



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Dissertação de Mestrado

WYLLIAN FRANZ DOS SANTOS OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE COVs
EXALADOS DO PELO DE CÃES INFECTADOS COM *Leishmania*
sp. POR MEIO DA TÉCNICA TD-GC-FID**

Salvador-BA

2016

WYLLIAN FRANZ DOS SANTOS OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE COVs
EXALADOS DO PELO DE CÃES INFECTADOS COM *Leishmania*
sp. POR MEIO DA TÉCNICA TD-GC-FID**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade

Salvador-BA

2016

Sistema de Bibliotecas/IQ - UFBA

Oliveira, Wyllian Franz dos Santos.

Desenvolvimento de método para extração de COVs exalados do pelo de cães infectados com *Leishmania* sp. por meio da técnica TD-GC-FID / Wyllian Franz dos Santos Oliveira – 2016

95 f. : il.

Orientador. Prof. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química, Salvador, 2015.

1. Leishmaniose visceral – Cão. 2. Compostos orgânicos voláteis. 3. Extração (Química). 4. Quimiometria. 5. Análise cromatográfica. I. Andrade, Jailson Bittencourt de. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. III. Título.

CDD – 614.534

CDU – 543.544.3


TERMO DE APROVAÇÃO

WYLLIAN FRANZ DOS SANTOS OLIVEIRA

“DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE CÔV_s EXALADOS DO PELO DE CÃES INFECTADOS COM *Leishmania sp.* POR MEIO DA TÉCNICA TD-GC-FID”

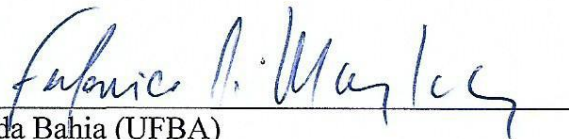
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade




Doutorado em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Frederico de Medeiros Rodrigues



Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Faculdade Maria Milza

Prof^a. Dr^a. Vânia Palmeira Campos



Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 12 de agosto de 2016.

À minha família:

Minha mãe, minha primeira educadora.

Meu pai pelas palavras de ânimo.

Minhas irmãs, as mulheres da minha vida.

“When a thing was new, people said,

‘It is not true’.

Later, when the truth became obvious, people said,

‘Anyway, it is not important’

And when its importance could not be denied, people said,

‘Anyway, it is not new.’”

William James (1842–1920).

Agradecimentos

Primeiro e acima de qualquer coisa, DEUS. Obrigado.

Ao meu orientador Prof^o. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade por quem tenho dupla admiração como cientista e professor.

A família que fiz na EBDA: Estéfane, Claudiane, Grazielle, Everaldo, Karla, Bete.

Obrigado pelo companheirismo e alegria em compartilhar conhecimento.

A Fred, Paulo e Jairo por discutir comigo cada etapa do processo e dar valiosos conselhos. Muito obrigado.

Aos professores Sérgio Luis, Wilson Lopes, M^a de Lourdes e Alailson Dantas.

Recebi de vocês lições para a academia e para a vida.

Aos funcionários da EBDA, cuja convivência diária aproximou saberes e ampliou horizontes.

Ao professor Dr. Fábio Santos Oliveira da UFRB que colaborou significativamente para este trabalho no tratamento especial de dados com PLS-DA, PCA, MLR-DA e MLR-GA-DA

Um especial agradecimento a Fiocruz que coletou e ajudou na primeira etapa de classificação das amostras de pelo canino.

A Escola de Medicina Veterinária que concluiu a etapa de classificação das amostras e, através de Jairo Torres Magalhães Júnior e a professora Stella Barrouin Melo do laboratório LIVE-UFBA, forneceram o diagnóstico definitivo de cada cão cuja amostra de pelo foi utilizada nesta pesquisa.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de abreviaturas e siglas.....	xiii
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xvii
1.0 INTRODUÇÃO.....	1
2.0 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	4
3.1 Leishmaniose Visceral.....	4
3.2 Transmissão da Leishmaniose Visceral.....	6
3.3 Medidas de Controle.....	8
3.4 Ecologia Química e Metabolômica.....	9
3.5 Extração de COVs em estruturas pilosas.....	11
3.5.1 Metodologias para a extração de voláteis.....	13
3.5.2 Técnicas analíticas para a determinação de COVs.....	19
3.6 Quimiometria.....	23
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Coleta do pelo e seleção dos grupos de cães.....	26
4.1.1 Avaliação clínica dos cães e coleta de amostras biológicas.....	26
4.1.2 Diagnóstico laboratorial dos cães.....	27
4.2 Otimização do método de extração dos COVs.....	28
4.2.1 Seleção do adsorvente.....	28
4.2.2 Planejamento Multivariado.....	29

4.3 Método de Extração dos COVs do Pelo Canino.....	32
4.4 Análise Cromatográfica via TD-GC-FID e GC-MS	34
4.4.1 TD-GC-FID	34
4.4.2 GC-MS	34
4.5 Identificação dos compostos	35
4.6 Análise de dados	36
4.6.1 Análise multivariada dos dados	36
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 Classificação dos Cães	38
5.2 Seleção do tubo adsorvente	38
5.3 Planejamentos Multivariados.....	41
5.4 Extração e Análise do Pelo Canino	45
5.5 Identificação dos Picos.....	47
5.6 Análise de dados	48
6.0 CONCLUSÕES	62
7.0 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	63
7.1 Trabalhos Apresentados em Congresso	64
7.2 Artigo Publicado	64
REFERÊNCIAS.....	65
8.0 ANEXO.....	78

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. STATUS ENDÊMICO DA LV (A) NO MUNDO E (B) NO BRASIL.	6
FIGURA 2. INSETO VETOR, <i>LUTZOMYIA LONGIPALPIS</i>	7
FIGURA 3. MODELO DE INCORPORAÇÃO DE DROGAS E METABÓLITOS, ATRAVÉS DO FLUXO SANGUÍNEO, DURANTE A FASE DE CRESCIMENTO DO PELO..	12
FIGURA 4. PRINCIPAIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COVS.....	14
FIGURA 5. SPME POR <i>HEADSPACE</i> EM MODO A) ESTÁTICO E B) DINÂMICO.	16
FIGURA 6. CINTOS COM ADSORVENTES PRESOS EM <i>WATERBUCK</i>	18
FIGURA 7. ESQUEMA SIMPLIFICADO DE DESSORÇÃO TÉRMICA A PARTIR DE CARTUCHO ADSORVENTE.....	21
FIGURA 8. DETECÇÃO ESPECÍFICA DE UM INFOQUÍMICO A PARTIR DA GERAÇÃO SIMULTÂNEA DE UM CROMATOGRAMA E UM ELETROANTENOGRAMA NO GC-FID/EAD.	23
FIGURA 9. UTILIZAÇÃO DA QUIMIOMETRIA EM TODOS OS PROCESSOS DA ANÁLISE DE METABÓLITOS VOLÁTEIS.....	25
FIGURA 10. COLETA DE PELO CANINO E (B) ACONDICIONAMENTO DO PELO.....	27
FIGURA 11. ETAPAS PARA A EXTRAÇÃO DE COVS DE PELO CANINO	33
FIGURA 12. (A) CROMATOGRÁFO A GÁS ACOPLADO A DETECTOR FID E UNIDADE DE DESSORÇÃO TÉRMICA. (B) CROMATOGRÁFO A GÁS ACOPLADO A DETECTOR MS.	34
FIGURA 13. A) ÁREA TOTAL EM COUNTS E B) NÚMERO DE PICOS OBTIDOS PARA CADA TUBO ADSORVENTE	39
FIGURA 14. GRÁFICO DE PARETO PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 24 COM NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%).....	43
FIGURA 15. (A) SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E (B) SUPERFÍCIE DE CONTORNO GERADAS A PARTIR DOS DADOS DA TABELA 7.....	45
FIGURA 16. A) VIAL MODIFICADO E B) BLOCO DE ALUMÍNIO CRIADOS PELO GRUPO DE PESQUISA.....	46
FIGURA 17. CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS A OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO. OS COMPOSTOS IDENTIFICADOS ESTÃO NUMERADOS E DESCRITOS NA TABELA 9.47	
FIGURA 18. GRÁFICO DOS SCORES POR PCA ONDE CADA PONTO REPRESENTA UMA AMOSTRA, SENDO AMOSTRAS COM AUSÊNCIA DO PARASITA (AZUL), BAIXA CARGA PARASITÁRIA (VERDE) E ALTA CARGA PARASITÁRIA (VERMELHO).....	50

FIGURA 19. GRÁFICO DOS SCORES POR PLS-DA ONDE CADA PONTO REPRESENTA UMA AMOSTRA, SENDO AMOSTRAS COM AUSÊNCIA DO PARASITA (AZUL), BAIXA CARGA PARASITÁRIA (VERDE) E ALTA CARGA PARASITÁRIA (VERMELHO).....	51
FIGURA 20. DISCRIMINAÇÃO POR PLS-DA ENTRE CÃES COM AUSÊNCIA DE PARASITA (VERMELHO) E CÃES COM BAIXA E ALTA CARGA PARASITÁRIA (AZUL).	51
FIGURA 21. DISCRIMINAÇÃO POR PLS-DA ENTRE CÃES COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA (VERMELHO) E CÃES COM AUSÊNCIA DO PARASITA E COM ALTA CARGA PARASITÁRIA (AZUL).	52
FIGURA 22. DISCRIMINAÇÃO POR PLS-DA ENTRE CÃES COM ALTA CARGA PARASITÁRIA (VERMELHO) E CÃES COM AUSÊNCIA DO PARASITA E COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA (AZUL).	52
FIGURA 23. DISCRIMINAÇÃO POR MLR-GA-DA / STEPWISE MLR-DA ENTRE CÃES COM AUSÊNCIA DO PARASITA (DIREITA) E BAIXA E ALTA CARGA PARASITÁRIA (ESQUERDA).	55
FIGURA 24. DISCRIMINAÇÃO POR MLR-GA-DA / STEPWISE MLR-DA ENTRE CÃES COM BAIXA CARGA DO PARASITA (DIREITA) E CÃES COM AUSÊNCIA DO PARASITA E COM ALTA CARGA PARASITÁRIA (ESQUERDA).	55
FIGURA 25. DISCRIMINAÇÃO POR MLR-GA-DA / STEPWISE MLR-DA ENTRE CÃES COM ALTA CARGA DO PARASITA (DIREITA) E CÃES COM AUSÊNCIA DO PARASITA E COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA (ESQUERDA).	56
FIGURA 26. COEFICIENTES DE REGRESSÃO MLR-GA-DA / STEPWISE MLR-DA PARA DISCRIMINAÇÃO DE CÃES COM AUSÊNCIA DO PARASITA DE CÃES COM BAIXA E ALTA CARGA PARASITÁRIA.....	56
FIGURA 27. COEFICIENTES DE REGRESSÃO MLR-GA-DA / STEPWISE MLR-DA PARA DISCRIMINAÇÃO DE CÃES COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA DE CÃES COM AUSÊNCIA DO PARASITA E ALTA CARGA PARASITÁRIA.	57
FIGURA 28. COEFICIENTES DE REGRESSÃO MLR-GA-DA / STEPWISE MLR-DA PARA DISCRIMINAÇÃO DE CÃES COM ALTA CARGA PARASITÁRIA DE CÃES COM AUSÊNCIA DO PARASITA E BAIXA CARGA PARASITÁRIA.	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. DADOS SOBRE A LV NO CONTINENTE AMERICANO.....	5
TABELA 2. FATORES E NÍVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^4 PARA OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE COVS DE PELO CANINO.	29
TABELA 3. MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^4 EM VALORES REAIS.	30
TABELA 4. NÍVEIS AVALIADOS DAS VARIÁVEIS “TEMPO DE EXTRAÇÃO” E “VAZÃO DE AMOSTRAGEM” NA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA POR COMPOSTO CENTRAL.	31
TABELA 5. MSR-PCC PARA OS FATORES TEMPO DE EXTRAÇÃO (T_{EXT}) E VAZÃO DE AMOSTRAGEM (VA).	32
TABELA 6. PLANEJAMENTO FATORIAL APRESENTANDO A ÁREA TOTAL EM <i>COUNTS</i> COMO RESPOSTA ANALÍTICA.	42
TABELA 7. MSR-PCC PARA A OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO ($T_{EXT} = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ E $MP = 130\text{ MG}$).	44
TABELA 8. CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO PARA O MÉTODO OTIMIZADO. EM AZUL ESTÃO OS FATORES OTIMIZADOS VIA PLANEJAMENTO MULTIVARIADO.....	45
TABELA 9. COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS DE PELO DE CÃES RESIDENTES EM ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, COM SEUS RESPECTIVOS ÍNDICES DE KOVATS.....	48
TABELA 10. FREQUÊNCIA DOS RESULTADOS DA CLASSIFICAÇÃO POR PLS-DA NOS TRÊS GRUPOS ESTUDADOS.	53
TABELA 11. SELEÇÃO DE COVS POR MLR-GA-DA / STEPWISE MLR-DA NOS TRÊS GRUPOS ESTUDADOS.....	54
TABELA 12. FREQUÊNCIA DOS RESULTADOS DA CLASSIFICAÇÃO POR MLR-GA-DA / STEPWISE MLR-DA NOS TRÊS GRUPOS ESTUDADOS.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE	Eletroforese Capilar (do inglês Capillary Electrophoresis)
CE-MS	Eletroforese Capilar Acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry)
COVs	Compostos orgânicos voláteis
DSE	Extração direta por solvente (do inglês <i>direct solvent extraction</i>)
DHS-SPME	Microextração em Fase Sólida por Headspace Dinâmico (do inglês Dynamic Headspace-Solid Phase Micro-Extraction)
EAD	Detector Eletroantenográfico (do inglês Electro Antenographic Detector)
FID	Detector por Ionização em Chama (do inglês Flame Ionization Detector)
GC-FID	Cromatografia a Gás acoplado a Detector por Ionização em Chama (do inglês Gas Chromatography – Flame Ionization Detector)
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (do inglês <i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HS-SPME	Microextração em Fase Sólida por Headspace (do inglês Headspace-Solid Phase Micro-Extraction)
IR	Infravermelho (do inglês <i>infrared</i>)

KI	Índice de Kovats (do inglês, Kovats Index)
LC-ESI-MS	Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectrômetro de Massas Empregando Ionização por Electrospray (do inglês liquid Chromatography-electrospray ionization-Mass Spectrometry)
LC-NMR	Cromatografia Líquida Acoplada a Ressonância Magnética Nuclear (do inglês Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance)
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês <i>liquid-liquid extraction</i>)
LTPRI	Índice de Retenção com Programação Linear de Temperatura (do inglês Linear Temperature Programmed Retention Index)
LV	Leishmaniose visceral
MLR-GA	Regressão Linear Múltipla com Algoritmo Genético (do inglês Multiple Linear Regressions Genetic Algorithm)
MS	Espectrometria de massas (do inglês <i>mass spectrometry</i>)
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
MSR-PCC	Metodologia de Superfície de Resposta – Planejamento Composto Central.
NIR	Infravermelho Próximo (do inglês <i>Near Infrared</i>)
NMR	Ressonância magnética nuclear (do inglês <i>nuclear magnetic ressonance</i>)
PCA	Análise de Componentes Principais (do inglês Principal Component Analysis)

PLS-DA	Análise Discriminatória pelo Método dos Mínimos quadrados Parciais (do inglês <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>)
qPCR	Reação da Cadeia da Polimerase quantitativa (do inglês <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
SE	Extração por solvente (do inglês <i>solvent extraction</i>)
SFE	Extração por fluido supercrítico (do inglês <i>supercritical fluid extraction</i>)
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>solid phase extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês <i>solid phase microextraction</i>)
Stepwise MLR-DA	Regressão Linear em Passos (do inglês <i>Stepwise Multiple Linear Regression</i>)
TD	Dessorção Térmica (do inglês <i>Thermal Desorption</i>)
UPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance (do inglês <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>)
UV	Ultravioleta

RESUMO

A leishmaniose visceral é um importante problema de saúde pública, acometendo anualmente milhares de pessoas em todo o mundo, sobretudo em países em desenvolvimento, como o Brasil. O cão é o principal hospedeiro da doença, dada a sua proximidade com humanos e a facilidade de adquirir e desenvolver altas cargas parasitárias. Estudos recentes sugerem que o cão infectado com *L. infantum*, produz resposta fisiopatológica que altera, entre outras coisas, o perfil de metabólitos voláteis exalados do pelo do animal e que existe uma procura preferencial do vetor por cães infectados. O presente trabalho desenvolve um método de extração de voláteis exalados a partir do pelo canino por meio da técnica TD-GC-FID, a fim de possibilitar estudos para um melhor entendimento da atuação destes COVs na atração vetor-hospedeiro. Para a realização deste trabalho, as amostras foram classificadas em três grupos: cães infectados e com alta carga parasitária; cães infectados, porém com baixa carga parasitária e cães sadios, sem a presença do parasita. O método desenvolvido abarca a extração em fase sólida e amostragem via *purge and trap*. Todos os fatores que interferem na amostragem de COVs do pelo canino, foram avaliados através de planejamentos multivariados. A grande quantidade de dados gerados pelas 105 amostras foram classificadas no três grupos estudados por análise discriminatória pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Os erros obtidos na classificação das amostras foram mitigados com a remoção de COVs não informativos, usando as técnicas Regressão Linear Múltipla com Algoritmo Genético (MLR-GA-DA) e regressão linear em passos (Stepwise MLR-DA). A remoção destes COVs reduziu significativamente os erros de classificação, permitindo obter um modelo satisfatório para a classificação dos três grupos estudados. A variação dos coeficientes de regressão destas técnicas suplementares para os COVs selecionados, apontam o 1-hexanol, 1-octanol e o nonadecano como possíveis biomarcadores da leishmaniose visceral canina. Um método para a extração de COVs utilizando TD-GC-FID que possibilita obter extratos de voláteis do pelo canino e permita investigar a atração vetor-hospedeiro foi desenvolvido e utilizado para discriminar as três classes de amostras.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral Canina. Quimiometria. COVs. TD-GC-FID.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a major public health problem, affecting thousands of people around the world every year, especially in developing countries such as Brazil. Dog is a principal host of the disease, because of its proximity to human beings and the ease to acquire and develop high parasite loads. Recent studies suggest that the infected dog with *L. infantum* produces physiopathological responses that changes, among other things, the profile of volatile metabolites exhaled from the animal hair and that there is a preferred demand from vector to infected dogs. The present work develops a method to extract volatiles exhaled from canine hair by TD-GC-FID technique, in order to enable studies to better understand the role of these VOCs in vector-host attraction. In order to carry out this work, samples were classified into three groups: infected dogs and with high parasite load; infected dogs, but with low parasite load and healthy dogs, but without the presence of parasite. The method developed includes solid phase extraction and sampling by purge and trap. All the factors that affect in the VOCs canine hair sampling were evaluated by multivariate designs. The huge amount of data generated by 105 samples were classified into three groups studied by Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA). The misclassification of samples were mitigated by removing of uninformative VOCs, using techniques such as Multiple Linear Regressions Genetic Algorithm (MLR-GA-DA) and Stepwise Multiple Linear Regression (Stepwise MLR-DA). The number of samples misclassified were significantly reduced, providing a satisfactory model for classification of those three groups. Changes in the regression coefficients of the MLR-GA-DA/Stepwise MLR-DA in the selected VOCs indicate the 1-hexanol, 1-octanol and nonadecane as potential biomarkers of canine visceral leishmaniasis. A method for extraction of VOCs using TD-GC-FID, which enables to obtain an extract from canine hair volatiles and allow us to investigate the vector-host attraction was developed and used to discriminate the three sample classes.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis. Chemometric. VOCs. TD-GC-FID.

1.0 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma zoonose parasitária que é endêmica em mais de 60 países. Dados estimados por país e região epidemiológica com base em relatórios sobre incidência, revelam que a doença tem uma ocorrência anual que varia entre 200.000 a 700.000 casos por ano, estando 90% destes casos concentrados em apenas seis países: Índia, Nepal, Bangladesh, Etiópia, Sudão e Brasil (ALVAR et al., 2012). Depois da malária, é a doença parasitária que mais causa mortes no mundo (MATHERS; EZZATI; LOPEZ, 2007). Apesar de rotulada como doença tropical, foi observado um aumento no número de casos importados em países desenvolvidos, industrializados e não-endêmicos onde, infere-se que haja uma associação do aumento de casos com o aumento do turismo, operações militares e fluxo de imigrantes de países endêmicos e pessoas infectadas com HIV (coinfecção) (DESJEUX; ALVAR, 2003). A doença leva à morte em 90% dos casos não tratados (SAÚDE, 2015) e mesmo com acesso a tratamento, a taxa de letalidade é de 20% (ALVAR et al., 2012). Essa elevada taxa é justificada pelo fato da doença assumir formas letais quando está associada com má nutrição, imunossupressão e infecções concomitantes (GONTIJO; MELO, 2004; WHO, 2010).

A doença é transmitida por meio de vetores flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalps* (LAINSON; RANGEL, 2005) e tem no cão o seu principal hospedeiro em áreas urbanas (SILVA et al., 2005; TRAVI et al., 2001) sendo, portanto, uma doença de alto risco de infecção dada à proximidade do homem ao cão.

A transmissão ocorre através da picada do *L. longipalpis*, e estudos indicam que os vetores picam preferencialmente animais infectados (KNOLS; MEIJERINK, 1997; O'SHEA et al., 2002). Esta preferência pode estar relacionada à mudanças nos processos metabólicos do cão infectado que podem ser percebidas pelo inseto através do perfil de compostos orgânicos voláteis (COVs) exalados do pelo canino e captados pelas sensilas da antena do inseto. DE OLIVEIRA et al. (2008) demonstraram que existem diferenças no

perfil de COVs exalados através do pelo de cães soropositivos e soronegativos para *Leishmania sp.*, sendo que, mais recentemente foi hipotetizado que esta diferença está relacionada com a presença e intensidade da carga parasitária nos cães (MAGALHÃES-JÚNIOR et al., 2014).

O pelo, entre outras funções, também pode servir de canal para secreção e excreção de substâncias que são produzidas pelos processos metabólicos de um organismo vivo (STENN; PAUS, 2001). GRATACOS-CUBARSI et al. (2006), por exemplo, relataram que o uso de pelo de animais pode ser usado como um indicador do metabolismo interno de animais à medicamentos.

Os COVs exalados do pelo canino podem ser a chave para entender melhor como funciona a comunicação entre parasito, hospedeiro e vetor e de como estes voláteis fazem parte do ciclo da doença. Assim, a extração eficiente de COVs do pelo canino pode auxiliar a discriminação de cães infectados de sadios e pode ser uma ferramenta útil, tanto para o diagnóstico alternativo da doença, quanto para identificação de COVs que interfiram na ecologia química do inseto.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e otimizar um método analítico de extração de COVs de pelo canino livre de solvente, com a utilização de TD-GC-FID para discriminar cães sadios dos infectados por *Leishmania sp.*

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e otimizar, via planejamento multivariado, uma metodologia de extração de COVs do pelo canino usando extração por headspace dinâmico em fase sólida (*purge and trap*);
- Identificar os compostos exalados a partir do pelo de cães sadios e infectados por *Leishmania sp.*;
- Usar métodos quimiométricos para identificar compostos que possam discriminar cães sadios de infectados por *Leishmania sp.*, com diferentes cargas parasitárias.

3.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Leishmaniose Visceral

Segundo relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), a leishmaniose é uma das doenças mais negligenciadas do mundo e acomete, principalmente, a população mais carente de países pobres e em desenvolvimento (WHO, 2010). Ela é caracterizada como uma zoonose parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, da qual existe mais de 20 espécies (MANSUETO et al., 2014). A forma clínica conhecida como Leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é causada na América do sul pela infecção do protozoário da espécie *L. infantum* (sin. *Leishmania chagasi*) (ALVAR et al., 2012; CHAPPUIS et al., 2007; COURA-VITAL et al., 2014; PEIXOTO; DE OLIVEIRA; ROMERO, 2015; WHO, 2010) e é considerada a forma clínica mais grave e letal (KHADEM; UZONNA, 2014). Os sintomas da doença são febre prolongada, fraqueza, anorexia, perda de peso hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia, pancitopenia, (COURA-VITAL et al., 2014; LIMA et al., 2013). Se não houver tratamento, o quadro clínico do doente pode evoluir para caquexia severa, doença multissistêmica, hemorragia, infecções secundárias e, por fim, morte. (LOMTADZE et al., 2005; MURRAY et al., 2005).

Nas Américas a distribuição da doença ocorre desde o México até a Argentina, mas o Brasil concentra mais de 90% dos casos (ALVAR et al., 2012; MARCONDES; ROSSI, 2013). A Tabela 1 apresenta a incidência reportada e estimada por ano nos países da América, onde se nota que não existem dados sobre os países da América do norte.

Tabela 1. Dados sobre a LV no continente americano.

País	Casos/Ano	Período Correspondente	Incidência Anual Estimada
Argentina	8	2004 - 2008	20 a 30
Bolívia	0	2008	
Brasil	3481	2003 - 2007	4200 a 6300
Colômbia	60	2004 - 2008	70 a 110
El Salvador		sem dados	
Guatemala	15	2004 - 2008	20 a 30
Honduras	6	2004 - 2008	7 a 10
México	7	2004 - 2008	8 a 12
Nicarágua	3	2003 - 2007	3 a 5
Paraguay	48	2004 - 2008	100 a 200
Venezuela	40	2004 - 2008	50 a 200
Região	3668	-	4500 a 6500

Fonte: Adaptado de Alvar et al. (2012).

Entre os países da América Latina, o Brasil é o país onde a incidência de casos de LV mais se destaca. Foram notificados 3.038 casos da doença em humanos somente no ano de 2012. A taxa de incidência é de 1,57 casos/100.000 habitantes e a taxa de letalidade chega a 7,1% (MARCONDES; ROSSI, 2013). No Brasil a LV é considerada uma doença endêmica das áreas rurais, cujos focos da doença ocorrem em sua maioria no Nordeste do país (BRASIL, 2014). Atualmente, segundo dados oficiais do governo brasileiro, a doença é encontrada em 19 das 27 Unidades da Federação com 1600 municípios apresentando transmissão autóctone (Figura 1b)(BRASIL, 2014).

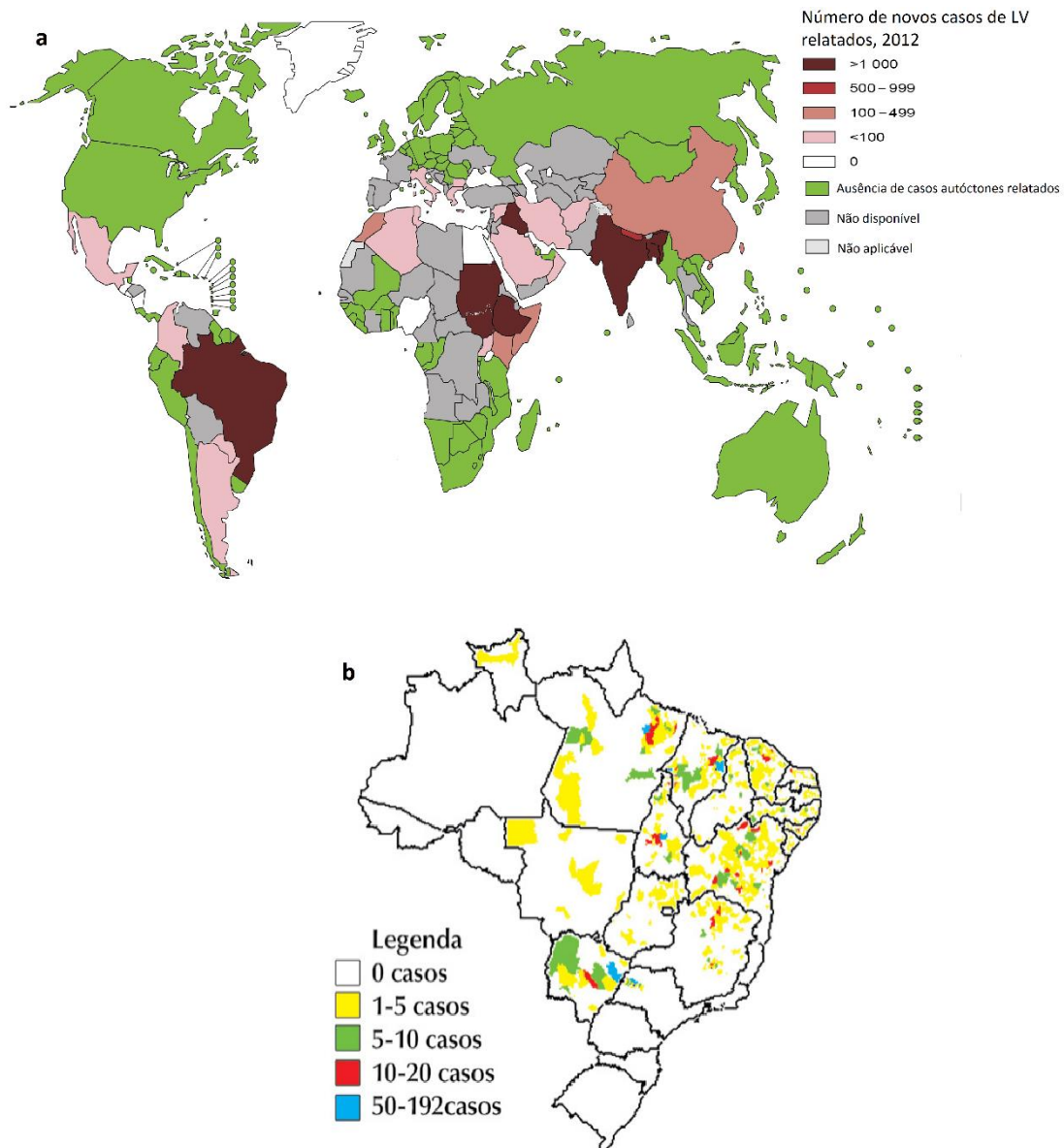


Figura 1. Status endêmico da LV (a) no mundo e (b) no Brasil. Fonte (a): World Health Organization, 2013. Fonte (b): Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, (BRASIL, 2014).

3.2 Transmissão da Leishmaniose Visceral

Nas Américas, a LV é o resultado da transmissão zoonótica do protozoário *L. infantum* e tem a fêmea de insetos flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* como o principal vetor da doença. O inseto mede de 2-3 mm, tem o corpo piloso e de coloração castanho claro ou palha (BRASIL, 2014) (Figura 2). Apenas a fêmea

de flebotomíneos alimenta-se de sangue, isso ocorre porque ela utiliza-se de alguns micronutrientes do sangue dos hospedeiros para maturar seus ovos.



Figura 2. Inseto vetor, *Lutzomyia longipalpis*. Fonte: BRASIL, 2014.

O *Lutzomyia longipalpis* possui uma grande facilidade para se adaptar às imediações domésticas e diferentes temperaturas (MARTINS-MELO et al., 2014). Ele está amplamente distribuído no Brasil e o aumento crescente de casos em diferentes lugares evidencia sua expansão, inclusive para as capitais, cuja realidade epidemiológica exige abordagens mais austeras baseadas em vigilância e controle (WERNECK, 2010).

Existem registros de outras formas de transmissão da doença, como transfusões de sangue, compartilhamento de agulhas entre usuários de drogas, transplante de órgãos, transmissão congênita, ou vertical entre mãe e filho (BELO et al., 2013; BRASIL, 2014; MANSUETO et al., 2014; WHO, 2010), contudo, estas formas de transmissão são mais raras e sem importância epidemiológica (WHO, 2010).

Dada a facilidade que o cão possui em adquirir e desenvolver altas cargas parasitárias e a sua proximidade com o homem, o cão é principal hospedeiro da doença (BELO et al., 2013; COURA-VITAL et al., 2011; SILVA, et al., 2005; TRAVI, et al., 2001; WERNECK, 2010). Os estudos de SANCHEZ et al. (2004) mostraram que é possível diferenciar cães infectados e que apresentam sinais clínicos (sintomáticos) de cães infectados, mas sem sinais clínicos

(assintomáticos) através da análise da carga parasitária nas vísceras do cão. Segundo os autores, cães sintomáticos apresentam quase duas vezes mais carga parasitária no fígado do que cães assintomáticos e, uma menor carga parasitária no baço, mas também com duas vezes mais carga parasitária em cães sintomáticos do que em assintomáticos. Cães infectados, não necessariamente são transmissores da doença (TRAVI et al., 2001). Para infectar o vetor, o cão precisa possuir LV na forma ativa, onde, numa área endêmica, menos que 50% dos cães suscetíveis tendem a progredir à manifestação clínica, e a outra fração resistente não o faz (ALVAR et al., 2004). MOREIRA et al. (2004) observaram que é comum, após a eutanásia de cães infectados, a inserção de um filhote, cão mais susceptível à doença, na mesma região onde há presença de vetores. Assim, uma metodologia que possa identificar cães resistentes, evitando a eutanásia dos mesmos, pode ser útil em diminuir o número de casos de humanos e cães infectados ao evitar a eutanásia de cães resistentes.

3.3 Medidas de Controle

As medidas de controle até então implementadas no Brasil, têm-se mostrado ineficientes contra o surgimento de novas epidemias e a expansão da doença no país (GONTIJO; MELO, 2004). O governo federal assume que devido às características epidemiológicas e o conhecimento insuficiente dos elementos que compõem a cadeia de transmissão da LV, as medidas de controle são pouco efetivas contra o avanço da doença (BRASIL, 2014). Em síntese, as principais medidas de combate à doença no Brasil consistem em controlar as populações de vetores e reservatórios (WERNECK, GUILHERME LOUREIRO, 2014). Entre as medidas para controle de reservatórios está a eutanásia de cães infectados, porém há muita controvérsia nesta medida, pois alguns relatos sugerem que o impacto dela na redução de casos humanos e caninos é pouco perceptível (COSTA, 2011; GRIMALDI et al., 2012). Os principais motivos da ineficácia desta medida são a baixa sensibilidade dos métodos sorológicos utilizados e os atrasos na detecção e eliminação de cães infectados. Além disso, na maioria dos casos, ocorre a rápida substituição do animal sacrificado por filhotes mais

susceptíveis a doença (COURA-VITAL, WENDEL et al., 2014). Adicionalmente, o tratamento de cães infectados não é eficaz quando há recaídas e o cão é reinfectado (ALVAR, et al., 1994). Estes relatos e fatos apontam a necessidade de um enfoque maior no controle do vetor do que no controle de reservatórios para combater a disseminação da doença (PICADO et al., 2012).

Os sítios de reprodução de flebotomíneos são difíceis de se encontrar na natureza. Assim, medidas de controle contra a fase imatura do inseto não são viáveis (ALEXANDER; MAROLI, 2003). Os principais métodos relacionados a controle vetorial consistem em utilizar o controle químico, pulverização intradomiciliar ou sítios onde possa ser encontrado e mosquiteiros impregnados com inseticida (ALEXANDER; MAROLI, 2003; MAROLI; KHOURY, 2006). Ainda dentro de controle químico, o uso de coleiras impregnadas com inseticidas piretróides também é uma alternativa; gestão ambiental para reduzir ao máximo o contato entre o vetor e humanos, através de intervenções em nichos ecológicos e um monitoramento entomológico para avaliar a presença de insetos e a eficácia das medidas de controle, também são recomendadas (WHO, 2010). Dentre estes métodos, a pulverização é a mais utilizada para áreas urbanas, contudo seu uso é contestado por ser ineficaz em áreas rurais onde as casas estão dispersas e cercadas por reservatórios naturais do inseto vetor (MAROLI; KHOURY, 2006). Soma-se a este fato, os danos causados por contaminação ambiental e o desenvolvimento de resistência nos insetos (AMÓRA et al., 2009). Devido a estas problemáticas, a mediação comportamental dos insetos vetores através da ecologia química tem ganhado maior visibilidade nesta área.

3.4 Ecologia Química e Metabolômica

Ecologia química é uma ciência que descreve relações entre seres vivos intermediada por compostos químicos (PAREJKO, 1988). Nesta comunicação alguns compostos têm efeitos específicos sobre as funções biológicas de um determinado organismo vivo. Esses compostos são chamados de semioquímicos (sinais químicos), pois transmitem informações entre organismos vivos (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009). Infoquímico, apesar de ser um termo

semelhante a semioquímico, possui uma definição mais restrita à ideia de substâncias químicas que fornecem informações sobre indivíduos que interagem entre si e provocam no receptor uma resposta fisiológica ou comportamental (VILELA; LÚCIA; DELLA, 2001). Neste contexto, o termo infoquímico será usado de preferência a semioquímico, haja vista que o termo semioquímico inclui toxinas e nutrientes como sinais de comunicação, mas que não são objetos de interesse neste trabalho.

Nas últimas décadas a ecologia química tem-se mostrado uma alternativa elucidativa e resolutiva em questões na agricultura e saúde; somando-se a isso o benefício de um menor impacto ambiental. À medida que ferramentas da informática e técnicas analíticas são aperfeiçoadas, a ecologia química tem entrado em diversas áreas do conhecimento e vem se tornando uma ciência de fronteira (RAGUSO et al., 2014). KANG; BALDWIN (2008) creem que as mudanças que ocorrem na filogenética, genômica comparativa, biologia de sistemas, engenharia metabólica e neurociência, trazem uma nova geração de ferramentas com as quais é possível explorar interações entre organismos mediados quimicamente.

Há muito tempo a ecologia química já vem sendo utilizada no manejo de pragas na agricultura (ROOT, 1973), mas o seu uso também é descrito na literatura como ferramenta que pode elucidar a comunicação entre micróbios e a resistência a antibióticos (KOLTER, 2010). Entre estes e outros modos de se utilizar da ecologia química como ferramenta, está o aprimoramento de armadilhas para captura de insetos causadores de doenças zoonóticas, a exemplo da febre do Nilo ocidental, transmitida pelo *Culex pipiens quinquefasciatus* (SYED; LEAL, 2009) e a malária, que é transmitida por mosquitos do gênero *Anopholes* sp. (MORAES et al., 2014). Pesquisas como estas são possíveis graças ao estudo dos COVs emitidos pelos organismos que se deseja investigar o comportamento ou a resposta fisiológica frente a uma situação problema (KNOLS; MEIJERINK, 1997; LOGAN et al., 2008; SYED; LEAL, 2009). Por trás da produção e emissão destes voláteis está a ciência chamada metabolômica, que consiste no estudo sistemático do perfil de metabólitos causados por modificações genéticas, estímulos fisiológicos, ambientais, nutricionais, entre outros fatores (DE ANDRADE et al., 2014). Quando injuriados, organismos vivos

tendem a reagir fisiologicamente gerando produtos de processos celulares intermediados pela ação direta de enzimas e proteínas, assim, metabólitos estão mais próximos do fenótipo da doença do que informação genética ou proteômica (TER KUILE; WESTERHOFF, 2001). Muitas pesquisas já foram realizadas com base na metabolômica a fim de conseguir uma forma alternativa de diagnóstico, prognóstico, desenvolvimento terapêutico e biomarcadores de doenças (GOWDA et al., 2008).

Diferentes tipos de matrizes já foram utilizadas em pesquisas com abordagem em metabolômica, tais como pele (DORMONT et al., 2013), hálito (FOWLER et al., 2015), biofluidos (TRIVEDI; ILES, 2015), pelo animal (MAGALHÃES-JÚNIOR et al., 2014) cabelo (MOLINA-VILLALBA et al., 2015) entre outros.

3.5 Extração de COVs em estruturas pilosas

Em 1859 foi registrado o primeiro caso de detecção de produtos tóxicos em cabelo humano. Hoppe detectou arsênio no cabelo de um corpo exumado após 11 anos (CASPER, 1857). Desde então, estruturas pilosas têm sido usadas na pesquisa científica como forma de avaliar o uso de drogas ilícitas na toxicologia forense, monitoramento de drogas veterinárias, farmacêuticas e análise de metabólitos relacionados à doenças (ADRIAN et al., 2009; GRATACOS-CUBARSI et al., 2006; RUBIO et al., 2015; SAISHO; TANAKA; NAKAHARA, 2001). Estas pesquisas acontecem graças ao mecanismo de incorporação interna de drogas e metabólitos na corrente sanguínea, como pode ser visto na Figura 3. O rápido processo de divisão celular para formar o folículo piloso, exige uma grande vascularização desta área e assim, drogas e metabólitos presentes na corrente sanguínea são transportados por difusão passiva para pelos e cabelos. Outros mecanismos também influenciam o transporte interno e externo de metabólitos, porém as variadas formas em que isto ocorre não estão completamente compreendidas (KINTZ, 2006). Dentre as várias matrizes biológicas, o cabelo, a exemplo de uma matriz pilosa, oferece vantagens tais como uma janela de detecção para os analitos de 3 dias à meses

ou anos, desde que alguns critérios particulares da análise sejam atendidos. Esta janela de detecção é, comparavelmente, muito maior que matrizes biológicas tais como saliva (1h-24h), plasma/soro (3h-2d) e urina (6h-3d) e ainda permite armazenamento à temperatura ambiente (WENNIG, 2000).

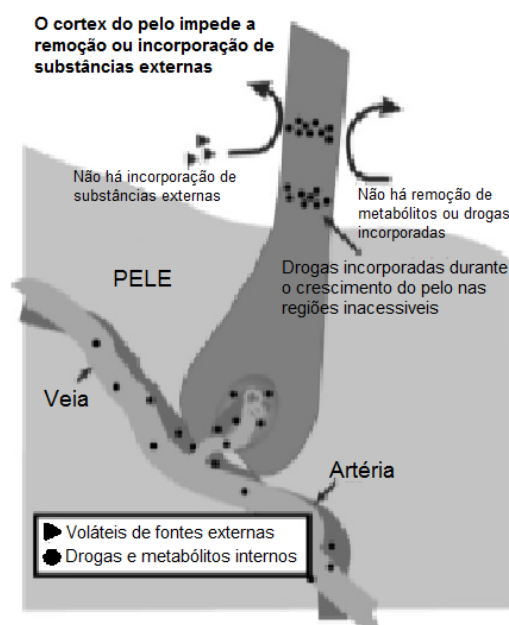


Figura 3. Modelo de incorporação de drogas e metabólitos, através do fluxo sanguíneo, durante a fase de crescimento do pelo. Fonte: KINTZ, 2006.

As principais vantagens do uso do pelo como matriz para estudos metabólitos são a extração indolor, prática, fácil transporte e matriz estável. Além disso, acontece pouca alteração durante o armazenamento, que pode ser feito sem refrigeração, controle de pH ou agentes preservantes, que são geralmente necessários em outras amostras biológicas como sangue e urina (MOLINA-VILLALBA et al., 2015; RIVIER, 2000)

Os metabólitos são compostos químicos com arranjos atômicos e grupamentos funcionais diversos e, conseqüentemente, diferentes propriedades físicas e químicas. Responder a questão biológica que motivou a análise, caracterizar e quantificar estes compostos exige metodologias apropriadas, de acordo com as classes de compostos (ABDELNUR, 2011). Para escolher a metodologia adequada para a extração de COVs, é preciso definir qual o objetivo da análise.

Pelo menos duas abordagens são comuns em metabolômica. A primeira refere-se a uma análise direcionada chamada *targeted*, também chamada de metabolômica quantitativa, que consiste na quantificação de metabólitos endógenos que já são conhecidos (KOAL; DEIGNER, 2010). A segunda é chamada de *non-targeted* ou metabolômica qualitativa, a qual representa um traçado do perfil dos metabólitos de um sistema, permitindo triar e identificar metabólitos endógenos a fim de detectar compostos significativos e relevantes (QI et al., 2014). Este trabalho foi desenvolvido sob a perspectiva *non-targeted* e, por isso, os métodos e técnicas aqui abordados são discutidos sob esta ótica.

3.5.1 Metodologias para a extração de voláteis

Com o desenvolvimento da ecologia química e das técnicas analíticas, foram desenvolvidas ferramentas para extração de COVs *in vivo* (HOSSAIN; BOJKO; PAWLISZYN, 2013), *in vitro* (MAGALHÃES-JÚNIOR et al., 2014), *ex vivo* (EGAN et al., 2013) e *in situ* (GIKONYO et al., 2002) com o objetivo de estudar metabólitos.

A preparação da amostra deve ser a mais simples possível, a fim de minimizar a manipulação da matriz, incluindo suas modificações e perdas. O preparo de amostra ideal consiste em garantir o fim das reações metabólicas até o momento da análise; cobrir uma ampla faixa de analitos com o objetivo de garantir uma amostragem representativa e evitar contaminações com o background que pode levar à falsas conclusões (BOJKO et al., 2014). As abordagens mais comuns para a extração de COVs estão representadas na Figura 4.

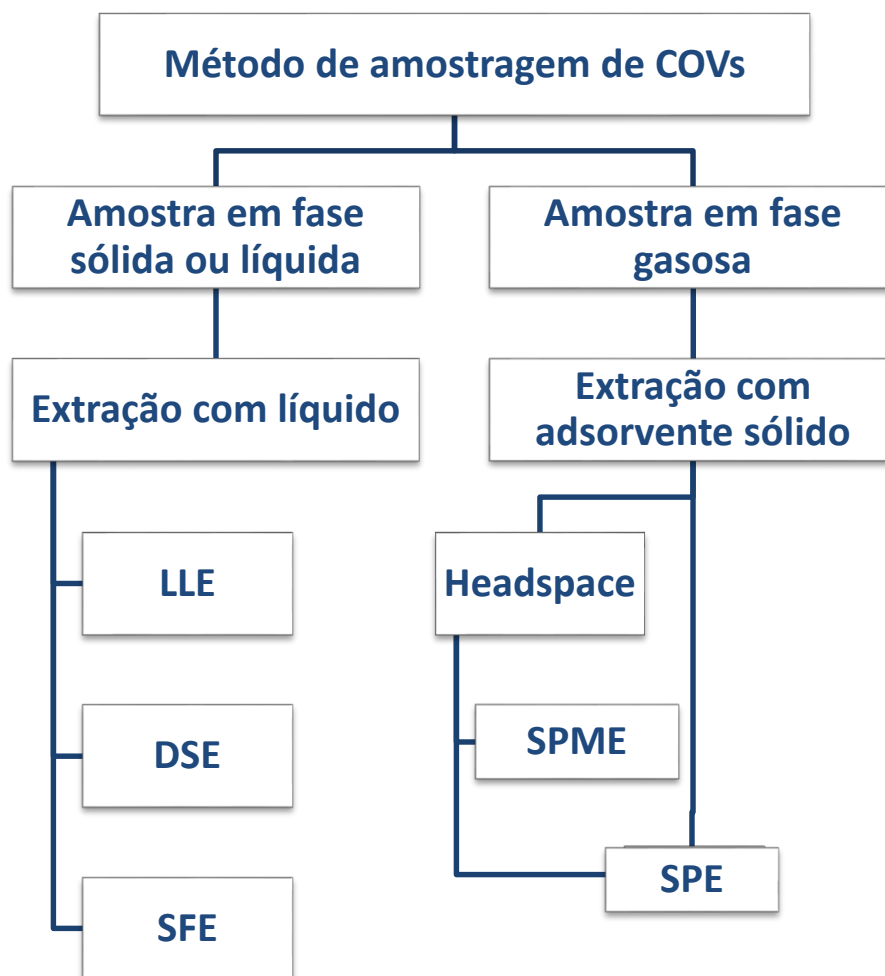


Figura 4. Principais métodos de extração de COVs. Adaptado de PAWLISZYN, (1997); BART, (2005).

Segundo a IUPAC (1997), a extração por solvente (SE) é o processo de transferência de uma substância a partir de qualquer matriz para uma fase líquida apropriada e, se a substância está inicialmente presente como um soluto em uma fase líquida imiscível, o processo é sinônimo de extração líquido-líquido (LLE). A extração direta por solvente (DSE) e a extração por fluido supercrítico (SFE) baseiam-se nas diferenças de solubilidade entre fluidos imiscíveis com o propósito de separar, concentrar ou purificar (CICERI; PERERA; STEVENS, 2014).

Na ecologia química, a DSE é a metodologia mais utilizada para a extração de feromônios de insetos (SNART; HARDY; BARRETT, 2015), haja vista ser um método prático e com menor gasto de tempo quando comparado

aos demais métodos. É certo que este tipo de extração traz o ônus de uma grande quantidade de impurezas que estão relacionadas com o inseto ou a parte dele usada na extração por solvente; contudo, traz o bônus da possibilidade de concentrar feromônios que são emitidos na faixa de nanogramas ou picogramas (THOMAZINI, 2012; VILELA et al., 2001; ZARBIN; FERREIRA; LEAL, 1999).

A extração com fluido supercrítico é usada em processos de transferência de massa e para a extração de compostos de baixa volatilidade (BRUNNER, 2010; WALRADT, 1982) e possui vantagens como extração de analitos termolábeis e uma rápida cinética de extração quando comparado com a extração por solventes líquidos, apresentando porém, alto custo de investimento (KING, 2002; WALRADT, 1982).

Com distinta citação na literatura científica, a SPME é um dos métodos mais utilizados para extração de COVs (BOJKO et al., 2014). TIKUNOV et al. (2005) fazem referência a esta técnica (SPME-GC-MS) como adequada para estudos metabômicos de voláteis por ter reconhecidamente alta sensibilidade, reprodutibilidade e robustez. A técnica consiste, sucintamente, na adsorção física dos analitos no interior ou sobre um material polimérico que cobre uma fibra de sílica (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2007).

O trabalho de amostragem por SPME pode ser realizado através da técnica *headspace*, cujas variações mais conhecidas são os modos *headspace* estático (HS-SPME) e amostragem por *headspace* dinâmico (DHS-SPME) que são mostradas na Figura 5. No primeiro modo, os voláteis estão selados em um recipiente e são coletados no *headspace* depois do equilíbrio de volatilização com o auxílio de um *holder* (aplicador) e, no segundo modo, um gás, inerte de preferência, passa pela amostra e leva os analitos até a fibra polimérica onde serão adsorvidos fisicamente. Qualquer que seja o modo, os analitos são posteriormente dessorvidos termicamente ou por solvente e detectados (BOYACI et al., 2015).

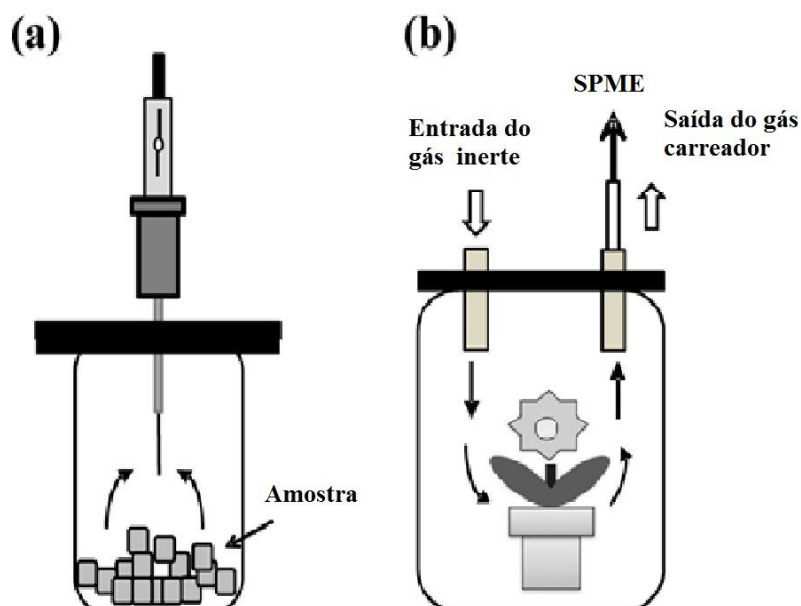


Figura 5. SPME por *headspace* em modo a) estático e b) dinâmico. Fonte: IJIMA, 2014.

BOJKO et al. (2014) descrevem entre as vantagens da técnica:

1. A diversidade de fases de extração disponíveis comercialmente que permitem o planejamento do tipo Taylor¹;
2. O uso de auto-amostradores que permitem uma automação completa dos métodos e melhoraram a taxa de transferência da amostra e a repetibilidade;
3. A portabilidade que permite análises *in situ* e observações de mudanças dinâmicas em organismos *in vivo*.

Como ferramenta em estudos sobre metabolômica, a literatura relata o uso de SPME em medicina, alimentos, agricultura, ciência forense, entre outros, tais como caracterização e biomarcadores voláteis de câncer (LIU et al., 2014; SILVA; PASSOS; CAMARA, 2012), avaliação do efeito de agentes antimicrobianos e farmacêuticos em sistemas biológicos complexos (HOSSAIN et al., 2013), resposta defensiva de plantas à ataque de pragas (LAWO et al.,

¹ É a substituição da improvisação, empirismo e critério individual do analista por métodos planejados e testados.

2011), caracterização de espécies de plantas e cultivares (LUYKX; VAN RUTH, 2008), detecção de biomarcadores na deterioração bacteriana em peito de frango (ALEXANDRAKIS et al., 2012), detecção de drogas de abuso em cabelo (ALEKSA et al., 2012) e muitos outros. Entretanto, a SPME possui desvantagens como menor sensibilidade para isolar COVs liberados em baixa concentração e os resultados obtidos são difíceis de se relacionar com a concentração real dos compostos na matriz quando comparada com métodos exaustivos e isto é o principal fator limitante da técnica (BOJKO et al., 2014; SANCHEZ-PALOMO et al., 2009).

Das três metodologias supracitadas, a extração em fase sólida é o método exaustivo mais versátil. Pode ser adaptado com o auxílio de dispositivos como: cartuchos², colunas, discos (HENRY, 2000). Pode ser usado com solvente ou sem solvente (GUALLAR-HOYAS et al., 2012), em análises *targeted* ou *non-targeted* (PEREIRA; MARTIN, 2014) e executadas em modo *on-line* ou *off-line* (CALDAS et al., 2011). Por ser um método exaustivo e possuir estas possibilidades de uso em metodologias de extração, a SPE permite adaptações para diferentes técnicas analíticas instrumentais (SIMPSON, 2000), tornando-a adequada para análises de compostos orgânicos e inorgânicos em diferentes matrizes, tais como amostras aquosas, gasosas, biológicas, clínicas, ambientais e alimentícias, entre outras (BIELICKA-DASZKIEWICZ, 2015; BOYACI et al., 2015). A Figura 6 mostra a metodologia SPE usada *in vivo* e *in situ* na extração de COVs do *Kobus ellipsiprymnus*, uma espécie de antílope que vive na África subsaariana, para avaliar os voláteis emitidos pelo animal e que são atrativos para as moscas tsé-tsé (*G. morsitans*).

Comparada à metodologias que utilizam-se da extração por solvente, a SPE possui maiores vantagens como simplicidade, alto rendimento, robustez e, em muitos casos, menor custo, além de permitir mais facilmente a automação para análises de rotina (LI; RIVORY; CLARKE, 2006).

² O termo “coluna” é somente aplicado à parede do tambor da seringa usada na extração. O termo “cartucho” é usado de modo intercambiável com o formato coluna, porém o seu uso é preferível por evitar confusão com a coluna analítica.

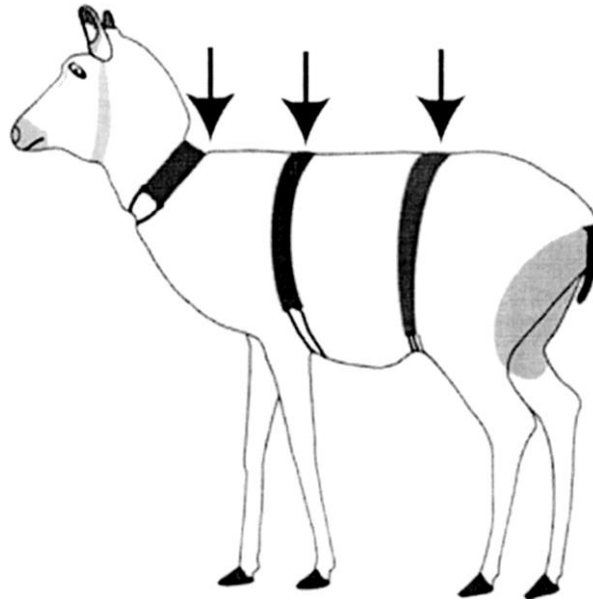


Figura 6. Cintos com adsorventes presos em Waterbuck. Fonte: GIKONYO et al., 2002.

Apesar de prover maior quantidade em massa de analito, MILLAR; HAYNES (1998) fazem notar que a técnica apresenta quatro pontos negativos na ecologia química:

1. Os extratos são misturas complexas de compostos voláteis e não volatéis e, se o objetivo for isolar algum composto puro, numerosos passos de fracionamento tornarão o trabalho factível, porém trabalhoso.
2. O perfil de voláteis coletados pode não ser representativo do perfil de voláteis liberados da matriz quando se desconhece o mecanismo de liberação de voláteis. Por exemplo, se a análise é *in vivo*, situações de *stress* farão o organismo liberar voláteis que não são de interesse, como os voláteis de folha verde (acetato de (Z)-3-hexenal, (Z)-3-hexenol e (Z)-3-hexenila) que são produzidos por oxidação de ácidos graxos em tecidos de plantas.
3. Se em alguma etapa houver aquecimento, compostos de interesse podem ser degradados ou sofrer rearranjos.
4. O uso de solvente pode ocasionar perda de voláteis durante etapas de eluição ou pré-concentração.

Com base nestas desvantagens, é indutivo concluir que metodologias usando SPE que tenham conhecimento e tratamento adequado da matriz, condições brandas de aquecimento e que sejam livres de solvente, mostram-se altamente vantajosas na extração de voláteis.

3.5.2 Técnicas analíticas para a determinação de COVs

A diversidade de compostos em metabolômica é incomparavelmente maior do que na proteômica (arranjo de 20 aminoácidos) e na transcriptômica (arranjo de quatro bases nucleotídicas ligados à estrutura de açúcar e fosfato). Metabólitos possuem grandes variações em suas propriedades químicas (peso molecular, solubilidade e polaridade) e física (volatilidade) em graus de concentração que variam de mmol à picomol (DUNN; ELLIS, 2005). Uma única técnica que mapeie o metaboloma (conjunto de todos os metabólitos) de um organismo vivo ou responda todas as perguntas levantadas por pesquisadores sobre a relação de metabólitos e a comunicação ou resposta metabólica de organismos vivos, infelizmente, não existe.

O que existe de fato é uma combinação de várias técnicas analíticas que são aplicadas de forma otimizada e interdisciplinar para atender ao objetivo da análise. Para isso, a sequência analítica normal é: isolamento, concentração, separação, identificação e bioensaio, com uma ou mais etapas desta sequência podendo ser omitidas a depender do objetivo da análise, da matriz e da metodologia de extração escolhida (BERGSTROM, 2008; MAGALHÃES-JÚNIOR et al., 2014; THOMAZINI, 2012).

Várias plataformas analíticas têm sido apresentadas em metabolômica, incluindo espectroscopias, como Espectroscopia de Infravermelho (IR), Infravermelho próximo (NIR) ou Ultravioleta (UV), além de técnicas cromatográficas hífenadas GC-MS, GC-FID, LC-ESIMS, CE-MS e LC-NMR, entre outras técnicas (ORAV; VIITAK; VAHER, 2010; RAVAGNANI et al., 2012).

Em termos de instrumentação analítica, atualmente, as duas principais plataformas de detecção em metabolômica são: Espectrometria de Massas (MS)

e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). E se o propósito é a separação, as principais abordagens ainda são cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC) (BOJKO et al., 2014). A matriz e a metodologia de amostragem de compostos voláteis escolhida, praticamente definem a técnica analítica a ser utilizada. Se, por exemplo, o metabólito encontra-se no plasma sanguíneo, a LC diminuirá o grau de manipulação da matriz, mas se o metabólito é volátil, GC se mostra como a melhor alternativa. Se a quantidade, por exemplo, de ferômonio obtido estiver na faixa de nanogramas ou picogramas, a faixa em que geralmente são emitidas, a elucidação da estrutura através da NMR não é viável sem uma etapa de concentração, redundando em mais tempo, material de análise e maior manipulação da matriz. Assim, a MS seria uma melhor alternativa (ROBERTSON, 2005).

De fato, a escolha da técnica instrumental passa por critérios menos superficiais do que os exemplos citados, entretanto, para a análise de metabólitos voláteis a técnica mais utilizada é a GC-MS. Vários fatores contribuem para esta escolha como possibilidades de análises qualitativas, quantitativas, rápidas, sensíveis, seletivas e a capacidade de cobrir uma ampla faixa de metabólitos (BERGSTROM, 2008; DUNN; ELLIS, 2005; THOMAZINI, 2012).

As abordagens modernas em metabólitos voláteis contam com inovações que permitem medidas acuradas de alta resolução em poucos minutos. O desenvolvimento rápido e recente das plataformas analíticas GC, HPLC, UPLC, CE acopladas a MS ou NMR permitem a separação, detecção, caracterização e quantificação de metabólitos, porém, nenhuma delas é suficientemente capaz de medir todos os metabólitos do organismo ou sistema a que se propõe estudar (ZHANG et al., 2012). Além da hifenização, algumas abordagens têm somado significativamente na análise de metabólitos voláteis. Entre estas abordagens, pelo menos duas merecem um destaque especial: a Dessorção Térmica (TD) e a Eletroantenografia. A TD é uma técnica facilmente automatizada e que, acoplada a um cromatógrafo a gás, permite análises de voláteis, abrindo mão da extração por solvente. Somente por esta perspectiva, é impossível deixar de notar vantagens como menor manipulação da matriz, não diluição da amostra, não ocorrência de solvólise, menor risco de perda de metabólitos voláteis que

podem ser obtidos no extrato (eluato) ou que podem ser perdidos na etapa de pré-concentração, ausência de interferência por um grande pico de solvente no cromatograma e menor gasto de tempo (KANNO; SUGIMOTO, 1995; VILELA et al., 2001).

A técnica consiste em uma dessorção primária dos compostos coletados no cartucho adsorvente, auxiliados pelo aquecimento do cartucho e um alto valor de vazão de gás inerte, para um trap contendo adsorvente sólido em temperatura muito baixa. Antes de chegar ao trap, parte destes compostos podem ser descartados ou pode-se eliminar seletivamente compostos indesejados através do uso opcional do split 1. Os compostos aprisionados no trap são rapidamente aquecidos e arrastados para a coluna em um tipo de injeção “on-column” na forma de uma estreita banda de vapor, que mitiga o efeito de espalhamento das bandas e favorece a determinação de componentes da mistura termicamente instáveis. Essa dessorção secundária que ocorre a partir do trap, também pode, opcionalmente, eliminar compostos através do Split 2. Os componentes da mistura são separados na coluna e após a detecção, é gerado o cromatograma. A Figura 7 apresenta estas etapas simplificadas.

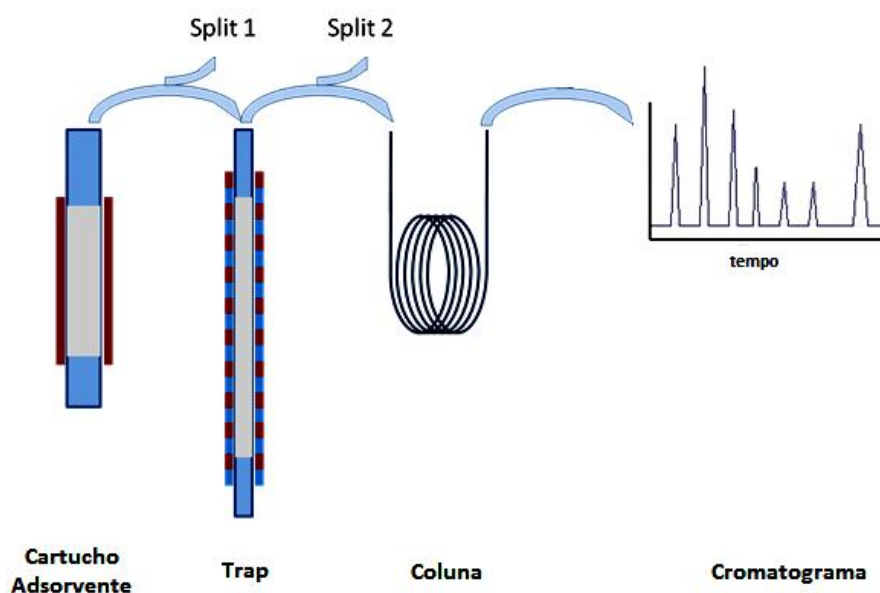


Figura 7. Esquema simplificado de dessorção térmica a partir de cartucho adsorvente.

Mesmo sua principal desvantagem, a degradação de compostos termolábeis, tem sido contornada com processos de dessorção brandas em um equilíbrio eficiente de menor temperatura e maior vazão de dessorção com gás

inerte. Assim, o complexo volátil do metaboloma de um sistema pode ser facilmente notado nas centenas de compostos extraídos por esta técnica (SPE-TD-GC-MS) em comparação com as dezenas obtidas por outras técnicas.

A eletroantenografia é uma técnica que, ao ser acoplada a um cromatógrafo a gás, possibilita a realização de um bioensaio para a detecção de estimulantes olfatórios presentes em uma mistura de voláteis que causam resposta fisiológica no inseto, usando apenas a antena do inseto como biossensor (ARN; STÄDLER; RAUSCHER, 1975; SYNTECH, 2004). A técnica não é um fim em si mesma. Dela pode se extrair informações sobre quais voláteis estão relacionados a uma resposta fisiológica do inseto, contudo, saber se o volátil funciona como atrator, estimulante alimentar, repelente ou deterrente só pode ser verificado em um bioensaio comportamental. Assim a eletroantenografia responde à pergunta “o que?”, enquanto o posterior bioensaio responde a pergunta “como?”, reduzindo um estudo com centenas de voláteis a apenas algumas unidades.

Algo digno de nota sobre esta técnica, é que, apesar da MS estar abalizada na literatura científica como detector em metabólitos voláteis (BERGSTROM, 2008), ela não permite a hifenização com GC quando este está hifenado ao EAD. A causa, é o fato do eluente da coluna cromatográfica ser dividido entre o detector (FID) e a antena do inseto, o biossensor do detector EAD (VILELA et al., 2001). O vácuo criado pelo detector MS impediria que o efluente da coluna chegasse à antena do EAD impossibilitando a detecção simultânea que é um dos privilégios da técnica GC-FID/EAD. Além do mais, o tempo de retenção dos compostos sob vácuo no MS seriam diferentes daqueles obtidos no EAD sob pressão positiva, dificultando a comparação dos picos nos cromatogramas (BYERS, 2004). Devido a esta limitação, FID é o detector mais utilizado em análises com detecção simultânea com o EAD.

Atualmente, raros são os trabalhos de elucidação de estruturas que não utilizam a combinação GC-FID/EAD graças à sua especificidade (VILELA et al., 2001). Assim, apesar da sensibilidade do FID ser menor que a do MS e a divisão do efluente para dois detectores diminuir a sensibilidade do FID pela metade (BYERS, 2004), o seu amplo uso, graças a sua especificidade, atesta sua

eficiência em detecção de metabólitos voláteis. Na FIGURA 8 é mostrado um detector EAD juntamente com um FID hifenados ao GC.

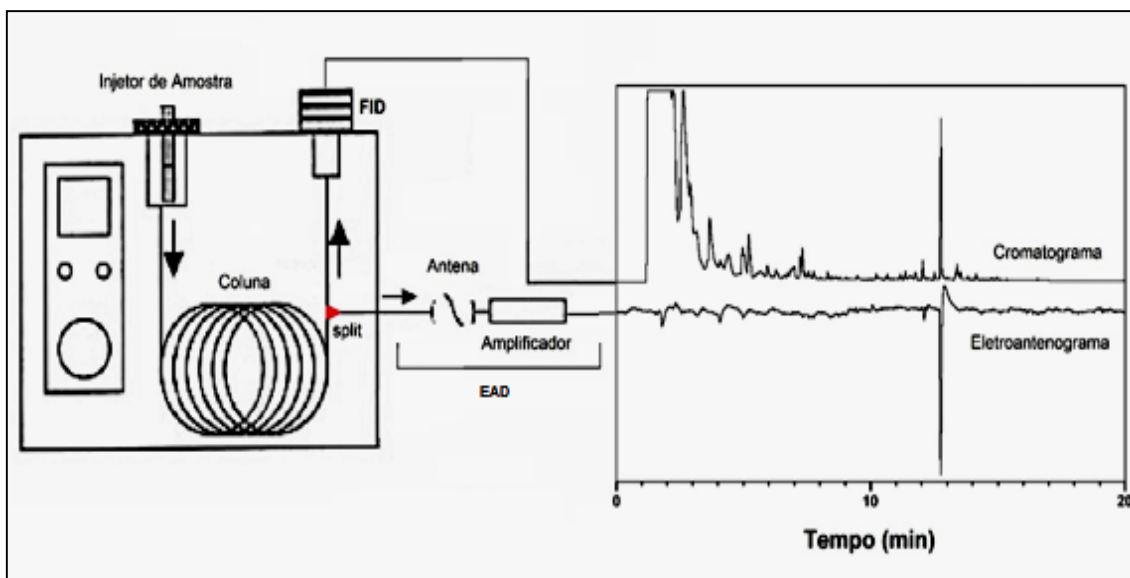


Figura 8. Detecção específica de um infoquímico a partir da geração simultânea de um cromatograma e um eletroantenograma no GC-FID/EAD.

3.6 Quimiometria

O grande volume de dados obtidos a partir de métodos de extração de voláteis e técnicas analíticas em organismos vivos, não diz nada em si mesmo e é de difícil interpretação. Não somente por desconhecer o gene responsável pela emissão de determinados voláteis, mas também porque sistemas biológicos são facilmente perturbados por fatores ambientais ou experimentais, tais como idade, dieta, fase de crescimento, nutrientes, pH, sexo e temperatura (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ; PRIEGO-CAPOTE; DE CASTRO, 2010a;2010b). A depender dos organismos estudados, o número de metabólitos podem variar de centenas à milhares de centenas (DUNN; ELLIS, 2005). Segundo BROWN et al. (2005) os dados metabolômicos são gerados:

- Por uma grande variedade de organismos (humanos, micróbios, plantas)

- Usando um número de diferentes abordagens (*metabolic profiling*, *fingerprinting* ou *targeted* e etc.)
- Usando um número de diferentes técnicas analíticas
- Por muitas aplicações (Determinação de toxicidade, diagnósticos, determinação da função de um gene e etc.)

Nesta etapa da ciência entra uma ferramenta poderosa em tratamento de dados: a quimiometria. FERREIRA (2015) a define como uma disciplina que se utiliza de fundamentos matemáticos aliados a recursos de informática com o objetivo de otimizar e avaliar dados de origem química em experimentos, extraindo assim, o máximo de informações destes experimentos. Dada a sua aplicabilidade em análises de metaboloma, há quem sugira que nenhum bom artigo de revisão sobre metabolômica é completo sem mencionar a quimiometria (ROBERTSON, 2005).

As quatro etapas para a identificação de voláteis que intermedeiam a comunicação entre organismos vivos, citados por BERGSTROM (2008), podem ser otimizadas via quimiometria: Isolamento de volatéis a partir de uma matriz (DE OLIVEIRA et al., 2008), Separação cromatográfica (FERREIRA et al., 2007), Identificação (MAGALHÃES-JÚNIOR et al., 2014a) e bioensaio comportamental (MAGALHÃES-JÚNIOR et al., 2014b). Ver Figura 9.

Pelo menos em duas destas etapas a quimiometria merece destaque adicional. A primeira é o planejamento de métodos de extração de voláteis a partir do planejamento fatorial, a fim de avaliar os fatores que interferem significativamente na resposta e, assim, excluir fatores insignificantes e diminuir o número de experimentos sem prejuízo na interpretação dos dados (OLIVEIRA et al., 2008) . Este tipo de planejamento reduz custo e tempo. Usualmente, este planejamento é seguido de otimização via metodologia de superfície de resposta (MSR), cujo objetivo final é desenvolvimento, melhoria e otimização de processos (FERREIRA, 2015). A segunda é o tratamento do grande volume de dados obtidos a partir da etapa de identificação que, em metaboloma, geralmente é obtido por MS ou NMR (OKADA et al., 2010). Aqui está um dos grandes trunfos da análise *non-targeted* de metabólitos voláteis: processar um

complexo e grande volume de dados a fim de extrair o máximo de informações sobre o sistema de estudo, através da redução de dados, agrupamento de dados e abordagem visual de fácil interpretação (KOTŁOWSKA, 2014). As duas ferramentas quimiométricas mais populares para este tipo de processamento são Análise de Componentes Principais (PCA) e Mínimos Quadrados Parciais (PLS) (WORLEY; POWERS, 2013). O objetivo destas ferramentas é identificar as diferenças de classe a partir de um conjunto de dados multivariados. Em metabolômica, uma classe pode referir-se a qualquer classificação biologicamente relevante, tais como, seres humanos tratados com uma dieta ou medicamento específico; ou células expostas a stress ambiental (WORLEY; POWERS, 2013). Além da possibilidade de redução de dados através da PCA, a PLS e métodos supervisionados, permitem uma investigação do metaboloma em um sistema biológico, cuja informação de interesse pode estar mascarada pelo background de outros efeitos grandes e multiplexados, como em estudos epidemiológicos, ambientais ou nutricionais (FONVILLE et al., 2010). Um exemplo notável do uso da PLS em fármaco-metabolômica foi a possibilidade de prever a resposta individual a uma agressão tóxica antes da administração do fármaco, o que possibilita o tratamento medicamentoso personalizado de um paciente (CLAYTON et al., 2009; CLAYTON et al., 2006).

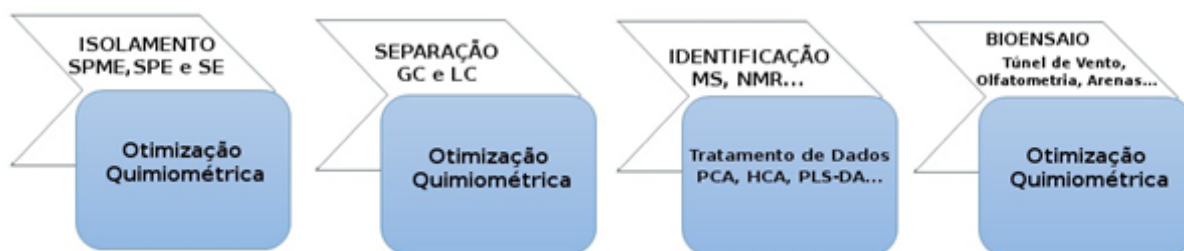


Figura 9. Utilização da quimiometria em todos os processos da análise de metabólitos voláteis.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do pelo e seleção dos grupos de cães

Está sendo realizado um estudo transversal, com avaliação clínica e laboratorial de cães domiciliados em área endêmica da Bahia, de forma randomizada e aleatória. Esta etapa do trabalho é realizada em colaboração com o Laboratório de Patologia e Biointeração (LPBI) localizado no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e o Laboratório de Infectologia Veterinária da Escola de Medicina Veterinária da UFBA, que são responsáveis pelo diagnóstico laboratorial dos animais. São coletadas amostras de sangue, baço e pelo de animais residentes no município de Camaçari, Bahia. Todas as coletas são obtidas com o consentimento do guardião, e as visitas são sempre realizadas com a presença de um agente de saúde do município, médicos veterinários e estudantes de Medicina Veterinária, os quais realizaram as análises clínicas e coleta dos materiais.

4.1.1 Avaliação clínica dos cães e coleta de amostras biológicas

Os cães foram avaliados clinicamente para observação do estado físico geral e foram registrados os sinais compatíveis com a LV. No momento da avaliação clínica, foram coletadas as amostras de sangue, baço e pelo. As amostras de sangue e baço foram encaminhadas para o Laboratório de Patologia e Biointervenção da FIOCRUZ- Bahia, para posterior realização das técnicas diagnósticas.

Na coleta de pelo canino, as hastes dos pelos foram retiradas da região dorsal do animal com a utilização de uma lâmina cortante descartável. Foram realizados movimentos de raspagem a favor do pelo, sem que a lâmina entre em contato com sangue ou pele dos animais (Figura 10a). A amostragem foi realizada em diferentes pontos do dorso de cada animal, sendo coletados pelo menos 800 mg de pelo. As amostras foram armazenadas individualmente em sacos plásticos selados e levados para a extinta Empresa Baiana de

Desenvolvimento Agrícola e atual Centro Tecnológico da Agropecuária - CETAB/SEAGRI, onde ficaram armazenadas a +4°C até a realização das análises (Figura 10b).

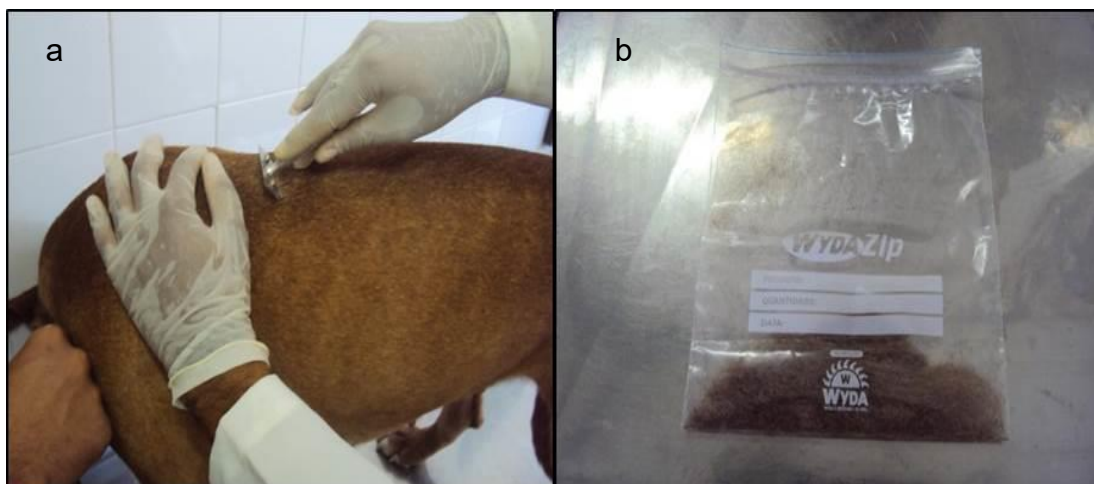


Figura 10. Coleta de pelo canino e (b) acondicionamento do pelo.

4.1.2 Diagnóstico laboratorial dos cães

O diagnóstico de positividade dos cães foi realizado pelo teste qPCR (do inglês *Quantitative Polymerase Chain Reaction*) de sangue e baço. O qPCR, também conhecido como PCR em tempo real, é um exame molecular muito sensível e específico, que detecta e quantifica o material genético de um determinado agente etiológico encontrado em uma amostra qualquer. No nosso estudo, esta técnica foi utilizada para diagnosticar e classificar os cães de acordo com a carga parasitária de *Leishmania* encontrada nas amostras, além de definir a positividade dos animais. Desta forma, os animais que apresentavam um valor de *Leishmania* inferior a 1000 unidades médias foram considerados com baixa carga parasitária, enquanto os animais que apresentaram valores de *Leishmania* acima de 1500 unidades foram considerados com alta carga parasitária. Os cães que não foram encontrados valores de *Leishmania* nas amostras analisadas, foram considerados negativos. Ver anexo.

4.2 Otimização do método de extração dos COVs

4.2.1 Seleção do adsorvente

A primeira etapa do trabalho consistiu em selecionar o tubo adsorvente que melhor coletasse e liberasse por dessorção térmica uma maior quantidade de COVs da amostra. Segundo a literatura, um único adsorvente não é capaz de coletar todos os tipos de COVs de uma ampla faixa de graus de volatilidade (SUPELCO, 2002). Cada tipo de adsorvente com suas características é capaz de adsorver fisicamente uma faixa limitada de voláteis e semivoláteis. O uso de tubos adsorventes multicamadas tem ampliado a faixa de voláteis que podem ser adsorvidos e liberados em apenas um tubo.

Para a seleção do tubo adsorvente, foram utilizados 3 tipos diferentes de tubos adsorventes, onde dois destes são tubos adsorventes multicamadas constituídos por Carbopack B, Carboxen-1000, Tenax TA e Tenax GR:

- Tubo 1: Tenax TA
- Tubo 2: Tenax GR e Carbon Graphitized Black (Carbopack B)
- Tubo 3: Tenax TA, Carbon Graphitized Black (Carbopack B) e Carbon Molecular Sieves (Carboxen-1000)

Esta seleção consistiu em manter fixas as condições de extração e variar os tubos adsorventes, utilizando o valor da área total e o número dos picos do cromatograma como resposta analítica para se definir qual tubo oferece maior área total e maior número de picos por tubo. As condições fixas para a extração foram 90 °C para a temperatura de extração, 0,4 L·min⁻¹ para a vazão de amostragem, 100 mg de massa de pelo, e 60 minutos para o tempo de extração. A amostra de pelo foi a mesma para os três tipos de tubos adsorventes.

4.2.2 Planejamento Multivariado

Após a escolha do tubo adsorvente, foi realizado um planejamento fatorial completo de dois níveis 2^4 para triar fatores que afetam o processo de extração dos compostos orgânicos voláteis do pelo canino. A escolha dos fatores foi realizada com base no trabalho de Oliveira et al., (2008), acrescentando o fator “vazão de amostragem” que é um fator passível de investigação em análises por SPE. Assim, os fatores analisados foram: tempo de extração, vazão de amostragem, massa de pelo e temperatura de extração. Neste contexto a variável resposta considerada foi a área total do cromatograma. Os níveis analisados são apresentados na Tabela 2. Esta primeira análise quimiométrica permitiu identificar quais fatores tiveram efeito relevante sobre a resposta e, como um fator é influenciado à medida que se percorre os níveis de outros fatores.

Tabela 2. Fatores e níveis do planejamento fatorial completo 2^4 para otimização do método de extração de COVs de pelo canino.

Fatores	Símbolo	(-1)	0	(+1)
Tempo de extração (min)	t_{ext}	20	40	60
Temperatura de extração (°C)	T_{ext}	50	70	90
Massa de pelo (mg)	MP	70	100	130
Vazão de Amostragem ($L \cdot min^{-1}$)	VA	0,2	0,4	0,6

O estabelecimento do planejamento fatorial completo resultou em um total de 19 ensaios dos quais, três se referem a triplicata do ponto central. Este planejamento foi aleatorizado. Na Tabela 3, os fatores são apresentados em valores reais e não aleatorizados para facilitar a observação dos valores entres os níveis mais altos e mais baixos de cada fator.

Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial completo 2^4 em valores reais.

Experimento	t_{ext} (min)	VA (L·min⁻¹)	T_{ext} (°C)	MP (mg)
1	20	0,2	50	70
2	60	0,2	50	70
3	20	0,6	50	70
4	60	0,6	50	70
5	20	0,2	90	70
6	60	0,2	90	70
7	20	0,6	90	70
8	60	0,6	90	70
9	20	0,2	50	130
10	60	0,2	50	130
11	20	0,6	50	130
12	60	0,6	50	130
13	20	0,2	90	130
14	60	0,2	90	130
15	20	0,6	90	130
16	60	0,6	90	130
17 (C)	40	0,4	70	100
18 (C)	40	0,4	70	100
19 (C)	40	0,4	70	100

Após a identificação de quais fatores exerciam influência na extração de COVs, foi utilizada uma metodologia de superfície de resposta com o objetivo de encontrar as condições em que o procedimento adotado resulta na melhor resposta possível, neste caso, um valor máximo da área total do cromatograma. Para a metodologia de superfície de resposta, foi escolhido o planejamento composto central, haja vista que este é o planejamento mais utilizado para o desenvolvimento de procedimento analíticos (Bezerra et al., 2008). Os fatores investigados nesta etapa foram “tempo de extração” e “vazão de amostragem”.

A Tabela 4 apresenta os fatores e níveis investigados. Os fatores “temperatura de extração” e “massa de pelo” foram removidos nesta etapa do processo de otimização. Assim, para a temperatura de extração foi fixado o valor de 90 °C e massa de amostragem de 130 mg, conforme valores otimizados por Oliveira et al., (2008).

Tabela 4. Níveis avaliados das variáveis “tempo de extração” e “vazão de amostragem” na metodologia de superfície de resposta por composto central.

Fatores	(-1)	PC	(+1)	-α	+α
t_{ext} (min)	80	130	180	59,2893	200,7107
VA (L.min ⁻¹)	0,3	0,575	0,85	0,186091	0,963909

O planejamento composto central requer $N = k^2 + 2k + C_p$ experimentos, onde k é o número de fatores e C_p é o número de replicatas do ponto central. Como visto na Tabela 4, entre os experimentos realizados no composto central também estão os pontos axiais, também conhecidos como pontos estrela, cujos valores para o sistema com dois fatores são $\alpha = \pm\sqrt{2}$ (FERREIRA et al., 2007). É importante ressaltar que, assim como o planejamento fatorial, o planejamento composto central para a metodologia de superfície de resposta também foi executado aleatoriamente conforme ordem previamente definida pelo *software*. A Tabela 5 apresenta os valores reais dos fatores para a metodologia de superfície de resposta planejamento composto central (MSR-PCC) e, assim como no planejamento fatorial, a ordem apresentada na tabela é apenas para facilitar a observação de como os ensaios foram executados.

Tabela 5. MSR-PCC para os fatores Tempo de extração (t_{ext}) e Vazão de amostragem (VA).

Experimentos	t_{ext}	VA (L·min⁻¹)
1	80	0,3
2	80	0,85
3	180	0,3
4	180	0,85
5	59,2893	0,575
6	200,7107	0,575
7	130	0,1861
8	130	0,9639
9 (C)	130	0,575
10 (C)	130	0,575
11 (C)	130	0,575

4.3 Método de Extração dos COVs do Pelo Canino

Após a otimização dos fatores de extração, foram utilizados 130 mg de amostra de pelo em cada análise, sendo que cada animal foi avaliado em triplicata. O pelo foi pesado dentro de um *vial* modificado de borossilicato em forma de “L”. À extremidade inferior do *vial* foi acoplada uma bomba de ar comprimido através de tubulação de teflon e conectores de aço inoxidável. Antes de chegar ao *vial*, a bomba comprime o ar ambiente e empurra-o através de conexões de teflon através de um sistema purificador composto por carvão ativo e peneira molecular 13X e, em seguida, chegava ao *vial* que continha a amostra. O *vial* modificado era aquecido a 90 °C sobre uma placa de aquecimento com um bloco de alumínio em seu entorno. A extremidade superior do *vial* de amostragem era conectada ao tubo adsorvente multicamada composto, segundo ordem de entrada do fluxo de ar proveniente do *vial* de amostragem, por Tenax

TA, Carbopack B e Carboxen-1000. Na outra extremidade do tubo adsorvente, era conectado um medidor de vazão em acrílico, cujo valor foi mantido em $0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 106 min. Após o término da amostragem, o tubo adsorvente era colocado no dessorvedor térmico para análise cromatográfica. As etapas para extração dos COVs aqui descritos, podem ser visualizados na Figura 16.



Figura 11. Etapas para a extração de COVs de pelo canino

4.4 Análise Cromatográfica via TD-GC-FID e GC-MS

4.4.1 TD-GC-FID

Os COVs coletados foram dessorvidos com o uso de um sistema de dessorção térmica TD-20 (Shimadzu, Japão) para o cromatógrafo GC2010 Plus (Shimadzu, Japão) (Figura 11a), através de uma coluna capilar DB-1MS (30m X 0,25 mm ID x 0,25 μm) e detecção por ionização em chama (FID); vazão para o gás carreador He 0,70 mL $\cdot\text{min}^{-1}$. As condições para a dessorção térmica foram: temperatura do bloco de dessorção de 280 °C por 5 min com vazão de amostragem de 60 mL $\cdot\text{min}^{-1}$. A programação de temperatura para a coluna foi de 40 °C por 3 min, 2 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ até 130 °C, 130 °C por 15 min, 2 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ até 245°C, 245°C por 4 min, perfazendo um total de 124,50 min de análise.

4.4.2 GC-MS

As condições de separação e identificação no GC-MS (Figura 11b) foram: coluna capilar DB-1MS (30m X 0,25 mm ID x 0,25 μm); vazão do gás de arraste He 0,70 mL $\cdot\text{min}^{-1}$; programação de temperatura: 40 °C por 3 min, 2 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ até 130 °C, 130 °C por 15 min, 2 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ até 245 °C, 245 °C por 4 min (total de 124,5 min); injetor no modo “splitless” e temperatura de 240 °C; temperatura da linha de transferência de 240 °C; temperatura da fonte de íons de 240 °C; energia de impacto de elétrons de 70 eV.



Figura 12. (a) Cromatógrafo a gás acoplado a detector FID e unidade de dessorção térmica. (b) Cromatógrafo a gás acoplado a detector MS.

4.5 Identificação dos compostos

A maneira mais segura de identificar um composto em cromatografia é usar um padrão autêntico que permite fazer uma comparação direta entre o analito sob investigação e o padrão autêntico, quando as condições de análise são as mesmas para ambos. Os índices de retenção como Índice de Retenção com Programação Linear de Temperatura (LTPRI, do inglês, *Linear Temperature Programmed Retention Index*) usado em programação linear de temperatura e o Índice de Kovats (KI, do inglês *Kovats index*) usando em cromatografia com programação de temperatura são os mais conhecidos e, também, são economicamente mais viáveis que o uso de padrões analíticos, já que neste caso é necessário obter somente o padrão de uma série homóloga de interesse para que os componentes de uma mistura sejam identificados.

A metodologia usada nos índices de retenção consiste em injetar no cromatógrafo uma série homóloga nas condições de análise da amostra e utilizando os valores do tempo de retenção ajustado do analito sob investigação e os tempos de retenção do composto anterior e posterior a este analito e, aplicando estes dados na equação adequada, obtém-se o índice de retenção, cujo valor não muda, independente das condições cromatográficas tais como comprimento da coluna, espessura, diâmetro, pressão, velocidade do gás carreador e etc. Este índice de retenção obtido é comparado com os índices de retenção de compostos listados em uma base de dados especializada e, o composto que apresentar o mesmo valor ou um valor muito próximo é, provavelmente, o composto desconhecido.

Neste trabalho, foram utilizados dois métodos para a identificação dos compostos. O primeiro foi a injeção de padrão analítico via dessorção térmica e, o segundo, através do índice de retenção chamado Índice de Kovats.

Os padrões analíticos foram indiretamente diluídos para 5 ppm e, ao serem utilizados, 1 µL do padrão era adicionado diretamente no tubo adsorvente e dessorvido termicamente. Foram utilizados os seguintes padrões analíticos certificados da Sigma-Aldrich: padrão de hidrocarbonetos C₈ – C₄₀, hexanol,

heptanal, benzaldeído, heptanol, 1-octen-3-ol, octanal, octanol, nonanal, nonanol, decanal, 8-pentadecanona, heptadecanal.

Para a identificação por KI foi realizada uma extração com os parâmetros otimizados de uma amostra de pelo de um cão infectado. Usando 1 mL de hexano (grau HPLC, Sigma-Aldrich) como solvente extrator e pré-concentrando o eluato para 500 µL, injetou-se 1 µL no GC-MS. O cromatograma obtido por esta análise foi utilizado para a identificação de picos por injeção de padrão no TD-GC-FID.

A correspondência entre o pico não identificado no TD-GC-FID e o investigado no GC-MS foi realizada por comparação entre o KI no TD-GC-FID e o KI no GC-MS. Um padrão analítico de n-alcenos (C₈-C₄₀) como série homóloga de referência foi injetado em ambos os equipamentos e, utilizando-se o tempo de retenção do pico sob investigação e os tempos de retenção do hidrocarboreto anterior e posterior deste pico na equação 4.1, foram obtidos os KI experimentais dos compostos sob investigação e comparados aos KI de base de dados especializadas. Na fórmula, o t'_R é o tempo de retenção ajustado, i é analito, n é o número de carbonos do padrão adjacente menos retido, e n + 1 é o número de carbonos do padrão adjacente mais retido.

$$KI = 100n + 100 \left(\frac{\log t'_{R(i)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \right) \quad \text{Equação 4.1}$$

4.6 Análise de dados

4.6.1 Análise multivariada dos dados

A análise multivariada foi realizada avaliando 39 COVs emitidos a partir do pelo de 105 amostras arranjadas em três grupos com 36 amostras em G1(cães com ausência do parasita), 36 amostras em G2(cães com baixa carga parasitária) e 33 amostras em G3(cães com alta carga parasitária). Os compostos químicos identificados foram analisados em triplicata por TD-GC-FID,

sendo que as áreas relativas obtidas a partir das diferentes amostras foram arranjadas em uma matriz 36 x 105.

Uma avaliação exploratória inicial do conjunto de dados foi realizada por Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) para identificar possíveis tendências de agrupamento e/ou discriminação dos três conjuntos de amostras definidos. Subsequentemente a matriz de dados foi avaliada por Análise Discriminatória pelo Método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) (BRERETON, 2009).

O PLS-DA é uma técnica multivariada que utiliza o perfil dos COVs para classificar amostras entre os três diferentes grupos de amostras de cães. O refinamento do modelo PLS-DA foi realizado selecionando os COVs mais importantes para discriminar os grupos, sendo utilizadas como técnicas a Regressão Linear Múltipla com Algoritmo Genético (MLR-GA, do inglês *Multiple Linear Regressions Genetic Algoritm*) e a regressão linear em passos (Stepwise MLR, do inglês *Stepwise Multiple Linear Regression*) (CENTNER et al., 2000).

Os cálculos por PLS-DA foram realizados empregando o pacote Unscrambler 9.1 software (CAMO, Norway), enquanto para seleção de variáveis por algoritmo genérico e regressão linear em passos foram utilizados códigos escritos para Matlab (Mathworks, USA). A única etapa de pré-processamento dos dados foi a centragem na média e a validação cruzada completa, que foram empregadas para avaliar a qualidade dos modelos.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Classificação dos Cães

A partir dos animais aleatoriamente avaliados na área endêmica, selecionou-se o pelo de 35 cães com perfis clínicos e parasitológicos distintos e distribuídos em três grupos: (G1) 12 cães hígidos clinicamente e apresentando nenhum grau de parasitismo segundo a qPCR; (G2) 12 cães positivos na técnica de qPCR, porém que apresentavam baixa carga parasitária (0,11 a 992 unidades médias de *Leishmania*); e (G3) 11 cães positivos na técnica de qPCR e apresentando alta carga parasitária (1566 a 1498224 unidades médias de *Leishmania*). Não foi feita distinção de sexo, idade ou raça entre os animais examinados.

Os dados com os resultados do teste diagnóstico detalhado com os valores da carga parasitária para qPCR, são apresentados no Anexo.

5.2 Seleção do tubo adsorvente

Foi observado que nas análises em branco, alguns picos são característicos do tubo adsorvente e não existe nenhuma relação com a extração de COVs. Para que estes picos não interferissem no resultado final da seleção do tubo adsorvente, foram usados os valores do número de picos e área total de análises branco para serem subtraídos da análise normal.

O tubo multicamada número 3, composto por Tenax TA, *Carbon Graphitized Black* (Carbopack B) e *Carbon Molecular Sieves* (Carboxen-1000), foi selecionado por apresentar maior valor médio de picos e de área total. Os resultados estão expressos na Figura 12. A literatura respalda o tubo adsorvente selecionado com a ideia de que tubos formados com leitos adsorventes fracos, médios e fortes, no sentido de adsorção, podem coletar uma maior faixa de COVs (SUPELCO, 2002). Ademais, tubos multicamadas são os que apresentam as qualidades consideradas ideais para um tubo adsorvente (LEE et al., 2006).

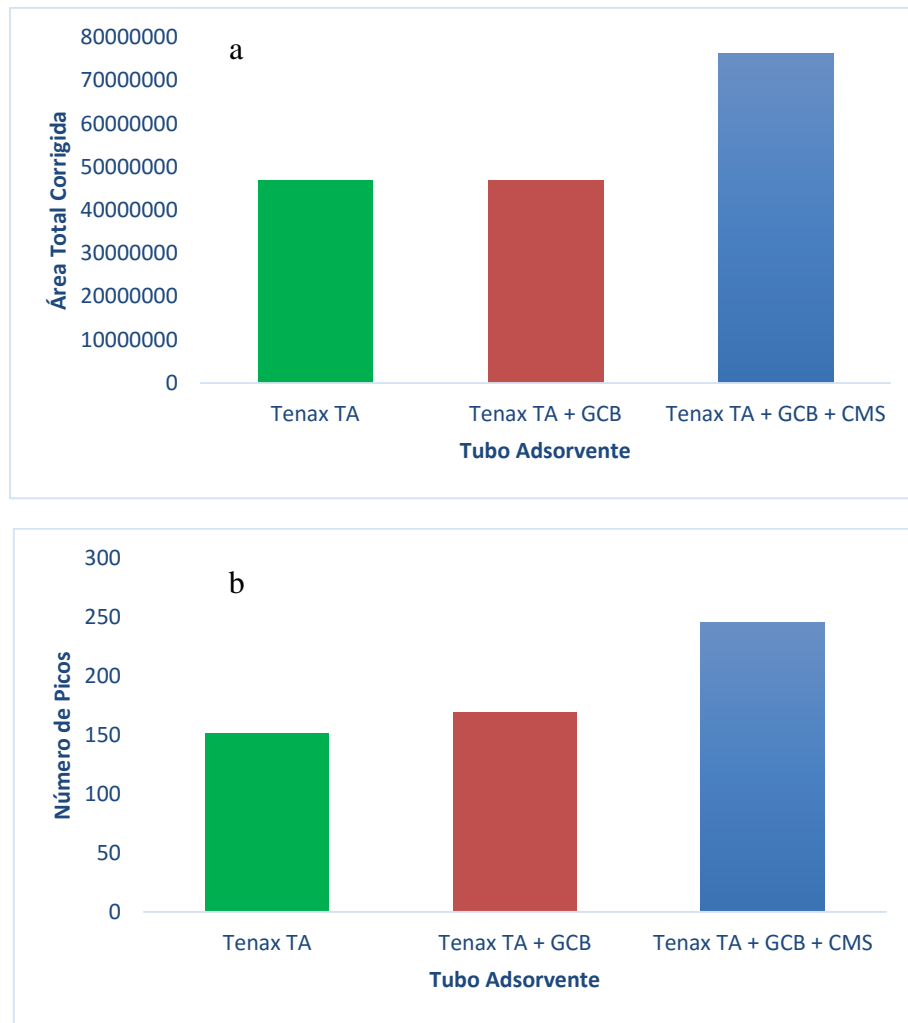


Figura 13. a) Área total em counts e b) número de picos obtidos para cada tubo adsorvente

A combinação de boas características de adsorção e dessorção do Tenax TA (óxido (poli)-2,6-difenil-p-fenileno), o torna um dos adsorventes poliméricos mais amplamente utilizados na extração de voláteis (KROUPA et al., 2004). Porém, este adsorvente apresenta picos característicos como artefatos, que podem gerar falsos positivos. Lee et al., (2006) relatam que o mecanismo pelo qual estes artefatos são produzidos ainda é desconhecido, mas já se tem identificado que sua formação está relacionada à decomposição química de compostos na presença de oxidantes, tais como O_3 e NO_x , sendo o ozônio o principal oxidante na geração de artefatos. Quando sua concentração é maior que 1000 ppb e possui alto grau de penetração de O_3 no leito adsorvente, pode gerar fenol, ácido benzóico, ácido fenilmaléico, fenilbenzoato e n-aldeídos com

cadeia de 6 a 10 carbonos. Segundo os mesmos autores, o carbopack B também gera artefatos na presença de ozônio, tais como 1-octeno e 1-noneno.

É importante salientar que os aldeídos identificados neste trabalho não são falsos positivos oriundos do tenax, mas voláteis característicos do pelo, conforme demonstrado por Oliveira et al., (2008) ao conduzir seu trabalho de extração de COVs utilizando SPME com fibra polidimetilsiloxano/divinilbenzeno.

Na prática, muitos adsorventes geram artefatos, porém duas intervenções mitigam este efeito. O primeiro é diminuir ou impedir que O₃ e NO_x cheguem ao tubo adsorvente. Para tanto, neste trabalho foi utilizado um purificador composto por peneira molecular 13x e carvão ativo para reter possíveis contaminantes. O segundo consiste na realização de um bom condicionamento do tubo adsorvente. Outros polímeros porosos como Porapaks ou Chromosorbs apresentam altos níveis de artefatos entre 5-10 ng, enquanto o Tenax TA apresenta níveis mínimos entre 0.1-1 ng para materiais bem condicionados. O carbopack B e o carboxen-1000 apresentam artefatos inerentes entre 0.01 e 0.1 quando bem condicionados (WOOLFENDEN, 2001).

A umidade é de especial interesse nesta pesquisa, devido aos efeitos adversos relacionados à coleta de voláteis. Dentro da configuração inicial do sistema de extração, estava prescrito a utilização de um umidificador, haja vista que as circunstâncias de extração devem mimetizar a condição natural em que os COVs são exalados. Contudo, a umidade pode diminuir a força de um adsorvente em um fator de 10 para *Carbon Molecular Sieves* (CMS) em umidades elevadas. Afeta diversamente a análise ao condensar água no tubo, permitindo o particionamento entre a fase vapor e a fase aquosa de compostos orgânicos mais polares, gerando resultados não reprodutíveis (WOOLFENDEN, 2001).

A umidade tem um efeito significativo em CMS, uma vez que esta classe de adsorvente, do qual faz parte o carboxen-1000, adsorve, relativamente, grande quantidade de água quando comparada com outras classes de adsorventes (TRABUE et al., 2008). Devido a esta dificuldade, entre outras já citadas, o trabalho foi desenvolvido sem umidificação. A bomba de ar comprimido

expele água a cada 40 min do sistema de extração, adicionalmente, a peneira molecular adsorve a água residual do sistema, reduzindo o teor de água a um nível que não inviabilize a extração

5.3 Planejamentos Multivariados

O planejamento fatorial completo tendo como resposta analítica a área total do cromatograma é apresentado na Tabela 6. Nesta tabela são apresentados os 19 ensaios com seus respectivos valores de área total em ordem padrão, para que os efeitos dos fatores possam ser mais facilmente visualizados.

É possível inferir do planejamento que a partir dos níveis mais altos dos fatores temperatura de extração e massa de pelo, foram obtidos os maiores valores na resposta analítica. Estes resultados são esperados, haja vista que, quanto maior a massa de pelo, maior serão os COVs dela desorvidos e, quanto maior a temperatura de extração, mais favorecida é a cinética de desorção de compostos voláteis a partir do pelo. A Figura 13 do gráfico de Pareto, também atesta esta observação. Baseado no fato de que quanto maior a massa de pelo, maior a quantidade de COVs desorvidos da amostra e que a amostra em estoque disponível no laboratório é limitada, a massa de pelo foi fixada em 130 mg conforme trabalho de Oliveira et al., (2008).

Tabela 6. Planejamento fatorial apresentando a área total em *counts* como resposta analítica.

Experimento	t_{ext} (min)	VA (L·min⁻¹)	T_{ext} (°C)	MP (mg)	Área Total
1	20	0,2	50	70	2391572
2	60	0,2	50	70	5946131
3	20	0,6	50	70	5352113
4	60	0,6	50	70	9646532
5	20	0,2	90	70	19674967
6	60	0,2	90	70	47914045
7	20	0,6	90	70	35026017
8	60	0,6	90	70	81549871
9	20	0,2	50	130	6437266
10	60	0,2	50	130	13688261
11	20	0,6	50	130	6735341
12	60	0,6	50	130	15533106
13	20	0,2	90	130	41473032
14	60	0,2	90	130	123024118
15	20	0,6	90	130	45383542
16	60	0,6	90	130	101913633
17 (C)	40	0,4	70	100	41136380
18 (C)	40	0,4	70	100	37695018
19 (C)	40	0,4	70	100	40205350

Da mesma forma que o fator “massa do pelo”, quanto maior a temperatura de extração, maior quantidade COVs são dessorvidos da amostra. Contudo, testes univariados mostraram que em uma temperatura de extração superior a 110 °C, o perfil cromatográfico da amostra muda completamente, denotando uma descaracterização do perfil de COVs exalados a temperaturas mais brandas, um indicativo claro da quebra de compostos, favorecido por altas

temperaturas. Assim como o fator massa de pelo, foi utilizado o trabalho de Oliveira et al., (2008) para fixar a temperatura de extração em 90 °C.

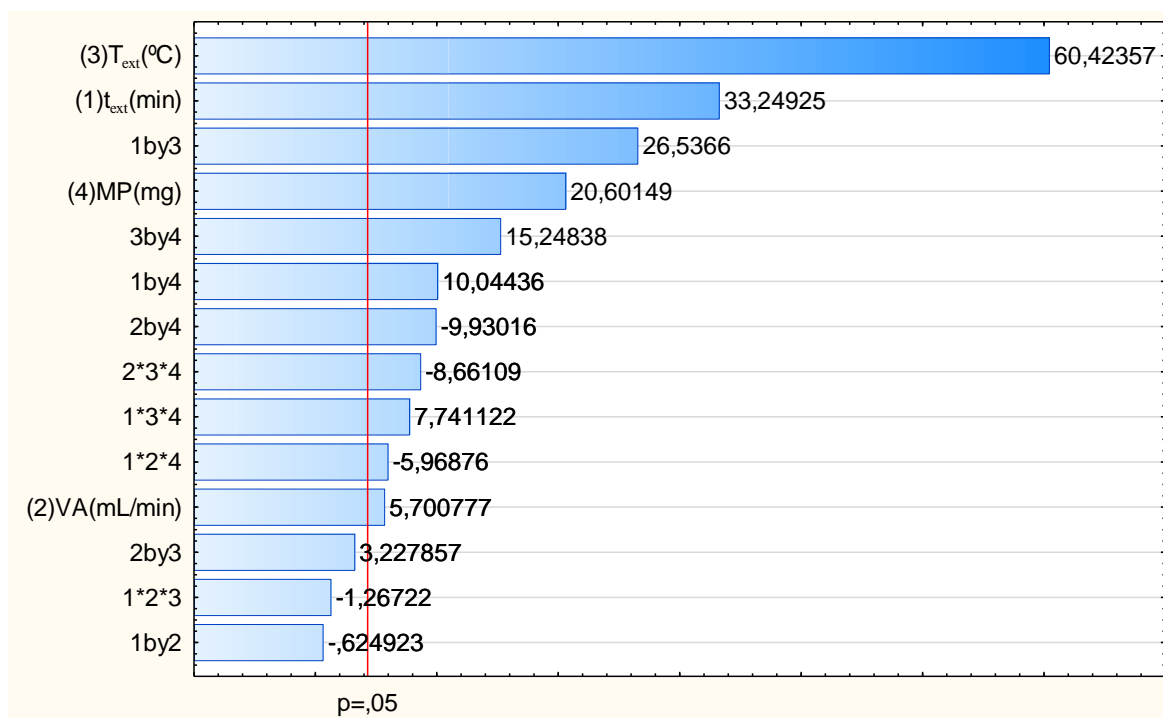


Figura 14. Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo 24 com nível de confiança de 95%).

No gráfico de Pareto nota-se a interação entre os fatores, justificando a abordagem multivariada e, nele também, é mostrado que a temperatura de extração, tempo de extração, massa de pelo e vazão de amostragem, isto é, todos os quatro fatores investigados, são significativos no processo de extração de COVs. Entre as interações verificadas, a interação 1by2 (t_{ext} de VA), apesar de não ser significativa, foi a interação avaliada na MSR por razões já mencionadas, sendo que o seu valor negativo, mostra que quando um fator aumenta outro diminui. Este fato justifica-se com a teoria da cinética de adsorção/dessorção física. O fenômeno de adsorção é teoricamente favorecido, entre outros fatores, por temperaturas e vazões de amostragem baixas.

Fixando o valor da temperatura, notar-se-á que um maior tempo de amostragem garante uma maior quantidade de amostra a ser adsorvida, contudo, a dessorção destes compostos durante a amostragem pode aumentar

com o tempo, graças a vazão de amostragem e temperatura do fluxo de ar que arrasta mecanicamente os COVs através do tubo adsorvente. A vazão de amostragem apresenta um efeito semelhante ao fator tempo de amostragem, uma vez que, se ela for elevada, aumenta a quantidade de amostra que pode ser coletada no tubo adsorvente em um tempo pré-determinado, porém, o aumento da vazão, auxiliado pela temperatura de extração, dessorve os compostos fisissorvidos nos leitos adsorventes.

Assim, após fixado os parâmetros massa de pelo e temperatura de extração, quais as condições de vazão de amostragem e tempo de extração oferecem um melhor resultado? Estes dois parâmetros avaliados posteriormente no processo de otimização da extração de COVs via MSR, equivalem ao volume de amostragem e, de acordo com a observação anterior, não é somente o volume da amostra que importa, mas em que condições este volume é amostrado. Na Tabela 7 está a matriz e resultados da MSR-PCC para a otimização dos fatores tempo de extração e vazão de amostragem.

Tabela 7. MSR-PCC para a otimização do sistema de extração ($T_{\text{ext}} = 90 \text{ }^\circ\text{C}$ e $MP = 130 \text{ mg}$).

Experimentos	t_{ext} (min)	VA ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)	Área total
1	80	0,3	597486106
2	80	0,85	555417584
3	180	0,3	907828587
4	180	0,85	752950302
5	59,2893	0,575	1006515715
6	200,7107	0,575	400996802
7	130	0,1861	710449017
8	130	0,9639	549840281
9 (C)	130	0,575	782246672
10 (C)	130	0,575	741760916
11 (C)	130	0,575	863752677

Os resultados apresentados na Tabela 7 são melhor visualizados e interpretados na Figura 15, onde são apresentados a curva de nível e a superfície de resposta para o planejamento do composto central.

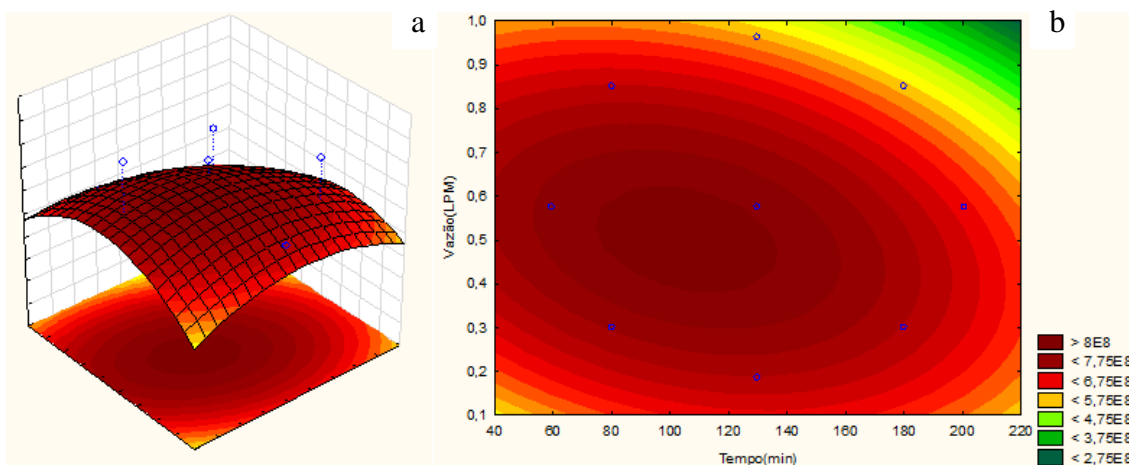


Figura 15. (a) superfície de resposta e (b) superfície de contorno geradas a partir dos dados da Tabela 7.

A partir da inserção dos dados da Tabela 7 no programa Statistica 10.0, obteve-se os gráficos da Figura 15 e os valores críticos para os fatores tempo de extração e vazão de amostragem, que são respectivamente, 106 minutos e 0,5 L·min⁻¹. Assim, para o método otimizado as condições de extração são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Condições de extração para o método otimizado. Em azul estão os fatores otimizados via planejamento multivariado.

FATOR	t _{ext} (min)	VA (L·min ⁻¹)	T _{ext} (°C)	MP (mg)
Condição de extração	106	0,5	90	130

5.4 Extração e Análise do Pelo Canino

A extração foi realizada conforme a metodologia já descrita e com os valores padronizados pela MSR-PCC. Para a obtenção de melhores resultados, o nosso laboratório de pesquisa desenvolveu dois materiais de laboratório. Um

vial foi adaptado em forma de “L” com duas aberturas para que funcionasse em modo *headspace* dinâmico, facilitando a dessorção e o *trap* dos COVs do pelo canino no tubo adsorvente (Figura 16a). Para tornar essas duas variáveis ainda mais eficientes no processo de extração, foi produzido um bloco de alumínio que envolve parte do vial modificado e permite um aquecimento homogêneo da amostra (Figura 16b). Esse bloco evita o aquecimento localizado da amostra, a necessidade de temperaturas mais altas para se obter maior concentração de COVs dessorvidos e, conseqüentemente, a dessorção dos COVs coletados no tubo adsorvente devido ao ar quente.



Figura 16. a) Vial modificado e b) bloco de alumínio criados pelo grupo de pesquisa.

Na Figura 17 está o cromatograma obtido de uma amostra de cão infectado, utilizando as condições otimizadas da extração dos COVs de pelo. O cromatograma gerado apresentou, em média, cerca de 245 picos. Os dois primeiros picos são característicos do tenax TA e foram desconsiderados em todas as etapas do trabalho.

A análise das amostras foi realizada em triplicata com um desvio padrão relativo de até 20% do valor de área total (RIBANI et al., 2004).

5.5 Identificação dos Picos

Foram identificados 30 compostos por injeção de padrão e 9 compostos por índice de Kovats. Na Figura 17 é possível observar os 39 compostos identificados no cromatograma de uma amostra de pelo de cão infectado.

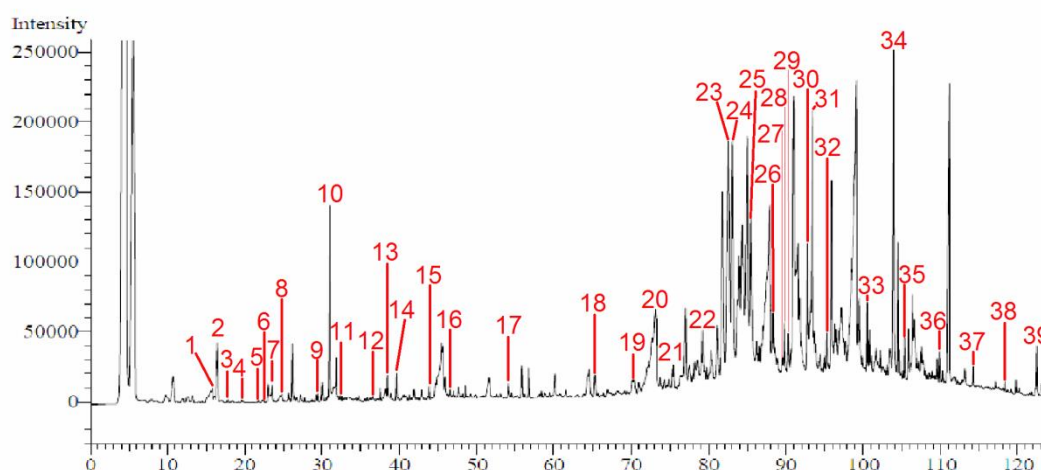


Figura 17. Cromatograma obtido após a otimização do método de extração. Os compostos identificados estão numerados e descritos na Tabela 9.

Os dois primeiros picos são artefatos que geram o chamado “pico do sistema”. Isso ocorre porque o trap interno do TD-GC-FID é composto por Tenax TA. A quantidade destes mesmos artefatos, originados a partir do tubo multicamada que também é composto por Tenax TA, são minimizados após o usual recondicionamento dos tubos.

A Tabela 9 mostra os 39 compostos identificados com seus respectivos KI experimentais e da literatura, obtidos a partir das bases de dados de índices de Kovats. Apenas os 9 compostos em negrito foram identificados, exclusivamente, a partir do KI e, os demais compostos, foram identificados por injeção de padrão. Para a série homóloga de hidrocarbonetos, obtidos a partir da injeção de um padrão mix, não foram apresentados os valores de KI, uma vez que a identificação por injeção de padrão é superior à identificação por índice de Kovats. Outros compostos cujos valores de KI foram apresentados, mesmo

identificados por injeção de padrão, servem para realçar como é útil e confiável a identificação por índice kovats.

Tabela 9. Compostos orgânicos voláteis identificados nas amostras de pelo de cães residentes em área endêmica para leishmaniose visceral, com seus respectivos índices de Kovats.

N	Composto	Índice de Kovats		N	Composto	Índice de Kovats	
		KI Exp ¹	K _i Lit ²			KI Exp	K _i Lit
1	Hexanol	860	858	21	Hexadecano		
2	Heptanal	867	877	22	8-Pentadecanona	1661	1659
3	Nonano			23	Heptadecano		
4	Benzaldeído	930	925	24	Octadecano		
5	Heptanol	960	954,9	25	Ácido pentadecanóico	1834	1840
6	1-Octen-3-ol	968	968	26	heptadecanal	1880	1880
7	Octanal	983	983	27	Nonadecano		
8	Decano			28	Ácido hexadecanóico	1956	1950
9	Octanol	1061	1061	29	Eicosano		
10	Nonanal	1084	1080	30	1-octadecanol	2055	2058
11	Undecano			31	(Z)-Metil-octadec-9-enoato	2071,0	2074,0
12	Nonanol			32	Heneicosano		
13	Decanal	1185	1186	33	Docosano		
14	Dodecano			34	Nonadecanoato de Etila	2275	2274
15	Ácido Nonanoico	1259	1263	35	Tricosano		
16	Tridecano			36	Tetracosano		
17	Tetradecano			37	Pentacosano		
18	Pentadecano			38	Hexacosano		
19	Ácido Dodecanóico	1554	1550	39	Heptacosano		
20	tetradecanal	1587	1584				

¹ KI Exp: índice de Kovats obtido no experimento; ² KI Lit: índice de Kovats obtido na literatura; ³ Os compostos em negrito foram identificados por índice de kovats.

5.6 Análise de dados

O objetivo do tratamento estatístico das amostras através de PCA e PLS-DA foi observar tendências de agrupamento e classificação das amostras com

base na carga parasitária. As amostras e os valores de área de cada composto foram coletados em triplicatas e organizadas em três grupos de acordo com a carga parasitária (G1, G2 e G3). Estes valores absolutos foram somados para cada análise da triplicata e, em seguida, transformados em valores relativos, isto é, calculado o valor em percentagem do composto em cada replicata da amostra.

Os possíveis padrões de agrupamento entre amostras de cães com ausência de parasita (G1), com baixa carga parasitária (G2) e animais com alta carga parasitária (G3), foram inicialmente avaliados por PCA. A Figura 18 ilustra o gráfico dos *scores*, onde cada ponto representa uma amostra e foram empregadas diferentes cores para identificar os grupos a que cada amostra pertence.

Avaliando a Figura 18, verifica-se que não há uma separação nítida entre os diferentes grupos de amostras. Por outro lado, nota-se que maior parte das amostras de cães com ausência do parasita encontram-se nos quadrantes superiores do gráfico enquanto as amostras com baixa e alta cargas parasitárias, em maior proporção, encontram-se na porção inferior do gráfico, indicando que o segundo componente principal (PC2) contribui para esta discriminação. Os resultados obtidos por PCA apontam uma possibilidade de discriminação das diferentes cargas parasitárias a partir do perfil de COVs, porém ainda há uma grande sobreposição entre os grupos, verificando-se, portanto, a relevância do emprego de outras técnicas quimiométricas de identificação de padrões multivariados.

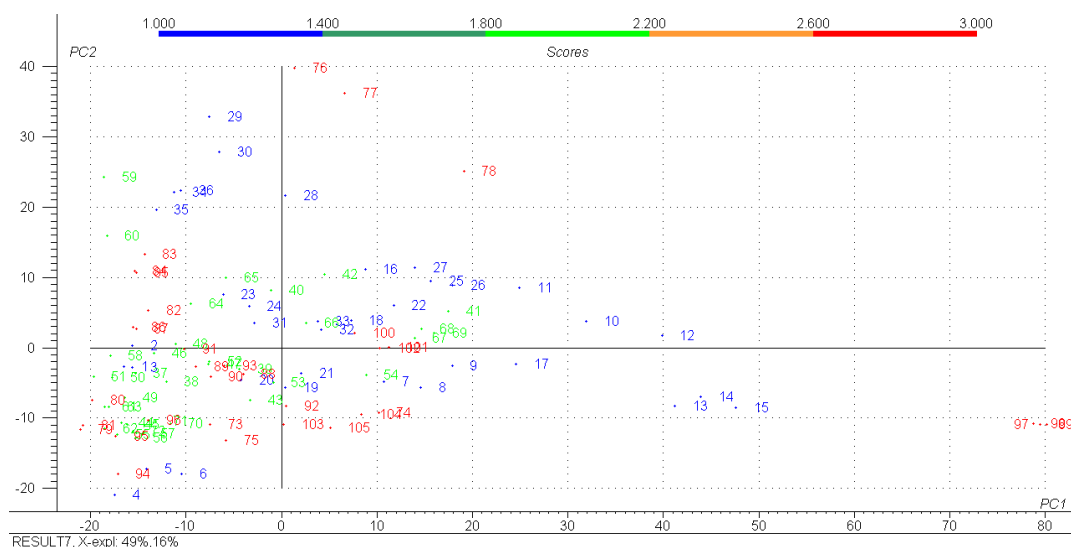


Figura 18. Gráfico dos scores por PCA onde cada ponto representa uma amostra, sendo amostras com ausência do parasita (azul), baixa carga parasitária (verde) e alta carga parasitária (vermelho).

Foi construído um modelo PLS-DA para verificar se uma determinada amostra pertence a classe de amostras que está sendo avaliada. Neste modelo foi atribuído um valor positivo (+1) para amostras de cães que pertencem ao grupo em análise no momento, e um valor negativo (-1) para as demais amostras. Na etapa de previsão por PLS-DA, uma amostra é identificada como pertencendo a um determinado grupo se, usando o modelo para este grupo, um valor positivo for previsto, sendo esta etapa repetida para verificar se a amostra pertence aos demais grupos.

Um total de 9 variáveis latentes foram identificadas como o número ótimo para obter menores erros de previsão por PLS-DA. A Figura 19 ilustra o gráfico dos *scores* das duas primeiras variáveis latentes obtidas por PLS-DA empregando validação cruzada completa, representando aproximadamente 60% da variabilidade das informações do conjunto de dados. Avaliando a Figura 19, verifica-se que a maior parte das amostras com ausência de parasita encontram-se no quadrante inferior à direita, enquanto as amostras com baixa e elevada carga parasitária encontram-se majoritariamente no quadrante superior, dispersas entre a porção direita e esquerda.

Ainda que o gráfico dos *scores* obtido por PLS-DA (Figura 19) não represente valor próximo a 100% da variabilidade das informações do conjunto de dados, a discriminação é mais nítida entre cães com ausência e presença do

parasita, independente da carga parasitária, quando comparado aos resultados de PCA visualizados na Figura 18.

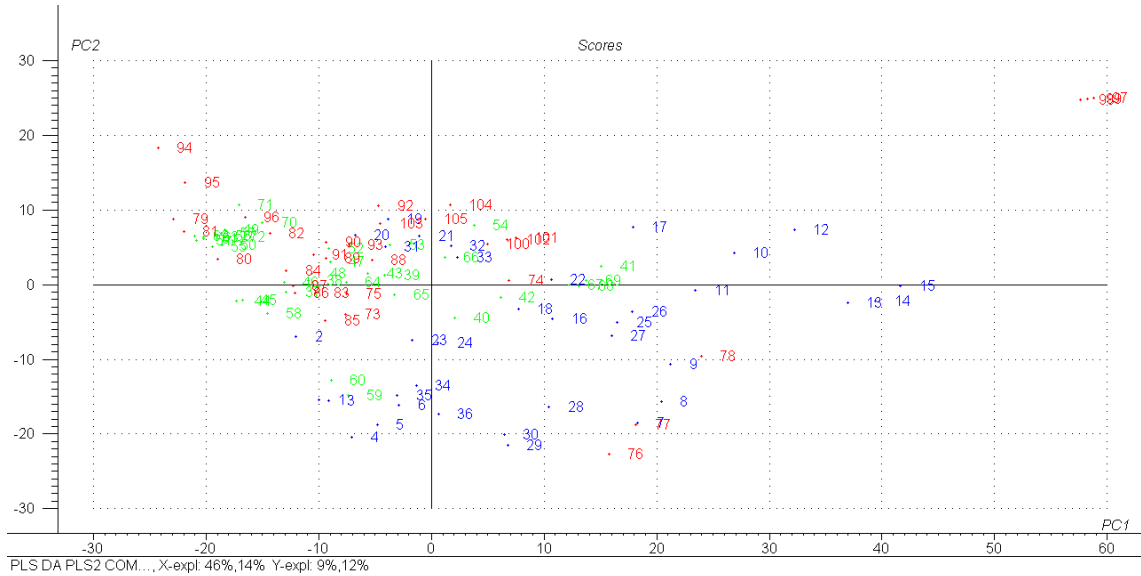


Figura 19. Gráfico dos scores por PLS-DA onde cada ponto representa uma amostra, sendo amostras com ausência do parasita (azul), baixa carga parasitária (verde) e alta carga parasitária (vermelho).

As Figuras 20, 21e 22 ilustram os resultados da discriminação por PLS-DA entre os cães dos diferentes grupos (G1, G2 e G3).

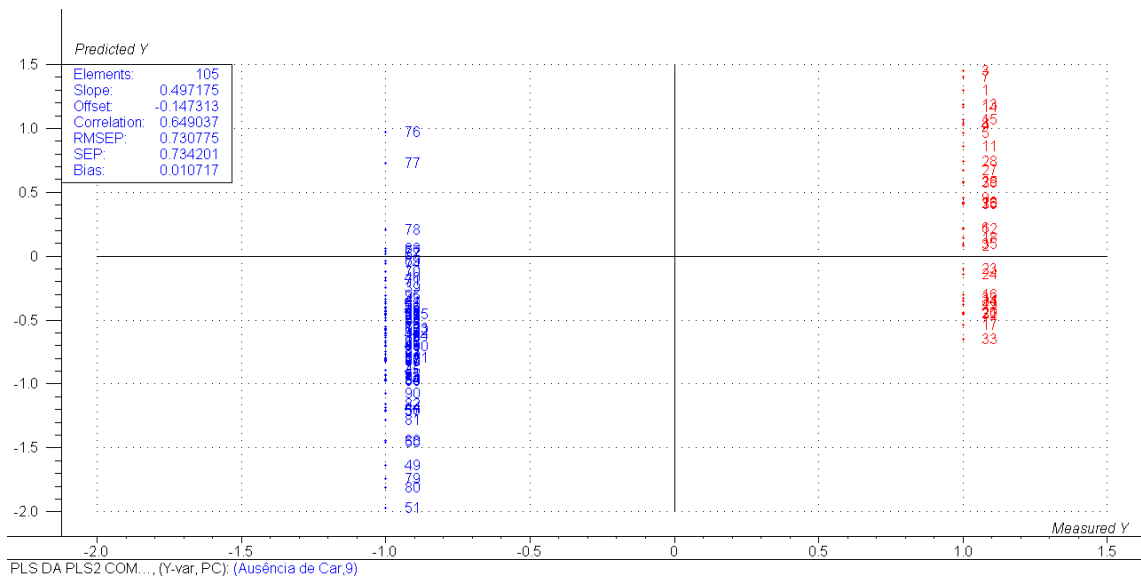


Figura 20. Discriminação por PLS-DA entre cães com ausência de parasita (vermelho) e cães com baixa e alta carga parasitária (azul).

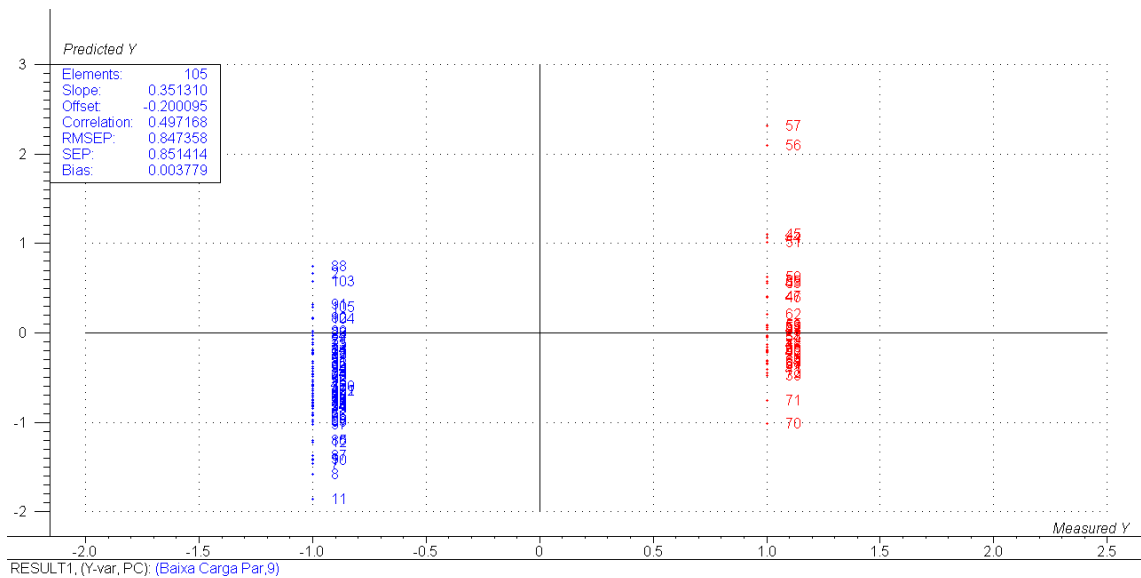


Figura 21. Discriminação por PLS-DA entre cães com baixa carga parasitária (vermelho) e cães com ausência do parasita e com alta carga parasitária (azul).

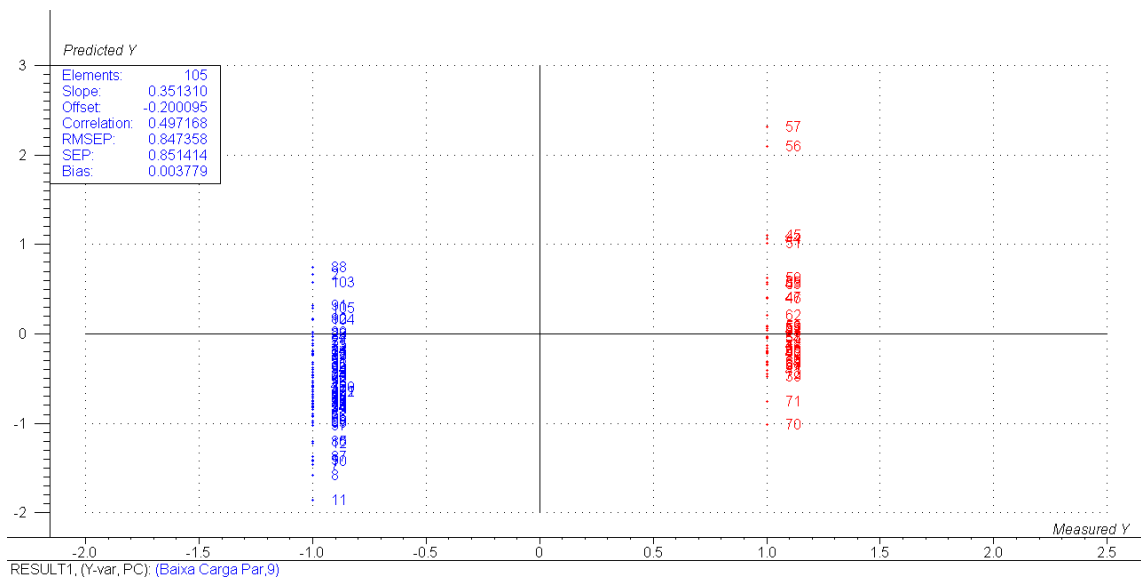


Figura 22. Discriminação por PLS-DA entre cães com alta carga parasitária (vermelho) e cães com ausência do parasita e com baixa carga parasitária (azul).

A Tabela 10 apresenta a distribuição dos erros de classificação por PLS-DA empregando todos os 39 COVs identificados entre as 105 amostras. O Erro Tipo I corresponde ao número de amostras aos quais foram atribuídas o valor +1, mas que o PLS-DA classificou como pertencendo ao grupo de amostras aos

quais foram atribuídas o valor -1. O valor do Erro Tipo I pode ser visualizado nas figuras 20 a 22 como as amostras que aparecem no IV quadrante. O Erro Tipo II corresponde as amostras aos quais foram atribuídas o valor -1, mas que o método classificou como pertencendo às amostras as quais foram atribuídas o valor +1. O valor do Erro Tipo II pode ser visualizado nas figuras 20 a 22 como as amostras que aparecem no II quadrante. A classificação correta corresponde a fração do universo de 105 amostras aos quais o método classificou corretamente, sendo o somatório das amostras que aparecem no I e no III quadrante.

Verifica-se que os erros de classificação mais frequentes foram do Tipo I (33,3 – 54,5%). Ainda que os resultados obtidos por PLS-DA sejam bastante promissores, os erros de classificação não são tão baixos para considerar os modelos de classificação como satisfatórios.

Tabela 10. Frequência dos resultados da classificação por PLS-DA nos três grupos estudados.

Grupos Estudados	Classificação correta (n, %)	Erro tipo I ^a (n, %)	Erro tipo II ^b (n, %)
Cães com ausência do parasita (Grupo I)	87 (82,9)	12 (33,3)	6 (8,7)
Cães com baixa carga parasitária (Grupo II)	76 (72,4)	19 (52,8)	10(14,5)
Cães com alta carga parasitária (Grupo III)	77 (73,3)	18 (54,5)	10(13,9)

a: Amostras não classificadas no grupo a que pertencem.

b: Amostras classificadas como pertencendo a um grupo incorreto.

De uma forma geral, o modelo PLS-DA consegue lidar com um conjunto multivariado de dados contendo COVs relevantes para a discriminação e compostos químicos não informativos. Por outro lado, na presença de muitos COVs não informativos no modelo PLS-DA, especialmente COVs não informativos com altas áreas, contribui para deteriorar a qualidade do modelo.

Uma vez que os resultados obtidos por PLS-DA ainda não foram os mais satisfatórios, empregou-se para seleção dos COVs duas técnicas de seleção dos componentes químicos mais relevantes e discriminação multivariada, o MLR-GA-DA e Stepwise MLR-DA.

As variáveis selecionadas por MLR-GA-DA e Stepwise MLR-DA foram idênticas, sendo escolhidos 10 COVs para cada um dos grupos, culminando em resultados iguais nas previsões para as duas técnicas de seleção de variáveis. A Tabela 11 ilustra os COVs selecionados para discriminação entre os três grupos, indicando também aqueles que foram selecionados como relevantes para mais de um grupo.

Tabela 11. Seleção de covs por MLR-GA-DA / Stepwise MLR-DA nos três grupos estudados.

	COVs selecionados		
Cães com ausência do parasita (Grupo I)	<u>Octanal</u> , <u>hetptadecano</u> , <u>nonadecano</u> , octadecenoico, <i>heptacosano</i>	tetradecanal, ácido eicosano, ácido <u>nonadecanoico</u> ,	hexadecano, pentadecanoico, ácido 9-
Cães com baixa carga parasitária (Grupo II)	<u>Hexanol</u> , heptanol, <u>octanal</u> , <u>octanol</u> , nonanal, tetradecano, <u>pentadecano</u> , heptadecanal, docosano, <i>heptacosano</i>		
Cães com alta carga parasitária (Grupo III)	<u>Hexanol</u> , heptanal, <u>octanol</u> , dodecano, <u>pentadecano</u> , <u>heptadecano</u> , <u>nonadecano</u> , octadecano, <u>ácido nonadecanoico</u> , <i>heptacosano</i>		

Sublinhados: COVs selecionados comuns em dois grupos. Sublinhado e itálico: COVs comum aos três grupos.

As Figuras 23, 24 e 25 ilustram os resultados da discriminação por MLR-GA-DA/Stepwise MLR-DA entre os cães do Grupo 1 - ausência do parasita; Grupo 2 - baixa carga parasitária e Grupo 3 - alta carga parasitária. Ao comparar estes resultados com os obtidos por PLS-DA empregando todos os COVs, verifica-se um melhora na qualidade das classificações.

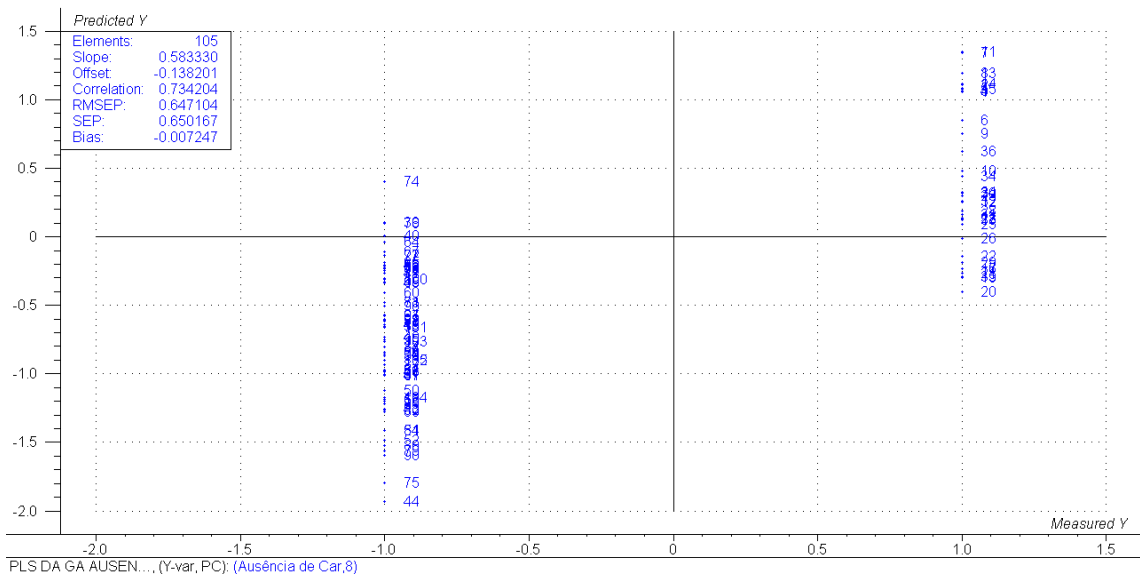


Figura 23. Discriminação por MLR-GA-DA / Stepwise MLR-DA entre cães com ausência do parasita (direita) e baixa e alta carga parasitária (esquerda).

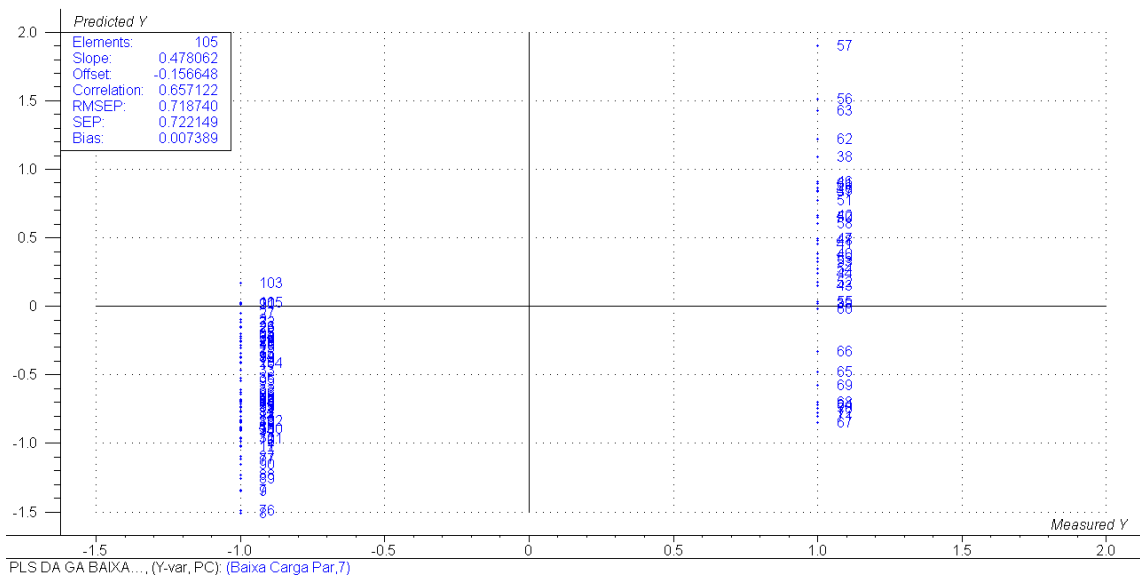


Figura 24. Discriminação por MLR-GA-DA / Stepwise MLR-DA entre cães com baixa carga do parasita (direita) e cães com ausência do parasita e com alta carga parasitária (esquerda).

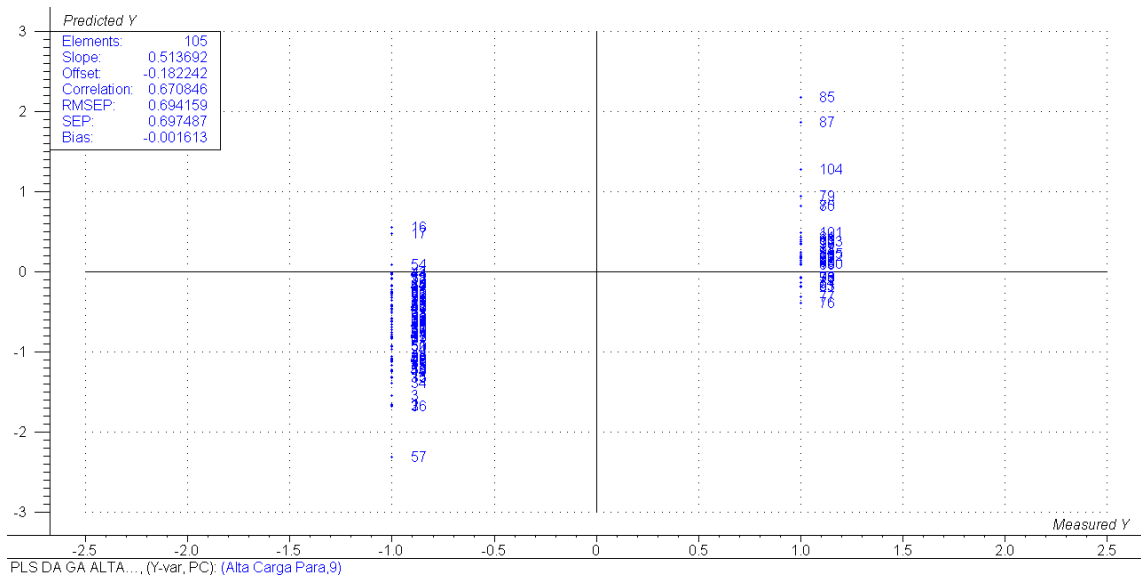


Figura 25. Discriminação por MLR-GA-DA / Stepwise MLR-DA entre cães com alta carga do parasita (direita) e cães com ausência do parasita e com baixa carga parasitária (esquerda).

A melhoria dos resultados de classificação por MLR-GA-DA / Stepwise MLR-DA está associada a remoção de COVs não informativos e inclusão apenas daqueles mais relevantes para discriminação entre os grupos. Os coeficientes de regressão para cada modelo de classificação MLR-GA-DA / Stepwise MLR-DA estão ilustrados nas Figuras 26, 27 e 28.

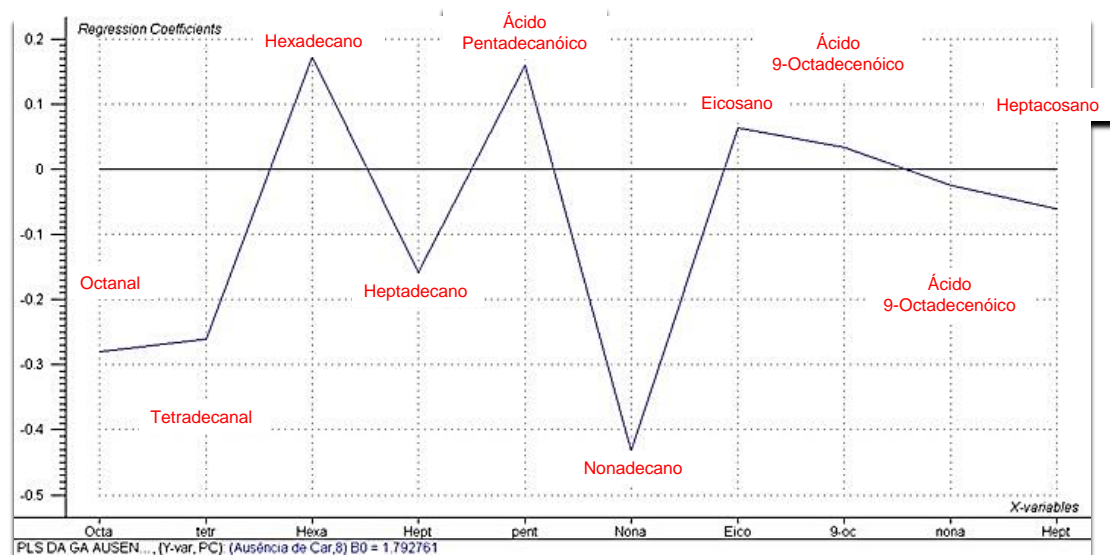


Figura 26. Coeficientes de regressão MLR-GA-DA / Stepwise MLR-DA para discriminação de cães com ausência do parasita de cães com baixa e alta carga parasitária.

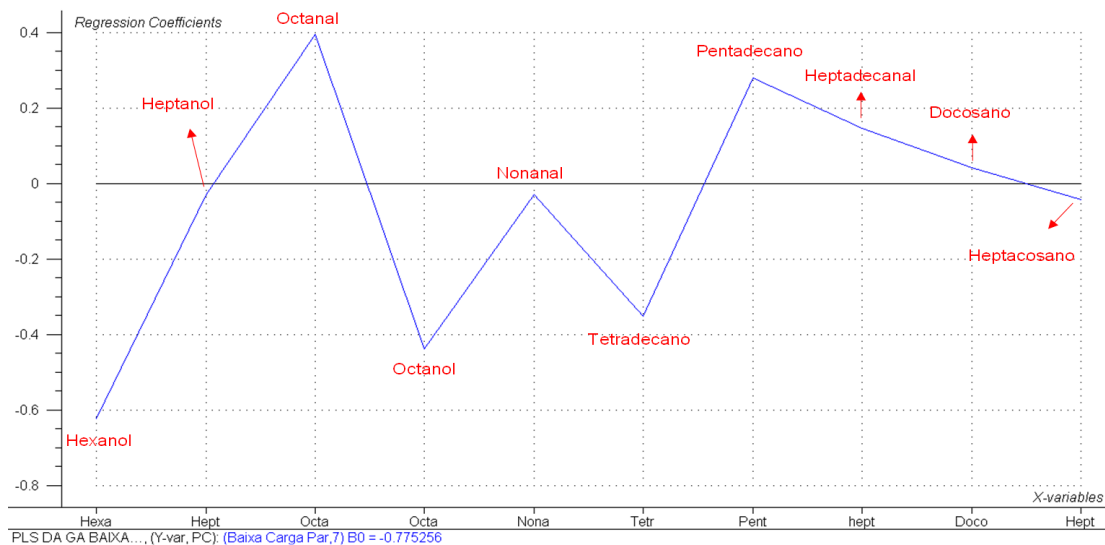


Figura 27. Coeficientes de regressão MLR-GA-DA / Stepwise MLR-DA para discriminação de cães com baixa carga parasitária de cães com ausência do parasita e alta carga parasitária.

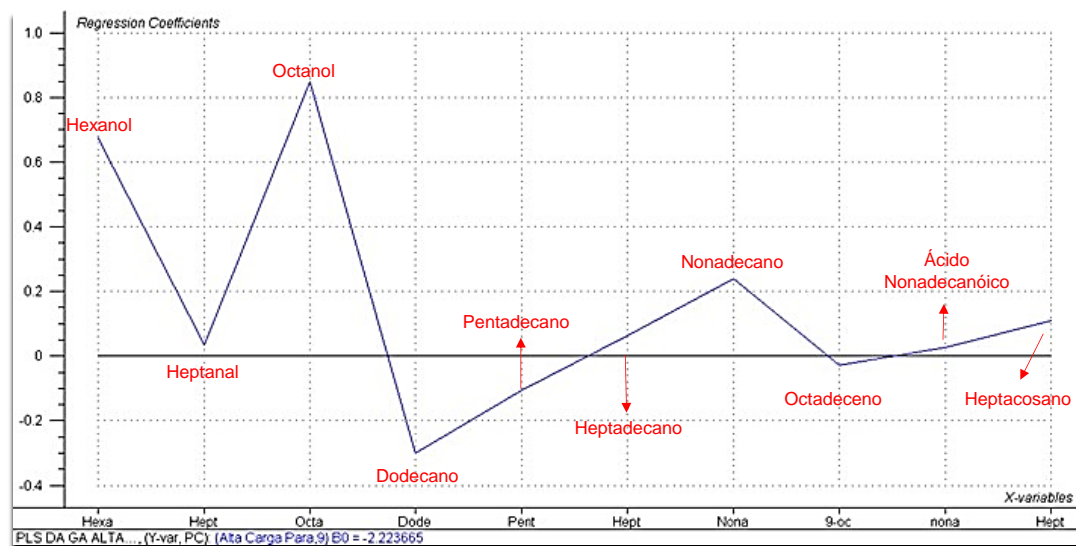


Figura 28. Coeficientes de regressão MLR-GA-DA / Stepwise MLR-DA para discriminação de cães com alta carga parasitária de cães com ausência do parasita e baixa carga parasitária.

Quanto maior o valor absoluto do coeficiente de regressão de um determinado composto, maior a variação deste composto no grupo de estudo quando comparado aos demais, ou seja, mais relevante ele é para discriminação, sendo que quando apresenta valores positivos, este COV, em média, tende a estar em maiores concentrações para o grupo de amostra avaliado. Analogamente, quando o coeficiente de regressão de um COV é negativo, indica que ele tende a estar em concentrações menores no grupo em estudo quando comparado aos demais. Assim, é possível observar que após a

retirada dos COVs não informativos e a utilização apenas dos compostos mais relevantes para cada grupo apresentado na Tabela 11, nota-se uma tendência na variação de alguns grupos funcionais nos COVs presentes nas amostras dos grupos G1, G2 e G3.

No grupo G1, nota-se uma pequena concentração de aldeídos que sobe em G2, e cai um pouco em G3, mantendo-se praticamente estáveis. Avaliando os hidrocarbonetos, os coeficiente de regressão estão em uma estreita janela que vai de -0,2 a 0,2, salvo algumas exceções como o nonadecano que está em baixíssima concentração em G1, não aparece como COV relevante em G2, reaparecendo em concentrações mais elevadas no grupo G3.

Hidrocarbonetos já foram identificados como compostos atratores e, para o *L. longipalpis*, uma investigação mais acurada através de bioensaio comportamental ou teste eletrofisiológico colocaria o nonadecano como nossa melhor hipótese entre os hidrocarbonetos. O fato deste composto não aparecer como relevante em G2 não quer dizer que ele tenha menos chance de ser um biomarcador do que compostos cujas concentrações aumentam gradativamente do grupo G1 até o G3. O que se observa naturalmente é que existem apenas cães sadios e cães infectados, independente do grau de parasitismo do animal. COURTENAY et al., (2002) relatam que o alto grau de infecção é preponderante no ciclo de transmissão da doença quando o vetor é o *L. longipalpis*, uma vez que este vetor é menos suscetível a infecção do que outros flebotomíneos. Ademais, cães mais infecciosos (de maior carga parasitária), transmitem mais facilmente a doença (TRAVI et al., 2001). Assim, é indutivo pensar que o inseto será mais atraído por cães cujos caimônios são mais característicos do alto grau de parasitismo, a exemplo do nonadecano.

Dentre as informações mais relevantes, há um destaque especial para os álcoois. Estes não aparecem como compostos relevantes em G1. Em G2 o hexanol aparece em baixíssimas concentrações, junto com o heptanol que apresenta um pequeno coeficiente de regressão negativo, mas em G3 o hexanol e octanol apresentam, entre todos os COVs relevantes investigados, os maiores valores de coeficiente de regressão positivos, indicando que na média, foram os

compostos relevantes de maior concentração em cães com alta carga parasitária quando comparado com os demais grupos.

Este fato parece ser um indicativo de que cães saudáveis exalam um odor com baixíssima concentração de álcoois como hexanol, heptanol e octanol, uma vez que todos eles estão presentes nos três grupos estudados, ainda que não apareçam como relevantes para G1 na Figura 26; para cães com baixa carga parasitária, estes mesmos álcoois aparecem como relevantes mesmo em baixas concentrações, como pode ser observado na Figura 27 e, para cães com alta carga de infecção, o hexanol e octanol apresentam-se como COVs relevantes e em altas concentrações quando comparados aos demais grupos.

Além de se apresentar como possíveis biomarcadores da LV canina, a forma como o hexanol e octanol aparecem nas três classes de amostras estudadas também poderia respaldar a hipótese de KNOLS; MEIJERINK, (1997) e O'SHEA et al., (2002) de que o inseto pica preferencialmente animais infectados, uma vez que cães saudáveis e infectados, exalam hexanol e octanol, porém em concentrações cada vez mais elevadas à medida que a carga parasitária no hospedeiro se eleva, tornando cães infectados mais facilmente detectáveis através do odor destes álcoois.

Usando alguns álcoois alifáticos de cadeia curta, o hexano como controle negativo e o 1-octen-3-ol, como controle positivo, Machado et al., (2015) testou a atratividade de alguns álcoois em diferentes concentrações frente ao *Nyssomyia neivai*, um *Psychodidae* da mesma família do *Lutzomyia longipalpis* e percebeu que o inseto é ³ativado e/ou atraído por estes álcoois com diferentes intensidades. O teste mostrou que entre os álcoois testados, o hexanol e o octanol foram os compostos que apresentaram a maior porcentagem de insetos ativados/atraídos, sendo que o hexanol mostrou uma porcentagem de atração superior ao 1-octen-3-ol, denominado no estudo de octenol, o qual a literatura já o apresentou como composto atrator para esta espécie de inseto (Pinto et al., 2012).

³ Ativado equivale ao número de insetos que deixam a câmara de liberação dentro do túnel de vento. Atraído equivale ao número de insetos que alcançam a fonte de estímulo.

Resultados semelhantes foram encontrados por Magalhães-Junior et al., (2014) quando estes autores estudaram a atratividade do *L. longipalpis* ao 1-octen-3-ol, heptanol, octanol, nonanol e encontraram que machos e fêmeas desta espécie são fortemente atraídos pelo 1-octen-3-ol, nonanol e heptanol, os quais são encontrados como voláteis de plantas. Diferentemente do *N. neivai*, o *L. longipalpis* não apresentou resposta concentração-dependente ao octanol, sobressaindo apenas, estatisticamente, a ativação e atração em concentrações de 50% de octanol para fêmeas e, concentrações de 10% de octanol para machos quando comparadas ao controle.

A mistura de álcoois descrito no trabalho de Machado et al., (2015), mostra que o inseto é também sensível à mistura de álcoois. Este fato pode ser explorado em um bioensaio comportamental do *L. longipalpis*, uma vez que o cão com baixa e alta carga parasitária eleva a concentração de álcoois exalados a partir do pelo. Outro bom motivo para esta investigação é a potencialização do efeito atrator de um composto pela interação sinérgica de outro(s) composto(s). Assim, álcoois como o octanol podem gerar elevadas porcentagens de atração para o *N. neivai* tanto quanto para o *L. longipalpis*.

A Tabela 12 apresenta a distribuição das classificações corretamente realizadas e os erros de classificação por MLR-GA-DA / Stepwise MLR-DA empregando todos os VOC selecionados. Os percentuais dos erros mais frequentes foram Tipo I (25,0 - 27,8%).

Tabela 12. Frequência dos resultados da classificação por MLR-GA-DA / Stepwise MLR-DA nos três grupos estudados.

Grupos Estudados	Classificação correta (n, %)	Erro tipo I ^a (n, %)	Erro tipo II ^b (n, %)
Cães com ausência do parasita (Grupo I)	92 (87,6)	9 (25,0)	3 (4,3)
Cães com baixa carga parasitária (Grupo II)	91 (96,7)	10 (27,8)	4 (5,8)
Cães com alta carga parasitária (Grupo III)	93 (88,6)	9 (27,3)	3 (4,2)

a: Amostras não classificadas no grupo a que pertencem.

b: Amostras classificadas como pertencendo a um grupo incorreto.

A Tabela 12 apresenta uma faixa do percentual de erros tipo I e tipo II, muito menor quando comparada à tabela 10, onde não houve remoção de COVs não informativos. Estes menores valores percentuais mostram um modelo satisfatório para a classificação dos três grupos de cães estudados.

6.0 CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um método de extração do tipo purge and trap usando SPE e a técnica TD-GC-FID para identificação de COVs exalados do pelo de cães saudáveis e infectados por *Leishmania sp.*;

Através da aplicação de técnicas de análise multivariada foi possível discriminar as amostras entre os grupos de cães saudáveis, com baixa carga parasitária e alta carga parasitária;

A técnica desenvolvida permitiu a identificação em cães de possíveis biomarcadores de infecção por *Leishmania sp.*

7.0 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Aplicar o método de extração desenvolvido na avaliação da atratividade do *L. longipalpis* à extratos obtidos do pelo de cães sadios e infectados por *Leishmania sp*;

Avaliar a resposta eletrofisiológica em antenas de fêmeas de *L. longipalpis* aos COVs identificados.

7.1 Trabalhos Apresentados em Congresso

OLIVEIRA, W. F. S.; MESQUITA, P. R. R.; MAGALHAES-JUNIOR, J. T.; MELO, S. M. B.; RODRIGUES, F. M.; ANDRADE, J. B.. Desenvolvimento de método de extração de COVs exalados do pelo de cães infectados com Leishmania sp. por meio da técnica TD-GC-FID. 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Natal, Rio Grande do Norte, 2014.

MAGALHAES-JUNIOR, J. T.; OLIVEIRA, W. F. S.; NUNES, E. C.; MESQUITA, P. R. R.; RODRIGUES, F. M.; MELO, S. M. B.. EVIDÊNCIAS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE APRESENTAÇÃO CLÍNICA OU SUBCLÍNICA DE INFECÇÃO POR Leishmania sp. E MODIFICAÇÃO NO PERFIL DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS CUTÂNEOS EM CÃES. 65ª reunião anual da sbpc. Recife, Pernambuco, 2013.

7.2 Artigo Publicado

MAGALHÃES-JUNIOR, JAIRO TORRES; MESQUITA, PAULO ROBERTO RIBEIRO; OLIVEIRA, WYLLIAN FRANZ DOS SANTOS; OLIVEIRA, FÁBIO SANTOS; FRANKE, CARLOS ROBERTO; RODRIGUES, FREDERICO DE MEDEIROS; DE ANDRADE, JAILSON BITTENCOURT; BARROUIN-MELO, STELLA MARIA. Identification of biomarkers in the hair of dogs: new diagnostic possibilities in the study and control of visceral leishmaniasis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 26, p. 6691-6700, 2014.

REFERÊNCIAS

ABDELNUR, P. V. 2011. Metabolômica e espectrometria de massas. Embrapa - Circular Técnica. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/917736/1/CITE10.pdf>>. Acesso em: 06 jul. 2015.

ADRIAN, J., GRATACÓS-CUBARSÍ, M., SÁNCHEZ-BAEZA, F., REGUEIRO, J. A. G., CASTELLARI, M., & MARCO, M. P. Traceability of sulfonamide antibiotic treatment by immunochemical analysis of farm animal hair samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 4, p. 1009-1016, 2009.

ALEKSA, K., WALASEK, P., FULGA, N., KAPUR, B., GARERI, J., & KOREN, G. Simultaneous detection of seventeen drugs of abuse and metabolites in hair using solid phase micro extraction (SPME) with GC/MS. **Forensic Science International**, v. 218, n. 1-3, p. 31-36, 2012.

ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2003.

ALEXANDRAKIS, D., BRUNTON, N. P., DOWNEY, G., & SCANNELL, A. G. Identification of Spoilage Marker Metabolites in Irish Chicken Breast Muscle Using HPLC, GC-MS Coupled with SPME and Traditional Chemical Techniques. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 5, p. 1917-1923, 2012.

ALVAR, J., CANAVATE, C., MOLINA, R., MORENO, J., & NIETO, J. Canine Leishmaniasis. In: (Ed.). **Advances in Parasitology**: Academic Press, v. Volume 57, 2004. p.1-88. ISBN 0065-308X.

ALVAR, J., MOLINA, R., SAN ANDRÉS, M., TESOURO, M., NIETO, J., VITUTIA, M., GONZÁLEZ, F., SAN ANDRÉS, M. D., BOGGIO, J., RODRIGUEZ, F., SAINZ, A., & ESCACENA, C. CANINE LEISHMANIASIS - CLINICAL, PARASITOLOGICAL AND ENTOMOLOGICAL FOLLOW-UP AFTER CHEMOTHERAPY. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 88, n. 4, p. 371-378, 1994.

ALVAR, J., VELEZ, I. D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN, J., & DEN BOER, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B.; PRIEGO-CAPOTE, F.; DE CASTRO, M. L. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 111-119, 2010a.

_____. Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 120-127, 2010b.

AMÓRA, S. S., BEVILAQUA, C. M., FEIJÓ, F., ALVES, N. D., & MACIEL, M. D. V. Control of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 303-310, 2009.

ARN, H.; STÄDLER, E.; RAUSCHER, S. The Electroantennographic Detector — a Selective and Sensitive Tool in the Gas Chromatographic Analysis of Insect Pheromones. **Zeitschrift für Naturforschung C.**, v. 30, n. 11-12, p. 722-725, 1975.

GOWDA, G. N., ZHANG, S., GU, H., ASIAGO, V., SHANAIAH, N., & RAFTERY, D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 5, p. 617-633, 2008.

BART, J. C. J. **Additives in Polymers: Industrial Analysis and Applications**. Wiley, 2005. ISBN 9780470012055.

BELO, V. S., WERNECK, G. L., BARBOSA, D. S., SIMÕES, T. C., NASCIMENTO, B. W. L., DA SILVA, E. S., & STRUCHINER, C. J. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 4, p. e2182, 2013.

BERGSTROM, L. G. W. Chemical communication by behaviour-guiding olfactory signals. **Chemical Communications**, n. 34, p. 3959-3979, 2008.

BIELICKA-DASZKIEWICZ, K. Different methods to select the best extraction system for solid-phase extraction. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 3, p. 439-444, 2015.

BOJKO, B., REYES-GARCÉS, N., BESSONNEAU, V., GORYŃSKI, K., MOUSAVI, F., SILVA, E. A. S., & PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction in metabolomics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 61, n. 0, p. 168-180, 2014.

BOYACI, E., RODRIGUEZ-LAFUENTE, A., GORYNSKI, K., MIRNAGHI, F., SOUZA-SILVA, E. A., HEIN, D., & PAWLISZYN, J. Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. **Analytica Chimica Acta**, v. 873, p. 14-30, 2015.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, p.120. 2014

BRERETON, R. **Chemometrics for pattern recognition**. John Wiley & Sons, 2009. ISBN 0470746475.

BROWN, M., DUNN, W. B., ELLIS, D. I., GOODACRE, R., HANDL, J., KNOWLES, J. D., SPASIĆ, I., & KELL, D. B. A metabolome pipeline: from concept to data to knowledge. **Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 39-51, 2005.

BRUNNER, G. Applications of supercritical fluids. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 1, p. 321-342, 2010.

BYERS, J. A. Equations for nickel–chromium wire heaters of column transfer lines in gas chromatographic–electroantennographic detection (GC–EAD). **Journal of Neuroscience Methods**, v. 135, n. 1–2, p. 89-93, 2004.

CALDAS, S. S., GONÇALVES, F. F., PRIMEL, E. G., PRESTES, O. D., MARTINS, M. L., & ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, p. 1604-1617, 2011.

CASPER, J. L. **Practisches Handbuch der gerichtlichen Medicin**. Рипол Классик, 1857. ISBN 1143650387.

CENTNER, V., VERDÚ-ANDRÉS, J., WALCZAK, B., JOUAN-RIMBAUD, D., DESPAGNE, F., PASTI, L., MASSART, D.L., & DE NOORD, O. E. Comparison of multivariate calibration techniques applied to experimental NIR data sets. **Applied Spectroscopy**, v. 54, n. 4, p. 608-623, 2000.

CHAPPUIS, F., SUNDAR, S., HAILU, A., GHALIB, H., RIJAL, S., PEELING, R. W., ALVAR, J., & BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Micro**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CICERI, D.; PERERA, J. M.; STEVENS, G. W. The use of microfluidic devices in solvent extraction. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 771-786, 2014.

CLAYTON, T. A., BAKER, D., LINDON, J. C., EVERETT, J. R., & NICHOLSON, J. K. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 34, p. 14728-14733, 2009.

CLAYTON, T. A., LINDON, J. C., CLOAREC, O., ANTTI, H., CHARUEL, C., HANTON, G., PROVOST, J. P., LE NET, J. L., BAKER, D., WALLEY, R. J., EVERETT, J. R., & NICHOLSON, J. K. Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalized drug treatment. **Nature**, v. 440, n. 7087, p. 1073-1077, 2006.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? a critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 232-242, 2011.

COURA-VITAL, W., DE ARAÚJO, V. E. M., REIS, I. A., AMANCIO, F. F., REIS, A. B., & CARNEIRO, M. Prognostic Factors and Scoring System for Death from Visceral Leishmaniasis: An Historical Cohort Study in Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. 12, 2014.

COURA-VITAL, W., KER, H. G., ROATT, B. M., AGUIAR-SOARES, R. D. O., DE ALMEIDA LEAL, G. G., DAS DORES MOREIRA, N., MACHADO OLIVEIRA, L. A., MACHADO, E. M. M., MORAIS, M. H. F., CORRÊA-OLIVEIRA, R., CARNEIRO, M., & REIS, A. B. Evaluation of Change in Canine Diagnosis Protocol Adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a New Proposal for Diagnosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91009, 2014.

COURA-VITAL, W., MARQUES, M. J., VELOSO, V. M., ROATT, B. M., DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R. D., REIS, L. E. S., BRAGA, S. L., MORAIS, M. H. F., REIS, A. B., & CARNEIRO, M. Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 8, p. e1291, 2011.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314-1320, November 1, 2002 2002.

DE ANDRADE, J. B., JUNIOR, J. T. M., MESQUITA, P. R. R., OLIVEIRA, F. S., DE MEDEIROS RODRIGUES, F., & BARROUIN-MELO, S. M. Perspectives for Diagnosis and Control of Leishmaniasis Based on Volatile Organic Compounds. 2015.

DE MORAES, C. M., STANCZYK, N. M., BETZ, H. S., PULIDO, H., SIM, D. G., READ, A. F., & MESCHER, M. C. Malaria-induced changes in host odors enhance mosquito attraction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 30, p. 11079-11084, 2014.

DE OLIVEIRA, L. S., RODRIGUES, F. D. M., DE OLIVEIRA, F. S., MESQUITA, P. R., LEAL, D. C., ALCÂNTARA, A. C., SOUZA, B. M., FRANKE, C. R., PEREIRA, P. A. P., & DE ANDRADE, J. B. *Headspace* solid phase microextraction/gas chromatography–mass spectrometry combined to chemometric analysis for volatile organic compounds determination in canine hair: A new tool to detect dog contamination by visceral leishmaniasis. **Journal of Chromatography B**, v. 875, n. 2, p. 392-398, 2008.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, p. 3-15, Oct 2003.

DORMONT, L., BESSIÈRE, J. M., MCKEY, D., & COHUET, A. New methods for field collection of human skin volatiles and perspectives for their application in the chemical ecology of human-pathogen-vector interactions. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 15, p. 2783-2788, 2013.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285-294, 2005.

EGAN, T., DONG, B., TIKUNOV, A., SEMELKA, C., BLACKWELL, J., SIMMONS, W., ... & MACDONALD, J. Effect of Ex-Vivo Lung Perfusion (EVLV)

on Metabolomic Profile of Human Lungs. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 32, n. 4, p. S247, 2013.

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às Técnicas de Planejamento de Experimentos**. Salvador: Vento Leste, 2015. 190p ISBN 978-85-8140-067-9.

FERREIRA, S. L. C., BRUNS, R. E., DA SILVA, E. G. P., DOS SANTOS, W. N. L., QUINTELLA, C. M., DAVID, J. M., DE ANDRADE, J. B., BREITKREITZ, M. C., JARDIM, I. C. S. F. & NETO, B. B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1–2, p. 2-14, 2007.

FONVILLE, J. M., RICHARDS, S. E., BARTON, R. H., BOULANGE, C. L., EBBELS, T., NICHOLSON, J. K., HOLMES, E., & DUMAS, M. E. The evolution of partial least squares models and related chemometric approaches in metabonomics and metabolic phenotyping. **Journal of Chemometrics**, v. 24, n. 11-12, p. 636-649, 2010.

FOWLER, S. J., BASANTA-SANCHEZ, M., XU, Y., GOODACRE, R., & DARK, P. M. Surveillance for lower airway pathogens in mechanically ventilated patients by metabolomic analysis of exhaled breath: a case-control study. **Thorax**, v. 70, n. 4, p. 320-325, 2015.

GIKONYO, N. K., HASSANALI, A., NJAGI, P. G., GITU, P. M., & MIDIWO, J. O. Odor composition of preferred (buffalo and ox) and nonpreferred (waterbuck) hosts of some savanna tsetse flies. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 5, p. 969-981, 2002.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004.

Gratacós-Cubarsí, M., Castellari, M., Valero, A., & García-Regueiro, J. A. Hair analysis for veterinary drug monitoring in livestock production. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 834, n. 1-2, p. 14-25, 2006.

GRIMALDI, G., TEVA, A., SANTOS, C. B., FERREIRA, A. L., & FALQUETO, A. The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 6, p. 966-971, 2012.

GUALLAR-HOYAS, C., TURNER, M. A., BLACKBURN, G. J., WILSON, I. D., & THOMAS, C. P. A workflow for the metabolomic/metabonomic investigation of exhaled breath using thermal desorption GC-MS. **Bioanalysis**, v. 4, n. 18, p. 2227-2237, 2012.

HENRY, M. SPE technology: principles and practical consequences. **Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications**. Marcel Dekker, New York, p. 125-182, 2000.

HOSSAIN, S. M. Z.; BOJKO, B.; PAWLISZYN, J. Automated SPME–GC–MS monitoring of *headspace* metabolomic responses of *E. coli* to biologically active components extracted by the coating. **Analytica Chimica Acta**, v. 776, n. 0, p. 41-49, 2013.

IJIMA, Y. Recent Advances in the Application of Metabolomics to Studies of Biogenic Volatile Organic Compounds (BVOC) Produced by Plant. **Metabolites**, v. 4, n. 3, p. 699-721, 2014.

KANG, J.-H.; BALDWIN, I. T. Training molecularly enabled field biologists to understand organism-level gene function. **Molecules Cells**, v. 26, p. 1-4, 2008.

KANNO, S.; SUGIMOTO, M. A Small-Volume Constant-Flow Air Sampling Device for Thermal Desorption GC Analysis. **Industrial health**, v. 33, n. 4, p. 207-211, 1995.

KHADEM, F.; UZONNA, J. E. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 901-915, 2014.

KING, J. W. Supercritical fluid extraction: present status and prospects. **Grasas y Aceites**, v. 53, n. 1, p. 8-21, 2002.

KINTZ, P. **Analytical and practical aspects of drug testing in hair**. CRC Press, 2006. ISBN 1420006193.

KNOLS, B. G.; MEIJERINK, J. Odors influence mosquito behavior. **Science and Medicine**, v. 4, p. 56-63, 1997.

KOAL, T.; DEIGNER, H. P. Challenges in Mass Spectrometry Based Targeted Metabolomics. **Current Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 216-226, 2010.

KOLTER, R. Microbial chemical ecology and the future of antibiotics. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, Supplement 1, n. 0, p. e326, 2010.

KOTŁOWSKA, A. Application of Chemometric Techniques in Search of Clinically Applicable Biomarkers of Disease. **Drug development research**, v. 75, n. 5, p. 283-290, 2014.

KROUPA, A., DEWULF, J., VAN LANGENHOVE, H., & VÍDEN, I. Breakthrough characteristics of volatile organic compounds in the –10 to +170 °C temperature range on Tenax TA determined by microtrap technology. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, n. 1–2, p. 215-223, 2004.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. LUTZOMYIA LONGIPALPIS AND THE ECO-EPIDEMIOLOGY of American visceral leishmaniasis, with particular reference to

Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.

LAWO, N. C., WEINGART, G. J., SCHUHMACHER, R., & FORNECK, A. The volatile metabolome of grapevine roots: First insights into the metabolic response upon phylloxera attack. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1059-1063, 2011.

Lee, J. H., Batterman, S. A., Jia, C., & Chernyak, S. Ozone artifacts and carbonyl measurements using Tenex GR, Tenex TA, Carbopack B, and Carbopack X adsorbents. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 56, n. 11, p. 1503-1517, 2006.

LI, K. M.; RIVORY, L. P.; CLARKE, S. J. Solid-phase extraction (SPE) techniques for sample preparation in clinical and pharmaceutical analysis: A brief overview. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 2, p. 95-102, 2006.

LIMA, I. P., MÜLLER, M. C., HOLANDA, T. A., HARHAY, M., COSTA, C. H. N., & COSTA, D. L. Human immunodeficiency virus/Leishmania infantum in the first foci of urban American visceral leishmaniasis: clinical presentation from 1994 to 2010. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 156-160, 2013.

LIU, H., LI, C., WANG, H., HUANG, Z., ZHANG, P., PAN, Z., & WANG, L. Characterization of Volatile Organic Metabolites in Lung Cancer Pleural Effusions by SPME-GC/MS Combined with an Untargeted Metabolomic Method. **Chromatographia**, v. 77, n. 19-20, p. 1379-1386, 2014.

LOGAN, J. G., BIRKETT, M. A., CLARK, S. J., POWERS, S., SEAL, N. J., WADHAMS, L. J., MORDUE, A. J., & PICKETT, J. A. Identification of Human-Derived Volatile Chemicals that Interfere with Attraction of *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 3, p. 308-322, 2008.

LOMTADZE, M. L., KHOCHAVA, M. A., SHALAMBERIDZE, I. A., KHARAIHVILI, V. I., & VOROB'ÉVA, E. O. Study of intravascular coagulation activation markers in patients with visceral leishmaniasis. **Georgian Med News**, n. 124-125, p. 47-50, 2005.

LUYKX, D. M. A. M.; VAN RUTH, S. M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 897-911, 2008.

MACHADO, V. E., CORRÊA, A. G., GOULART, T. M., DA ROCHA SILVA, F. B., ORTIZ, D. G. S., & PINTO, M. C. Attraction of the sand fly *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to chemical compounds in a wind tunnel. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-4, 2015.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T., BARROUIN-MELO, S. M., CORRÊA, A. G., DA ROCHA SILVA, F. B., MACHADO, V. E., GOVONE, J. S., & PINTO, M. C. A

laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Parasit Vectors**, v. 7, n. 1, p. 60, 2014.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T., MESQUITA, P. R. R., DOS SANTOS OLIVEIRA, W. F., OLIVEIRA, F. S., FRANKE, C. R., DE MEDEIROS RODRIGUES, F., DE ANDRADE, J. B., & BARROUIN-MELO, S. M. Identification of biomarkers in the hair of dogs: new diagnostic possibilities in the study and control of visceral leishmaniasis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 26, p. 6691-6700, 2014.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T. ; SANTOS, G. A. ; NOVAIS, H. O. ; SANTOS, R. C. ; MESQUITA, P. R. R. ; RODRIGUES, F. M. ; PINTO, M. C. ; BARROUIN-MELO, Stella Maria . Efeito de diferentes variáveis na resposta comportamental de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), vetor da leishmaniose visceral, em túnel de vento. In: XXV Congresso Brasileiro de Entomologia, 2014, Goiânia. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Entomologia, 2014.

MANSUETO, P., SEIDITA, A., VITALE, G., & CASCIO, A. Leishmaniasis in travelers: A literature review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, n. 6, p. 563-581, 2014.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MAROLI, M.; KHOURY, C. Current Approaches to the Prevention and Control of Leishmaniasis Vectors. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 1, p. 49-52, 2006.

MARTINS-MELO, F. R., DA SILVEIRA LIMA, M., RAMOS JR, A. N., ALENCAR, C. H., & HEUKELBACH, J. Mortality and Case Fatality Due to Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Nationwide Analysis of Epidemiology, Trends and Spatial Patterns. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93770, 2014.

MATHERS, C. D.; EZZATI, M.; LOPEZ, A. D. Measuring the Burden of Neglected Tropical Diseases: The Global Burden of Disease Framework. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 1, n. 2, p. e114, 2007.

MILLAR, J.; HAYNES, K. **Methods in Chemical Ecology Volume 1: Chemical Methods**. Springer US, 1998. ISBN 9780412080715.

MOLINA-VILLALBA, I., LACASAÑA, M., RODRÍGUEZ-BARRANCO, M., HERNÁNDEZ, A. F., GONZALEZ-ALZAGA, B., AGUILAR-GARDUÑO, C., & GIL, F. Biomonitoring of arsenic, cadmium, lead, manganese and mercury in urine and hair of children living near mining and industrial areas. **Chemosphere**, v. 124, n. 0, p. 83-91, 2015.

MOREIRA, E. D., DE SOUZA, V. M. M., SREENIVASAN, M., NASCIMENTO, E. G., & DE CARVALHO, L. P. Assessment of an optimized dog-culling program in

the dynamics of canine Leishmania transmission. **Veterinary parasitology**, v. 122, n. 4, p. 245-252, 2004.

MURRAY, H. W., BERMAN, J. D., DAVIES, C. R., & SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

OCKENFELS, P; VAN DER PERS, J (2004). Electroantennography a practical introduction. Syntech, Kirchzarten. Disponível em: <<http://www.syntech.nl/manuals/EAGpract.pdf>> Acesso em: 16 jun. 2015

O'SHEA, B., REBOLLAR-TELLEZ, E., WARD, R. D., HAMILTON, J. G. C., EL NAIEM, D., & POLWART, A. Enhanced sandfly attraction to Leishmania-infected hosts. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 2, p. 117-118, 2002.

OKADA, T., MOCHAMAD AFENDI, F., ALTAF-UL-AMIN, M., TAKAHASHI, H., NAKAMURA, K., & KANAYA, S. Metabolomics of Medicinal Plants: The Importance of Multivariate Analysis of Analytical Chemistry Data. **Current Computer - Aided Drug Design**, v. 6, n. 3, p. 179-196, 2010.

ORAV, A.; VIITAK, A.; VAHER, M. Identification of bioactive compounds in the leaves and stems of *Aegopodium podagraria* by various analytical techniques. **Procedia Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 152-160, 2010.

PAREJKO, K. What is chemical ecology? **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, n. 12, p. 2219-2221, 1988.

PEIXOTO, H. M.; DE OLIVEIRA, M. R. F.; ROMERO, G. A. S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 3, p. 334-352, 2015.

PEREIRA, A. S.; MARTIN, J. W (2014). On-Line Solid Phase Extraction–HPLC–Orbitrap Mass Spectrometry for Screening and Quantifying Targeted and Non-Targeted Analytes in Oil Sands Process-Affected Water and Natural Waters in the Athabasca Oil Sands Region. Disponível em <<https://era.library.ualberta.ca/downloads/hq37vp69m>> Acesso em: 16 jul. 2015

PICADO, A., DASH, A. P., BHATTACHARYA, S., & BOELAERT, M. Vector control interventions for visceral leishmaniasis elimination initiative in South Asia, 2005-2010. **Indian Journal of Medical Research**, v. 136, p. 22, 2012

PINTO, M. C., BRAY, D. P., EIRAS, A. E., CARVALHEIRA, H. P., & PUERTAS, C. P. Attraction of the cutaneous leishmaniasis vector *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to host odour components in a wind tunnel. **Parasit Vectors**, v. 5, n. 1, p. 210, 2012.

QI, W., FAN, Z. C., WANG, C. L., HOU, L. H., LIU, J. F., & CAO, X. H. Non-targeted metabolomic reveals the effect of salt stress on global metabolite of

halotolerant yeast *Candida versatilis* and principal component analysis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1553-1562, 2014.

RAGUSO, R. A., AGRAWAL, A. A., DOUGLAS, A. E., JANDER, G., KESSLER, A., POVEDA, K., & THALER, J. S. The raison d'être of chemical ecology. **Ecology**, v. 96, n. 3, p. 617-630, 2015.

RAVAGNANI, F. G., SAIDEMBERG, D. M., FARIA, A. L. C., SARTOR, S. B., OLIVEIRA, D. N., & CATHARINO, R. R. Quality Control of Biomarkers: From the Samples to Data Interpretation. **Assessment**, v. 11, p. 12, 2012.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., & MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIVIER, L. Techniques for analytical testing of unconventional samples. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 147-165, 2000.

ROBERTSON, D. G. Metabonomics in toxicology: a review. **Toxicological Sciences**, v. 85, n. 2, p. 809-822, 2005.

ROOT, R. B. Organization of a Plant-Arthropod Association in Simple and Diverse Habitats: The Fauna of Collards (*Brassica Oleracea*). **Ecological Monographs**, v. 43, n. 1, p. 95-124, 1973.

RUBIO, N. C., HASTEDT, M., GONZALEZ, J., & PRAGST, F. Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios. **International Journal of Legal Medicine**, v. 129, n. 1, p. 69-84, 2015.

SAISHO, K.; TANAKA, E.; NAKAHARA, Y. Hair analysis for pharmaceutical drugs. I. Effective extraction and determination of phenobarbital, phenytoin and their major metabolites in rat and human hair. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 1, p. 59-64, 2001.

SÁNCHEZ-PALOMO, E., ALAÑÓN, M. E., DÍAZ-MAROTO, M. C., GONZÁLEZ-VIÑAS, M. A., & PÉREZ-COELLO, M. S. Comparison of extraction methods for volatile compounds of Muscat grape juice. **Talanta**, v. 79, n. 3, p. 871-876, 2009.

SANCHEZ, M. A., DIAZ, N. L., ZERPA, O., NEGRON, E., CONVIT, J., & TAPIA, F. J. Organ-specific immunity in canine visceral Leishmaniasis: Analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 6, p. 618-624, 2004.

SAÚDE, S. D. V. E. Leishmaniose Visceral (LV). 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o->

ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-visceral-lv> Acesso em: 06 mai. 2015.

SILVA, A. V. M. D., PAULA, A. A. D., CABRERA, M. A. A., & CARREIRA, J. C. A. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. **Cad Saude Publica**, v. 21, n. 1, p. 324-8, 2005.

SILVA, C. L.; PASSOS, M.; CAMARA, J. S. Solid phase microextraction, mass spectrometry and metabolomic approaches for detection of potential urinary cancer biomarkers-A powerful strategy for breast cancer diagnosis. **Talanta**, v. 89, p. 360-368, 2012.

SIMPSON, N. J. K. **Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications**. Taylor & Francis, 2000. ISBN 9781420056242.

SNART, C. J. P.; HARDY, I. C. W.; BARRETT, D. A. Entometabolomics: applications of modern analytical techniques to insect studies. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, v. 155, n. 1, p. 1-17, 2015.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Sampling volatile compounds from natural products with *headspace*/solid-phase micro-extraction. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 235-242, 2007.

STENN, K. S.; PAUS, R. Controls of Hair Follicle Cycling. **Physiological reviews**, v. 81, n. 1, p. 449-494, 2001.

SUPELCO. 2002. A tool for selecting an adsorbent for thermal desorption applications. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General_Information/t402025.pdf> Acesso em: 06 jul. 2015

SYED, Z.; LEAL, W. S. Acute olfactory response of Culex mosquitoes to a human- and bird-derived attractant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 44, p. 18803-18808, 2009.

TER KUILE, B. H.; WESTERHOFF, H. V. Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway. **FEBS Letters**, v. 500, n. 3, p. 169-171, 2001.

THOMAZINI, M. J. A Comunicação Química entre os Insetos: Obtenção e Utilização de Feromônios no Manejo de Pragas. **Embrapa Florestas-Capítulo em livro técnico-científico (ALICE)**, 2012.

TIKUNOV, Y., LOMMEN, A., DE VOS, C. R., VERHOEVEN, H. A., BINO, R. J., HALL, R. D., & BOVY, A. G. A Novel Approach for Nontargeted Data Analysis for Metabolomics. Large-Scale Profiling of Tomato Fruit Volatiles. **Plant Physiology**, v. 139, n. 3, p. 1125-1137, 2005.

TRABUE, S. L., SCOGGIN, K. D., LI, H., BURNS, R., & XIN, H. Field sampling method for quantifying odorants in humid environments. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 10, p. 3745-3750, 2008.

TRAVI, B. L., TABARES, C. J., CADENA, H., FERRO, C., & OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: Relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 3-4, p. 119-124, 2001.

TRIVEDI, D. K.; ILES, R. K. HILIC-MS-based shotgun metabolomic profiling of maternal urine at 9-23 weeks of gestation - establishing the baseline changes in the maternal metabolome. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 2, p. 240-245, 2015.

VILELA, E. F.; LÚCIA, T.; DELLA, M. Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação. In: (Ed.). **Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação**: Holos editora, 2001.

WALRADT, J. P. Analysis of Fragrance Materials. In: THEIMER, E. T. (Ed.). **Fragrance Chemistry**. San Diego: Academic Press, 1982. p.575-615. ISBN 978-0-12-685850-1.

WENNIG, R. Potential problems with the interpretation of hair analysis results. **Forensic Science International**, v. 107, n. 1-3, p. 5-12, 2000.

WERNECK, G. L. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos De Saude Publica**, v. 26, n. 4, p. 645-645, 2010.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, p. 851-856, 2014.

WHO. **Control of the leishmaniasis**. Genebra. 2010. (949)

WOOLFENDEN, E. Review: Optimising Analytical Performance and Extending the Application Range of Thermal Desorption for Indoor Air Monitoring. **Indoor and Built Environment**, v. 10, n. 3-4, p. 222-231, 2001.

World Health Organization. 2013. Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2012. Disponível em:
<http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013.png?ua=1>. Acesso em: 11 mai. 2015

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate analysis in metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 92-107, 2013.

ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA, J. T. B.; LEAL, W. S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova**, v. 22, p. 263-268, 1999.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, p. 722-731, 2009.

ZHANG, A., SUN, H., WANG, P., HAN, Y., & WANG, X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **Analyst**, v. 137, n. 2, p. 293-300, 2012.

8.0 ANEXO

Anexo 1 – Teste diagnóstico: qPCR

Amostra	qPCR de Baço	Resultado Definitivo
RUR 007	0,00	Negativo, ausência do parasita
RUR 017	0,00	Negativo, ausência do parasita
RUR 018	0,00	Negativo, ausência do parasita
RUR 019	0,00	Negativo, ausência do parasita
RUR 020	0,00	Negativo, ausência do parasita
RUR 052	0,00	Negativo, ausência do parasita
RUR 064	0,00	Negativo, ausência do parasita
RUR 078	0,00	Negativo, ausência do parasita
RUR 083	0,00	Negativo, ausência do parasita
RUR 110	0,00	Negativo, ausência do parasita
RUR 111	0,00	Negativo, ausência do parasita
RUR 155	0,00	Negativo, ausência do parasita
RUR 042	0,11	Positivo, baixa carga parasitária
RUR 109	0,64	Positivo, baixa carga parasitária
RUR 039	1,07	Positivo, baixa carga parasitária
RUR 021	1,86	Positivo, baixa carga parasitária
RUR 023	2,00	Positivo, baixa carga parasitária
RUR 073	6,10	Positivo, baixa carga parasitária
RUR 001	6,85	Positivo, baixa carga parasitária
RUR 108	16,98	Positivo, baixa carga parasitária
RUR 127	19,44	Positivo, baixa carga parasitária
RUR 056	599,72	Positivo, baixa carga parasitária
RUR 004	695,01	Positivo, baixa carga parasitária
RUR 068	992,57	Positivo, baixa carga parasitária
RUR 016	1566,14	Positivo, alta carga parasitária
RUR 191	2566,40	Positivo, alta carga parasitária
RUR 069	3194,00	Positivo, alta carga parasitária
RUR 074	3925,56	Positivo, alta carga parasitária
RUR 150	9789,00	Positivo, alta carga parasitária
RUR 112	10107,92	Positivo, alta carga parasitária
RUR 055	10670,58	Positivo, alta carga parasitária
RUR 072	15080,00	Positivo, alta carga parasitária
RUR 038	46987,26	Positivo, alta carga parasitária
RUR 065	77628,50	Positivo, alta carga parasitária
RUR 003	1498224,13	Positivo, alta carga parasitária