

AVALIAÇÃO DE COMPOSIÇÃO DE CREATINAS DE DIFERENTES FABRICANTES ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN

Letícia Cristine de Siqueira Santos¹; Dr Landulfo Silveira Jr.²; Dr Marcos Tadeu Tavares Pacheco³ (orientador)

RESUMO:

O suplemento de creatina, que vem sendo muito consumido nos últimos anos, é um composto sintético de aminoácidos, que interfere no metabolismo do fosfato promovendo um aumento da energia. O objetivo deste trabalho consiste em é analisar creatina monohidratada de 5 fabricantes diferentes com intuito de verificar se há diferenças qualitativas e quantitativas em suas composições utilizando a espectroscopia Raman. O procedimento de coleta consistiu em separar, identificar as amostras, posicionar na sonda Raman e extrair o espectro correspondente. O espectro obtido do retro espalhamento da amostra contém informações de que há a presença de um composto adicional em uma das amostras, sendo possivelmente um outro tipo de aminoácido.

INTRODUÇÃO:

O suplemento de creatina, que vem sendo muito consumido nos últimos anos, é um composto sintético de aminoácidos, com fórmula química $C_4H_9N_3O_2$, que interfere no metabolismo do fosfato promovendo um aumento da energia, da proteína muscular, da cinética do cálcio, das células satélites e dos fatores de crescimento e conseqüentemente um aumento na massa muscular, força e resistência durante os treinos (CANDAW et al.,2019; MILLS et al.,2021).

Isso ocorre devido o aumento da disponibilidade de creatina total nos músculos esqueléticos (creatina livre e fosfocreatina), que favorece a síntese de ATP (adenosina trifosfato) responsável por gerar mais energia para a execução do exercício de alta intensidade (KREIDER et al., 2017).



Atualmente a técnica utilizada para verificação de qualidade dos suplementos de creatina é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (em inglês, High Performance Liquid Chromatography - HPLC), pois apresenta baixo custo e alta eficiência cromatográfica e seletividade dos íons catiônicos emparelhadores (MO et al., 2003).

Como uma alternativa de análise está a espectroscopia Raman (ER), que é baseada no espalhamento inelástico da luz pelas moléculas polarizáveis que revela os níveis de energia vibracional das ligações químicas da molécula, como cada molécula tem sua assinatura vibracional única trata-se de uma técnica sensível, pois essas vibrações únicas funcionam como impressão digital (YI et al., 2018; MOREIRA et al., 2019).

Os picos Raman distintos associados às suas ligações moleculares fornecem um padrão semelhante a uma impressão digital que pode ser utilizada para identificação. Uma das vantagens desta técnica de ER é que a estrutura molecular da amostra sem mantém intacta pós análise, uma vez que não há aditivos químicos para realização da amostra assim como o tempo de análise, na medida que os espectros são gerados em tempo real (HACKSHAW et al., 2020; MOREIRA et al., 2019).

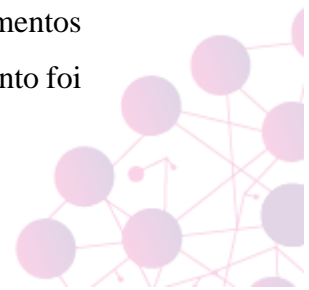
Devido aos benefícios desse suplemento ter sido divulgado para a população nos últimos anos houve uma crescente produção por diversos fabricantes e com isso subtipos de creatina surgiram. Logo, o objetivo deste trabalho é analisar creatina de diferentes fabricantes afim de verificar se há diferenças qualitativas e quantitativas utilizando a técnica de espectroscopia Raman.

PALAVRAS-CHAVE:

Creatina, Benefícios da Creatina, Espectroscopia Raman.

MÉTODO:

O experimento foi realizado no Laboratório de Diagnóstico Óptico do Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITÉ), Parque Tecnológico de São José dos Campos, São José dos Campos, SP, Brasil. Para este estudo, foram adquiridas 5 amostras comerciais de creatina em pó de diferentes fabricantes. Os suplementos foram identificados antes do início das análises e cerca de 1mg de cada suplemento foi



posicionado na sonda Raman para coleta de sinal espectral em triplicata com tempo de exposição de 30s.

O sinal retroespalhado pela amostra contendo informações de sua composição é disperso pelo espectrógrafo/CCD e armazenado na memória do computador. Todas as amostras foram analisadas no mesmo dia sob as mesmas condições experimentais. Os suplementos foram submetidos a um espectrômetro Raman dispersivo (modelo Dimension P1, Lambda Solutions Inc., MA, EUA), que utiliza excitação por laser de diodo (830nm, 300mW), gerando imagens de um espectrógrafo com rede de difração (1200 linhas/mm) e Câmera CCD (100x1340 pixels), gerando espectros Raman de alta resolução na faixa de 400 a 1800 cm^{-1} .

Ao final da coleta, os espectros Raman foram processados para remover picos de raios cósmicos, fluorescência de fundo (sinal de fundo) e depois normalizados pela área sob a curva. Em seguida, o espectro médio foi calculado para cada amostra e o gráfico de dispersão considerando a intensidade dos picos em relação ao número de onda (Raman Shift) foi obtido utilizando o software Excel® 2019 para comparação. As bandas Raman das formulações foram comparadas para verificar suas semelhanças e diferenças espectrais.

Para avaliar as alterações na quantidade dos compostos das creatinas dos diferentes fabricantes, os dados espectrais foram submetidos à análise de componente principal (PCA). Uma técnica multivariada utilizada para detectar as variações estatísticas dentro do grupo e entre os grupos, com o intuito de correlacionar as informações espectrais apresentadas nos componentes principais com os marcadores bioquímicos específicos das amostras. A PCA decompõe os espectros em vetores de carregamento de componentes principais e score. Os vetores de carregamentos de componentes se assemelham aos espectros Raman (com picos positivos e negativos) e poderão ser utilizados para indicar quais são as características espectrais relevantes para cada grupo. Já os scores serão usados para quantificar características particulares apresentadas em cada vetor para cada sujeito ou grupo. À vista disso, os vetores podem revelar a presença de características de compostos no conjunto de dados e os scores



podem ser utilizados para apontar qual voluntário apresenta essas características na urina. A PCA foi implementado usando a função princomp.m no Matlab 7.4 (The Mathworks Inc., MA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

A realização do trabalho permitiu uma compreensão sobre a constituição molecular do suplemento de creatina, quatro das cinco amostras têm o mesmo padrão de espectro. No entanto, uma delas, a amostra do fabricante 5 demonstrou a presença de mais alguns compostos em sua constituição, como é possível verificar na Figuras 1.

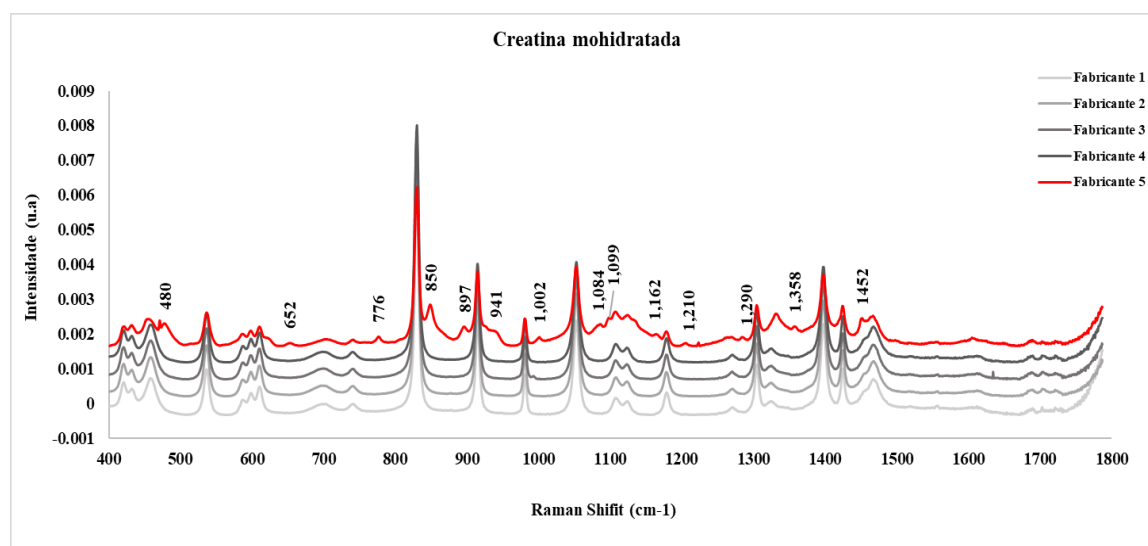


Figura 1. Comparação de Creatina monohidratada de diferentes fabricantes

As Figuras 2, 3, 4 e 5 são referentes a Análise de Principal Componente (PCA) que foi realizada com as 5 amostras de creatina monohidratada. Na Figura 2 é possível verificar que o componente principal 1 contém cerca de 96,7% da variância contida no conjunto de dados, e indica a presença de picos de creatina conforme a literatura (BELL et al., 2012). Com exceção da amostra do fabricante 5 todas as outras apresentam a mesma quantidade de creatina presentes na constituição do produto.

A Figura 2 indica os picos comuns às cinco amostras de creatina monohidratada. Sendo que os mais intensos são os picos na região do Raman Shift 831 cm^{-1} , 915 cm^{-1} , 382 cm^{-1} , 1053 cm^{-1} , 1397 cm^{-1} , caracterizando o padrão da creatina monohidratada.

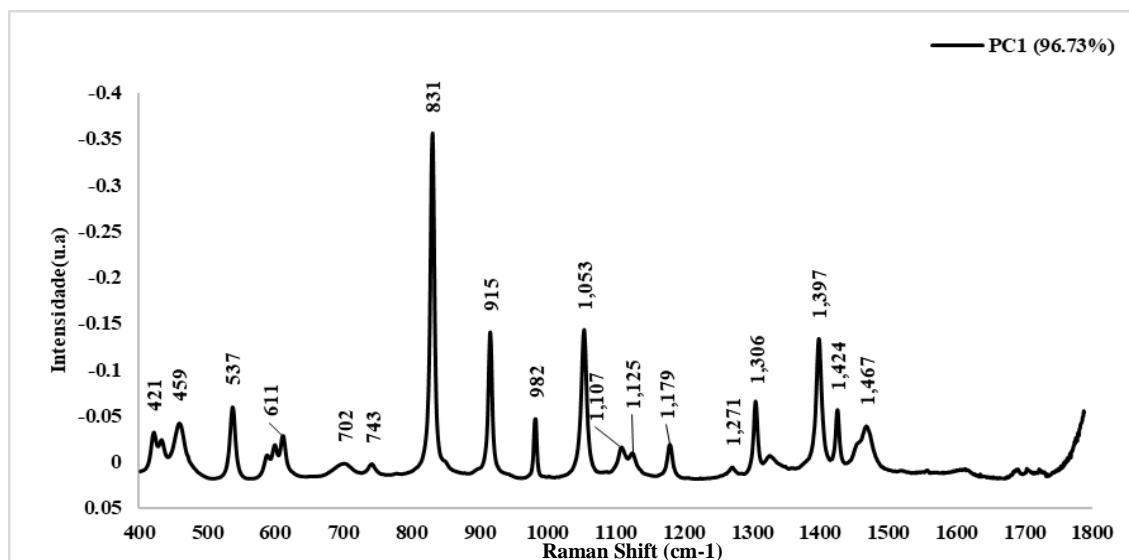


Figura 2. Componente Principal 1 da Creatina monohidratada

A Figura 3 demonstra os picos Raman do composto (s) adicionado no produto 5 diferentes dos outros produtos: 478 cm^{-1} , 652 cm^{-1} , 778 cm^{-1} , 849 cm^{-1} , 896 cm^{-1} , 939 cm^{-1} , 1002 cm^{-1} , 1087 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} , 1164 cm^{-1} , 1359 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} .

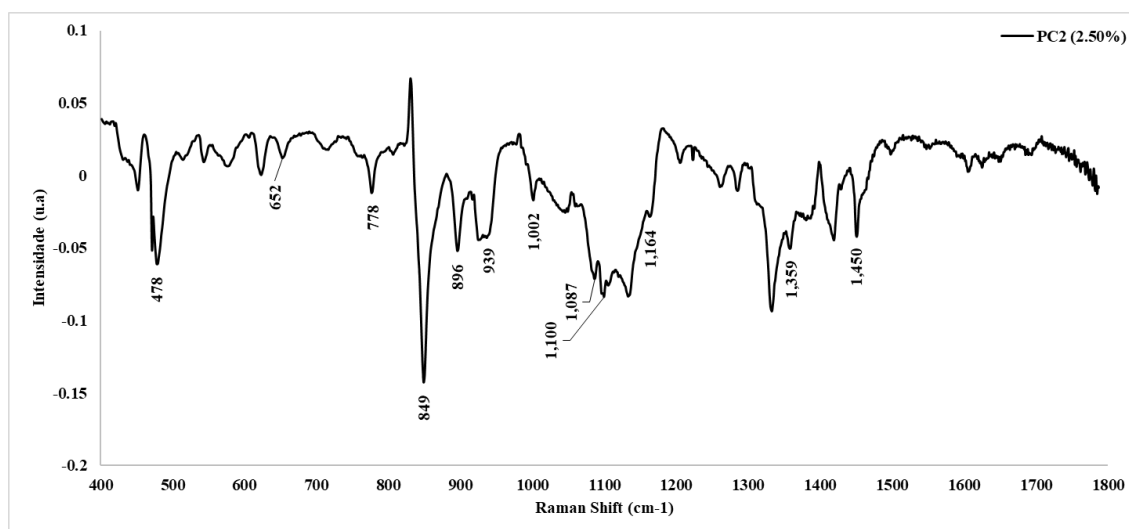


Figura 3. Componente Principal 2 da Creatina monohidratada fabricante 5



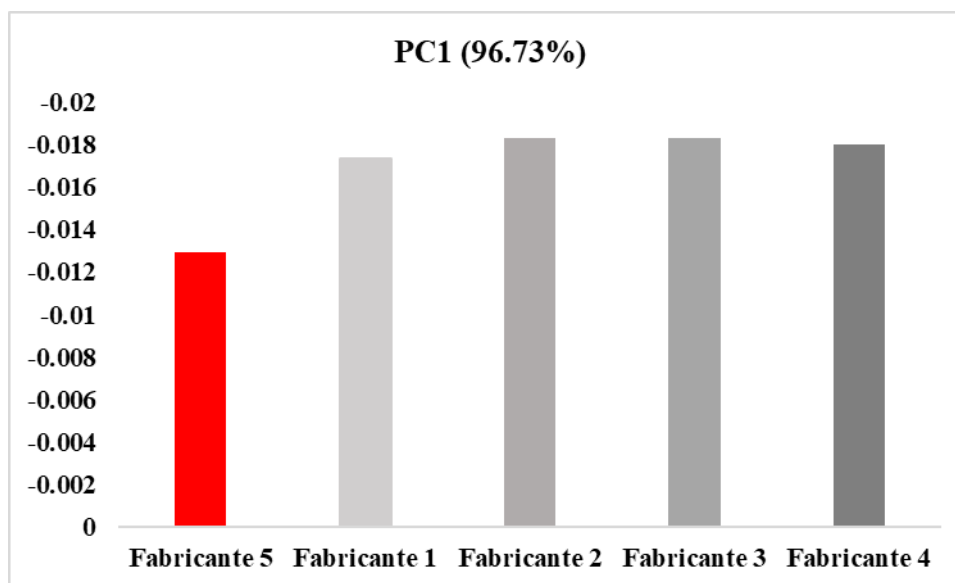


Figura 4. Análise de Principal Componente 1 das Creatinas monohidratadas

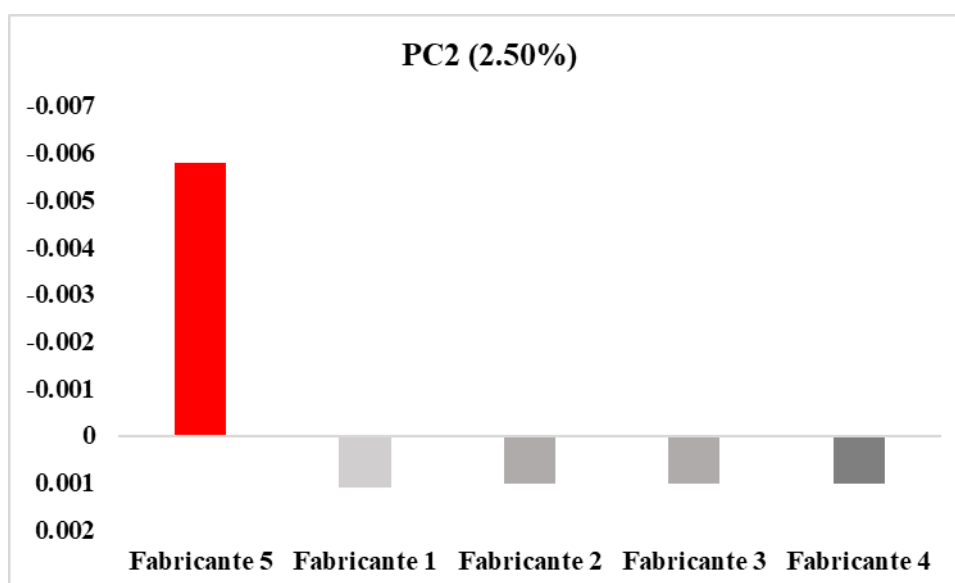


Figura 5. Análise de Principal Componente 2 das Creatinas monohidratadas

Na Figura 4 é possível verificar que o componente principal 1 contém cerca de 96,7% da variância contida no conjunto de dados, e indica a presença de picos de creatina conforme a literatura (BELL et al., 2012). Com exceção da amostra do fabricante 5 todas as outras apresentam a mesma quantidade de creatina presentes na constituição do produto.



Enquanto que na Figura 5 o segundo componente principal de todas as amostras ficou evidenciado principalmente na amostra do Fabricante 5. Aproximadamente 2,5% da variância contida no conjunto de dados indica a presença de picos de outros compostos além dos comuns a todas as amostras.

Desta forma, a partir da PCA, é possível inferir que dos produtos analisados quatro deles apresentam os mesmos aminoácidos presentes em quantidades parecidas, como demonstrado nas Figuras 4 e 5. E na amostra referente ao Fabricante 5 tem a adição de mais um aminoácido, possivelmente a L-leucina, comparando os espectros com a literatura (ZHU et al.,2010).

Logo, a espectroscopia Raman se mostra uma técnica tão adequada quanto ao HPLC, porém com algumas vantagens, pois não necessita de nenhum tipo de adição de reagente químico para análise, não compromete a estrutura química da molécula e os espectros são obtidos em tempo real. Enquanto que o HPLC utiliza reagentes químicos com absorção na região do ultravioleta para procedimento cromatográfico podendo alterar a estrutura química básica da amostra.

CONCLUSÕES:

A realização do trabalho permite concluir que dos cinco produtos utilizados na análise todos tem a formação base dos constituintes da creatina monohidratada, porém uma das amostras, apresenta mais um composto, possivelmente a L-leucina. Contudo, mais estudos são necessários para verificar se há outros tipos de compostos adicionados, uma vez que nem todos os picos diferentes presentes no amostras foram relacionados com o espectro da L-leucina encontrado na literatura.



REFERÊNCIAS:

Bell SEJ, Stewart SP, Speers SJ (2012). **Raman Spectroscopy of Drugs of Abuse. In: Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science.** Chalmers JM, Edwards HGM, Hargreaves MD. Chichester: John Wiley & Sons; 2012. p. 323

Candow, D. G.; Forbes, S. C.; Chilibeck, P. D.; Cornish, S. M.; Antonio, J.; & Kreider, R. B. (2019). **Variables Influencing the Effectiveness of Creatine Supplementation as a Therapeutic Intervention for Sarcopenia.** *Frontiers in Nutrition.* 6. doi:10.3389/fnut.2019.00124.

Hackshaw, K. V.; Miller, J. S.; Aykas, D. P.; Rodriguez-Saona. (2020). **Vibrational Spectroscopy for Identification of Metabolites in Biologic Samples.** *L. Molecules.* 2020 Oct 15;25(20):4725. doi: 10.3390/molecules25204725.PMID: 33076318

Mills, S.; Candow, D. G.; Forbes, S. C.; Neary, J. P.; Ormsbee, M. J.; & Antonio, J. (2020). **Effects of Creatine Supplementation during Resistance Training Sessions in Physically Active Young Adults.** *Nutrients.* 12(6), 1880. doi:10.3390/nu12061880

Mo, Y., Dobberpuhl, D., & Dash, A. K. (2003). **A simple HPLC method with pulsed EC detection for the analysis of creatine.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 32(1), 125–132. doi:10.1016/s0731-7085(03)00028-1

Moreira, L. P., Rocco, D. D. F. M., da Silva, A. G., Pacheco, M. T. T., & Silveira, L. (2019). **Detecting creatine excreted in the urine of swimming athletes by means of Raman spectroscopy.** *Lasers in Medical Science.* doi:10.1007/s10103-019-02843-z

Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q., & Wan, X. (2011). **Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,* 78(3), 1187–1195. doi:10.1016/j.saa.2010.12.079





FOMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores agradecem ao Instituto Ânima pelo apoio concedido ao projeto de pesquisa.

