\)90198-W](https://doi.org/10.1016/0026-0495(93)90198-W).
- [113] G. Dyrda, E. Boniewska-Bernacka, D. Man, K. Barchiewicz, R. Słota, The effect of organic solvents on selected microorganisms and model liposome membrane, *Mol. Biol. Rep.* 46 (2019) 3225–3232. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04782-y>.
- [114] W. Dduntze, D. Neumann, W. Atzpodien, H. Holzer, J.M. Gancedo, *Studies on the Regulation and Localization of the Glyoxylate Cycle Enzymes in Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.* 10 (1969) 83–89. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00658.x>.
- [115] H.L. KORNBERG, H.A. KREBS, *Synthesis of Cell Constituents from C2-Units by a Modified Tricarboxylic Acid Cycle*, *Nature*. 179 (1957) 988–991. <https://doi.org/10.1038/179988a0>.
- [116] S.T.F. O'Connor, J. Lan, M. North, A. Loguinov, L. Zhang, M.T. Smith, A.Z. Gu, C.

Vulpe, Genome-wide functional and stress response profiling reveals toxic mechanism and genes required for tolerance to benzo[a]pyrene in *S. cerevisiae*, *Front. Genet.* 3 (2013) 316. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00316>.

- [117] Y. Miyagi, M. Higashiyama, A. Gochi, M. Akaike, T. Ishikawa, T. Miura, N. Saruki, E. Bando, H. Kimura, F. Imamura, M. Moriyama, I. Ikeda, A. Chiba, F. Oshita, A. Imaizumi, H. Yamamoto, H. Miyano, K. Horimoto, O. Tochikubo, T. Mitsushima, M. Yamakado, N. Okamoto, Plasma Free Amino Acid Profiling of Five Types of Cancer Patients and Its Application for Early Detection, *PLoS One.* 6 (2011) e24143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024143>.
- [118] H.J. Kim, S.H. Jang, J.S. Ryu, J.E. Lee, Y.C. Kim, M.K. Lee, T.W. Jang, S.Y. Lee, H. Nakamura, N. Nishikata, M. Mori, Y. Noguchi, H. Miyano, K.Y. Lee, The performance of a novel amino acid multivariate index for detecting lung cancer: A case control study in Korea, *Lung Cancer.* 90 (2015) 522–527. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.10.006>.
- [119] E.R. Kasala, L.N. Bodduluru, C.C. Barua, C.S. Sriram, R. Gogoi, Benzo(a)pyrene induced lung cancer: Role of dietary phytochemicals in chemoprevention, *Pharmacol. Reports.* 67 (2015) 996–1009. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.03.004>.
- [120] K. Widziewicz, W. Rogula-Kozłowska, G. Majewski, Lung Cancer Risk Associated with Exposure to Benzo(A)Pyrene in Polish Agglomerations, Cities, and Other Areas, *Int. J. Environ. Res.* 11 (2017) 685–693. <https://doi.org/10.1007/s41742-017-0061-z>.
- [121] X. Li, Y. Song, Y. Bian, C. Gu, X. Yang, F. Wang, X. Jiang, Insights into the mechanisms underlying efficient Rhizodegradation of PAHs in biochar-amended soil: From microbial communities to soil metabolomics, *Environ. Int.* 144 (2020) 105995. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105995>.
- [122] X. Li, C. Qu, Y. Bian, C. Gu, X. Jiang, Y. Song, New insights into the responses of soil microorganisms to polycyclic aromatic hydrocarbon stress by combining enzyme activity and sequencing analysis with metabolomics, *Environ. Pollut.* 255 (2019) 113312. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113312>.
- [123] N. Verma, M. Pink, C. Kersch, A.W. Rettenmeier, S. Schmitz-Spanke, Benzo[a]pyrene mediated time- and dose-dependent alteration in cellular metabolism of primary pig bladder cells with emphasis on proline cycling, *Arch. Toxicol.* 93 (2019) 2593–2602. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02521-7>.
- [124] S.Y. Zhang, D. Shao, H. Liu, J. Feng, B. Feng, X. Song, Q. Zhao, M. Chu, C. Jiang, W. Huang, X. Wang, Metabolomics analysis reveals that benzo[a]pyrene, a component of PM2.5, promotes pulmonary injury by modifying lipid metabolism in a phospholipase A2-dependent manner in vivo and in vitro, *Redox Biol.* 13 (2017) 459–469.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.001>.

- [125] C. Defois, J. Ratel, S. Denis, B. Batut, R. Beugnot, E. Peyretailade, E. Engel, P. Peyret, Environmental Pollutant Benzo[a]Pyrene Impacts the Volatile Metabolome and Transcriptome of the Human Gut Microbiota, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1562. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01562>.
- [126] N. Verma, M. Pink, S. Boland, A.W. Rettenmeier, S. Schmitz-Spanke, Benzo[a]pyrene-induced metabolic shift from glycolysis to pentose phosphate pathway in the human bladder cancer cell line RT4, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09936-1>.
- [127] F. Jin, J. Thaiparambil, S.R. Donepudi, V. Vantaku, D.W.B. Piyarathna, S. Maity, R. Krishnapuram, V. Putluri, F. Gu, P. Purwaha, S.K. Bhowmik, C.R. Ambati, F.C. Von Rundstedt, F. Roghmann, S. Berg, J. Noldus, K. Rajapakshe, D. Godde, S. Roth, S. Storkel, S. Degener, G. Michailidis, B.A. Kaipparattu, B. Karanam, M.K. Terris, S.M. Kavuri, S.P. Lerner, F. Kheradmand, C. Coarfa, A. Sreekumar, Y. Lotan, R. El-Zein, N. Putluri, Tobacco-specific carcinogens induce hypermethylation, DNA adducts, and DNA damage in bladder cancer, *Cancer Prev. Res.* 10 (2017) 588–597. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-17-0198>.
- [128] P. Lin, Y.R. Chen, C.Y. Chen, Y.T. Chang, J.S. Chen, M.H. Tsai, C.C. Kuo, H.L. Lee, Changes of serum amino acid profiles by an epidermal growth factor receptor mutation and benzo[*a*] pyrene in mouse lung tumorigenesis, *Toxicol. Res. (Camb)*. 5 (2016) 1182–1192. <https://doi.org/10.1039/c6tx00010j>.
- [129] D. Hoffmann, I. Hoffmann, K. El-Bayoumy, The less harmful cigarette: A controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 767–790. <https://doi.org/10.1021/tx000260u>.
- [130] M.R. Smith, D.I. Walker, K. Uppal, M.J. Utell, P.K. Hopke, T.M. Mallon, P.L. Krahl, P. Rohrbeck, Y.-M. Go, D.P. Jones, Benzo[a]pyrene Perturbs Mitochondrial and Amino Acid Metabolism in Lung Epithelial Cells and Has Similar Correlations With Metabolic Changes in Human Serum, *J. Occup. Environ. Med.* 61 (2019) S73–S81. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000001687>.
- [131] S.N. Sarma, L.E. Kimpe, V.C. Doyon, J.M. Blais, H.M. Chan, A metabolomics study on effects of polyaromatic compounds in oil sand extracts on the respiratory, hepatic and nervous systems using three human cell lines, *Environ. Res.* 178 (2019) 108680. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108680>.
- [132] H. Chen, X. Diao, H. Wang, H. Zhou, An integrated metabolomic and proteomic study of toxic effects of Benzo[a]pyrene on gills of the pearl oyster *Pinctada martensii*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156 (2018) 330–336.



<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.040>.

- [133] Q. Song, H. Zhou, Q. Han, X. Diao, Toxic responses of *Perna viridis* hepatopancreas exposed to DDT, benzo(a)pyrene and their mixture uncovered by iTRAQ-based proteomics and NMR-based metabolomics, *Aquat. Toxicol.* 192 (2017) 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.010>.
- [134] S. Potratz, H. Jungnickel, S. Grabiger, P. Tarnow, W. Otto, E. Fritsche, M. von Bergen, A. Luch, Differential cellular metabolite alterations in HaCaT cells caused by exposure to the aryl hydrocarbon receptor-binding polycyclic aromatic hydrocarbons chrysene, benzo[a]pyrene and dibenzo[a,l]pyrene, *Toxicol. Reports.* 3 (2016) 763–773. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.09.003>.

## APÊNDICE

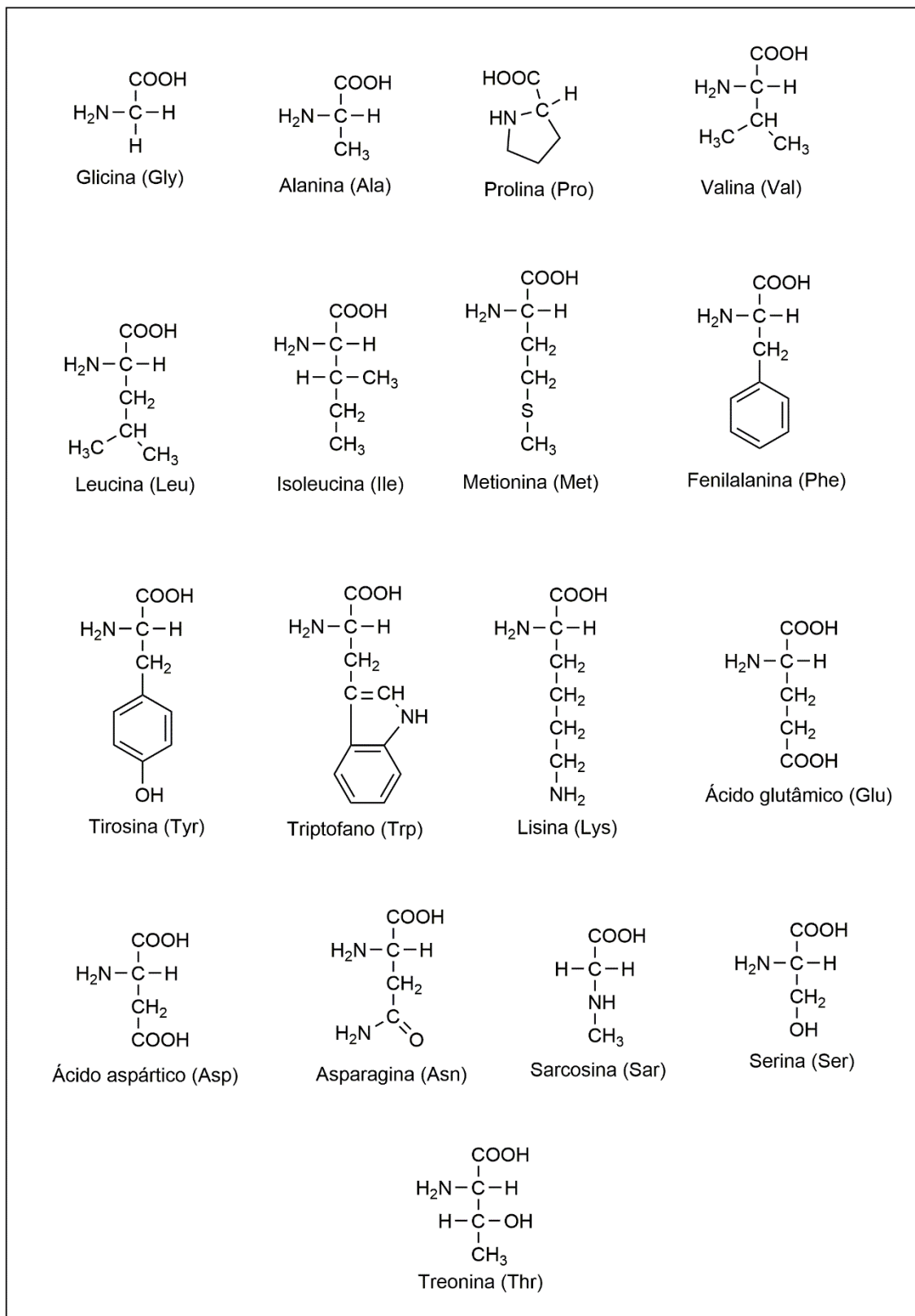
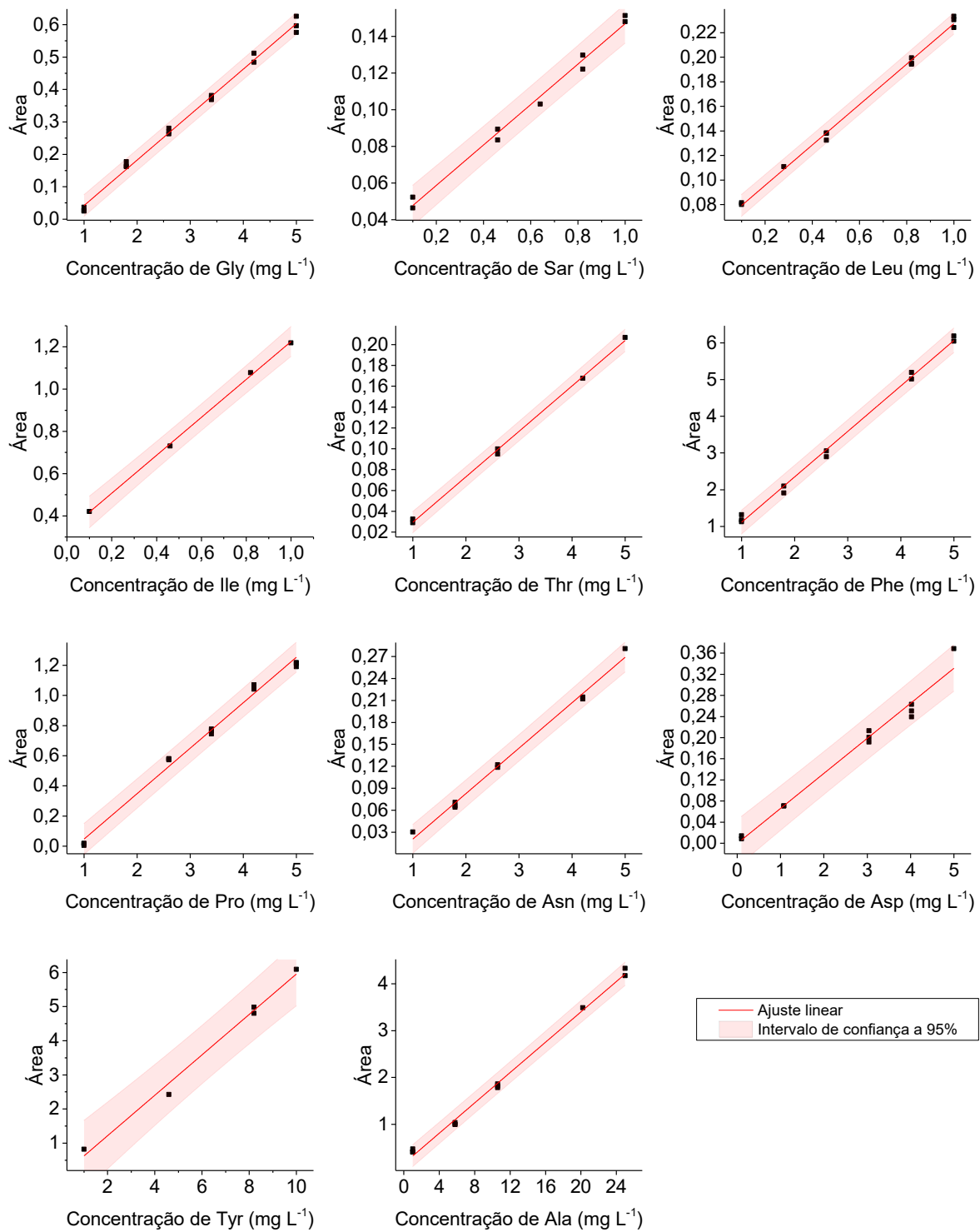
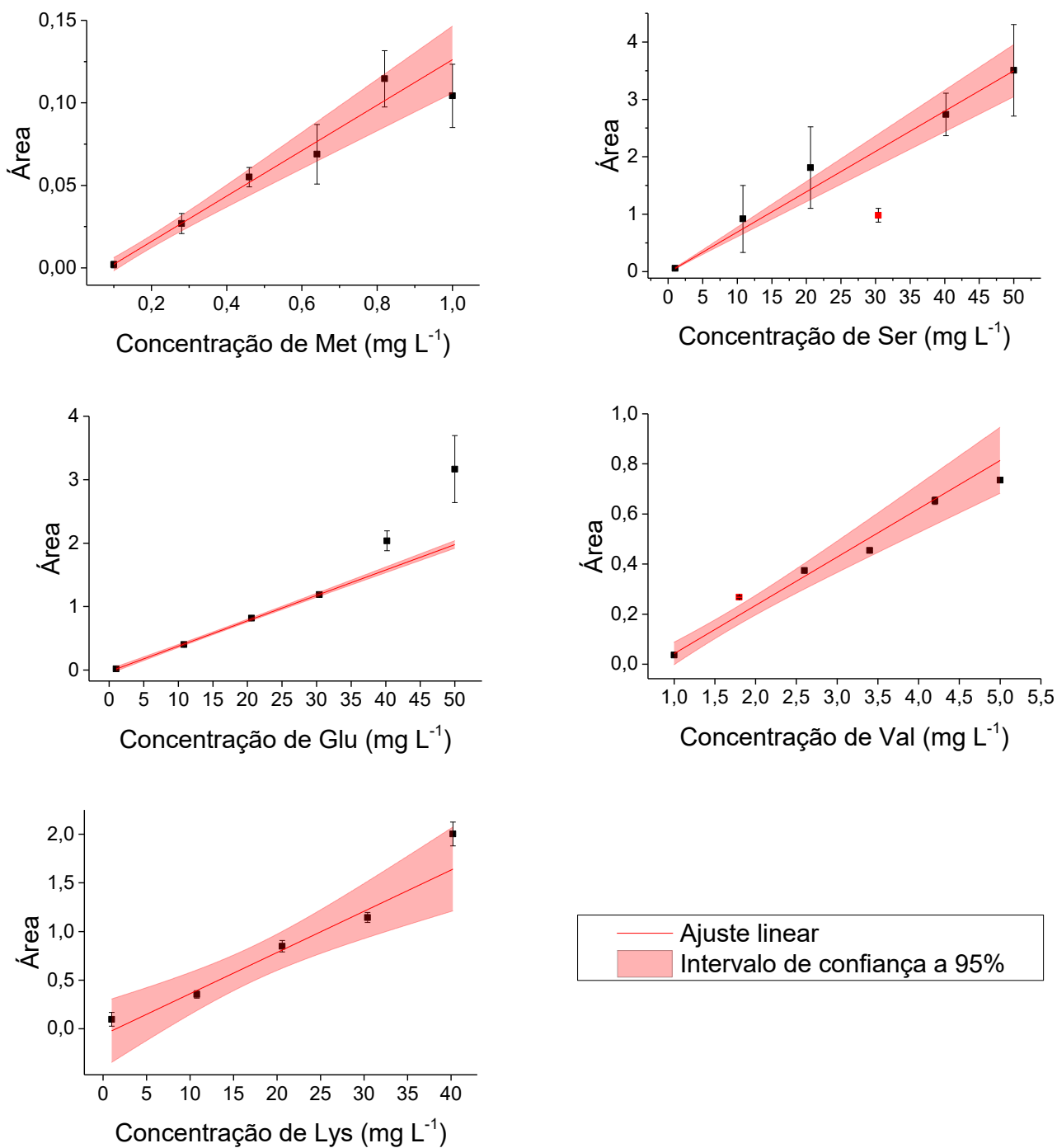


Figura 18. Estruturas dos 17 aminoácidos envolvidos neste trabalho.



**Figura 19.** Curvas de calibração dos derivados de aminoácidos determinados por GC/MS que se adequaram à regressão linear por MQO.



**Figura 20.** Curvas de calibração dos derivados de aminoácidos determinados por GC/MS que se adequaram à regressão linear por MQP.