

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA TERRA  
DEPARTAMENTO DE GEOLOGIA

LETÍCIA SAYURI PASTORE

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DE CÁLCULOS RENAIS**



CURITIBA

NOVEMBRO DE 2017

LETÍCIA SAYURI PASTORE

## **DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DE CÁLCULOS RENAIS**

Monografia apresentada à Disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II como requisito parcial para a obtenção da graduação em Geologia, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

**Orientação:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anelize Manuela Bahniuk Rumbelsperger

**Co-orientação:** Prof. Dr. Sandro Froehner

CURITIBA

2017

*Ao meu querido pai de coração e eterno mestre,  
José Manoel dos Reis Neto, e à todas as pessoas que terão suas vidas  
impactadas de alguma forma por esse trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à Deus por ter me dado forças e vontade para chegar até onde cheguei, e pelo Seu amor incondicional.

Ao professor Sandro, pela paciência e orientação desde o começo, por tantos ensinamentos passados e pelo acompanhamento de perto do início ao fim da pesquisa.

À professora Anelize, pela visão e entusiasmo, pela confiança depositada em mim para a realização desse trabalho e pela orientação numa área tão nova para a geologia que é a geomedicina.

À Aluana Schleder, que tanto me ajudou em todas as etapas desse trabalho, pela atenção, paciência e cuidado, muito obrigada; e ao Juan Sáñez, que aprimorou a técnica desde o começo para chegar com maestria nos resultados em que chegamos, além dos ensinamentos passados.

Ao professor Maurício, aos alunos da medicina Phillipe, Rosa e Giovanna, da UFPR e PUC-PR, e ao professor Jahnert, pelas discussões e pela parceria nesse projeto. À Ísis, por ser sempre tão solícita quando eu precisei.

À equipe do LAMIR - Fran, Keiji e Marcelo, pela amizade durante todos esses anos da minha graduação e por serem sempre tão prestativos e receptivos. Ao Carioca e à Lari, pelo carinho e apoio, e por me dar conselhos motivacionais e de vida quando precisei.

À minha família pelo carinho e suporte, e principalmente à minha mãe, pelo apoio, paciência e cuidado, pelas discussões geológicas durante esse tempo e pela compreensão quando eu tive que me ausentar para fazer meu TCC. À minha prima Dani, pela parceria e pelas risadas.

Aos meus amigos de graduação, principalmente à minha equipe do Mapa, Paula e Alberto, pela amizade desde o início do curso, pelo companheirismo e por contribuírem para que eu me tornasse uma pessoa melhor.

Às pessoas da minha célula, e principalmente à Fer, ao Rafa e ao Dani, por serem amigos tão amáveis e grandes conselheiros. À Elisiane e à Eyshila, pelo carinho incondicional e por compartilharem da mesma fé.

*“O Senhor é a minha rocha, a minha fortaleza  
e o meu libertador, o meu Deus é o meu  
rochedo, em quem me refugio.”*

*Salmos 18:2*

## RESUMO

Cálculos renais são concreções compostas por minerais orgânicos que se formam no interior do sistema urinário devido à supersaturação urinária e que dão o nome à doença nefrolitíase. Os fatores que controlam sua formação são atualmente alvo de estudos, os quais atribuem influência pelo pH, pela composição química dos solutos excretados pelos rins, pela dureza da água, por atividade microbial e principalmente por hábitos alimentares. Eles podem ser monominerálicos, compostos por oxalatos de cálcio (whewellita e whedellita), fosfatos (estruvita, apatita, brushita e whitlockita) e minerais biogênicos (cistina e ácido úrico). Também podem ser biminerálicos, com variadas junções desses minerais, mas principalmente compostos pelas duplas whewellita + wedellita e estruvita + apatita. Uma pequena porção dos cálculos é composta por três ou mais minerais. A composição mineralógica dos cálculos renais já está bem determinada, contudo não se sabe ao certo qual a influência da presença de bactérias na sua formação e desenvolvimento. Este trabalho tem como proposta determinar se existe uma influência biogênica na formação dos cálculos, qual a relação entre a sua nucleação e crescimento no organismo humano e quais são as consequentes mudanças metabólicas associadas. O estudo refere-se à sete amostras providas do Hospital de Clínicas da UFPR, de diferentes composições mineralógicas, provindos de pacientes de diferentes idades. A moagem das amostras foi realizada no LAMIR (Laboratório de Análises de Minerais e Rochas); e a preparação dos compostos lipídicos foi feita no LGPA (Laboratório de Geoquímica do Petróleo e Ambiental), através do fracionamento e metilação dos compostos de interesse. As análises foram realizadas no LPH (Laboratório de Pesquisas Hidrogeológicas) através da técnica de Cromatografia a Gás acoplada à um Espectrômetro de Massa, que identifica os diferentes compostos lipídicos presentes em cada amostra. Foram encontrados ácidos pertencentes ao grupo dos ácidos graxos livres, fosfolipídios e colesterol. Os principais ácidos graxos livres identificados foram os ácidos miristoleico, palmítico, elaídico, linoleico e esteárico, que apresentam relativa diferença de acordo com a mineralogia da amostra. Os fosfolipídios determinados incluem principalmente os ácidos butírico e hexanoico, e praticamente não há diferença desses compostos entre amostras de diferentes composições mineralógicas. Já o colesterol está presente em 5 das 7 amostras, juntamente com o ácido hexanedioico, que aparece com alta intensidade em todas as amostras. Através dos resultados foi possível calcular a razão entre os ácidos palmítico e miristoleico nas amostras compostas por estruvita, que apresenta uma faixa de 14 a 16, o que pode ser usado como assinatura da composição lipídica de cálculos com essa mineralogia. As fontes desses compostos ainda são motivo para debate - podem ser tanto de hábitos alimentares quanto pela produção através de bactérias contidas no organismo.

**Palavras-chave:** geomedicina, composição lipídica, cálculos renais, cromatografia, nefrolitíase.

## ABSTRACT

Kidney stones are concretions composed by organic minerals that form inside the urinary tract due to urinary supersaturation and name the disease nephrolithiasis. Controlling factors for its formation are currently a study target, attributing to the influence of pH, chemical composition of solutes excreted by the kidneys, water hardness, microbial activity and specially for eating habits. Kidney stones can either be monomineralic, composed by calcium oxalate (whewellite and weddellite), phosphates (struvite, apatite, brushite and whitlockite) and biogenic minerals (cystine and uric acid). They can also be bimineralic, with varied combinations amongst these minerals, but mostly composed by whewellite + weddellite and struvite + apatite. A small portion is composed by three or more minerals. The mineral composition of kidney stones is well known, however, it is unclear the role of bacteria in its formation and development. The purpose of this research is to determine whether there is a biogenic influence in the formation of renal calculi, what is its relationship with nucleation and growth and what are the consequent associated metabolic changes. The present study was done on seven samples donated by the *Hospital de Clínicas* of Curitiba – PR, from patients of different ages. Grinding of samples was fulfilled in the *Laboratório de Análises de Minerais e Rochas* (LAMIR), preparation of lipidic compounds was made in the *Laboratório de Geoquímica do Petróleo e Ambiental* (LGPA) through fractionation and methylation of interest compounds. Analyzes were made in the *Laboratório de Pesquisas Hidrogeológicas* (LPH) through Gas Chromatography coupled with a Mass Spectrometer, distinguishing different lipid compounds in each sample. The defined groups of lipids were free fatty acids, phospholipids and cholesterol. The main free fatty acids determined were myristoleic, palmitic, elaidic, linoleic and stearic acids, that present a relative difference according to the mineralogy of the sample. Phospholipids include mainly butyric and hexanoic acids, and there is almost no difference amongst these compounds in samples of different mineral composition. Cholesterol however, is present in 5 of 7 samples, along with hexanedioic acid, that appears with high intensity in all samples. Based on the above results, the ratio between palmitic and myristoleic acids in struvite samples range between 14 and 16. This range can be used as a signature for stones composed of struvite. Sources of these compounds are still a reason for debate – they can either be of feeding habits, or from bacterial activity in the human body.

**Key words:** geomedicine, lipid composition, kidney stones, chromatography, nephrolithiasis.

## SUMÁRIO

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                           | <b>10</b> |
| <b>1.1 JUSTIFICATIVA .....</b>                                       | <b>11</b> |
| <b>1.2 OBJETIVOS.....</b>                                            | <b>11</b> |
| <b>2. ESTADO DA ARTE.....</b>                                        | <b>12</b> |
| <b>2.1 PRINCIPAIS MINERAIS ENCONTRADOS EM CÁLCULOS RENAIIS... 12</b> |           |
| 2.1.1 OXALATO DE CÁLCIO .....                                        | 12        |
| 2.1.2 FOSFATO DE CÁLCIO .....                                        | 13        |
| 2.1.3 ESTRUVITA .....                                                | 14        |
| 2.1.4 ÁCIDO ÚRICO (URICITA).....                                     | 14        |
| 2.1.5 CISTINA .....                                                  | 14        |
| <b>2.2 MECANISMOS DE FORMAÇÃO DE CÁLCULOS RENAIIS .....</b>          | <b>15</b> |
| <b>2.3 RELAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE CÁLCULOS RENAIIS E BACTÉRIAS</b>     |           |
| .....                                                                | 17        |
| <b>2.4 TIPOS DE LIPÍDIOS .....</b>                                   | <b>17</b> |
| 2.4.1 TIPOS DE LIPÍDIOS ENCONTRADOS EM CÁLCULOS RENAIIS ...          | 20        |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                   | <b>21</b> |
| <b>3.1 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DOS CÁLCULOS</b>          |           |
| <b>RENAIS.....</b>                                                   | <b>21</b> |
| <b>3.2 FRACIONAMENTO DOS LIPÍDIOS .....</b>                          | <b>23</b> |
| <b>3.3 METILAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS.....</b>                          | <b>25</b> |
| 3.3.1 PREPARAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS E FOSFOLIPÍDIOS .....             | 25        |
| <b>3.4 CROMATOGRAFIA.....</b>                                        | <b>27</b> |
| 3.4.1 QUANTIFICAÇÃO DOS LIPÍDIOS POR CG-MS.....                      | 29        |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>                                           | <b>31</b> |
| <b>1. INTRODUCTION.....</b>                                          | <b>33</b> |
| <b>2. STATE OF ART .....</b>                                         | <b>34</b> |
| 2.1 MAIN MINERALS FOUND IN KIDNEY STONES .....                       | 34        |
| 2.1.1 Calcium Oxalate.....                                           | 34        |
| 2.1.2 Calcium Phosphate.....                                         | 35        |
| 2.1.3 Struvite.....                                                  | 35        |

|                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.1.4 Uric Acid (Uricite) .....                                | 36        |
| 2.1.5 Cystine.....                                             | 36        |
| 2.2 MECHANISMS OF STONE FORMATION.....                         | 36        |
| 2.3 RELATION OF KIDNEY STONES OCCURRENCE AND BACTERIA.....     | 38        |
| 2.4 TYPES OF LIPIDS.....                                       | 38        |
| 2.4.1 Types of Lipids found in Kidney Stones.....              | 40        |
| <b>3. SAMPLING AND METHODS.....</b>                            | <b>41</b> |
| 3.1 SAMPLING .....                                             | 41        |
| 3.2 METHODS.....                                               | 41        |
| 3.2.1 Obtaining Total Lipid Extraction.....                    | 41        |
| 3.2.2 Lipid Fractionation.....                                 | 42        |
| 3.2.3 Free Fatty Acids Methylation.....                        | 42        |
| 3.2.3.1 Preparation of Free Fatty Acids and Phospholipids..... | 42        |
| 3.2.4 Quantification of Lipids using CG-MS.....                | 43        |
| <b>4. RESULTS .....</b>                                        | <b>43</b> |
| 4.1 STRUVITE.....                                              | 44        |
| 4.1.1 FREE FATTY ACIDS (FFAs) .....                            | 44        |
| 4.1.2 PHOSPHOLIPIDS.....                                       | 48        |
| 4.1.3 CHOLESTEROL.....                                         | 49        |
| 4.2 BIMINERALIC STONES .....                                   | 50        |
| 4.2.1 FLUORAPATITE AND STRUVITE.....                           | 50        |
| 4.2.1.1 Free Fatty Acids (FFAs) .....                          | 51        |
| 4.2.1.2 Phospholipids.....                                     | 54        |
| 4.2.1.3 Cholesterol.....                                       | 54        |
| 4.2.2 WHEWELLITE AND STRUVITE.....                             | 54        |
| 4.2.2.1 Free Fatty Acids (FFAs) .....                          | 55        |
| 4.2.2.2 Phospholipids.....                                     | 56        |
| 4.2.2.3 Cholesterol.....                                       | 56        |
| 4.2.3 URIC ACID AND WHEWELLITE.....                            | 56        |
| 4.2.3.1 Free Fatty Acids (FFAs).....                           | 57        |
| 4.2.3.2 Phospholipids.....                                     | 59        |

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| 4.2.3.3 Cholesterol.....            | 59        |
| <b>5. DISCUSSIONS .....</b>         | <b>59</b> |
| <b>6. CONCLUSIONS.....</b>          | <b>62</b> |
| <b>ACKNOWLEDGMENTS.....</b>         | <b>63</b> |
| <b>REFERENCES .....</b>             | <b>63</b> |
| <b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b> | <b>68</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>             | <b>69</b> |
| <b>APÊNDICE.....</b>                | <b>73</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Nefrolitíase é uma doença causada pela formação de cálculos no trato urinário. Ela envolve o desenvolvimento de pedras no sistema urinário, o qual pode afetar os rins, ureteres, bexiga ou uretra (SMITH, 2016). Essa patologia é muito comum, estima-se que um total de 10% de todos os indivíduos serão afetados por cálculos renais durante a sua vida, e casos de recorrência podem chegar a até 50% (SMITH, 2016; PERES et al., 2003). No Brasil, aproximadamente 5% da população sofre de urolitíase, o que atualmente corresponde a 10 milhões de pessoas (PERES et al., 2003), e afeta a qualidade de vida da população.

Pedras nos rins são o produto da nucleação e deposição de cristais nos rins. Há vários tipos de cálculos, mas os principais incluem oxalatos de cálcio, fosfatos de cálcio, ácido úrico (uricita), estruvita e cistina (LESLIE e SWIERZERSKI, 1998). Todas as pedras são consideradas minerais, pois encaixam na definição segundo Klein e Dutrow (2012, p. 28), que diz: “um mineral é um sólido de ocorrência natural com um arranjo atômico altamente ordenado e uma composição química homogênea e definida, mas não necessariamente fixa”. Os autores chegam a citar os minerais produzidos pelo organismo humano, como a apatita, que é o principal constituinte dos ossos e dentes, e os próprios cálculos renais.

A precipitação mineralógica é resultado da supersaturação urinária influenciada pela eliminação de solutos excretados pelos rins, pelo pH e pelo volume urinário (BRANCO et al., 2009). Porém, há uma grande contribuição do material orgânico para a sua formação (KHAN et al., 2002). Moléculas de proteínas, carboidratos e lipídios fazem parte da porção orgânica dos cálculos renais, no entanto, os mecanismos de nucleação e crescimento não são completamente compreendidos (BOYCE, 1956; LIESKE et al., 1999).

Pesquisas em urolitíase na área médica estão avançadas, porém, as visões geológica e geoquímica sobre os mesmos processos são muito recentes, originando uma área interdisciplinar denominada de geomedicina. O presente trabalho de conclusão de curso está inserido na pesquisa do Projeto Nefro, uma parceria entre o Laboratório de Análises de Minerais e Rochas (LAMIR) e o Laboratório de Geoquímica do Petróleo e Ambiental (LGPA) com o Centro de

Pesquisas Nefrológicas do Hospital das Clínicas (HC-UFPR), onde participam alunos de graduação e pós-graduação, dos cursos de Geologia e Medicina, com exemplo de Dias (2016). O presente trabalho pretende caracterizar a porção lipídica dos cálculos renais, através do método de Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massa, buscando identificar características comuns entre as pedras de mesma composição mineralógica. E, se possível, interpretar se existe influência de atividade bacteriana na nucleação e crescimento de pedras de composições mineralógicas variadas.

O Trabalho de Conclusão de Curso está organizado na forma tradicional, no entanto, no item "Resultados" é apresentado o manuscrito intitulado "Lipid Composition of Kidney Stones", o qual será parte integrante de outro artigo o qual está sendo idealizado com o grupo da Medicina.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Pesquisas com interdisciplinaridade entre as áreas de Geologia, Química e Medicina para identificar mecanismos de nucleação e crescimento de cálculos renais ainda são muito recentes. O presente trabalho é pioneiro na área de geomedicina e pretende contribuir para uma possível alternativa de tratamento para pacientes que sofrem de cálculos renais, possível uso em ciências forenses, além de abrir novas portas para futuras pesquisas na área de geoquímica orgânica em cálculos renais.

## 1.2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho é caracterizar a porção lipídica dos cálculos renais, bem como determinar qual a relação entre a formação de cálculos renais no organismo humano e as mudanças metabólicas associadas. Os objetivos específicos, desse modo, são:

- Validar a metodologia de análise de cromatografia para cálculos renais;
- Comparar dados com a literatura e prover padrões orgânicos à médicos, químicos e geólogos;

- Fortalecer a interdisciplinaridade entre as ciências de geologia, química e medicina.

## 2. ESTADO DA ARTE

### 2.1 PRINCIPAIS MINERAIS ENCONTRADOS EM CÁLCULOS RENAIIS

A composição mineralógica, a estrutura e o arranjo interno dos minerais de cálculos renais são fundamentais para o entendimento dos mecanismos da sua formação e crescimento, permitindo correlacionar o quadro clínico e os hábitos do indivíduo com a composição do cálculo formado (BRANCO et al., 2009). Os fatores envolvidos no processo de formação dos cálculos são múltiplos, incluindo supersaturação da urina, hidratação, alimentação, atividade bacteriana, entre outros. Na tabela a seguir encontram-se os principais tipos de cálculos que se desenvolvem no trato urinário.

Tabela 1. Principais minerais formadores de cálculos renais e sua composição química.

| Mineral               | Composição química                                                                      |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Whewelita             | $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot (\text{H}_2\text{O})$                            |
| Wedelita              | $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$                           |
| Apatita               | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH}, \text{F}, \text{Cl}, \text{Mg}, \text{Fe}^{2+})$ |
| Estruvita             | $(\text{NH}_4)\text{MgPO}_4 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$                                |
| Ácido úrico (uricita) | $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$                                              |
| Cistina               | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2^{(2)}$                           |

Fonte: webmineral, NIST <sup>(2)</sup>

#### 2.1.1 Oxalato De Cálcio

Os oxalatos de cálcio puros, de nome whewelita e wedelita, ou misturados com outros minerais, são os tipos mais comuns de pedras nos rins, ocorrendo em aproximadamente 85% dos casos (LESLIE e SWIERZERSKI, 1998). Quando ocorre pura, a whewelita tende a exibir cores castanho escuro a preto na superfície, e normalmente ocorre num agregado de cristais, que podem ser alongados ou arredondados (DIAS, 2016). A wedelita, por outro lado, ocorre

geralmente associada à whewelita, e possui cores em tons claros de castanho, ocorrendo em agregados de cristais alongados (DIAS, 2016).

As principais causas desse tipo de cálculo, segundo Carvalho e Nanni (2012), são a hipercalciúria, hiperoxalúria e hipocitratúria. Hipercalciúria é a excreção elevada de cálcio na urina, cujas causas podem estar associadas a um aumento da absorção de cálcio e oxalato pelo organismo, a um “vazamento” de cálcio dos rins ou a uma reabsorção de cálcio a partir da retirada do elemento químico dos ossos (BALAJI e MANI MENON, 1997). Segundo os mesmos autores, a hiperoxalúria é o excesso de excreção de oxalato na urina, e existem várias causas para essa doença: hiperoxalúria primária tipos 1 e 2 referem-se à deficiência de certas enzimas que metabolizam esse composto no organismo; e a hiperoxalúria entérica ocorre devido ao excessivo consumo de alimentos contendo oxalato e a má absorção dessa substância. Já a hipocitratúria, de acordo com Carvalho e Nanni (2012), se refere à falta de citrato na urina, pois esse composto é o responsável por evitar que moléculas de cálcio e oxalato se liguem formando um cristal.

### 2.1.2 Fosfato de Cálcio

Também chamado de apatita, o fosfato de cálcio ocorre majoritariamente em associação com outros tipos de minerais. Existem algumas variações na sua forma, o qual ocorre como apatita, flúor-apatita, hidroxapatita, carbapatita e minerais mais raros como a whitlockita (fosfato de cálcio com magnésio e ferro) e a brushita (fosfato de cálcio di-hidratado) (CORDUA, 1996). Cristais de apatita apresentam cor castanho claro a cinza escuro, e possuem zonações concêntricas, evidenciadas pelas cores, o que revela um aspecto heterogêneo nas amostras (DIAS, 2016).

Tais ocorrências estão associadas ao hiperparatireoidismo primário, no qual “há um aumento das glândulas paratireoides e consequente excesso de produção do hormônio da paratireoide, o paratormônio” (CARVALHO e NANNI, 2012). De acordo com tais autores, esse hormônio causa um acréscimo de cálcio no sangue e na urina. Cálculos puros de apatita estão quase sempre associados à um defeito de acidificação tubular renal, no qual há um aumento de pH que causa a supersaturação de fosfato de cálcio (BALAJI e MANI MENON, 1997).

### 2.1.3 Estruvita

A estruvita é um fosfato de magnésio e amônia, e ocorre em 15% dos casos de pedras nos rins (BALAJI e MANI MENON, 1997). Tal mineral apresenta coloração branca a branco acastanhado, porém em vários casos há pequenas áreas nas amostras que diferenciam de cor e formato; possuem superfície comumente plana e observa-se zonações concêntricas evidenciadas por alternância de cores (DIAS, 2016). São pedras grandes (>1cm) e podem ser coraliformes (CARVALHO e NANNI, 2012; DIAS, 2016).

Esse tipo de cálculo é mais comum em mulheres do que homens por estar associado a infecções urinárias, nas quais bactérias como a *proteus mirabilis* metabolizam a amônia presente na urina, misturam tal substância com sais de cálcio, fosfato e magnésio e então formam o cálculo (CARVALHO e NANNI, 2012). Essas bactérias lançam substâncias químicas que neutralizam o ácido da urina, o que possibilita o seu maior crescimento e promove a formação do cálculo (LESLIE e SWIERZERSKI, 1998).

### 2.1.4 Ácido Úrico (Uricita)

O ácido úrico é um composto orgânico que ocorre em 10% dos casos de pedras nos rins, e é reconhecível pela sua cor laranja, porém podem também ocorrer em tons de castanho, possuindo aspecto muito homogêneo (CARVALHO e NANNI, 2012; DIAS, 2016).

Tais cálculos podem se formar por hiperuricosúria (excesso de ácido úrico) ou por baixo pH da urina, que favorece a sua cristalização (CARVALHO e NANNI, 2012). Doenças como diabetes mellitus e gota podem favorecer a formação desses cálculos por acidificar a urina, assim como medicamentos a base de drogas citotóxicas (CARVALHO e NANNI, 2012; BALAJI e MANI MENON, 1997).

### 2.1.5 Cistina

A cistina é um cálculo renal que possui cor castanho claro, a textura pode ser lisa ou ocorrer num agregado de cristais alongados e tem aspecto homogêneo (DIAS, 2016). Tal cálculo é pouco solúvel e acompanha a doença cistinúria, que se caracteriza pela eliminação de grandes quantidades de cistina na urina, e acaba precipitando no trato urinário (CARVALHO e NANNI, 2012). Essa doença é difícil de tratar e o tratamento é feito durante toda a vida (LESLIE e SWIERZERSKI, 1998).

## 2.2 MECANISMOS DE FORMAÇÃO DE CÁLCULOS RENAIIS

Os mecanismos de formação dos cálculos não são completamente entendidos, e não há um consenso sobre os processos que ocorrem durante a sua nucleação e crescimento. Porém, acredita-se que os principais fatores que influenciam em sua formação são a supersaturação e cristalização, componentes inibidores, complexores, promotores e matriz (BALAJI e MANI MENON, 1997).

O estado de saturação da urina, segundo Balaji e Mani Menon (1997), é de todas, a força mais importante para a formação de um cálculo renal. Um sal adicionado a um solvente comum, é dissolvido até o limite de concentração permitido pelo solvente; passado o limite, o sal começa a cristalizar - caso a temperatura e o pH forem inalterados - indicando uma supersaturação do composto no solvente (BALAJI e MANI MENON, 1997). Na urina, entretanto, a situação é diferente, devido à complexidade de íons contidos em solução, que interagem com o cálcio e o fosfato. Agentes inibidores e complexantes permitem uma maior concentração de fosfato de cálcio na urina do que em solventes puros, tornando a urina metaestável em relação à esse composto. Com o aumento de concentração desse sal, a dissolução não é mais possível, formando pedras de fosfato de cálcio (BALAJI e MANI MENON, 1997).

A presença de citrato na urina é o que faz as moléculas de cálcio e oxalato não formarem um cristal, pois os dois componentes possuem uma atração muito forte (CARVALHO e NANNI, 2012). O pH também é importante, pois, dependendo da faixa em que se encontra, cálculos de composição específica podem se formar. Cristais de fosfato e oxalato de cálcio se formam em urinas alcalinas, enquanto pedras de ácido úrico se formam em pH ácido (BALAJI e

MANI MENON, 1997). A temperatura, por outro lado, não é relevante no contexto do organismo humano, pois possui pouca variação.

A dureza da água também é um fator controverso entre o meio científico e os médicos. De acordo com Irsey et al. (2014), a ingestão de água mineral dura ajuda na absorção de cálcio pelo organismo e íons de magnésio e bicarbonato presentes na água auxiliariam inibindo a cristalização de cálculos, através da redução da absorção e saturação de oxalato, e normalização do pH da urina. Bellizzi et al. (1999), no entanto, afirma que a ingestão de água dura aumenta os riscos de ocorrência de cálculos renais, pois a concentração de cálcio na urina aumentaria proporcionalmente em relação à quantidade de cálcio ingerida, apesar da quantidade de oxalato continuar a mesma. Isso induziria à supersaturação do produto cálcio-oxalato, o qual precipitaria devido à sua alta concentração.

Fatores internos ao corpo humano também são pertinentes na formação de cálculos renais. Lieske et al. (1999) afirma que cristais de oxalato de cálcio podem aderir à células epiteliais renais, devido à cargas elétricas opostas dos dois: cristais possuiriam cargas positivas enquanto as células seriam carregadas negativamente. Além disso, após a adesão, as células englobariam esses cristais, e serviriam de substrato para agregar inúmeros cristais e formar pedras maiores. Entretanto, segundo os autores, tal processo pode ser inibido se íons específicos existentes na urina, como o citrato, estiverem presentes para revestir a superfície do cristal. Então, há uma competição entre ânions solúveis presentes nos fluidos tubulares renais e ânions na superfície da célula que determinam se irá ou não haver adesão do cristal na célula.

Khan et al. (2002), é mais específico ao atribuir a cristalização e crescimento de cálculos renais de oxalato e fosfato de cálcio à membranas lipídicas celulares. Os autores argumentam que a exposição prolongada de cristais de oxalato de cálcio à células renais causam danos celulares, resultando na destruição das células e sua excreção pela urina. Essas mudanças nas membranas lipídicas se manifestam como o aumento do seu conteúdo da urina, e isso se comprova pois indivíduos formadores de cálculos possuem uma quantidade muito maior de proteínas e lipídios em sua urina do que indivíduos saudáveis (KHAN ET AL., 2002). Portanto, o autor afirma que, devido à presença de lipídios, e principalmente fosfolipídios nas amostras analisadas, as

membranas celulares e seus fosfolipídios estão envolvidos ativamente na nucleação e crescimento de cálculos de oxalato e fosfato de cálcio.

### 2.3 RELAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE CÁLCULOS RENAIIS E BACTÉRIAS

Geologicamente falando, é possível usar conhecimentos de geomicrobiologia para fazer uma analogia de ambientes naturais com o corpo humano. Bactérias podem induzir ou influenciar a precipitação de carbonatos e fosfatos de cálcio, através da organomineralização (DUPRAZ et al., 2009). Segundo os autores, a organomineralização induzida resulta da interação entre atividade biológica e o ambiente. Já a organomineralização influenciada é definida como a mineralização passiva de matéria orgânica (biogênica ou abiogênica) cujas propriedades podem influenciar a morfologia e composição do cristal (DUPRAZ et al., 2009). Analogamente, bactérias podem ter um papel fundamental na nucleação e crescimento de cálculos renais, tanto ativa quanto passivamente.

A relação entre cálculos compostos por estruvita com infecções bacterianas já é bem conhecida. Tal fato se soma à uma maior ocorrência desse tipo de cálculo em mulheres do que homens, devido à recorrência de infecções urinárias em mulheres (CARVALHO e NANNI, 2012). Contudo, poucos estudos descrevem a porção orgânica de tais cálculos. Khan et al. (2002) obteve resultados de tal natureza, em que cálculos compostos por estruvita tinham maior concentração de colesterol e triglicerídeos do que cálculos de outras composições.

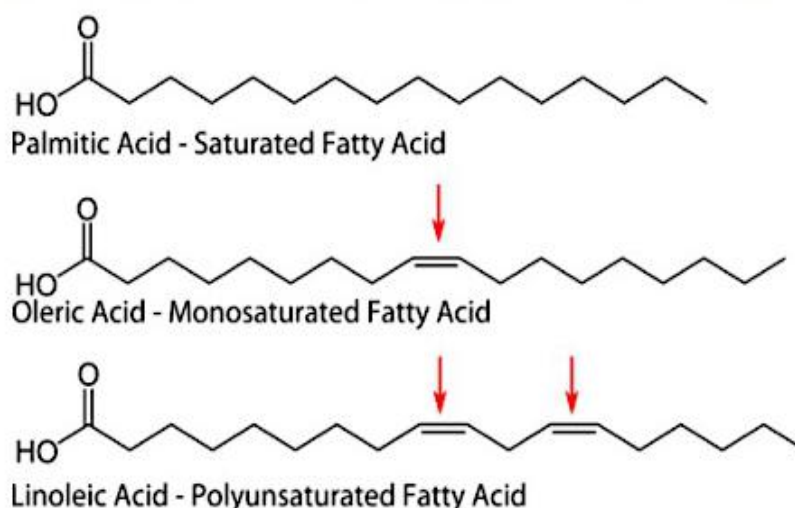
Outros tipos de cálculos renais também apresentaram íntimas associações com conteúdo bacteriano. Pedras compostas por carbapatita, na ausência da estruvita, foram encontradas juntamente com conteúdo bacteriano, o que sugere atividade de microorganismos atuando na precipitação dos cálculos (CARPENTIER et al., 2009). Kajander e Çiftçioğlu (1998) identificaram a biomineralização através de nanobactérias atuando na formação de carbapatita.

### 2.4 TIPOS DE LIPÍDIOS

Alguns compostos orgânicos encontrados na matriz de cálculos renais incluem lipídios, proteínas e carboidratos (BOYCE e GARVEY, 1956; KHAN e KOK, 2004). Lipídios são uma importante substância formadora dos cálculos pois, de acordo com Khan e Kok (2004), eles promovem a nucleação do cristal, modulam o crescimento do mesmo e são incorporados nas calcificações.

Lipídios são compostos orgânicos insolúveis em água, e incluem, no corpo humano, gorduras, óleos, hormônios e certos componentes de membranas celulares (THOMPSON, 2017). Suas moléculas contêm hidrocarbonetos e são fundamentais para o funcionamento de células vivas (MANDAL, 2012). Uma molécula de gordura ou óleo é constituída por glicerol e ácidos graxos - o glicerol é um álcool que possui 3 carbonos, 5 hidrogênios e 3 grupos hidroxila na sua estrutura - e tais moléculas formam um triglicerídeo, que é um tipo de lipídio fundamental para o armazenamento de energia nos animais (RYE et al., 2017; SOULT, 2016; MANDAL, 2012). Já os ácidos graxos possuem uma longa cadeia carboxílica, na qual é possível haver ligações duplas entre os carbonos (MANDAL, 2012). Ligações simples entre carbonos em ácidos graxos são chamadas de saturadas, enquanto as duplas podem ser chamadas de monoinsaturadas ou poliinsaturadas, dependendo do seu número (figura 1).

FIGURA 1. EXEMPLOS DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIAS SATURADAS, MONOINSATURADAS E POLIINSATURADAS.

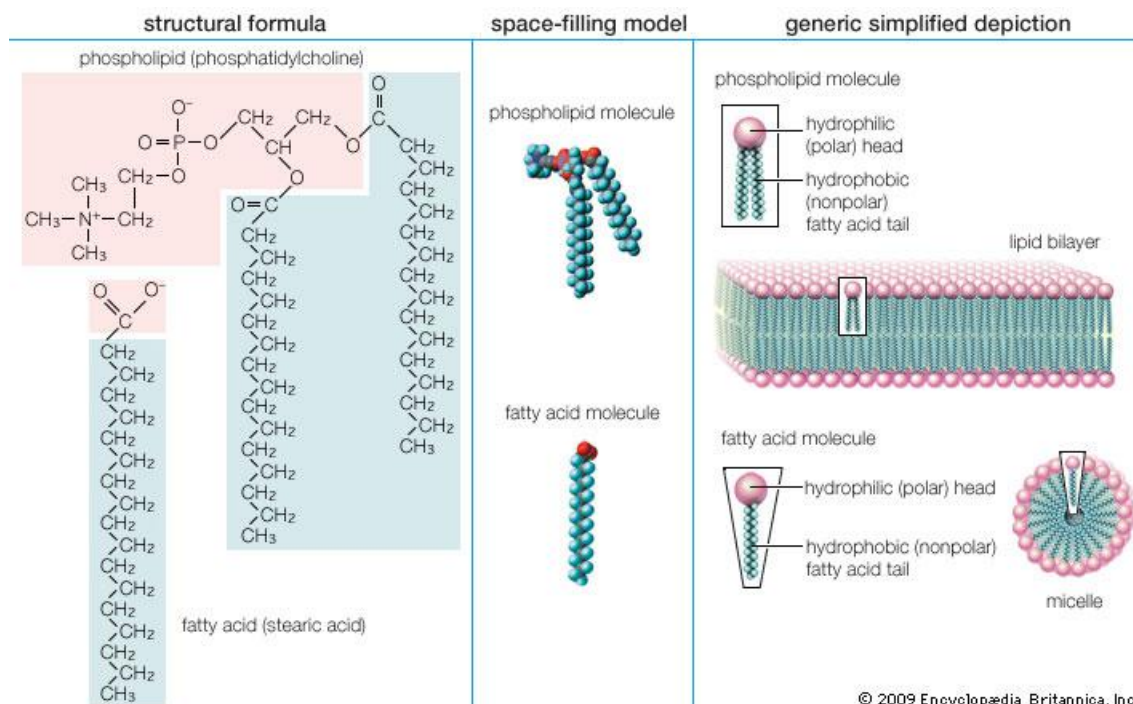


FONTE: SOULT, 2016

Outros tipos de lipídios existentes incluem os fosfolipídios e esteróides (SOULT, 2016). Fosfolipídios são os principais constituintes das membranas celulares, e são formados por um grupo de fosfato, dois álcoois e um ou dois ácidos graxos (SOULT, 2016; THOMPSON, 2017). Eles se diferenciam dos ácidos graxos por possuírem uma "cabeça" composta por fosfato, e uma "cauda" composto por ácidos graxos (figura 2). Tais moléculas são anfipáticas, o que significa que uma parte da molécula é hidrofílica, ou seja, possui afinidade com a água (no caso a cabeça), e a outra parte é hidrofóbica, ou seja, são insolúveis em água (no caso a cauda) (RYE et al., 2017).

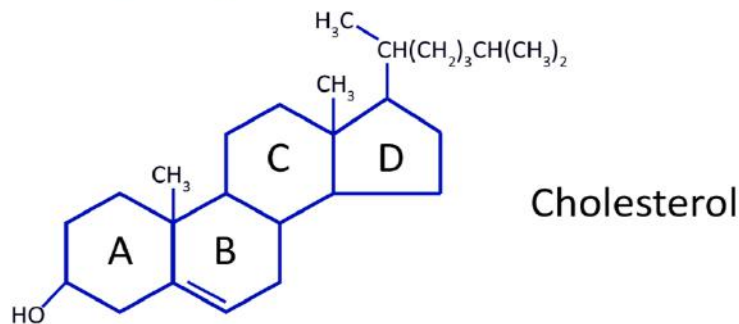
Os esteróides, diferente dos outros lipídios, são compostos por anéis de carbono interligados. Apesar de não se assemelharem aos outros lipídios, os esteróides são agrupados junto pois também são hidrofóbicos - insolúveis em água. Todos os esteróides possuem quatro anéis de carbono e vários deles, incluindo o colesterol, possuem uma curta cauda (RYE et al., 2017). A figura 3 mostra a estrutura básica de uma molécula de colesterol, que é a molécula fundamental de todo esteróide, pois todos os outros tipos de de esteróides derivam dessa substância (LENTS et al., 2014).

FIGURA 2. COMPARAÇÃO ENTRE CADEIAS DE ÁCIDOS GRAXOS E FOSFOLIPÍDIOS



FONTE: THOMPSON, 2017

FIGURA 3. MOLÉCULA DE COLESTEROL, COMPOSTO FUNDAMENTAL PARA TODOS OS ESTEROIDES



FONTE: LENTS ET AL., 2014

#### 2.4.1 Tipos de Lipídios encontrados em Cálculos Renais

Biomarcadores são compostos derivados de lipídios que podem ser traçados a partir de moléculas biológicas precursoras específicas (KILLOPS e KILLOPS, 2005). A aplicação desses conhecimentos é muito usada em paleontologia e geologia do petróleo a fim de entender mudanças no paleoambiente no qual muitos organismos viviam. Tal estudo ocorre através de seus produtos - as rochas (KILLOPS e KILLOPS, 2005). Em análogo, é possível analisar a composição lipídica de um cálculo renal a fim de entender as mudanças ocorridas durante a sua formação - no caso, o ambiente é o corpo humano - e o produto é o próprio cálculo.

A composição lipídica de cálculos renais não é um assunto novo, mas é um assunto que vêm ganhando atenção nas últimas décadas. Vários estudos foram realizados em aspectos específicos da matriz orgânica dos cálculos renais, como a presença de certos tipos de lipídios junto com certos tipos mineralógicos (ROTTEM et al., 1978; NAYA et al., 2002; KHAN et al., 1996; BIGELOW et al., 1996). Porém, apenas recentemente os estudos adquiriram uma abrangência maior em relação aos tipos de lipídios e à mineralogia do cálculos. Khan et al. (2002) caracterizou os lipídios presentes na urina de indivíduos saudáveis e de indivíduos formadores de cálculos, e relatou a maior quantidade de fosfolipídios na urina de indivíduos com nefrolitíase. Ainda, foi relatada uma maior concentração de colesterol, colesterol éster e triglicerídeos em urina de indivíduos formadores de ácido úrico e oxalato de cálcio, do que em relação à indivíduos saudáveis. Em complemento, Boonla et al. (2010), através

da análise de urina e da matriz orgânica dos cálculos renais, relatou uma grande ocorrência de triglicerídeos em urinas de indivíduos doentes e saudáveis, mas uma concentração quase nula na matriz das pedras. Uma maior concentração de glicolipídios, detritos e fragmentos celulares foi encontrada na urina de indivíduos formadores de cálculos do que de indivíduos saudáveis (BOONLA et al., 2010).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

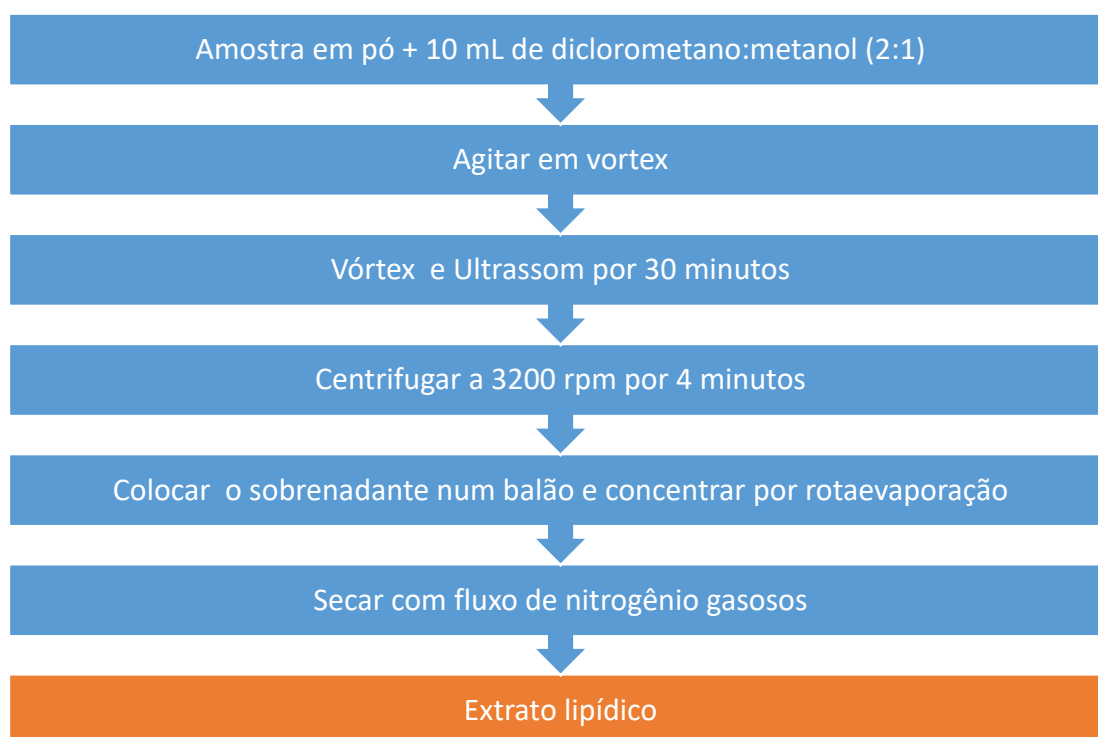
Sete amostras de cálculos renais foram caracterizadas quanto à composição lipídica. As amostras foram cedidas pelo Ambulatório de Nefrolitíase do Centro de Pesquisas Nefrológicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR). As amostras foram obtidas de pacientes com idade maior ou igual a 18 anos, no período de 2014 a 2015 e com consentimento para a utilização dos cálculos para a pesquisa. Os pacientes foram selecionados a partir do diagnóstico de nefrolitíase por exames de imagens que comprovaram a possibilidade de fornecimento de amostras para análise. Após a retirada, por procedimento cirúrgico, as amostras foram obrigatoriamente higienizadas com formol ou álcool 70. Os cálculos foram enviados para o Laboratório de Geoquímica do Petróleo e Ambiental (LGQPA) do Departamento de Engenharia Ambiental para análise de lipídios. Já a caracterização mineralógica foi realizada previamente no Laboratório de Análise de Minerais e Rochas (LAMIR) do Departamento de Geologia da Universidade Federal do Paraná. Este projeto é uma continuação do trabalho desenvolvido e iniciado por Dias (2016).

#### **3.1 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DOS CÁLCULOS RENAIIS**

No laboratório, as amostras foram pulverizadas e pesadas para a obtenção do extrato lipídico (TLE), o qual contém os compostos de interesse: ácidos graxos, fosfolipídios e esteróis (colesterol). Esses compostos foram extraídos e fracionados segundo o procedimento descrito por Dickson et al. (2009) e Slowakiewicz et al. (2014). Para extração do TLE foi utilizado 10 mL de diclorometano:metanol (2:1, v/v). As amostras foram submetidas à um vórtex e sonicadas por 30 minutos. Em seguida, foram centrifugadas à 3200 rpm por 4

minutos com o objetivo de separar o extrato lipídico do material sólido. O extrato lipídico (sobrenadante) foi transferido para balões de 50 ml com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Este procedimento foi repetido por 3 vezes. Posteriormente os volumes foram reduzidos para aproximadamente 1 mL num evaporador rotatório, transferidos para um vial de 7 mL e seco sob fluxo de nitrogênio (N<sub>2</sub>). As figuras 4 e 5 apresentam e ilustram as etapas seguidas para extração do TLE.

FIGURA 4. DIAGRAMA DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO DO EXTRATO LIPÍDICO TOTAL (TLE).



FONTE: A Autora.

FIGURA 5. PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO. (A) SOLVENTE DE DICLOROMETANO:METANOL, (B) ADIÇÃO DO SOLVENTE NA AMOSTRA, (C) CENTRÍFUGA, (D) ULTRASSOM, (E) DRYBLOCK E (F) ROTAVAPOR ROTATÓRIO.



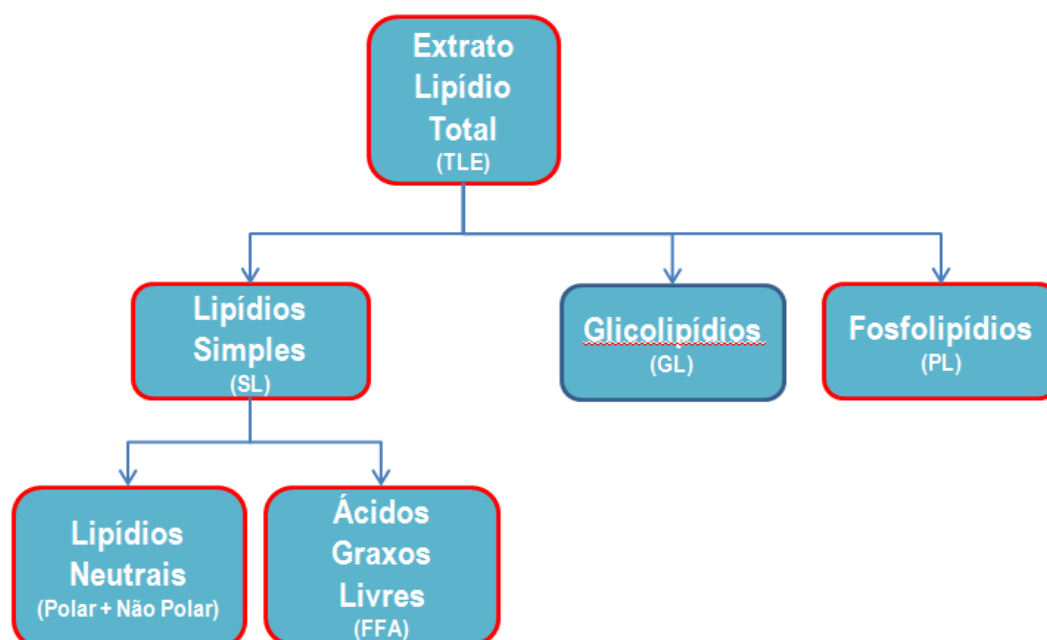
FONTE: A Autora.

### 3.2 FRACIONAMENTO DOS LIPÍDIOS

As amostras foram redissolvidas 500  $\mu$ L com clorofórmio e fracionadas para obtenção dos compostos de interesse (ácidos graxos, fosfolipídios e esteróis) conforme etapas mostradas nas figuras 6 e 7. Para o fracionamento, foram utilizadas colunas preenchidas com 2g de sílica gel, previamente ativada em estufa à 120 °C por 12 horas. As colunas foram condicionadas com 4 mL de clorofórmio, em seguida foi adicionada a amostra. Os compostos foram eluídos e separados da seguinte forma: eluição com 5 mL de clorofórmio:ácido acético (100:1 v/v) para obtenção dos lipídios simples (ácidos livres) (SL); eluição com 20 mL de acetona para obtenção dos glicolipídios (GL) e finalmente os fosfolipídios (PL) foram separados com 5 mL de metanol. A fração SL foi

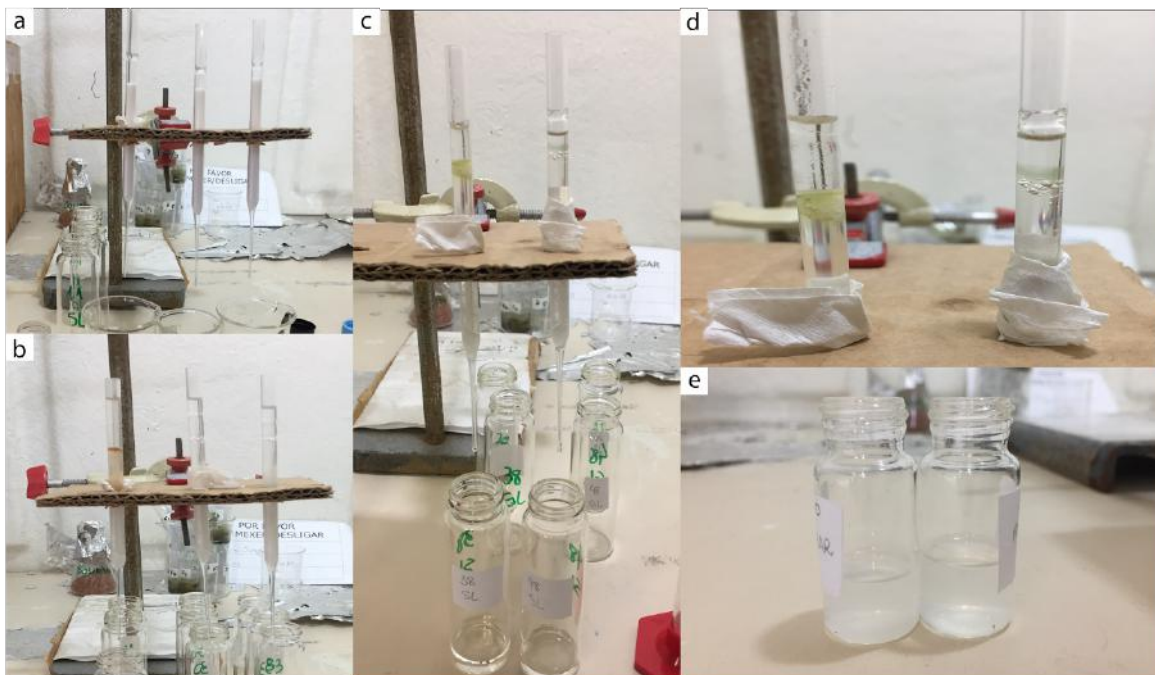
separada em ácidos graxos livres (FFA) dos lipídios neutros (polares e apolares). Os FFAs foram eluídos com 9 mL de clorofórmio saturado com hidróxido de amônia. Já os compostos neutros foram eluídos com 9 mL de clorofórmio:ácido acético (100:1 v/v). A fração neutra, contendo os compostos polares e apolares, foi separada para identificação do colesterol. Para tal, a separação se deu numa coluna (pipeta de Pasteur) preenchida com alumina. A fração apolar (colesterol) foi obtida pela eluição de 15 mL de uma mistura hexano:diclorometano (9:1 v/v). A fração polar foi obtida pela eluição com 15 mL de uma mistura diclorometano:metanol (1:2 v/v).

FIGURA 6. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO RESUMINDO A METODOLOGIA DE DICKSON ET AL (2009), USADA NO PRESENTE TRABALHO.



FONTE: A Autora.

FIGURA 7. FRACIONAMENTO DOS LIPÍDIOS. (A) PIPETAS COM SÍLICA GEL, ANTES DA ADIÇÃO DA AMOSTRA, (B) E (C) PIPETAS DURANTE O FRACIONAMENTO DAS AMOSTRAS, (D) DETALHE PARA A DIFERENÇA DE COLORAÇÃO, MOSTRANDO UM COMPOSTO FICANDO RETIDO E OUTRO SENDO CARREADO, (E) SOLUTO APÓS O FRACIONAMENTO.



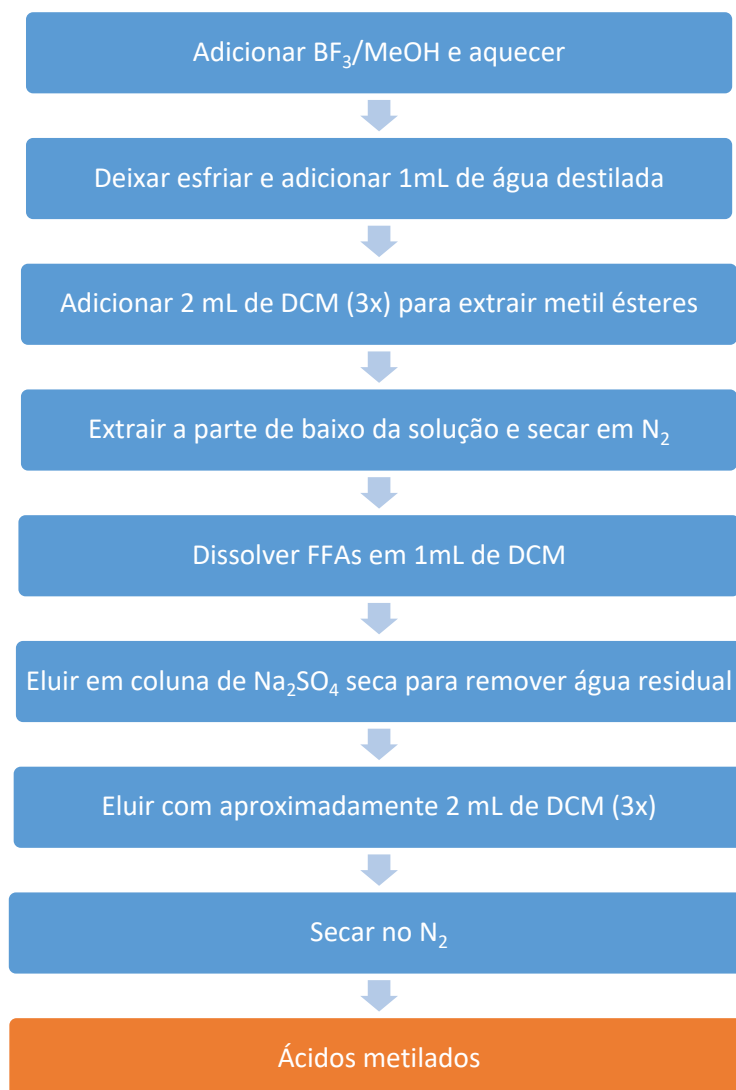
FONTE: A Autora.

### 3.3 METILAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

#### 3.3.1 Preparação dos Ácidos Graxos e Fosfolipídios

Os ácidos graxos foram analisados na forma de metil ésteres. A conversão em ésteres foi realizada a partir da adição de 100  $\mu\text{L}$  de trifluoreto de boro dissolvido em metanol com posterior aquecimento a 70°C por uma hora. Após o resfriamento, foi adicionado 1 mL de água destilada e 2 mL de diclorometano. Os ésteres estavam na fase inferior (diclorometano). A fase foi separada com auxílio de uma pipeta e o procedimento foi repetido 3 vezes para garantir a total retirada dos FFAs. A solução foi tratada com sulfato de sódio para retirar a água e seca sob fluxo de  $\text{N}_2$  (figura 8).

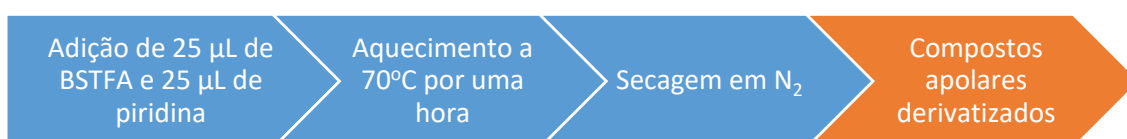
FIGURA 8: DIAGRAMA DE FLUXO DE METILAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS.



FONTE: A Autora.

Os compostos polares (colesterol) foram derivatizados com 25 µL de BSTFA e 25 µL de piridina e aquecidos à 70°C por uma hora, e após esfriar, a amostra foi seca sob fluxo de N<sub>2</sub> (figura 9).

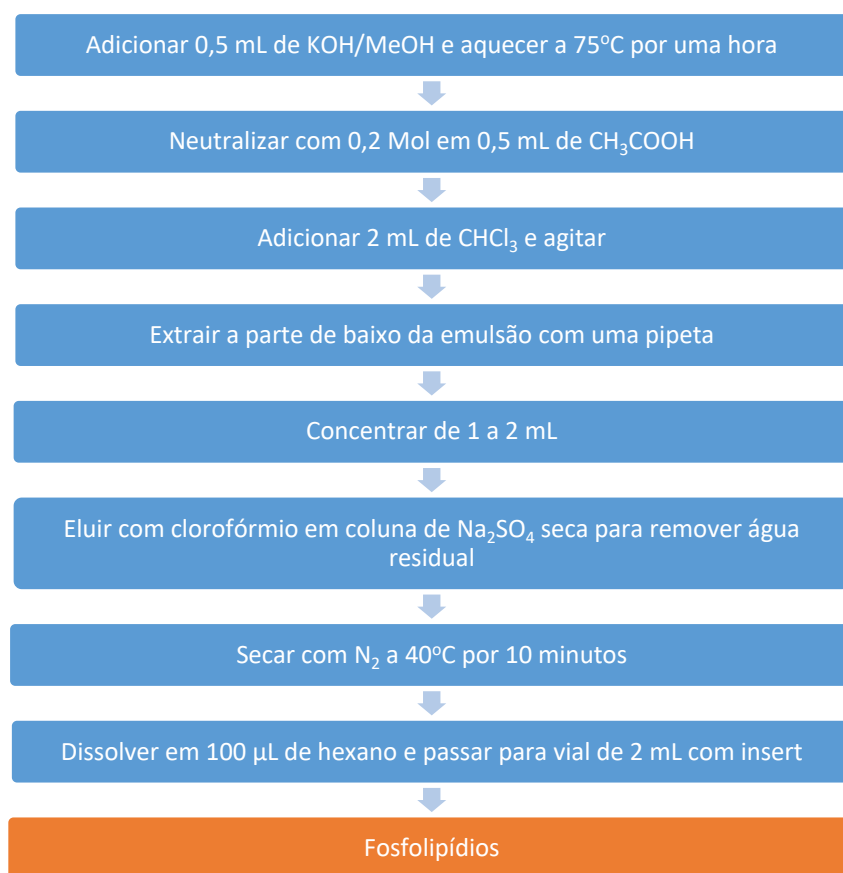
FIGURA 9: DIAGRAMA DE FLUXO DE DERIVATIZAÇÃO DOS COMPOSTOS APOLARES.



FONTE: A Autora.

Os fosfolipídios também foram analisados na forma de metil ésteres. Para isso, foram diluídos numa solução de 0,2 M de hidróxido de potássio preparada em metanol (0,5 mL), e aquecida a 75 °C por uma hora. Numa etapa seguinte, a solução foi neutralizada com 0,5 mL de ácido acético 0,2 M, e foram adicionados 2 mL de clorofórmio. A fase inferior foi separada com uma pipeta e o volume reduzido a 1 ou 2 mL (com os ácidos graxos). Finalmente, os ácidos foram convertidos em ésteres seguindo o procedimento descrito acima (figura 10).

FIGURA 10: DIAGRAMA DE FLUXO PARA A PREPARAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS.



FONTE: A Autora.

### 3.4 CROMATOGRAFIA

A cromatografia é um método físico-químico de separação de componentes que compõem uma mistura (COLLINS et al., 1997). Essa separação se dá por meio da distribuição dos componentes numa fase móvel que se desloca através de uma fase estacionária, e, durante essa passagem, os componentes da mistura são distribuídos nas duas fases (COLLINS et al., 1997).

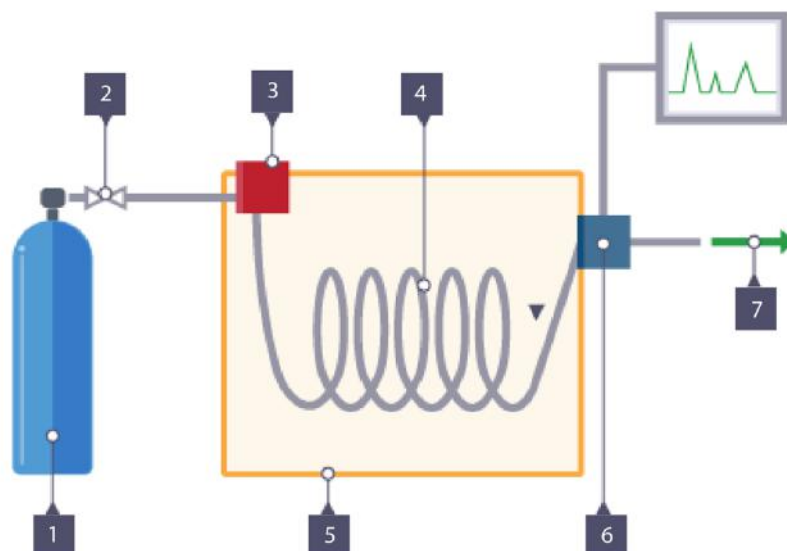
De acordo com os mesmos autores, cada componente é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes, dependendo da sua massa iônica.

Existem diferentes classificações para a cromatografia, como a técnica planar ou em coluna, e as fases móveis podem ser tanto líquidas quanto gasosas ou por fluido supercrítico. As fases estacionárias podem ser líquidas, sólidas ou uma fase ligada (COLLINS et al., 1997).

No presente trabalho foi usada a técnica de cromatografia em coluna, com fase móvel gasosa (gás hélio 5.0 analítico) e fase estacionária sólida com coluna capilar preenchida com sílica. Nessa técnica, uma corrente de gás passa continuamente pela coluna, e, quando a amostra vaporizada é introduzida rapidamente na corrente, ela é arrastada através da coluna - e as substâncias presentes na amostra, depois de separadas, chegam ao detector, gerando um sinal para o registrador (COLLINS et al., 1997). A figura 11 esquematiza os componentes de um cromatógrafo.

A espectrometria de massa, quando acoplada à cromatografia, auxilia na identificação dos compostos presentes nas substâncias analisadas. Seu princípio é de gerar íons de compostos orgânicos ou inorgânicos, separar esses íons pela sua razão massa/carga e detectar qualitativamente e quantitativamente a abundância dessas respectivas razões.

FIGURA 11. COMPONENTES DE UM CROMATÓGRAFO. (1) GÁS DE ARRASTE, (2) CONTROLADOR DE VAZÃO, (3) SISTEMA DE INJEÇÃO DA AMOSTRA, (4) COLUNA CROMATOGRÁFICA, (5) TERMOSTATO PARA INJETOR, (6) SISTEMA DE DETECÇÃO E REGISTRADOR (7) REFUGO.



FONTE: Adaptado de BBC UK.

### 3.4.1 Quantificação dos Lipídios por CG-MS

Os FAMES foram identificados e quantificados por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa (Varian 431-GC, Varian 220-MS) (figura 12). As análises foram realizadas no modo de varredura de íons totais. Utilizou-se uma coluna capilar de 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m de espessura filme, sendo a fase estacionária constituída por polidimetilsiloxano e 5 % grupos fenila (ZB-5). A injeção de cada extrato (1  $\mu$ l) foi realizado com amostrador automático no modo divisão do fluxo slit. Na tabela 2 se apresenta o programa de temperaturas.

FIGURA 12. CROMATÓGRAFO ACOPLADO À UM ESPECTRÔMETRO DE MASSA UTILIZADO NA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DO PRESENTE TRABALHO.



FONTE: A Autora.

Os ácidos graxos foram quantificados a partir de uma curva padrão (1 ppm, 2,5ppm, 2ppm, 5ppm, 10ppm, 20 ppm, 25 ppm, 40 ppm, 50 ppm (SUPELCO 37 FAME S Mix).

TABELA 2. CONDIÇÕES DO CROMATÓGRAFO PARA A ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DE CÁLCULOS RENAIIS.

| Condições           | Quantificação          |
|---------------------|------------------------|
| Temperatura inicial | 75 °C                  |
| Tempo               | 5 min.                 |
| Rampa1              | 5 °C min <sup>-1</sup> |
| Temperatura 1       | 310 °C                 |
| Total               | 55 min.                |

FONTE: JIMÉNEZ (2017).

Os ácidos graxos foram quantificados como FAMES, mas nos resultados são apresentados como ácidos graxos. Para a conversão, foi utilizado o seguinte fator:

$$\mu\text{g g}^{-1} \text{ x ácido graxo} = \frac{\text{PM do ácido graxo}}{\text{PM do FAME}} \text{ X concentração } (\mu\text{g g}^{-1}) \text{ do FAME}$$

PM = peso molecular

FAMES = ácido graxo esterificado.

**4. RESULTADOS – Os principais resultados do TCC foram organizados na forma de artigo científico, o qual será parte integrante de outro artigo em conjunto com pesquisadores da medicina e da química.**

**Lipid Composition of Kidney Stones**

Letícia Sayuri Pastore<sup>1</sup>, Sandro Froehner<sup>2</sup>, Anelize Manoela Bahniuk Rumbelsperger<sup>1</sup>, Maurício de Carvalho<sup>3</sup>, Aluana Ariane Schleder<sup>2</sup>, Giovanna Soldatelli Borsato<sup>3</sup>, Philippe Valaski<sup>3</sup>, Hoerlam da Rosa<sup>3</sup>, Ricardo Jahnert<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Análise de Minerais e Rochas, Campus Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná – LAMIR-UFPR, Curitiba (PR), Brazil. E-mail: leticiasayuri@ufpr.br, anelize.bahniuk@ufpr.br, ricjahnert@gmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Geoquímica do Petróleo e Ambiental, Campus Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná – LGPA-UFPR, Curitiba (PR), Brazil. E-mail: froehner@ufpr.br, aluana.schleder@gmail.com.

<sup>3</sup>Hospital das Clínicas, Universidade Federal do Paraná – HC-UFPR, Curitiba (PR), Brazil. E-mail: carvalho@mais.sul.com.br, gsborsato@hotmail.com, phill\_valaski@hotmail.com, hoerlamrosa@gmail.com.

**ABSTRACT**

Kidney stones are concretions composed of organic minerals that form inside the urinary tract due to urinary supersaturation, originating a disease called nephrolithiasis. The controlling factors are currently attributed to the influence of pH, chemical composition of solutes excreted by the kidneys, water hardness, microbial activity and chiefly eating habits. Kidney stones are mostly composed of calcium oxalate (whewellite and weddellite), phosphates (struvite, apatite, brushite and whitlockite) and biogenic minerals (cystine and uric acid), or a mixture of two or more of these minerals. The purpose of the present research is to determine if there is any biogenic influence in formation of renal calculi, its relationship with their nucleation and growth, and what are the associated metabolic changes. The present research was carrying on seven samples donated by the *Hospital de Clínicas* of Curitiba – PR. Grinding of samples was done in the *Laboratório de Análises de Minerais e Rochas* (LAMIR), and preparation in the *Laboratório de Geoquímica do Petróleo e Ambiental* (LGPA) through fractionation and methylation of interest compounds. Analyzes were made in the *Laboratório de Pesquisas Hidrogeológicas* (LPH) through Gas Chromatography coupled with a Mass Spectrometer. Mains free fatty acids determined were myristoleic, palmitic, elaidic, linoleic and stearic acids, that present a relative difference according to the mineralogy of the sample. Phospholipids include mainly butyric and hexanoic acids, and there is almost no difference amongst these compounds in samples of different mineral composition. Cholesterol however, is present in 5 of 7 samples, along with hexanedioic acid, that appears with high intensity in all samples. Calculated ratio between palmitic

and myristoleic acids in samples composed of struvite, presents a range of 14 and 16, which can be used as a signature of lipid composition for stones composed of struvite. Sources of these compounds can either be of feeding habits or from the production through bacteria contained in the human body.

**Key words:** geomedicine, lipid composition, kidney stones, chromatography, nephrolithiasis.

## RESUMO

Cálculos renais são concreções compostas por minerais orgânicos que se formam no interior do sistema urinário devido à supersaturação urinária e que dão o nome à doença nefrolitíase. Os fatores que controlam sua formação são atualmente atribuídos à influência pelo pH, pela composição química dos solutos excretados pelos rins, pela dureza da água, por atividade microbial e principalmente por hábitos alimentares. Eles podem ser compostos por oxalatos de cálcio (whewellita e whedellita), fosfatos (estruvita, apatita, brushita e whitlockita) e minerais biogênicos (cistina e ácido úrico), ou uma mistura de dois ou mais desses minerais. Este trabalho tem como proposta determinar se existe uma influência biogênica na formação dos cálculos, qual a relação entre a sua nucleação e crescimento no organismo humano e quais são as conseqüentes mudanças metabólicas associadas. O estudo refere-se à sete amostras provindas do Hospital de Clínicas da UFPR. A moagem das amostras foi realizada no LAMIR (Laboratório de Análises de Minerais e Rochas); e a preparação dos compostos lipídicos foi feita no LGPA (Laboratório de Geoquímica do Petróleo e Ambiental), através do fracionamento e metilação dos compostos de interesse. As análises foram realizadas no LPH (Laboratório de Pesquisas Hidrogeológicas) através da técnica de Cromatografia a Gás acoplada à um Espectrômetro de Massa. Foram encontrados ácidos pertencentes ao grupo dos ácidos graxos livres, fosfolipídios e colesterol. Os principais ácidos graxos livres identificados foram os ácidos miristoleico, palmítico, elaídico, linoleico e esteárico, que apresentam relativa diferença de acordo com a mineralogia da amostra. Os fosfolipídios determinados incluem principalmente os ácidos butírico e hexanoico, e praticamente não há diferença desses compostos entre amostras de diferentes composições mineralógicas. Já o colesterol está presente em 5 das 7 amostras, juntamente com o ácido hexanedioico, que aparece com alta intensidade em todas as amostras. O cálculo da razão entre os ácidos palmítico e miristoleico nas amostras compostas por estruvita apresenta uma faixa de 14 a 16, o que pode ser usado como assinatura da composição lipídica de cálculos com essa mineralogia. As fontes desses compostos podem ser tanto de hábitos alimentares quanto pela produção através de bactérias contidas no organismo.

**Palavras chave:** geomedicina, composição lipídica, cálculos renais, cromatografia, nefrolitíase.

## 1. INTRODUCTION

Urolithiasis or nephrolithiasis is an illness caused by the formation of calculi in the urinary tract. It involves the development of stones in the urinary system, which can affect kidneys, ureters, bladder or urethra (Smith, 2016). This disease is very common, and it is estimated that up to 10% of all individuals will be affected by it sometime throughout lifetime, and its recurrence can reach 50% of the cases (Smith, 2016; Peres et al., 2003). In Brazil, approximately 5% of population has urolithiasis, which currently corresponds to more than 10 million people (Peres et al, 2003), affecting life quality.

Kidney stones are the product of the nucleation and deposit of crystals in the kidneys. There are many types of stones but the main varieties include calcium stones (oxalates and phosphates), uric acid, struvite and cystine stones (Leslie and Swierzerski, 1998). With the exception of cystine, which is an amino acid, all of them are considered minerals because they fit perfectly with the definition of Klein and Dutrow (2012, p. 28), that says that a mineral is a solid of natural occurrence with a highly ordered atomic arrangement and a homogeneous and defined chemical composition, but not necessarily fixed. The authors actually name minerals produced by the human organism, such as apatite, which is the main constituent of bones and teeth, and even kidney stones.

Despite the great incidence and importance of this disease, the process of stone nucleation and formation is not well comprehended as yet. Researches evolving the medical approach in urolithiasis are well developed, but the geological and geochemical views in the same process are very recent, and have originated the geomedicine area.

In order to try to understand the relationship between nucleation and development of kidney stones, this research attempted to investigate the lipidic composition of renal calculi samples, using biomarkers found in nature. Specific aims include validate the organic geochemistry in kidney stones analyzes, provide geochemical patterns for physicians, chemists and geologists. Also, strengthen the interdisciplinarity amongst these sciences, since it is a pioneer study in this area.

Possible uses for this study comprises mainly a contribution for alternative treatments of patients that suffer of kidney stones, as well as a potential use in forensic sciences.

## 2. STATE OF ART

### 2.1 MAIN MINERALS FOUND IN KIDNEY STONES

The mineral composition, internal arrangement and structure of minerals in kidney stones are essential for the understanding of its formation mechanisms and growth, allowing it to correlate the clinical condition and the individual's habits with the composition of the calculus formed (Branco et al, 2009). Factors evolved in the process of formation of the calculi are innumerable, including urine supersaturation, hydration, alimentation, bacterial activity, amongst others. The following table shows the main types of kidney stones.

Table 1. Main types of minerals present in kidney stones

| Mineral             | Chemical composition                                                                    |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Whewellite          | $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot (\text{H}_2\text{O})$                            |
| Weddellite          | $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$                           |
| Apatite             | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH}, \text{F}, \text{Cl}, \text{Mg}, \text{Fe}^{2+})$ |
| Struvite            | $(\text{NH}_4)\text{MgPO}_4 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$                                |
| Uric Acid (uricite) | $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$                                              |
| Cistine             | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ <sup>(2)</sup>                  |

Source: webmineral, NIST <sup>(2)</sup>

#### 2.1.1 CALCIUM OXALATE

Pure calcium oxalate, called whewellite and weddellite, or mixed with others, are the commonest types of kidney stones, occurring in approximately 85% of cases (Leslie and Swierzski, 1998). When it occurs in its pure form, whewellite tends to exhibit dark brown to black color in its surface, and normally occur in an aggregate of crystals, that can be elongated or rounded (Dias, 2016). Weddellite, on the other hand, usually occurs associated to whewellite, in light shades of brown, occurring in aggregates of elongated crystals (Dias, 2016).

The mains causes of this type of stone, according to Carvalho and Nanni (2012), are hypercalciuria, hyperoxaluria and hypocitraturia. Hypercalciuria is the excessive excretion of calcium in urine, and its causes can be associated to an increase of calcium and oxalate absorption and a calcium leakage in the kidneys or to a calcium reabsorption starting at the removal of this chemical element from the organism's bones (Balaji and Mani Menon, 1997). According to the same authors, hiperoxaluria is the excess of oxalate excretion in urine, and there are several causes for this disease: primary hiperoxaluria, types 1 and 2, occur due to a deficiency in certain enzymes that metabolize this compound

in human body; enteric hiperoxaluria refers to an excessive consumption of foods containing oxalate, and malabsorption of this substance. Hipocitraturia, on the other hand, occurs due to a lack of citrate in urine, because this compound is responsible to avoid that calcium and oxalate molecules bond and form a crystal (Carvalho and Nanni, 2012).

### 2.1.2 CALCIUM PHOSPHATE

Also called apatite, the calcium phosphate occurs majorly in association with other minerals. There are some variations in its composition, which occurs as apatite, fluorapatite, hydroxyapatite, carapatite, and rare minerals such as whitlockite (magnesium and iron calcium phosphate) and brushite (dihydrate calcium phosphate) (Cordua, 1996). Apatite crystals occur as light brown to dark gray crystals, and have concentric zonations, evidenced by its colors, which reveals a heterogeneous aspect in the samples (Dias, 2016).

Such occurrence are associated to a primary hyperparathyroidism, in which "there is an increase in parathyroid glands and consequent excess in production of the parathyroid hormone, the parathormone" (Carvalho and Nanni, 2012). According to these authors, parathormone causes an addition of calcium in blood and urine. Pure stones of apatite are almost always associated with a defect in the acidification of the renal tubular, in which the pH increases and causes a supersaturation of calcium phosphate (Balaji and Mani Menon, 1997).

### 2.1.3 STRUVITE

Struvite is a magnesium and ammonia phosphate, and occurs in 15% of all cases of renal calculi (Balaji and Mani Menon, 1997). It is white to white brownish colors, although in many cases there are small areas in the samples that differentiate in color and shape; they commonly have flat surfaces and concentric zonations evidenced by a color alternation (Dias, 2016). They are large (>1cm) and coraliform stones (Carvalho and Nanni, 2012; Dias, 2016).

This type of calculus is more common in women than men, due to its association with urinary infections, in which bacteria such as *proteus mirabilis* metabolize the ammonia contained in urine, blend them with calcium, phosphate and magnesium salts and precipitate the stone (Carvalho and Nanni, 2012). These bacteria produce chemical substances neutralizing the urine acid, enabling the formation and growth of struvites (Leslie and Swierzski, 1998).

#### 2.1.4 URIC ACID (URICITE)

Uric acid is an organic compound recognizable by its orange color, however it can also occur in shades of brown, being very homogeneous stones (Carvalho and Nanni, 2012; Dias, 2016).

The uricite precipitates due to hyperuricosuria (excess of uric acid) or by low pH in urine, favoring its formation (Carvalho and Nanni, 2012). Illness such as diabetes mellitus and gout can ease its development by acidifying the urine, as well as medicines based on cytotoxic drugs (Carvalho and Nanni, 2012; Balaji and Mani Menon, 1997).

#### 2.1.5 CYSTINE

Cystine is an amino acid with light brown color; the texture can be either smooth or occur in an elongated crystal aggregate and has a homogeneous aspect (Dias, 2016). This calculus has low solubility and follows the disease cystinuria, when great amounts of cystine are released in urine, and ends up in the urinary tract (Carvalho and Nanni, 2012). This illness is difficult to treat, and its treatment lasts a lifetime (Leslie and Swierzerski, 1998).

### 2.2 MECHANISMS OF KIDNEY STONES FORMATION

The mechanisms of kidney stone formation are not well comprehended; however, there is no consensus about the processes of nucleation and growth. Nevertheless, it is believed that the main factors influencing its formation are: supersaturation and crystallization, inhibitors, complexors, promoters and matrix (Balaji and Mani Menon, 1997).

The state of saturation of urine, according to Balaji and Mani Menon (1997), is, of all, the most important driving force behind stone formation. When any salt is added to a common solvent, it is dissolved until a particular concentration is reached, beyond which no further dissolution is possible. The salt then begins to precipitate, - provided the temperature and pH are unchanged – indicating a supersaturation of the salt in the solvent (Balaji and Mani Menon, 1997). In urine, however, it is different, due to the complexity of ions in solution, interacting with calcium and phosphate. Inhibitors and complexors allow a higher concentration of calcium and phosphate in urine than in pure solvents, making urine a metastable solution related to this substance. With an increase of phosphate and calcium in solution, a stone is formed (Balaji and Mani Menon, 1997).

The presence of citrate in urine inhibits oxalate and calcium molecules to form a crystal, for both components have a strong force of attraction (Carvalho and Nanni, 2012). The pH is also important, providing that certain calculi form in certain ranges of pH. Calcium phosphate and oxalate stones form in alkaline urines, whilst uric acid calculi precipitates in acidic conditions (Balaji and Mani Menon, 1997). Temperature, on the other hand, is not relevant in this context, because it has low variation.

Water hardness is also a controversial subject amongst the scientific and medical milieu. According to Irsey et al. (2014), the ingestion of hard mineral water helps the absorption of calcium by the organism, and magnesium and bicarbonate ions in water would help inhibiting stones crystallization, through reduction of absorption and saturation of oxalate, and normalization of pH in urine. Bellizzi et al. (1999), however, claim that hard water ingestion increases risks of kidney stone formation, because calcium concentration in urine would elevate proportionally to the amount of calcium ingested, despite the unchanged concentration of oxalate. That would induce a supersaturation of the calcium-oxalate product, which would precipitate due to its high concentration.

Internal factors of human body are also pertinent to renal calculi formation. Lieske et al. (1999) states that calcium oxalate crystals can adhere to renal epithelial cells, due to opposite electric charges - crystals would be positively charged whilst cells would be negatively charged. In addition, after adhesion, cells would internalize these crystals and serve as substrate to aggregate innumerable crystals and form considerable larger stones. However, according to the authors, such process can be inhibited if specific ions in urine, such as citrate, were present to coat the crystalline surface. Therefore, there is a competition for the crystal surface between soluble anions in tubular fluid and anions on the cell surface, which will determine whether the crystal will bind or not to the cell (Lieske et al., 1999).

Khan et al. (2002) is more specific to attribute the nucleation and growth of crystals of calcium phosphate and oxalate to cell membranes and their lipids. The authors state that prolonged exposition of calcium oxalate crystals to renal cells would damage the cells, resulting in shedding of microvillous brush border and ultimately in sloughing of the cells into the urine. These changes in cell membranes and their lipids would manifest as an increase of protein and lipid content in urine, in comparison with healthy individuals (Khan et al., 2002). Therefore, the authors declare that, due to the presence of lipids, specially phospholipids in samples analyzed, the cell membranes and their

phospholipids are actively involved in nucleation and growth of calcium phosphate and oxalate stones.

### 2.3 THE KIDNEY STONES AND BACTERIA RELATIONSHIP

The relationship amongst calculi composed of struvite and bacterial infection is well known. This fact is added to a higher occurrence of this type of stones in women than men, due to recurrence of urinary infections in women (Carvalho e Nanni, 2012). Nonetheless, few studies describe the organic portion of these calculi. Khan et al. (2002) obtained results of such nature, that stones made of struvite had a higher concentration of cholesterol and triglycerides than mineralogically different calculi.

Other types of kidney stones also present intimate associations with bacterial content. Calculi composed of carbapatite, in the absence of struvite, were found along bacterial material, which suggests a microbial activity acting in the formation of stones (Carpentier et al., 2009). Kajander and Çiftçioglu (1998) identified biomineralization through nanobacteria acting in the precipitation of carbapatite.

### 2.4 TYPES OF LIPIDS

Organic compounds found in kidney stones include lipids, proteins and carbohydrates (Boyce and Garvey, 1956; Khan and Kok, 2004). Lipids are an important forming substance of renal calculi since, according to Khan and Kok (2004), they promote the crystal nucleation, modulate its growth and are incorporated in the calcification process.

Lipids are organic compounds insoluble in water, and include, in the human body, fats, oils, hormones and some components in cell membranes (Thompson, 2017). Its molecules contain hydrocarbons and are fundamental for cell functioning (Mandal, 2012). A fat or oil molecule is constituted by glycerol and free fatty acids - glycerol is an alcohol made up of 3 carbons, 5 hydrogens and 3 groups of hydroxyl in its structure - and such molecules form a triglyceride, which is a type of fundamental lipid for energy storage in animals (Rye et al., 2017; Sout, 2016; Mandal, 2012). Furthermore, free fatty acids rarely occur alone in nature, but associated to other molecules (Thompson, 2017). Such compounds have a long carboxyl chain, which can have double bonds between carbons (Mandal, 2012). Simple bonds amongst carbons in free fatty acids are called saturated, whilst double bonds can be either monounsaturated or polyunsaturated, depending on its quantity (figure 1).

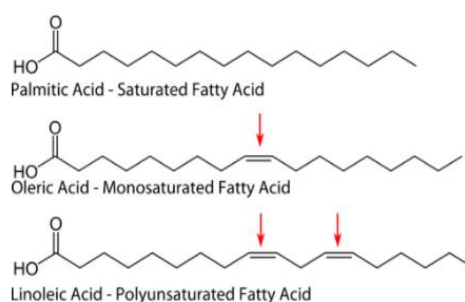


Figure 1. Examples of free fatty acids in saturated, monounsaturated and polyunsaturated chains (Soult, 2016).

Other types of lipids include phospholipids and steroids (Soult, 2016). Phospholipids are the main constituents of cell membranes, and are formed by a phosphate group, two alcohols and one or two free fatty acids (Soult, 2016; Thompson, 2017). They differ from free fatty acids because they have a head composed of phosphate and a tail made of free fatty acids (figure 2). These molecules are amphipathic, which means that one part of the molecule is hydrophilic (has affinity with water - the head), and the other is hydrophobic (is insoluble in water - the tail) (Rye et al., 2017).

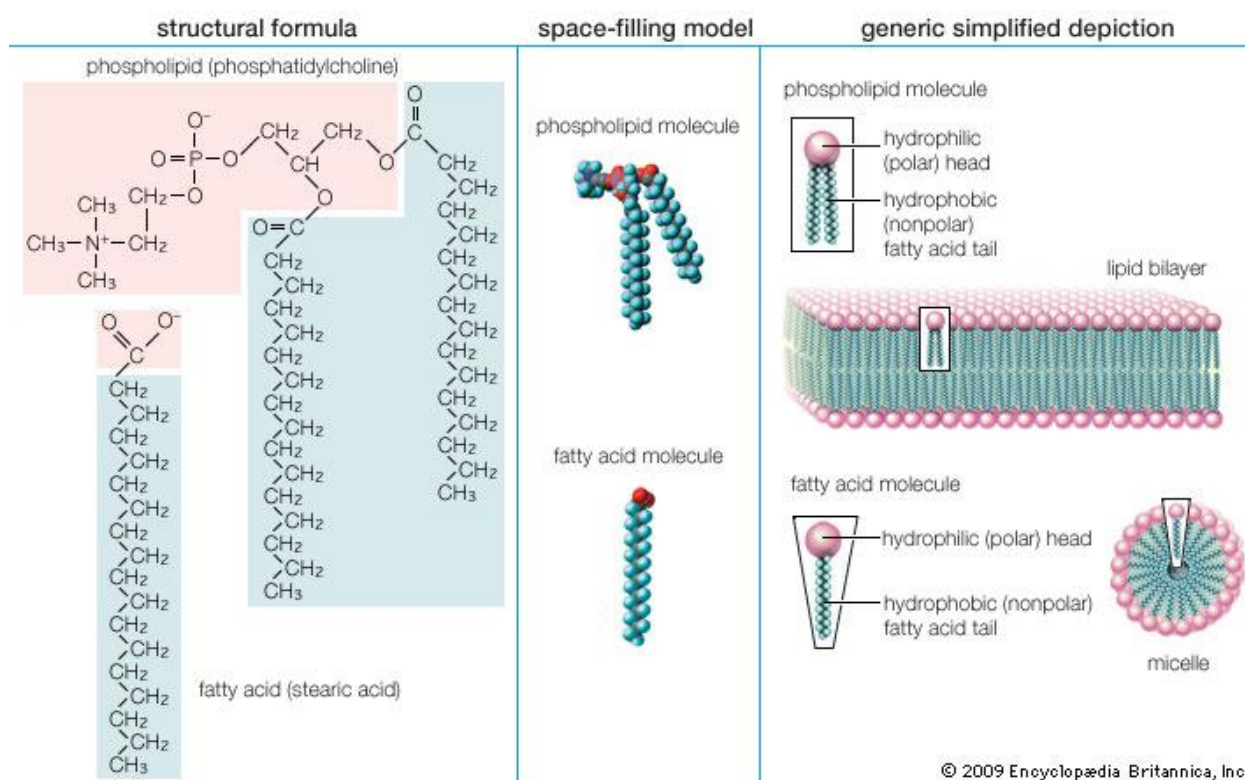


Figure 2. Comparison between free fatty acids and phospholipids chains (Thompson, 2017).

Steroids, disaccording to other lipids, are made of connected carbon rings. Although they do not resemble other lipids, steroids are grouped together because they are hydrophobic. All steroids have four carbon rings, and many of them, including cholesterol, have a short tail (Rye et al., 2017). The figure 3 shows the basic structure of a cholesterol molecule, which is a fundamental molecule of all steroids, for all others derive from that substance (Lents et al., 2014).

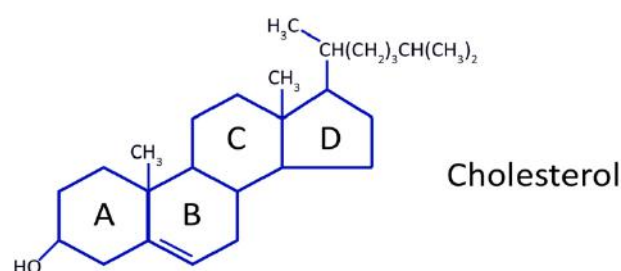


Figure 3. Cholesterol molecule, fundamental compound for all steroids (Lents et al., 2014).

#### 2.4.1 TYPES OF LIPIDS FOUND IN KIDNEY STONES

Biomarkers are compounds derived from lipids that can be traced as specific precursors biological molecules (Killops and Killops, 2005). The application of this knowledge is highly used in paleontology and petroleum geology in order to understand changes in paleoenvironment in which many organisms lived. These studies are assembled through its products - the rocks (Killops e Killops, 2005). In analogy, it is possible to analyze the lipid composition of a kidney stone in order to understand changes occurred during its formation - in this case, the environment is the human body, and the product is the calculus itself.

The lipid composition of kidney stones is not a new subject, but it has been getting attention in the last decades. Several studies were performed in specific aspects of the organic matrix of renal calculi, such as the presence of certain types of lipids combined to certain minerals (Rottem et al, 1978; Naya et al, 2002; Khan et al, 1996; Bigelow et al, 1996). However, only recently researches acquired a wider scope in relation to the lipids groups and stones mineralogy. Khan et al (2002) characterized lipids present in urine of healthy and stone former individuals, and reported a higher quantity of phospholipids in urine of people with nephrolithiasis. Moreover, the same paper reported a higher

concentration of cholesterol, cholesterol ester and triglycerides in uric acid and calcium oxalate urine formers than in healthy individuals.

Furthermore, Boonla et al (2010), through a urine analysis and organic matrix of kidney stones, reported a great occurrence of triglycerides in urine of healthy and sick individuals, but a nearly null concentration in stones' matrix. A higher volume of glycolipids, debris and cell fragments was found in urine of stone formers than in healthy individuals.

### **3. SAMPLING AND METHODS**

#### **3.1 SAMPLING**

Seven samples of kidney stones were obtained from the Nephrolithiasis Ambulatory of Federal University of Parana's Clinical Hospital. The samples were acquired from patients older than 18 years old, collected during the period of 2014 and 2015. All patients consented to the use of their kidney stones for research. The selection was based on nephrolithiasis diagnostic by image exams.

The samples were previously sanitized with formalin or alcohol 70 percent after surgical procedures, and sent to the Laboratório de Geoquímica do Petróleo e Ambiental (LGQPA), of the Water Resources and Environmental Engineering Department of the Federal University of Paraná, for lipidic analysis. The mineralogical characterization was previously performed in the Laboratório de Análise de Minerais e Rochas (LAMIR) of the Geology Department of the same University, published by Dias (2016).

#### **3.2 METHODS**

##### **3.2.1 OBTAINING TOTAL LIPID EXTRACTION**

Pulverized samples were weighed to obtain the total lipid extraction (TLE), containing interest compounds: free fatty acids, phospholipids and sterols. These compounds were extracted and fractionated according to Dickson et al (2009) and Slowakiewicz et al (2014) methods. For TLE extraction was used 10 mL of dichloromethane:methanol (2:1 v/v). Samples were submitted to a vortex and sonicated for 30 minutes. Afterward, samples were centrifuged in 3200 rpm for 4 minutes, to separate TLE from the solid material. The lipid extract (supernatant) was transferred to 50 mL balloons using a Pasteur pipette. This procedure was repeated 3 times. Subsequently the solutes were reduced to approximately 1 mL in a rotary evaporator, transferred to a 7 mL vial and dried out under nitrogen flux (N<sub>2</sub>).

### 3.2.2 LIPID FRACTIONATION

Samples were redissolved in 500  $\mu\text{L}$  with chloroform and fractionated to obtain compounds of interest (free fat acids, phospholipids and sterols). For the fractionation, columns were filled with 2g of silica gel, previously activated in a kiln in 120  $^{\circ}\text{C}$  during 12 hours. Columns were conditioned with 4 mL of chloroform, and then the sample was added. Compounds were eluted and separated according to the following: Elution with 5 mL of chloroform:acetic acid (100:1  $v/v$ ), to obtain simple lipids (SL); elution with 20 mL of acetone to obtain glycolipids (GL) and finally, phospholipids (PL) were separated with 5 mL of methanol.

Simple lipids were discriminated between free fatty acids (FFA) and neutral lipids (polar and apolar). FFAs were eluted with 9 mL of chloroform saturated with hydroxide of ammonia. Neutral compounds were eluted with 9 mL of chloroform:acetic acid (100:1  $v/v$ ), and were separated between polar and apolar in order to identify the cholesterol compound. For that, separation occurred in a column (Pasteur pipette) filled with alumina. The apolar fraction (cholesterol) was obtained by elution of 15 mL of hexane:dichloromethane (9:1  $v/v$ ). The polar fraction was obtained by the elution of 15 mL of dichloromethane:methanol (1:2  $v/v$ ).

### 3.2.3 FREE FATTY ACIDS METHYLATION

#### 3.2.3.1 Preparation of Free Fatty Acids and Phospholipids

Free fatty acids were analyzed in a methyl esters form. Conversion to esters was made from the addition of 100  $\mu\text{L}$  of boron trifluoride dissolved in methanol, heated afterwards to 70  $^{\circ}\text{C}$  for one hour. After cooling, 1 mL of water and 2 mL of dichloromethane were added. Esters were in the bottom phase (dichloromethane). This phase was separated with a pipette, and this procedure was repeated 3 times for total removal of FFAs. The solution was treated with sodium sulfate to withdraw all water and dried under flux of  $\text{N}_2$ .

Polar compounds were derivatized with 25  $\mu\text{L}$  of BSTFA and 25  $\mu\text{L}$  of pyridine and heated in 70 $^{\circ}\text{C}$  for one hour, and after cooling, sample was dried under the flux of  $\text{N}_2$ .

Phospholipids were also analyzed in a methyl esters form. For that, they were diluted under a solution of 0,2 M of potassium hydroxide prepared in methanol (0,5 mL) and heated in 75  $^{\circ}\text{C}$  for one hour. Next step was the solution neutralization, with 0.5 mL

of acetic acid 0.2 M, and 2 mL of chloroform were added. The bottom phase was separated with a pipette and the volume reduced to 1 or 2 mL (with FFAs). Finally, acids were converted in esters following the steps described above.

### 3.2.4 QUANTIFICATION OF LIPIDS USING CG-MS

FAMES were identified and quantified by gas chromatography attached to a mass spectrometer (Varian 431-GC, Varian 220-MS). Analysis were made using total ions scanning mode. A capillary column of 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  of film thickness was used, and the stationary phase was constituted of polydimethylsiloxane and 5% of phenyl groups (ZB-5). Injection of each extract (1  $\mu\text{l}$ ) was made with an automatic sampler in the division of flux slit mode. Table 2 shows the temperatures program.

Free fatty acids were quantified from a standard curve (1 ppm, 2,5ppm, 2ppm, 5ppm,10ppm,20 ppm, 25 ppm, 40 ppm, 50 ppm (SUPELCO 37 FAME S Mix).

Table 2. Conditions of chromatographer in analysis of lipid composition of kidney stones.

| Conditions          | Quantification         |
|---------------------|------------------------|
| Initial temperature | 75 °C                  |
| Time                | 5 min.                 |
| Ramp1               | 5 °C min <sup>-1</sup> |
| Temperature 1       | 310 °C                 |
| Total               | 55 min.                |

Source: Jiménez (2017).

Free fatty acids were quantified as FAMES, but in results they are presented as fatty acids with the following conversion factor:

$$\mu\text{g g}^{-1} \text{ fatty acid} = \frac{\text{MW of fatty acid}}{\text{MW of FAME}} \times \text{concentration } (\mu\text{g g}^{-1}) \text{ of FAME}$$

MW = molecular weight

FAME = fatty acid methyl ester

## 4. RESULTS

Four samples of struvite and three bimineralic samples were examined according their lipid composition such as free fatty acids, phospholipids and cholesterol. The chemical structure of each group of compounds identified is showed in table 3. Also, the mineralogical composition was associated with the organic composition. Both groups, free fatty acids and phospholipids were analyzed as methyl esters by gas chromatography.

Table 3. Chemical formula of all acids analyzed in this paper.

| Types of acids                      | Chemical formula                               |
|-------------------------------------|------------------------------------------------|
| Myristoleic acid                    | C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> |
| Pentadecanoic acid                  | C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> |
| Palmitoleic acid                    | C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> |
| Palmitic acid                       | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> |
| cis-10-Heptadecanoic acid           | C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> |
| Heptadecanoic acid                  | C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> |
| Linolenic acid                      | C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> |
| Linoleic acid                       | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> |
| Linolelaidic acid                   | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> |
| trans-9-elaidic acid                | C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> |
| cis-9-Oleic acid                    | C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> |
| Stearic acid                        | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> |
| cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid | C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> |
| cis-11,14-Eicosadienoic acid        | C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> |
| cis-11- eicosenoic acid             | C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> |
| Hexanoic acid                       | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>  |
| Butyric acid                        | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>   |
| Cholesterol                         | C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O              |
| Hexanedioic acid                    | C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>  |

#### 4.1 STRUVITE

Struvite is an ammonium magnesium phosphate [(NH<sub>4</sub>)Mg(PO<sub>4</sub>)•6H<sub>2</sub>O], and it has an interesting organogenic nature. Few works attempted to investigate the organic composition that might reveal the formation and nucleation of such mineral. In human body, kidney stones have different morphologies, colors and textures, such as light brownish to whitish yellow, and structures such as lamination are common in struvite renal calculi (Dias, 2016). Furthermore, it is always associated with urinary infection (Cloutier, 2015), in which urea is hydrolyzed to ammonium and raises urine pH to neutral or alkaline values (Wesson and Ward, 2007). It is suspicious that the bacteria *Proteus Mirabilis* is one among others that works as support for growing of calculus (Norsworthy, 2016).

##### 4.1.1 FREE FATTY ACIDS (FFAs)

Four of seven samples correspond to pure struvite and has shown similar distribution of free fatty acids. It was investigated 37 fatty acids, however for discussion purpose we only attempt to the predominant ones. The distribution of fatty acids is similar among them. The palmitic, linoleic, linolelaidic, cis-9-oleic, stearic and eicosenoic acids were present in all samples, and palmitic, elaidic (trans-9-elaidic acid), linoleic and stearic acids were predominant among all examined (figure 5). In figure 6 it is showed typical chromatograms of fatty acids and cholesterol in struvite samples. Fatty acids were

grouped according to the presence of double bonds in the molecule, thus the results are presented as saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA), and polyunsaturated fatty acids (PUFA) (table 4), and the saturated fatty acids are predominant and most of them are present in all samples.

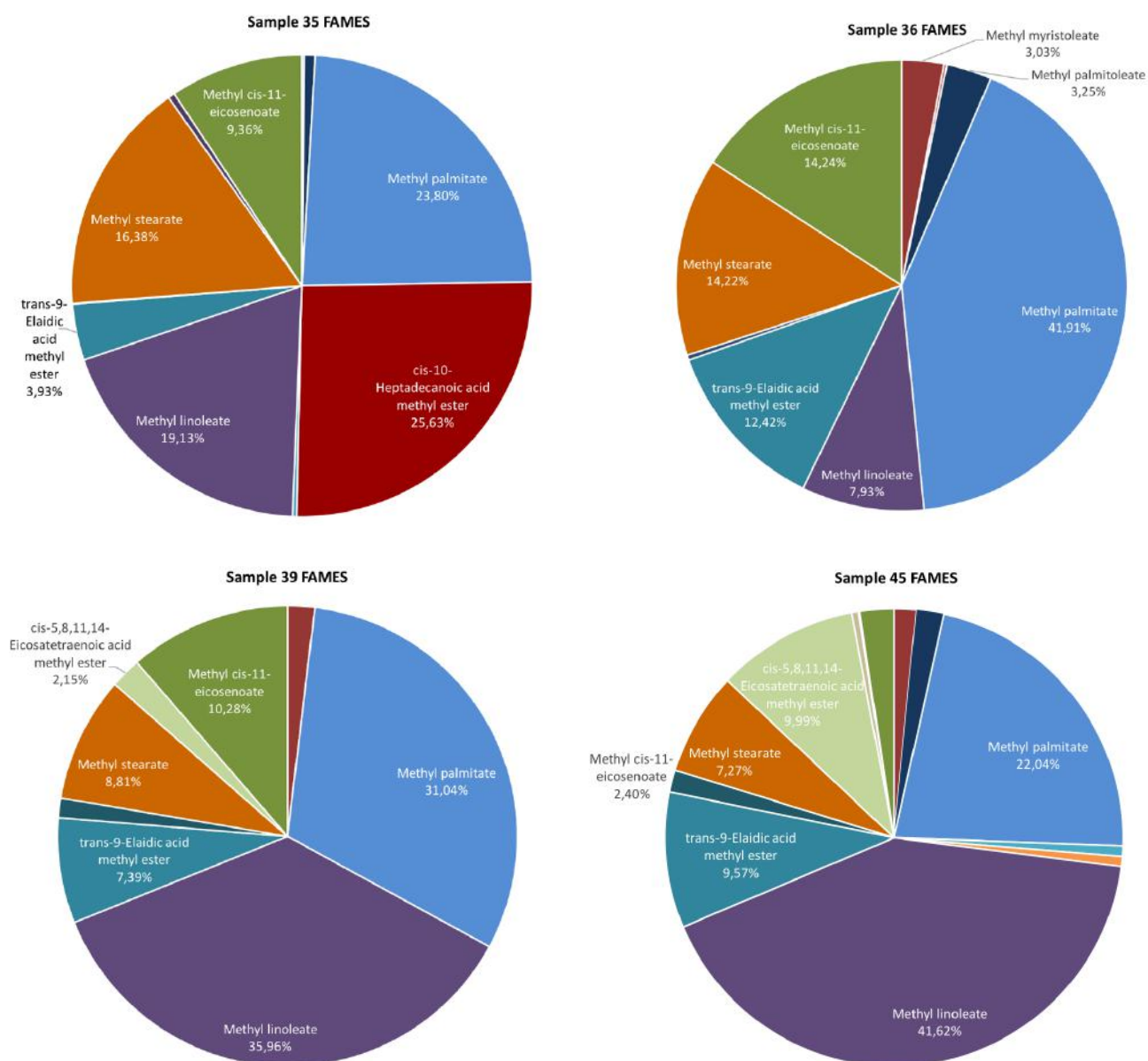


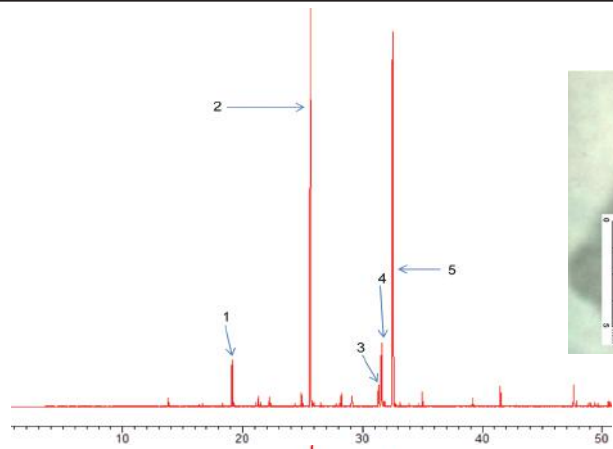
Figure 5. Percentages of FFAs in samples composed of struvite.

# MONOMINERALIC CALCULI COMPOSED OF STRUVITE 4 SAMPLES

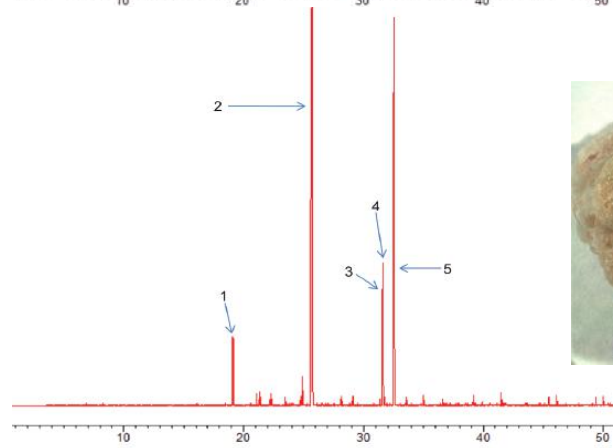
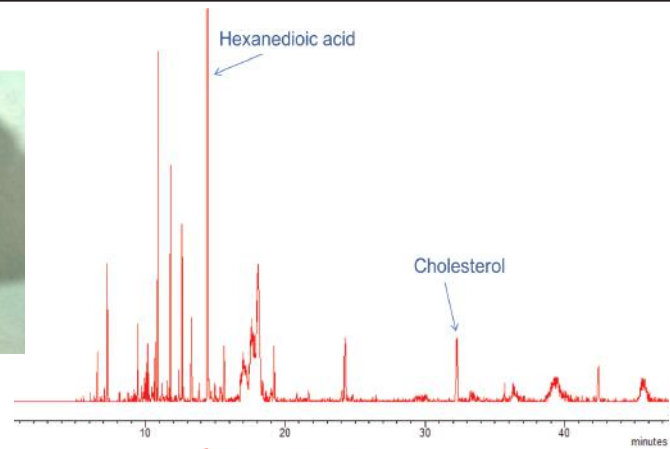
## STRUVITE

### Free Fatty Acids

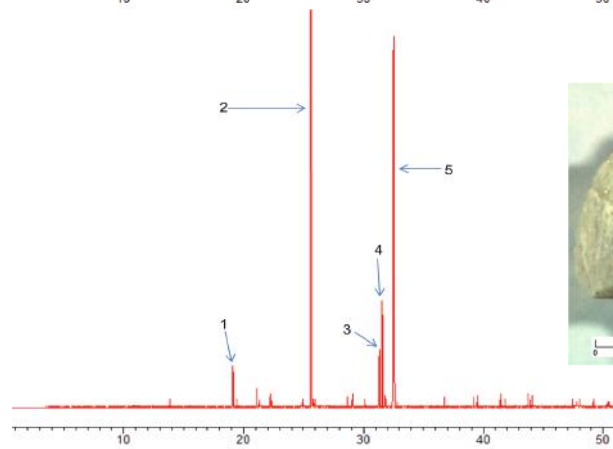
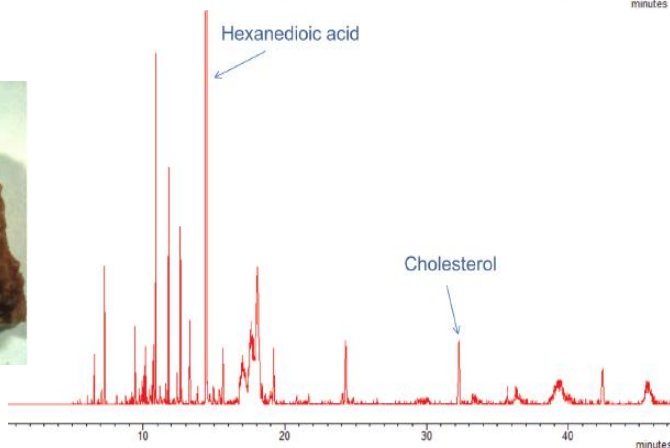
### Cholesterol



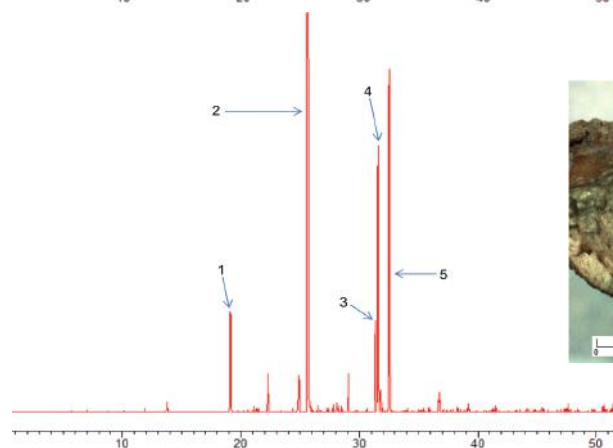
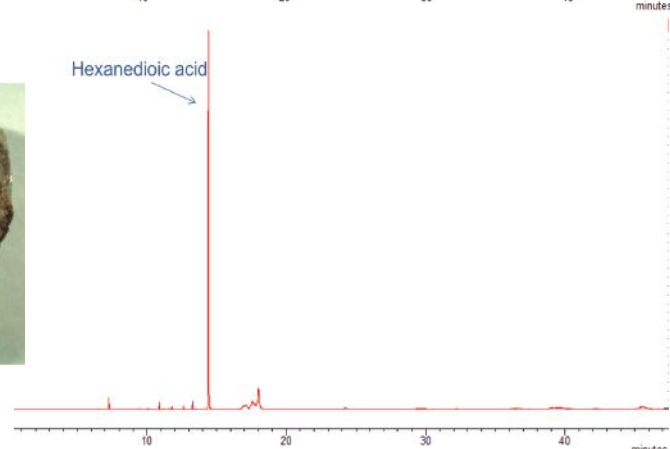
SAMPLE 35



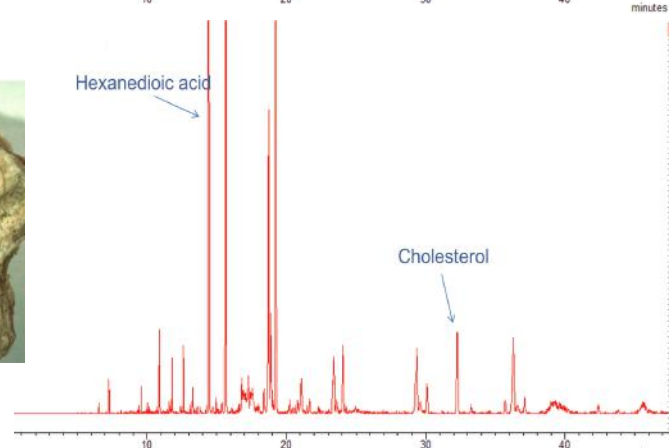
SAMPLE 36



SAMPLE 39



SAMPLE 45



(1) Methyl myristoleate, (2) Methyl palmitate, (3) trans-9-elaidic acid methyl ester (4) Methyl linoleate, (5) Methyl stearate

Figure 6. Typical chromatograms of fatty acids and cholesterol in struvite samples.

Table 4. Types of molecules of each acid analyzed.

| Types of acids                      | Types of molecules         | Initials |
|-------------------------------------|----------------------------|----------|
| Myristoleic acid                    | Monounsaturated fatty acid | MUFA     |
| Pentadecanoic acid                  | Saturated fatty acid       | SFA      |
| Palmitoleic acid                    | Monounsaturated fatty acid | MUFA     |
| Palmitic acid                       | Saturated fatty acid       | SFA      |
| cis-10-Heptadecanoic acid           | Saturated fatty acid       | SFA      |
| Heptadecanoic acid                  | Saturated fatty acid       | SFA      |
| Linolenic acid                      | Polyunsaturated fatty acid | PUFA     |
| Linoleic acid                       | Polyunsaturated fatty acid | PUFA     |
| Linolelaidic acid                   | Polyunsaturated fatty acid | PUFA     |
| trans-9-elaidic acid                | Monounsaturated fatty acid | MUFA     |
| cis-9-Oleic acid                    | Monounsaturated fatty acid | MUFA     |
| Stearic acid                        | Saturated fatty acid       | SFA      |
| cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid | Polyunsaturated fatty acid | PUFA     |
| cis-11,14-Eicosadienoic acid        | Polyunsaturated fatty acid | PUFA     |
| cis-11- eicosenoic acid             | Monounsaturated fatty acid | MUFA     |

Table 5 shows all acids found in struvite samples (The acids are listed as fatty methyl esters required for analysis).

Table 5. Concentrations in ng g<sup>-1</sup> of FFAs in struvite composed samples. Values in bold are the highest.

| Fames                                            | Kidney Stone concentration (ng g <sup>-1</sup> ) |              |              |               |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------|--------------|---------------|
|                                                  | 35                                               | 36           | 39           | 45            |
| Methyl myristoleate                              | 2186                                             | <b>1779</b>  | <b>1029</b>  | <b>5882</b>   |
| Methyl pentadecanoate                            | 250                                              | 125          | -            | 1888          |
| Methyl palmitoleate                              | 1161                                             | 1910         | -            | 7297          |
| Methyl palmitate                                 | <b>35680</b>                                     | <b>24600</b> | <b>16790</b> | <b>82690</b>  |
| cis-10-Heptadecanoic acid methyl ester           | 38420                                            | -            | -            | -             |
| Methyl heptadecanoate                            | 441                                              | -            | -            | 2835          |
| Methyl $\gamma$ -linolenate                      | -                                                | -            | -            | 2655          |
| Methyl linoleate                                 | <b>28690</b>                                     | <b>5164</b>  | <b>19450</b> | <b>156100</b> |
| trans-9-Elaidic acid methyl ester                | <b>5903</b>                                      | <b>7288</b>  | <b>3998</b>  | <b>35880</b>  |
| cis-9-Oleic acid methyl ester                    | <b>76</b>                                        | <b>215</b>   | <b>744</b>   | <b>5886</b>   |
| Methyl stearate                                  | <b>24560</b>                                     | <b>8348</b>  | <b>4766</b>  | <b>27270</b>  |
| cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid methyl ester | -                                                | -            | 1161         | 37480         |
| cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester        | 708                                              | -            | -            | 350           |
| Methyl cis-11-eicosenoate                        | <b>14030</b>                                     | <b>9267</b>  | <b>6155</b>  | <b>9005</b>   |

Palmitic acid is the most abundant, ranging from 16,789 to 82,690 ng/g. It represents 21.51 to 37.79% of the total. The linoleic acid was also found in higher amounts, ranging from 5,190 to 156,000 ng/g. Other acids were found in significant concentration, however in terms of percentage was lower than palmitic and linoleic acids.

As mentioned above, the acids were grouped according to double bonds in the molecule. The first group is composed by saturated fatty acids, which were the most common group (figure 5). This group is predominated by palmitic acid (21.51-37.79%), and minor concentration of other acids, such as stearic acid, with 7.1 to 17.91% of total. Polyunsaturated fatty acids are the second most common, with high percentages of linoleic acid, ranging from 7.93 to 41.62%, followed by monounsaturated, with percentages of acids such as trans-9-elaidic acid (also called elaidic acid), of 3.93 to 12.42%.

#### 4.1.2 PHOSPHOLIPIDS (PL)

The phospholipids are a major component of cell membranes, they are composed of two fatty acids, a glycerol unit, a phosphate group and a polar molecule (Bailey, 2017). The phosphate group, which is also the polar head region of the molecule, is hydrophilic, while the fatty acid tail is hydrophobic (Bailey, 2017). Khan et al (2002) already showed that a significantly higher concentration of phospholipids occurs in calcium oxalate stone formers' urine than in healthy individuals or uric acid formers urine.

The phospholipidic composition revealed a very homogeneous pattern of data (figure 7). All samples show a similar distribution, and hexanoic acid was the predominant compound, ranging from 92,720 to 108,600 ng/g, representing 81.87-83.05% of total, followed by butyric acid (16.69-18.12%) and palmitic acid (>1%) (table 6).

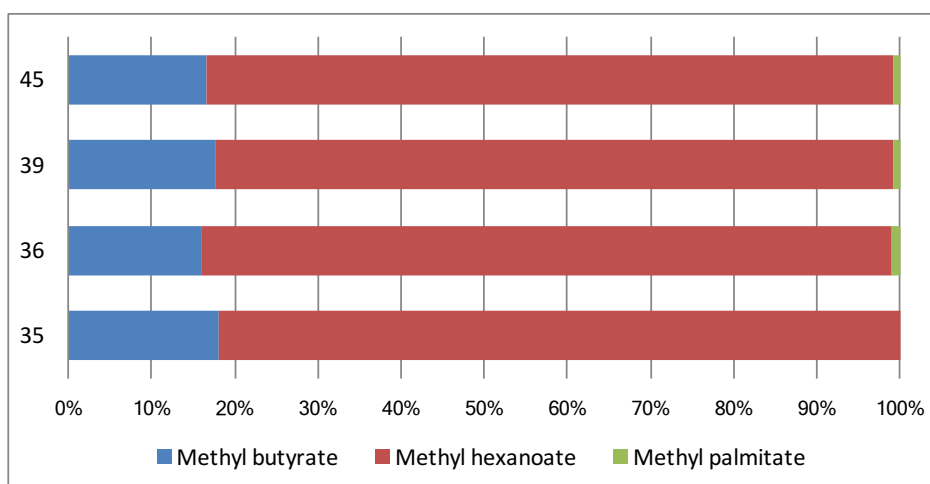


Figure 7. Distribution of phospholipids in samples composed of struvite. Notice the homogeneous pattern.

It is suspected that hexanoic acid could be derived from the *Proteus Mirabilis* bacteria, commonly present in kidney stones composed of struvite (Norsworthy, 2016).

Table 6. Concentrations in  $\text{ng g}^{-1}$  of phospholipids in struvite composed samples. Values in bold are the highest.

| Fames - PL       | Kidney Stone concentration ( $\text{ng g}^{-1}$ ) |               |               |               |
|------------------|---------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
|                  | 35                                                | 36            | 39            | 45            |
| Methyl butyrate  | 20520                                             | 20540         | 22770         | 21960         |
| Methyl hexanoate | <b>92720</b>                                      | <b>107600</b> | <b>105600</b> | <b>108600</b> |
| Methyl palmitate | -                                                 | 1408          | 989           | 996           |

#### 4.1.3 CHOLESTEROL

Cholesterol and hexanedioic acid are not similarly distributed in all chromatograms. Several other peaks are shown in chromatograms of most samples, but it was not possible to interpret correspondent acids.

The values of cholesterol correspond from 387 to 38,990  $\text{ng/g}$ , which is the most prominent compound measured (table 7). Hexanedioic acid was not measured, but it is the compound with the highest peaks in the chromatograms.

Table 7. Concentrations in  $\text{ng g}^{-1}$  of polar compounds in struvite composed samples. Values in bold are the highest.

| Peak Name   | Kidney Stone concentration (ng g <sup>-1</sup> ) |      |     |       |
|-------------|--------------------------------------------------|------|-----|-------|
|             | 35                                               | 36   | 39  | 45    |
| Cholesterol | 11440                                            | 5127 | 387 | 38990 |

Cholesterol occurs naturally in the human body, and it is a building block in the cell membranes (Corliss, 2017). It occupies the spaces between the polar head-groups of the phospholipid molecular bilayer, reducing its fluidity (Myant, 1981 in Charlton-Menys and Durrington, 2007). Hexanedioic acid, however, is an adipate (formal name: Di(2-Ethylhexyl) Adipate) primarily used as plasticizer in the flexible vinyl industry and it is widely used as a flexible poly(vinyl chloride) (PVC) food film, and also in cosmetics, among others (IARC monographs, 2000).

#### 4.2 BIMINERALIC STONES

Three other samples were analyzed, all of them composed of two minerals. The nucleation and growth of polymineralic stones has not been well explained so far, but it is known that the organic portion of a renal calculi occurs as a matrix around crystals of inorganic material (Boyce and Garvey, 1956).

The samples' composition varies amongst phosphates, oxalates and uric acid (table 8). Results differ specially in the quantity of FFAs and polar compounds.

Table 8. Mineral composition of each sample and its respective percentages.

| Sample number | Mineralogic composition (%)         |
|---------------|-------------------------------------|
| 23            | Fluorapatite (54%) e struvite (46%) |
| 26            | Whewellite (85%) e struvite (15%)   |
| 34            | Uric acid (84%) whewellite (16%)    |

##### 4.2.1 FLUORAPATITE AND STRUVITE

Apatite might occur in more than one composition in kidney stones - either hydroxyapatite, fluorapatite or carbapatite. It is proven that high carbonate apatite is associated with infectious agents (Carpentier, 2009), as in struvite. The sample 23 is composed of fluorapatite and struvite and its results of FFAs were similar to samples 39 and 45, while phospholipids had little variation and cholesterol differed from most of them.

#### 4.2.1.1 Free Fatty Acids (FFAs)

The occurrence of acids includes myristoleic, palmitic, linoleic, linolelaidic, *cis*-9-oleic, *cis*-5,8,11,14 escosatetraenoic, *cis*-11 eicosenoate, *trans*-9-elaidic, stearic, eicosenoic, pentadecanoic and heptadecanoic acids, with myristoleic, elaidic, palmitic, linoleic and stearic acids predominating. Table 9 shows the absolute concentrations of each acid. Despite the great amount of acids analyzed, the major methyls observed are very similar to FFAs of struvite samples (figure 8), with a percentage of palmitic (34.64%) and linoleic acid (31.35%). That could be explained by the significant percentage of struvite in this particular sample. The major acid analyzed was palmitic, with a concentration of 30790 ng g<sup>-1</sup>.

In figure 9, the chromatograms of samples composed of fluorapatite and struvite and whewellite and struvite, are compared to a sample composed of pure struvite. It is possible to observe a similarity in FFAs chromatograms of sample composed of fluorapatite and struvite and sample composed of pure struvite, with resembling peak intensities and proportion. The cholesterol chromatograms of the same samples also show a higher number of peaks compared with the sample rich in whewellite and struvite.

Table 9. Concentrations in ng g<sup>-1</sup> of FFAs in sample composed of fluorapatite and struvite. Values in bold are the highest.

| Sample 23                                            |                                                  |                                                                                                              |                                                  |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Fames                                                | Kidney Stone concentration (ng g <sup>-1</sup> ) | Fames                                                                                                        | Kidney Stone concentration (ng g <sup>-1</sup> ) |
| <b>Methyl myristoleate</b>                           | <b>5163</b>                                      | <b><i>cis</i>-9-Oleic acid methyl ester</b>                                                                  | <b>1411</b>                                      |
| <b>Methyl pentadecanoate</b>                         | 1055                                             | <b><i>trans</i>-9-Elaidic acid methyl ester</b>                                                              | <b>6569</b>                                      |
| <b>Methyl palmitoleate</b>                           | 825                                              | <b><i>cis</i>-9-Oleic acid methyl ester</b>                                                                  | <b>1411</b>                                      |
| <b>Methyl palmitate</b>                              | <b>30790</b>                                     | <b>Methyl stearate</b>                                                                                       | <b>6970</b>                                      |
| <b><i>cis</i>-10-Heptadecanoic acid methyl ester</b> | -                                                | <i>cis</i> -5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid methyl ester                                                     | 2219                                             |
| <b>Methyl heptadecanoate</b>                         | 194                                              | <i>cis</i> -8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester Q <i>cis</i> -11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester | -                                                |
| <b>Methyl <math>\gamma</math>-linolenate</b>         | 739                                              | <i>cis</i> -11,14-Eicosadienoic acid methyl ester                                                            | -                                                |
| Methyl linoleate                                     | <b>27870</b>                                     | <b>Methyl <i>cis</i>-11-eicosenoate</b>                                                                      | <b>5115</b>                                      |

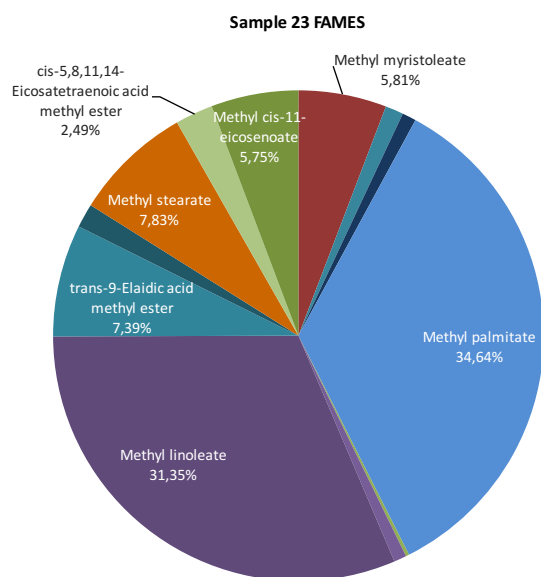


Figure 8. Percentages of each acid in sample composed of fluorapatite and struvite.

POLIMINERALIC CALCULI

FLUORAPATITE + STRUVITE (23)      WHEWELLITE + STRUVITE (26)      STRUVITE (36)

FLUORAPATITE + STRUVITE (23)

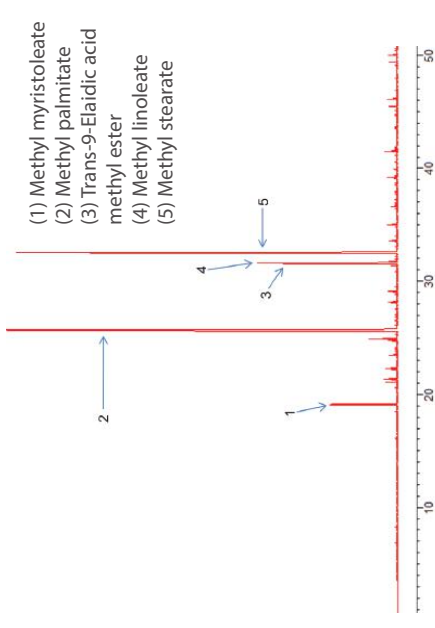
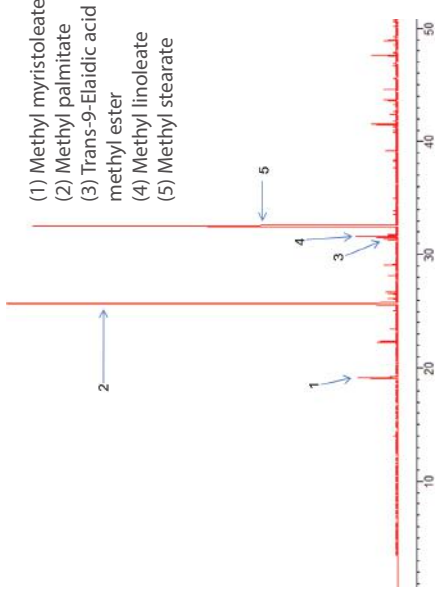
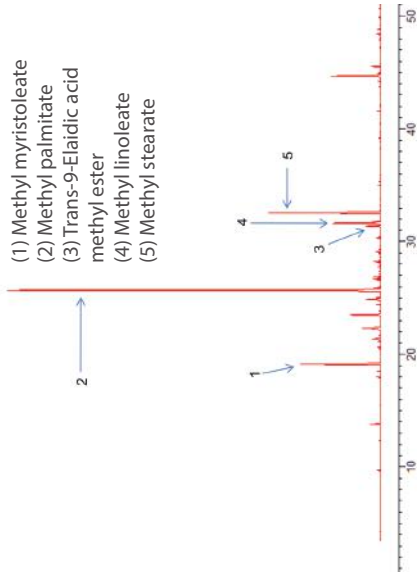
WHEWELLITE + STRUVITE (26)

STRUVITE (36)

Free Fatty Acids

Free Fatty Acids

Free Fatty Acids



Cholesterol

Cholesterol

Cholesterol

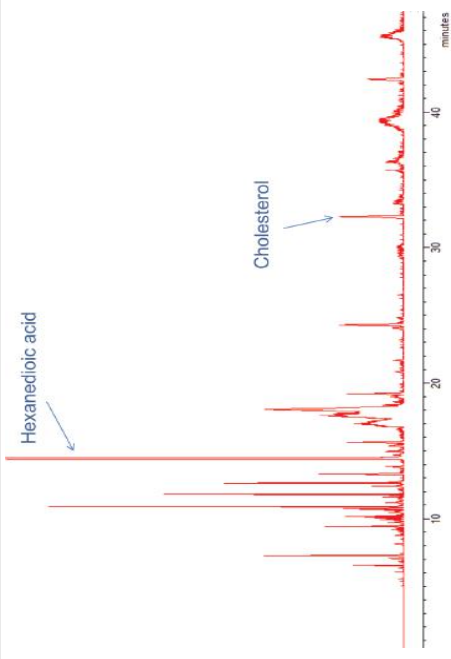
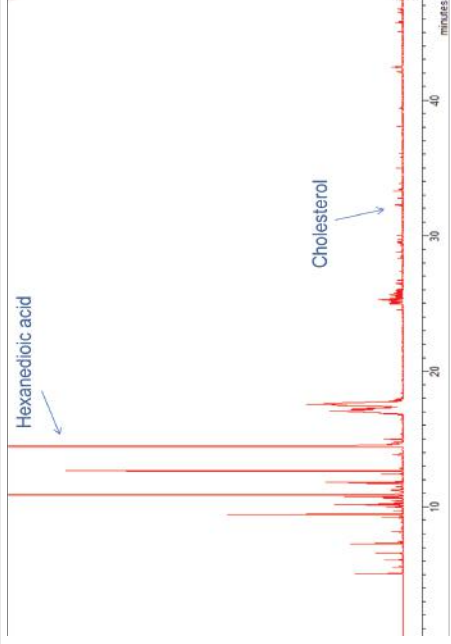
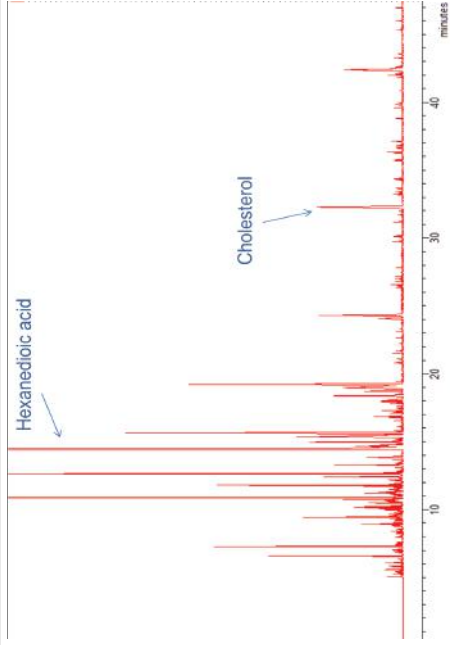


Figure 9. Chromatograms of free fatty acids and cholesterol of samples composed of fluorapatite and struvite and whewellite and struvite (left and middle), compared to a sample composed of pure struvite (right).

#### 4.2.1.2 Phospholipids

The concentration and distribution of phospholipids in all samples is very similar. In the sample 23, hexanoic acid is the predominant compound, making 103,100 ng/g (81.51%), 22,580 ng/g (17.85%) of butyric acid and only 811 of palmitic acid, composing less than 1% (table 10, figure 10).

Table 10. Concentrations in ng g<sup>-1</sup> of phospholipids in sample composed of fluorapatite and struvite. Values in bold are the highest.

| Fames- PL               | Kidney Stone concentration (ng g <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------|--------------------------------------------------|
|                         | Sample 23                                        |
| <b>Methyl butyrate</b>  | 22580                                            |
| <b>Methyl hexanoate</b> | <b>103100</b>                                    |
| <b>Methyl palmitate</b> | 811                                              |

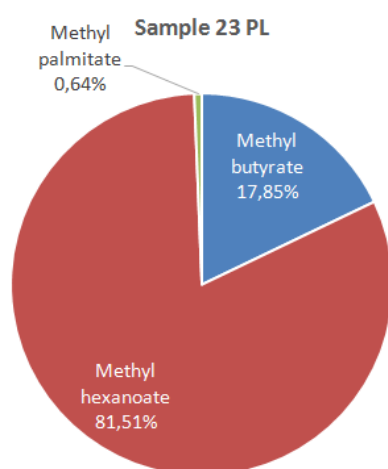


Figure 10. Graph of the all phospholipids of sample composed of fluorapatite and struvite.

#### 4.2.1.3 Cholesterol

Other observed compounds observed are cholesterol and hexanedioic acid (figure 9). The values of cholesterol correspond to 8624 ng/g, which is the only compound measured. The hexanedioic acid was not measured, but it is the compound with the highest peaks in all chromatograms.

#### 4.2.2 WHEWELLITE AND STRUVITE

Whewellite occur either associated with another mineral or alone. Most common associations occur with weddellite, cabapatite and uric acid, but association with struvite also happen (Cloutier, 2015). The sample 26 is composed of 85% whewellite and 15% struvite, and results of phospholipids are similar to the other samples. Nevertheless, FFAs and cholesterol have rather different results in respect to the other samples.

#### 4.2.2.1 Free Fatty Acids (FFAs)

The acids analyzed include mostly palmitic, with a concentration of 9960 ng/g, followed by linoleic and cis-11-eicosenoic acids (table 11). Less prominent were acids stearic, myristoleic and linolelaidic (figure 11).

Table 11. Concentrations in ng g<sup>-1</sup> of FFAs in sample composed of whewellite and struvite. Values in bold are the highest.

| Fames                                                            | Kidney Stone concentration (ng g <sup>-1</sup> ) | Fames                                                                                       | Kidney Stone concentration (ng g <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
|                                                                  | 26                                               |                                                                                             | 26                                               |
| Methyl myristoleate                                              | <b>883</b>                                       | <b>trans-9-Elaidic acid methyl ester</b>                                                    | <b>2004</b>                                      |
| <b>Methyl pentadecanoate</b>                                     | -                                                | <b>cis-9-Oleic acid methyl ester</b>                                                        | -                                                |
| <b>Methyl palmitoleate</b>                                       | -                                                | <b>Methyl stearate</b>                                                                      | <b>2767</b>                                      |
| Methyl palmitate                                                 | <b>9960</b>                                      | cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid methyl ester                                            | -                                                |
| <b>cis-10-Heptadecanoic acid methyl ester</b>                    | -                                                | cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester Qcis-11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester | -                                                |
| <b>Methyl heptadecanoate</b>                                     | -                                                | cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester                                                   | -                                                |
| <b>Methyl <math>\gamma</math>-linolenate / Methyl linolenate</b> | -                                                | <b>Methyl cis-11-eicosenoate</b>                                                            | <b>5724</b>                                      |
| Methyl linoleate                                                 | <b>5118</b>                                      |                                                                                             |                                                  |

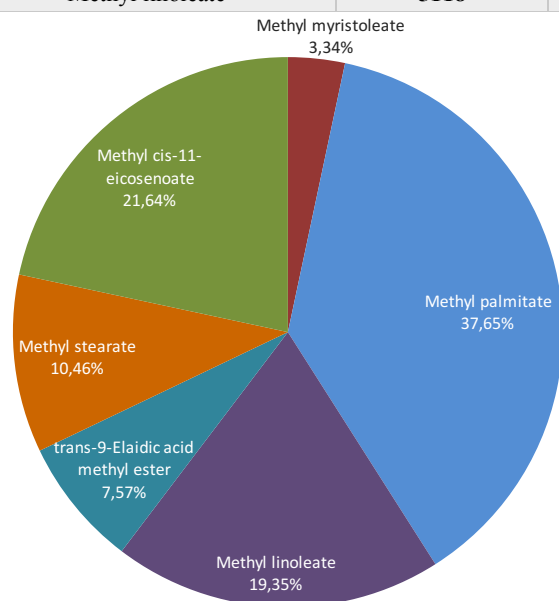


Figure 11. Percentages of each acid in sample composed of whewellite and struvite.

#### 4.2.2.2 Phospholipids

The distribution of phospholipids is very similar in all samples. In sample 26, hexanoic acid was the main compound, with a concentration of 122100 ng/g (82.18%); butyric acid making 17.24% and palmitic acid a very small concentration (table 12, figure 12).

Table 12. Concentrations in ng g-1 of phospholipids in sample composed of whewellite and struvite. Values in bold are the highest.

| Fames- PL               | Kidney Stone concentration (ng g-1) |
|-------------------------|-------------------------------------|
|                         | 26                                  |
| <b>Methyl butyrate</b>  | 25620                               |
| <b>Methyl hexanoate</b> | <b>122100</b>                       |
| <b>Methyl palmitate</b> | 856                                 |

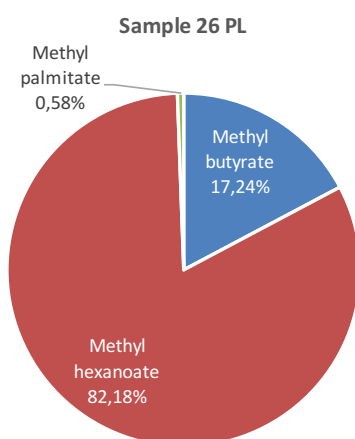


Figure 12. Graph of phospholipids of sample composed of whewellite and struvite.

#### 4.2.2.3 Cholesterol

The compounds analyzed include cholesterol and hexanedioic acid. Cholesterol correspond to 691 ng/g, which is the most predominant compound quantified, with a concentration of 691 ng/g. Hexanedioic acid was not measured, but it is the compound with the highest peaks in all chromatograms (figure 9).

#### 4.2.3 URIC ACID AND WHEWELLITE

The uric acid stones form by itself or associated with whewellite, and its occurrence might indicate an excessive urate excretion in urine or insulin resistance due to diabetes (Cloutier, 2015). The sample 34 is composed of mostly uric acid (84%) and whewellite (16%). The results of FFAs and cholesterol are slightly different from the other samples, while phospholipids appear very similar to the others.

#### 4.2.3.1 Free Fatty Acids (FFAs)

The acids occurrence include predominantly palmitic, with a 30790 ng/g concentration (38.51%), followed by linoleic, stearic, linoleidic and cis-11-eicosenoic. Less dominant acids occur as cis-9-Oleic and myristoleic acids (table 13, figure 13). Figure 14 shows the chromatograms of FFAs and cholesterol of sample 34 compared to a sample composed of pure struvite.

Table 13. Concentrations in ng g<sup>-1</sup> of FFAs in sample composed of uric acid and whewellite. Values in bold are the highest.

| Fames                                         | Kidney Stone concentration (ng g <sup>-1</sup> ) | Fames                                                                                       | Kidney Stone concentration (ng g <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
|                                               | <b>34</b>                                        |                                                                                             | <b>34</b>                                        |
| Methyl myristoleate                           | <b>1444</b>                                      | <b>trans-9-Elaidic acid methyl ester</b>                                                    | <b>8068</b>                                      |
| <b>Methyl pentadecanoate</b>                  | 72                                               | <b>cis-9-Oleic acid methyl ester</b>                                                        | <b>1174</b>                                      |
| <b>Methyl palmitoleate</b>                    | 667                                              | <b>Methyl stearate</b>                                                                      | <b>13910</b>                                     |
| Methyl palmitate                              | <b>30790</b>                                     | cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid methyl ester                                            | -                                                |
| <b>cis-10-Heptadecanoic acid methyl ester</b> | -                                                | cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester Qcis-11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester | -                                                |
| <b>Methyl heptadecanoate</b>                  | 32                                               | cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester                                                   | -                                                |
| <b>Methyl <math>\gamma</math>-linolenate</b>  | -                                                | <b>Methyl cis-11-eicosenoate</b>                                                            | <b>7967</b>                                      |
| Methyl linoleate                              | <b>15830</b>                                     |                                                                                             |                                                  |

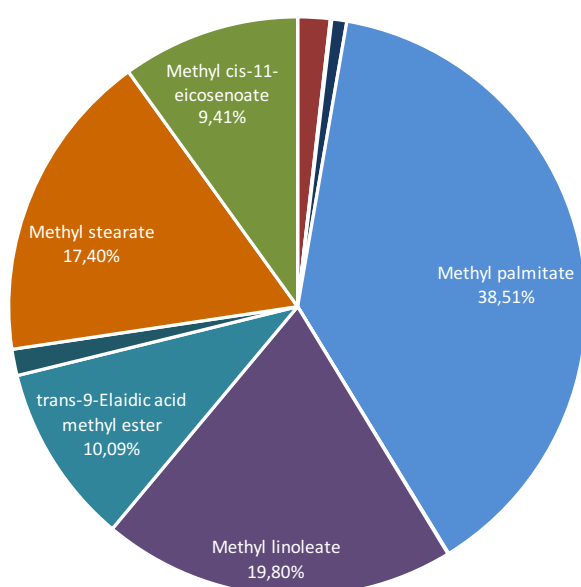


Figure 13. Percentages of each acid in sample composed of uric acid and whewellite.

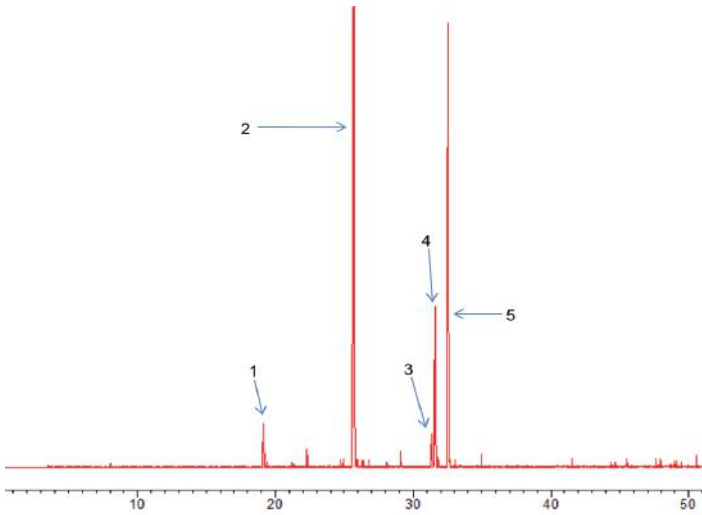
# POLIMINERALIC CALCULUS URIC ACID + WHEWELLITE COMPARED WITH STRUVITE

**URIC ACID + WHEWELLITE (34)**

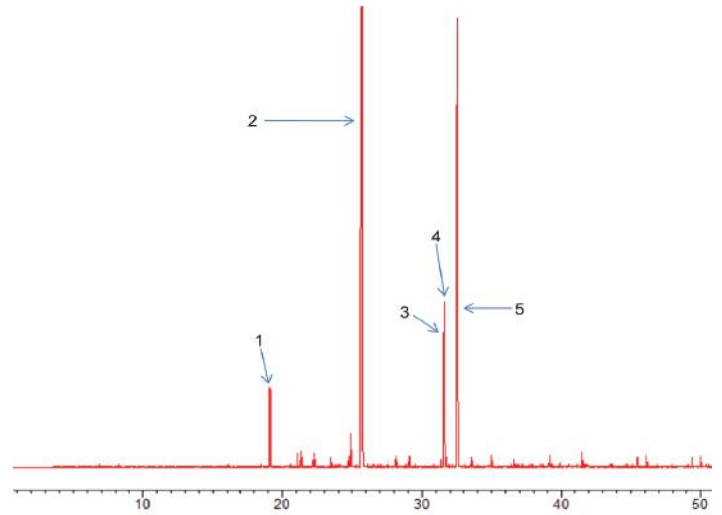
**STRUVITE (36)**

Free Fatty Acids

Free Fatty Acids



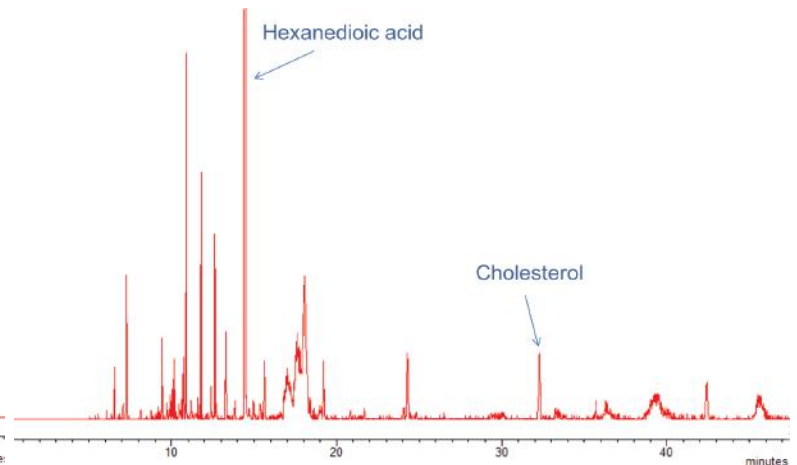
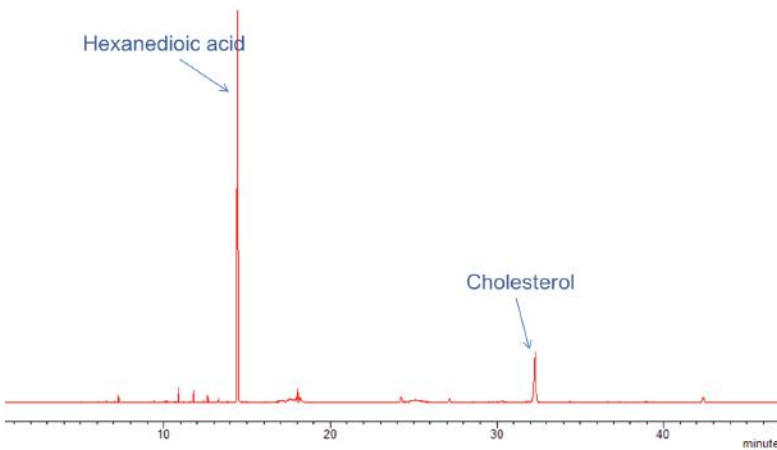
(1) Methyl myristoleate, (2) Methyl palmitate, (3) Trans-9-Elaidic acid methyl ester, (4) Methyl linoleate, (5) Methyl Stearate



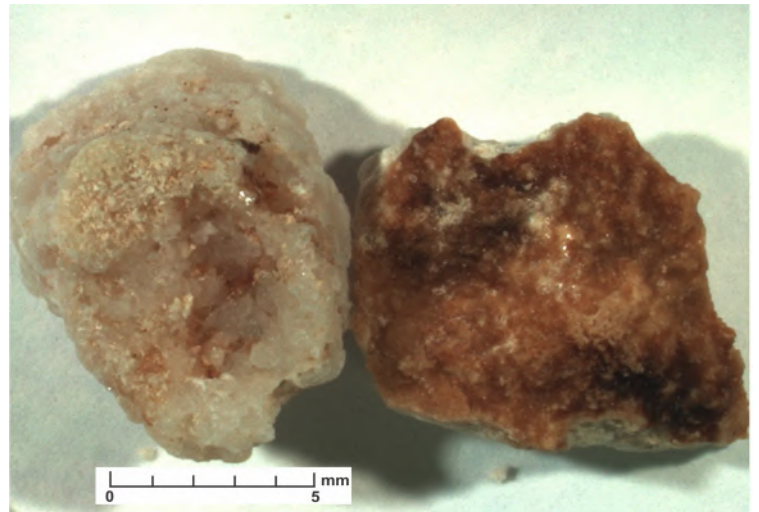
(1) Methyl myristoleate, (2) Methyl palmitate, (3) Trans-9-Elaidic acid methyl ester, (4) Methyl linoleate, (5) Methyl Stearate

Cholesterol

Cholesterol



Uric acid + whewellite



Struvite

Figure 14. Chromatograms of FFAs and cholesterol of sample composed of uric acid and whewellite compared to a sample composed of pure struvite.

#### 4.2.3.2 Phospholipids

The concentration of all acids are similar to other samples. In sample 34, hexanoic acid is predominant, with a concentration of 129400 ng/g (82.83%), followed by butyric acid (16.67%) and palmitic acid (0.5%) (table 14, figure 15).

Table 14. Concentration in ng g<sup>-1</sup> of phospholipids in sample composed of uric acid and whewellite. Values in bold are the highest.

| Fames- PL               | Kidney Stone<br>concentration (ng g <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------|-----------------------------------------------------|
|                         | 34                                                  |
| <b>Methyl butyrate</b>  | 26040                                               |
| <b>Methyl hexanoate</b> | <b>129400</b>                                       |
| <b>Methyl palmitate</b> | 780                                                 |

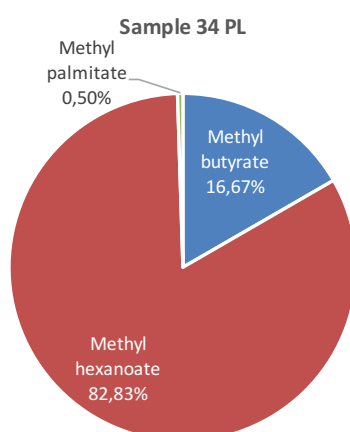


Figure 15. Graph of the all phospholipids of sample composed of uric acid and whewellite.

#### 4.2.3.3 Cholesterol

Just as all other samples, occurring compounds are basically cholesterol and hexanedioic acid. The cholesterol composes practically all of quantified compounds, with a concentration 225400 ng/g. Hexanedioic acid was not measured, but it is the compound with the highest peaks in all chromatograms (figure 14).

## 5. DISCUSSIONS

The understanding of lipid composition in kidney stones is a rather recent scientific subject. Studies defining the quantity of lipids in urine and lab precipitated

stones (Khan et al, 2002), as well as the types of lipids in urine (Naya et al, 2002) and even major types of lipids in kidney stones have been accomplished (Boonla et al, 2010), but the present study is the first one to establish qualitatively and quantitatively the type of acids present in lipids of renal calculi.

Different type of lipids were found in all samples, chiefly myristoleic, palmitic, elaidic, linoleic and stearic acids, with regard to free fatty acids. Most phospholipids were hexanoic and butyric acids, and also cholesterol and hexanedioic acids. The sources of these acids are mostly eating habits, with examples of food such as butter, lard, different types of cheese, milk and dairy products, and some acids occur in seeds such as peanut, and oils, for instance coconut, olive and sunflower oils. The table 15 shows a summary of food sources of acids analyzed.

Despite the fact that these acids are found in food, some acids can be synthesized by bacteria, existing in human body. The hexanoic acid can be produced from many components made in human body, by bacteria *Clostridium* and *Megasphaera elsdenii* (Jeon et al, 2010; Marounek et al, 1989). The butyric acid is produced by bacteria in human intestine, and it can be used as treatments for diseases (Immerseel et al, 2010). Palmitic, stearic and elaidic acids can be found in bacterial cells such as *C. diphtheriae*, *L. acidophilus*, *Hemophilus (Bordetella)* and *Salmonella typhimurium*, causing different diseases in the human body (O'Leary, 1962). The linoleic acid can be found in human colon by bacteria of *Roseburia* species. It is not possible to correlate the acids with the presence of bacteria in human body. Additional studies are necessary to refute or to prove such possibility. The phospholipids also occur in cell membranes, but its source is still unsure.

The lipids are present in all samples, but their function in the nucleation and growth of kidney stones is still unclear. Khan et al (2002) proposed that cell membranes and their phospholipids have an active role in calcium oxalate and phosphate crystals nucleation and growth. However, it is possible that these lipids are incorporated in stones by binding surfaces of growing and aggregating crystals, according to the author. At present, it is still not possible to reassure whether lipids have an active or passive function in kidney stones formation.

It is possible to establish a range in ratio between palmitic and myristoleic acids in stones composed of struvite, which varies from 14 to 16, and it might be an important data when characterizing future struvite signature for lipidic composition. However, it was not possible to establish a pattern in other samples

Table 15. Acids analyzed and their respective food sources.

| <u>Free fatty acids</u>                                                      |                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Acid                                                                         | Comments                                                                                                                           | Sources (g/100g of edible portion)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Myristoleic acid</b><br>(C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> ) | It is biosynthesized from myristic acid in the body.                                                                               | (Myristic acid) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cheeses: 3.4 g/100 g;</li> <li>• Butter: 8.3 g/100 g;</li> <li>• <b>Coconut oil:</b> 17 g/100 g;</li> <li>• Dried and fresh coconut: 9.5 g and 5.4 g/100 g, respectively.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Palmitic acid</b><br>(C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )    | It is the most common saturated free fatty acid in nature.                                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fresh red meat: lamb, rabbit, pork, chicken (2g/100g)</li> <li>• Processed meat: salami (7,6g/100g), lard (21g/100g)</li> <li>• Eggs: yolk (6g/100g)</li> <li>• Dairy products: cheese (8,4g/100g), butter (20,9g/100g), milk and chocolate (8-9g/100g)</li> <li>• Fish: tuna can (3,57g/100g)</li> <li>• Vegetable fat: peanut butter (5,8g/100g), margarine (19,3g/100g)</li> <li>• Palm oil: 41g/100g</li> <li>• Peanut and dehydrated coconut: 5 e 5.4g/100g</li> </ul> |
| <b>Elaidic acid</b><br>(C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )     | It is a trans isomer of oleic acid.                                                                                                | It is the main trans fat in: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Margarine</li> <li>• Fried foods</li> <li>• Partially hydrogenated oils</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Linoleic acid</b><br>(C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )    | It is the precursor of omega 6, it is the most common acid in plant and animal tissues.                                            | Occur in great amounts in: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Seeds and oils of: walnuts, peanut, poppy, sunflower, grape, corn, sesame, soy</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Stearic acid</b><br>C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>        | It is also used in the manufacturing of candles, plastic, lubricants, cosmetics, suppositories, and as a softener for chewing gum. | Occurs in animal and vegetable fats: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fresh red and white meat: &lt;1,8g/100g</li> <li>• Sausage, salami: 3,5 g/100g</li> <li>• Lard: 11,1-16,7g/100g</li> <li>• Milk and dairy products: 3g/100g</li> <li>• Butter: 9,4g/100g</li> <li>• Eggs: yolk 3,7/100g</li> <li>• Peanut butter and margarine: 2,8g e 5,5g/100g</li> <li>• Sunflower oil: 4,8g/100g, but also in extra virgin olive oil, coconut oil, peanut, corn, palm sesame and soy</li> </ul>                    |
| <u>Phospholipids</u>                                                         |                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Hexanoic acid</b><br>C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>        | -                                                                                                                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Butter</li> <li>• Cheddar and other cheeses</li> <li>• Coconut oil</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Butyric acid</b><br>C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>          | -                                                                                                                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Butter</li> <li>• Cheeses</li> <li>• Plant oils</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <u>Cholesterol</u>                                                           |                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Cholesterol</b><br>C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O                      | Foods with saturated fat help in the production of cholesterol.                                                                    | Food that contain high amounts of saturated fat: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Butter, ghee</li> <li>• Margarines</li> <li>• Meat fat</li> <li>• Lard</li> <li>• Products like sausages</li> <li>• Cheeses, milk cream and yogurt</li> <li>• Coconut and palm oil, coconut cream</li> </ul>                                                                                                                                                                                                               |

Sources: Akoh and Min (2008) and Chow (2008)

because of the small number of samples and due to their different mineralogical composition. It was not possible to establish a pattern in the ratio linoleic/stearic, independent to its mineral composition.

Hexanedioic or adipate acid is also found in great concentration in all samples of renal calculi. Such compound is synthetic, and used in the manufacturing of flexible poly(vinyl chloride) (PVC) food film, and also has a highly migrating property (IARC Monographs, 2000). Castle et al (1987) studied the amounts of compound, also called di(2-ethylhexyl) adipate, and discovered that relatively high concentrations were present in foods wrapped with PVC, specially cheese (27,8-135 mg/kg) and baked goods and sandwiches (11-212 mg/kg). Highest levels were found in home-use and microwave cooking foods. Despite these facts, the possibility that this compound is found because of contamination from the storage of kidney stones in plastic containers is still relevant, therefore it is not possible to assure the its source.

Cholesterol was present in most samples, and its source is uncertain, due to the fact that the human body produces most of the cholesterol, and the rest is ingested from food (Lyra, 2016).

## 6. CONCLUSIONS

Although nephrolithiasis is remarkably common and has a 50% chance of recurrence, mechanisms of stone nucleation and growth are still now well understood. The application of a geochemical technique was effective in determination of stone lipid composition and quantification.

One of the purposes of this research was to generate a data bank for researchers of renal calculi, since it does not exist yet. Data such as lipid composition of urine of stone formers or of calcium oxalate, and even types of lipids in kidney stones in terms of either free fatty acids, glycolipids and phospholipids exist, but not with regard to the type of each acid forming the free fatty acids or phospholipids. Most common acids were myristoleic, palmitic, elaidic, linoleic and stearic acids concerning free fatty acids; butyric and hexanoic acids regarding phospholipids, and cholesterol and hexanedioic acids.

By calculating the ratio between the most common free fatty acids, it is possible to establish a range in samples composed of struvite. The ratio palmitic acid/myristoleic acid shifts from 14 to 16, which might become a signature of struvite in free fatty acids composition. The samples did not have any other pattern.

Sources of each acid are still a reason for debate. In future studies, a suggestion would be to also analyze samples' isotopic composition in order to assure the sources of compounds. Also, it is necessary to analyze more samples in order to set up a data bank of different types of kidney stones.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the general support of the UFPR / LAMIR (Laboratório de Análises de Minerais e Rochas), LGPA (Laboratório de Geoquímica do Petróleo e Ambiental) and LPH (Laboratório de Pesquisas Hidrogeológicas). This research is part of the Nephrolithiasis Project, a partnership among LGPA, LAMIR and the Nephrolithiasis Research Center of Clinical Hospital of UFPR, funded by LAMIR. We thank Professor Maurício de Carvalho and the medicine students Phillipe, Rosa and Giovanna for providing the samples and giving support with medical knowledge.

## REFERENCES

- Akoh, C. C.; Min, D.B. 2008. Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. 3th edition, Florida: CRC Press.
- Apatite-(CaOH) Mineral Data. Webmineral. Disponível em: [http://webmineral.com/data/Apatite-\(CaOH\).shtml#.WfiL0hNSxsM](http://webmineral.com/data/Apatite-(CaOH).shtml#.WfiL0hNSxsM) Acessado em 27 de outubro de 2017.
- Apatite-(CaF) Mineral Data. Webmineral. Disponível em: [http://webmineral.com/data/Apatite-\(CaF\).shtml#.WfiL9RNSxsM](http://webmineral.com/data/Apatite-(CaF).shtml#.WfiL9RNSxsM) Acessado em 27 de outubro de 2017.
- Balaji, K. C., Menon, M., 1997. Mechanism of Stone Formation. Urolithiasis, v. 24, no 1, p. 94:143.
- Bailey, R. 2017. Phospholipids. ThoughtCo. Disponível em: <https://www.thoughtco.com/phospholipids-373561>. Acessado em 25 de outubro de 2017.
- Bellizzi, V.; Nicola De, L.; Minutolo, R.; Russo, D.; Cianciaruso, B.; Andereucci, M.; Conte, G.; Andreucci, V. B., 1999. Effects of Water Hardness on Urinary Risk Factors for Kidney Stones in Patients with Idiopathic Nephrolithiasis. Nephron, v. 81, p.66-70.
- Bigelow, M. W.; Wiessner, J. H.; Kleinman, J. G.; Mandel, N. S., 1996. Calcium oxalate-crystal membrane interactions: dependence on membrane lipid composition. The Journal of Urology, American Urological Association, Inc., v. 155, p. 1094-1098.
- Boonla, C.; Youngjermchan, P.; Pumpaisanchai, S.; Tungsanga, K.; Tosukhowong, P., 2010. Lithogenic activity and clinical relevance of lipids extracted from urines and stones of nephrolithiasis patients. Urological Research, Springer-Verlag, v. 39, p. 9-19.

Boyce, W. H.; Garvey, F. K., 1956. The amount and nature of the organic matrix in urinary calculi: a review. *The Journal of Urology*, vol. 76, n. 3.

Branco, C.H.D.; Silva, A.L.; Luiz, J.M.; Mercuri, L.P.; Matos, J.R., 2009. Caracterização de cálculos renais por análise térmica. *Eclética Química*, São Paulo, v. 34, n.1, p.51-56.

Carpentier, X.; Daudon, M.; Traxer, O.; Jungers, P.; Mazouyes, A.; Matzen, G.; Véron, E.; Bazin, D., 2009. Relationships between carbonation rate of carbapatite and morphologic characteristics of calcium phosphate stones and etiology. *Urology*, vol. 75, n. 5, p. 968-975.

Carvalho, M.; Nanni, F. N. 2012. *Manual do Paciente com Cálculo Renal*. Champagnat editora, PUCPR, Curitiba.

Castle, L.; Mercer, A.J.; Startin, J.R.; Gilbert, J., 1987. Migration from plasticized films into foods. 2. Migration of di-(2-ethylhexyl)adipate from PVC films used for retail food packaging. *Food Additives and Contaminants*, v. 4, p. 399–406.

Charlton-Menys, V.; Durrington, P. N., 2007. Human cholesterol metabolism and the therapeutic molecules. *Experimental Physiology*, vol. 93, n.1, p. 27-42.

Chow, C. K. 2008. *Fatty acids in foods and their health implication*. 3th edition, Florida: CRC Press.

Cloutier, J.; Villa, L; Traxer, O.; Daudon, M., 2015. Kidney stone analysis: “Give me your stone, I will tell you who you are!”. *World Journal of Urology*, v. 33, p.157-169.

Cordua, W.S., 1996. Minerals from kidney stones. *Leaverite News*, v. 21, n. 2, p. 4. Disponível em: <<http://digital.library.wisc.edu/1793/11569>>. Acessado em 22 de novembro de 2017.

Corliss, J. 2017. How it’s made: Cholesterol production in your body. Disponível em: <https://www.health.harvard.edu/heart-health/how-its-made-cholesterol-production-in-your-body>. Acessado em 25 de outubro de 2017.

Cystine. NIST Standard Reference Database 69: *NIST Chemistry WebBook*. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C56893&Mask=80>, Acessado em 26 de outubro de 2017.

Dias, I. A., 2016. Caracterização mineralógica e geoquímica de cálculos renais. Undergraduate Thesis, Geology Graduation, Department of Geology, Federal University of Paraná, 73p.

Dickson, L.; Bull, I. D.; Gates, P. J.; Evershed, R. P., 2009. A simple modification of a silicic acid lipid fractionation protocol to eliminate free fat acids from glycolipid and phospholipid fractions. *Journal of Microbiological Methods*, v. 78, 249-254.

Di(2-Ethylhexyl) Adipate. *In: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 2000. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to*

Humans. World Health Organization: International Agency for Research on Cancer, vol. 77, p. 149-175

Dupraz, C.; Reid, R. P.; Braissant, O.; Decho, A. W.; Norman, R. S.; Visscher, P.T. Process of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews*. p. 22. 2009.

Irsay, L.; Bordinc, E.; Borda, M.; Ungur, R.; Ciortea, V.; Onac, I., 2014. Influence of mineral water consumption and renal stone formation. *Balneo Research Journal*, v. 5, p. 37-43.

Immerseel, F. V.; Ducatelle, R.; De Vos, M.; Boon, N.; De Wiele, T. V.; Verbeke, K.; Rutgeerts, P.; Sas, B.; Louis, P.; Flint, H. J., 2010. Butyric acid-producing anaerobic bacteria as a novel probiotic treatment approach for inflammatory bowel disease. *Journal of Medical Microbiology*, v. 59, p. 141-143.

Jeon, B. S.; Kim, B. C.; Um, Y.; Sang, I., 2010. Production of hexanoic acid from d-galactitol by a newly isolated *Clostridium* sp. BS-1. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 88, n. 5, p. 1161–1167.

Jiménez, A. 2017. Utilização de Ácidos Graxos como Traçador de Fontes de Material Orgânico em Sedimentos em Suspensão do Rio Barigui. Partial version of a Masters Degree. Post-Graduation Program of Water Resources and Environmental Engineering of the Federal University of Paraná, 70 p.

Kajander, E. O.; Çiftçioglu, N., 1998. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA; The National Academy of Sciences*, v. 95, p. 8274-8279.

Khan, S.R.; Atmani, F.; Glenton, P.; Hou, Z. C.; Talham, D. R.; Khurshid, M., 1996. Lipids and membranes in the organic matrix of urinary calcific crystals and stones. *Calcified Tissue International, Springer-Verlag New York Inc.*, v. 59, p. 357-365.

Khan, S. R.; Glenton, P. A.; Backov, R.; Talham, D. R., 2002. Presence of lipids in urine, crystals and stones: Implications for the formation of kidney stones. *Kidney International, International Society of Nephrology*, v. 62, p. 2062-2072.

Khan, S. R.; Kok D. J., 2004. Modulators of Urinary Stone Formation. *Frontiers in Bioscience*, v. 9, p. 1450-1482.

Killops, S, Killops, V., 2005. Introduction to organic geochemistry. 2nd Edition, Blackwell U.K.

Klein, C.; Dutrow, B., 2012. Manual de Ciência dos Minerais. 23rd edition, Bookman.

Lents, N. H.; Stark, L.; Denmark, B., 2014. Lipids: an introduction, *Biological Molecules*. Disponível em: <https://www.visionlearning.com/en/library/Biology/2/Lipids/207>, acessado em 30 de outubro de 2017.

Leslie, S. W. and Swierzewski, S. J., 1998. Types of Kidney Stones, Urological and Kidney Concerns. Disponível em: <http://www.healthcommunities.com/kidney-stones/types.shtml>, acessado em 27 de outubro de 2017.

Lieske, J.C.; Deganello, S.; Toback, F.G. Cell-Crystal Interactions and Kidney Stone Formation. *Nephron*, v.81, p.8-17.1999.

Lyra, R. 2016. Colesterol. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Disponível em: <https://www.endocrino.org.br/colesterol/>. Acessado em 22 de novembro de 2017.

Mandal, A., 2012. What are lipids? News Medical and Life Sciences. Disponível em: <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-are-Lipids.aspx>, acessado em 27 de outubro de 2017.

Marounek, M.; Fliegerova, K.; Bartos, S., 1989. Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 55, n. 6, p.1570–1573.

Naya, Y.; Ito, H.; Masai, M; Yamaguchi, K., 2002. Association of dietary fatty acids with urinary oxalate excretion in calcium oxalate stone-formers in their fourth decade. *BJU International*, v. 89, p. 842-846.

Norsworthy, A. N.; Pearson, M. M., 2016. From Catheter to Kidney Stone: The Uropathogenic Lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Trends in Microbiology*, v. 25, p. 304-315.

O’Leary, W. M., 1962. The Fatty Acids of Bacteria. *Bacteriological Reviews*, v. 26, n.4, p. 421-447.

Peres, L. A. B.; Molina, A. S.; Galles, M. H. L., 2003. Metabolic investigation of patients with urolithiasis in a specific region. *International Brazilian Journal of Urology, Brazilian Society of Urology*, v. 29 n. 3, Rio de Janeiro, p. 217-220.

Polar compound. (n.d.) Farlex Partner Medical Dictionary., 2012. Disponível em: <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/polar+compound>. Acessado em 25 de outubro de 2017.

Rye, C.; Wise, R.; Jurukovski, V.; DeSaix, J.; Choi, J.; Avissar, Y., 2017. Biological Macromolecules. In: *Biology*. OpenStax, Rice University, Houston, p. 65-92.

Rottem, S.; Markowitz, O.; Razin, S., 1978. Thermal Regulation of the Fatty Acid Composition of Lipopolysaccharides and Phospholipids of *Proteus mirabilis*. *European Journal of Biochemistry*, v. 85, p. 445-450.

Slowakiewicz, M.; Pancost, R. D; Thomas, L; Tucker, M. E.; Didi-Ooi, S. M.; Whitaker, F. Holocene Intertidal Microbial Mats of Qatar and Their Implications for Petroleum Source Rock Formation in Carbonate-Siliciclastic-Evaporite Systems. *International Petroleum Technology Conference*, January 20-22 of 2014, Doha, Qatar.

Smith, Y., 2016. What is Urolithiasis? News Medical and Life Sciences. Disponível em: <https://www.news-medical.net/health/What-is-Urolithiasis.aspx>. Acessado em: 26 de outubro de 2017.

Soult, A., 2016. Lipids and Triglycerides. Libretexts, University of Kentucky. Disponível em: <https://goo.gl/gkuB9o>, acessado em 27 de outubro de 2017.

Struvite Mineral Data. Webmineral. Disponível em: <http://webmineral.com/data/Struvite.shtml#.WfiMJRNSxsM>. Acessado em 26 de outubro de 2017.

Thompson, T. E., 2017. Lipid. Biochemistry, Encyclopedia Britannica. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/lipid>, acessado em 27 de outubro de 2017.

Uricite Mineral Data. Webmineral. Disponível em: <http://webmineral.com/data/Uricite.shtml#.WfiMQBNSxsM>. Acessado em 26 de outubro de 2017.

Weddellite Mineral Data. Webmineral. Disponível em: <http://webmineral.com/data/Weddellite.shtml#.WfiLnxNSxsM>. Acessado em 27 de outubro de 2017.

Wesson, J. A.; Ward, M. D., 2007. Pathological Biomineralization of Kidney Stones. Elements, v. 3, p. 415-421.

Whewellite Mineral Data. Webmineral. Disponível em: <http://webmineral.com/data/Whewellite.shtml#.WfiLJxNSxsM>. Acessado em 27 de outubro de 2017.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da nefrolitíase ser uma doença extremamente comum e com chance de recorrência de 50%, os mecanismos de nucleação e crescimento dos cálculos renais ainda não é bem compreendido. A aplicação de uma técnica de geoquímica orgânica foi efetiva na determinação e quantificação da composição lipídica dos cálculos.

Um dos objetivos dessa pesquisa era de gerar um banco de dados para pesquisadores de cálculos renais, pois tais dados ainda não existem. Dados como a composição lipídica da urina de indivíduos formadores de pedras nos rins, de pedras de oxalato de cálcio, ou mesmo tipos de lipídios como ácidos graxos, glicolipídios e fosfolipídios em diferentes tipos mineralógicos existem, mas não em grau de detalhe em que o tipo de ácido presente nos grupos de ácidos graxos ou fosfolipídios é determinado. Os ácidos mais comuns encontrados foram o miristoleico, palmítico, elaídico, linoleico, e esteárico, do grupo de ácidos graxos livres; ácidos butírico e hexanóico como fosfolipídios e colesterol e ácido hexanedióico.

Calculando a razão entre os ácidos graxos livres mais comuns, é possível estabelecer um padrão em amostras compostas por estruvita. A razão entre os ácidos palmítico/miristoleico vai de 14 a 16, o que pode se tornar uma assinatura da composição de ácidos graxos da estruvita. Outras amostras, porém, não tiveram nenhum outro padrão.

Fontes de cada ácido ainda são motivo para debate. Em estudos futuros, uma sugestão seria de analisar a composição isotópica dos cálculos a fim de assegurar as fontes dos compostos. Além disso, é necessário analisar mais amostras no intuito de montar um banco de dados para cada tipo mineralógico de pedras nos rins.

## REFERÊNCIAS

BALAJI, K. C., MANI MENON. Mechanism of Stone Formation. **Urolithiasis**, v. 24, no 1, p. 94:143.1997.

BAILEY, R. 2017. Phospholipids. ThoughtCo. Disponível em: <https://www.thoughtco.com/phospholipids-373561>. Acessado em 25 de outubro de 2017.

BBC UK: Gas Chromatography. Disponível em: [http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebite/size/science/triple\\_ocr\\_21c/further\\_chemistry/chromatography/revision/5/](http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebite/size/science/triple_ocr_21c/further_chemistry/chromatography/revision/5/). Acessado em 16 de novembro de 2017.

BELLIZZI, V.; NICOLA de, L.; MINUTOLO, R.; RUSSO, D.; CIANCIARUSO, B.; ANDEREUCCI, M.; CONTE, G.; ANDREUCCI, V. B. Effects of Water Hardness on Urinary Risk Factors for Kidney Stones in Patients with Idiopathic Nephrolithiasis. **Nephron**, v. 81, p.66-70.1999.

BIGELOW, M. W.; WIESSNER, J. H.; KLEINMAN, J. G.; MANDEL, N. S. Calcium oxalate-crystal membrane interactions: dependence on membrane lipid composition. **The Journal of Urology**, American Urological Association, Inc., v. 155, p. 1094-1098, 1996.

BOONLA, C.; YOUNGJERMCHAN, P.; PUMPAISANCHAI, S.; TUNGSANGA, K.; TOSUKHOWONG, P. Lithogenic activity and clinical relevance of lipids extracted from urines and stones of nephrolithiasis patients. **Urological Research**, Springer-Verlag, v. 39, p. 9-19, 2010.

BOYCE, W. H.; GARVEY, F. K. The amount and nature of the organic matrix in urinary calculi: a review. **The Journal of Urology**, vol. 76, n. 3, 1956.

BRANCO, C.H.D.; SILVA, A.L.; LUIZ, J.M.; MERCURI, L.P.; MATOS, J.R. Caracterização de cálculos renais por análise térmica. **Eclética Química**, São Paulo, v. 34, n.1, p.51-56, 2009.

CARPENTIER, X.; DAUDON, M.; TRAXER, O.; JUNGERS, P.; MAZOUYES, A.; MATZEN, G.; VÉRON, E.; BAZIN, D. Relationships between carbonation rate of carboxapatite and morphologic characteristics of calcium phosphate stones and etiology. **Urology**, vol. 75, n. 5, p. 968-975, 2009.

CARVALHO, M.; NANNI, F. N. **Manual do Paciente com Cálculo Renal**. Champagnat editora, PUCPR, Curitiba, 75p, 2012.

CHARLTON-MENYS, V.; DURRINGTON, P. N. Human cholesterol metabolism and the therapeutic molecules. **Experimental Physiology**, v. 93, n.1, p. 27-42, 2007.

CLOUTIER, J.; VILLA, L; TRAXER, O.; DAUDON, M. Kidney stone analysis: "Give me your stone, I will tell you who you are!". **World Journal of Urology**, v. 33, p.157-169, 2015.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução à métodos cromatográficos**. 7 edição, Campinas: Editora da UNICAMP, 1997.

CORDUA, W.S. Minerals from kidney stones. **Leaverite News**, v. 21, n. 2, p. 4. 1996. Disponível em: <<http://digital.library.wisc.edu/1793/11569>>. Acessado em 22 de novembro de 2017.

CORLISS, J. 2017. **How it's made: Cholesterol production in your body**. Disponível em: <https://www.health.harvard.edu/heart-health/how-its-made-cholesterol-production-in-your-body>. Acessado em 25 de outubro de 2017.

DIAS, I. A. **Caracterização mineralógica e geoquímica de cálculos renais**. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Geologia, Departamento de Geologia, Universidade Federal do Paraná, 73p, 2016.

DICKSON, L.; BULL, I. D.; GATES, P. J.; EVERSLED, R. P. A simple modification of a silicic acid lipid fractionation protocol to eliminate free fat acids from glycolipid and phospholipid fractions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, 249-254, 2009.

DUPRAZ, C.; REID, R. P.; BRAISSANT, O.; DECHO, A. W.; NORMAN, R. S.; VISSCHER, P.T. Process of carbonate precipitation in modern microbial mats. **Earth-Science Reviews**. p.22, 2008.

IRSAY, L.; BORDINC, E.; BORDA, M.; UNGUR, R.; CIORTEA, V.; ONAC, I. Influence of mineral water consumption and renal stone formation. **Balneo Research Journal**, v. 5, p37-43, 2014.

JIMÉNEZ, A. **Utilização de Ácidos Graxos como Traçador de Fontes de Material Orgânico em Sedimentos em Suspensão do Rio Barigui**. Versão Parcial de Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental da Universidade Federal do Paraná. 70 p, 2017.

KAJANDER, E. O.; ÇIFTÇIOĞLU, N. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**; The National Academy of Sciences, vol. 95, p. 8274-8279, 1998.

KHAN, S.R.; ATMANI, F.; GLENTON, P.; HOU, Z. C.; TALHAM, D. R.; KHURSHID, M. Lipids and membranes in the organic matrix of urinary calcific crystals and stones. **Calcified Tissue International**, Springer-Verlag New York Inc., v. 59, p. 357-365, 1996.

KHAN, S. R.; GLENTON, P. A.; BACKOV, R.; TALHAM, D. R. Presence of lipids in urine, crystals and stones: Implications for the formation of kidney stones. **Kidney International**, International Society of Nephrology, v. 62, p. 2062-2072, 2002.

KHAN, S. R.; KOK D. J. Modulators Of Urinary Stone Formation. **Frontiers in Bioscience**, vol. 9, p. 1450-1482, 2004.

KILLOPS, S, KILLOPS, V. **Introduction to organic geochemistry**. 2nd Edition, Blackwell U.K, 394 p, 2005.

KLEIN, C.; DUTROW, B. **Manual de Ciência dos Minerais**. 23rd edição, Bookman, 2012.

LENTS, N. H.; STARK, L.; DENMARK, B. **Lipids: an introduction**, Biological Molecules, 2014. Disponível em: <https://www.visionlearning.com/en/library/Biology/2/Lipids/207>, acessado em 30 de outubro de 2017.

LESLIE, S. W. AND SWIERZEWSKI, S. J. **Types of Kidney Stones**, Urological and Kidney Concerns, 1998. Disponível em: <http://www.healthcommunities.com/kidney-stones/types.shtml>, acessado em 27 de outubro de 2017.

LIESKE, J.C.; DEGANELLO, S.; TOBACK, F.G. Cell-Crystal Interactions and Kidney Stone Formation. **Nephron**, v.81, p.8-17, 1999.

MANDAL, A. **What are lipids?** News Medical and Life Sciences, 2012. Disponível em: <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-are-Lipids.aspx>, acessado em 27 de outubro de 2017.

NAYA, Y.; ITO, H.; MASAI, M; YAMAGUCHI, K. Association of dietary fatty acids with urinary oxalate excretion in calcium oxalate stone-formers in their fourth decade. **BJU International**, v. 89, p. 842-846, 2002.

NIST. **Cystine**. Standard Reference Database 69: *NIST Chemistry WebBook*. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C56893&Mask=80>, Acessado em 26 de outubro de 2017.

NORSWORTHY, A. N.; PEARSON, M. M. From Catheter to Kidney Stone: The Uropathogenic Lifestyle of *Proteus mirabilis*. 2016. **Trends in Microbiology**, v. 25, p. 304-315., 2016

PERES, L. A. B.; MOLINA, A. S.; GALLES, M. H. L. Metabolic investigation of patients with urolithiasis in a specific region. **International Brazilian Journal of Urology**, Sociedade Brasileira de Urologia, v. 29 n. 3, Rio de Janeiro, p. 217-220, 2003.

RYE, C.; WISE, R.; JURUKOVSKI, V.; DESAIX, J.; CHOI, J.; AVISSAR, Y. Biological Macromolecules. In: *Biology*. OpenStax, Rice University, Houston, 2017, p. 65-92.

ROTTEM, S.; MARKOWITZ, O.; RAZIN, S. Thermal Regulation of the Fatty Acid Composition of Lipopolysaccharides and Phospholipids of *Proteus mirabilis*. **European Journal of Biochemistry**, v. 85, p. 445-450, 1978.

SLOWAKIEWICZ, M.; PANCOST, R. D; THOMAS, L; TUCKER, M. E.; DIDI-OOI, S. M.; WHITAKER, F. Holocene Intertidal Microbial Mats of Qatar and Their Implications for Petroleum Source Rock Formation in Carbonate-Siliciclastic-Evaporite Systems. INTERNATIONAL PETROLEUM TECHNOLOGY CONFERENCE, 20-22 de janeiro de 2014, Doha, Qatar.

SMITH, Y. 2016. **What is Urolithiasis?** News Medical and Life Sciences. Disponível em: <https://www.news-medical.net/health/What-is-Urolithiasis.aspx>. Acessado em: 26 de outubro de 2017.

SOULT, A. **Lipids and Triglycerides**. Libretexts, University of Kentucky, 2016. Disponível em: <https://goo.gl/gkuB9o>, acessado em 27 de outubro de 2017.

THOMPSON, T. E. 2017. **Lipid**. Biochemistry, Encyclopedia Britannica. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/lipid>, acessado em 27 de outubro de 2017.

WEBMINERAL. **Apatite-(CaOH) Mineral Data**. Webmineral. Disponível em: [http://webmineral.com/data/Apatite-\(CaOH\).shtml#.WfiL0hNSxsM](http://webmineral.com/data/Apatite-(CaOH).shtml#.WfiL0hNSxsM) Acessado em 27 de outubro de 2017.

WEBMINERAL. **Apatite-(CaF) Mineral Data**. Webmineral. Disponível em: [http://webmineral.com/data/Apatite-\(CaF\).shtml#.WfiL9RNSxsM](http://webmineral.com/data/Apatite-(CaF).shtml#.WfiL9RNSxsM) Acessado em 27 de outubro de 2017.

WEBMINERAL. **Struvite Mineral Data**. Webmineral. Disponível em: <http://webmineral.com/data/Struvite.shtml#.WfiMJRNSxsM> Acessado em 26 de outubro de 2017.

WEBMINERAL. **Uricite Mineral Data**. Webmineral. Disponível em: <http://webmineral.com/data/Uricite.shtml#.WfiMQBNSxsM> Acessado em 26 de outubro de 2017.

WEBMINERAL. **Weddellite Mineral Data**. Webmineral. Disponível em: <http://webmineral.com/data/Weddellite.shtml#.WfiLnxNSxsM> Acessado em 27 de outubro de 2017.

WEBMINERAL. **Whewellite Mineral Data**. Webmineral. Disponível em: <http://webmineral.com/data/Whewellite.shtml#.WfiLJxNSxsM> Acessado em 27 de outubro de 2017.

Wesson, J. A.; Ward, M. D. Pathological Biomineralization of Kidney Stones. **Elements**, vol. 3, p. 415-421, 2007.

**APÊNDICE 1. DETALHES TÉCNICOS DE FAMES (FOSFOLIPÍDIOS).  
CONCENTRAÇÕES ESTÃO EM PPM.**

| Data File                           | Peak Name        | Area  | Amt   | S/N-PP | Calibration Equation       | Coeff. Det.(r2) |
|-------------------------------------|------------------|-------|-------|--------|----------------------------|-----------------|
| FAMES<br>PHOSPHOLIPIDS<br>SAMPLE 23 | Methyl butyrate  | 2786  | 22,58 | 16     | $y = +242.7344x + 45.0413$ | 0,996877        |
|                                     | Methyl hexanoate | 13118 | 103,1 | 380    | $y = +255.9791x - 72.5649$ | 0,999071        |
|                                     | Methyl palmitate | 38    | 0,811 | 10     | $y = +436.7084x - 80.3470$ | 0,999685        |
| FAMES<br>PHOSPHOLIPIDS<br>SAMPLE 26 | Methyl butyrate  | 3154  | 25,62 | 15     | $y = +242.7344x + 45.0413$ | 0,996877        |
|                                     | Methyl hexanoate | 15550 | 122,1 | 540    | $y = +255.9791x - 72.5649$ | 0,999071        |
|                                     | Methyl palmitate | 44    | 0,856 | 14     | $y = +436.7084x - 80.3470$ | 0,999685        |
| FAMES<br>PHOSPHOLIPIDS<br>SAMPLE 34 | Methyl butyrate  | 3205  | 26,04 | 14     | $y = +242.7344x + 45.0413$ | 0,996877        |
|                                     | Methyl hexanoate | 16486 | 129,4 | 379    | $y = +255.9791x - 72.5649$ | 0,999071        |
|                                     | Methyl palmitate | 33    | 0,78  | 9      | $y = +436.7084x - 80.3470$ | 0,999685        |
| FAMES<br>PHOSPHOLIPIDS<br>SAMPLE 35 | Methyl butyrate  | 2535  | 20,52 | 17     | $y = +242.7344x + 45.0413$ | 0,996877        |
|                                     | Methyl hexanoate | 11794 | 92,72 | 439    | $y = +255.9791x - 72.5649$ | 0,999071        |
| FAMES<br>PHOSPHOLIPIDS<br>SAMPLE 36 | Methyl butyrate  | 2538  | 20,54 | 16     | $y = +242.7344x + 45.0413$ | 0,996877        |
|                                     | Methyl hexanoate | 13703 | 107,6 | 518    | $y = +255.9791x - 72.5649$ | 0,999071        |
|                                     | Methyl palmitate | 125   | 1,408 | 25     | $y = +436.7084x - 80.3470$ | 0,999685        |
| FAMES<br>PHOSPHOLIPIDS<br>SAMPLE 39 | Methyl butyrate  | 2809  | 22,77 | 17     | $y = +242.7344x + 45.0413$ | 0,996877        |
|                                     | Methyl hexanoate | 13448 | 105,6 | 521    | $y = +255.9791x - 72.5649$ | 0,999071        |
|                                     | Methyl palmitate | 64    | 0,989 | 16     | $y = +436.7084x - 80.3470$ | 0,999685        |
| FAMES<br>PHOSPHOLIPIDS<br>SAMPLE 45 | Methyl butyrate  | 2710  | 21,96 | 17     | $y = +242.7344x + 45.0413$ | 0,996877        |
|                                     | Methyl hexanoate | 13831 | 108,6 | 619    | $y = +255.9791x - 72.5649$ | 0,999071        |
|                                     | Methyl palmitate | 65    | 0,996 | 12     | $y = +436.7084x - 80.3470$ | 0,999685        |

**APÊNDICE 2. DETALHES TÉCNICOS DE FAMES. CONCENTRAÇÕES ESTÃO EM PPM.**

| Data File       | Peak Name                                                | Area  | Amt   | S/N-PP                 | Calibration Equation    | Coeff. Det.(r2) |
|-----------------|----------------------------------------------------------|-------|-------|------------------------|-------------------------|-----------------|
| FAMES SAMPLE 23 | Methyl butyrate                                          | 80    | 0,288 | 2                      | y= +242.7344x +45.0413  | 0,996877        |
|                 | Methyl hexanoate                                         | 21    | 0,73  | 2                      | y= +255.9791x -72.5649  | 0,999071        |
|                 | Methyl laurate                                           | 85    | 0,199 | 25                     | y= +348.4643x +50.6701  | 0,995572        |
|                 | Methyl myristate                                         | 134   | 1,606 | 2                      | y= +99.5827x +53.6047   | 0,992224        |
|                 | Methyl myristoleate                                      | 804   | 5,163 | 197                    | y= +340.1268x -73.8402  | 0,997199        |
|                 | Methyl pentadecanoate                                    | 180   | 1,055 | 42                     | y= +155.6067x +16.2407  | 0,999862        |
|                 | Methyl palmitoleate                                      | 130   | 0,825 | 1                      | y= +77.6349x +65.7031   | 0,998944        |
|                 | Methyl palmitate                                         | 4402  | 30,79 | 923                    | y= +436.7084x -80.3470  | 0,999685        |
|                 | Methyl heptadecanoate                                    | 46    | 0,194 | 12                     | y= +93.4220x +27.9204   | 0,986762        |
|                 | Methyl $\gamma$ -linolenate / Methyl linolenate          | 50    | 0,739 | 3                      | y= +89.1340x -16.0418   | 0,973734        |
|                 | Methyl linoleate                                         | 3162  | 27,87 | 53                     | y= +111.2439x +61.8121  | 0,982596        |
|                 | trans-9-Elaidic acid methyl ester / Methyl linolelaidate | 1654  | 6,569 | 15                     | y= +251.3845x +2.6749   | 0,98804         |
|                 | cis-9-Oleic acid methyl ester                            | 241   | 1,411 | 3                      | y= +231.1382x +78.0174  | 0,985302        |
|                 | Methyl stearate                                          | 1341  | 6,97  | 277                    | y= +226.2999x +551.9019 | 0,99042         |
|                 | cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid methyl ester         | 165   | 2,219 | 6                      | y= +51.7084x +50.3839   | 0,997007        |
|                 | Methyl cis-11-eicosenoate                                | 262   | 5,115 | 4                      | y= +127.4858x -64.5385  | 0,976404        |
|                 | Methyl erucate                                           | 2377  | 29,41 | 32                     | y= +79.0995x +50.7179   | 0,993795        |
| Methyl behenate | 66                                                       | 0,719 | 23    | y= +221.0939x -13.6577 | 0,9875                  |                 |
| FAMES SAMPLE 26 | Methyl hexanoate                                         | 69    | 1,105 | 2                      | y= +255.9791x -72.5649  | 0,999071        |
|                 | Methyl myristoleate                                      | 76    | 0,883 | 20                     | y= +340.1268x -73.8402  | 0,997199        |
|                 | Methyl palmitate                                         | 1370  | 9,96  | 267                    | y= +436.7084x -80.3470  | 0,999685        |
|                 | Methyl linoleate                                         | 631   | 5,118 | 17                     | y= +111.2439x +61.8121  | 0,982596        |
|                 | trans-9-Elaidic acid methyl ester                        | 506   | 2,004 | 9                      | y= +251.3845x +2.6749   | 0,98804         |
|                 | #19                                                      | 46    | N/A   | 2                      | y= +231.1382x +78.0174  | 0,985302        |
|                 | Methyl stearate                                          | 865   | 2,767 | 184                    | y= +226.2999x +551.9019 | 0,99042         |
|                 | #21                                                      | 33    | N/A   | 3                      | y= +51.7084x +50.3839   | 0,997007        |
|                 | Methyl cis-11-eicosenoate                                | 300   | 5,724 | 10                     | y= +127.4858x -64.5385  | 0,976404        |
| Methyl erucate  | 584                                                      | 6,744 | 13    | y= +79.0995x +50.7179  | 0,993795                |                 |

| Data File       | Peak Name                                                | Area | Amt   | S/N-PP | Calibration Equation    | Coeff. Det.(r2) |
|-----------------|----------------------------------------------------------|------|-------|--------|-------------------------|-----------------|
| FAMES SAMPLE 34 | Methyl myristate                                         | 56   | 0,043 | 1      | y= +99.5827x +53.6047   | 0,992224        |
|                 | Methyl myristoleate                                      | 172  | 1,444 | 43     | y= +340.1268x -73.8402  | 0,997199        |
|                 | Methyl pentadecanoate                                    | 27   | 0,072 | 17     | y= +155.6067x +16.2407  | 0,999862        |
|                 | Methyl palmitoleate                                      | 117  | 0,667 | 4      | y= +77.6349x +65.7031   | 0,998944        |
|                 | Methyl palmitate                                         | 4402 | 30,79 | 836    | y= +436.7084x -80.3470  | 0,999685        |
|                 | Methyl heptadecanoate                                    | 31   | 0,032 | 15     | y= +93.4220x +27.9204   | 0,986762        |
|                 | Methyl linoleate                                         | 1823 | 15,83 | 78     | y= +111.2439x +61.8121  | 0,982596        |
|                 | Methyl linolelaidate                                     | 2031 | 8,068 | 36     | y= +251.3845x +2.6749   | 0,98804         |
|                 | cis-9-Oleic acid methyl ester                            | 214  | 1,174 | 3      | y= +231.1382x +78.0174  | 0,985302        |
|                 | Methyl stearate                                          | 2126 | 13,91 | 429    | y= +226.2999x +551.9019 | 0,99042         |
|                 | Methyl cis-11-eicosenoate                                | 443  | 7,967 | 8      | y= +127.4858x -64.5385  | 0,976404        |
|                 | Methyl erucate                                           | 420  | 4,662 | 13     | y= +79.0995x +50.7179   | 0,993795        |
| FAMES SAMPLE 35 | Methyl myristoleate                                      | 298  | 2,186 | 85     | y= +340.1268x -73.8402  | 0,997199        |
|                 | Methyl pentadecanoate                                    | 55   | 0,25  | 16     | y= +155.6067x +16.2407  | 0,999862        |
|                 | Methyl palmitoleate                                      | 156  | 1,161 | 4      | y= +77.6349x +65.7031   | 0,998944        |
|                 | Methyl palmitate                                         | 5113 | 35,68 | 1066   | y= +436.7084x -80.3470  | 0,999685        |
|                 | cis-10-Heptadecanoic acid methyl ester                   | 3213 | 38,42 | 45     | y= +81.3109x +89.3253   | 0,997545        |
|                 | Methyl heptadecanoate                                    | 69   | 0,441 | 20     | y= +93.4220x +27.9204   | 0,986762        |
|                 | #16                                                      | 0    | ---   | ---    | y= +89.1340x -16.0418   | 0,973734        |
|                 | Methyl linoleate                                         | 3253 | 28,69 | 84     | y= +111.2439x +61.8121  | 0,982596        |
|                 | trans-9-Elaidic acid methyl ester / Methyl linolelaidate | 1487 | 5,903 | 23     | y= +251.3845x +2.6749   | 0,98804         |
|                 | cis-9-Oleic acid methyl ester                            | 87   | 0,076 | 2      | y= +231.1382x +78.0174  | 0,985302        |
|                 | Methyl stearate                                          | 3331 | 24,56 | 684    | y= +226.2999x +551.9019 | 0,99042         |
|                 | cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid methyl ester         | 87   | 0,708 | 6      | y= +51.7084x +50.3839   | 0,997007        |
|                 | Methyl cis-11-eicosenoate                                | 830  | 14,03 | 16     | y= +127.4858x -64.5385  | 0,976404        |
|                 | Methyl arachidate                                        | 12   | 0,156 | 11     | y= +255.5803x -7.6632   | 0,978257        |
|                 | Methyl erucate                                           | 1211 | 14,67 | 18     | y= +79.0995x +50.7179   | 0,993795        |

| Data File       | Peak Name                                                | Area  | Amt   | S/N-PP                | Calibration Equation    | Coeff. Det.(r2) |
|-----------------|----------------------------------------------------------|-------|-------|-----------------------|-------------------------|-----------------|
| FAMES SAMPLE 36 | Methyl myristoleate                                      | 229   | 1,779 | 57                    | y= +340.1268x -73.8402  | 0,997199        |
|                 | Methyl pentadecanoate                                    | 36    | 0,125 | 10                    | y= +155.6067x +16.2407  | 0,999862        |
|                 | Methyl palmitoleate                                      | 214   | 1,91  | 4                     | y= +77.6349x +65.7031   | 0,998944        |
|                 | Methyl palmitate                                         | 3501  | 24,6  | 752                   | y= +436.7084x -80.3470  | 0,999685        |
|                 | Methyl linoleate                                         | 636   | 5,164 | 12                    | y= +111.2439x +61.8121  | 0,982596        |
|                 | trans-9-Elaidic acid methyl ester / Methyl linolelaidate | 1835  | 7,288 | 33                    | y= +251.3845x +2.6749   | 0,98804         |
|                 | cis-9-Oleic acid methyl ester                            | 103   | 0,215 | 2                     | y= +231.1382x +78.0174  | 0,985302        |
|                 | Methyl stearate                                          | 1497  | 8,348 | 319                   | y= +226.2999x +551.9019 | 0,99042         |
|                 | Methyl cis -11-eicosenoate                               | 526   | 9,267 | 10                    | y= +127.4858x -64.5385  | 0,976404        |
| Methyl erucate  | 557                                                      | 6,396 | 10    | y= +79.0995x +50.7179 | 0,993795                |                 |
| FAMES SAMPLE 39 | Methyl myristoleate                                      | 101   | 1,029 | 27                    | y= +340.1268x -73.8402  | 0,997199        |
|                 | Methyl palmitate                                         | 2363  | 16,79 | 500                   | y= +436.7084x -80.3470  | 0,999685        |
|                 | Methyl linoleate                                         | 2225  | 19,45 | 47                    | y= +111.2439x +61.8121  | 0,982596        |
|                 | trans-9-Elaidic acid methyl ester / Methyl linolelaidate | 1008  | 3,998 | 16                    | y= +251.3845x +2.6749   | 0,98804         |
|                 | cis-9-Oleic acid methyl ester                            | 164   | 0,744 | 3                     | y= +231.1382x +78.0174  | 0,985302        |
|                 | Methyl stearate                                          | 1091  | 4,766 | 243                   | y= +226.2999x +551.9019 | 0,99042         |
|                 | #21                                                      | 110   | 1,161 | 4                     | y= +51.7084x +50.3839   | 0,997007        |
|                 | Methyl cis -11-eicosenoate                               | 328   | 6,155 | 6                     | y= +127.4858x -64.5385  | 0,976404        |
|                 | #30                                                      | 507   | 5,773 | 9                     | y= +79.0995x +50.7179   | 0,993795        |

| Data File       | Peak Name                                                                                    | Area  | Amt   | S/N-PP | Calibration Equation    | Coeff. Det.(r2) |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|--------|-------------------------|-----------------|
| FAMES SAMPLE 45 | #06                                                                                          | 76    | 0,144 | 22     | y= +348.4643x +50.6701  | 0,995572        |
|                 | Methyl myristoleate                                                                          | 926   | 5,882 | 218    | y= +340.1268x -73.8402  | 0,997199        |
|                 | #11                                                                                          | 310   | 1,888 | 84     | y= +155.6067x +16.2407  | 0,999862        |
|                 | #12                                                                                          | 632   | 7,297 | 13     | y= +77.6349x +65.7031   | 0,998944        |
|                 | Methyl palmitate                                                                             | 11957 | 82,69 | 2481   | y= +436.7084x -80.3470  | 0,999685        |
|                 | #15                                                                                          | 293   | 2,835 | 85     | y= +93.4220x +27.9204   | 0,986762        |
|                 | #16                                                                                          | 221   | 2,655 | 11     | y= +89.1340x -16.0418   | 0,973734        |
|                 | #17                                                                                          | 17425 | 156,1 | 248    | y= +111.2439x +61.8121  | 0,982596        |
|                 | trans-9-Elaidic acid methyl ester / Methyl linolelaidate                                     | 9023  | 35,88 | 165    | y= +251.3845x +2.6749   | 0,98804         |
|                 | cis-9-Oleic acid methyl ester                                                                | 758   | 5,886 | 11     | y= +231.1382x +78.0174  | 0,985302        |
|                 | Methyl stearate                                                                              | 3638  | 27,27 | 765    | y= +226.2999x +551.9019 | 0,99042         |
|                 | cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid methyl ester                                             | 1988  | 37,48 | 46     | y= +51.7084x +50.3839   | 0,997007        |
|                 | cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester / cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester | 195   | 1,779 | 5      | y= +66.6238x +76.5935   | 0,995499        |
|                 | cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester                                                    | 102   | 0,35  | 2      | y= +81.3973x +73.9936   | 0,998387        |
|                 | Methyl cis-11-eicosenoate                                                                    | 509   | 9,005 | 11     | y= +127.4858x -64.5385  | 0,976404        |
|                 | Methyl erucate                                                                               | 780   | 9,222 | 13     | y= +79.0995x +50.7179   | 0,993795        |