UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

GUILHERME LOPES BATISTA

ANÁLISE DE ACETONA EM AR EXALADO: METODOLOGIA PARA ESTUDO EM PACIENTES HOSPITALIZADOS

São Paulo

Data do Depósito na CPG: 06/10/2010

GUILHERME LOPES BATISTA

ANÁLISE DE ACETONA EM AR EXALADO: METODOLOGIA PARA ESTUDO EM PACIENTES HOSPITALIZADOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Ivano Gebhardt Rolf Gutz

SÃO PAULO 2010

Nome do(a) Pós-Graduando(a) Título da Dissertação de Mestrado/Tes	se de Doutora	do.			
	Dissertação	apresentada	ao	Instituto	de
		Universidade (Título de M		•	

Aprovado er	m:		
Banca Exar	minadora		
Prof. Dr.			
Prof. Dr.		 	
Prof. Dr.			
Assinatura:			

(Química Analítica)

Aos meus pais, André e Maria Luiza, que tornaram isso possível.
Os meus verdadeiros ídolos, em quem me inspiro para fazer meu melhor.

Ao meu orientador, Ivano Gebhardt Rolf Gutz, com profundo respeito e admiração

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, André e Maria Luiza, pelo grande apoio, presença, exemplo e inspiração até este momento de minha vida. Se cheguei até aqui, eles são os maiores responsáveis por isso.

Às minhas irmãs, Larissa e Priscila, cujo apoio e presença também foram indispensáveis para minha dedicação a este trabalho.

Aos meu orientador Ivano G. R. Gutz, pela orientação, e por compartilhar seu enorme conhecimento, criatividade e bom-humor. Agradeço também seu trabalho pela Olimpíada Paulista de Química, grande responsável pelo meu interesse pela Química e pela minha carreira como Químico.

À Lúcia H. G. Coelho, pela enorme ajuda no período deste trabalho, pela amizade e pelo otimismo, que também me deu forças neste trabalho. Considero-a uma verdadeira irmã.

À Fabiana G. M. Braga e Fernando Bacal, pela oportunidade de trabalho interdisciplinar. Pude aprender muito com essa experiência

Ao Fernando Silva Lopes, pela grande ajuda durante a realização o mestrado.

Ao Carlos A. Neves, pela ajuda na decodificação dos cromatogramas e colaboração no trabalho.

Aos funcionários da Central Analítica, em especial Márcio, Alessandra e Cristiane, pelo convívio e colaboração no trabalho.

Aos professores Claudimir e Lúcio, e aos colegas de laboratório GPQAI com quem convivi. Este convívio, a troca de idéias e opiniões, de certa forma, fazem com que eu seja quem sou hoje.

Aos meus grandes amigos e familiares que, mesmo não tendo colaboração direta com o trabalho ou mesmo que tenham se distanciado pelos caminhos da vida, sempre torceram por mim e deram apoio. Levarei sempre este sentimento junto comigo.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo apoio financeiro.

E a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com este trabalho, como funcionários do Instituto de Química, professores, entre outros que, certamente, tornaram esse trabalho possível.

RESUMO

BATISTA, G.L., Análise de acetona em ar exalado: metodologia para estudo em pacientes hospitalizados 2010, 71 páginas. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo.

A dissertação se situa no campo de pesquisa de métodos não invasivos de análise clínica, mais especificamente, de prognóstico da gravidade de insuficiência cardíaca, IC, com base em bioindicador presente no ar exalado por pacientes, em estudo no Incor–HCFMUSP. O bioindicador mais relevante encontrado por GC-MS foi a acetona (propanona). Para a coleta do ar exalado desenvolveu-se dispositivo que compreende frasco borbulhador (impinger) com difusor, contendo 5 mL de água, imerso em banho de gelo e acoplado a saco plástico para definição de volume amostrado (7,6 L). A preservação de amostras deu-se por congelamento a -80°C. Para a determinação do analito, escolheu-se método espectrofotométrico (474 nm) baseado na reação da acetona com salicilaldeído em meio básico, apresentando limite de detecção de 0,3 mg/L em fase líquida e 0,3 μg/L em ar exalado. Foram realizados estudos de eficiência de coleta por geração de atmosfera controlada. Resultados iniciais obtidos com amostras coletadas de pacientes portadores de IC pelos colaboradores do Incor indicam a potencialidade do bioindicador e dos equipamentos e métodos desenvolvidos para acetona nesta dissertação.

Palavras-chaves: Análise de ar exalado, Acetona, Amostragem de gases, espectrofotometria, método não-invasivo

ABSTRACT

BATISTA, G.L., Breath Acetone Analysis: Methodology for studying hospitalized pacients, 2010, 71 pages. Masters Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo.

The dissertation fits in the research field of noninvasive clinical analysis, more specifically, the prognosis of the severity of heart failure, HF, based on a biomarker found in the air exhaled by patients, in a study at InCor-HCFMUSP. The most relevant biomarker found by GC-MS was acetone (propanone). For the breath collection a device was developed which comprises a scrubber flask (impinger) with diffuser, containing 5 mL of water, immersed in an ice bath and attached to a plastic bag for delimitation of the sample volume (7,6 L). For the determination of acetone a spectrometric method (474 nm) was chosen based on a reaction of acetone with salicylaldehyde in alkaline medium, with detection limits of 0,3 mg/L in liquid phase and 0,3 µg/L in breath. Preliminary studies made with samples collected from HF patients by the co-workers from InCor indicate the potential of the identified biomarker and the suitability of the equipment and methods developed in this dissertation for its analysis.

Keywords: Breath Analysis, Acetone, Gas Sampling, Spectrophotometry, Non-Invasive analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação dos fenômenos de trocas gasosas ocorridos durante o processo de respiração
Figura 2: Sistema de amostragem desenvolvido
Figura 3: Representação esquemática do sistema de DGAC e de amostragem 38
Figura 4: Foto do DGAC, seguido de amostragem39
Figura 5: Figura 5: Imagem típica da interface do software CLASS-GC500041
Figura 6: Representação da reação entre salicilaldeído e acetona em meio básico 42
Figura 7: Avaliação da temperatura interna dos dispositivos de coleta durante a amostragem em diferentes condições de resfriamento
Figura 8: Curvas de calibração analíticas de padrões de acetona realizadas em GC-MS49
Figura 9: Cromatogramas (corrente iônica do íon m/z 43) para uma mesma amostra analisada em ocasiões diferentes
Figura 10a: Análise espectrofotométrica de padrões de acetona após reação com salicilaldeído em meio básico
Figura 10b: Parâmetros de regressão linear (coeficiente angular, coeficiente linear/50 e coeficiente de correlação de Pearson/20) dos padrões de acetona após reação com salicilaldeído em meio básico, utilizando espectrofotometria em diferentes comprimentos de onda
Figura 11: Estudo cinético da reação entre salicilaldeído e acetona a 25 °C
Figura 12: Curva de calibração analítica para método espetrofotométrico (474nm), após 10 horas de reação com salicilaldeído (descontando-se a absorbância do branco 52
Figura 13: Absorbância (a 474nm) de padrões de acetona em concentrações conhecidas, avaliados em diferentes tempos de reação a 25°C
Figura 14: Correlação entre coeficientes das curvas mostradas na figura 10a e as concentrações nominais dos padrões de acetona
Figura 15: Estudo de eficiência de coleta, utilizando dois impingers em série 55
Figura 16: Rendimento de coleta em função do volume de gás com analito amostrada pelo impinger, mantendo-se geração de analito constante
Figura 17: Avaliação da conservação da amostra
Figura 18: Distribuição da quantidade de acetona exalada por voluntários e por pacientes de IC descompensada (ordenadas em faixas com incrementos exponenciais).

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMDS Amostradores Difusionais Anulares

CRDS Cavity Ringdown Spectroscopy

DGAC Dispositivo Gerador de Atmosfera Padrão

EBC Condensado de Ar Exalado

EPA Environmental Protection Agency
FDA U.S. Food and Drug Administration

FID Detector por Ionização em Chama

FT-IR Espectroscopia no Infravermelho

GC Cromatografia a gás

GC-FID Cromatografia a gás acoplada a Detector por Ionização em Chama

GC-MS Cromatografia a gás acoplada a Espectrometria de Massas

HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IC Insuficiência Cardíaca

InCor Instituto do Coração

LCW Cela de Longo Caminho Óptico

LED Diodo de Emissão de Luz

LPME Micro Extração em Fase Líquida

m/z Relação Massa/Carga

MIR Infravermelho Médio

MS Espectrometria de Massa

NIR Infravermelho Próximo

PFBHA (Pentafluorobenzil)hidroxilamina

ppbv Partes Por Bilhão (v/v)
ppmv Partes Por Milhão (v/v)

PTR-MS Proton Transfer Reaction - Mass Spectrometry

RT Tempo de Retenção

SIFT-MS Single Ion Flow Tube - Mass Spectrometry

SIM Single Ion Monitoring

SPME Micro Extração em Fase Sólida

VOCs Compostos Orgânicos Voláteis

VSCs Compostos Voláteis de Enxofre

SUMÁRIO

1. Introdução	. 12
1.1. Aspectos gerais sobre ar exalado	.13
1.2. A coleta do ar exalado	. 15
1.3. A análise química do ar exalado	. 19
1.4. Aplicações da análise de ar exalado	. 23
1.4.1. Aplicações aceitas	. 23
1.4.2. Aplicações em estudo	. 25
1.5. Determinação de acetona em ar exalado	. 27
1.6. Insuficiência Cardíaca (IC)	30
2. Objetivos	. 32
2.1. Objetivo geral	.33
2.2. Objetivos específicos	. 33
3. Metodologia	. 34
3.1. Método para coleta	. 35
3.1.1. Proposta inicial	35
3.1.2. Sistema otimizado	. 35
3.2. Dispositivo Gerador de Atmosfera Controlada (DGAC)	37
3.3. Determinação	. 38
3.3.1. Determinação por GC-MS	. 38
3.3.2. Determinação espectrofotométrica	.42
4. Resultados e Discussão	. 44
4.1. Métodos de coleta	45
4.2. Dispositivo Gerador de Atmosfera Controlada (DGAC)	47
4.3. Métodos de determinação	. 48
4.3.1. Determinação por GC-MS	. 48
4.3.2. Determinação espectrofotométrica	. 50
4.4. Avaliação da eficiência de coleta	. 54
4.5. Avaliação da conservação da amostra	. 59
4.6. Aplicações da metodologia completa a amostras reais	. 59
5. Conclusões e Perspectivas	62
6. Bibliografia	. 66
7 Anexo	71

I

INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais sobre ar exalado

A busca de técnicas e métodos não invasivos de análise clínica, seja para novos tipos de diagnóstico, seja para substituir métodos invasivos existentes, constitui campo de pesquisa de grande atualidade. Entre as principais vias de acesso não invasivo a biomarcadores, encontra-se a análise de ar exalado no processo de respiração aeróbica. Observação, feita por médico do InCor–HCFMUSP, de um odor característico no ar exalado por pacientes com insuficiência cardíaca (IC), desencadeou pesquisas em colaboração com o IQ-USP, que contribuiu nos aspectos relativos à identificação do(s) biomarcador(es) em questão e na concepção e desenvolvimento de técnicas e métodos de análise do(s) mesmo(s). A presente dissertação apresenta os progressos conseguidos no IQ-USP, essenciais à viabilização das pesquisas concomitantes, em curso no Incor no contexto de tese de uma doutoramento, voltadas, principalmente, à avaliação da aplicabilidade dos métodos de análise e da possibilidade de sua utilização para diagnóstico de IC, em diferentes graus.

O estudo da composição química do ar exalado no processo respiratório há tempos desperta interesse na comunidade científica. Hipócrates (conhecido como pai da Medicina), ainda na Grécia Antiga, interpretava alguns odores no ar exalado por pacientes como evidências de quadros clínicos diversos, como diabetes, abscesso no pulmão e problemas hepáticos e renais. Já na história moderna, em 1784, Laplace e Lavoisier detectaram o consumo de oxigênio e a eliminação de gás carbônico na respiração, sugerindo a ocorrência de processos oxidativos no corpo humano¹.

O início do entendimento da microcomposição do ar exalado se fez possível apenas no final do século XIX. Em 1874, Francis E. Anstie realizou ensaios colorimétricos utilizando reação com solução de dicromato para determinação de etanol no ar exalado

após sua ingestão¹ e, ainda no século XIX, A. Nebelthau analisou acetona no ar exalado por pacientes em grau avançado de diabetes². No entanto, o primeiro estudo exploratório só veio a ser realizado por Pauling L. et al. em 1971, detectando mais de duzentos compostos em uma única amostra³, revelando a grande complexidade desta matriz.

Em linhas gerais, o ar exalado pode ser entendido como ar atmosférico processado durante a respiração: parte do ar inalado é exalada sem sofrer alterações, enquanto outra parte pode ser consumida (podendo ser incorporada pelo organismo ou liberada por outra via de excreção) ou mesmo incrementada com substâncias produzidas pelo organismo (a partir de outras rotas metabólicas), cujo balanço de massa é ilustrado na Figura 1⁴. O processo de trocas gasosas ocorre essencialmente nos alvéolos pulmonares, onde o ar inalado entra em contato com grande área superficial de capilares sangüíneos.

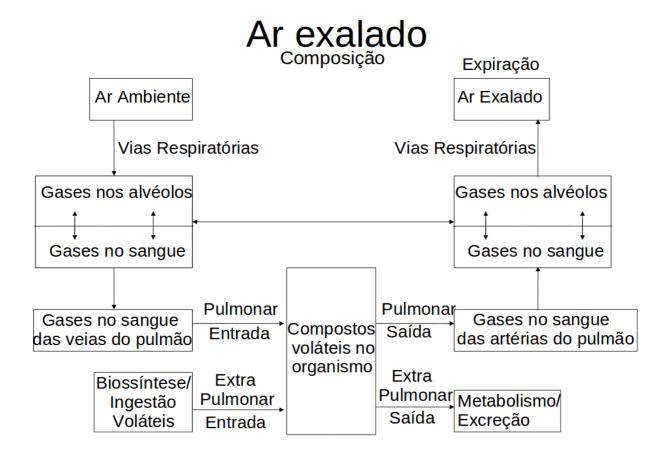


Figura 1: Representação dos fenômenos de trocas gasosas ocorridos durante o processo de respiração (Phillips M. *et al.*, 1999).

Do exposto acima, seguem-se as principais diferenças entre o ar exalado e o ar atmosférico: o processo de respiração, por princípio, retira parte do oxigênio do ar nos pulmões, liberando gás carbônico, e o contato entre o ar e os alvéolos favorece sua umidificação, tornando este saturado em vapor d'água. Além destas espécies, diversos compostos inorgânicos e orgânicos voláteis (*Volatile Organic Compounds*, VOCs) encontram-se no ar exalado em concentrações traço, podendo ser associados como biomarcadores de processos fisiológicos diversos⁴⁻⁷. A caracterização e quantificação destes compostos está se tornando cada dia mais viável pelo recente desenvolvimento de técnicas analíticas, que abrangem processos mais eficientes de coleta, preservação e separação de compostos de interesse, além de sua determinação com alta seletividade e sensibilidade^{5,8}.

1.2. A coleta do ar exalado

A etapa de coleta pode ser realizada diretamente em *canisters* ou sacos poliméricos como os de Tedlar[®] (polivinilfluoreto, material relativamente inerte e de baixa permeação a gases). No entanto ainda existe a possibilidade de perda de analitos, pela solubilização destes na água condensada durante a amostragem (devido ao alto teor de umidade da amostra)⁹, ou mesmo por adsorção no recipiente de amostragem ou permeação pelas paredes poliméricas. Além disso, a concentração de grande parte dos compostos não é detectável diretamente pela maioria das técnicas analíticas disponíveis atualmente, tornando-se necessária a implementação de etapas de pré-concentração, Para tanto, utilizam-se comumente a condensação por resfriamento, a extração gás-líquido e a extração gás-sólido, em suas diversas variações^{6,10}.

A pré-concentração por condensação é realizada passando-se o gás estudado em fluxo por um recipiente resfriado (tipicamente, um *impinger* inicialmente vazio, resfriado em banho de gelo e água ou gelo seco e acetona). Desta forma, os compostos menos voláteis se liquefazem e condensam com o vapor d'água, podendo haver retenção também dos aerossóis presentes (formados com gotículas de saliva ou do líquido lubrificante do sistema respiratório). Essa técnica, aplicada ao ar exalado (comumente referida na literatura pela sigla EBC, *exhaled breath condensate*), também retém compostos voláteis solúveis (ou que se acomodem bem na estrutura do gelo, no caso da amostragem criogênica)¹¹.

Ainda utilizando um *impinger*, uma alternativa à condensação é o borbulhamento do gás em uma solução aceptora. Por meio do contato da amostra com a fase líquida ocorre a solubilização dos analitos (extração gás-líquido) ou mesmo a reação entre as duas fases¹². O aumento da área e do tempo de contato entre gás e líquido, através de uma melhor dispersão (formação de micro-bolhas) favorece a retenção. Como desvantagem do método, o borbulhamento típico da amostragem por *impinger* pode induzir a formação de artefatos (compostos gerados durante a amostragem, não presentes na amostra) em solução¹³.

A solubilidade de gases em solventes pode ser analisada de acordo com o modelo da Lei de Henry, que relaciona a sua concentração em fase líquida com sua pressão parcial em fase gasosa. A razão entre estas duas grandezas, característica para cada gás, é denominada constante de Henry (1).

$$K_H = c_a/p_q \tag{1}$$

na qual K_H a constante de Henry do sistema, c_a a concentração da espécie em fase líquida e p_g a pressão parcial da espécie em fase gasosa.

Esta relação ainda pode ser expressa pela relação das concentrações entre a fase líquida e a fase gasosa (2)¹⁴.

$$K_H \cdot R \cdot T = c_a/c_q \tag{2}$$

na qual R representa a constante universal dos gases perfeitos, T a temperatura do sistema e c_g a concentração da espécie em fase gasosa.

As equações acima podem ser entendidas como a lei da ação das massas para a solubilização de uma espécie gasosa, conforme equação química genérica que se segue (3):

$$G_{(g)} \rightleftharpoons G_{(d)}$$
 (3)

Sendo G_(g) a substância no estado gasoso e G_(d) a substância dissolvida em dado líquido.

Este equilíbrio é influenciado pela temperatura, e esta dependência pode ser calculada através da equação de van't Hoff (4)¹⁵,

$$K_H = K_H^{\Theta} \cdot e^{\left(\frac{-\Delta H_d}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^{\Theta}}\right)\right)} \tag{4}$$

na qual K°_{H} representa a constante de Henry padrão em dada temperatura, ΔH_{d} a entalpia do processo solubilização, e T° a temperatura de referência relativa a K°_{H} . Desta forma, o equilíbrio de partição entre o gás e o líquido pode ser deslocado alterando-se as condições do sistema.

Para substâncias menos voláteis, este tipo de coleta gera uma mistura de líquidos (da solução aceptora e do analito), cuja pressão parcial de cada componente pode ser descrita (quando para substâncias ideais) pela lei de Raoult, ilustrada na equação abaixo (5):

$$p_A = x_A \cdot p_A^* \tag{5}$$

na qual p_A representa a pressão parcial de um componente, x_A a fração molar deste componente na mistura e p^*_A a pressão de vapor da substância pura.

Nota-se que a pressão de vapor de um líquido, quando diluído em outro, diminui consideravelmente frente ao líquido puro ou em mistura no qual se encontra mais concentrado.

Ainda como métodos de extração gás-líquido, vale citar algumas modalidades de micro extração (*Liquid Phase Micro Extraction*, LPME), que utilizam volumes reduzidos de solução em dispositivos menores de coleta. Em amostradores difusionais anulares (*Annular-type Membrane-based Diffusion Scrubbers*, AMDS), a amostra gasosa flui por um tubo externo concêntrico a outro tubo interno cuja parede é permeável ao analito de interesse, e, no tubo interno flui a solução aceptora que será analisada posteriormente. Pode-se também realizar o processo diretamente em uma gota ou em um fino filme de solução aceptora, que possuem relação entre área superficial e volume de solução para extração bastante favorável¹⁶.

A extração gás-sólido, utilizada para amostragem de ar atmosférico, também tem sido aplicada à análise de ar exalado^{4,9}. Dispositivos comerciais (cartuchos) baseados na adsorção seletiva de diversos materiais são amplamente utilizados para estudos em ar atmosférico. Existem modelos de composições diversas, de acordo com o tipo ou classe de compostos pela qual se tem interesse, podendo ser utilizadas misturas de materiais adsorventes para uma coleta mais abrangente. Porém pode ocorrer saturação da superfície adsortiva durante a coleta e alguns materiais podem apresentar efeito de memória (liberação incompleta de analitos na dessorção térmica ou na regeneração do cartucho)¹⁷, além de requererem unidade especial de dessorção térmica, geralmente acoplada a aparelhos de cromatografia a gás. Outro método frequentemente utilizado é a eluição do cartucho com solvente seguido por separação e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC).

Outra forma de pré-concentração é por micro-extração em fase sólida (*Solid Phase Micro Extraction*, SPME), na qual fibras de sílica fundida recoberta por fases estacionárias poliméricas são adaptadas a seringas especiais, de modo a expô-las apenas no momento da coleta e da dessorção (tipicamente realizada dentro do injetor de um cromatógrafo a gás)¹⁸. Esse recobrimento polimérico pode ser ainda modificado quimicamente para conferir seletividade ou melhorar adsorção de um analito ou uma classe de compostos¹⁹.

Quanto à coleta, ainda deve-se considerar a não-homogeneidade do ar exalado: a primeira fração (cerca de 150 mL) consiste em ar de "volume morto", que se distribui pelas vias aéreas (não sofrendo as trocas nos alvéolos), enquanto a fração posterior (cerca de 350 mL), que esteve em maior contato com os alvéolos nos pulmões, é mais representativa da composição dos compostos voláteis no sangue^{5,6,9}. Há, ao menos, duas alternativas, descritas na literatura, para descarte da primeira fração: o uso conjunto de duas bolsas de coleta (uma delas mais facilmente inflável)²⁰ ou equipamento com válvulas e um sensor da pressão parcial de gás carbônico, que direciona a fração rica nesse gás (oriundo das trocas gasosas dos alvéolos) para o recipiente de coleta²¹. Entretanto, a maioria dos estudos ainda recorre à coleta da mistura total, por ser mais simples e aplicável em campo⁵.

1.3. A análise química do ar exalado

Para a análise dessas amostras, a técnica mais utilizada atualmente é a cromatografia a gás (*Gas Chromatography*, GC)⁵⁻¹⁰. Nessa modalidade cromatográfica, a amostra (gás ou líquido volatilizável) é inserida em um injetor aquecido (a temperaturas tipicamente até 250°C) e dali é arrastada por um gás inerte através de uma coluna capilar revestida (comumente referida como fase estacionária) instalada num forno de

temperatura programável. Considerando-se diferenças estruturais e características físicoquímicas de cada um dos componentes da amostra injetada, estes sofrerão uma interação peculiar com a fase estacionária (partição, adsorção), resultando em um tempo de retenção, (*retention time*, RT) diferente para cada um deles²². A escolha da fase estacionária se faz de acordo com a classe de compostos a serem separados.

Ao final da coluna é acoplado um detector para que cada fração separada seja observada e, eventualmente, identificada. Para tanto, são comumente utilizados detectores por ionização em chama (*Flame Ionization Detector*, FID) e/ou espectrômetro de massa (*Mass Spectrometry*, MS). Em FID, uma chama de hidrogênio é formada ao final da coluna, e os compostos orgânicos que eluem desta são oxidados nesta chama, formando fragmentos iônicos (além de CO₂ e H₂O). Acima da chama é instalado um tubo metálico polarizado negativamente em relação ao queimador, medindo-se a corrente resultante, que varia com a formação destes íons proporcionalmente às suas quantidades. Apesar de apresentar grande sensibilidade, este detector não fornece informações estruturais dos compostos observados, simplesmente associados a seu RT, impossibilitando também a análise de espécies que co-eluam durante a separação cromatográfica.

Na análise por espectrometria de massas a amostra sofre um processo de fragmentação em íons, e os mesmos transitam no detector de acordo com sua relação massa/carga (m/z) característica. A fragmentação de cada composto forma íons moleculares característicos, e a partir da detecção destes a estrutura do composto analisado pode ser determinada. Por outro lado, além de um custo mais elevado, este detector possui sensibilidade inferior ao FID.

Apesar das vantagens da GC enumeradas acima, esta técnica requer equipamento dedicado e cilindros de gás, além de demandar tempos relativamente longos

de preparação e necessitar de técnico treinado para sua operação. Trabalhos recentes têm apresentado novas propostas de equipamentos menores e mais simples, com maior seletividade e sensibilidade¹⁶.

Ainda para a detecção simultânea multicomponente vem sendo propostos equipamentos de espectrometria de massa com injeção direta da amostra, utilizando ionização química (em particular utilizando precursores catiônicos para o estudo de VOCs) e câmaras de íons que dispensam alto vácuo²³⁻²⁵. Dentre elas, a *Single Ion Flow Tube Mass Spectrometry* (SIFT-MS) tem sido bastante utilizada em ar exalado^{23,24}. Nesta, a amostra injetada sofre reação (ionização química) com um precursor iônico, gerado e selecionado previamente por um quadrupolo, em uma câmara com fluxo de gás inerte (que também promove a termostatização do precursor gerado). Este gás arrasta os produtos da reação para um segundo quadrupolo, onde ocorre o processo de detecção. Através desta técnica, que permite o uso de diferentes precursores químicos (H₃O⁺, NO⁺ or O₂⁺) , é possível analisar a concentração de diversos compostos polares na ordem de partes por bilhão, em volume (ppbv).

Valendo-se da mesma ideia foi proposta a *Proton Transfer Reaction – Mass Spectrometry* (PTR-MS), que se diferencia da SIFT-MS pela utilização de íons H₃O⁺ gerados por uma fonte de descarga de cátodo oco como precursores químicos (não necessitando de separação prévia), e a câmara com fluxo de gás inerte é substituída por um *drift tube*, no qual a termostatização do sistema é feita pelos próprios componentes do ar atmosférico, em uma câmara menor. Além de se apresentar vantajosa pelo menor tamanho e maior simplicidade instrumental, a PTR-MS ainda é cerca de uma a duas ordens de grandeza mais sensível que a SIFT-MS por não haver diluição por fluxo de gás dentro da câmara^{25, 26}.

Os métodos de análise direta por espectrometria de massa apresentados acima são mais sensíveis do que a espectrometria de massa com separação por quadrupolo (normalmente acoplada com cromatografia gasosa), porém estes não geram fragmentos dos compostos analisados (apenas os íons moleculares, além de alguns clusters com os precursores), não permitindo a identificação de compostos presentes (diferentemente da MS acoplada a GC descrita anteriormente), além de se mostrarem favoráveis apenas para análise de compostos polares de menor massa molecular¹⁰.

O recente desenvolvimento de sensores óticos também têm possibilitado análises diretas de VOCs, presentes em concentrações traço, em amostras de ar exalado. Técnicas espectroscópicas, seja no infra-vermelho próximo (NIR) ou no infra-vermelho médio (MIR) vem permitindo a análise e quantificação multicomponente e em tempo real destas amostras²⁷.

Para aplicações toxicológicas, clínicas e bioquímicas, o interesse da análise de ar exalado pode ser apenas pela detecção e quantificação de um único composto já conhecido. Nesse caso, o uso de técnicas específicas, mesmo que não sejam abrangentes, pode ser uma boa opção. Para tanto encontram-se propostos detectores voltamétricos²⁸, amperométricos²⁹, potenciométricos³⁰, sensores quimioresistivos³¹, bem como técnicas de espectrofotometria³², quimioluminescência³³ e fluorescência em via úmida³⁴, entre outros. Métodos pouco seletivos são aplicáveis somente quando a concentração do composto de interesse é muito maior do que a dos seus interferentes, como será descrito nos parágrafos a seguir.

1.4. Aplicações da análise de ar exalado

1.4.1. Aplicações aceitas

Talvez o mais conhecido exame de ar exalado aplicado a fins toxicológicos seja o teste de concentração de etanol. Em condições normais de metabolismo, o álcool etílico apresenta-se em concentrações muito baixas no ar exalado⁵, no entanto, após a ingestão de bebidas alcoólicas, parte deste etanol ingerido pode ser recuperado no ar exalado na proporção de 1 para 2100 em relação ao sangue⁸. Desta forma, este exame vem sendo utilizado há décadas para fins criminalísticos, uma vez que muitos países proíbem a condução de veículos após o consumo de determinada quantidade de álcool.

Dos primeiros testes aplicados, por oxidação da amostra por via úmida em meio ácido (popularmente conhecido por teste do bafômetro) na década de 1950 nos Estados Unidos, muitas alternativas foram propostas. Nos dias de hoje são comercializados dispositivos que quantificam o teor de álcool exalado por oxidação eletroquímica (medido por amperometria), por espectroscopia no infravermelho (Fourier Transform Spectroscopy. FT-IR) baseados Infrared em semicondutores (quimiorresistivos), além dos testes de oxidação supracitados³⁵. O limite de detecção para esta aplicação são da ordem de 0,1 miligrama de álcool por litro de ar exalado, concentração muito acima daquela na qual os VOCs que poderiam ser interferentes está presente na amostra.

Em aplicações clínicas, o monitoramento da concentração de gás carbônico no ar exalado é hoje uma prática comum em pacientes sob condições de anestesia para prevenção e acompanhamento de hipóxia (falta de oxigenação em tecidos corpóreos), sendo proposto para até 46 aplicações clínicas³⁶. A técnica mais comum para essa finalidade é a FT-IR, que detecta o percentual de CO₂ exalado.

Outra abordagem comum é o estudo do material exalado após a ingestão controlada de alguma molécula específica. A infecção por *Helicobacter Pilory*, que pode se alojar no estômago ou no duodeno causando gastrite e úlcera, pode ser detectada pela análise da emissão de gás carbônico decorrente da catálise enzimática de uréia pela bactéria. Para tanto, uma dose de uréia marcada com carbono isotópico é ingerida e o CO₂ gerado no processo é quantificado, seja por cintilometria (quando utilizado o isótopo radioativo ¹⁴C) ou por espectrometria de massas (quando utilizado isótopo estável ¹³C)³⁷.

Problemas de má absorção intestinal, também causados por bactérias, podem ser diagnosticados em raciocínio análogo, pela análise de gás hidrogênio. Este gás é gerado pelo metabolismo destas bactérias após a ingestão de uma dose de um pequeno açúcar, como por exemplo (d)-xilose. Alguns problemas de absorção mais específicos podem ainda ser diagnosticados, dependendo do carboidrato ingerido durante o exame¹.

A quantificação de monóxido de carbono no ar exalado, tóxico para o organismo, é realizável amperometricamente em níveis de ppmv por equipamentos disponíveis comercialmente²⁹, podendo indicar a presença de doenças hemolíticas em recém-nascidos, bem como exposição a fumaça e a cigarro. Estudos realizados durante a instauração da lei antifumo na cidade de São Paulo mostram que os níveis de CO em ambientes de casas noturnas caiu 73,5% em doze semanas, e a quantidade de monóxido de carbono exalado pelas pessoas que convivem nesses ambientes apresentou redução drástica, inclusive para os próprios fumantes³⁸.

Além dos modelos expostos acima, encontram-se também disponíveis equipamentos comerciais para a coleta de EBC³⁹, citando-se aplicações médicas principalmente no estudo de problemas respiratórios e também dispositivo voltamétrico para análise de compostos voláteis de enxofre (VSCs)²⁸, tais quais sulfeto de hidrogênio, metil mercaptana e dimetil sulfeto, marcadores reconhecidos de halitose crônica.

1.4.2. Aplicações em estudo

O avanço recente de metodologias e equipamentos analíticos têm permitido a obtenção de resultados cada vez mais refinados e precisos, aumentando-se consideravelmente o número de informações e correlações entre a composição do ar exalado e a ocorrência de processos endógenos.

Concentrações elevadas de peróxido de hidrogênio no ar exalado vem sendo correlacionadas com diversos quadros clínicos, especialmente de processos nas vias respiratórias⁴⁰. Sendo um composto pouco volátil que apresenta grande constante de Henry, sua análise geralmente é realizada em EBC, utilizando detectores eletroquímicos.

Alguns alcanos são reconhecidos como subprodutos de peroxidação lipídica, como por exemplo o etano e o pentano, subprodutos da degradação de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6, respectivamente⁵. Dada a volatilidade dos alcanos de cadeia curta, estes podem ser encontrados no processo de respiratório, sendo relacionados a condições clínicas de *stress* oxidativo⁴¹, como por exemplo consumo de cigarros, infecção por HIV, câncer pulmonar e até mesmo rejeição em transplante cardíaco, este último valendo-se da análise de ar exalado como teste aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration*, FDA⁴². A análise destes alcanos é feita, na maioria dos casos, com amostragem em adsorvente sólido e determinação por GC-FID⁴¹, eventualmente combinado a MS⁴³, havendo também trabalhos que utilizam espectroscopia no MIR para detecção direta de etano¹⁷.

Outro hidrocarboneto muito comum no ar exalado é o isopreno (2-metil-1,3-butadieno), decorrente da biossíntese do colesterol pela via do mevalonato⁵. Apesar de presente em pessoas saudáveis, níveis elevados do mesmo podem estar associados a problemas renais¹⁰, condições de *stress* psicológico⁸, e degradação por processos

oxidativos⁴⁴. Assim como para alcanos, sua análise pode ser realizada por GC-FID/MS, mas também há proposta de análise direta por SIFT-MS utilizando-se NO⁺ como precursor químico⁴⁵ ou mesmo PTR-MS²⁴.

Alguns solventes orgânicos tóxicos, como o benzeno, o tolueno, o xileno e o fenol, não comumente encontrados no ar exalado, podem indicar quadros de exposição, importante para fins toxicológicos. Para a análise destes, comumente se usa amostragem por adsorção em fase sólida (seja em escala convencional ou mesmo SPME) e análise por GC-FID ou GC-MS, podendo-se também analisar diretamente por SIFT-MS ou PTR-MS⁴⁶.

Compostos orgânicos nitrogenados são gerados no metabolismo de proteínas, sendo normalmente eliminados por excreção. No entanto, quando o organismo apresenta falhas nos rins, a concentração de amônia e compostos nitrogenados no sangue aumenta, e estas espécies e/ou alguns derivados destas podem sofrer trocas gasosas nos pulmões e ser encontrados no ar exalado⁵. Além deste quadro, o metil nitrato também já foi atribuído como marcador de hiperglicemia em diabetes *mellitus* tipo 1, sendo analisado por GC-FID/MS⁴⁷.

Além dos metabólitos bacterianos que provocam halitose, VSCs também são gerados no organismo através do metabolismo incompleto de metionina pela via de transaminação, e podem indicar problemas no fígado, como cirrose⁵. Para análise destes compostos tem sido comumente utilizadas a GC-MS⁴⁸, GC-FID⁴⁹ e sensores eletroquímicos^{28, 30}.

A acetona, composto comum no ar exalado, é um produto da descarboxilação do acetoacetato nos hepatócitos quando da presença de excesso de acetil-CoA, proveniente da beta-oxidação de ácidos graxos. Essa situação ocorre quando o organismo utiliza suas reservas lipídicas ao invés de glicose para a produção de energia,

devido à falta de oxaloacetato, que serve como substrato para produção de glicose pela via da gliconeogênese⁵, conforme reações apresentadas na literatura¹⁰.

O metabolismo da glicose, no corpo humano, é controlado pela presença de insulina, que induz o armazenamento de glicose nos tecidos musculares e cerebrais na forma de glicogênio. A falha na função deste hormônio no organismo é caracterizada como Diabetes *Mellitus*, seja por problemas em sua síntese (caracterizada como Diabetes *Mellitus* tipo I) ou pela resistência do organismo ao mesmo (Diabetes *Mellitus* tipo II)⁵⁰. No primeiro caso, o metabolismo da glicose é ineficiente, aumentando a concentração desta no corpo e provocando o maior uso de reservas lipídicas pelo organismo, induzindo assim ao aumento da concentração de acetona no ar exalado.

O monitoramento da concentração de acetona exalada pode ser válido também em pessoas saudáveis para o acompanhamento de dietas para redução de peso, na qual um maior consumo de substrato lipídico (e, consequentemente, o aumento dos teores de acetona no ar exalado) pode ser correlacionado diretamente com a perda de massa corpórea do voluntário analisado^{51, 52}.

1.5. Determinação de acetona em ar exalado

Os primeiros métodos de detecção de acetona em ar exalado datam do início do século XX, compreendendo determinações titulométricas, gravimétricas e turbidimétricas pouco específicas e sensíveis, muito sujeita a interferentes ou requerendo um tratamento de amostra muito dispendioso⁵³. Nesse contexto, o desenvolvimento da GC na década de 1960 ofereceu uma alternativa mais específica e simples para a análise de acetona, porém ainda demandando instrumentação complexa e de alto custo.

A grande evolução das técnicas e instrumentos analíticos do final do século XX e início do século XXI abriu um grande leque de possibilidades e alternativas para a análise de acetona. O uso de técnicas espectroscópicas (*Cavity Ringdown Spectroscopy*, CRDS)⁵⁴ e espectrométricas (SIFT-MS⁵⁵ e PTR-MS²⁴) fornece informações muito rápidas e precisas das amostras de ar exalado com mínimo tratamento prévio da amostra, em concentrações na ordem de ppbv. Apesar do aumento da portabilidade, robustez e diminuição dos custos de produção dos equipamentos citados, o uso rotineiro destes instrumentos, especialmente em ambientes hospitalares, ainda não pode ser vislumbrado em futuro próximo.

Nos últimos anos, foram apresentadas ainda alternativas de instrumentação mais simples e de baixo custo, envolvendo, por exemplo, pré-concentração em água por AMDS, reação da acetona com salicilaldeído em meio básico sob aquecimento e detecção fotométrica de acetona em fluxo, utilizando cela de longo caminho ótico (*Liquid Core Waveguide*, LCW) e diodo de emissão de luz (*Light Emitting Diode*, LED), atingindo limite de detecção de 14ppbv³². Outra proposta recente é o uso de sensor quimiorresistivo de silício dopado com WO₃, específico para acetona, cujo limite de detecção é de 20ppbv³¹. Apesar de maior viabilidade, os métodos descritos ainda necessitam de aquecimento e são complexos para se operar, dificultando seu uso em aplicações clínicas.

Aplicados à acetona, pode-se encontrar em literatura outros métodos como: amostragem por SPME derivatizado com cloreto de (O-2,3,4,5,6-pentafluotobenzil)hidroxilamina (PFBHA)⁵⁶ ou extração em agulha modificada com uma mistura de copolímeros (ácido metacrílico e dimetacrilato de etilenoglicol)⁵⁷, ambos seguidos de análise por GC-MS; análise direta por dispositivo cromatográfico com detecção por semicondutor sensível a gás, disponível comercialmente e proposto para

estudos acadêmicos⁵⁸; análise fluorimétrica de solução de aquosa de acetona utilizando ácido antranílico diazotizado como derivatizante⁵⁹; coleta em 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) sucedida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), este último sendo método oficial pela agência americana *Environmental Protection Agency* (EPA) para amostragem de compostos carbonílicos em ar atmosférico⁶⁰.

O crescente número de publicações acerca da composição do ar exalado e o recente desenvolvimento de aparelhos para detecção e quantificação de biomarcadores no no ar exalado presentes no mercado ilustram a grande necessidade e interesse de aprofundamento no tema. O maior entendimento de processos bioquímicos e de suas implicações no metabolismo mostra que o ar exalado traz uma série de informações relevantes, e a grande quantidade e variedade de compostos presentes ainda indicam que há muito a se estudar sobre o tema. Referente ao desenvolvimento de métodos, apesar dos interessantes resultados apresentados em literatura, a elaboração de procedimentos sensíveis e seletivos, que possam ser aplicados em ambientes diversos ainda é um desafio em muitos casos, inviabilizando sua realização em muitas situações. Situa-se no contexto acima a oportunidade de trabalho em parceria com o Instituto de Coração (InCor) como já mencionado no início desta introdução (item 1.1). Mais explicitamente, a colaboração se deu com o Prof. Dr. Ferndando Bacal e sua orientada, Fabiana G. Marcondes Braga, que desenvolve o projeto de doutoramento "Análise de gases exalados em paciente com insuficiência cardíaca congestiva. Novo índice prognóstico?", e o autor desta dissertação e seu orientador.

1.6. Insuficiência Cardíaca (IC)

A Insuficiência Cardíaca (IC) é responsável pelos maiores custos diretos à saúde nos Estados Unidos⁶¹, e corresponde a 3% do total de internações no sistema de saúde brasileiro, cerca de 295 mil casos no ano de 2007⁶², havendo assim um grande interesse no desenvolvimento de métodos prognósticos, diagnósticos e tratamentos para esse quadro. Os pacientes acometidos por IC congestiva crônica (uma das classes funcionais da doença) apresentam perda de gordura subcutânea e de musculatura esquelética, sendo seu gasto energético maior do que o de indivíduos saudáveis. O mecanismo deste gasto parece envolver o consumo de ácidos graxos livres e a alteração na resistência à insulina⁶³.

Mesmo não se sabendo ao certo como se processam as alterações metabólicas no organismo acometido pela doença, os pesquisadores do InCor notaram um odor característico no ar exalado pelos pacientes, tal qual o odor exalado pelos diabéticos, sugerindo a possibilidade de melhor entendimento dos processos bioquímicos ocorrentes através do estudo da composição do ar exalado por essas pessoas. Apesar desta evidência, apenas um grupo de pesquisa se dedicou a exploração do assunto⁶⁴, e mesmo assim não procurou correlacionar as classes funcionais desta doença com a composição da amostra.

Desta forma, o estudo proposto pelo InCor compreende a seleção de 110 voluntários não diabéticos para a coleta e análise de ar exalado (90 pacientes de IC, em diversas classes funcionais, e 20 pessoas saudáveis como controle), necessitando de um equipamento de coleta de simples operação, confortável ao voluntário e de baixo custo.

Coube então o desenvolvimento de equipamento e procedimento para coleta deste material, bem como a definição do analito de interesse neste estudo (acetona) e a elaboração e aplicação de métodos para sua determinação (GC-MS e espectrofotometria) a este projeto de mestrado.

П

OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolvimento de método viável para amostragem de acetona em ar exalado, para utilização em leito hospitalar, e determinação deste analito nas amostras coletadas.

2.2. Objetivos específicos

Identificação de biomarcador(es) em ar exalado relacionados com o quadro clínico de IC.

Construção e avaliação de dispositivos para coleta de acetona visando portabilidade, simplicidade de operação e não necessidade de energia elétrica durante a amostragem.

Montagem de sistema de geração de atmosfera controlada de acetona em ar purificado para calibração do sistema de coleta.

Adaptação de método espectrofotométrico para determinação de acetona.

Aplicação da metodologia proposta para análise de ar exalado por pacientes de IC não diabéticos e voluntários saudáveis, viabilizando estudo em colaboração com o InCor-FMUSP.

Ш

METODOLOGIA

3.1. Método para coleta

3.1.1. Proposta inicial

O sistema de coleta inicialmente adaptado consiste em um coletor de EBC, pelo qual o voluntário respira normalmente durante dez minutos utilizando bocal (semelhante ao utilizado em *snorkel* de mergulho, encaixado entre os lábios e os dentes) e presilha para o nariz. O ar flui por um coletor de saliva e, na sequência, em um *impinger* resfriado em banho de água e gelo, inicialmente vazio, onde ocorre a condensação ¹¹. Finda a coleta, o material condensado é retirado com auxílio de um pipetador e transferido para um pequeno frasco de vidro ou polipropileno e conservado a -80°C até o momento da realização da determinação química. Medidas de volume de ar amostrado, quando necessárias, foram realizadas adaptando-se medidor G0.6 (Liceu de Artes e Ofícios, São Paulo, Brasil) em série na saída do sistema de coleta.

3.1.2. Sistema otimizado

No sistema desenvolvido (apresentado na figura 2), o voluntário expira o ar por um pequeno tubo de polietileno descartável (canudo) (1) conectado diretamente ao *impinger* (3) contendo água deionizada (4). Dispensou-se, portanto, o bocal preso ao paciente, o coletor de saliva, bem como a presilha nasal. Para aumentar a contactação entre as fases gasosa e líquida no *impinger*, adaptou-se à extremidade do tubo de entrada um difusor de gás feito de vidro sinterizado (5), também descartável (trata-se de modelo de baixo custo produzido para utilização na aeração de aquário). A água deionizada contida no *impinger* é resfriada num banho de água e gelo (6), representado no desenho, mas não na foto da figura 2, para facilitar a visualização dos componentes.

Uma bolsa de polietileno lacrada descartável (8) (saco para embalagem, fechado em seladora térmica e adaptado para entrada de gás) é acoplado na saída do sistema para definição do volume final de coleta. O ar exalado é soprado pelo coletor em ritmo normal de respiração, até que a bolsa, inicialmente vazia, fique completamente inflada e ofereça resistência ao sopro.

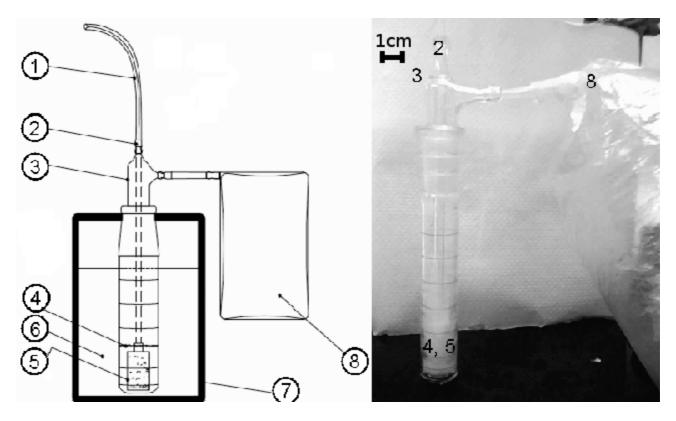


Figura 2: Sistema de amostragem desenvolvido 1-Tubo de polietileno; 2-Conexão; 3-*Impinger*; 4-Difusor de ar; 5-Água deionizada; 6-Banho de gelo e água; 7-Frasco para termostatização; 8-Saco plástico para definição de volume

Concluída a amostragem, o impinger é desmontado, as gotas de líquido contidas no difusor são liberadas injetando ar com uma seringa de 10 mL pelo tubo de entrada e, a seguir, todo o líquido é transferido para um frasco com capacidade de 5 mL (ou 10 mL) e conservado em freezer a -80 °C. Somente o impinger é esterilizado entre repetidas utilizações, vez que os demais materiais são descartáveis.

Para aferição do volume de bolsas, algumas unidades foram escolhidas aleatoriamente e preenchidas com ar introduzido através um ventilômetro de Wright Ferraris Mark 8. Alternativamente, pode-se utilizar o medidor de volume de gás G0.6

(Liceu de Artes e Ofícios, São Paulo, Brasil), desde que se faça 10 descargas consecutivas do saco, vez que a resolução deste medidor é baixa.

Para avaliação de rendimentos de coleta, recorreu-se a dois impingers idênticos em série, ou seja, a saída do primeiro impinger é acoplada a entrada do segundo, e ao final da montagem é acoplada a bolsa plástica para medição de volume.

3.2. Dispositivo Gerador de Atmosfera Controlada (DGAC)

Na avaliação do sistema de coleta desenvolvido neste projeto (descrito abaixo) utilizou-se um dispositivo gerador de atmosfera controlada (DGAC, figura 3 e 4). Duas bombas (B_1 e B_2 , Precision SR-7500, utilizada em aeração de aquários) propelem ar ambiente tratado em cartuchos P_1 e P_2 para remoção de VOCs (em leito químico misto com carvão ativo e permanganato de potássio sobre suporte inerte, Purafil Select CP Blend®) pelo gerador por mangueiras de polietileno. A corrente de ar da bomba B_2 passa por um frasco de vidro F (Schott Duran, referência 21806-245) com um duto de entrada e de saída de gás na tampa, imerso em banho termostatizado a $30\pm1~^{\circ}\text{C}$ (caixa de isopor com termostato de aquário Via Acqua 100W, não representados na figura), cuja temperatura era verificada periodicamente com termômetro. No interior deste frasco há outro frasco menor (E) contendo cerca de 1 g de acetona pura (Sigma-Aldrich, 99,5%). Entre o frasco e sua tampa perfurada foi colocado sob pressão um septo de silicone que permite a permeação de acetona. A taxa de emissão foi, que se mantém constante por longos períodos, foi determinada por pesagem periódica em balança com resolução de 10 µg.

O ar que deixa o recipiente F passa por um divisor de fluxo conectado a dois rotâmetros de vidro (R₁ e R₂, Dwyer Série VA, 65 e 150 mm), sendo a saída de gás de R₂

descartada e a de R₃ amostrada, sofrendo diluições para abranger maior faixa de concentrações. Para esta diluição, a saída de R₂ é conectada a uma terceria corrente de ar, medida por um terceiro rotâmetro de vidro (R₃, Dwyer Série VA, 150 mm) e conduzidos a uma câmara de mistura (misturador, M) provida de escape para o ambiente.

Com base nas vazões medidas nos rotâmetros (previamente calibrados com medidor de vazão Agilent ADM-2000 e bolhômetro) e da taxa de emissão de acetona (determinada por pesagem) pode-se calcular a concentração de acetona na fase gasosa levada ao coletor sob avaliação. O gás amostrado no coletor é aspirado diretamente da câmara de mistura, com auxílio da bomba B₃ a uma vazão de 400 mL/min.

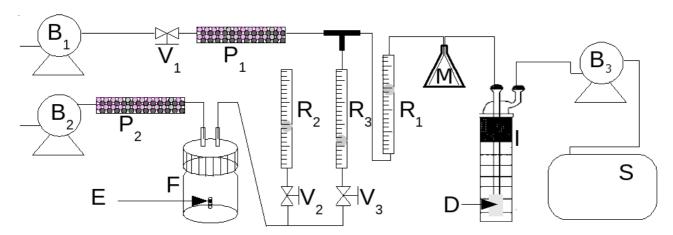


Figura 3: Representação esquemática do sistema de DGAC e de amostragem. B₁₋₂: Vias das bombas de diafragma; D: difusor de vidro sinterizado; E: tubo de permeação; F: frasco termostatizado; I: *impinger* utilizado para coleta; M: Misturador; P₁₋₂: purificadores de ar; R₁₋₃: Rotâmetros; V₁₋₃: Válvulas

3.3. Determinação

3.3.1. Determinação por GC-MS

A análise das amostras estudadas foi realizada na Central Analítica do IQ-USP, em cromatógrafo GC 17A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) acoplado a espectrômetro de massas QP5050A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), utilizando

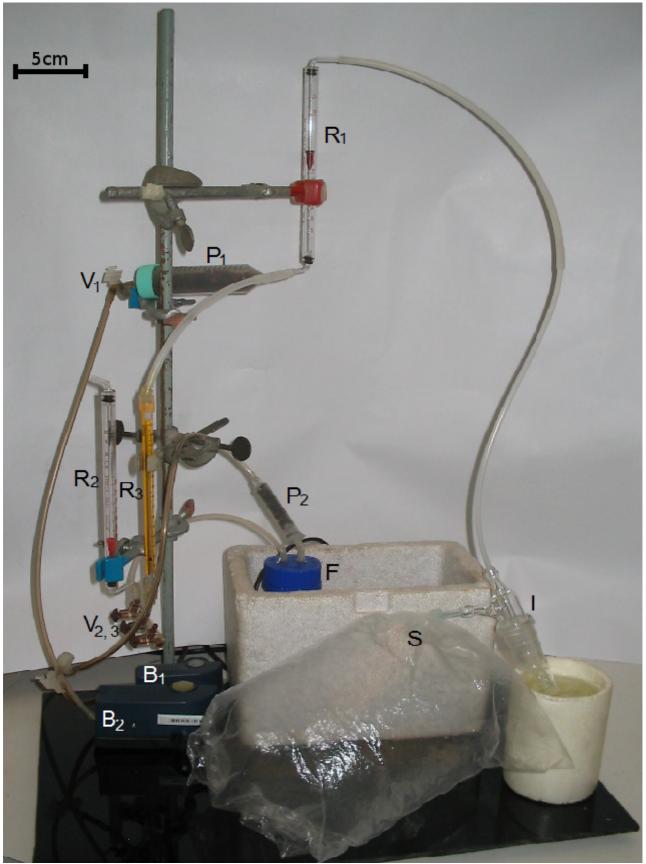


Figura 4: Foto do DGAC, seguido de amostragem. B₁₋₂: Vias das bombas de diafragma; D: difusor de vidro sinterizado;E: tubo de permeação; F: frasco termostatizado; I: *impinger* utilizado para coleta; P₁₋₂: purificadores de ar; R₁₋₃: Rotâmetros; V₁₋₃: Válvulas O misturador (M) não está representado nesta foto.

ionização por impacto de elétrons e coluna de polietilenoglicol, 30 m x 0,25 mm (Carbowax GC-745®). Para a análise, a amostra é descongelada em temperatura ambiente e são injetados 5 µL da solução aquosa no GC, nas seguintes configurações: injetor a 220 °C, fluxo de 4,9 mL/min, temperatura inicial da coluna 60 °C durante 3 minutos, rampa de aquecimento a 40 °C/min até atingir temperatura de 220 °C, na qual permanece em um patamar durante 10 minutos. O monitoramento dos íons formados era realizado por *Selected Ion Monitoring* (SIM), monitorando-se os fragmentos de relação m/z 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 58 e 59. Para estabelecimento do método de monitoramento acima, foram realizados previamente injeções do *headspace* da fração líquida coletada no modo *Scan Mode*, sob as mesmas condições. Vez que as amostras foram coletadas ao longo de um período de 20 meses, as condições de análise talvez não tenham se mantido rigorosamente constantes, tampouco foram realizados pelo mesmo operador da Central Analítica.

Os dados obtidos pelo método cromatográfico foram analisados em um primeiro momento utilizando-se o *software* CLASS-GC5000 (Shimadzu, fornecido originalmente com o aparelho; imagem típica deste *software* apresentada na figura 5). Posteriormente, as correntes iônicas registradas nos arquivos gerados pelo cromatógrafo foram decodificados com auxílio de editor hexadecimal (GHex) e convertidos em lista de valores ASCII utilizando-se *script* desenvolvido em linguagem de programação *phyton* (anexo 1), possibilitando posterior tratamento numérico. A resposta do método foi avaliada por curva de calibração, com padrões recém-preparados de acetona em água deionizada, nas concentrações 0,0 (branco), 0,6; 1,3; 3,3; 6,5 e 32,7 mg/L.

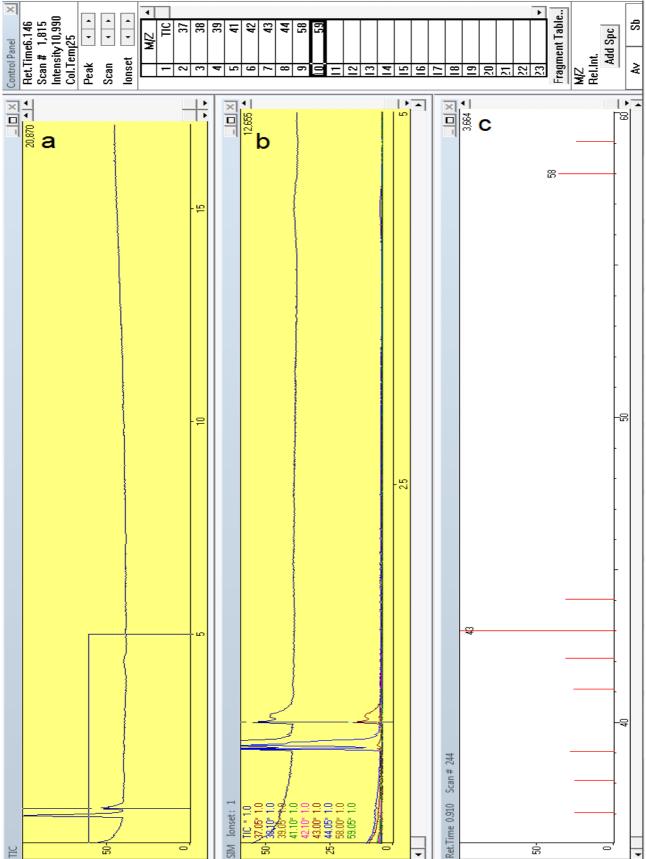


Figura 5: Imagem típica da interface do software CLASS-GC5000.

(a) Cromatograma exibindo corrente iônica total no detector, no tempo total de corrida; (b) Excerto do cromatograma a (correspondente ao retângulo exibido em a; (c) Espectro de massas obtido, correspondente ao instante indicado por linha nos cromatogramas a e b.

3.3.2. Determinação espectrofotométrica

A acetona sofre condensação aldólica com solução aquosa de salicilaldeído em meio básico, gerando produto de coloração distinta, conforme apresentado na figura 6. Apesar de lenta, é possível definir condições em que a absorbância do produto de reação guarde relação linear com a concentração de acetona. Conforme estudo da literatura, não há interferência significativa de outros compostos usualmente presentes no ar exalado³².

Figura 6: Representação da reação entre salicilaldeído e acetona em meio básico. O produto determinado está destacado em quadro (ao final do mecanismo)⁶⁵

Para a preparação do reagente, adiciona-se inicialmente 2 mL de hidróxido de sódio 11 mol/L em um balão de 50 mL à metade com água deionizada. A este balão misturam-se 600 μL de salicilaldeído, seguidos de 20 mL da solução de hidróxido de sódio, completando-se com água deionizada. A dissolução foi assistida por sonicação, quando necessário.

Na etapa de determinação, mistura-se de 500 μL de reagente com 500 μL de amostra e aguarda-se de 10 a 24 horas para que a reação se processe. Para estabelecer o melhor comprimento de onda de trabalho para otimização do sinal analítico amostras com concentrações conhecidas foram medidas em espectrofotômetro em uma faixa de 450 a 600 nm (a cada 2 nm). Comprimentos de onda inferiores a 450 nm não foram considerados por ser alta demais a absorbância (maior que 2,5), mesmo na ausência de acetona (ou seja, no branco). Para tanto, utilizou-se espectrofotômetro do tipo *diode array* HP8452A.

Para medições rotineiras em 474 nm empregou-se espectrofotômetro 600Plµs da Femto, que apresenta resolução de 0,001 unidades de absorbância e ajuste manual de comprimento de onda. A curva analítica (curva de calibração) foi construída com soluções de concentração conhecida obtidas por sucessivas diluições de acetona pura (Sigma-Aldrich, 99,5%), na faixa de 0,3 a 30,0 mg/L. O reagente colorimétrico, bem como os padrões de acetona, foram sempre preparados imediatamente antes da realização das determinações.

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Métodos de coleta

Ensaios iniciais com coletor do tipo EBC revelaram vários aspectos insatisfatórios, tais como, como baixa eficiência de coleta de acetona exalada, grande variação do volume de amostra coletado no período de tempo fixo de amostragem (10 min), volume muito pequeno de amostra, dificultando a transferência, conservação e determinação. Em algumas das amostras coletadas de pacientes de IC descompensada, o volume de material líquido final a ser manipulado e enviado para análise era particularmente pequeno.

Verificou-se experimentalmente que o volume da material coletado apresenta correlação direta com o volume de ar exalado conduzido através do EBC. Nas condições utilizadas, correspondeu a 28,4±1,3 mg de condensado por litro de ar exalado. Como o volume de ar exalado por minuto por um voluntário saudável e robusto pode ser muito maior que por um paciente debilitado e/ou de pequena massa corporal, inferiu-se ser preferível controlar e fixar o volume total de ar exalado durante a amostragem ao invés do tempo, para conseguir sempre amostra suficiente para a determinação de acetona.

A variação da temperatura interna do impinger durante a coleta foi avaliada em duas situações: i) em uma, a amostragem foi realizada em *impinger* de vidro vazio resfriado externamente com gelo seco, com camisa tubular de alumínio ajustada à sua parede externa (para melhor condução de calor ao frasco); ii) borbulhamento em *impinger* contendo água e resfriado em banho de água e gelo. Pode-se notar que a amostragem realizada por borbulhamento mantém a temperatura do processo de amostragem constante, diferentemente do processo de condensação (figura 7).

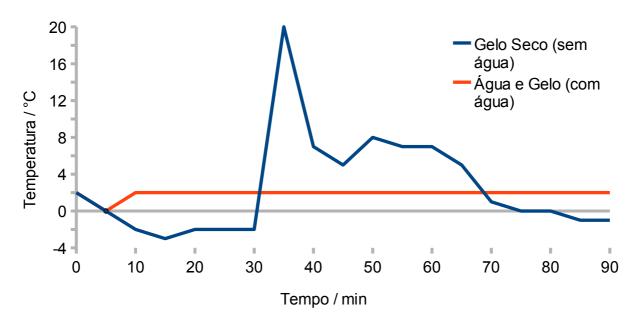


Figura 7: Avaliação da temperatura interna dos dispositivos de coleta durante a amostragem em diferentes condições de resfriamento. Em 30 e 45 minutos, ar exalado é soprado no sistema.

A presença de água, líquido não volátil miscível com acetona (também líquida, na temperatura de amostragem, 2 °C), além de favorecer a termostatização do sistema, tende a proporcionar menor perda de acetona durante a amostragem, seja pela maior pressão de vapor de água na mistura (considerando-se a lei de Raoult), pela maior razão entre líquido e gás na amostragem (favorecendo a partição do analito na fase líquida segundo a lei de Henry), ou até mesmo pela menor razão entre área superficial e volume de solução, durante a manipulação posterior, desfavorecendo a volatilização da amostra como um todo.

Inconvenientes adicionais foram observadas na amostragem de EBC: o uso de presilha para o nariz e do bocal, bem como a manutenção de tempo fixo de coleta (estipulado em dez minutos) tornam este processo de coleta desconfortável para o paciente.

Em vista das características do coletor de EBC inicialmente proposto, alterações na entrada de ar exalado e na saída do sistema foram propostas. A medição e delimitação do volume de ar exalado com saco plástico ao final do sistema mostrou-se

apropriada à presente aplicação pois não apresenta restrição significativa ao fluxo de ar durante a coleta, exceto ao final, quando a resistência aumenta subitamente, definindo o término da amostragem. A presença de água no recipiente de coleta impede que o ar já amostrado, contido no saco, retorne pelo bocal e escape durante os períodos em que o paciente ou voluntário inspira ou faz uma pausa, afastando a boca do bocal. Desta forma, elimina-se a necessidade de bocal interno (ente os lábio e os dentes), como o usado com o EBC descrito. Como o volume total expirado na amostragem é fixo, também não há necessidade de recorrer à presilha obstrutora do nariz. Essa combinação oferece conforto muito maior ao voluntário.

As bolsas plásticas utilizadas para coleta apresentaram volume bastante reprodutível (7,6±0,3 L, n=25), sendo uma maneira eficiente e de baixo custo para medida de volume sem restrição de fluxo. O uso de peças descartáveis também se mostra como um ponto a favor do método, pois um apenas número menor de peças precisam ser esterilizadas, o que permite uma limpeza e secagem mais rápida e, consequentemente, um maior número de amostragens por um mesmo conjunto de peças fixas. Além destas vantagens, o sistema assim proposto apresenta custo consideravelmente reduzido.

4.2. Dispositivo Gerador de Atmosfera Controlada (DGAC)

Após estabilização térmica e emissiva o DGAC, forneceu uma taxa de emissão de 11±1 μg de acetona por minuto (n=18 medidas, com pesagens a cada dois dias). Uma vez que a acetona encontra-se em concentrações na ordem de até décimos de micrograma por litro de ar exalado se fez necessária a diluição do gás do gerador, seja por inserção de ar puro à corrente com analito ou mesmo por descarte de parte do analito gerado inicialmente. Desta forma, o sistema foi capaz de fornecer concentrações de acetona de 0,3 μg/L a 20,0 μg/L dentro das resoluções dos rotâmetros utilizados, sem

alterações em sua montagem.

4.3. Métodos de determinação

4.3.1. Determinação por GC-MS

Para real avaliação e posterior aplicação dos sistemas de coleta foi necessário estabelecer um método para determinação de acetona em amostras aquosas. Inicialmente foi avaliada, com base em estudos na literatura, a aplicação das técnicas hifenadas GC-MS, com injeção pelo procedimento conhecido como *headspace*, em que o frasco com a amostra líquida em equilíbrio com a fase gasosa é aquecido e certo volume da fase gasosa é aspirado através do septo existente na tampa. Nesta fase da pesquisa, amostras coletadas por EBC foram encaminhas à Central Analítica do IQ-USP. Recorrendo ao modo de detecção *Scan Mode* foi possível verificar nas amostras a presença, em concentrações variáveis, de um composto de íon molecular m/z 58 e pico base m/z 43, reconhecido com acetona Visando otimizar a sensibilidade e a capacidade de quantificação desta técnica, o método foi adaptado para a injeção direta da fração aquosa no GC-MS e monitoramento iônico por SIM dos íons m/z 43 e 58 (referentes a acetona), e 44 e 59 (referentes a outro composto encontrado nas amostras, não descrito em literatura e também não investigado durante o período de realização desta dissertação.

Visto que o *software* CLASS-GC5000 não apresenta tabela completa com os dados de análise (apenas exibe o cromatograma graficamente), foi realizada a recodificação dos arquivos gerados pela análise por outro *software*. Para tanto, os dados brutos foram estudado em editor hexadecimal, através do qual foi possível encontrar o endereçamento das informações de correntes iônicas registradas, e um *script* em *Python*

foi desenvolvido para extração dos dados dos arquivos (anexo 3). A partir destes, o valor da integração dos picos correspondentes a acetona, em m/z 43 e m/z 58 mostraram-se proporcionais a concentração de acetona em padrões analisados, sendo que a quantificação se mostra de 4,2 vezes mais sensível quando realizada pelo íon m/z 43, devido a proporção dos íons quando da fragmentação por impacto de elétrons⁶⁶ (figura 8). Apesar da técnica apresentar boa repetitibilidade, a baixa reprodutibilidade impossibilitou a quantificação das amostras, conforme observado na duplicata de uma amostra, apresentada na figura 8.

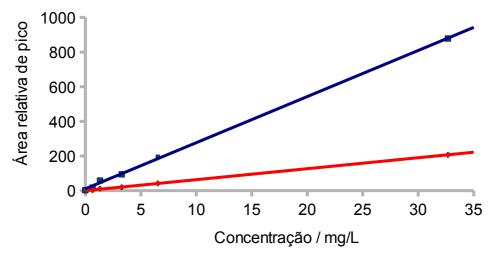


Figura 8: Curvas de calibração analíticas de padrões de acetona realizadas em GC-MS. Quantificação pela integração dos sinais de pico dos íons m/z 43 (azul) e 58 (vermelho). Equações das regressões: $C_{43} = 26,62 \cdot a_{43} + 10,44$ ($R^2 = 0,9992$); $C_{58} = 6,32 \cdot a_{58} + 0,43$ ($R^2 = 0,9996$)

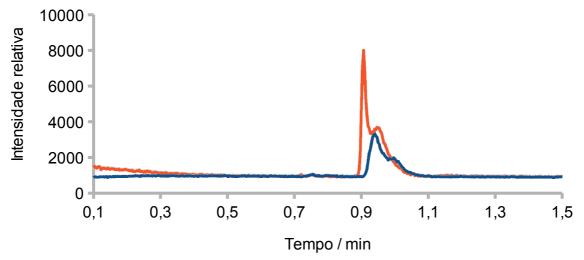


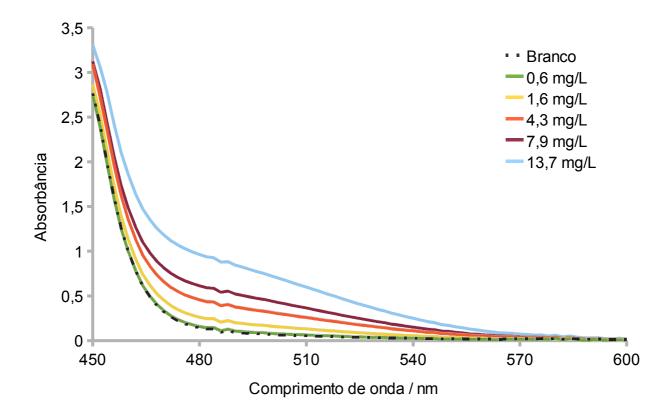
Figura 9: Cromatogramas (corrente iônica do íon m/z 43) para uma mesma amostra analisada em ocasiões diferentes. Injeção 5 μL, injetor 220 °C, fluxo 4,9 mL/min, coluna de polietilenoglicol, T_i 60 °C (3 min).

4.3.2. Determinação espectrofotométrica

Para avaliação inicial do método colorimétrico, o produto de reação com soluções padrão de acetona foi medido em uma faixa de comprimentos de onda de 450 a 600 nm (figura 10a). Para cada comprimento de onda avaliado, foi estimada a correlação linear entre a absorbância e a concentração da amostra, avaliando absorbância de branco (coeficiente linear), sensibilidade (coeficiente angular) e coeficiente de correlação da curva analítica (figura 10b). Para um melhor compromisso entre alta sensibilidade, baixa absorbância de branco e elevada correlação entre concentração e absorbância, a medida em 474 nm mostrou-se a mais conveniente.

Conforme observado experimentalmente, o tempo necessário para que a reação ocorra quantitativamente é de dez horas a 25 °C (figura 11), sendo a absorbância praticamente estável no período de 10 a, pelo menos, 24 horas após o início da reação. Aquecimento da mistura reagente visando o aumento da velocidade de reação, na prática, não apresentou resultados favoráveis, principalmente em termos de repetibilidade, provavelmente, devido a perdas durante o aquecimento por evaporação de analito e permeação pelos frascos nos quais foi realizado o aquecimento (que, quando não eram inteiramente de polipropileno, possuíam tampa plástica, e estes materiais poliméricos podem apresentar permeação a gases e vapores).

O limite de detecção estimado para esse método com base no triplo do desvio das medidas de branco (n=3) foi de 0,3 miligramas de acetona por litro de solução, correspondendo a um limite de quantificação de 1,0 mg/L. Na prática diária, determinação semi-quantitativa já é possível à partir de 0,6 mg/L, obtendo-se resposta linear até a concentrações de até 15 mg/L, após dez horas de reação (Figura 12).



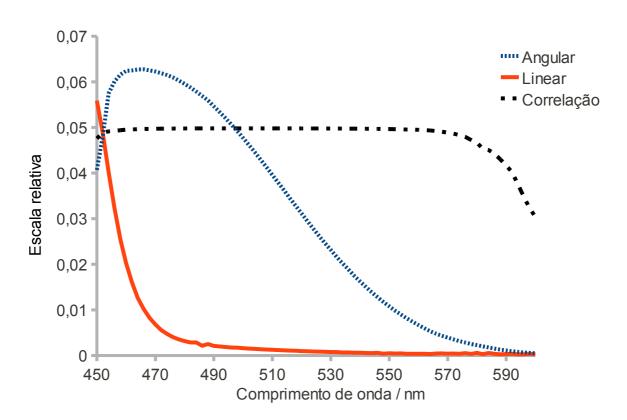


Figura 10: (a) Análise espectrofotométrica de padrões de acetona após reação com salicilaldeído em meio básico; (b) Parâmetros de regressão linear (coeficiente angular, coeficiente linear/50 e coeficiente de correlação de Pearson/20) dos padrões de acetona após reação com salicilaldeído em meio básico, utilizando espectrofotometria em diferentes comprimentos de onda.

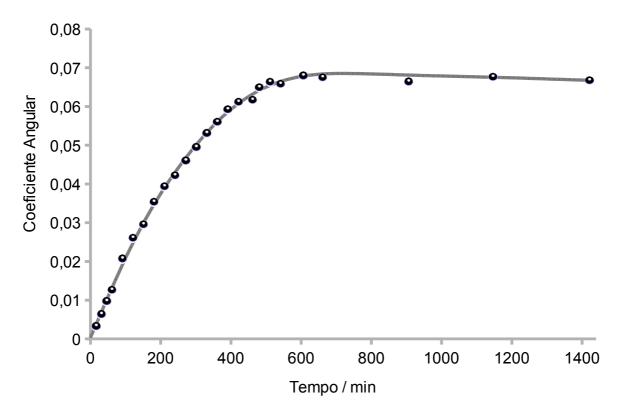


Figura 11: Estudo cinético da reação entre salicilaldeído e acetona a 25 °C. Cada ponto do gráfico corresponde ao coeficiente angular da regressão linear entre três soluções (0; 3,0; e 12,0 mg/L) durante a reação citada. Comprimento de onda: 474nm

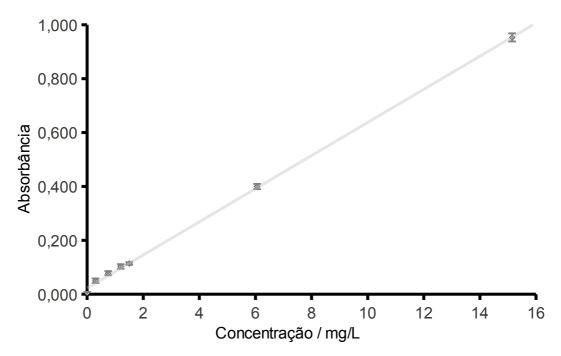


Figura 12: Curva de calibração analítica para método espetrofotométrico (474nm), após 10 horas de reação com salicilaldeído (descontando-se a absorbância do branco). Equação de regressão: C = 0.0615 a ($R^2 = 0.9992$)

Quando análises em tempos mais curtos forem necessárias podem ser realizados ensaios com mediições em tempos bem definidos e temperatura controlada, . Assim, soluções padrão foram medidas, transcorridos 15, 30, 45 e 60 minutos após adição de reagente colorimétrico (figura 13) e o coeficiente angular obtido para cada grupo de soluções foi lançado em gráfico em função da a concentração da amostra (figura 14), observando-se correlação linear em todas as situações. Neste procedimento breve, com uma hora de reação (ao invés de 10h), os limites de detecção e quantificação de acetona em fase líquida subiram para, respectivamente, 0,6 e 1,9 mg/L. Avaliação das figuras indica que, para aplicações em que as concentrações de acetona são mais elevadas, determinações após 10 ou 15 minutos de reação são plausíveis.

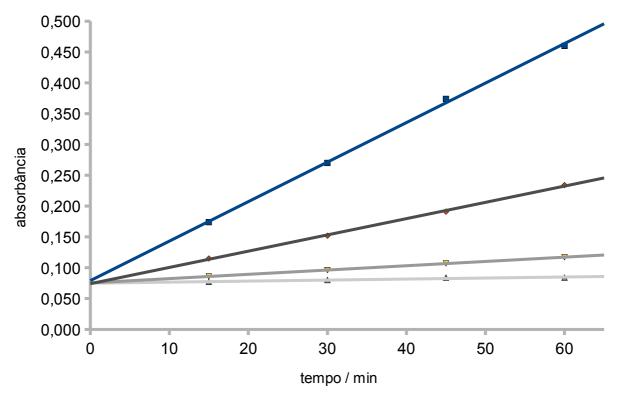


Figura 13: Absorbância (a 474nm) de padrões de acetona em concentrações conhecidas, avaliados em diferentes tempos de reação a 25°C. Equação de curvas (regressões) abaixo:

Branco	(cinza 20%)	$y = 0.0002 x + 0.0750 (R^2 = 0.8993)$
3,0 mg/L	(cinza 40%)	$y = 0.0007 \cdot x + 0.0755 (R^2 = 0.9996)$
12,0 mg/L	(cinza 70%)	$y = 0.0026 x + 0.0740 (R^2 = 0.9988)$
30,0 mg/L	(preto):	$y = 0.0064 \cdot x + 0.0790 (R^2 = 0.9987)$

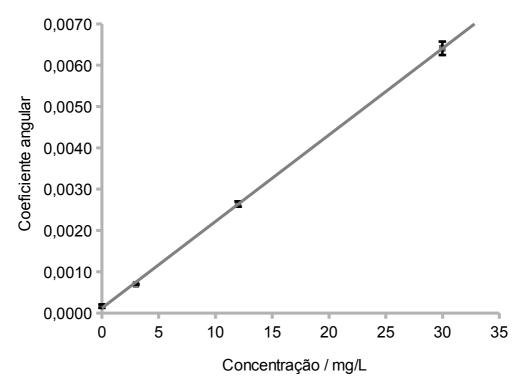


Figura 14: Correlação entre coeficientes das curvas mostradas na figura 10a e as concentrações nominais dos padrões de acetona. Equação da curva de calibração analítica:

C = 2,10·10⁻⁴ x + 1,20·10⁻⁴ (R² = 0,9998)

4.4. Avaliação da eficiência de coleta

Com o método espectrofotométrico estabelecido e já tendo ciência que, devido à constante de Henry da acetona, não seria possível alcançar eficiência de coleta próxima à quantitativa no *impinger*, mesmo trabalhando na temperatura mais favorável de 2 °C, procurou-se determinar experimentalmente o fator de eficiência a ser aplicado para corrigir, mesmo que de forma aproximada, os resultados.

Nesta avaliação, recorreu-se ao DGAC esquematizado na figura 3, com a diferença que dois *impingers* idênticos foram conectados em série (saída do 1º com a entrada do 2º). Para minimizar o aumento de pressão na linha de entrada de gás nos *impingers*, uma bomba de aspiração foi conectada à saída do segundo amostrador, e no escape de ar desta bomba foi colocado o saco plástico para controle de volume amostrado. Por ajuste das válvulas de agulha e leitura dos rotâmetros calibrados, gerou-

se diferentes concentrações de acetona em fase gasosa (branco; 4,9; 11,5; 17,1 e 19,6 μg/L). Os resultados das determinações de acetona na fase líquida dos dois *impingers* permitiram construir a figura 15.

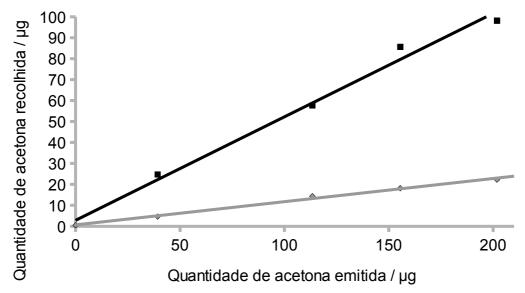


Figura 14: Estudo de eficiência de coleta, utilizando dois *impingers* em série. Preto: *impinger* 1; cinza: *impinger* 2. Equação das regressões: $C_1 = 0.49 \cdot c_g + 2.84$; $C_2 = 0.11 \cdot c_g + 0.67$

Esquematicamente, pode-se entender o experimento acima da seguinte maneira:

Tabela 1: Quantidade de acetona coletada em sistema de impingers em série

Situação	Inicialmente	1° Impinger	2° Impinger
Material Retido	а	a·x ₁	$a x_2 (1-x_1)$
Material Perdido		a (1-x ₁)	a (1-x ₁) (1-x ₂)

a-Quantidade inicial de acetona; x-Rendimento de coleta

Considerando-se que os dois impingers utilizados na coleta são idênticos e supondo-se, em primeira aproximação, que a eficiência de coleta se mantém constante ao longo do tempo, independentemente da concentração, pode-se calcular essa eficiência pela razão entre seus dois rendimentos (6):

$$\frac{a \cdot x_2 \cdot (1 - x_1)}{a \cdot x_1} = \frac{0, 11}{0, 49} \tag{6}$$

Sendo $x_1 = x_2$, tem-se que o rendimento de coleta é de 78%

O resultado apresentado acima pode ser entendido à luz da Lei de Henry (conforme exposto na introdução). Utilizando-se os valores referentes ao experimento realizado e considerando-se o balanço de massa do sistema (equação 7), o rendimento de coleta conforme o volume amostrado pode ser representado pela seguinte equação (8):

$$a = b + c \tag{7}$$

$$\frac{c}{a} = \frac{K_H \cdot R \cdot T \cdot V}{L + K_H \cdot R \cdot T \cdot V} \tag{8}$$

Sendo: a - Quantidade de analito inserido no sistema; b - Quantidade de analito que sai do sistema; c - Quantidade de analito retido no sistema; K_H - Constante de Henry do analito (corrigida para a temperatura conforme equação (4)); L - Volume de gás inserido no sistema; R - Constante universal dos gases; T - Temperatura do sistema; V - Volume de água no recipiente de coleta.

A razão entre **a** e **c** (rendimento de coleta) pode ser representada em função do volume de ar **L** inserido no sistema (mantendo-se os outros valores constantes; figura 16):

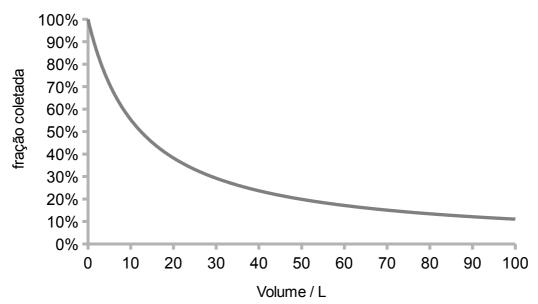


Figura 16: Rendimento de coleta em função do volume de gás com analito amostrada pelo impinger, mantendo-se geração de analito constante. Valores utilizados para gráfico: $K_H^{\circ 14} = 30 \text{ mol.L}^{-1} \text{ atm}^{-1}$; $R = 0.082 \text{ atm.L} \cdot K^{-1} \text{ mol}^{-1}$; T = 275 K; V = 5 mL

O gráfico apresentado pode ser entendido da seguinte maneira: no começo do processo, a solução aceptora (no caso, água deionizada) está sem analito, favorecendo a extração do analito da fase gasosa (presumindo contactação eficiente entre a fase líquida e as bolhas com gasosa no *impinger*). À medida que mais amostra gasosa passa pelo sistema, ocorre aumento da concentração na fase líquida (que não é renovada), com consequente decaimento do rendimento de coleta até o ponto em que, satisfeita a equação de Henry para as concentrações nas fases gasosa e líquida, a absorção tende a zero. Sendo assim, com o rendimento de coleta variando de acordo com o volume inserido no sistema, pode-se calcular o rendimento médio de coleta a partir da equação (7), da seguinte forma (8):

$$x = \frac{1}{L_f} \cdot \int_0^{L_f} \frac{K_H \cdot R \cdot T \cdot V}{L + K_H \cdot R \cdot T \cdot V} dL \tag{8}$$

Para os valores do gráfico, e considerando-se o volume total de coleta utilizado no método proposto, obtém-se rendimento de coleta médio de 78%, compatível com o valor encontrado experimentalmente. O limite de detecção e quantificação em fase gasosa, dado o rendimento observado são, respectivamente, de 0,3 e 1,0 μg/L.

No entanto, o rendimento observado diretamente (coeficiente linear da curva de regressão linear do primeiro *impinger*) corresponde a 49%, valor menor do que o calculado acima. Isso indica uma perda de analito no DGAC, que pode ser estimada (9):

$$1 - p = \frac{0,49}{0,78} \tag{9}$$

, ou seja, há uma perda de 37% do analito gerado. Dentre as prováveis razões para essas perdas, vale salientar a não-idealidade do contato do ar amostrado a água deionizada do *impinger* (o uso de difusor de vidro sinterizado para aumentar a área de contactação

gás/líquido pode não ter sido suficiente devido ao curto tempo de exposição), as perdas de analito ao longo do sistema de geração de padrão por permeação nos tubos de polietileno (reconhecidamente permeáveis a gases) ou mesmo as perdas por difusão de analito no misturador (que foi mantido com vazões de gases relativamente elevadas, visando compensar as perdas difusionais pelo movimento convectivo). Pode-se enumerar os seguintes fatores para colaborar na redução das perdas no sistema DGAC, numa futura validação mais rigorosa do método: uso de tubulação mais curta, de diâmetro interno menor, maior espessura; uso de material menos permeável (por exemplo, PTFE); reposicionamento dos rotâmetros e válvulas de agulha, de forma a minimizar o contato do analito por estes dispositivos e maior estabilidade emissiva (nesta dissertação o desvio padrão relativo observado foi de 9%), que pode ser obtido por maior estabilidade da temperatura e da pessão no frasco termostatizado.

Já no segundo *impinger*, a concentração de analito que entra no sistema não é constante ao longo da amostragem, já que é empobrecida em etapa anterior, e esta obedece a equação (10):

$$b = a \cdot \left(1 - \frac{K_H \cdot R \cdot T \cdot V}{L + K_H \cdot R \cdot T \cdot V}\right) \tag{10}$$

Em raciocínio análogo, o rendimento médio de coleta no segundo impinger, em relação ao material amostrado no início do primeiro sistema (100%) será (11):

$$x_2 = \frac{1}{L_f} \cdot \int_0^{L_f} \left(\frac{K_H \cdot R \cdot T \cdot V}{L + K_H \cdot R \cdot T \cdot V} \right) \cdot \left(1 - \frac{K_H \cdot R \cdot T \cdot V}{L + K_H \cdot R \cdot T \cdot V} \right)$$
(10)

resultando em x_2 = 0,16. O valor experimental encontrado (0,11) corresponde a coleta de 69% do previsto acima, valor coerente com a perda estimada no primeiro sistema.

4.5. Avaliação da conservação da amostra

A amostra, conservada por congelamento em *freezer* da fração líquida recolhida, apresenta recuperação média de 75,6±10,8% (n=31) da concentração de analito, avaliados em períodos de até 43 dias (figura 17). A perda, provavelmente inerente do próprio processo de congelamento e descongelamento, não mostrou-se diferenças temporais neste período avaliado.

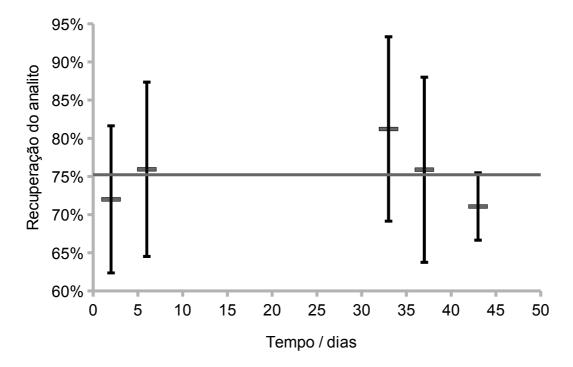


Figura 17: Recuperação do analito em função do período de congelamento, mostrando independência durante o período abrangido

4.6. Aplicações da metodologia completa a amostras reais

Uma vez desenvolvido o sistema de amostragem e estabelecido o método de determinação, foi possível aplicar a metodologia à analise de amostras de ar exalado de voluntários e pacientes. As coletas foram efetuadas no InCor pelos colaboradores, e as determinações, no IQ-USP. A repetibilidade do procedimento completo de análise é muito boa, sendo que replicatas efetuadas com voluntários apresentaram desvio padrão relativo

de 6% (n=5).

A concentração de acetona no ar exalado por pessoas saudáveis apresentou média de $0.4\pm0.4~\mu g/L$ (n = 21) e máximo de $1.1~\mu g/L$. Muitos dos resultados menores se situam abaixo dos limites de quantificação estimados para o método, ou seja, correspondem a estimativas semi-quantitativas. Todavia, são inteiramente concordantes com os valores expostos em literatura^{31, 32, 56, 57}.

Já pacientes acometidos de diversas formas de insuficiência cardíaca não compensada apresentaram concentrações de acetona, via de regra, muito mais elevadas, como se pode observar na figura 18.

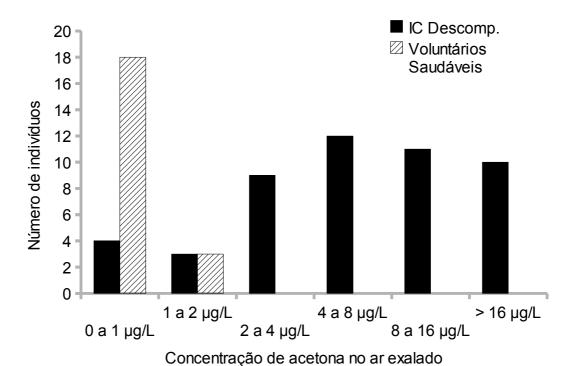


Figura 18: Distribuição da quantidade de acetona exalada por voluntários e por pacientes de IC descompensada (ordenadas em faixas com incrementos exponenciais)

Os resultados da figura 17 são citados a título de exemplo de aplicação, pois o aprofundamento deste estudo, relacionando a quantidade de acetona exalada com o grau de avanço da doença, bem como a possibilidade e viabilidade de utilização deste parâmetro para índices prognósticos não faz parte desta dissertação, mas constitui o

tema de tese de doutoramento em curso no Incor, conforme citado na introdução. Resultados médicos favoráveis, aliados à grande viabilidade de execução do método em ambiente hospitalar, podem permitir a utilização deste método em aplicações rotineiras, auxiliando no prognóstico e no tratamento deste quadro clínico.

V

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No âmbito da colaboração entre o InCor e o IQ-USP, voltada a identificação de biomarcadores em ar exalado e à investigação da possibilidade de utilizá-los para estudos bioquímicos e fins de prognóstico, a presente dissertação trouxe diversas contribuições e perspectivas, algumas das quais sumarizadas a seguir.

A análise por GC-MS de condensado ou extrato aquoso de ar exalado de pacientes com IC permitiu identificar inequivocamente a acetona como biomarcador de interesse a ser considerado na pesquisa. O sinal de um segundo composto foi sistematicamente observado, por vezes, com aparente correlação inversa frente ao sinal da acetona. Investigação futura deste composto poderá levar à sua identificação conclusiva e ao seu possível significado como biomarcador, vez que não pareceu receber atenção na literatura consultada.

Para o estudo da acetona em ar exalado e eventual aplicação, levou-se em conta a importância da proposição de técnicas e métodos que possibilitem a coleta e a preservação da amostra de maneira simples e sem depender da rede elétrica, de forma a viabilizar a realização destes procedimentos com custos reduzidos em ambiente hospitalar com pouco espaço e sem infra-estrutura específica.

O dispositivo de coleta de acetona em ar exalado desenvolvido nesta dissertação oferece vantagens em comparação ao dispositivo baseado em condensação descrito na literatura e avaliado, tais como: menor tempo de amostragem; maior eficiência de coleta; maior volume de amostra com menor perda relativa na conservação; maior estabilidade de temperatura durante a amostragem e menor custo, podendo todos os componentes afora o frasco do *impinger* e o banho de gelo ser (ou não) descartáveis.

Para dosagem do analito, a determinação espectrofotométrica mostrou-se vantajosa em comparação com a técnica de GC-MS, aplicada, paralelamente, a todas as amostras. Os dados obtidos por GC-MS SIM apresentaram repetibilidade satisfatória para

alguns conjuntos de amostras, mas, em diferentes ocasiões, mostraram problemas de reprodutibilidade que, mesmo superados, não compensariam o custo mais elevado e as necessidades treinamento para a operação do GC-MS. O método de determinação espectrofotomética de acetona, ajustado para a presente aplicação, pode ser facilmente implementado em laboratórios de análises clínicas ou mesmo no próprio ambiente hospitalar.

A metodologia desenvolvida apresenta limites de detecção e quantificação suficientes para a aplicação proposta, mesmo com perdas conhecidas de analito no sistema de coleta, bem como na preservação da amostra, que podem ser levadas em conta na obtenção dos resultados.

Como visto, a reação de condensação entre salicilaldeído e acetona em meio básico é lenta. Em sendo necessários resultados mais rápidos, pode ser aplicado o método cinético apresentado, reduzindo de 10 para uma hora (ou menos) o tempo de determinação. A sensibilidade do método cinético parece ser suficiente, ao menos, para contemplar os casos mais graves de IC.

As pesquisas desenvolvidas por Fabiana G. Marcondes Braga e Fernando Bacal no InCor-USP, foram viabilizadas com o uso do equipamento e metodologias aqui descritos. Nesse trabalho em curso, a análise crítica de correlação dos dados de concentração de acetona no ar exalado com os dados e exames clínicos de cada voluntário poderá auxiliar no melhor entendimento da ação da doença no organismo. Poderá, ainda, culminar com um novo método não-invasivo de prognóstico de formas de insuficiência cardíaca, seja para uso preliminar, como *screening* não invasivo, seja para acompanhamento frequente de pacientes em tratamento ou como ensaio complementar a outros métodos químicos (atualmente, invasivos). Neste caso, o desenvolvimento de métodos de detecção e quantificação, ou mesmo de analisadores portáteis de acetona,

passa a ser um campo promissor para viabilizar sua aplicação. Alguns analisadores recentemente descritos em literatura, voltados à medição de acetona em ar exalado por diabéticos, já apresentam certas características favoráveis como dimensões reduzidas, resposta rápida e/ou baixo limite de quantificação^{31,32}. Todavia, necessitam de alimentação elétrica, aquecimento, ou outros requisitos para operação, e aperfeiçoamentos adicionais são desejáveis para favorecer o seu uso clínico rotineiro.

VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Phillips M., Sci. Am., 1992, 267(1), 74-79
- Nebelthau, A., Centr. Inn. Med., 1897, 18, 977-982 apud Crofford, O., B. Et al, Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc., 1977, 88, 128–139
- 3. Pauling L., Robinson A.B., Teranish R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1971, **68**, 2374–2376
- 4. Phillips, M, Herrera, J., Krishnan, S., J Chromatogr. B, 1999, 729(1-2), 75-88
- 5. Miekisch, W., Schubert J.K., Noeldge-Schomburg, G.F.E., *Clin. Chim. Acta*, 2004, **347(1-2)**, 25-39
- 6. Cao W. Q., Duan X.Y., Crit. Rev. Anal. Chem., 2007, 37(1), 3-13
- 7. Mukhopadhyay, R., Anal. Chem., 2004, 76(15), 273A-276A
- 8. Manolis A., Clin. Chem., 1983, 29(1), 5-15
- 9. Ligor T., Crit. Rev. Anal. Chem., 2009, 39(1), 2-12
- 10. Buszewski B., Kesy M., Ligor T., Amann A., *Biomed. Chromatogr.*, 2007, **21(6)**, 553-566
- 11. Corradi M., Goldoni M., Caglieri ^a, Folesani G., Poli D., Corti M., Mutti A., *J. Aerosol Med. Pulm. D.*, 2008, **21(1)**, 35-44
- 12. Henderson M. J., Karger B. A., Wrenshall G. A., *Diabetes*, 1952, **1(3)**, 188–193.
- 13. Perrino, C., Gherardi, M., Atmos. Environ., 1999, 33, 4579
- 14. Sandler R., Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potencial Importance in Environmental Chemistry, 1999, 3; 46
- 15. Atkins, P. W., *Physical Chemistry*, W.H. Freeman & Company, 6^a ed., 1997
- 16. Ohira, S. I., Toda K., Anal. Chim. Acta, 2008, **619(2)**, 143-156
- 17. Miekisch, W., Schubert, J.K., TRAC-Trend Anal. Chem., 2006, 25(7), 665-673
- 18. Grote, C., Pawliszyn, J., Anal. Chem. 1997, (69), 587-596
- 19. Deng, C.H., Zhang, J., Yu, X.F., Zhang, W., Zhang, X.M., *J. Chormatogr. B*, 2004,

- **810(2)**, 269-275
- 20. Quintron-USA GaSampler® System, http://www.quintron-usa.com/gasampler (acessado em 10/10)
- 21. Schubert, J.K., Spittler, K., Braun G., Geiger K., Guttman J., *J Appl. Physiol.*, 2001, **90**,486-492
- 22. Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*, W.H. Freeman & Company, 5^a ed., 1999
- 23. Turner, C., Spanel, P., Smith, D., Physiol. Meas., 2006, 27(7), 637-648
- 24. Amann, A., Poupart G., Telser S., Ledochowski M., Schimid A., Mechtcheriakov S., *Int. J. Mass Spetrom.*, 2004, **239(2-3)**, 227-233
- 25. Critchley A., Elliott T.S., Harrison G., Mayhew C.A., Thompson J.M., Worthington T., *Int. J. Mass Spetrom.*, 2004, **239(2-3)**, 235-241
- 26. Blake, R.S., Monks, P.S., Ellis, A., M., Chem. Rev., 2009, 109(3), 861-896
- 27. Kim S., Young C., Vidakovic B., Gabram-Mendola S.G.A., Bayer C. W., Mizaikoff B., *IEEE Sens. J.*, 2010, **10(1)**, 145-158
- 28. Halimeter®, Interscan Corporation, http://www.halimeter.com, acessado em 10/10
- 29. Micro⁺ Smokerlyzer[®], Bedfont Scientific Ltd., http://www.bedfont.com, acessado em 10/10
- 30. Morita, M., Musinski, D.L., Wang, H., J. Clin. Periodontol., 2001, 28, 494-496
- 31. Righettoni, M., Tricoli, A., Pratsinis, S. E., Anal. Chem. 2010, 82, 3581–3587
- 32. Teshima, N., Toda, J.L.K., Dasgupta, P., *Anal. Chim. Acta.*, 2005, **535**, 189-199
- 33. Horváth, I., Donnely, L.E., Kiss A., Kharitonov S.A., Lim S., Chung K.F., Barnes P.J., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998, **158**, 1042-1046
- 34. Toda, K., Koga, T., Kosuge, J., Kashiwagi, M., Oguchi, H., Arimoto, T., *Anal. Chem.*, 2009, **81(16)**, 7031-7037

- 35. http://www.q3i.com/allaboutbreathalyzers.php, acessado em 10/10
- 36. Nikolova-Todorova Z., Signa Vitae, 2008, 3(1), 44-45
- 37. Helicobacter Foundation, http://helico.com/diag_breath.html, acessado em 10/10
- 38. Lei Antifumo, http://www.leiantifumo.sp.gov.br, acessado em 10/10
- 39. EcoScreen Turbo, CareFusion, http://www.carefusion.com/ acessado em 10/10
- 40. Anh, D.T.V., Olthius, W., Bergveld, P., Sensors Actuators B, 2005, **111-112**, 494-499
- 41. Aghdassi, E., Allard, J.P., Free Radical Bio. Med., 2000, 28(6), 880-886
- 42. Heartsbreath H030004, http://www.fda.gov/, acessado em 10/10
- 43. Barker, M., Hengst, M., Schmid, J., Buers, H-J., Mittermaier, B., Klemp, D., Koppmann, R., *Eur. Respir. J.*, 2006, **27**, 929–936
- 44. Risby, T.H., Sehnert, S.S., Free Radical Bio. Med., 1999, 27(11/12), 1182-1192
- 45. Turner, C., Spanel, P., Smith, D., Physiol. Meas., 2006, 27, 13-22
- 46. Amorim, L.C.A., Cardeal, Z.L., J. Chromatogr. B, 2007, 853, 1-9
- 47. Novak, B.J., Blake, D.R., Meinardi, S., Rowland, F.S., Pontello, A., Cooper, D.M., Galassetti, P.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2007, **104(40)**, 15163–15168
- 48. Mochalski, P., Wzorek B., Sliwka, I., Amann, A., *J. Chromatogr. B*, 2009, **877**, 189-
- 49. Awano, S., Koshimune, S., Kurihara, E., Gohara, K., Sakai, A., Soh, I., Hamasaki, T., Ansai, T., Takehara, T., *J. Dent*, 2004, **32**, 555-559
- 50. Torres, B.B., Marzoco, A., *Bioquímica Básica*, Guanabara Koogan S.A., 2ª ed., 1999
- 51. Crofford, O.B., Mallard, R.E., Wilton, R.E., Rogers, N.L., Jackson J.C., Keller, U., *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 1977, **88**, 128–139.
- 52. Kundu, S.K., Bruzek, J.A., Nair, R., Judilla, A.M., Clin. Chem., 1993, 39(1), 87-92

- 53. Hubbard, R.S., J. Biol. Chem., 1920, 43(1), 57-65
- 54. Wang, C., Mbi, A., Shepherd, M., IEEE Sens. J., 2010, 10(1), 54-63
- 55. Turner, C., Spanel, P., Smith, D., Physiol. Meas., 2006, 27, 321-337
- 56. Deng, C., Zhang, J., Yu, X., Zhang, W., Zhang, X., *J. Chromatogr. B*, 2004, **810**, 269-275
- 57. Ueta, I., Saito, Y., Hosoe, M., Okamoto, M., Ohkita, H., Shirai, S., Tamura, H., Jinno, K., *J. Chromatogr. B*, 2009, **877**, 2551-2556
- 58. Kinoyama, M., Nitta, H., Watanabe, A., Ueda, H., *J. Health Sci.*, 2008, **54(4)**, 471-477
- 59. María, C.G., Domínguez K.B.H., Garrido, N.M., *Anal. Chim. Acta*, 2007, 600, 172-176
- 60.US Environmental Protection Agency, EPA-TO11A, Cincinnati, OH: Center for Environmental Research Information, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency; 1999.
- 61. Maisel, A.S., Krishnaswamy, P., Nowak, R.M., McCord, J., Hollander, J.E., Duc, P., Omland, T., Storrow, A.B., Abraham, W.T., Wu, A.H.B., Clopton, P., Steg, P.G., Westheim, A., Knudsen, C.W., Perez, A., Kazanegra, R., Herrmann, H.C., McCullough, P.A., New Engl. J. Med., 2002, 347(3), 161-167
- 62. http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php, acessado em 05/08
- 63. Neubauer S., New Engl. J. Med., 2007, 356(11), 1140-1151
- 64. Kupari, M., Lommi, J., Ventilä, M., Karjalainen, U., *Am. J. Cardiol.*, 1995, **76**, 1076-1078
- 65. Fabinyi, R., *Chem. Zentr.*,1900, **2**, 302 apud Csonka, F. A., *J. Biol. Chem.*, 1916, **27(1)**, 209-212.
- 66. Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press, 82° ed., 2000

VII

ANEXO

Script para recodificação de arquivo de dados de GC-MS (ClassGC-5000)

```
# file: ScriptOK.py
\mbox{\#} Authors: Carlos A. Neves and Guilherme L. Batista
# About: Stracts the m/z and peak intensity from the data file of the Shimadzu CG5000.
# Licence: THE BEER-WARE LICENSE (Revision 42) http://en.wikipedia.org/wiki/Beerware
print "Starting script."
number scans = 5070 # (from 0 to 5069)
block_size = 68
addr0 = 809 \# initial address where starts the data blocks
scans = 5070 # number of scans of the experiment
base = 25
# general counters
scan_counter = 0
i = 0; j = 0; v = 0;
n = []
I = []
tic = []
lines = []
mz = []
b = '
s = ''
# input and output files
fna = raw_input('IN:')
fi = open(fna, 'rb')
fnb = raw_input('OUT:')
fo = open(fnb, 'w')
print 'processing input data file...'
# adjust the pointer to the first data block
fi.seek(addr0)
addr = addr0
while(scan counter<scans):</pre>
    mz = []
    n = []
    I = []
    i = 0
    while (i<block_size):</pre>
        b = fi.read(1)
        if b == '':
            fi.close()
            fo.close()
            print "bye"
            exit(0)
        v = ord(b)
        # verify if this line has big numbers
        if (i == 17):
            if (v == 1):
                block_size = 86
        n.append(v)
        i = i + 1
    \#index = n[12] << 8 \mid n[11] << 0
    if n[17] == 2:
        for i in range(9):
            # line with normal numbers
            mz.append(float(n[base+4*i+1] << 8 | n[base+4*i+0] << 0)/20)
            I.append(n[base+4*i+3] << 8 \mid n[base+4*i+2] << 0)
```

```
else:
       # line with big numbers
       for i in range(9):
           # line with normal numbers
           mz.append(float(n[base+6*i+1]<<8 | n[base+6*i+0]<<0)/20)
           I.append(n[base+6*i+5]<<24 | n[base+6*i+4]<<16 | n[base+6*i+3]<<8 |
n[base+6*i+2]<<0)
   # append a line
   lines.append(I)
   tic.append(sum(I))
   addr = addr + block_size
   block size = 68
   scan counter = scan counter + 1
print 'Done.'
print 'Saving data to the output file...'
# save the data into a file
# header
s = 'time min mz1 mz2 mz3 mz4 mz5 mz6 mz7 mz8 mz9 tic\n'
print s,
fo.write(s)
# m/z
s = '0 \%.2f \%.2f \%.2f \%.2f \%.2f \%.2f %.2f %.2f %.2f %.2f %.2f %.1, mz[3], mz[3],
mz[4], mz[5], mz[6], mz[7], mz[8])
print s,
fo.write(s)
# intensities
for i in range(len(lines)):
   [1], lines[i][2], lines[i][3], lines[i][4], lines[i][5], lines[i][6], lines[i][7],
lines[i][8], tic[i])
   print s,
   fo.write(s)
print 'Done.'
print 'Bye.'
```

CURRICULUM VITAE

1. Dados Pessoais

Nome: Guilherme Lopes Batista Data de Nascimento: 03/06/1985

Nacionalidade: Brasileira e-mail: guilhermelb@usp.br

2. Formação Acadêmica

Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP-SP), São Paulo, Brasil, 2007

Ensino médio: Colégio Objetivo (Unidade Paulista), São Paulo, Brasil, 2003

3. Ocupação

Bolsista de Mestrado, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, março/2008-fevereiro/2010. Orientação: Ivano Gebhardt Rolf Gutz

Estagiário, Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – USP, Química Analítica Instrumental, Fevereiro/2009-Junho/2009

Estagiário, SABESP (ETE Barueri), julho/2006-fevereiro/2007.

Bolsista de Iniciação Científica, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, julho/2005-junho/2006. Orientação: Liliana Marzorati

6. Prêmios e Distinções

Prêmio Lavoisier, Concedido pelo CRQ-IV, como melhor aluno no curso de Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas, Setembro, 2007

Medalha de Bronze conquistada na do Estado de São Paulo para estudantes do Ensino Médio, 2001

5. Participação em Eventos

Batista, G.L., Gutz, I.G.R., Braga, F.G.M., Bacal, F., "Desenvolvimento de Método Prático para Análise de Acetona em Ar Exalado por Pacientes de Insuficiência Cardíaca", 15° Encontro Nacional de Química Analítica, Salvador, BA – 2009

6. Publicações

Bacal, F., Braga, F.G.M; Gutz, I.G.R.; Batista, G.L., "Non-invasive Method for Diagnosing the Severity of Heart Failure, Use of a Biomarker for Diagnosing Decompensated Heart Failure, Collector Device for the Heart Failure Biomarker from Exhaled Breath and a Diagnosis Kit", Pedido de Patente Nº 12/838,204, United States Patent and Trademark Office (USPTO - Department of Commerce), depositado em 16 de julho de 2010.