Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

"Investigação de compostos orgânicos voláteis em amostras de suor como biomarcadores no diagnóstico de câncer"

Fernanda Ferreira da Silva Souza Monedeiro

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2018

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

"Investigação de compostos orgânicos voláteis em amostras de suor como biomarcadores no diagnóstico de câncer"

Versão corrigida

(a versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-graduação)

Fernanda Ferreira da Silva Souza Monedeiro

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Monedeiro, Fernanda Ferreira da Silva Souza Monedeiro
Investigação de compostos orgânicos voláteis em amostras de suor como biomarcadores no diagnóstico de câncer. Ribeirão Preto, 2018.

292 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: De Martinis, Bruno Spinosa.
Versão corrigida
1. VOCs. 2. Câncer. 3. Biomarcadores. 4. Diagnóstico. 5. GC-MS. 6. Suor. 7. Urina.

Nome: MONEDEIRO, Fernanda Ferreira da Silva Souza

Título: Investigação de compostos orgânicos voláteis em amostras de suor como biomarcadores no diagnóstico de câncer

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências, Área de concentração: Química.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Sobretudo, agradeço aos meus pais, Maria do Carmo e Fernando. Simplesmente agradeço por seu amor incondicional, pois seria impossível de qualquer outra forma explicar o que, em meio a tantas dificuldades, fizeram e fazem por mim, a contribuição que tiveram em cada etapa de minha vida. Aos meus irmãos, Bárbara e Diogo, que são partes de mim e pessoas admiráveis por sua capacidade e caráter. À minha família: Eduardo, Zildete, Sara, Vitor e Teresa, pelo constante crédito, ajuda e motivação.

Ao meu orientador, Prof. Bruno, pela oportunidade de realizar o doutorado, pela confiança e incentivo.

Ao Prof. Buszewski, por me receber para o estágio com seu grupo de pesquisa.

Aos demais professores que durante minha formação, mesmo sem saberem, me inspiraram com seus conhecimentos.

Àqueles que conheci durante este trajeto: Iara, Caio, Lidiane, Marcela, Thiago, Lívia, Mariana, Dayanne, Laís, Ricardo, Fabiana, Eduardo, Nayna, Natália, Fernanda, Mércia, amigos do FCBM, Cláudia, Josiane, André e Maciej- pelos ensinamentos e apoio.

Aos profissionais do HC-FMRP/USP. Por me receberem, Dra. Fernanda e Dr. Rodolfo.

À FAPESP, por conceder o apoio financeiro para realização deste trabalho: a Bolsa no país (DD) (processo: 2013/19653-4) e a Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) (processo: 2017/10387-0). Ao CNPq, por fornecer a bolsa no estágio inicial da pós-graduação (processos: 131031/2013-9 e 161938/2013-2.)

Àqueles que aceitaram em participar desta pesquisa. Cito em especial a colaboração dos funcionários da EMEF Dep. Rogê Ferreira para obtenção de amostras do grupo controle, não podendo deixar de ser extremamente grata aos pacientes que, em situação tão sensível, concordaram em contribuir para este estudo cedendo suas amostras.

RESUMO

MONEDEIRO, F.F.S.S**. Investigação de compostos orgânicos voláteis em amostras de suor como biomarcadores no diagnóstico de câncer**. 2018. 292f. Tese (Doutorado) –Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Processos metabólicos naturais no organismo humano levam à formação de substâncias como compostos orgânicos voláteis (VOCs), de modo que, em um quadro patológico, processos diferenciados podem ocorrer nas células, fazendo com que um conjunto diferente de compostos seja produzido. Com esta hipótese, VOCs podem ser analisados em amostras biológicas com a intenção de se verificar alterações em seus perfis que sejam indicativos de certas patologias. No presente estudo, foi selecionado o suor como matriz, amostra de coleta simples e não-invasiva, de composição menos complexa e relacionada aos níveis sanguíneos e emanações da pele. Adicionalmente, foram também analisadas amostras de urina, para obtenção de dados comparativos. O presente estudo compreendeu amostras de voluntários saudáveis (grupo controle- C) e com diagnóstico de câncer confirmado (grupo positivo- P). As amostras de suor foram coletadas com o dispositivo PharmChek®, após, o *patch* foi removido, inserido em frasco e os VOCs isolados com emprego de técnica otimizada de *Headspace* estático (HS). Para as amostras de urina, estas foram analisadas com e sem tratamento por β-glucuronidase. Perfis de VOCs foram obtidos por análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) para todas amostras. A tentativa de identificação dos compostos detectados foi feita por busca na biblioteca NIST08 e uso do *software* AMDIS32. Diferenças qualitativas (teste chi-quadrado, $p<<0,01$) e quantitativas (teste U de Mann-Whitney, $p<<0,01$) foram avaliadas entre os perfis do grupo controle e positivo. Para o suor foram selecionados os potenciais biomarcadores pentanal, hexanal, heptanal, octanal, limoneno, 2-etil-1-hexanol, 1-undeceno, fenol, 2,6-dimetil-7-octen-2-ol (DMOL), nonanal, decanal e tridecano; para a urina, fenol e DMOL, hidrólise-dependentes, foram selecionados. Método HS-GC-FID (acoplado a detector por ionização de chama) foi desenvolvido e validado segundo a RDC 27/2012 da ANVISA, para ambas amostras. No suor, os analitos apresentaram limites inferiores de quantificação (LIQ) de 1 ng/adesivo, 5 ng/adesivo para o fenol; na urina foram de 2 ng mL^{-1} para o DMOL e 10 ng mL^{-1} para o fenol. Linearidade foi observada para faixa de 2 a 150 ng/adesivo e, 2 e 5 a 400 ng mL^{-1} na urina. No suor, a precisão variou de 0,08 a 12,35% e os analitos foram demonstrados estáveis para os ensaios realizados. Curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foram avaliadas e áreas sob a curva foram todas próximas a 1, com valores *cut-off* de 1,71 a 35,44 ng/adesivo no suor e 8,71 e 52,86 ng mL^{-1} na urina. 2-etil-1-hexanol se demonstrou negativamente correlacionado com o estágio clínico em adenocarcinomas (rô= -0,527) e DMOL, no suor, e aldeídos C5-C8 positivamente relacionados ao estágio do câncer de próstata (rô= 0,779 e 0,684, respectivamente). Conclui-se, portanto, que o método apresentado se mostrou eficiente, contudo, prático e de baixo custo, e os resultados obtidos corroboram para ideia da determinação de VOCs como promissora ferramenta auxiliar de diagnóstico no câncer.

Palavras-chave: VOCs. Câncer. Biomarcadores. Diagnóstico. GC-MS. Suor. Urina.

ABSTRACT

MONEDEIRO, F.F.S.S**. Investigation of volatile organic compounds in sweat samples as biomarkers in cancer diagnosis**. 2018. 292f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Natural metabolic processes in the human body lead to the formation of substances such as volatile organic compounds (VOCs), so that, in a pathological context, differentiated processes can occur in the cells, causing a different set of compounds to be produced. With this hypothesis, VOCs can be analyzed in biological samples with the intention to verify changes in their profiles that are indicative of certain pathologies. In the present study, sweat was selected as the matrix, due simple and non-invasive collection, with lower complexity composition and related to blood levels and skin emanations. In addition, urine samples were also analyzed to obtain comparative data. The present study comprised samples from healthy volunteers (control-C group) and individuals with confirmed cancer diagnosis (positive-P group). The sweat samples were collected with PharmChek® device, next, the patch was removed, inserted in a vial and the VOCs were isolated using an optimized Static Headspace (HS) technique. For urine samples, these were analyzed with and without β-glucuronidase treatment. VOC profiles were obtained by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) for all samples. The attempt to identify the detected compounds was made by searching the NIST08 library and using the AMDIS32 software. Qualitative differences (chi-square test, $p << 0.01$) and quantitative tests (Mann-Whitney U test, $p << 0.01$) were evaluated between the profiles of the control and positive groups. For the sweat, the potential biomarkers pentanal, hexanal, heptanal, octanal, limonene, 2-ethyl-1-hexanol, 1-undecene, phenol, 2,6-dimethyl-7-octen-2-ol (DMOL), nonanal, decanal and tridecane; for urine, phenol and DMOL, both hydrolysis-dependent, were selected. HS-GC-FID (coupled to flame ionization detector) method was developed and validated according to RDC 27/2012- ANVISA, for both samples. In sweat, the analytes presented limits of quantification (LOQ) of 1 ng/patch, 5 ng/patch for phenol; in urine were 2 ng mL^{-1} for DMOL and 10 ng mL^{-1} for phenol. Linearity was observed for the range of 2 to 150 ng/patch and, 2 and 5 to 400 ng mL^{-1} in urine. In sweat, the precision ranged from 0.08 to 12.35% and the analytes were shown to be stable for the assays performed. Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were evaluated and areas under the curve were all near to 1, with cut-off values of 1.71 to 35.44 ng/patch in sweat and 8.71 and 52.86 ng mL^{-1} in urine. 2-ethyl-1-hexanol was shown to be negatively correlated with the clinical stage in adenocarcinomas (rho= -0.527) and DMOL, in sweat, and C5-C8 aldehydes sum, positively related to the stage of prostate cancer (rho= 0.779 and 0.684, respectively). It was concluded, therefore, that the method presented proved to be efficient, however, practical and low cost, and the results corroborate to the idea of VOCs determination as a promising diagnostic tool for cancer diagnosis.

Keywords: VOCs. Cancer. Biomarkers. Diagnosis. GC-MS. Sweat. Urine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características do câncer como um processo. Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011) e Ministério da Saúde (1996). 7
Figura 2- Esquematização da composição do suor. Adaptado de Hussain et al. (2017) 15
Figura 3 - Camadas da pele e porções secretoras de suor 16
Figura 4 - Etapas da coleta de amostra de suor. (A) Adesivo PharmChek® embalado; (B) Limpeza do local (lombar) com isopropanol; (C), (D) e (E) Fixação do adesivo; (F) Retirada do adesivo; (G) Armazenamento do *patch* diretamente em frasco para *Headspace.* 21
Figura 5 - Gráfico de área relativa (área do analito/área obtida para o decano) para tempos de incubação de 5, 10 e 20 minutos, à temperatura de incubação de 70°C. 39
Figura 6 - Gráfico de área relativa (área do analito/área obtida para o decano) para tempos de incubação de 5, 10 e 20 minutos, à temperatura de incubação de 80°C. 39
Figura 7 - Gráfico de área relativa (área do analito/área obtida para o decano) para tempos de incubação de 5, 10 e 20 minutos, à temperatura de incubação de 90°C. 40
Figura 8 - Área total dos analitos vs temperaturas de incubação empregadas, para diferentes tempos de incubação. 41
Figura 9 - Cromatogramas obtidos para análise de 100 ng de alcanos heptano a pentadecano para papel sem adição de solução salina 300 g/L de cloreto de sódio (em vermelho) e com a adição de solução salina (em verde). 42
Figura 10 - Cromatogramas obtidos para análise de 100 ng de alcanos heptano a pentadecano para papel sem adição de solução salina 300 g/L de cloreto de sódio (em vermelho) e com a adição de solução salina (em verde). 42
Figura 11 - Cromatogramas obtidos para análise de 100 ng de alcanos heptano a pentadecano para papel com adição de solução salina a 50,100 e 300 g/L de cloreto de sódio (em vermelho, verde e preto, respectivamente). 43
Figura 12 - Cromatogramas obtidos para análise de 100 ng de alcanos heptano a pentadecano para velocidades de agitação durante a incubação equivalentes a 250, 500 e 650 RPM (em azul, verde e vermelho, respectivamente). 44

Figura 13 - Área total obtida *vs* concentração da solução salina e velocidade de agitação do incubador. 44
Figura 14 - Cromatogramas obtidos para análise de frasco vazio (em vermelho), contendo patch PharmChek® adicionado de solução salina (em verde) e papel filtro empregado no desenvolvimento de método, adicionado da mesma solução (em preto). 45
Figura 15 - Área total dos picos *vs* temperaturas de incubação empregadas, para diferentes tempos de incubação (amostras controles C1 e C2 e positivas P1 e P2). Os números de picos identificados estão escritos sobre as colunas correspondentes. Para as condições testadas a incubação *Headspace* a 90°C, por 10 minutos forneceu, na maioria dos casos, maiores valores de Área total, além de que um maior número de picos foi reconhecido.....47
Figura 16 - Diferentes volumes de amostra vs área total dos picos (condições empregadas: 90°C, 10 minutos). 48
Figura 17 - Comparação de resposta de íons no espectro de massas, para um mesmo pico nos cromatogramas obtidos na análise de 500 µL (A e C) e 1 mL de amostra (B e D). Observa-se que para o volume de 1 mL a abundância do íon correspondente é menor (951 *vs* 677*)*, ainda, há maior abundância de picos estranhos ao espectro do composto em particular (setas indicando). 49
Figura 18 - Cromatogramas sobrepostos para análise de uma amostra (P2) com diferentes concentrações de sal sólido: 0,1 g (em vermelho), 0,5 g (em verde), 0,7 g (em preto), 1 g (em azul), e sem qualquer adição de sal (em rosa). 49
Figura 19 - Amostra P2 tratada com β-glucuronidase, ensaio de 90 minutos com temperaturas de incubação 37°C (em vermelho) e 50°C (em verde). Ocorreu uma melhora na resolução de muitos picos, outros, no entanto, deixaram de ser detectados (setas). 50
Figura 20 - Amostra P2 sem tratamento com enzima (em vermelho) e com tratamento da enzima β-glucuronidase (em verde), ensaio de 90 minutos, 37°C, adição de 0,7 g de cloreto de sódio. 51

Figura 21 - Sobreposição de cromatogramas ilustrando análises para diferentes concentrações de β-glucuronidase: 100 U (em vermelho), 500 U (verde), 1000 U (em preto) e 2000 U (em vermelho); considerando-se uma mesma amostra (P2).....52
Figura 22 - Cromatogramas obtidos para uma análise de 500 µL de água, adicionada de sal (A), e do mesmo volume de água após processo de incubação com 500 U de β-glucuronidase, seguida da adição de sal (B).....53
Figura 23 - (a) Sobreposição dos cromatogramas obtidos, em torno do tempo de 14,00 minutos, nas análises das amostras dos voluntários do grupo controle 1 (linha em rosa) e 10 (linha em preto) e voluntários do grupo positivo 7 (linha em roxo) e 9 (linha em laranja); (b) espectro de massas no pico aos 13,94 minutos; (c) sugestão de identidade fornecida pela NIST08 junto ao espectro de massas padrão do composto 2-etil-1-hexanol.....71
Figura 24 - Indicação de VOCs incidentes apenas nas amostras positivas. Estão sobrepostos os cromatogramas obtidos para análise de suor dos voluntários com câncer 18SP (em azul) e 32SP (em preto), e “saudáveis” 1SC (em vermelho) e 29SC (em verde). Observação: não estão presentes nestas amostras, em específico, os picos correspondentes a 6,58; 7,53 e 27,11 minutos. 73
Figura 25 - (a) Sobreposição dos cromatogramas obtidos, em torno do tempo de 11,00 minutos, nas análises das amostras do voluntário do grupo controle 9SC (linha em preto) e voluntários do grupo positivo 16SP (linha em roxo) e 21SP (linha em laranja); (b) espectro de massas no pico aos 10,99 minutos; (c) sugestão de identidade fornecida pela NIST08 junto ao espectro de massas padrão do composto Hexanal.74
Figura 26 - (a) Sobreposição dos cromatogramas obtidos, em torno do tempo de 14,00 minutos, nas análises das amostras 10SC (linha em preto) e 32SP (linha em roxo) e 24SP (linha em laranja); (b) espectro de massas no pico aos 13,98 minutos; (c) sugestão de identidade fornecida pela NIST08 junto ao espectro de massas padrão do composto 3,3-dimetil-octeno. 75
Figura 27 - (a) Sobreposição dos cromatogramas obtidos, em torno do tempo de 15,50 minutos, nas análises das amostras dos voluntários do grupo controle 1SC (linha em rosa) e 10SC (linha em preto) e voluntários do grupo positivo 7SP (linha em roxo) e 9SP (linha em laranja); (b) espectro de massas no pico aos ~15,05 minutos; (c)

sugestão de identidade fornecida pela NIST08 junto ao espectro de massas padrão do composto 2-decen-1-ol e (d) Nonanal. 76
Figura 28 - (a) Sobreposição dos cromatogramas obtidos, em torno do tempo de 17,00 minutos, nas análises das amostras dos voluntários do grupo controle 1SC (linha em rosa) e 10SC (linha em preto) e voluntários do grupo positivo 7SP (linha em roxo) e 9SP (linha em laranja); (b) espectro de massas no pico aos ~16,90 minutos; (c) sugestão de identidade fornecida pela NIST08 junto ao espectro de massas padrão do composto Dodecanal e (d) Decanal. 77
Figura 29 - VOCs com incidência registrada apenas em amostra positivas de urina. Estão sobrepostos os cromatogramas dos voluntários 3UC (em vermelho), 4UC (em verde), 3UP (em preto) e 9UP (em azul). Observação: os VOCs em 13,77 e 17,92 minutos não foram detectados nestas amostras em particular. 90
Figura 30 - Em (A), cromatogramas sobrepostos mostrando a diferença nas respostas nos picos em ~14,15 e 14,42 minutos (setas indicando) nas amostras positiva 3UP (em preto) e 3UC (em vermelho). Abaixo, espectros obtidos para os tempos ~14,15 (B) e 14,42 minutos (C), respectivamente, seguidos dos espectros de referência para os possíveis compostos fenol (D) e 2,6-dimetil-octen-2-ol (E). 91
Figura 31 - Gráficos de distribuição de VOCs segundo a classe química, de acordo com (A) número de compostos, (B) frequência no número total de VOCs, por matriz. (*) VNCs: compostos voláteis de nitrogênio; (**) VSCs: compostos voláteis de enxofre. 96
Figura 32 - Esquematização do processo de preparo de amostras 113
Figura 33 - Cromatograma de amostra de suor fortificada com marcadores em 50 ng/adesivo e adicionadas de PI (50 ng). 121
Figura 34 - Cromatograma de amostra fortificada a nível do LIQ, adicionada de 13 interferentes voláteis a 1- 2 µg/adesivo.....123
Figura 35 - Cromatogramas sobrepostos para amostras de três indivíduos controle diferentes, demonstrando ausência de interferentes nas regiões (demarcadas) dos tempos de retenção dos analitos e PI, a não ser pelo próprio pico referente ao analito e presente na matriz.....123
Figura 36 - Amostra branco de suor, analisada logo após amostra do LSQ 124

Figura 37 - Curva analíticas obtidas para os marcadores- Suor 125
Figura 38 - Amostra fortificada com 10 ng de analitos, armazenada por 6 meses *versus* recém-preparada.....130
Figura 39 - Cromatogramas de amostras branco preparadas em ambos suportes 131
Figura 40 - Cromatogramas normal e obtidos sob diferentes formas de contaminação externa 132
Figura 41 - Cromatogramas obtidos para amostras de urina sem e com prévia incubação.....133
Figura 42 - Cromatograma para urina fortificada com 50 ng de analitos e PI (200 ng mL^{-1}) 134
Figura 43 - Cromatograma de urina fortificada ao nível do LIQ, adicionada de 13 interferentes voláteis a concentração de 1 – 2 µg mL^{-1} de urina. 135
Figura 44 - Cromatogramas para análise de urina de três indivíduos diferentes, demonstrando ausência de picos interferentes nas regiões dos analitos e PI 136
Figura 45 - Cromatograma demonstrando o “branco” da enzima para o método....136
Figura 46 - Cromatograma para amostra branco (urina isenta) após análise do LSQ 137
Figura 47 - Curvas analíticas construídas os marcadores- Urina.....138
Figura 48 - Urina positiva hidrolisada e analisada *vs.* reinjetada 18h após.....141
Figura 49- Esquema proposto para processo de peroxidação oxidativa. Adaptado de Miekisch, Schubert e Noeldge-Schomburg (2004). 147
Figura 50- Via do mevalonato. Adaptado de Mullen et al. (2016).....148
Figura 51- Cromatogramas sobrepostos para amostras, positivas (SP) e controle (SC), no suor 156
Figura 52- Cromatogramas sobrepostos para amostras, positivas (UP) e controle (UC), na urina.....157
Figura 53- Curvas ROC- marcadores no suor.....162
Figura 54- Curvas ROC- marcadores na urina.....163
Figura 55- Verificação- PCA (C= indivíduo controle; P= indivíduo positivo).....164
Figura 56- Perfil para adenocarcinoma de pulmão.....167
Figura 57- Perfil para adenocarcinoma de pâncreas/vias biliares 167

Figura 58- Perfil para CEC de boca/esôfago.....168
Figura 59- Perfil para adenocarcinoma gástrico.....169
Figura 60- Perfil para adenocarcinoma gástrico.....170
Figura 61- Perfil para neoplasia de rim.....171
Figura 62- Possível mecanismo de formação do Nonanal, através da peroxidação lipídica. Adaptado de Frankel (1980), Miekisch, Schubert e Noeldge-Schomburg (2004) e SCHAICH et al. (2013).....173
Figura 63- Possível mecanismo de formação do Decanal, através da peroxidação lipídica. Adaptado de Frankel (1980), Miekisch, Schubert e Noeldge-Schomburg (2004) e SCHAICH et al. (2013).....174
Figura 64- Possível mecanismo de formação do Octanal e Heptanal, através da peroxidação lipídica. Adaptado de Frankel (1980), Miekisch, Schubert e Noeldge-Schomburg (2004) e SCHAICH et al. (2013).....174
Figura 65- Possível mecanismo de formação do Hexanal e Pentanal, através da peroxidação lipídica. Adaptado de Frankel (1980), Miekisch, Schubert e Noeldge-Schomburg (2004) e SCHAICH et al. (2013).....175
Figura 66- Possível mecanismo de formação do Tridecano, através da combinação de radicais alquil (C5 e C8) formados anteriormente na peroxidação lipídica.....175
Figura 67- Possível mecanismo de formação do Fenol a partir de aminoácido aromático. Adaptado de Sato e Kumagai (2013).....176
Figura 68- Reações possivelmente envolvidas na produção de Limoneno e 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol. Adaptado de Croteaus e Satterwhite (1989) 177

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre as técnicas de extração de VOCs.....26
Tabela 2 - Alcanos reportados na literatura como biomarcadores 31
Tabela 3 - Programa de temperatura do forno 37
Tabela 4 - Tempos de retenção dos padrões alcanos obtidos para o método cromatográfico empregado.....38
Tabela 5 - Origens às quais as classes de VOCs no suor são geralmente atribuídas 56
Tabela 6 - Informações do grupo de controle (gênero, idade, diagnósticos médicos, quantidade observada de suor produzido e uso de tabaco e álcool durante o período monitorado). 59
Tabela 7 - Informações do grupo de indivíduos diagnosticados com câncer (gênero, idade, tipo de neoplasia, outros diagnósticos médicos, quantidade observada de suor produzido e uso de tabaco e álcool durante o período monitorado).....62
Tabela 8 - Perfil geral dos voluntários participantes- amostras de suor 64
Tabela 9 - Voláteis identificados como possíveis interferentes nas análises de suor65
Tabela 10 - VOCs mais frequentes nas amostras de suor analisadas.....66
Tabela 11 - Compostos mais incidentes, correlacionados com a literatura para VOCs no suor 66
Tabela 12 - Frequência dos VOCs detectados nas amostras de suor 67
Tabela 13 - Indicação de possíveis biomarcadores detectados em amostras de suor do grupo positivo e não detectadas no grupo controle. 71
Tabela 14 - VOCs que apresentaram respostas aumentadas nas amostras positivas 78
Tabela 15 - Informações do grupo de controle (gênero, idade, diagnósticos médicos e uso de tabaco e álcool durante o período anterior a 24h da coleta).....79
Tabela 16 - Informações do grupo de indivíduos diagnosticados com câncer (gênero, idade, tipo de neoplasia, outro diagnósticos médicos e uso de tabaco e álcool durante período anterior a 24 h da coleta) 81
Tabela 17 - Perfil geral dos voluntários participantes- amostras de urina 83

Tabela 18 - Voláteis identificados como possíveis interferentes para as análises de urina 83
Tabela 19 - Tabela de frequência para VOCs detectados nas amostras de urina 84
Tabela 20 - VOCs incidentes apenas nas amostras positivas de urina.....87
Tabela 21 - VOCs incidentes nos dois grupos estudados que apresentaram maior resposta com relação ao grupo controle 89
Tabela 22 - Outros compostos do suor com maior incidência no grupo positivo e registros na literatura os associando a um tipo de neoplasia 93
Tabela 23 - Distribuição de VOCs de acordo com a classe química, no suor e urina 95
Tabela 24 - VOCs correspondentes nas amostras de suor e urina.....97
Tabela 25 - Compostos de interesse- densidade e solubilidade 109
Tabela 26 - Marcadores selecionados e respectivos padrões internos.....111
Tabela 27 - Tempos de retenção dos analitos – Método HS-GC-FID 113
Tabela 28 - LDs, LIQs e CQs atribuídos aos analitos- Suor.....122
Tabela 29 - Efeito matriz: Fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN) e coeficientes de variação (CV%)- Suor.....126
Tabela 30 - Precisão intra e inter-corrida: coeficientes de variação (CV%) calculados- Suor.....127
Tabela 31 - Exatidão intra e inter-corrida: erros padrão relativos (EPR-%) calculados- Suor.....128
Tabela 32 - Ensaios de estabilidade dos analitos na matriz suor, em termos de desvio da concentração nominal (%).....129
Tabela 33 - Ensaio de estabilidade dos analitos em solução, em termos de desvio quanto à resposta analítica (%).....130
Tabela 34 - Desvios observados para respostas dos analitos na comparação entre *patch* e papel filtro 131
Tabela 35 - LDs, LIQs e CQs atribuídos aos analitos- Urina.....134
Tabela 36 - Efeito matriz: Fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN) e coeficientes de variação (CV%)- Urina.....138

Tabela 37 - Precisão intra e inter-corrida: coeficientes de variação (CV%) calculados- Urina.....139
Tabela 38 - Exatidão intra e inter-corrida: erros padrão relativos (EPR-%) calculados- Urina.....139
Tabela 39 - Ensaios de estabilidade dos analitos na matriz urina, em termos de desvio da concentração nominal (%).....140
Tabela 40 - Ensaio de estabilidade dos analitos em solução, em termos de desvio quanto à resposta analítica (%).....140
Tabela 41 - Dados dos voluntários, acerca de neoplasia e estadiamento 152
Tabela 42- Dados de quantificação dos marcadores- Suor.....157
Tabela 43- Dados de quantificação dos marcadores- Urina.....160
Tabela 44- Valores de cut-off obtidos para os marcadores.....161
Tabela 45- Correlações observadas 165

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(E)	Enzima
(S)/(U)	“no suor”/ “na urina”
ADH	Álcool desidrogenase
ALDH	Aldeído desidrogenas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
C(n°)	Unidades de carbono na cadeia molecular
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEC	Carcinoma de célula escamosas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CQ	Controle de qualidade
CQA	Amostra de controle de qualidade de alta concentração
CQB	Amostra de controle de qualidade de baixa concentração
CQM	Amostra de controle de qualidade de média concentração
CV	Coeficiente de variação
E	Enzima/Tratado com enzima
ECG	Estágio clínico geral
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
EPR	Erro padrão relativo
FID	Detector por ionização de chama
FMN	Fator de matriz normalizado por padrão interno
GC	Cromatografia em fase gasosa
HS	*Headspace*
INCA	Instituto Nacional de Câncer

IPP	Isopentenil pirofosfato
K	Coeficiente de partição para o *Headspace*
LD	Limite de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
MS	Espectrometria de massas
MVA	Via do mevalonato
NaCl	Cloreto de sódio
ND	Não-detectado
NVC	Composto volátil de nitrogênio
PBS	Tampão fosfato
PCA	Análise de Componentes Principais
PI	Padrão interno
R	Coeficiente de determinação linear
ROC	*Receiver Operating Characteristic Curve*
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SC	Suor controle
SP	Suor positivo
SPME	Microextração em Fase Sólida
SVC	Composto volátil de enxofre
U	Unidade de atividade enzimática
UC	Urina controle
UP	Urina positiva
VEGF- A	Fator de crescimento endotelial vascular
VOC	Composto orgânico volátil

SUMÁRIO

RESUMO v

ABSTRACT vi

LISTA DE FIGURAS vii

LISTA DE TABELAS xiii

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS xvi

CAPÍTULO I – INVESTIGAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM AMOSTRAS DE SUOR COMO BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO DE CÂNCER- DELINEAMENTO DA PESQUISA 1

1. INTRODUÇÃO 2

1.1. Câncer, teoria do processo de carcinogênese e diagnóstico 2

1.2. Compostos orgânicos voláteis como biomarcadores 10

1.3. Suor: potencial de aplicação na área clínica 13

2. JUSTIFICATIVA DO PROJETO 17

3. OBJETIVOS GERAIS 19

4. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA 19

5. PROCEDIMENTO DE COLETA DE AMOSTRAS 20

CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA AVALIAÇÃO COMPREENSIVA DE VOCs 23

1. INTRODUÇÃO 24

2. OBJETIVOS 26

3. MÉTODO 27

3.1. Materiais e reagentes 27

3.2. Metodologia experimental 28

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 37

4.1. Desenvolvimento e otimização das condições de análise- Suor.....37
4.2. Verificação de interferentes da análise- Suor 45
4.3. Desenvolvimento de método e otimização- Urina.....46
4.4. Verificação de interferentes da análise- Urina 52
5. CONCLUSÕES 53
CAPÍTULO III- AQUISIÇÃO DE PERFIS DE VOCs EM AMOSTRAS REAIS E SELEÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES 54
1. INTRODUÇÃO 55
2. OBJETIVOS 56
3. MÉTODO.....57
3.1. Materiais e reagentes.....57
3.2. Metodologia experimental 57
3.3. Análise de amostras reais- Suor 57
3.4. Análise de amostras reais- Urina 58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....59
4.1. Análise de amostras reais- Suor 59
4.2. Análise de amostras reais- Urina 79
4.3. Considerações 91
4.4. Comparação: Suor e Urina 94
4.5. Seleção e confirmação de marcadores.....99
5. CONCLUSÕES 99
CAPÍTULO IV- VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE MARCADORES.....101
1. INTRODUÇÃO 102
1.1. Análise GC-FID.....102
1.2. Validação analítica.....102

2. OBJETIVOS 106
3. MÉTODO 106
3.1. Materiais e reagentes 106
3.2. Metodologia experimental 107
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 121
4.1. Validação analítica- Suor 121
4.2. Verificação da influência da substituição do PharmChek® por papel filtro 131
4.3. Verificação da influência da contaminação do *patch* por produtos cosméticos 132
4.4. Validação analítica- Urina 133
4.5. Eficiência da interrupção da atividade da enzima/ Estabilidade pós-processamento com enzima 140
4.6. Considerações 141
5. CONCLUSÕES 143
CAPÍTULO V- DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES NAS AMOSTRAS E ASSOCIAÇÕES ENTRE VOCs E O CÂNCER 145
1. INTRODUÇÃO 146
1.1. Estresse oxidativo 146
1.2. Alterações na atividade enzimática 148
1.3. Efeito Warburg 148
1.4. Alterações na via do mevalonato 148
1.5. Expressão gênica individual 150
2. OBJETIVOS 150
3. MÉTODO 150
3.1. Quantificação dos analitos nas amostras 150

3.2. Abordagens estatísticas 151
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 151
4.1. Dados e quantificação dos marcadores 151
4.2. Curvas ROC 160
4.3. Análise de componentes principais 163
4.4. Tentativa de se estabelecer correlações 165
4.5. Possíveis relações entre alterações metabólicas e formação dos marcadores propostos 172
5. CONCLUSÕES 177
REFERÊNCIAS 179
APÊNDICE 1- VOCs identificados em amostras de suor de voluntários do grupo controle 201
APÊNDICE 2- VOCs identificados em amostras de suor de voluntários do grupo positivo 208
APÊNDICE 3- VOCs identificados em amostras de urina de voluntários do grupo controle 220
APÊNDICE 4- VOCs identificados em amostras de urina de voluntários do grupo positivo 235
ANEXO 1- Termo de consentimento livre e esclarecido 266
ANEXO 2- Carta De Acordo- Unidade de Pesquisa Clínica 268
ANEXO 3- Carta de aprovação do CEP FFCLRP- USP 269
ANEXO 4- Carta de aprovação do CEP HC-FMRP/USP 270
ANEXO 5- Carta de aprovação de emenda - CEP FFCLRP- USP 271

CAPÍTULO I – INVESTIGAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM AMOSTRAS DE SUOR COMO BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO DE CÂNCER- DELINEAMENTO DA PESQUISA

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer, teoria do processo de carcinogênese e diagnóstico

Atualmente, o câncer representa um grande problema de saúde pública na realidade mundial. Os dados estatísticos mais recentes sobre a incidência e mortalidade relacionados ao câncer pertencem à Organização Mundial de Saúde, e são de 2012. As pesquisas registram que a incidência mundial do câncer é de quase 14 milhões, e de 437 mil no país, sendo que a mortalidade em decorrência do câncer chega a aproximadamente 8,2 milhões de mortes no mundo, e mais de 224 mil no Brasil (GLOBOCAN, 2012).

O câncer pode ser definido como um conjunto de patologias caracterizadas pelo desenvolvimento anormal de grupos de células, devido a um mau funcionamento nos sistemas promotores do crescimento, fazendo com que estas se proliferem inapropriadamente. O aglomerado celular resultante, ou tumor, pode ser considerado “benigno” se a multiplicação das células ocorre de forma lenta, mais controlada, e “maligno” se a multiplicação das células ocorre muito rapidamente e as células manifestam um maior grau de autonomia, possuindo a capacidade de se infiltrar pelos tecidos adjacentes. Há ainda, neste último caso, uma progressão do risco oferecido quando as células cancerosas, através da corrente sanguínea ou do sistema linfático, conseguem alcançar outras regiões do corpo (processo de metástase), “colonizando-as” e assim propiciando a formação de novos tumores. (SOMPAYRAC, 2004).

Hanahan e Weinberg (2000, 2011), no intuito de produzir a racionalização de forma organizada das complexidades das doenças neoplásicas, apresentaram estas como sendo constituídas de uma série de princípios fundamentais. Cada princípio seria uma competência biológica característica adquirida durante o desenvolvimento dos tumores humanos (*hallmarks of cancer*) e tais capacidades compreenderiam processos complementares que permitem o crescimento do tumor e a metástase.

Um primeiro fator é que as células cancerosas desregulam sinais promotores de crescimento controlados tipicamente pelos tecidos normais. Tal capacidade lhes

permite sustentar e estimular o próprio crescimento. Para tanto, podem estar presentes mecanismos de produção de ligantes destes fatores pelas próprias células, estímulo das células normais adjacentes ao tumor para recrutar fatores de crescimento ou mesmo elevação dos níveis de proteínas receptoras na superfície celular, tornando-as células mais responsivas a esse tipo de sinalização (HANAHAN, WEINBERG, 2011).

Como evidências, verificam-se situações de mutações somáticas presentes nas células tumorais relacionadas à ativação de rotas de sinalização que usualmente são acionadas por receptores de fatores de crescimento, e defeitos no *feedback* negativo que regula a homeostase de sinais, fatores capazes de promover a sinalização pró- proliferação (BARDEESY; SHARPLESS, 2006).

A proliferação crônica e descontrolada das células no câncer também representa a possível existência de um desregulamento do metabolismo energético celular. Pesquisadores observaram que as células cancerosas alteram sua produção de energia, por meio da reprogramação do metabolismo de glicose, isso é feito pela limitação de seu metabolismo a, em grande parte, glicólise, mesmo na ampla presença de oxigênio (é o chamado estado de glicólise aeróbica ou “efeito Warburg”). Esse tipo de mecanismo é menos eficiente para a geração de ATP do que a fosforilação oxidativa que ocorre nas mitocôndrias, o que é compensado pela regulação positiva de transportadores de glicose. (DEBERARDINIS *et al.*, 2008; JONES; THOMPSOM, 2009).

Ainda não foi definida uma razão funcional para tal estímulo da glicólise, porém, segundo VANDER HEIDEN *et. al* (2009), este fator permite o desvio de intermediários em várias vias biossintéticas, como as que se encarregam de gerar nucleosídeos e aminoácidos, o que facilitaria a biossíntese de macromoléculas e organelas requeridas para a formação das novas células. Esta ideia é suportada também pelo fato de que tal configuração da atividade metabólica foi verificada em muitos tecidos embrionários em situação de rápida divisão celular (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; JONES; THOMPSOM, 2009).

Observou-se que os tumores se desenvolvem mais frequentemente e mais rapidamente em organismos com deficiências imunológicas. Para o tumor progredir,

possivelmente as células cancerosas também possuem competências para contornar os programas de destruição imunológica que monitoram os tecidos (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Além de estimularem a própria proliferação, as células cancerosas também devem ser hábeis em driblar mecanismos que regulam negativamente a proliferação celular, e muitos destes mecanismos dependem da ação de genes que são supressores tumorais (trabalham na limitação da proliferação das células, como exemplos principais, as proteínas RB e TP53). Os mesmos supressores foram encontrados inativados de alguma forma (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Uma das formas de inibição da proliferação é a inibição por contato, que ocorre por meio dos contatos célula-célula (geração de monocamadas) e esta apresentava-se ausente em vários tipos de câncer. A proteína β-TGF, conhecida por seus efeitos antiproliferativos, foi encontrada em tumores afastada de sua função original, ativando o processo que anteriormente inibia (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004).

O programa de morte celular representa mais um empecilho para a neoplasia. A apoptose pode ser desencadeada devido ao estresse fisiológico que as células experimentam durante a carcinogênese, este é gerado pela perda da homeostase relacionada ao desbalanço de moléculas sinalizadoras e dano ao DNA. A apoptose decai com a progressão do tumor à malignidade, demonstrando a aquisição de resistência dessas células à morte (JUNTTILA; EVAN, 2009). A mesma situação também se relaciona com a resistência da doença ao tratamento (ADAMS; CORY, 2007).

Dentre as estratégias para superar a ação do maquinário apoptótico estão a perda da função do sensor TP53 (responsável por regular a apoptose por expressão de proteínas em resposta a danos ao DNA e anormalidades nos cromossomos), e o aumento da expressão de reguladores anti-apoptóticos (JUNTTILA; EVAN, 2009).

Já a necrose celular é caracterizada pelo inchaço da célula seguida de seu rompimento, com a liberação de sinais pró-inflamatórios no tecido, que recrutam células inflamatórias do sistema imunológico. Este tipo de célula é um provável promotor tumoral, pois aparenta promover a angiogênese (discutida mais adiante) e pode liberar reguladores bioativos que estimulam as células vizinhas a se

multiplicarem (potencial de aumentar a progressão da neoplasia) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Os processos inflamatórios estariam então permitindo que neoplasias incipientes alcançassem as marcas características do câncer. A inflamação pode contribuir fornecendo biomoléculas ativas para a região do tumor, tais como fatores de crescimento, de sobrevivência, modificadores da matriz extracelular, entre outras envolvidas nos programas existentes na formação e desenvolvimento do tumor. Além disso, o processo inflamatório ainda poderia liberar agentes químicos, no caso, espécies reativas de oxigênio, que são ativamente mutagênicas para as células, acelerando a evolução genética para estados de aumentada malignidade (DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Mais um conceito marcante é a maneira como as células conseguem habilitar a “imortalidade replicativa”. Uma célula normal participa de ciclos de divisão celular um número limitado de vezes, quando o limite é atingido, a célula começa a entrar no estágio de senescência (envelhecimento), passa por um estágio de “crise”, e finalmente chega à morte. As células cancerosas demonstraram sobreviver com eficiência ao estágio de crise, não contemplando a fase de morte (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Uma explicação pode surgir com relação aos telômeros. O envelhecimento celular se encontra ligado ao encurtamento progressivo dos telômeros (estruturas repetitivas de proteínas e DNA não-codificante que protegem as extremidades do DNA). Em células do câncer foi observada um grande aumento (de aproximadamente 90%) na expressão da telomerase (polimerase que adiciona tais estruturas) (BLASCO, 2005).

Em adição, a proliferação anormal de células demanda a criação de novos vasos sanguíneos, a fim de se suprir as necessidades destas células do tumor por nutrientes e oxigenação, para que se mantenham vivas. A neovascularização é possibilitada pelo processo de angiogênese. Essa situação faz com que o fluxo sanguíneo, e, por consequência, os nutrientes, sejam deslocados para a irrigação do grupo de células tumorais, tornando as células comuns do tecido carentes em suprimentos (SOMPAYRAC, 2004; DOMINGUES, 2012).

Os mecanismos que levam a este acontecimento são governados por reguladores angiogênicos, dos quais alguns são proteínas sinalizadoras que se ligam a receptores na superfície celular das células endoteliais vasculares (BAERISWYL; CHRISTOFORI, 2009).

Um dos fatores envolvidos é o indutor da angiogênese, o fator de crescimento endotelial vascular- A (VEGF- A). Estudos (FERRARA, 2009) mostram que a expressão de VEGF pode ser regulada positivamente pela sinalização de oncogenes (genes que, após sofrerem mutações, se encontram relacionados, de alguma forma, ao desenvolvimento de tumores).

A progressão do câncer para um estágio de maior malignidade está associada à consolidação da invasão local. As células envolvidas desenvolvem alterações em sua forma de adesão entre si. Perdida a adesão, surgem as propriedades invasivas e migratórias da célula e sua capacidade de disseminação (metástase). Neste contexto, o processo em que isso ocorre é o denominado transição epitelial-mesenquimal (EMT) (CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004).

O EMT é controlado por um conjunto de fatores de transcrição. Nos tumores, agentes indutores do EMT são tipicamente encontrados. Uma das alterações características melhor consolidada é a observação de uma perda na expressão de E-caderina, a qual se trata de uma molécula importante para a adesão célula-célula. (CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

É possível perceber que uma sucessão de alterações genômicas que sofre a célula neoplásica é que lhe confere vantagens seletivas. As células em questão possuem alto índice de mutação. Acredita-se que essa mutabilidade seja alcançada por um aumento na sensibilidade a agentes mutagênicos e/ou pela ruptura com componentes da maquinaria de manutenção genômica (BERDASCO; ESTELLER, 2010; JACKSON; BARTEK, 2009).

Os defeitos na manutenção e reparação do genoma são seletivamente favoráveis para o desenvolvimento do tumor. Assim, a instabilidade do genoma é claramente uma marca característica que está relacionada com o alcance de outras etapas da carcinogênese (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A Figura 1 mostra um esquema das características do câncer como um processo.

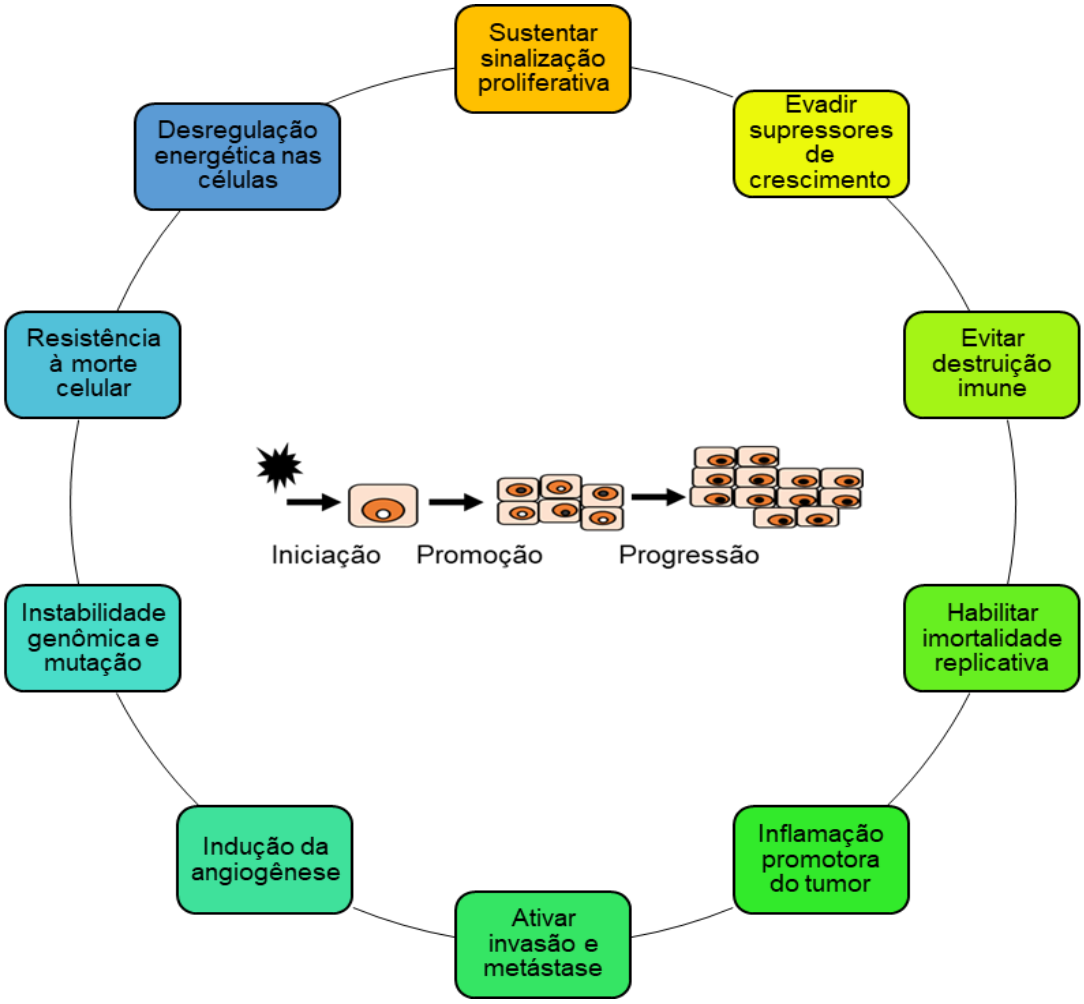


Figura 1 - Características do câncer como um processo. Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011) e Ministério da Saúde (1996).

Muitos estudos demonstram também a associação entre estresse oxidativo e câncer, processos inflamatórios e envelhecimento celular. O estresse oxidativo pode ser explicado como o efeito de uma quantidade excessiva de espécies oxidantes no meio, sem que haja, em contrapartida, balanceamento deste excesso através da atuação do sistema de defesa antioxidante (espécies antioxidantes produzidas pelo corpo ou provindas da dieta) (BARREIROS; DAVID, J.M.; DAVID, J.P, 2006), o que resulta na perda do equilíbrio homeostático (BARBOSA *et al*., 2010).

Os processos oxidativos decorrentes têm a capacidade de danificar as biomoléculas, afetando suas estruturas e funções: essa condição pode promover o ataque de lipídios das membranas e agressão às proteínas dos tecidos e das

membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS; DAVID, J.M.; DAVID, J.P, 2006).

Os danos oxidativos ao DNA causados por espécies reativas de oxigênio são apontados como importante fator ligado aos estágios de iniciação, promoção e progressão (fase correspondente ao desenvolvimento desordenado das células) da carcinogênese (LOFT; POULSEN, 1996; COOKE *et al*., 2003).

Nestas condições, o DNA, entre outras circunstâncias, é capaz de sofrer alterações estruturais, o que inclui a ocorrência de mutações, rearranjos, deleções e inserções. Além disso, as espécies oxidantes reativas seriam responsáveis também por atuar na regulação de genes ligados à proliferação, diferenciação e apoptose das células (WISEMAN; HALLIWELL, 1996).

Os métodos diagnósticos de câncer muitas vezes consistem em técnicas de diagnóstico por imagem (como ultrassom, radiografia, cintilografia, imagem por ressonância magnética), que podem ser extremamente úteis na função de se localizar possíveis tumores. Podem também ser realizados exames de sangue para indicar a existência de tumores: é o caso da análise dos níveis de antígeno prostático específico (PSA) no diagnóstico do câncer de próstata. Na endoscopia, um tubo flexível equipado com uma pequena câmera permite obter imagens do interior do corpo e localizar regiões suspeitas da presença de tumores ou outras anormalidades (ITC; INCA, 2012).

Estas técnicas, em geral, são complementadas por um cuidadoso exame histológico. Na biópsia, uma pequena quantidade de tecido da região em que se suspeita que haja o tumor é coletada, através de uma agulha ou de outro procedimento cirúrgico capaz de remover essa amostra de tecido. A amostra então é submetida a uma análise histopatológica, em que o exame das células pode inclusive indicar em que estágio de desenvolvimento o tumor se encontra (ITC; INCA, 2012).

O desenvolvimento de recentes métodos de análise tem tido como foco o emprego como nova ferramenta de diagnóstico, capaz de detectar doenças inclusive em seus estágios iniciais, uma vez que é sabido que, quanto mais rapidamente é

realizada a identificação de uma doença, mais cedo o paciente poderá se submeter a outros exames confirmatórios e iniciar um tratamento.

No caso do câncer, em particular, os tumores malignos se desenvolvem rapidamente. Com o passar do tempo, maiores são as chances de as células tumorais sofrerem metástase, e, consequentemente, de generalizar a doença pelo organismo, tornando o tratamento muito difícil.

Ainda com relação ao câncer, os sintomas observados podem ser os mais variados, não diferenciáveis de outros vários tipos de doenças, podendo ser detectado em vários estágios de evolução histopatológica e clínica (INCA, 2008). Este fator também está ligado ao fato de que os pacientes portadores de câncer não costumam se dirigir diretamente a um especialista quando os sintomas aparecem, ou somente se dirigem quando sinais mais drásticos e perceptíveis (como lesões) são observados, o que para alguns tipos de câncer já são indicativos de que este se encontra em estágio avançado.

Adicionalmente, em detrimento dos problemas no sistema de saúde, até que o paciente seja atendido uma série de vezes necessárias, e a doença seja confirmada, o início do tratamento já foi bastante adiado. Na realidade brasileira, segundo Instituto Nacional do Câncer (INCA), 70% dos diagnósticos de câncer são feitos por médicos não-oncologistas.

Certos tipos de câncer ainda não possuem métodos de detecção precoce, é o caso, por exemplo, do seminoma metastático (um tumor do testículo) e alguns tumores que afetam crianças, como a leucemia aguda e os linfomas (INCA, 2012).

Cada vez com maior frequência, a análise dos perfis de determinados compostos de interesse mediante diferentes circunstâncias biológicas surge no intuito da criação de métodos de *screening* ou rastreamento. Métodos de *screening* podem ser explicados como sendo métodos capazes de promover a identificação presuntiva de alterações do estado de saúde, as quais não puderam ser reconhecidas anteriormente (por estarem, por exemplo, em fase assintomática), por intermédio de exames clínicos ou laboratoriais (ELUF NETO; WÜNSCH FILHO, 2000), que, de preferência, sejam simples e de baixo custo, para que possam ser empregados em escalas maiores do que os métodos diagnósticos habituais.

Os métodos de *screening* se situam na possibilidade de diagnosticar precocemente doenças, de modo que os indivíduos classificados, em face do teste, como suspeitos de portá-la, possam dirigir-se mais rapidamente a um tratamento, o que está profundamente ligado ao aumento de chances de cura.

A carcinogênese é um processo complexo, em que participam diversos mecanismos associados a alterações metabólicas nas células. Uma vez gerados, metabólitos característicos podem sofrer transformações, sendo oxidados a compostos menores através de reações enzimáticas (catalisadas, por exemplo, pelas enzimas Citocromo P450), ou permanecer com a estrutura inalterada, sendo incorporados à corrente sanguínea (VAN DE KANT *et al*., 2012). Na corrente sanguínea, estas substâncias se distribuem para outros fluidos biológicos, e é este princípio que torna possível a análise de compostos de interesse em matrizes diversas. Nesta oportunidade estão incluídos os compostos orgânicos voláteis (*Volatile Organic Compounds*), ou, abreviadamente, VOCs.

1.2. Compostos orgânicos voláteis como biomarcadores

Na literatura, o conceito de VOCs pode estar ligado a diferentes temas. Além de se tratarem de um grupo de compostos com pontos de ebulição relativamente baixos, altas pressões de vapor, e, em geral, baixos pesos moleculares, podem ser explicados, no contexto ambiental, como poluentes e contaminantes da água ou liberados na atmosfera, através de emissões naturais e antropogênicas, ou ainda, como agentes químicos presentes no ambiente ocupacional e associados a doenças do trabalho.

A abordagem dos VOCs como compostos endógenos (mais precisamente, os perfis característicos que descrevem), tem importante relação com a formulação de diagnósticos clínicos, os quais, na década de 70 detinham-se principalmente na avaliação de desordens metabólicas, devido às limitações pertinentes aos métodos experimentais utilizados (ZLATIKS; BRAZELL; POOLE, 1981). Os conceitos lançados nessa época começaram a demonstrar sua importância com a análise dos VOCs, em urina e ar exalado, como um meio de se obter informações a respeito da qualidade da

dieta humana, com potencial para assistir a medicina ortomolecular (PAULING *et al.* 1971). Mais tarde, outros estudos de destaque, realizaram a investigação dos perfis destes compostos em portadores de diabetes mellitus, insuficiência renal e infecções por vírus, mediante comparação com os perfis de indivíduos saudáveis, obtendo resultados satisfatórios (ZLATIKS; BRAZELL; POOLE, 1981).

Neste cenário atual, os conceitos adquiriram aspectos mais complexos e o interesse por pesquisar os VOCs na função de biomarcadores é crescente. Biomarcadores podem ser definidos como moléculas cuja presença (verificada experimentalmente) indica respostas a determinadas condições fisiológicas, as quais podem se encontrar alteradas do normal, mantendo relação com patologias e exposição a efeitos tóxicos, possuindo assim, utilidade clínica (FUNG; WRIGHT; DALMASSO, 2000).

Os VOCs podem ser investigados com diferentes propósitos e em diferentes matrizes, incluindo sangue, urina, saliva e ar exalado. De modo geral, os VOCs analisados são alcanos, aromáticos, aldeídos e seus derivados (ALTOMARE *et al.*, 2012).

Alguns exemplos de registros existentes de análise de VOCs presentes na urina, têm por objetivo a detecção de compostos orgânicos tóxicos inalterados (como xileno e tolueno) relacionados à exposição ocupacional (JANASIK; JAKUBOWSKI; JAŁOWIECKI, 2008; WANG *et al.*, 2007) ou de compostos tóxicos e seus metabólitos presentes no ambiente e constituintes da fumaça do cigarro (ALWIS *et al., 2012*). Outros visam verificar a aplicabilidade da urina como matriz capaz de discriminar pacientes saudáveis de pacientes portadores de tuberculose, baseando-se, da mesma forma, nas modificações do metaboloma (conjunto de metabólitos produzidos por um organismo) sofridas devido ao processo infeccioso da doença (BANDAY *et al.*, 2011).

Em amostras de sangue, a finalidade mais explorada é avaliar a exposição ambiental a substâncias tóxicas. Na área forense, os VOCs presentes no sangue post-mortem, órgãos e restos da deterioração humana, demonstraram permitir uma correlação com abuso de solventes (TRANTHIM-FRYER; HANSSON; NORMAN,

2001), auxiliar na construção de perfis de emissão de substâncias conforme os estágios da decomposição humana e auxiliar na análise do impacto ambiental pertinente (STATHEROPOULOS *et al.,* 2007) e, no trabalho com amostras diversas, possuir aplicação no resgate de pessoas soterradas e localização de cadáveres (HOFFMAN *et al.*, 2009; STATHEROPOULOS *et al.,* 2005).

Dos capilares sanguíneos, os VOCs alcançam os alvéolos pulmonares e são exalados com a expiração (ALTOMARE *et al.*, 2012), com isso, estudos mais recentes utilizam técnicas de amostragem de ar exalado com aparato apropriado. A amostra então é geralmente analisada por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de espectrometria de massas. Com técnicas como essas, doenças do pulmão como câncer (PHILLIPS *et al*., 1999; PHILLIPS *et al*., 2003b; BAJTAREVIC *et al*., 2009; RUDNICKA *et al.*, 2009; BUSZEWSKI *et al*., 2012ab), asma (DRAGONIERI *et al*., 2007; FENS *et al*., 2009) e tuberculose (PHILLIPS *et al.*, 2007a; SYHRE *et al*., 2009; PHILLIPS *et* al., 2012; KOLK *et al.*, 2012), a infecção causada pela bactéria *Helicobacter pylori* (ULANOWSKA *et al*., 2010), câncer de mama (PHILLIPS *et al.*, 2003a; PHILLIPS *et al*., 2010) e câncer colorretal (ALTOMARE *et al*., 2013), estão sendo investigadas por grupos internacionais, apresentando resultados cada vez mais conclusivos com relação à capacidade discriminadora entre indivíduos saudáveis e com câncer.

Acredita-se que estudo de VOCs como biomarcadores do câncer surgiu a partir de relatos publicados no periódico *The Lancet*, nos anos de 1989 e 2001, indicando que que cães seriam capazes de detectar a doença (WILLIAMS, PEMBROKE, 1989; CHURCH, WILLIAMS, 2001). Segundo o reportado por estes casos, os cães mostravam interesse persistente e espontâneo por uma determinada lesão no corpo de seus donos, após algum tempo a lesão foi diagnosticada como um melanoma e, após a excisão, os cães perderam o interesse manifestado anteriormente.

Pesquisas como estas consistem fundamentalmente na verificação do perfil cromatográfico dos VOCs nas amostras coletadas, então, é realizada uma identificação dos VOCs com poder discriminativo. Os dados levantados algumas vezes são associados a modelos estatísticos preditivos que funcionam como “testes

cegos", que estimam a probabilidade de doença frente aos resultados de cada indivíduo participante.

Algumas pesquisas demonstraram o potencial dos VOCs de estarem diretamente associados a algumas patologias de forma diferenciada: AMAL *et al. (2012)* tiveram o intuito de realizar a detecção do carcinoma hepatocelular analisando os VOCs presentes no *Headspace* de culturas celulares, contendo células cancerosas com alto e baixo potencial de metástase e células normais, utilizando-se de sensores baseados em nanomateriais. FILIPIAK *et al.* (2008) estudaram os VOCs emanados de culturas de células com o propósito de identificar compostos derivados de células cancerosas do pulmão.

O processo tido como principal mecanismo na formação destes VOCs diferenciados associados ao câncer é a peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares, reação também consequente do estresse oxidativo, a qual relaciona-se primariamente com a formação de hidrocarbonetos voláteis, que podem vir a sofrer transformações pela ação de enzimas.

1.3. Suor: potencial de aplicação na área clínica

Embora sejam bastante diversificadas as pesquisas envolvendo os VOCs, e em diferentes tipos de amostras, existem poucas publicações na literatura abordando os VOCs presentes no suor mediante o desenvolvimento de um método analítico, especialmente no que possam ser relacionados com doenças. Como um dos primeiros registros têm-se a detecção e identificação do composto ácido *trans*-3-metil-2-hexenóico, encontrado no suor de pacientes esquizofrênicos e conferindo-lhe odor peculiar (SMITH; THOMPSON; KOSTER, 1969).

A análise de compostos voláteis através de sensores químicos *(eletronic nose)* presentes no suor serviu de método para o estudo de VOSS *et al.* (2012) que buscavam relacionar as interações moléculas-sensor, identificadas por mudanças na condutividade elétrica (condição dependente do perfil de compostos presentes nas amostras) com a possibilidade de detectar a insuficiência cardíaca em indivíduos. Tal

possibilidade existiria devido a uma deficiência metabólica propriamente causada pela doença.

Atualmente, no campo clínico, o suor tem como aplicação prática mais comum seu emprego no método padrão ouro no diagnóstico da fibrose cística, baseado na dosagem de cloreto. Esta doença é caracterizada por disfunção em uma enzima responsável pelo transporte de íons cloreto, gerando perda de água por osmose das secreções mucosas e consequentemente tubulopatia obstrutiva devido ao aumento da viscosidade dos fluidos (RIBEIRO et al., 2002). Substâncias inorgânicas como traços de metais tóxicos já foram avaliados na matriz (SEARS et al., 2012), assim como glicose, que estaria correlacionada aos níveis sanguíneos (MOYER et al., 2012; BANDODKAR et al., 2014) e eletrólitos (GAO et al., 2016), sendo inclusive base para o desenvolvimento de sensores específicos de monitoramento que podem ser fixados na pele. Na área da metabolômica Mena-Bravo et al. (2014) produziram uma revisão sobre aplicações do suor. Calderon-Santiago et al. (2015) verificaram marcadores não-voláteis do câncer de pulmão nesta matriz.

O suor é produzido pelas glândulas sudoríparas écrinas (as quais são mais abundantes) e apócrinas. O suor total coletado inclui ainda o sebo, gerado pelas glândulas sebáceas. Este é um fluido que possui pH ácido, entre 4,4 e 5,5 e acredita-se que a produção diária de suor em um indivíduo varie de 300 a 700 mL. Quando na superfície da epiderme, se evapora lentamente, cumprindo desta maneira a função de contribuir para a manutenção da temperatura do corpo. Sua composição é basicamente dada por água (em sua maior parte), eletrólitos, açúcares, aminoácidos, ureia, lactato e outros compostos orgânicos (KUTYSHENKO *et al.*, 2011), dentre estes últimos, constam substâncias (endógenas e exógenas) excretadas (DE GIOVANNI; FUCCI, 2013). A Figura 2 ilustra um esquema da composição do suor.

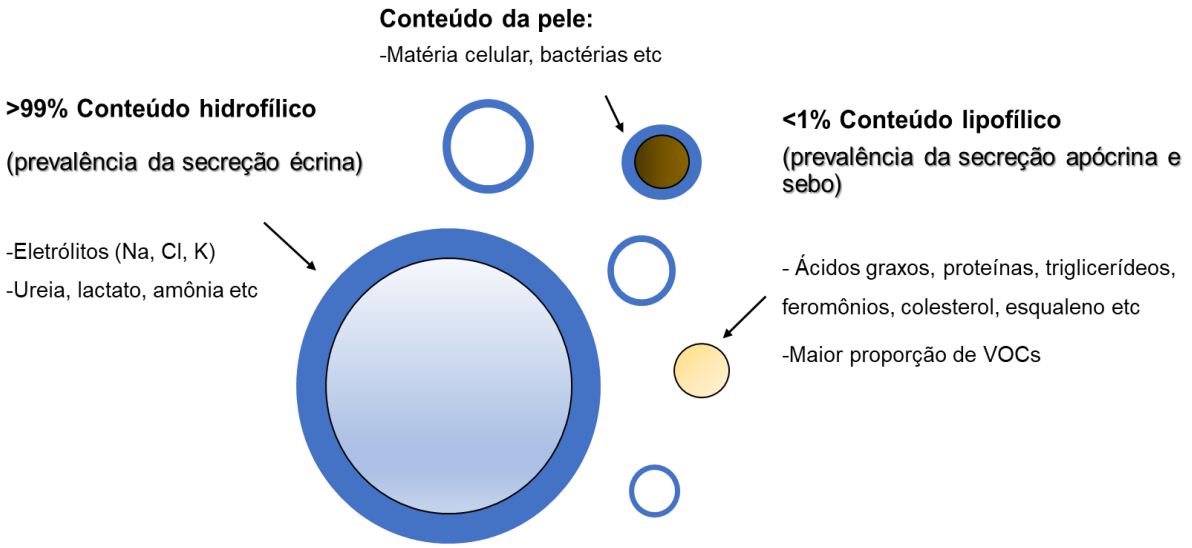


Figura 2- Esquematização da composição do suor. Adaptado de Hussain et al. (2017)

Nas camadas interiores da pele, vasos sanguíneos compõem uma rede de capilares ao redor das porções secretoras de suor (HIBSS; BURCH; PHILLIPS, 1958). Investiga-se ainda hoje por quais mecanismos certas substâncias, como drogas, chegariam da corrente sanguínea até as glândulas sudoríparas e assim estariam presentes no suor. Acredita-se que o mecanismo primário ocorra através de difusão passiva, que aconteceria dos capilares até as glândulas sudoríparas. As substâncias também poderiam se difundir através das camadas derme e epiderme da pele, e os fatores que podem influenciar os processos de distribuição são lipofilicidade, tamanho molecular e pKa da molécula em questão (KACINKO *et al.*,2005). A Figura 3 demonstra um corte das camadas internas da pele.

O suor é uma matriz alternativa, ainda pouco explorada, tendo sido, nos últimos anos, empregada para detecção de drogas de abuso e seus metabólitos, permitindo realizar monitoramentos do uso de tais substâncias ilícitas com eficácia. Pesquisas nesse sentido já foram realizadas para análise de cocaína, heroína, anfetaminas, metanfetaminas, ecstasy e Δ-9-THC, neste sentido, as revisões de Fortner (2008), De Giovanni e Fucci (2013), Jadoon et al. (2015), oferecem um panorama geral.

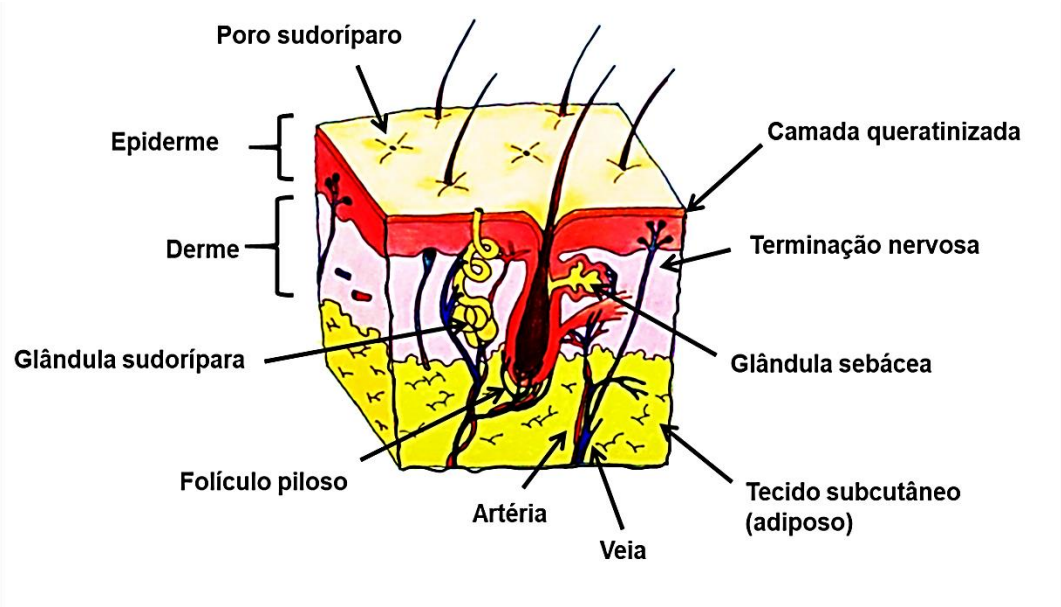


Figura 3 - Camadas da pele e porções secretoras de suor

Para a coleta do suor existem dispositivos próprios, disponíveis comercialmente (PharmChek®*patchs*). Basicamente, consistem em uma bandagem absorvente de celulose, onde as substâncias são depositadas, que é aderida à pele por um adesivo adjacente. Uma camada de poliuretano protege o dispositivo de contaminações externas, enquanto permite a troca gasosa entre pele e ambiente, não prejudicando o tecido (KACINKO et *al.,* 2005, UEMURA et *al*., 2004). A pele é limpa antes de o adesivo ser aplicado, geralmente com *swab* embebido em isopropanol 70%, para remover substâncias ali previamente existentes (KIDWELL; SMITH, 2000).

Podem ser citadas, como vantagens do uso dessa matriz, o fato da coleta ser não-invasiva, mais segura, além disso, a amostra é de fácil manuseio e fornece uma maior janela de detecção para a identificação de substâncias de interesse. Algumas das desvantagens pertinentes são: a concentração não muito alta dos analitos (pode não representar uma soma acumulada das substâncias ali depositadas, devido aos possíveis fenômenos de reabsorção da droga pela pele e de alguma perda para o ambiente) (UEMURA *et al*., 2004), a atuação de variáveis que alteram a quantidade de amostra que pode ser obtida, sendo estas internas (o quanto de suor é produzido por determinado indivíduo) ou externas (condição de exercício físico, temperatura ambiente etc) (KACINKO *et al*., 2005).

Considerando os registros existentes das aplicações do suor na toxicologia analítica, esta matriz possui potencial de representar dados relacionados às substâncias presentes no sangue, sendo possível, portanto, estar também apta a fornecer informações no tocante a identificação de condições de alterações metabólicas no organismo e suas apropriadas interpretações em um contexto toxicológico e/ou clínico.

2. JUSTIFICATIVA DO PROJETO

Com base nos dados estatísticos relacionados ao câncer, constatam-se as altas taxas de incidência e mortalidade em decorrência desta doença, inclusive no país, o que chama atenção para o grande impacto social e econômico que implicam desta condição (BITTENCOURT; SCALETZKY; BOEHL, 2004). Nos países mais desenvolvidos e naqueles em desenvolvimento (como é o caso do Brasil), vêm ocorrendo uma alteração da demografia, e isto conduz a mudanças dos padrões saúde-doença no mundo.

Essas alterações consistem na diminuição das taxas de natalidade e mortalidade devido a doenças infecciosas, juntamente ao aumento da expectativa de vida. Por outro lado, crescem as taxas de incidência para doenças degenerativas, como as doenças cardiovasculares e o câncer, assim como a demanda por assistência médica deste tipo (GUERRA *et al.*, 2005).

Em conformidade com esta tendência, o INCA, em seu relatório "Estimativa 2016 - Incidência de Câncer no Brasil", estimou a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer no país. Ainda segundo o próprio órgão, essa enorme demanda é muito preocupante se se deparar com uma precariedade de recursos, especialmente em certas regiões do país, por isso, a prevenção e o controle do câncer devem receber atenção direcionada e equivalente à área de serviços assistenciais, pois, se o número de casos emergir de forma tão rápida, não haverá meios suficientes para sanar as necessidades de diagnóstico, tratamento e acompanhamento, podendo isso acarretar na morte prematura de muitas pessoas por câncer, além de um grande obstáculo socioeconômico para o Brasil (INCA, 2012).

A implantação de novos métodos diagnósticos, mais simples e mais rápidos é bastante promissora, pois seria capaz de reduzir o tempo gasto nas diversas etapas do atendimento de saúde, encaminhando mais rapidamente o paciente para um tratamento específico. Além disso, métodos que não envolvem procedimentos invasivos facilitariam mais o processo de coleta da amostra, sem oferecer desconforto ou dor aos pacientes, em especial para o diagnóstico da doença em crianças.

A utilização de uma técnica de amostragem não-invasiva também pode ser relacionada com um provável aumento de indivíduos interessados em submeter-se ao exame diagnóstico, pois as circunstâncias tornariam este mais aceitável, praticamente não impondo situações restritivas ao paciente. O aumento de adesão aos exames diagnósticos acrescenta importância na função de se realizar, de fato, a identificação da doença previamente do que poderia, por ventura, ocorrer por meio dos métodos tradicionais.

Embora os benefícios da introdução de exames de *screening* pareçam ser muitos, muito se discute a respeito de que critérios deveriam atender para serem considerados seguros o bastante (ELUF NETO; WÜNSCH FILHO, 2000), o que reforça a necessidade de elaboração de mais experimentos acerca destes métodos, particularmente aqueles que não se tratam de testes muito específicos de uma determinada patologia, porque têm o potencial de possuírem maior aplicabilidade (se um exame abrange um conjunto de patologias, isso diminui o número total de testes que deveriam ser realizados por um indivíduo a fim de se excluírem todas as possibilidades existentes de portar doenças).

A análise dos perfis de compostos orgânicos voláteis característicos também poderá ser capaz de contribuir ampliando a compreensão de como o mecanismos associados à formação destes compostos está associado ao processo de carcinogênese.

Em pesquisa exaustiva na literatura indexada, não foram encontradas publicações que relatam a determinação de VOCs em amostras de suor coletadas de pacientes com câncer, sendo esta a primeira proposta de se empregar esta matriz alternativa para se estudar uma ferramenta diagnóstica para o câncer.

3. OBJETIVOS GERAIS

Esta pesquisa possui o objetivo de investigar a presença de compostos orgânicos voláteis (VOCs) em amostras de suor, que possam ser utilizados como marcadores biológicos específicos do câncer, a partir do desenvolvimento e validação de um método analítico, capaz de analisar os compostos presentes em amostras de suor de indivíduos saudáveis e indivíduos portadores de câncer.

4. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

A pesquisa abrange a coleta de amostras de suor de indivíduos diagnosticados com câncer que ainda não iniciaram tratamento quimioterápico ou radioterápico, junto aos Ambulatórios e Enfermaria de Oncologia Clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto/FMRP/USP, e de voluntários saudáveis (que não foram diagnosticados com a doença), estes últimos foram convidados, em ambientes públicos, a participarem desta pesquisa, uma vez que atendessem às especificações descritas a seguir (critérios de exclusão e inclusão) e expressassem concordância com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1).

Os critérios de exclusão estabelecidos para o recolhimento das amostras envolvem situações em que presença de interferentes para o método é provável. Não serão incluídas: amostras de pacientes com idade inferior a 18 anos, amostras de pacientes com diabetes mellitus não controlada, amostras de pacientes portadores de outras doenças inflamatórias não tratadas.

Os critérios de inclusão são, para o primeiro grupo de interesse (indivíduos portadores de câncer): indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos, com diagnóstico de câncer confirmado por exame anatomo-patológico, que não tenham iniciado quimioterapia ou radioterapia, ou qualquer outro tratamento neoadjuvante, que possuam condições físicas e psicológicas apropriadas para a abordagem.

Os critérios de inclusão são, para o segundo grupo de interesse (indivíduos não portadores de câncer): indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos, sem histórico

de qualquer diagnóstico positivo para câncer, que, no caso de portarem diabetes ou outras doenças inflamatórias, que estas estejam sendo controladas adequadamente pelo uso de medicamentos.

O projeto de pesquisa foi enviado primeiramente para análise na Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (ANEXO 2) e após encaminhado aos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras e do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, obtendo aprovação (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética- CAAE- n° 20879114.0.0000.5407 e 20879114.0.3001.5440, respectivamente) (ANEXOS 3 e 4).

Em seguida, submeteu-se uma emenda ao CEP do centro coordenador, para inclusão do procedimento de coleta de urina (ANEXO 5).

Com o intuito de se estabelecer uma observação mais rigorosa entre os controles e as amostras de pacientes com câncer, as amostras foram coletadas de indivíduos de faixa etária e hábitos correspondentes. Também foi realizado o registro do uso de medicamentos, consumo de álcool e tabaco, além da existência de diagnóstico médico para outros problemas de saúde. A análise destes fatores pode servir como auxílio na discussão e interpretação dos resultados e no entendimento de quais condições interferem no exame a ser desenvolvido.

5. PROCEDIMENTO DE COLETA DE AMOSTRAS

Primeiramente, a região lombar do voluntário (onde será fixado o adesivo) é limpa com algodão contendo isopropanol. Este procedimento serve para higienizar a região, removendo o suor já depositado sobre a pele e eventuais contaminantes externos, além de servir para melhorar a fixação do adesivo. Aguarda-se o período de aproximadamente três minutos para que ocorra a evaporação do excesso de álcool sobre a pele para que então o dispositivo adesivo *PharmChek*® seja fixado. Dois dispositivos foram aplicados por voluntário, em diferentes lados da lombar. Após o período aproximado de 48 h da aplicação, o adesivo foi retirado, o tecido de celulose removido e enrolado com auxílio de uma pinça limpa, sendo por fim inserido no interior

de frasco de vidro de *Headspace*, com capacidade de 20 mL e tampado com tampa de rosca de material inox, magnética, possuindo septo e recobrimento de *teflon* (PTFE/silicone) em seu interior. Uma vez tampados e identificados, os frascos contendo as amostras foram armazenados sob congelamento, a - 20° C, até o momento da análise. Foram coletadas e analisadas 64 amostras de suor (do segundo semestre de 2015 ao primeiro semestre de 2017), 32 pertencentes ao grupo controle e 32 pertencentes ao grupo positivo. A Figura 4 ilustra o processo de coleta da amostra de suor.

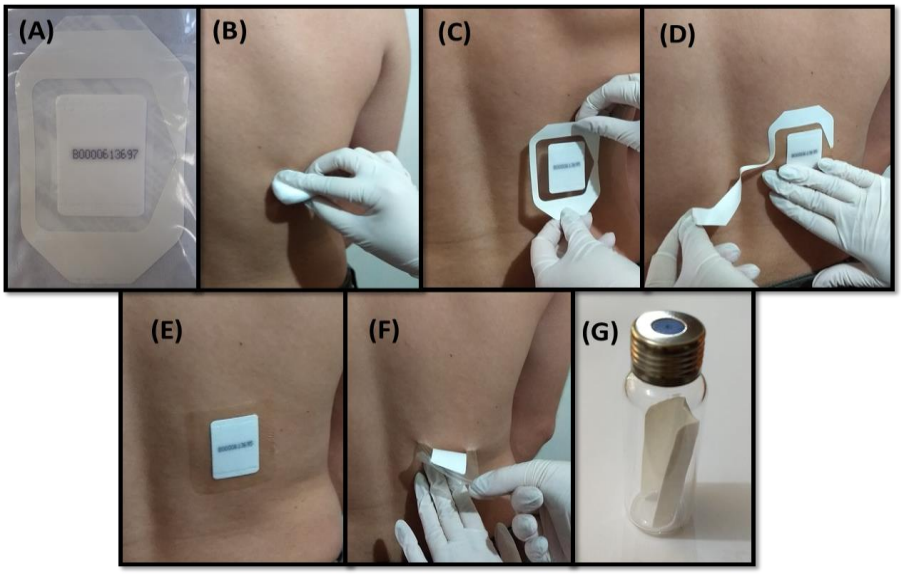


Figura 4 - Etapas da coleta de amostra de suor. (A) Adesivo PharmChek® embalado; (B) Limpeza do local (lombar) com isopropanol; (C), (D) e (E) Fixação do adesivo; (F) Retirada do adesivo; (G) Armazenamento do *patch* diretamente em frasco para *Headspace.*

Considerou-se a possibilidade de se coletar amostras de urina concomitantemente com as de suor, para que pudessem ser analisadas através da mesma metodologia com o objetivo de se verificar também a presença de perfis diferenciados de voláteis em outro tipo de matriz obtida por coleta não-invasiva, o que corroboraria para hipótese apresentada por este projeto, além de fornecer dados comparativos que pudessem auxiliar no entendimento da distribuição e origem dos compostos de interesse. Assim sendo, os indivíduos que se encontravam nos critérios de inclusão estabelecidos eram convidados na mesma abordagem a doar, além da amostra de

suor, a amostra de urina; Ou então, caso não fosse possível deixar o adesivo afixado pelo período estabelecido, ou se o voluntário não desejasse participar do fornecimento da amostra de suor, caso quisesse, poderia doar somente a amostra de urina.

Para coleta de urina foi utilizado recipiente plástico estéril, comum para obtenção da amostra de urina de rotina. Para doação das amostras de urina não foi requerido ao indivíduo a realização de práticas de coleta como solicitadas em alguns exames clínicos, como urina I e urocultura, portanto não houve a necessidade de ser a primeira urina do dia, jejum, qualquer assepsia, descarte do primeiro jato de urina ou exigência de um volume mínimo de amostra. As amostras coletadas foram identificadas e mantidas sob refrigeração, a - 20° C, até o momento dos experimentos. Foram coletadas (no período do segundo semestre de 2016 ao primeiro semestre de 2017) e analisadas, no total, 51 amostras, 28 pertencentes ao grupo positivo e 23 ao grupo controle.

CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA AVALIAÇÃO COMPREENSIVA DE VOCs

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia gasosa (GC) é a técnica extensivamente utilizada para análise de voláteis, isso porque estes compostos satisfazem adequadamente os requisitos da técnica. Para uma substância qualquer poder ser carreada pelo fluxo de um gás esta deve se dissolver - pelo menos parcialmente - nesse gás, desta forma a análise é restrita a substâncias que possam se converter na forma gasosa dentro dos parâmetros empregados e que sejam termicamente estáveis. Uma vez que a amostra (seja gasosa ou líquida) é introduzida no injetor, esta amostra deverá se vaporizar no interior do *liner*- um espaço inerte, e então conduzida para a coluna capilar para que se inicie a separação. Ao cromatógrafo podem estar acoplados diferentes detectores, como detector por ionização de chama (*flame ionization detector,* FID), termiônico sensível (*thermionic specific detector*, TSD), além de, principalmente, o acoplamento à espectrometria de massas (MS) em que os tipos de analisadores podem variar.

Por se tratarem de compostos voláteis, os VOCs são amplamente analisados, com maior facilidade e eficiência através das técnicas de *Headspace* estático (HS), *Headspace* dinâmico, como *Purge & Trap* (técnica de extração contínua da fração gasosa para material sorvente, pela purga da amostra), Dessorção Térmica (*thermal desorption,* TD, técnica de simples dessorção térmica de compostos previamente sorvidos em cartucho) e, principalmente, *Headspace*-Microextração em Fase Sólida *(solid phase microextraction,* HS-SPME, extração em microescala baseada em partição da fração volátil para fibra com recobrimento de polímero adsorvente*).*

A técnica de *Headspace* consiste em uma análise da fase gasosa, a qual permanece no equilíbrio dinâmico com a amostra analisada, para isso, um amostrador apropriado pode ser empregado. A amostra pode ser diretamente colocada num recipiente hermético e termostatizado, aonde permanece o tempo suficiente (etapa de incubação da amostra) para se estabelecer um equilíbrio entre as fases envolvidas. Em seguida, um volume adequado de fase gasosa é removido e injetado no cromatógrafo. A análise por *Headspace* é consideravelmente rápida e de baixo custo, permite o isolamento dos analitos a partir da matriz de maneira simplificada, sendo,

de fato, mais indicada para a análise de substâncias com pontos de ebulição mais baixos (BORUSIEWICZ, 2002).

A relação da concentração do analito na fase condensada (C_L) pela sua concentração na fase gasosa (C_G) pode ser expressa pelo coeficiente de partição (K) (Equação 1):

$$K = \frac{C_{\mathrm{L}}}{C_{\mathrm{G}}} \qquad \text{(Equação 1)}$$

O valor desta variável fica, portanto, associada à tendência de um dado composto ser levado à fase gasosa: quanto menor o valor de K, maior será a concentração desta substância no *Headspace*. O valor K pode ser modificado por alteração na temperatura (que, se aumentada, teoricamente tornará mais favorável o processo de passagem para fase de vapor) e por meio de alteração na composição da matriz a ser analisada (sendo que diminuir a afinidade de um composto pela matriz proporciona a facilitação da formação da fase gasosa) (BERNAL, 2012; BULLOCK, 2009).

Outra relação determinante em termos da técnica *Headspace* é o valor β, chamado de "taxa de fase", que exprime a taxa de volume de amostra presente no *Headspace* (V_g) pelo volume da amostra original condensada (V_L) (Equação 2). De modo geral, o aumento do tamanho da amostra original torna maior a concentração do analito na fase vapor, um menor *Headspace* favorece a amostragem de um volume mais concentrado, teoricamente gerando melhor resposta analítica.

$$\beta = \frac{V_G}{V_{\mathrm{L}}} \qquad \text{(Equação 2)}$$

K e β são baseados nos princípios da técnica e, de forma resumida, trazem os principais conceitos para sua otimização: influência da temperatura, influência do volume da amostra e solubilidade dos compostos-alvo na matriz, o que pode ser sumarizado à Equação 3:

$$C_G = \frac{C_O}{(K+\beta)} \qquad \text{(Equação 3)}$$

Sendo C_G a concentração do composto na fase gasosa e C_0 sua concentração original na amostra (BERNAL, 2012; BULLOCK, 2009).

Em um dado sistema, K e β são constantes, implicando em:

$$C_G = constante\ C_O \quad \text{(Equação 4)}$$

Pelo princípio da cromatografia:

$$A = constante\ C_G = constante\ C_O \quad \text{(Equação 5)}$$

Em que A é a área do analito e tal relação demonstra que esta é proporcional à concentração analisada, da fase gasosa injetada, que, por sua vez é proporcional à concentração original, da amostra condensada, logo, temos que a concentração do analito no *Headspace* é simplesmente proporcional à original na amostra. A Tabela 1 seguinte traz a comparação em alguns aspectos das principais técnicas de isolamento de voláteis.

Tabela 1 - Comparação entre as técnicas de extração de VOCs

Técnica	Tamanho de amostra (g)	Sensibilidade	Intervalo de aplicação destinado			Custo	Automatização	Tempo de execução mínimo (minutos)
			gás	volátil	semi-volátil			
Headspace estático	0,1-10	ppm				baixo	sim	5+
Purge and Trap	5-1000	ppb				alto	sim	10+
Dessorção térmica	5-1000	ppb				alto	sim	10+
HS- SPME	0,1-1	ppt				alto	sim	15+
			0	100	200 300			
			temperatura de ebulição					

2. OBJETIVOS

Desenvolver e otimizar um método GC-MS, empregando a técnica de extração de *Headspace* estático, para a análise compreensiva de compostos orgânicos voláteis em amostras de suor e de urina.

3. MÉTODO

3.1. Materiais e reagentes

Dispositivos coletores de suor PharmChek® foram adquiridos da PharmChem (EUA). Coletores universais estéreis de 80 mL destinados à armazenamento das amostras de urina foram adquiridos da J.ProLab (Brasil).

Cloreto de sódio >99% foi obtido da Synth (Brasil), hexano (99% n-hexano) 99,5%, obtido da JT Baker (EUA). Papel filtro de 80 gr. foi adquirido da J.ProLab (Brasil). Frascos de *Headspace* de 20 mL foram obtidos da Sun Sri (Espanha), tampas magnéticas com septo de PTFE foram obtidos da Sun Sri (Itália), seringa gas-tight de 1,0 mL adquirida da SGE (Austrália). Foi utilizada balança analítica Sartorius BP211D (Alemanha).

Para otimização da metodologia, padrão analítico de mistura de n-alcanos C7-C10 (heptano, octano, nonano e decano), de 500 mg, com pureza ≥ 98%, da Sigma-Aldrich (EUA) e padrões de undecano, dodecano, tridecano, tetradecano e pentadecano pureza ≥ 98% (2 mL cada) da Sigma-Aldrich, foram empregados. Ureia ≥99,5% e cloreto de amônio ≥99,5% foram também adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA), ácido acético glacial e ácido láctico 98% foram obtidos da JT Baker e hidróxido de sódio 99,0%, também obtido da JT Barker (México).

Para tratamento das amostras de urina, β-glucuronidase de Escherichia coli, tipo IX-A (500 KU), sob a forma de pó liofilizado (0,5 g), foi obtida da Sigma-Aldrich (EUA). Di-hidrogeno fostato de sódio ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) 99,0% foi obtido da Merck (Alemanha) e monohidrogeno fostato de sódio (Na_2HPO_4) 99,0% obtido da Synth (Brasil).

3.2. Metodologia experimental

3.2.1. Preparo das soluções empregadas nas análises

A) Preparo do suor artificial

À quantidade adequada de água deionizada foram adicionados: 8,75 g de NH_4Cl, 1,0 g de NaCl, 2,50 g de ureia, 6,18 mL de ácido láctico e 1,20 mL de ácido acético glacial.

A solução principal foi levada para leitura no pHmetro. Para ajustar o pH final de 4,7 foi empregada uma solução de NaOH 2 mol L^{-1}, obtida da diluição de 8,0 g de pastilhas para um volume final de 100,00 mL.

O suor artificial foi por fim vertido em balão volumétrico e teve o volume final ajustado com água deionizada para 500,00 mL.

B) Soluções C7-C15 empregadas na etapa de otimização de método

Considerando as propriedades dos compostos, as soluções-padrão foram preparadas em hexano. Foram pesados em balança analítica 0,0100 g (ou 10,00 mg) de cada um dos padrões originais em balões volumétricos de 10,00 mL. Cada balão volumétrico contendo 10 mg de padrão foi prontamente completado com hexano, com posterior homogeneização da solução por agitação manual e vortex, sendo depois transferidos para tubos de ensaio, originando soluções padrão de mistura C7-C10, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano e pentadecano 1 mg mL^{-1}. Destas últimas soluções foi preparada solução de mistura (mix) a 10 µg mL^{-1}: recolheu-se 400 µL da solução C7-C10 1 mg mL^{-1} e 100 µL das demais soluções padrão, transferindo-se estes volumes para balão volumétrico de 10,00 mL. O volume foi completado com hexano e a solução final, de concentração de 10 µg de cada alcano/mL foi homogeneizada e transferida para um tubo. Os tubos contendo as soluções foram

vedados com ParaFilm (filme plástico de parafina), cobertos com papel alumínio e mantidos a - 20°C.

Como se sabe, o hexano grau HPLC é uma mistura de isômeros C_6H_{14}, contendo majoritariamente o n-hexano. Esta característica faz com que o solvente se apresente como mais de um pico no cromatograma. Apesar deste inconveniente optou-se por utilizar os padrões em hexano por possuírem solubilidade adequada neste e praticamente não possuírem solubilidade em água, que seria o solvente de características desejáveis para a análise, dada a composição da matriz estudada.

C) Solução de cloreto de sódio 300 g L^{-1}

Pesou-se a massa de 15 g de NaCl em balança semi-analítica, que foi diluída para volume final de 50,00 mL utilizando-se balão volumétrico. A solução foi armazenada em frasco plástico estéril, mantendo-se ao abrigo da luz e à temperatura ambiente para evitar saturação.

D) Tampão fosfato (PBS) pH 6,8 a 0,1 mol L^{-1}

Primeiramente foram preparadas soluções 1 mol L^{-1} de Na_2HPO_4 e $NaH_2PO_4.H_2O$, através da diluição, respectivamente, de 71,0 g e 69,0 g para 500,00 mL com água deionizada. 1,475 mL de Na_2HPO_4 1 mol L^{-1} e 1,0 mL de NaH_2PO_4 1 mol L^{-1} foram misturados em uma quantidade aproximada de 20 mL de água em um béquer.

A leitura no pHmetro forneceu o valor de pH igual a 6,8 para uma amostra dessas soluções. Em balão volumétrico de 25,00 mL ocorreu ajuste do volume final com água deionizada. Outras proporções de concentração de ácido e base foram testadas, partindo-se dos valores teóricos calculados, mas a descrita acima ([base]+[ácido]=1,46 [ácido] +1 [ácido]=0,1 mol) foi a que proporcionou valor mais aproximado do pH desejado.

E) Soluções de β-glucuronidase 1000 U mL^{-1} e 20000 U mL^{-1}

Como a enzima liofilizada apresentava 500 KU por 0,5 g, para preparo da solução de 1000 U mL^{-1} (ou 1 KU mL^{-1}), 10 mg de pó liofilizado foram pesados, diluídos em tampão fosfato pH 6,8 a 0,1 mol L^{-1} e transferidos para balão volumétrico de 10,00 mL, tendo-se o volume final completado com o mesmo solvente. Para preparo da solução a 20000 U mL^{-1} (ou 20 KU mL^{-1}) procedeu-se de forma similar, com a diluição de 200 mg de enzima liofilizada. Os tubos contendo as soluções foram vedados com ParaFilm, cobertos com papel alumínio e mantidos em geladeira.

3.2.2. Desenvolvimento e otimização das condições de análise- Suor

Tendo em vista a possivelmente baixa concentração dos compostos de interesse presentes no suor e a falta de relatos na literatura para este tipo de análise, considerou-se uma etapa importante a averiguação dos parâmetros analíticos buscando otimizá-la.

Considerando os resultados de biomarcadores selecionados por estudos em amostras de ar exalado para diferentes tipos de câncer e cultura de células cancerosas observou-se que, em geral, as substâncias elencadas tratam-se de cetonas, aldeídos, álcoois e especialmente alcanos variando de curtas a médias cadeias carbônicas. Por isso, com o intuito de se otimizar condições para separação e identificação desta classe de compostos, tendo em vista exemplos de marcadores como mostrados na Tabela 2, optou-se por se utilizar, nesta etapa, padrão analítico de mistura de n-alcanos C7-C10 (heptano, octano, nonano e decano), e padrões de undecano, dodecano, tridecano, tetradecano e pentadecano. Além disso, o emprego de série homóloga mostra-se útil para obtenção de referências de tempo de retenção, que serão empregadas como ferramenta na seleção das possíveis identidades na etapa seguinte, de identificação de compostos desconhecidos nas amostras.

Tabela 2 - Alcanos reportados na literatura como biomarcadores

n-alcano	Neoplasia	Referência	Isômeros ramificados	Neoplasia	Referência
C7	Pulmão	PHILLIPS et *al.*, 2003b/POLI et *al.*, 2005	**C7**	Mama/Cabeça e pescoço	PENG et *al.*,2010/HAKIM et *al.*, 2011
C8	Pulmão	POLI et *al.*, 2005/FILIPIAK et *al.*, 2013	**C8**	Pulmão	PHILLIPS et *al.*, 1999; PHILLPS et *al.*, 2003a; POLI et *al.*, 2005
C9	Mama	PHILLIPS et *al.*, 2003a	**C9**	Pulmão/Mama/ Cabeça e pescoço	PHILLIPS et *al.*, 1999/PENG et *al.*,2010/HAKIM et *al.*, 2011
C10	Pulmão/Fígado	PHILLIPS et *al.*, 1999/POLI et *al.*, 2005/QIN et *al.*, 2010	**C10**	Pulmão/Cabeça e Pescoço	PHILLIPS et *al.*, 1999/HAKIM et *al.*, 2011
C11	Pulmão/Mama/ Cabeça e Pescoço	PHILLPS et *al.*, 1999/BAJTAREVIC et *al.*, 2009/PHILLIPS et *al.*, 2010/WANG et *al.*, 2012/GRUBER et *al.*, 2014	**C11**	Pulmão	PHILLIPS et *al.*, 2003a/ PHLLIPS et *al.*, 2007b
C12	Pulmão/Mama/ Cabeça e Pescoço	PHILLIPS et *al.*, 1999/PHILLIPS et *al.*, 2010	**C12**	Pulmão/Mama/ Cabeça e pescoço	PHILLIPS et al, 2003a/PENG et *al.*, 2010/HAKIM et *al.*, 2011
C13	Mama/Pulmão	PHILLIPS et *al.*, 2010/WANG et *al.*, 2012	**C13**	Mama/Pulmão	PHILLIPS et *al.*, 2003a/BAJTAREVIC et *al.*, 2009
C14	Mama	PHILLIPS et *al.*, 2010	**C14**	Pulmão/ Cabeça e Pescoço	POLI et *al.*, 2005/BAJTAREVIC et *al.*, 2009/HAKIM et *al.*, 2011
C15	Mama	PHILLIPS et *al.*, 2010	**C15**	Mama/Fígado	PHILLIPS et *al.*, 2010/PENG et *al.*, 2010/WANG et *al.*, 2012

No objetivo de verificar os principais fatores relacionados ao desempenho da técnica, os principais testes foram feitos avaliando: **a)** Temperatura de incubação de amostra; **b)** Tempo de incubação de amostra; **c)** Velocidade de agitação do incubador; **d)** Efeito *salting-out*: Influência da adição de sal na amostra de suor e influência da concentração da solução salina empregada.

Alterar a temperatura do frasco contendo a amostra é um dos meios de se diminuir o coeficiente de partição de um analito. Foi verificado o desempenho da análise sob diferentes temperaturas de incubação, 70, 80 e 90 °C.

Já o tempo de incubação da amostra refere-se ao tempo necessário para que ocorra o equilíbrio entre fases gasosa e condensada. Via de regra, uma vez alcançado o tempo ótimo necessário para o equilíbrio, incrementos neste período não trarão

respostas analíticas superiores. Foram avaliados três tempos de incubação: 5, 10 e 20 minutos.

Geralmente a variável da temperatura é analisada sob determinado tempo de incubação fixo, mas não se pode descartar a possibilidade de que um fator influencie o outro no momento do alcance do equilíbrio, sendo assim, os diferentes tempos de incubação foram avaliados para cada uma das temperaturas. Ressalta-se que mesmo que o volume de matriz seja muito pequeno, tal amostra possui conteúdo aquoso predominante, além de que se planeja submeter à análise a influência da presença de solução salina, desta forma, considerou-se o aquecimento a temperaturas maiores de 90 °C não recomendado, para evitar danos à coluna e ao espectrômetro de massas, que precisa operar a baixíssimos níveis de ar e umidade.

Foram também verificadas condições favorecedoras do equilíbrio como a velocidade de agitação do incubador de amostras durante o período de incubação para 250, 500 e 650 RPM e a constatação do efeito *salting out*, para diferentes concentrações de solução salina, 50, 100 e 300 g L^{-1} de cloreto de sódio.

Para realização destes experimentos foi empregado papel filtro de 80 de gramatura como suporte simulador do tecido de celulose, nas dimensões de 4,8 cm x 3,0 cm, idem às do dispositivo adesivo PharmChek® empregado na coleta de amostras. Como meio substituinte ao suor foi empregada uma solução mimetizando a composição desta matriz, o suor artificial desenvolvido por DE MARTINIS et al. (2007), o qual trata-se de uma solução contendo 327 mmol L^{-1} de cloreto de amônio, 166 mmol L^{-1} de ácido láctico, 83 mmol L^{-1} de ureia, 42 mmol L^{-1} de ácido acético, 34 mmol L^{-1} de cloreto de sódio, em água deionizada, com pH ajustado para 4,7 com hidróxido de sódio 2,0 mol L^{-1} (DE MARTINIS et al, 2007). A cada recorte de papel filtro (depositado sobre filme plástico para não haver influência por seu contato com a bancada) eram adicionados 200 µL de suor artificial e 10 µL de solução-padrão do mix de alcanos de heptano a pentadecano na concentração de 10 µg mL^{-1}, sendo portanto a quantidade adicionada equivalente à 100 ng de analitos/adesivo. Com auxílio de pinças o papel filtro adicionado do suor artificial e fortificado era enrolado e inserido no interior de frasco de vidro de 20 mL, este era fechado com tampa magnética *inox* com septo, revestida com filme interior de *teflon* para evitar partição de plástico do septo para a

amostra vapor. Os frascos contendo as amostras preparadas progressivamente eram colocados em *rack* para injeção no GC-MS, com intercalação dos métodos a serem testados, para evitar a possível influência da instabilidade na permanência do frasco na *rack* até o momento da respectiva análise. Todos os experimentos citados foram realizados em triplicata.

Ao término da seleção das condições de análise mais favoráveis, uma verificação dos possíveis interferentes para metodologia de identificação de compostos desconhecidos provenientes das amostras reais foi realizada.

3.2.3. Verificação de interferentes da análise- Suor

Uma vez estabelecido o método final de preparo de amostra e análise cromatográfica, conferir os cromatogramas obtidos para injeções de amostras nas seguintes situações é um experimento essencial para descartar a contribuição de interferências nas análises a serem feitas:

- frasco vazio – esta análise permite identificar picos provenientes da própria injeção *Headspace* e do ar preenchendo o frasco;
- papel filtro contendo suor artificial e solução salina e PharmChek® contendo solução salina - a comparação dos dois cromatogramas justifica o uso do papel filtro para a fase de testes caso não existam diferenças consideráveis entre as amostras (o que é esperado já que ambos possuem composição de celulose) e, no caso do PharmChek® permite averiguar se este material potencialmente afeta a análise das amostras reais.

Cada situação citada acima foi avaliada em quadruplicata (4 reproduções por ensaio). Os papéis filtros e PharmChek® foram selecionados de diferentes embalagens/lotes para estes testes.

3.2.4. Desenvolvimento e otimização das condições de análise- Urina

Foram também otimizadas algumas condições para as amostras de urina, dada a composição diferenciada desta matriz. Os principais parâmetros avaliados foram: **a)** Temperatura de incubação; **b)** Tempo de incubação; **c)** Volume de amostra; **d)** Efeito

salting-out; **e)** Tratamento com enzima β-glucuronidase, para verificação da presença de compostos originalmente voláteis que estariam conjugados por decorrência do processo de modificação de metabólitos para promover sua eliminação.

Os testes foram baseados pela análise das próprias amostras, duas pertencentes ao grupo controle (C1 e C2) e duas positivas (P1 e P2), selecionadas tão somente por possuírem maior quantidade de amostra disponível, que tiveram parte de seu volume reservado em um primeiro momento para estes testes e daí aliquotadas a cada ensaio que compreendeu esta etapa.

Em semelhança ao processo de otimização para a amostra de suor, para urina foram avaliadas as temperaturas de incubação 70, 80 e 90°C e os tempos de incubação 5, 10 e 20 minutos, de forma combinada e para o valor fixo de 1 mL de amostra. A velocidade de agitação do incubador na etapa de *Headspace* foi mantida fixa, em 500 RPM. Com as condições de incubação definidas pela etapa anterior, os volumes de amostra em seguida testados foram de 100 µL, 500 µL e 1 mL. Após, o efeito *salting-out* foi examinado para 0,1; 0,5; 0,7 e 1 g de cloreto de sódio.

Estuda-se que compostos originalmente voláteis podem se apresentar, em maior proporção, como conjugados na urina (WAGENSTALLER; BUETTNER, 2013). Monteiro et al. (2014) constatou que a adição de ácido à urina implicava em um número maior de compostos detectados para a mesma amostra, possivelmente devido ao efeito da conversão dos compostos na forma conjugada em sua forma não-conjugada. A adição de ácido às amostras parece um parâmetro importante a ser estudado, no entanto, também realizar as análises da mesma forma com que são conduzidas em concentrações altas de ácido poderia decorrer na volatilização do excesso de ácido e deterioração da coluna. Além disso, o surgimento de compostos diferenciados em meio ácido pode também não só ser devido à promoção da hidrólise de conjugados, mas também ao ataque a demais moléculas, já que é uma reação de processo não seletivo. Com isso, optou-se por verificar a presença de conjugados por meio de tratamento das amostras com a enzima β-glucuronidase, responsável por promover a hidrólise em compostos associados ao ácido glicurônico.

Foram preparadas soluções de 1 KU mL^{-1} e 20 KU mL^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} de pH=6,8. A enzima acompanha especificações tal como a necessidade de

ser preparada em faixa de pH adequada para aplicação, além disso, diretrizes quanto aos parâmetros do ensaio, para quais recomenda-se o período *overnight* (cerca de 16 h) de incubação a *37*°C, ou então, 90 minutos a 50°C. No entanto, para cada tipo de substância conjugada os critérios para atuação satisfatória da enzima podem ser diferentes. No presente caso, a intenção é de que o método não fosse excessivamente demorado, e que permitisse controle do tempo de reação de forma hábil para que o protocolo não seja restrito e, portanto, possa ser igualmente aplicado a todas amostras, controles e positivas, ainda mais considerando-se a disponibilidade para apenas seis frascos no incubador. Por isso estabeleceu-se o tempo de reação de 90 minutos, aplicando-se as temperaturas de 37°C e 50°C. A quantidade de unidades de enzima pode variar de 1000 até 10000 por mL de urina, em situações de hidrólise de xenobióticos. As quantidades de enzima avaliadas foram de apenas 100, 500, 1000 e 2000 U por volume final estabelecido de amostra. Os experimentos de otimização para amostra de urina foram todos realizados em duplicata.

De forma semelhante à seção anterior, ao término da seleção das condições de análise mais favoráveis, uma verificação dos possíveis interferentes para metodologia de identificação de compostos desconhecidos provenientes das amostras reais foi realizada.

3.2.5. Verificação de interferentes da análise- Urina

Para se estabelecer os potenciais interferentes para as análises das amostras reais, foram examinados os cromatogramas e espectros obtidos para os seguintes testes (repetidos quatro vezes para cada situação):

- frasco vazio, como avaliado na seção anterior;
- injeção de volume, igual àquele a ser empregado para as amostras, de água deionizada, armazenada em *freezer,* nos mesmo frascos, pelo mesmo período aproximado de tempo e de mesma forma que as amostras reais de urina, mimetizando os procedimentos a serem utilizados nas amostras, o que inclui a análise apenas com a adição de sal e a idêntica incubação com enzima, seguida da adição de sal.

3.2.6. Método GC-MS

Embora inicialmente métodos de cromatografia em fase gasosa empregados em trabalhos da literatura em investigações com objetivos similares tenham sido testados, a reprodução satisfatória destes não pôde ser constatada. Considerando a limitação da técnica de extração e introdução de amostra utilizadas, a metodologia foi delineada a fim de se minimizar os limites de detecção, conferir boa resolução dos compostos mais voláteis, obtenção de separação eficiente dos picos, produção de ordem de eluição lógica dos compostos para posteriormente auxiliar no processo de identificação por atribuição de tempos de retenção mais prováveis e detecção de compostos de diferentes características físico-químicas (tanto mais polares como totalmente apolares, de baixo ou maior peso molecular etc). Considerando essas características desejáveis para o método de análise optou pela escolha de uma coluna com fase de baixa a média polaridade, de maior espessura de filme e maior comprimento, além da aplicação de uma isoterma na maior parte da corrida e tempo de análise extenso. Sobretudo, as observações empíricas foram determinantes para seleção da metodologia.

As análises foram realizadas em cromatógrafo em fase gasosa CP 3800, da Varian, acoplado a espectrômetro de massas Saturn 2000 com analisador do tipo *ion trap*, da Varian. Foi empregada coluna SPB-624 (Sigma-Aldrich), 60 metros de comprimento x 0,32 mm de diâmetro interno x 1,8 µm de espessura do filme.

A temperatura do injetor foi mantida a 240ºC, e o programa de temperatura da coluna demonstrado na Tabela 3 foi aplicado, gerando um tempo total de corrida de 37,40 minutos. O fluxo de gás de arraste (hélio 5.0 analítico) manteve-se a 1,3 mL/ minuto. As temperaturas da *transferline*, *trap* e *manifold*, foram mantidas a 240°C, 220°C e 40°C, respectivamente. O analisador de massas foi configurado para detectar m/z de 20 m/z a 650 m/z, o detector foi ligado no tempo de 0,1 minuto de corrida e desligado aos 37,40 minutos.

Tabela 3 - Programa de temperatura do forno

Temperatura (ºC)	Taxa de aquecimento (°C/minuto)	Tempo de permanência (minutos)
70	-	5,00
200	25,00	25,00
230	20,00	1,00

As amostras foram injetadas utilizando-se o amostrador automático CombiPal da CTC Analytics. A limpeza prévia, e entre injeções, da seringa *gas-tight* de 1,0 mL foi realizada com a passagem de um fluxo de gás nitrogênio 4.5 pelo período de 30 segundos (para o qual não foi observado efeito *carry over*). A velocidade de aspiração de amostra empregada foi de 500 µL/s e o mesmo valor foi ajustado para velocidade de injeção da amostra. O volume de amostra injetada no equipamento foi de 1000 µL da fase gasosa, com taxa de *split* de 5. Foi utilizado para a aquisição de dados o *software* MS Workstation, versão 6.5.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento e otimização das condições de análise- Suor

Com o método cromatográfico citado anteriormente foram identificados os padrões, com tempos de retenção e íons de identificação conforme segue a Tabela 4:

Tabela 4 - Tempos de retenção dos padrões alcanos obtidos para o método cromatográfico empregado

Tempo de retenção (minutos)	**Analito**	**Íons de referência (m/z)**
8,92	Heptano	43,85,41
10,38	Octano	57,41,43
11,65	Nonano	57,71,41
12,87	Decano	57,71,43
14,15	Undecano	57,71,41
15,71	Dodecano	57,71,43
17,71	Tridecano	57,71,41
20,37	Tetradecano	41,43,70
24,22	Pentadecano	41,43,71

Os resultados advindos das etapas de testes podem ser expressos na forma de tendências gráficas, com relação às áreas relativas médias ou à área total média obtidas para os cromatogramas em cada condição de análise. Neste caso as áreas relativas foram calculadas com base na área do analitos com maior área em todas análises, o decano. Observar o comportamento dessas áreas relativas para cada condição de análise teve como intenção corrigir os erros advindos da injeção e avaliar individualmente o comportamento de resposta de cada analito para os métodos descritos.

A limitação desta abordagem de expressão em termos de área relativa é que esta assume que os analitos se apresentam com respostas sempre proporcionais, não importando o conjunto de parâmetros empregado. Nisso, outra abordagem para avaliar o desempenho dos métodos foi considerada: a expressão em termos de área total dos analitos, em que as áreas de todos os picos dos analitos foram somadas para cada replicata, produzindo-se uma área total média para cada condição.

As Figuras 5, 6 e 7 mostram o comportamento para cada analito para extração com temperatura de 70°C, 80°C e 90°C, respectivamente, para diferentes tempos de incubação. As barras de erros representam o desvio padrão calculado para os dados das três replicatas.

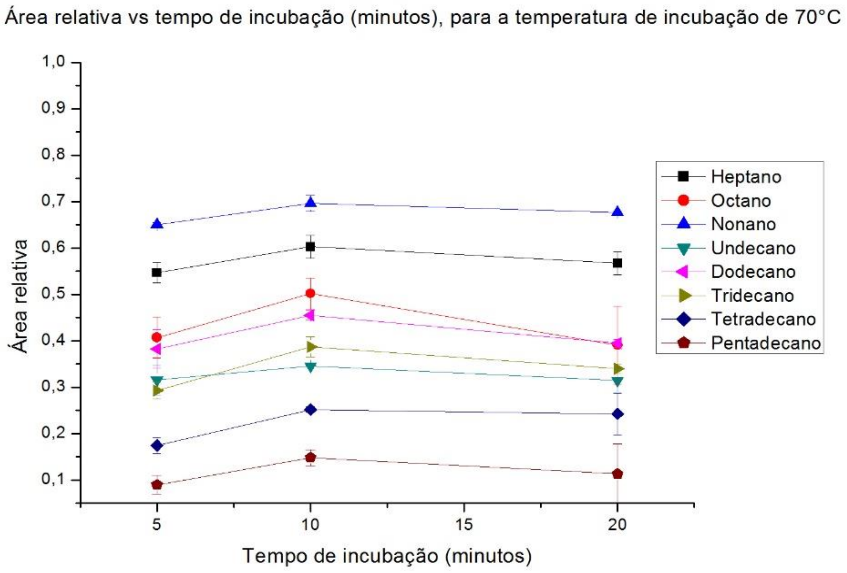


Figura 5 - Gráfico de área relativa (área do analito/área obtida para o decano) para tempos de incubação de 5, 10 e 20 minutos, à temperatura de incubação de 70°C.

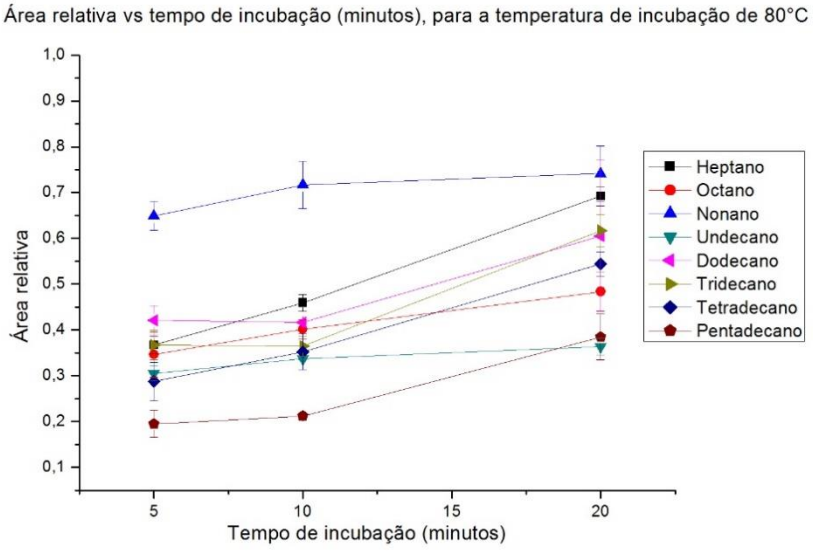


Figura 6 - Gráfico de área relativa (área do analito/área obtida para o decano) para tempos de incubação de 5, 10 e 20 minutos, à temperatura de incubação de 80°C.

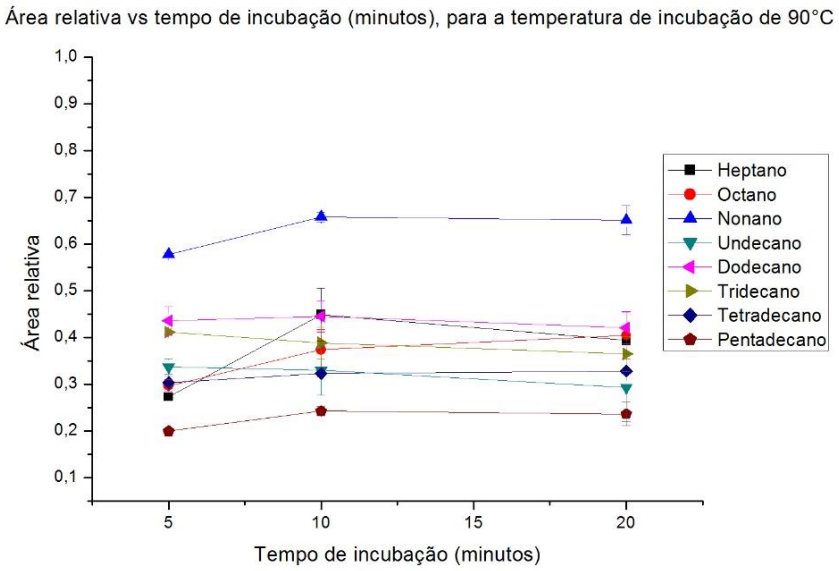


Figura 7 - Gráfico de área relativa (área do analito/área obtida para o decano) para tempos de incubação de 5, 10 e 20 minutos, à temperatura de incubação de 90°C.

O alcano decano (cuja área foi utilizada como referência para os valores mostrados nos gráficos anteriores) possui um menor coeficiente de partição, sendo seguido por nonano, heptano e octano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano e pentadecano. Curvas localizadas em regiões mais baixas do gráfico (situadas em menores áreas relativas) referem-se a extrações menos eficientes dos analitos. Em adição, quanto mais distanciadas as curvas construídas para cada analito, maior a discrepância existente entre a eficiência de suas extrações para fase amostrada, demonstrando como indício que diferentes temperaturas de incubação implicam no estabelecimento de diferentes equilíbrios em fase gasosa podendo favorecer a partição de determinados compostos ao mesmo tempo em contrapartida com a diminuição da partição de outros, ou seja, a temperaturas menores há prevalência muito maior dos compostos com menor coeficiente de partição, que devem ocupar o *Headspace* de tal forma que causam maior deslocamento dos compostos de K maiores da fase a ser amostrada.

A 90 °C a tendência obviamente não é modificada, mas a discrepância é menor, disso pode-se assumir o limite de detecção de compostos similares aos de maior K

poderá ser menor do que a 70 e 80°C. Ainda, a 70 e 90 °C o tempo de incubação mais adequada parece ser de 10 minutos enquanto que a 80°C, o tempo de 20 minutos o parece ser. Para inferir a informação correta deste comportamento deve-se observar também os dados obtidos quanto à área total (Figura 8).

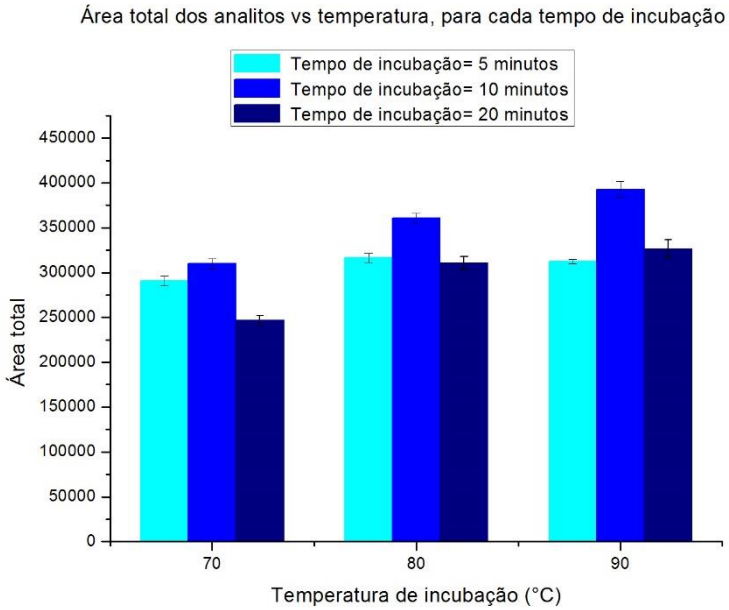


Figura 8 - Área total dos analitos vs temperaturas de incubação empregadas, para diferentes tempos de incubação.

De modo geral, não há grandes diferenças entre as áreas totais obtidas para cada condição de temperatura, ainda mais considerando o desvio padrão observado, representado pelas barras de erro no gráfico, sendo importante lembrar que para essa representação os erros atribuídos à injeção da amostra são desconsiderados.

Como observado anteriormente a incubação a 80°C, por 20 minutos, na realidade provoca queda na concentração de decano no *Headspace*, pois a área média total para o tempo de 10 minutos é superior também nesta temperatura.

Basicamente, os gráficos das Figuras 5, 6 e 7 representariam as diferenças nas extrações dos diferentes compostos testados e a Figura 8 permitiria uma avaliação estimada da eficiência total da extração. Sendo assim, o método de extração com incubação a 90°C pelo tempo de 10 minutos foi escolhido por demonstrar ser mais eficiente, conforme os dados.

Quando avaliada a adição de 200 µL (volume mínimo observado como sendo suficiente para cobrir todo o *patch*) de solução de cloreto de sódio 300 g/L, pelos cromatogramas, a exemplo dos presentes nas Figuras 9 e 10, verificou-se que a adição da solução salina pareceu reduzir o ruído da linha de base e propiciou áreas ligeiramente maiores para os picos, considerando-se útil, portanto, incluir esta etapa no preparo da amostra de suor.

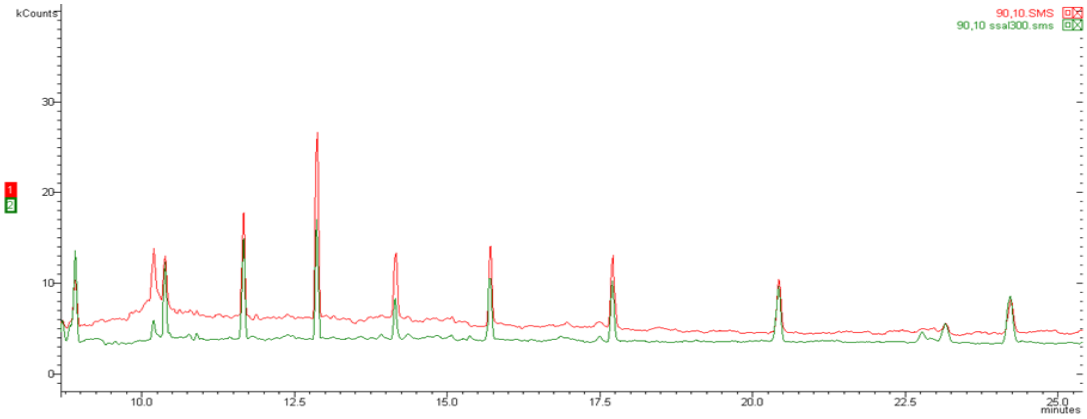


Figura 9 - Cromatogramas obtidos para análise de 100 ng de alcanos heptano a pentadecano para papel sem adição de solução salina 300 g/L de cloreto de sódio (em vermelho) e com a adição de solução salina (em verde).

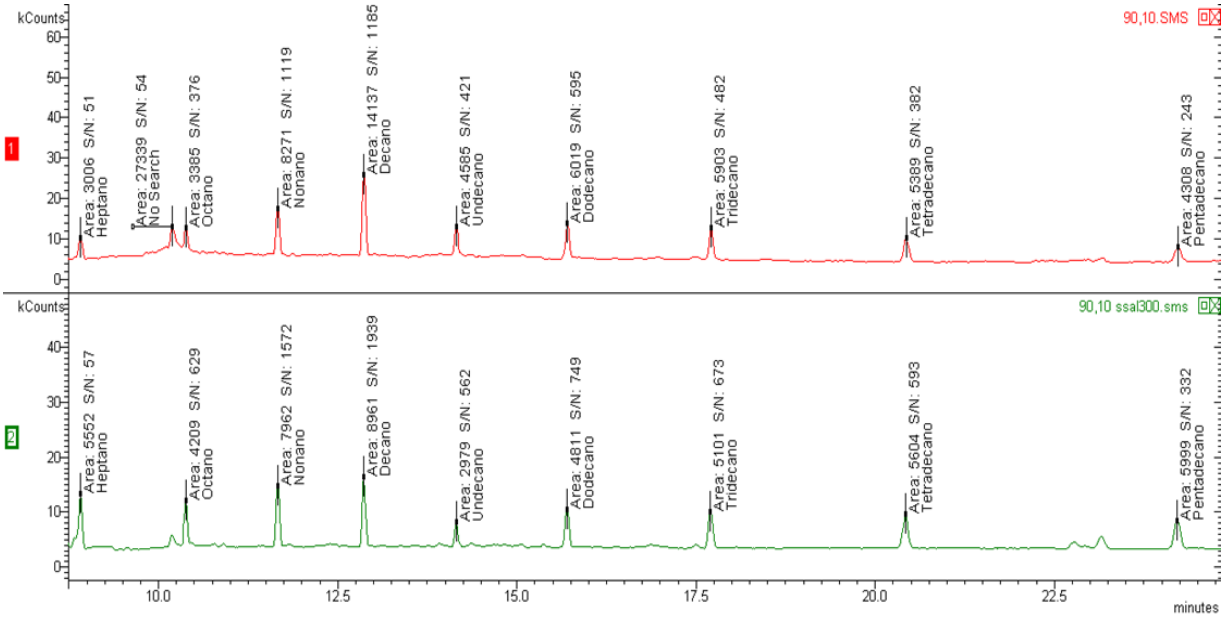


Figura 10 - Cromatogramas obtidos para análise de 100 ng de alcanos heptano a pentadecano para papel sem adição de solução salina 300 g/L de cloreto de sódio (em vermelho) e com a adição de solução salina (em verde).

Já a Figura 11 traz exemplos de cromatogramas obtidos para diferentes concentrações de sal, demonstrando que concentrações maiores provêm maiores áreas de picos.

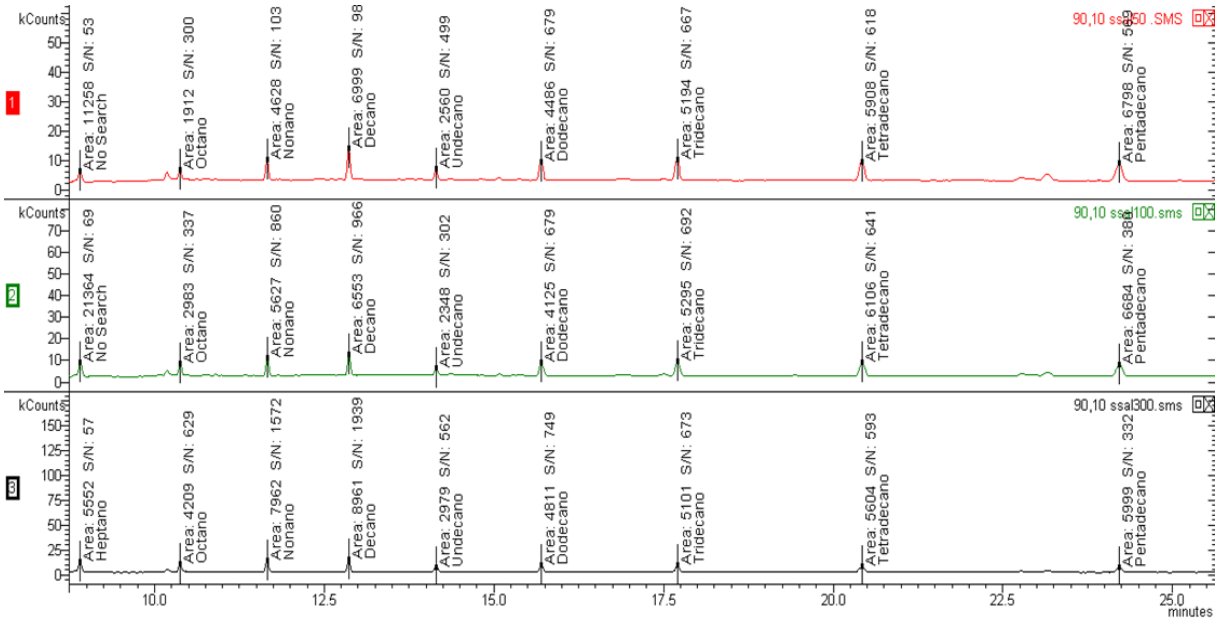


Figura 11 - Cromatogramas obtidos para análise de 100 ng de alcanos heptano a pentadecano para papel com adição de solução salina a 50,100 e 300 g/L de cloreto de sódio (em vermelho, verde e preto, respectivamente).

Foram testadas análises nas condições já determinadas anteriormente, mas com emprego de diferentes velocidades de agitação do incubador de amostras. A Figura 12 traz o exemplo de cromatogramas obtidos para agitação a 250, 500 e 650 RPM, sendo que todos experimentos até aqui foram executados com a velocidade de agitação de 500 RPM. Constata-se que esta velocidade parece ser mais adequada, favorecedora do máximo de partição dos analitos para fase gasosa, no tempo e temperatura empregados.

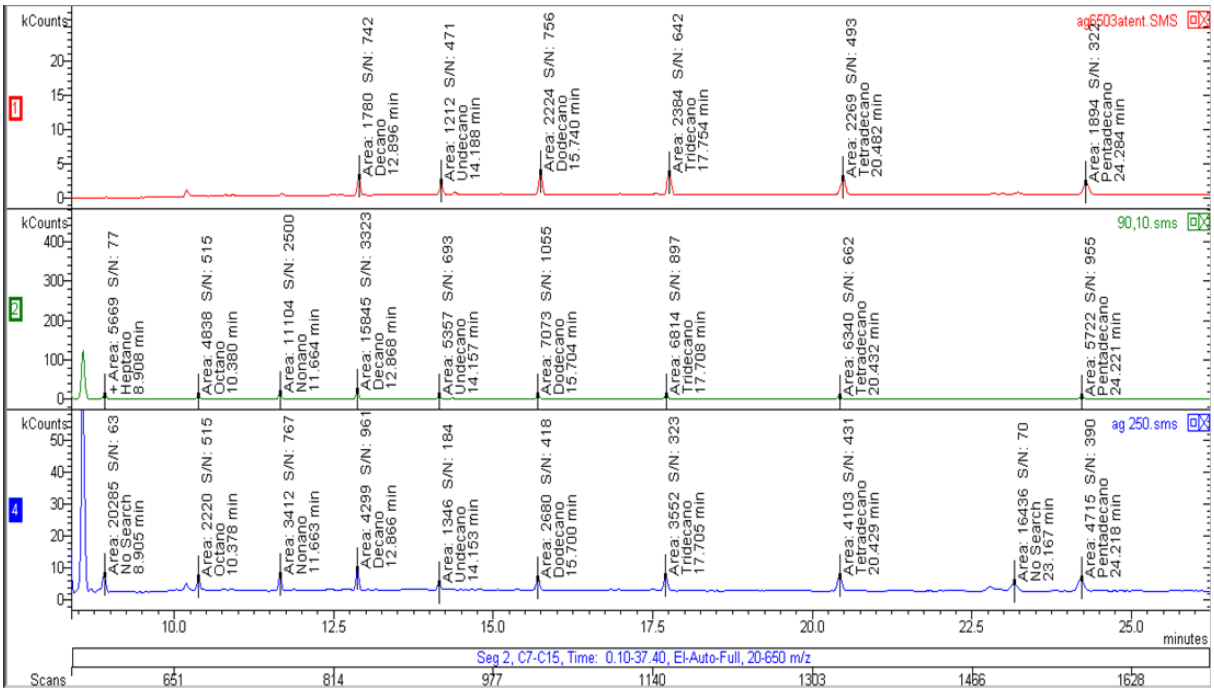


Figura 12 - Cromatogramas obtidos para análise de 100 ng de alcanos heptano a pentadecano para velocidades de agitação durante a incubação equivalentes a 250, 500 e 650 RPM (em azul, verde e vermelho, respectivamente).

O gráfico a seguir (Figura 13) pode sumarizar os efeitos observados para os parâmetros de adição de sal e velocidade de agitação durante a incubação.

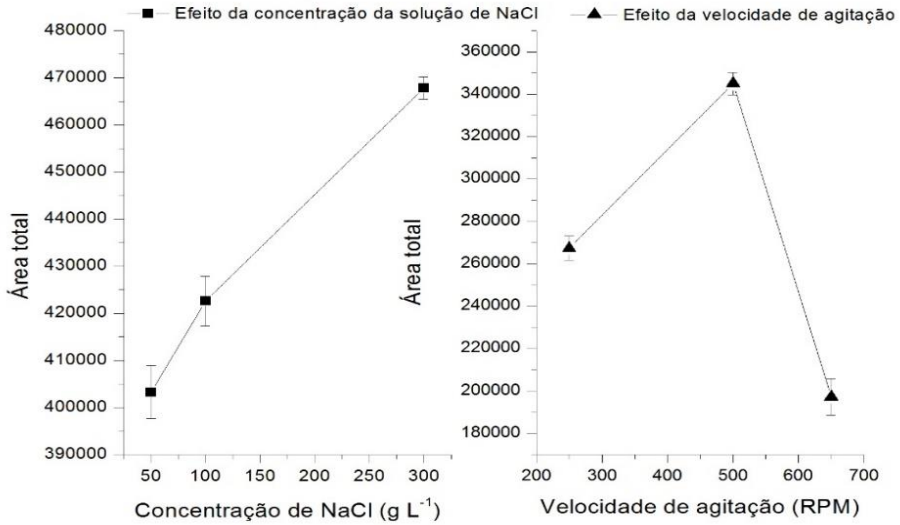


Figura 13 - Área total obtida *vs* concentração da solução salina e velocidade de agitação do incubador.

4.2. Verificação de interferentes da análise- Suor

Como observa-se na Figura 14, os primeiros picos do cromatograma são atribuídos à injeção, o pico em aproximadamente 4,0 minutos tem espectro com íon 43 m/z majoritário, o que é compatível com o espectro de difluoretileno, monômero do *teflon*, o material que reveste internamente as tampas dos frascos de amostra.

Não há praticamente diferença entre os cromatogramas de papel filtro e da bandagem do PharmChek®, além disso este último gera uma cromatograma pouco complexo, que não tem potencial de influenciar nas análises de suor, uma vez que os picos presentes deste material serão descontados das amostras reais e relatados com relação a seus espectros. Descrição mais detalhada dos picos interferentes (tempos de retenção e espectros) encontra-se na seção 4.1 do Capítulo III.

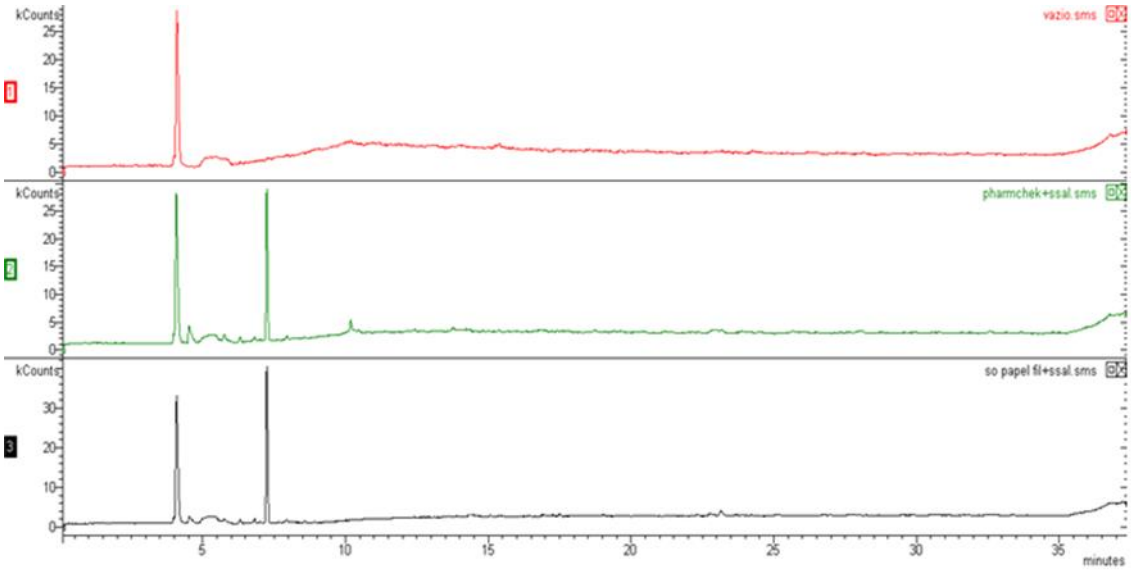


Figura 14 - Cromatogramas obtidos para análise de frasco vazio (em vermelho), contendo patch PharmChek® adicionado de solução salina (em verde) e papel filtro empregado no desenvolvimento de método, adicionado da mesma solução (em preto).

4.3. Desenvolvimento de método e otimização- Urina

Para o emprego de diferentes tempos de incubação e mesmo tipo de amostra foram obtidas tendências conforme mostradas nos gráficos seguintes. Os gráficos para cada tipo de amostra (amostra controle C1, amostra controle C2, amostra positiva P1 e amostra positiva P2) foram expressos em valores médio de área total (com barras de erros representando o desvio padrão das duplicatas) em função das diferentes temperaturas de incubação e diferentes tempos de incubação empregados (Figura 15). Tal valor de "área total" derivou da soma de áreas de todos os picos (corrente iônica total, "TIC") reconhecidos pelo *software* para um conjunto de parâmetros de integração idêntico em todos os casos, com critério para reconhecimento dos picos a apresentação de valor mínimo de 100 *counts*.

Além disso, como também parte do propósito, não só a resposta total deve ser considerada, mas também o número de picos reconhecidos, que foi mais um fator avaliado para determinação do método mais adequado.

Como é possível observar, novamente as condições de 90°C e 10 minutos de incubação parecem ser mais adequadas. Temperaturas e tempos de incubação menores favorecem a detecção de compostos mais voláteis, no entanto, a detecção de compostos com maiores tempos de retenção é prejudicada, o que também torna razoável compreender que em um tempo de incubação insuficiente certos compostos, mais voláteis, ocuparão maior parte do *headspace*, mas em um tempo ideal, mais compostos dividirão a ocupação do *headspace,* o que diminuirá a concentração dos primeiros compostos neste, mas proporcionará que um número maior de compostos possa ser detectado.

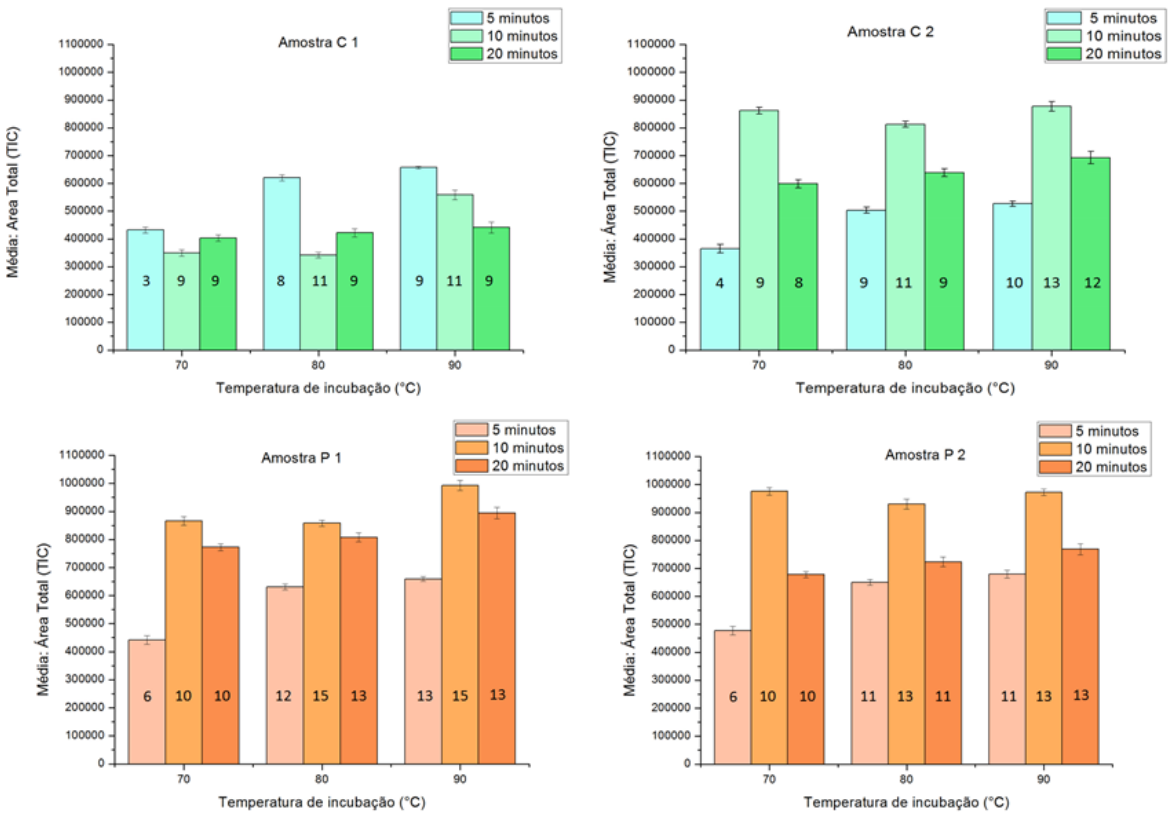


Figura 15 - Área total dos picos *vs* temperaturas de incubação empregadas, para diferentes tempos de incubação (amostras controles C1 e C2 e positivas P1 e P2). Os números de picos identificados estão escritos sobre as colunas correspondentes. Para as condições testadas a incubação *Headspace* a 90°C, por 10 minutos forneceu, na maioria dos casos, maiores valores de Área total, além de que um maior número de picos foi reconhecido

Em seguida, uma abordagem similar foi utilizada para determinação do volume de amostra a ser utilizado. Neste caso, quase não se observou diferença entre os valores obtidos para 500 µL e 1 mL, de forma que a diminuição do volume empregado deva ser priorizada. Constatou-se também que para amostras de urina particularmente, que são mais complexas em termos de composição que as amostras de suor, quando se atinge um volume maior do que o ideal de amostra isso acaba por influenciar negativamente a análise, devido ao aumento da linha de base. Como esperado, o aumento do ruído mostrou interferir consideravelmente na obtenção de espectros de massas claros. Assim, o volume de 500 µL foi o selecionado para as análises seguintes, as Figuras 16 e 17 ilustram este efeito.

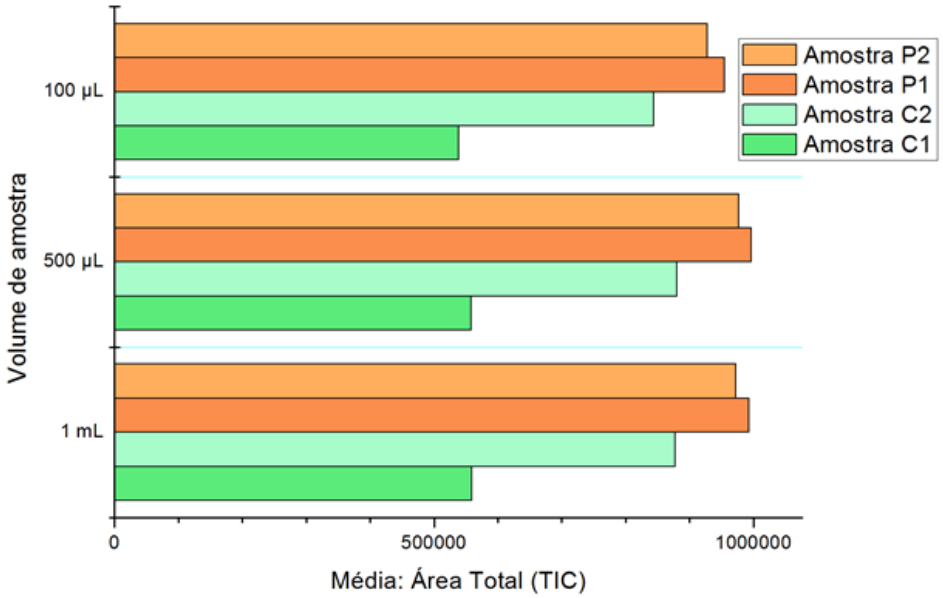


Figura 16 - Diferentes volumes de amostra vs área total dos picos (condições empregadas: 90°C, 10 minutos).

Com emprego das condições determinadas anteriormente, diferentes quantidades de sal cloreto de sódio adicionadas à amostra foram testadas. Inicialmente avaliou-se a adição da mesma solução saturada de sal utilizada nas análises do suor, no entanto, pouca ou nenhuma diferença foi observada, além disso, este processo envolveria incremento indesejado do volume final de amostra a ser analisado, de modo que a opção de adição de sal sólido mostrou-se mais apropriada. Sob o ponto de vista teórico, o efeito *salting-out* se limitará na quantidade necessária para a saturação do meio, o que aparenta ser a quantidade de 0,7 g, suficiente para saturar o meio e para a qual incrementos parecem não favorecer maior resposta analítica. O sal foi pesado em balança analítica e adicionado ao interior do frasco que era então submetido à breve agitação manual para homogeneização do sal com a amostra. A Figura 18 mostra cromatogramas sobrepostos da mesma amostra, para diferentes quantidades de sal adicionadas.

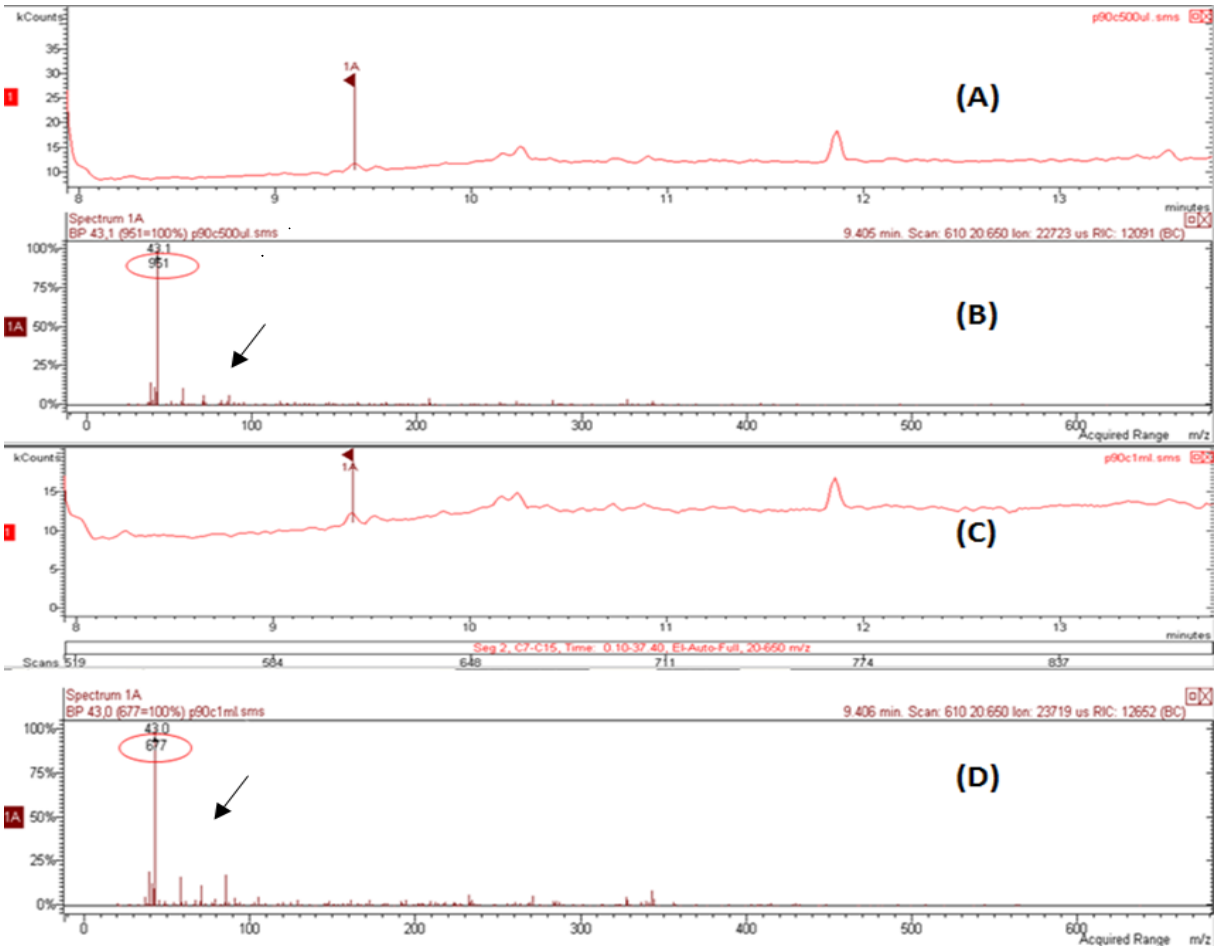


Figura 17 - Comparação de resposta de íons no espectro de massas, para um mesmo pico nos cromatogramas obtidos na análise de 500 µL (A e C) e 1 mL de amostra (B e D). Observa-se que para o volume de 1 mL a abundância do íon correspondente é menor (951 *vs* 677*)*, ainda, há maior abundância de picos estranhos ao espectro do composto em particular (setas indicando).

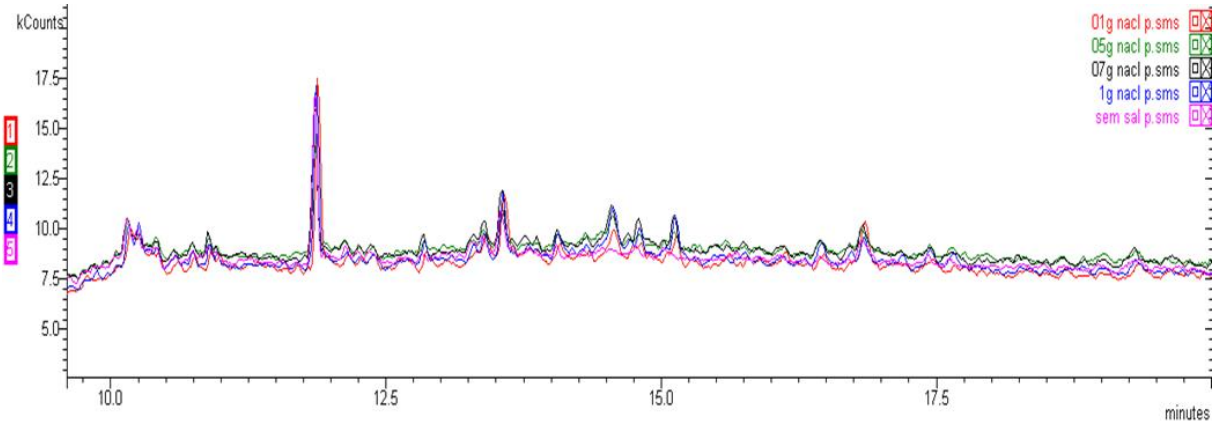


Figura 18 - Cromatogramas sobrepostos para análise de uma amostra (P2) com diferentes concentrações de sal sólido: 0,1 g (em vermelho), 0,5 g (em verde), 0,7 g (em preto), 1 g (em azul), e sem qualquer adição de sal (em rosa).

Quanto ao tratamento com a β-glucuronidase, este apresentou-se como essencial para detecção de mais compostos, houve também um razoável aumento da resposta dos compostos já identificados sem o tratamento, sem que fosse verificada a perda da detecção de algum composto. Os ensaios iniciais foram realizados com a adição de 100 unidades de enzima por amostra (equivalente à adição de 100 µL de solução 1 KU mL^{-1}).

Foram realizados testes com a incubação à temperatura de 37 e 50°C, porém, como ilustrado pela Figura 19 seguinte, nenhuma melhora foi evidenciada pelo uso da temperatura de 50°C, sugerindo que temperaturas superiores podem, na realidade, prejudicar a análise.

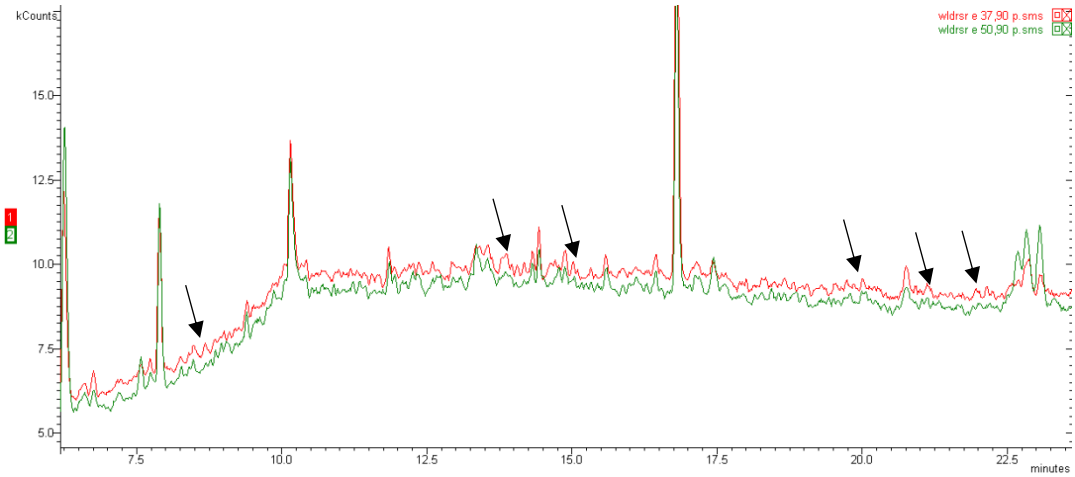


Figura 19 - Amostra P2 tratada com β-glucuronidase, ensaio de 90 minutos com temperaturas de incubação 37°C (em vermelho) e 50°C (em verde). Ocorreu uma melhora na resolução de muitos picos, outros, no entanto, deixaram de ser detectados (setas).

Considerando o aperfeiçoamento da análise através da adição de sal, após terminado o período de incubação com a enzima, foi misturado à amostra o sal sólido, o que implicou em grande melhora na análise. A Figura 20 seguinte mostra a comparação entre o cromatogramas obtidos para uma mesma amostra positiva (amostra P2) de urina não tratada e tratada com enzima, ambas acrescidas de sal.

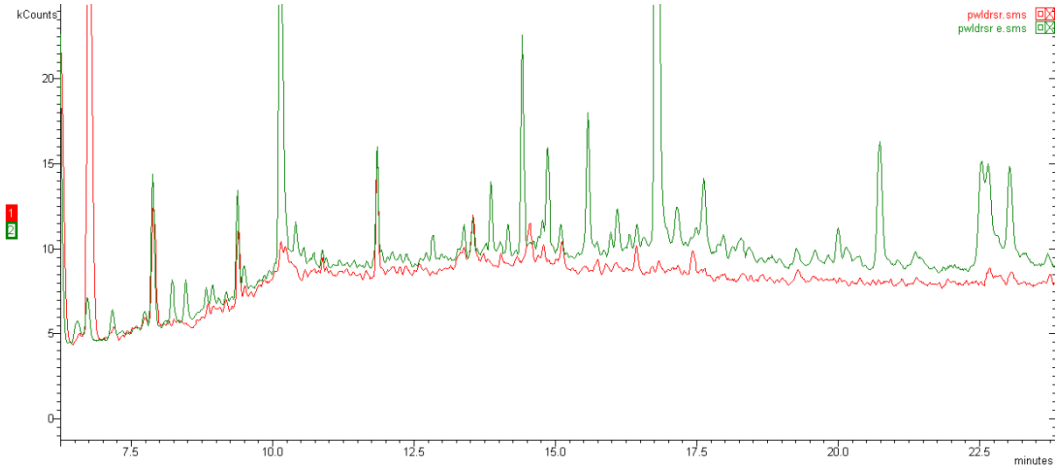


Figura 20 - Amostra P2 sem tratamento com enzima (em vermelho) e com tratamento da enzima β-glucuronidase (em verde), ensaio de 90 minutos, 37°C, adição de 0,7 g de cloreto de sódio.

Outro fator avaliado neste processo foi a quantidade de unidades de enzima adicionada às amostras. A Figura 21 compara os cromatogramas obtidos para esta variação. Observa-se a concentração de 500 U/volume de amostra (obtida pela adição de 25 µL de solução de enzima 20 KU mL^{-1}) foi a mínima que permitiu a detecção de maior número de picos, além disso, é possível notar que, aparentemente, para avaliação de conjugados originalmente voláteis, o uso de concentrações altas de enzima (como aplicadas nos protocolos de análises toxicológicas) pode ser desnecessário.

O pH de todas amostras de urina foi lido com fita de papel indicador universal, os valores variaram de pH 5,0 a 7,0. Como é necessário para a atividade enzimática ideal que o pH ótimo do meio seja mantido, foi necessário adicionar solução tampão às amostras para que apresentassem este critério. O volume final mínimo estabelecido para alterar o pH das amostras para o adequado foi de 150 µL de tampão fosfato pH 6,8 a 0,1 mol L^{-1}, considerando o volume de amostra igual a 500 µL.

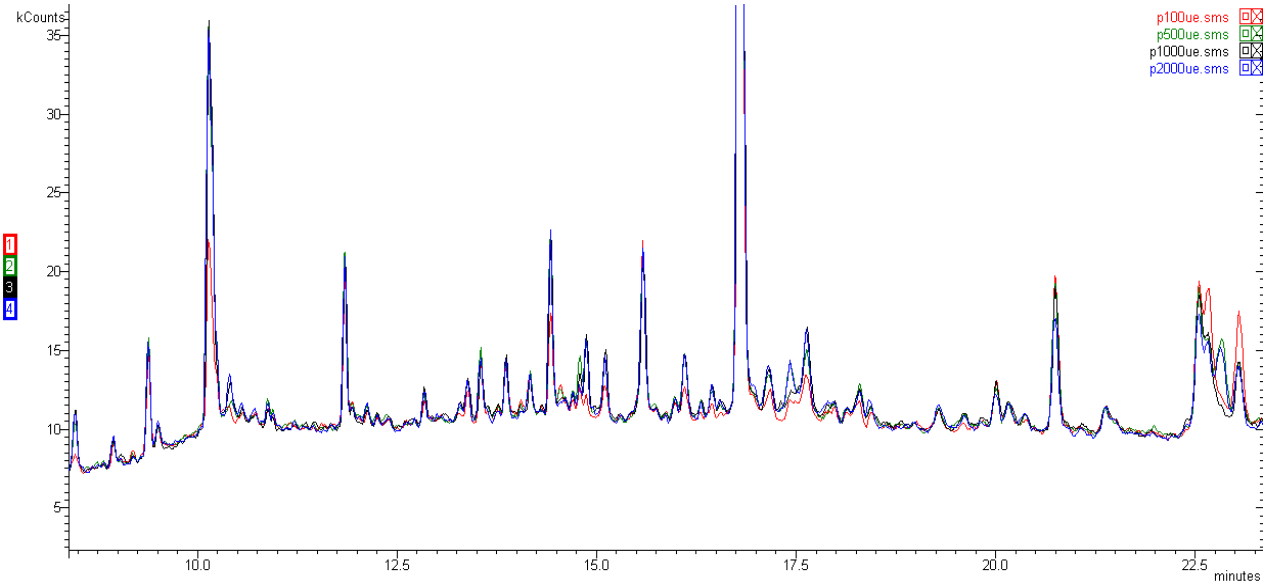


Figura 21 - Sobreposição de cromatogramas ilustrando análises para diferentes concentrações de β-glucuronidase: 100 U (em vermelho), 500 U (verde), 1000 U (em preto) e 2000 U (em vermelho); considerando-se uma mesma amostra (P2).

Além disso, verificou-se que uma vez retirada a incubação e adicionado o sal, a atuação enzimática demonstra não prosseguir de qualquer forma, para isso comparou-se amostras injetadas logo após o tratamento e muitas horas (2, 6 e 15 horas) após este, sendo que mudanças nos perfis cromatográficos e respostas não foram observados. É possível que a enzima não opere sem a temperatura de 37°C, já que a temperatura ambiente é de 23°C no local dos experimentos, ou mesmo que o aumento drástico da força iônica do meio ocasionada pelo acréscimo de sal seja capaz de interromper a atividade da β-glucuronidase.

4.4. Verificação de interferentes da análise- Urina

Nota-se que a interferência destas amostras “branco” pode ser considerada mínima (Figura 22), porém os picos provenientes devem ser identificados e descartados da lista de compostos detectados nas amostras. Descrição mais detalhada dos picos interferentes (tempos de retenção e espectro) encontra-se na seção 4.2 do Capítulo III.

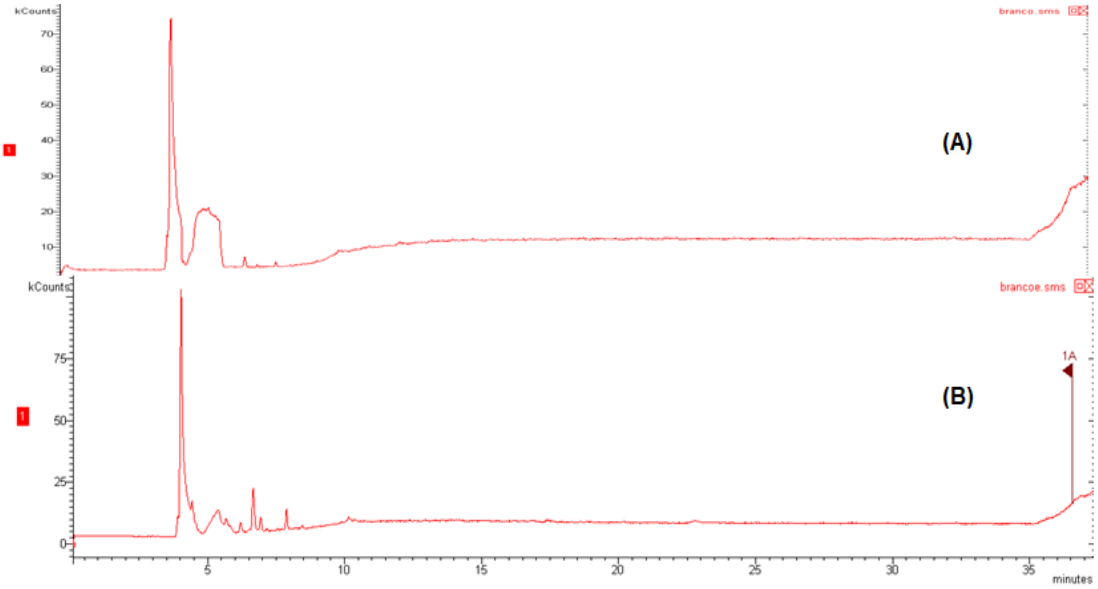


Figura 22 - Cromatogramas obtidos para uma análise de 500 µL de água, adicionada de sal (A), e do mesmo volume de água após processo de incubação com 500 U de β-glucuronidase, seguida da adição de sal (B).

5. CONCLUSÕES

- Considerando o exposto, as condições de análise definidas para as amostras de suor foram: Adição de 200 µL de solução de cloreto de sódio 300 g L^{-1} às amostras antes de serem levadas à análise; Incubação *Headspace* a 90°C, por 10 minutos, com agitação a 500 RPM.

- As condições de análise definidas para as amostras de urina foram: Volume de amostra de 500 µL de urina; Adição de 0,7 g de cloreto de sódio sólido à amostra; Incubação *Headspace* a 90°C, por 10 minutos com agitação a 500 RPM.

- Para ensaios com enzima: Volume de amostra de 500 µL; Adição de 125 µL de tampão pH 6,8 e adição de 500 U de enzima (25 µL de solução 20 KU mL^{-1}); Incubação para atuação da enzima a 37°C, por 90 minutos; Finalizada a incubação, adição de 0,7g de sal; Incubação *Headspace* a 90°C, por 10 minutos com agitação a 500 RPM.

CAPÍTULO III- AQUISIÇÃO DE PERFIS DE VOCs EM AMOSTRAS REAIS E SELEÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES

1. INTRODUÇÃO

As emanações da pele são produtos de uma mistura complexa de voláteis e ao que se indica, os padrões produzidos são os mais variados. Nestas emanações estuda-se ainda o conceito de voláteis humanos ativos, os quais desempenhariam funções de sinalização com relação ao ambiente e outros animais, como é o caso das substâncias classificadas como feromônios. Embora mais de mil voláteis já tenham sido detectados em amostras biológicas, e que possam ter utilidade no monitoramento de desordens no organismo humano, apenas poucos possuem via bioquímica associada completamente conhecida. O rastreio de compostos quanto a condições metabólicas cada vez mais específicas e as análises em tempo real para experimentos *in vitro,* mostram perspectivas neste sentido (AMMAN et al., 2014).

Com relação ao suor, deve ser considerada, além da migração dos compostos liberados na corrente sanguínea, a ação do microbioma cutâneo. Segundo demonstrado por algumas pesquisas, compostos apolares, como os precursores dos ácidos graxos responsáveis pelo odor característico do suor, do interior das glândulas, podem ser carreados até a superfície da pele pela secreção apócrina por ação de ligação a enzimas. Quando na superfície da pele, bactérias podem atuar na degradação destes precursores e liberar produtos ativos, de propriedades odoríficas. As enzimas envolvidas caracterizadas até o momento são as *Apocrine Secretion Odor-Binding Protein* 1 e 2 (ASOB1 e ASOB2), e destaca-se que, como qualquer enzima, têm expressão segundo a variabilidade genética, estando assim ligadas à influência étnica do indivíduo, entre outros fatores (SPIELMAN; ZENG; PRETI, 1995; PRETI; LEYDEN, 2010), potencialmente influindo de forma considerável na diversidade inter-individual dos perfis de emanações da pele. Ainda, considerando os estudos envolvendo este tópico, a Tabela 5 resume algumas possíveis origens para as classes de VOCs encontrados em emanações da pele (KUTYSHENKO et al., 2010; MOCHALSKI et al., 2014).

A distribuição deste voláteis virá a depender das partições sangue : ar e gordura : sangue, que são características das propriedades físico-químicas destes (AMANN et al., 2014)

Tabela 5 - Origens às quais as classes de VOCs no suor são geralmente atribuídas

Classe química	Origem atribuída
n-Alcanos Alcenos	Degradação oxidativa de diferentes ácidos graxos
n-Aldeídos	Degradação oxidativa de diferentes ácidos graxos
Compostos alifáticos de enxofre	Quebra endógena de aminoácidos que contém enxofre Metabólitos bacterianos de aminoácidos
Acetona	Degradação oxidativa do esqualeno Descarboxilação do acetil-CoA
n-Álcoois	Oxidação enzimática de alcanos
N-cetonas	Metabolismo de álcoois
Cetonas alifáticas insaturadas	Degradação do esqualeno
Heterociclos	Metabólitos bacterianos Componente do cigarro
Terpenos	Dieta (vegetal) Absorção de cosméticos e óleos essenciais Metabólitos bacterianos
Acetonitrila	Componente do cigarro
Pentano	Produto reconhecido da peroxidação de ácidos graxos
Isopreno	Degradação do esqualeno Síntese do colesterol
Aminoácidos	Componentes de fatores de hidratação natural da pele

2. OBJETIVOS

- Aplicar o método otimizado para a investigação dos analitos presentes nas amostras de suor e urina coletadas de voluntários;
- Detectar e identificar os voláteis presentes nas amostras de voluntários saudáveis e com câncer;
- Avaliar diferenças na excreção destes compostos e selecionar potenciais marcadores;
- Estabelecer comparações entre os perfis de voláteis obtidos para o suor e a urina.

3. MÉTODO

3.1. Materiais e reagentes

Os materiais e reagentes aqui empregados são referidos na seção equivalente (3.1.) do capítulo anterior (Capítulo II).

3.2. Metodologia experimental

A metodologia para o preparo de soluções e o método GC-MS nesta seção aplicados, são referidos no item 3.2. do Capítulo II. A coleta de amostras é descrita no Item 5 do Capítulo I. Para realização dos testes estatísticos simples, o *software* XLSTAT 2017 foi usado.

3.3. Análise de amostras reais- Suor

Uma vez selecionado o método indicado pelos testes de otimização realizados, prosseguiu-se para análise das amostras reais.

Antes de o frasco de *Headspace* contendo a amostra armazenada ser levado ao equipamento para injeção, a bandagem absorvente removida do adesivo foi adicionada de 200 µL de solução de cloreto de sódio a 300 g L^{-1}.

Cada cromatograma foi cuidadosamente estudado, sendo registrados todos os picos distintos do dispositivo adesivo, da injeção ou da coluna e, portanto, pertencentes apenas aos VOCs advindos do suor, possuindo um valor de sinal/ruído superior a 3. Uma vez identificado um pico, seu espectro foi pesquisado na biblioteca de espectros NIST08, com o objetivo de se obter a identidade mais provável para aquele composto. A sugestão mais provável para identidade de cada pico era também escolhida não só com base na maior probabilidade com relação ao espectro, mas também era verificada com relação ao seu possível tempo de retenção na corrida cromatográfica, de modo a se obter, diante dos meios disponíveis, o resultado mais plausível.

Como um auxílio à tentativa de identificação, os cromatogramas também foram processados com o *software* AMDIS32 (*Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System*). Esta ferramenta associada aos pacotes de busca da NIST basicamente propõe a deconvolução de espectros reconhecendo espectros

sobrepostos através do comportamento de distribuição da população de diferentes íons em um dado intervalo de tempo, sendo assim possível fazer a distinção de espectros em cromatogramas complexos ou simplesmente extrair espectros “limpos” e pesquisá-los em bibliotecas específicas, ou novamente na própria NIST, como foi o caso. Os parâmetros empregados no *software* foram para análise dos dados GC-MS no modo simples, sendo selecionado o íon interferente da coluna como 207 m/z, resolução, sensibilidade e formato requerido nos níveis médio.

Uma vez registrados todos possíveis compostos presentes nas amostras dos dois grupos de voluntários, examinou-se, junto às informações coletadas a respeito dos indivíduos, possíveis evidências da detecção de biomarcadores nas amostras de suor investigadas.

3.4. Análise de amostras reais- Urina

O volume de 500 µL de urina foi transferido ao frasco de *Headspace*, seguindo-se da adição de 0,7 g de cloreto de sódio à amostra antes de esta ser levada à injeção em GC-MS.

Uma derivação deste procedimento também foi realizada para avaliação de compostos conjugados: no frasco de *Headspace*, a 500 µL de amostra, adicionou-se 125 µL de tampão fosfato (PBS) pH 6,8 a 0,1 mol L^{-1} e 25 µL de solução de enzima 20 KU mL^{-1}. Estes frascos foram incubados em incubador de amostrador CombiPal, a temperatura de 37°C, sem agitação, por um período de 90 minutos. Após a incubação, adicionou-se à amostra 0,7 g de cloreto de sódio e então os frascos foram levados à *rack* para injeção.

Diferentemente do que para as amostras de suor, a análise dos espectros obtidos para os cromatogramas das amostras de urina foi realizada apenas empregando-se o procedimento no software AMDIS32, pois, por ser uma matriz mais complexa, verificou-se uma influência muito maior da linha de base, o que resultava na dificuldade em se obter adequadamente o espectro para picos de menor intensidade (o caso de praticamente todos). Quando possível, os espectros eram editados manualmente, deletando-se um a um os íons estranhos e realizando-se nova busca na NIST para verificar a identificação feita pelo AMDIS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise de amostras reais- Suor

Os dados coletados dos voluntários encontram-se nas Tabelas 6 (voluntários "saudáveis") e 7 (voluntários diagnosticados com câncer). A Tabela 8 resume o perfil dos voluntários participantes da pesquisa.

Tabela 6 - Informações do grupo de controle (gênero, idade, diagnósticos médicos, quantidade observada de suor produzido e uso de tabaco e álcool durante o período monitorado).

Grupo controle- Suor - (SC=suor controle)						**[Continua...]**
Voluntário	**Gênero**	**Idade**	**Uso de medicamentos**	**Diagnósticos médicos**	**Produção de suor observada**	**Outras observações**
1 SC	Feminino	65	Metformina, Atenolol	Diabetes, hipertensão, glaucoma	Intensa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
2 SC	Feminino	39	Puran T4	-	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
3 SC	Masculino	44	-	-	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
4 SC	Feminino	60	Tibolona, Vitamina D	-	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
5 SC	Feminino	44	-	-	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
6 SC	Masculino	46	Amitriptilina	-	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
7 SC	Feminino	53	Valsartana, Hidroclorotiazida, besilato de amlodipina (Exforge HCT)	-	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
8 SC	Feminino	52	Puran T4	-	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool

Grupo controle- Suor - (SC=suor controle)						[Continuação]
Voluntário	**Gênero**	**Idade**	**Uso de medicamentos**	**Diagnósticos médicos**	**Produção de suor observada**	**Outras observações**
9 SC	Masculino	58	-	-	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
10 SC	Masculino	47	-	-	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
11 SC	Masculino	52	-	-	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
12 SC	Feminino	24	Dipropiato de betametasona, sulfato de gentaminicina	Dermatite atópica	Baixa	Ex-tabagista Sem uso de tabaco/ álcool
13 SC	Feminino	21	-	-	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
14 SC	Feminino	51	-	-	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
15 SC	Feminino	42	-	-	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
16 SC	Feminino	32	-	-	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
17 SC	Feminino	50	Nitrendipina, sinvastatina, valsartana	Hipertensão, Dislipidemia	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
18 SC	Feminino	54	-	-	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
19 SC	Feminino	41	Hidroclorotiazida, Losartana	Hipertensão	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
20 SC	Masculino	51	-	-	Mediana	Fumante ativo Fez uso de álcool
21 SC	Feminino	57	Hidroclorotiazida, Atenolol	Hipertensão	Mediana	Ex-tabagista Sem uso de tabaco/ álcool
22 SC	Feminino	55	Propanolol, metimazol	Hipertiroidismo	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool

Grupo controle- Suor - (SC=suor controle)						[Conclusão]
Voluntário	**Gênero**	**Idade**	**Uso de medicamentos**	**Diagnósticos médicos**	**Produção de suor observada**	**Outras observações**
23 SC	Masculino	35	-	-	Mediana	Fumante ativo Sem uso de álcool
24 SC	Masculino	57	-	-	Baixa	Sem uso de tabaco Fez uso de álcool
25 SC	Masculino	60	Sinvastatina, Metformina	Dislipidemia, Diabetes	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
26 SC	Masculino	63	-	-	Mediana	Sem uso de tabaco Fez uso de álcool
27 SC	Masculino	58	-	-	Baixa	Sem uso de tabaco Fez uso de álcool
28 SC	Masculino	66	-	-	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
29 SC	Masculino	61	Atenolol, Hidroclorotiazida	Hipertensão	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
30 SC	Feminino	73	Losartana, Sinvastatina	Hipertensão, Dislipidemia	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
31 SC	Masculino	50	-	-	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
32 SC	Masculino	56	-	-	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool

Tabela 7 - Informações do grupo de indivíduos diagnosticados com câncer (gênero, idade, tipo de neoplasia, outros diagnósticos médicos, quantidade observada de suor produzido e uso de tabaco e álcool durante o período monitorado).

Grupo positivo- Suor - (SP=suor positivo; CEC=carcinoma de células escamosas)							**[Continua...]**
Voluntário	**Gênero**	**Idade**	**Neoplasia**	**Uso de medicamentos**	**Outros diagnósticos médicos**	**Produção de suor observada**	**Outras observações**
1 SP	Masculino	70	Adenocarcinoma de pulmão, metastático	-	Diabetes	Intensa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
2 SP	Feminino	71	Adenocarcinoma de vias biliares, metastático	-	-	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
3 SP	Feminino	45	CEC de esôfago (operado)	-	-	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
4 SP	Masculino	46	CEC de boca, com invasão da língua (operado)	-	Hepatopatia alcóolica	Mediana	Fumante ativo Etilista
5 SP	Feminino	75	Adenocarcinoma de pâncreas, metastático	Sinvastatina, Loratadina	-	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
6 SP	Feminino	68	Adenocarcinoma de pulmão	-	-	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
7 SP	Masculino	58	Adenocarcinoma gástrico, metastático	Paracetamol, codeína, dipirona, omeprazol	-	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
8 SP	Masculino	37	Linfoma	-	-	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
9 SP	Masculino	52	Adenocarcinoma de pulmão	-	Diabetes	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
10 SP	Masculino	64	Adenocarcinoma gástrico	-	-	Intensa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
11 SP	Masculino	60	CEC de boca	Paracetamol	-	Mediana	Fumante ativo Sem uso de álcool
12 SP	Masculino	61	Adenocarcinoma gástrico	-	-	Intensa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool

Grupo positivo- Suor - (SP=suor positivo; CEC=carcinoma de células escamosas)							[Continuação]
Voluntário	**Gênero**	**Idade**	**Neoplasia**	**Uso de medicamentos**	**Outros diagnósticos médicos**	**Produção de suor observada**	**Outras observações**
13 SP	Feminino	58	Adenocarcinoma de cólon do reto, metastático	-	-	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
14 SP	Masculino	60	Próstata	Diclofenaco de potássio, Omeprazol, Cetoprofeno	Hepatite C tratada, espondilite	Baixa	Fumante ativo Sem uso de álcool
15 SP	Masculino	40	CEC de esôfago, lesão suspeita no rim	AZT+ 3TC + EFV, atorvastatina	HIV+, Hepatite C,-tratada Dislipidemia, Disfagia	Intensa	Fumante ativo Etilista
16 SP	Masculino	69	Próstata	-	Hipertensão, Diabetes	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
17 SP	Feminino	51	Adenocarcinoma gástrico, metastático	-	-	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
18 SP	Masculino	53	CEC de esôfago, metastático	-	-	Mediana	Fumante ativo Etilista
19 SP	Masculino	70	Próstata	-	Doença pulmonar crônica, Hipertensão	Mediana	Fumante ativo Etilista
20 SP	Masculino	65	Próstata	Metformina,Sinvastatina, Captopril	Diabetes, Hipertensão, Psoríase	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
21 SP	Masculino	58	Próstata	-	-	Intensa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
22 SP	Masculino	63	Próstata	Ácido acetil salicílico	Hipertensão, Diabetes	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
23 SP	Masculino	60	Rim	Losartana, Hidroclorotiazida	Hipertensão	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
24 SP	Masculino	73	Rim, próstata	-	-	Intensa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
25 SP	Masculino	48	Rim	Diazepam, Quetiapina, Tramal, Haldol	Transtorno psiquiátrico	Baixa	Ex-etilista Sem uso de tabaco/ álcool
26 SP	Feminino	44	Rim	-	-	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool

Grupo positivo- Suor - (SP=suor positivo; CEC=carcinoma de células escamosas)							[Conclusão]
Voluntário	**Gênero**	**Idade**	**Neoplasia**	**Uso de medicamentos**	**Outros diagnósticos médicos**	**Produção de suor observada**	**Outras observações**
27 SP	Masculino	68	Próstata	Ácido acetil salicílico, Metoprolol, Enalapril	Hepatite C-tratada	Baixa	Fumante ativo Sem uso de álcool
28 SP	Masculino	73	Próstata	-	-	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
29 SP	Masculino	60	Próstata	-	-	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
30 SP	Feminino	59	Adenocarcinoma gástrico	-	-	Baixa	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
31 SP	Masculino	73	Próstata	Amlodipina, Furosemida, Clonidina	Doença renal crônica, Hipertensão	Mediana	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
32 SP	Masculino	73	Adenocarcinoma gástrico, metastático	-	-	Mediana	Ex-etilista Sem uso de tabaco/ álcool

Tabela 8 - Perfil geral dos voluntários participantes- amostras de suor

Perfil de voluntários- Amostras de suor					
Grupo controle (n=32)			**Grupo positivo (n=32)**		
Gênero	**Idade (média)**	**Desvio padrão**	**Gênero**	**Idade (média)**	**Desvio padrão**
Masculino 15 Feminino 17	50,53	11,70	Masculino 24 Feminino 8	60,16	10,53

A Tabela 9 apresenta os picos de possíveis interferentes: picos provenientes da injeção (observados para análise do frasco de análise vazio), do dispositivo coletor (bandagem absorvente do PharmChek®) e isopropanol, cujo resíduo poderia estar presente sobre a pele do voluntário, fazendo com que seja transferido para a amostra. Estes picos foram desconsiderados da investigação cromatográfica. Já os principais compostos detectados nas amostras se encontram listados no APÊNDICE 1 (para amostras de indivíduos controles) e APÊNDICE 2 (para amostras de indivíduos diagnosticados com câncer).

Tabela 9 - Voláteis identificados como possíveis interferentes nas análises de suor

Possíveis interferentes presentes nas amostras de suor					
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
Frasco vazio	3,87	Fluoracetileno	14,60	Dióxido de carbono	10,50
	5,64	Formamida	18,40	Ácido propanoico, 2-hidroxi-etil éster	40,00
Dispositivo PharmChek®	3,91	Butano	10,86	-	
	6,21	Ácido 2-oxo-aminopropanoico	19,10	-	
	7,13	2-nitro-butano	8,76	2-metil-nitro-propano	20,50
	8,40	Ciclohexano	2,79	Ciclohexano	22,80
Isopropanol	6,17	(Identidade confirmada através de fortificação com o padrão)			

A mesma classe de substâncias tende a ter um espectro muito semelhante, assim sendo, a pesquisa na biblioteca de espectros através do *software* pode fornecer muitas sugestões para um dado espectro investigado, dividindo as probabilidades correspondentes, sendo que porcentagens maiores de probabilidade são verificadas apenas para compostos de espectro muito singular. Por isso também variações nas identidades fornecidas pelo *software* são muito comuns. Assim, a pesquisa na biblioteca do espectro de massas contribui na identificação dos compostos correspondentes no sentido de direcionar a interpretação de um espectro.

As identidades sugeridas apresentadas nos resultados foram indicadas com base nos compostos com maior porcentagem de combinação com a biblioteca de espectros, plausibilidade do tempo de retenção observado e concordância, a partir da criteriosa análise individual do espectro, com o espectro de massas padrão da substância.

Certos compostos são recorrentes na maioria das amostras, provavelmente, por fazerem parte da composição volátil comum da matriz. Na Tabela 10 encontram-se elencados os compostos encontrados em todas amostras de suor com maior frequência, os quais podem estar associados à composição endógena principal de voláteis no suor:

Tabela 10 - VOCs mais frequentes nas amostras de suor analisadas

Tempo de retenção (minutos)	Espectro de massas	Possível identidade	Frequência (%)
	Íons (m/z)		
7,96	43,70,42	2-butanona	*95,3*
12,12	57,71,67,82	2-Metil- ciclopentanol/Estireno	*87,5*
15,03	41,57,29,43	2-decen-1-ol/Nonanal	*90,6*
16,89	41,57,55,82	Dodecanal/Decanal	*84,4*

Poucas pesquisas abordaram os compostos orgânicos voláteis que compõem o suor. Choi e Oh (2014) realizaram o preparo de amostra por *Headspace* associado a microextração em fase sólida (HS-SPME) diretamente do suor colhido após atividade física induzida, a análise foi feita por cromatografia gasosa bidimensional acoplada a espectrômetro de massas com analisador de tempo de vôo (GCxGC-TOF MS). Antes, Gallagher et al. (2008) também trabalharam na identificação destes compostos empregando GC-MS, foi utilizada extração por SPME e extração líquido-líquido com solvente, diretamente do suor sobre a pele, após atividade física. Tais trabalhos demonstraram que o perfil de VOCs corresponde principalmente a álcoois, aldeídos e ésteres de ácidos carboxílicos, o que se mostra de acordo com os dados obtidos. Alguns dos compostos reportados nesses estudos puderam ser relacionados com alguns dos compostos identificados nas análises, como mostra a Tabela 11.

Tabela 11 - Compostos mais incidentes, correlacionados com a literatura para VOCs no suor

VOCs no suor		**[Continua...]**
Possível identidade	**CHOI; OH, 2014**	**GALLAGHER et al., 2008**
2-Metil-ciclopentanol	-	✓
Octanal	-	✓
Nonanal	✓	✓
1-Octen-3-ol	✓	-
Decanal	✓	✓
2-Decen-1-ol/Nonanal	-	✓
1-Undeceno	-	✓
5,9-Undecadien-2-ona	✓	-

VOCs no suor		[Conclusão]
Possível identidade	**CHOI; OH, 2014**	**GALLAGHER et al., 2008**
6,10-Dimetil-5,9-undecadien-2-ona	✓	✓
Dodecanal	-	✓

Verificou-se, na presente pesquisa, que a incidência destes compostos, a qual pode estar atrelada às variações nas concentrações destes (já que é um fator dependente do limite de detecção do método), demonstrou se distribuir de forma diferente de indivíduo para indivíduo, portanto, o perfil de compostos orgânicos voláteis no suor aparenta estar sujeito à variação inter-individual, como também apontam estudos similares, citados anteriormente. Desta forma, é necessário verificar se mesmo diante desta característica os dois grupos de amostras podem ser considerados de fato diferentes em termos de sua composição. Para tanto, foi elaborada uma tabela de frequência contendo listados todos possíveis compostos identificados com incidência maior ou igual a 3, e suas frequências no grupo controle, positivo e no grupo geral das amostras, como mostrado na Tabela 12.

Tabela 12 - Frequência dos VOCs detectados nas amostras de suor

Frequência dos VOCs nas amostras de suor (Inc.= Incidência; Freq.= Frequência)								[Continua]
Tempo de retenção	**Espectro de massas**	**Possível identidade**	**Total (n=64)**		**Grupo controle (n=32)**		**Grupo positivo (n=32)**	
(minutos)	**Íons (m/z)**		**Inc. (≥ 3)**	**Freq. (%)**	**Inc.**	**Freq. (%)**	**Inc.**	**Freq. (%)**
6,58	76,44,32,38	Dissulfeto de carbono	5,0	*7,8*	0,0	*0,0*	5,0	*15,6*
6,60	41,40,39,38	Acetonitrila	20,0	*31,3*	7,0	*21,9*	13,0	*40,6*
6,65	43,41,41,71	2-metil-pentano	16,0	*25,0*	13,0	*40,6*	3,0	*9,4*
6,95	57,56,41,43	3-metil-pentano	30,0	*46,9*	17,0	*53,1*	13,0	*40,6*
7,34	41,39,70	2-butenal	5,0	*7,8*	0,0	*0,0*	5,0	*15,6*
7,45	41,70,39,42,40	Metacroleína	4,0	*6,3*	0,0	*0,0*	4,0	*12,5*
7,53	45,43,27,44	1,3-butanodiol	5,0	*7,8*	0,0	*0,0*	5,0	*15,6*
7,75	43,42,44	Ácido acético	10,0	*15,6*	1,0	*3,1*	9,0	*28,1*

Frequência dos VOCs nas amostras de suor (Inc.= Incidência; Freq.= Frequência)								[Continuação]
Tempo de retenção	**Espectro de massas**	**Possível identidade**	**Total (n=64)**		**Grupo controle (n=32)**		**Grupo positivo (n=32)**	
			Inc.	**Freq.**	**Inc.**	**Freq.**	**Inc.**	**Freq.**
(minutos)	**Íons (m/z)**		**(≥ 3)**	**(%)**		**(%)**		**(%)**
7,86	43,70,42	2-butanona	61,0	*95,3*	29,0	*90,6*	32,0	*100,0*
8,08	56,45,41,57	Heptano	5,0	*7,8*	3,0	*9,4*	2,0	*6,3*
8,15	57,56,41	4-metil-1-hexeno	6,0	*9,4*	0,0	*0,0*	6,0	*18,8*
8,25	43,57,41,56	2,4-dimetil-pentano	11,0	*17,2*	2,0	*6,3*	9,0	*28,1*
8,50	56,41,39	Metil-ciclopentano	14,0	*21,9*	4,0	*12,5*	10,0	*31,3*
8,79	43,71,70,41	3-etil-pentano	5,0	*7,8*	4,0	*12,5*	1,0	*3,1*
8,82	43,71,41,70	2,4-dimetil-3-pentanona	28,0	*43,8*	7,0	*21,9*	21,0	*65,6*
9,04	56,55,41,43	5-metil-hexen-2-eno	10,0	*15,6*	2,0	*6,3*	8,0	*25,0*
9,51	55,84,80,41	Pentanal	5,0	*7,8*	0,0	*0,0*	5,0	*15,6*
10,18	55,42,43,41	3-metil-1-butanol	3,0	*4,7*	1,0	*3,1*	2,0	*6,3*
10,40	91,92,65	Tolueno	16,0	*25,0*	3,0	*9,4*	13,0	*40,6*
10,54	58,69,78,28	4-metil-2-heptanona/2,2,2-trifluormetil-acetamida	13,0	*20,3*	0,0	*0,0*	13,0	*40,6*
10,99	43,44,56,84/81	Hexanal	19,0	*29,7*	1,0	*3,1*	18,0	*56,3*
11,70	91,106,77	Etil-benzeno	11,0	*17,2*	1,0	*3,1*	10,0	*31,3*
12,12	57,71,67,82	2-metil-Ciclopropanol/Estireno	56,0	*87,5*	24,0	*75,0*	32,0	*100,0*
12,23	70,44,41	Heptanal	11,0	*17,2*	0,0	*0,0*	11,0	*34,4*
13,10	81,82,138	2-pentil furano	9,0	*14,1*	0,0	*0,0*	9,0	*28,1*
13,34	43,41,55,69	6-metil-5-hepten-2-ona	31,0	*48,4*	12,0	*37,5*	19,0	*59,4*
13,38	56,55,41,43	Octanol	7,0	*10,9*	0,0	*0,0*	7,0	*21,9*
13,54	57,43,71,85	Octanal	21,0	*32,8*	0,0	*0,0*	21,0	*65,6*
13,70	68,53,97	Limoneno	14,0	*21,9*	0,0	*0,0*	14,0	*43,8*
13,86	57,41,43,55	2-etil-1-hexanol	32,0	*50,0*	0,0	*0,0*	32,0	*100,0*
13,98	55,56,70,41	3,3-dimetil-octeno	18,0	*28,1*	1,0	*3,1*	17,0	*53,1*
14,03	43,55,56,41	1-undeceno	11,0	*17,2*	0,0	*0,0*	11,0	*34,4*

Frequência dos VOCs nas amostras de suor (Inc.= Incidência; Freq.= Frequência)								[Conclusão]
Tempo de retenção	**Espectro de massas**	**Possível identidade**	**Total (n=64)**		**Grupo controle (n=32)**		**Grupo positivo (n=32)**	
			Inc.	**Freq.**	**Inc.**	**Freq.**	**Inc.**	**Freq.**
(minutos)	**Íons (m/z)**		**(≥ 3)**	**(%)**		**(%)**		**(%)**
14,10	57,43,56	2,6,7-trimetil-decano	6,0	*9,4*	4,0	*12,5*	2,0	*6,3*
14,15	94,66,65,39	Fenol	12,0	*18,8*	0,0	*0,0*	12,0	*37,5*
14,38	98,83,55,41	2-butil-ciclohexanona	6,0	*9,4*	2,0	*6,3*	4,0	*12,5*
14,45	59,43,55,69	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	12,0	*18,8*	0,0	*0,0*	12,0	*37,5*
14,66	79,108,107	Álcool benzílico	8,0	*12,5*	0,0	*0,0*	8,0	*25,0*
14,77	69,73,55,57	3,7-dimetil-3-octanol	3,0	*4,7*	3,0	*9,4*	0,0	*0,0*
15,03	41,57,29,43	Nonanal	58,0	*90,6*	28,0	*87,5*	30,0	*93,8*
15,27	105,77,136	Metil benzoato	8,0	*12,5*	6,0	*18,8*	2,0	*6,3*
15,53	109,43,81	6-metil-3,5-heptadien-2-ona	3,0	*4,7*	2,0	*6,3*	1,0	*3,1*
16,89	41,57,55,82	Decanal	54,0	*84,4*	26,0	*81,3*	28,0	*87,5*
17,70	57,43,71,41	Tridecano	6,0	*9,4*	0,0	*0,0*	6,0	*18,8*
18,70	94,138,77	2-fenoxi-etanol	3,0	*4,7*	0,0	*0,0*	3,0	*9,4*
19,20	57,43,71,41	6-metil-tridecano	6,0	*9,4*	2,0	*6,3*	4,0	*12,5*
19,39	81,41,39	2,4-dodecadienal	5,0	*7,8*	3,0	*9,4*	2,0	*6,3*
20,34	57,43,41,71	5,8-dietil-dodecano	22,0	*34,4*	10,0	*31,3*	12,0	*37,5*
23,07	57,43,55,41	Ácido butanoico, heptil éster	4,0	*6,3*	2,0	*6,3*	2,0	*6,3*
25,15	43,69,41,39	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	34,0	*53,1*	18,0	*56,3*	16,0	*50,0*
27,11	74,87,41,55	Ácido 2-metil dodecanoico	9,0	*14,1*	0,0	*0,0*	9,0	*28,1*
34,44	41,43,57	Ácido oxálico, alil nonil éster	4,0	*6,3*	4,0	*12,5*	0,0	*0,0*
34,93	57,43,71,85	2-metil-pentadeceno	7,0	*10,9*	7,0	*21,9*	0,0	*0,0*

Com base na tabela de frequência foi empregado o teste chi-quadrado, um teste estatístico categórico, utilizado para verificar se a diferença na distribuição de determinados eventos em dois grupos é estatisticamente relevante. O resultado é expresso em termos do valor p, que é um parâmetro numérico indicativo da hipótese

testada, no caso, a hipótese seria a existência de distinção entre os dois grupos. No caso do valor $p<0,05$, tal hipótese pode ser aceita.

O valor encontrado para o teste foi << 0,01 (igual a $1,3\times10^{-23}$, quando todos valores de incidência são considerados, e igual a $2,4\times10^{-11}$ quando são excluídos todos compostos cuja incidência esperada é ≤ 5, atendendo mais propriamente aos critérios do teste), disto infere-se que a hipótese nula, de que a diferença entre grupos assim resulta da aleatoriedade, seria improvável. Este valor obtido relaciona-se principalmente com a incidência de determinados compostos no grupo positivo, em especial os referentes aos de tempos de retenção em torno de 6,58; 7,34; 7,45; 7,53; 8,15; 9,51; 10,54; 12,23; 13,10; 13,38; 13,54; 13,70; 13,86; 14,15; 14,45; 14,66; 17,70; 18,70; 27,11 e 14,04. Compostos correspondentes aos tempos de retenção de cerca de 14,77; 34,44 e 34,93 se mostraram, por outro lado, ausentes nas amostras positivas.

O composto com tempo de retenção médio de 13,86 minutos, identificado como possivelmente sendo 2-etil-1-hexanol, foi observado em todas amostras positivas estando ausente nas amostras do grupo controle. A produção aumentada de 2-etil-1-hexanol reportada em amostras de urina de pacientes com câncer de pulmão (HANAI et al., 2012a), headspace de linhagem de células cancerosas de pulmão (SPONRING et al., 2009; FILIPIAK et al., 2010), headspace de células cancerosas de câncer de mama (SILVA et al., 2017) e saliva de indivíduos com câncer (pulmão, estômago e colorretal) (SÁNCHEZ et al., 2012), parecendo configurar como um marcador de alguma condição geral dos indivíduos com câncer. Exemplos de cromatogramas na região do tempo de retenção correspondente podem ser observados na Figura 23.

Outros compostos não foram detectados em amostras do grupo controle e foram detectados em amostras positivas, como indicados na Tabela 13.

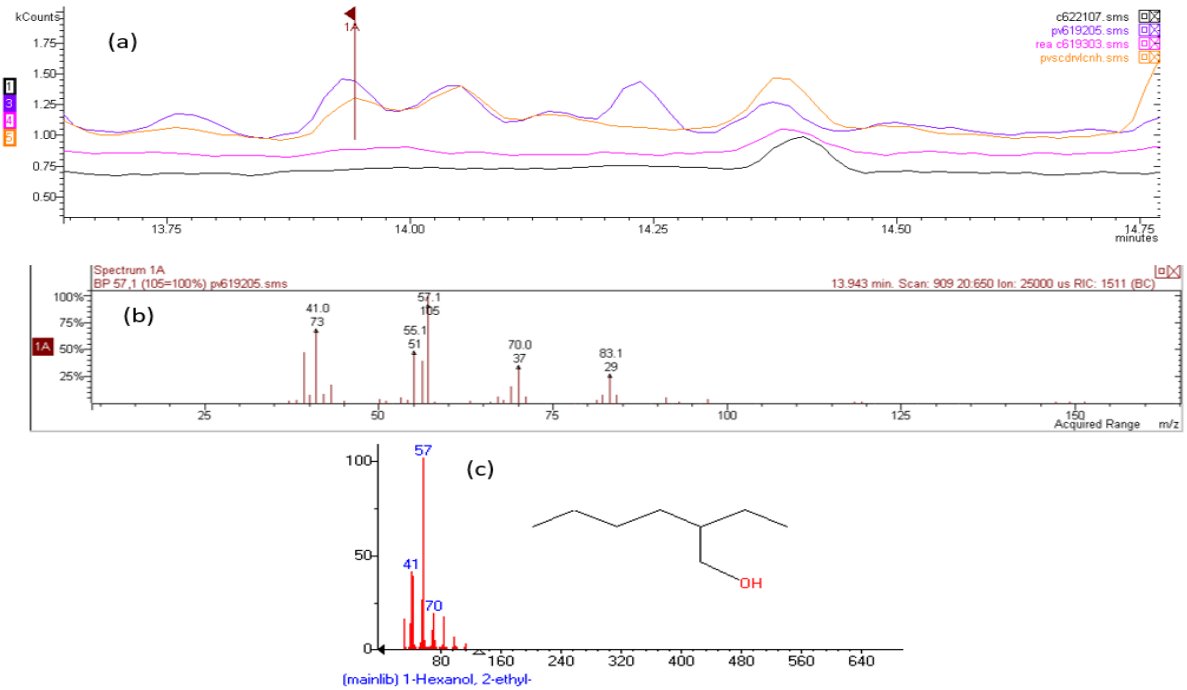


Figura 23 - (a) Sobreposição dos cromatogramas obtidos, em torno do tempo de 14,00 minutos, nas análises das amostras dos voluntários do grupo controle 1 (linha em rosa) e 10 (linha em preto) e voluntários do grupo positivo 7 (linha em roxo) e 9 (linha em laranja); (b) espectro de massas no pico aos 13,94 minutos; (c) sugestão de identidade fornecida pela NIST08 junto ao espectro de massas padrão do composto 2-etil-1-hexanol.

Tabela 13 - Indicação de possíveis biomarcadores detectados em amostras de suor do grupo positivo e não detectadas no grupo controle.

Diferenças qualitativas nos VOCs- Suor				**[Continua...]**
Tempo de retenção (minutos)	**Espectro de massas** / **Íons (m/z)**	**Possível identidade**	**Amostras positivas em que o composto foi detectado**	**Referência (se já reportado antes na literatura como biomarcador do câncer)**
6,58	76,44,32,38	Dissulfeto de carbono	7,8,11,26,30	BUSZEWSKI et al., 2012b; SÁNCHEZ et al., 2012; BHATT et al., 2015
7,34	41,39,70	2-butenal	4,6,9,19,32	-

Diferenças qualitativas nos VOCs- Suor				[Conclusão]
Tempo de retenção (minutos)	**Espectro de massas Íons (m/z)**	**Possível identidade**	**Amostras positivas em que o composto foi detectado**	**Referência (se já reportado antes na literatura como biomarcador do câncer)**
7,45	41,70,39,42,40	Metacroleína*	2,14,20,21	-
7,53	45,43,27,44	1,3-butanodiol	1,2,5,6,17	-
8,15	67,55,41,39	3-metil-hexeno	24-26,28,32	-
9,51	55,84,80,41	Pentanal	23-25,31,32	FUCHS et al., 2010; LI et al., 2014; KHALID et al., 2015
10,54	58,69,78,28	4-metil-2-heptanona	2,7-9,14,17,21-26,30-32	LAVRA et al., 2015
12,23	70,44,41	Heptanal	7-9,21,23-25,28,30-32	DENG; ZHANG; LI, 2004; LI et al., 2014
13,10	81,82,138	2-pentil furano	11,16,18,23-25,28,31,32	-
13,38	56,55,41,43	Octanol	9,11,18-20,30,32	SILVA; PASSOS; CÂMARA, 2011
13,54	57,43,71,85	Octanal	4,5,7,8,10,11,13,14,18,20-25,27-32	FUCHS et al., 2010; LI et al., 2014
13,70	68,53,97	Limoneno	10-12,17-21,24-27,31,32	PHILLIPS et al., 2010; HAKIM et al., 2011
13,86	57,41,43,55	2-etil-1-hexanol	Todas	SÁNCHEZ et al., 2012; LAVRA et al., 2015; SILVA et al., 2017,
14,03	43,55,56,41	1-undeceno	11,13-19,24,28,32	
14,15	94,66,65,39	Fenol	7,14,18-24,26,30,31	KUMAR et al., 2015; HANAI et al., 2012b; WANG et al., 2016
14,45	59,43,55,69	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	13,16,18,21-26,28,31-32	KHALID et al., 2015
14,66	79,108,107	Álcool benzílico*	8,9,11,21,28-30,32	-
17,70	57,43,71,41	Trimetil-decano/ Tridecano	10,12,20,22,29,32	PENG et al., 2010; WANG et al., 2012
18,70	94,138,77	2-fenoxi-etanol	11,18,24	-
27,11	74,87,41,55	Ácido 2-metil dodecanoico	7-9,14,21,24,26,31	-

(*) Maior probabilidade de serem de exógenos

A Figura 24 mostra cromatogramas sobrepostos obtidos para amostras do grupo positivo e controle, indicando alguns dos VOCs detectados somente neste primeiro grupo.

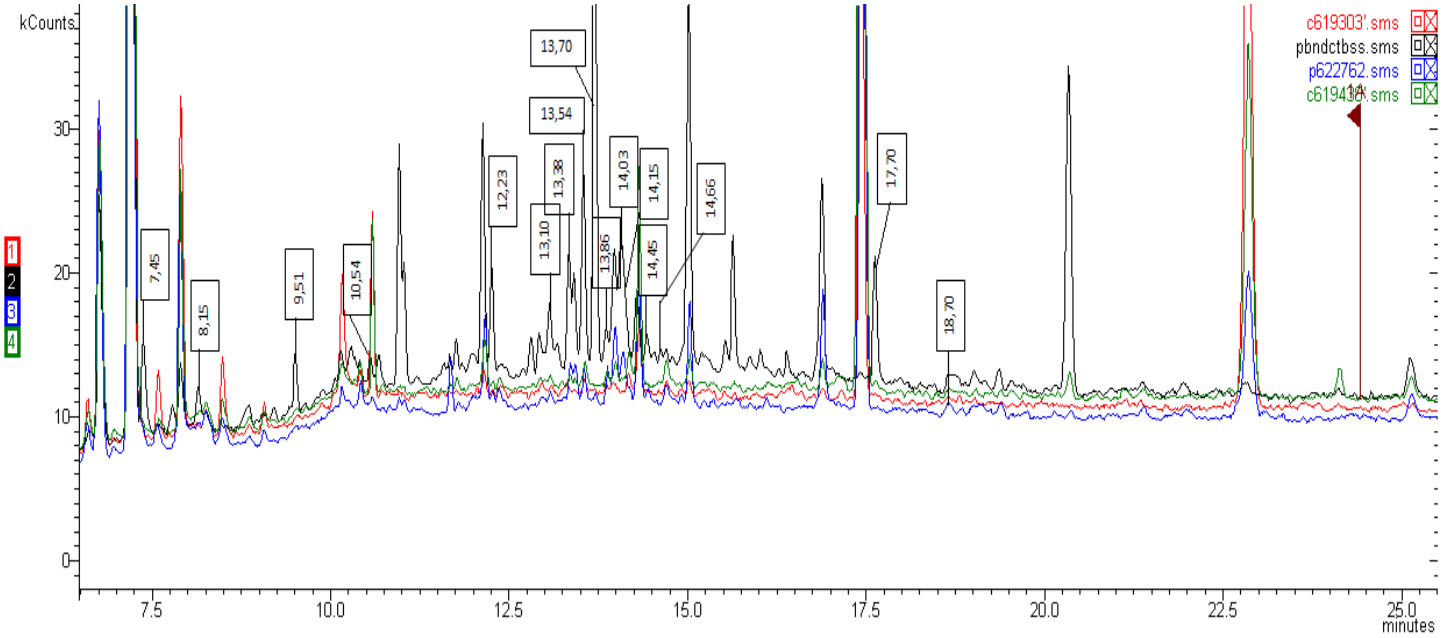


Figura 24 - Indicação de VOCs incidentes apenas nas amostras positivas. Estão sobrepostos os cromatogramas obtidos para análise de suor dos voluntários com câncer 18SP (em azul) e 32SP (em preto), e “saudáveis” 1SC (em vermelho) e 29SC (em verde). Observação: não estão presentes nestas amostras, em específico, os picos correspondentes a 6,58; 7,53 e 27,11 minutos.

Verificou-se também que os picos com os tempos de retenção ~15,03 e 16,86 minutos, associados aos compostos 2-decen-1-ol ou nonanal e decanal ou dodecanal, respectivamente, aparentaram possuir respostas aumentadas para a amostras de indivíduos com câncer quando em comparação com o grupo controle.

Ainda, alguns compostos, com os tempos de retenção equivalentes a 10,99 e 13,98 minutos foram detectados cada um em apenas uma amostra controle, possuindo todos frequência de 1% neste grupo de amostras, em contrapartida com as frequências de 56,3 e 53,1%, respectivamente, no grupo de amostras positivas. As

figuras a seguir (Figuras 25, 26, 27 e 28) demonstram, através da sobreposição dos cromatogramas das amostras controle junto a cromatogramas das amostras positivas em que os compostos foram detectados, que a resposta destes parece ser mais expressiva no grupo positivo.

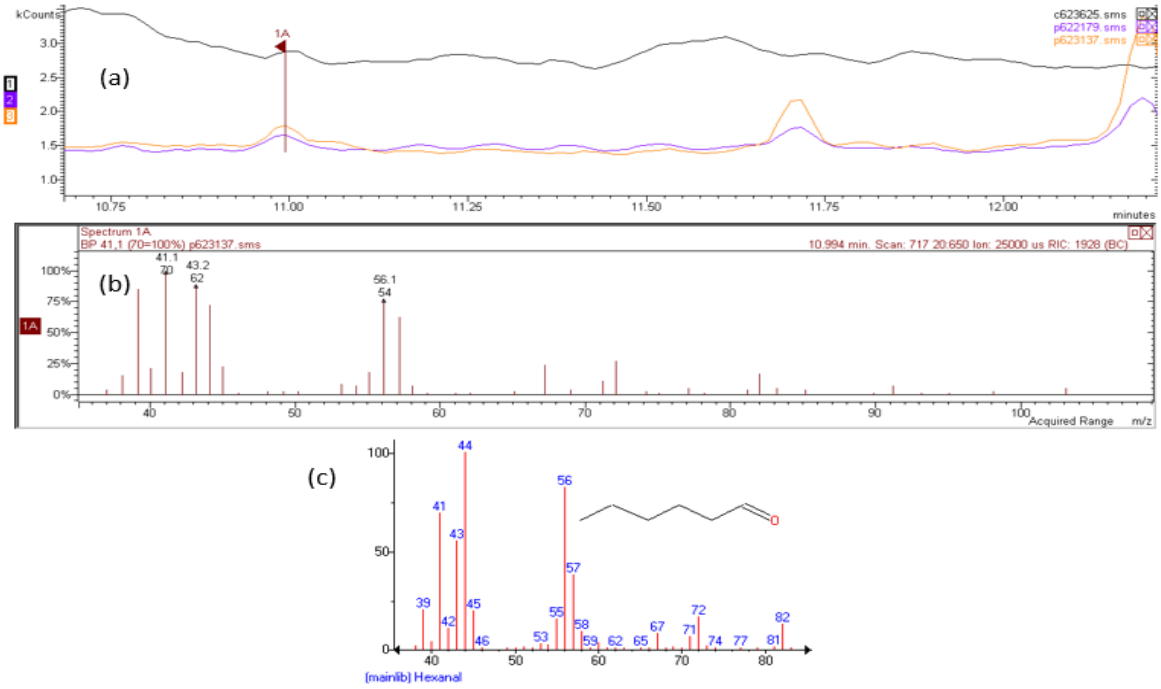


Figura 25 - (a) Sobreposição dos cromatogramas obtidos, em torno do tempo de 11,00 minutos, nas análises das amostras do voluntário do grupo controle 9SC (linha em preto) e voluntários do grupo positivo 16SP (linha em roxo) e 21SP (linha em laranja); (b) espectro de massas no pico aos 10,99 minutos; (c) sugestão de identidade fornecida pela NIST08 junto ao espectro de massas padrão do composto Hexanal.

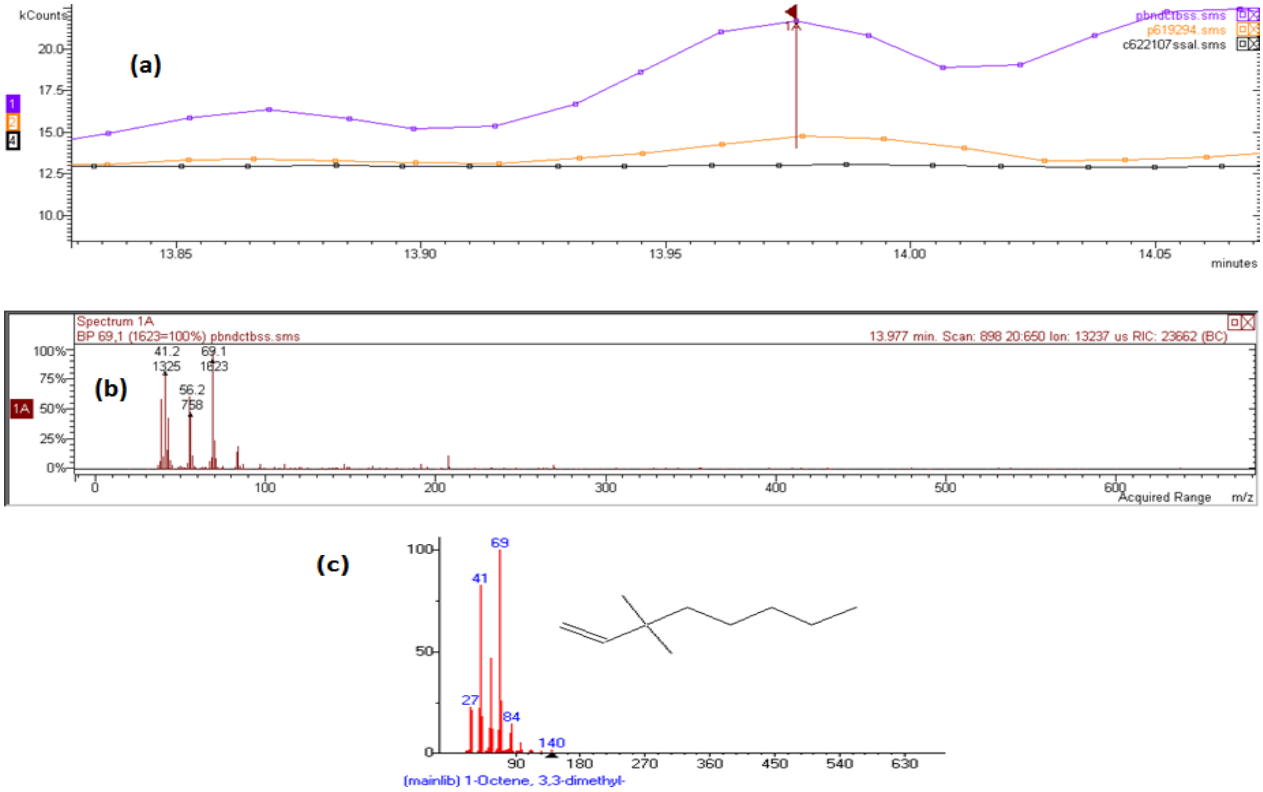


Figura 26 - (a) Sobreposição dos cromatogramas obtidos, em torno do tempo de 14,00 minutos, nas análises das amostras 10SC (linha em preto) e 32SP (linha em roxo) e 24SP (linha em laranja); (b) espectro de massas no pico aos 13,98 minutos; (c) sugestão de identidade fornecida pela NIST08 junto ao espectro de massas padrão do composto 3,3-dimetil-octeno.

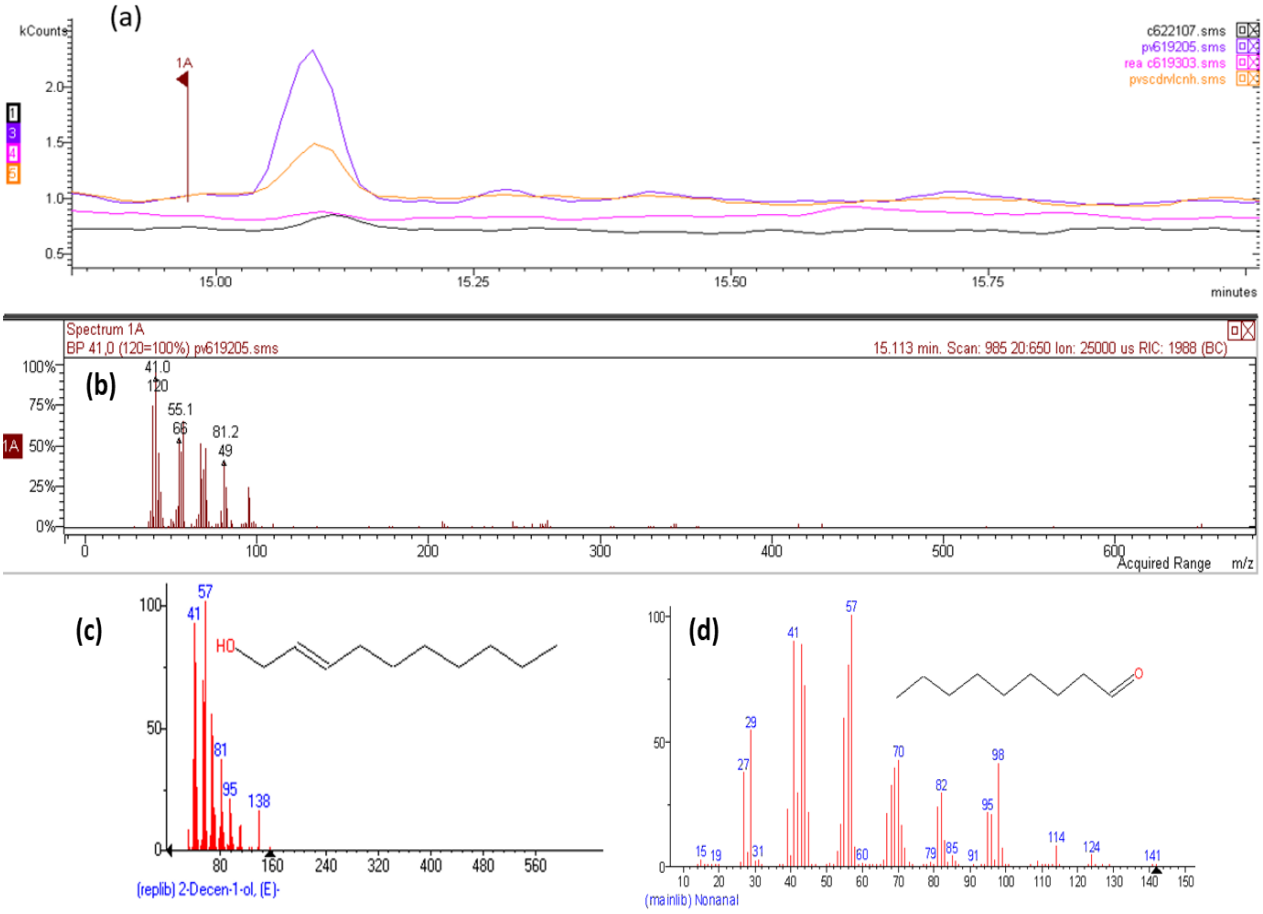


Figura 27 - (a) Sobreposição dos cromatogramas obtidos, em torno do tempo de 15,50 minutos, nas análises das amostras dos voluntários do grupo controle 1SC (linha em rosa) e 10SC (linha em preto) e voluntários do grupo positivo 7SP (linha em roxo) e 9SP (linha em laranja); (b) espectro de massas no pico aos ~15,05 minutos; (c) sugestão de identidade fornecida pela NIST08 junto ao espectro de massas padrão do composto 2-decen-1-ol e (d) Nonanal.

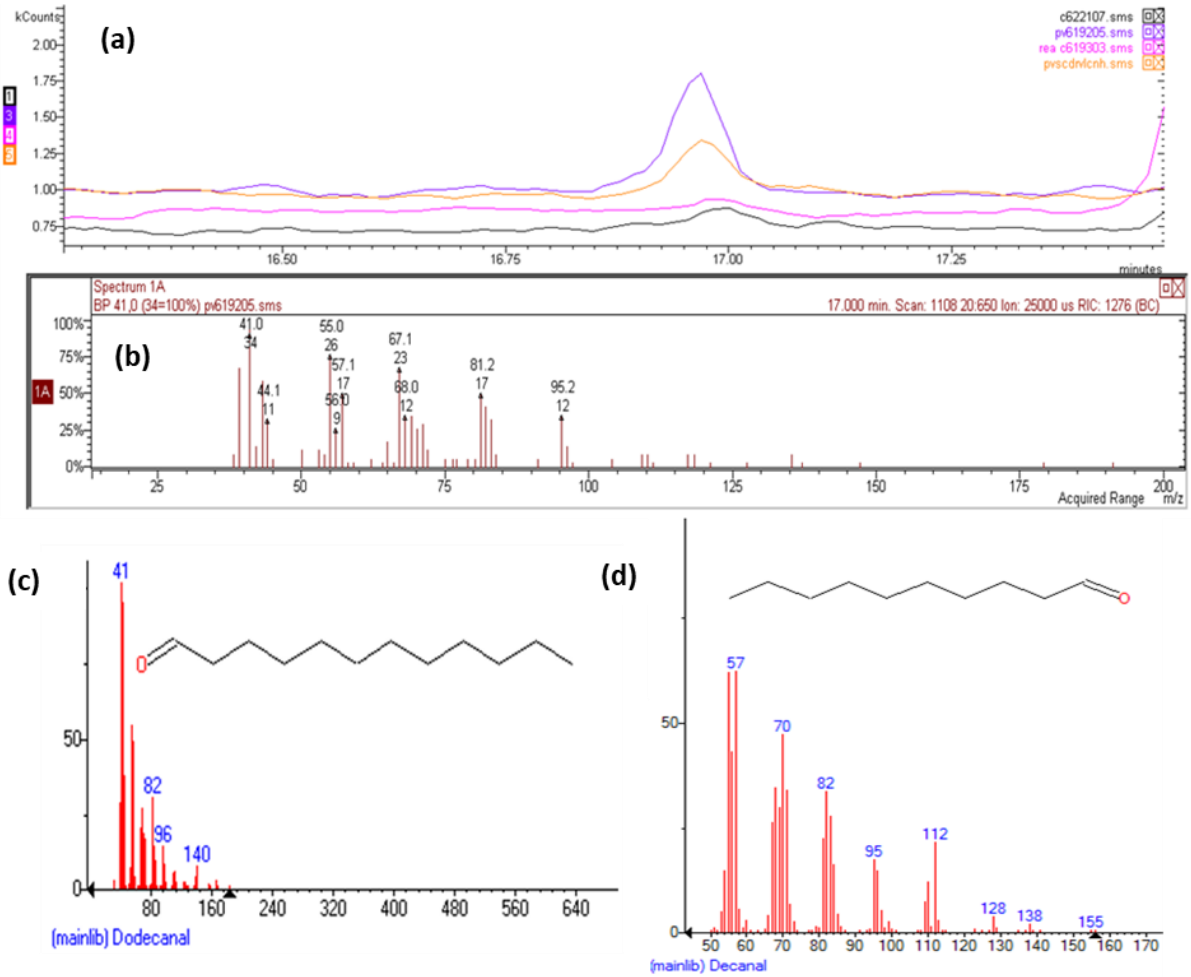


Figura 28 - (a) Sobreposição dos cromatogramas obtidos, em torno do tempo de 17,00 minutos, nas análises das amostras dos voluntários do grupo controle 1SC (linha em rosa) e 10SC (linha em preto) e voluntários do grupo positivo 7SP (linha em roxo) e 9SP (linha em laranja); (b) espectro de massas no pico aos ~16,90 minutos; (c) sugestão de identidade fornecida pela NIST08 junto ao espectro de massas padrão do composto Dodecanal e (d) Decanal.

Há dificuldade em se estabelecer quais compostos estariam presentes em maiores concentrações baseando-se apenas na área do pico cromatográfico, pela ausência de um método validado baseado nas respostas de padrões analíticos dos compostos de interesse e emprego de padrão interno apropriado, assim, uma avaliação desta forma é sujeita a erros do preparo de amostra e injeção. Contudo, se respostas distintas são observadas isso pode ser um indicativo de excreção

diferenciada do composto na amostra de suor, assim sendo, considerou-se a possibilidade de observação de diferenças quantitativas, baseada na comparação das áreas dos picos das amostras controle contra as áreas dos picos equivalentes nas amostras positivas.

Foram obtidos os valores de área para o pico do íon extraído de maior abundância no espectro dos compostos citados e, para verificar se há diferença estatisticamente relevante entre os dois grupos de dados quantitativos, foi aplicado o Teste U de Mann-Whitney (teste não-paramétrico para duas amostras independentes, ou seja, pertencentes a indivíduos diferentes), considerando-se que para o valor $p<0,05$ a hipótese nula é rejeita. Os resultados encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14 - VOCs que apresentaram respostas aumentadas nas amostras positivas

Tempo de retenção (minutos)	**Espectro de massas Íons (m/z)**	**Possível identidade**	**Amostras controle em que o composto foi detectado**	**Amostras positivas em que o composto foi detectado**	**Valor p**	**Referência (se já reportado antes na literatura como biomarcador do câncer)**
10,99	43*,44,56,81	Hexanal	9	7,4-10,15,16-18,20,21,23-25,28,29,31,32	0,0014	FUCHS et al., 2010; DENG; ZHANG; LI et al., 2014; KUMAR et al., 2015
13,98	55*,56,70,41	3,3-dimetil-octeno	10	7,9-11,13,14,16,21,23-27,29-32	0,0010	-
15,03	41*,57,29,43	2-decen-1-ol/ Nonanal	Todas, exceto 3,4,7,8	Todas, exceto 1,6	0,0011	Nonanal: FUCHS et al., 2010; LI et al., 2014 KUMAR et al., 2015
16,89	41*,57,55,82	Dodecanal/ Decanal	Todas, exceto 4,7,8	Todas, exceto 1,8,10,26	0,0132	Decanal: FUCHS et al., 2010; LI et al., 2014 KUMAR et al., 2015

(*) Íon de quantificação

O valor-p sugere que há uma diferença significativa entre as quantidades detectadas das substâncias referenciados os grupos, o que deve ser confirmado pela aplicação de um método validado utilizando padrões internos adequados.

Ainda, conforme observado, não foram detectados com frequência compostos de moléculas pequenas, muito voláteis. Isto pode ser consequência do método utilizado para a coleta do suor (método indireto), em que o fluido foi coletado após ser depositado em um suporte, o que induziria a perda por evaporação dos compostos menores (MOCHALSKY et al., 2014), não só durante manuseio da amostra, mas possivelmente porque tais moléculas poderiam permear para o meio ambiente tal

como as moléculas de vapor d'água e gases através do adesivo. Contudo, verifica-se que a metodologia de coleta de amostra se mostrou adequada ao propósito.

4.2. Análise de amostras reais- Urina

Os dados coletados dos voluntários encontram-se na Tabela 15 (voluntários "saudáveis") e Tabela 16 (voluntários diagnosticados com câncer). Alguns dos voluntários citados também cederam amostras de suor, neste caso está referido seu número de amostra de suor (SC/SP) correspondente. A Tabela 17 apresenta o perfil dos voluntários participantes da pesquisa.

Tabela 15 - Informações do grupo de controle (gênero, idade, diagnósticos médicos e uso de tabaco e álcool durante o período anterior a 24h da coleta)

Grupo controle- Urina - (UC= urina controle; SC= suor controle)				**[Continua...]**	
Voluntário	**Gênero**	**Idade**	**Uso de medicamentos**	**Diagnósticos médicos**	**Outras observações**
1 UC	Masculino	49	Rozovastatina	Dislipidemia	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
2 UC	Feminino	30	Hidroclortiazida	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
3 UC **(20 SC)**	Masculino	52	-	-	Fumante ativo Sem uso de álcool
4 UC	Masculino	47	-	-	Sem uso de tabaco Fez uso de álcool
5 UC	Masculino	51	Losartana	Hipertensão	Sem uso de tabaco Fez uso de álcool
6 UC	Feminino	66	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
7 UC	Masculino	65	Amoxicilina	Dislipidemia, zika	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool

Grupo controle- Urina - (UC= urina controle; SC= suor controle)				[Continuação]	
Voluntário	**Gênero**	**Idade**	**Uso de medicamentos**	**Diagnósticos médicos**	**Outras observações**
8 UC	Masculino	47	Losartana	Hipertensão	Fez uso de álcool Sem uso de álcool
9 UC	Masculino	49	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
10 UC	Masculino	61	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
11 UC	Masculino	64	Metformina, Losartana	Diabetes, Hipertensão	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
12 UC	Masculino	58	-	-	Fumante ativo Sem uso de álcool
13 UC	Masculino	55	-	-	Fumante ativo Sem uso de álcool
14 UC	Masculino	68	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
15 UC **(24 SC)**	Masculino	57	-	-	Sem uso de tabaco Fez uso de álcool
16 UC	Masculino	70	Sinvastatina, Hidroclorotiazida	Hipertensão, Dislipidemia	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
17 UC	Masculino	50	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
18 UC	Masculino	52	Metformina, Atenolol	Diabetes, Hipertensão	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
19 UC	Feminino	58	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
20 UC	Masculino	66	Hidroclortiazida	Hipertensão	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
21 UC	Masculino	70	Atenolol	Hipertensão, Dislipidemia	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool

Grupo controle- Urina - (UC= urina controle; SC= suor controle)					[Conclusão]
Voluntário	**Gênero**	**Idade**	**Uso de medicamentos**	**Diagnósticos médicos**	**Outras observações**
22 UC	Masculino	67	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
23 UC	Feminino	52	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool

Tabela 16 - Informações do grupo de indivíduos diagnosticados com câncer (gênero, idade, tipo de neoplasia, outro diagnósticos médicos e uso de tabaco e álcool durante período anterior a 24 h da coleta)

Grupo positivo- Urina - (UP=urina positiva; SP=suor positivo)					[Continua...]	
Voluntário	**Gênero**	**Idade**	**Neoplasia**	**Uso de medicamentos**	**Outros diagnósticos médicos**	**Outras observações**
1 UP (31 SP)	Masculino	73	Próstata	Amlodipina, Furosemida, Clonidina	Doença renal crônica, Hipertensão	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
2 UP (14 SP)	Masculino	60	Próstata	Diclofenaco de potássio, Omeprazol, Cetoprofeno	Hepatite C tratada, espondilite	Fumante ativo Sem uso de álcool
3 UP (25 SP)	Masculino	48	Rim	Diazepam, Quetiapina, Tramal, Haldol	Transtorno psiquiátrico	Ex-etilista Sem uso de tabaco/ álcool
4 UP	Masculino	58	Próstata	Tadalafila	-	Fumante ativo Etilista
5 UP (19 SP)	Masculino	70	Próstata	-	Doença pulmonar crônica, Hipertensão	Fumante ativo Etilista
6 UP (23 SP)	Masculino	60	Rim	Losartana, Hidroclorotiazida	Hipertensão	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
7 UP	Masculino	67	Próstata	Puran 25, Hidroclorotiazida, Losartana, Propanolol	Hipertensão, Hipotiroidismo	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
8 UP	Masculino	67	Próstata	-	Diabetes	Ex-tabagista, Ex-etilista Sem uso de tabaco/álcool
9 UP	Masculino	57	Bexiga	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool

Grupo positivo- Urina - (UP=urina positiva; SP=suor positivo)					[Continuação]	
Voluntário	**Gênero**	**Idade**	**Neoplasia**	**Uso de medicamentos**	**Outros diagnósticos médicos**	**Outras observações**
10 UP	Masculino	73	Próstata	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
11 UP **(24 SP)**	Masculino	73	Rim, próstata	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
12 UP	Masculino	68	Próstata	Carvedilol, Digoxina	Gota, Hipertensão, Dislipidemina	Ex-tabagista Sem uso de tabaco/ álcool
13 UP **(21 SP)**	Masculino	58	Próstata	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
14 UP	Masculino	65	Próstata	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
15 UP **(13 SP)**	Feminino	58	Adenocarcinoma de cólon do reto, metastático	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
16 UP	Feminino	59	Rim	Losartana, Sinvastatina, Glimepirida, Metformina	Hipertensão, Diabetes, Dislipidemia	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
17 UP **(20 SP)**	Masculino	65	Próstata	Metformina,Invastatina, Captopril	Diabetes, Hipertensão, Psoríase	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
18 UP	Masculino	53	Rim	-	-	Fumante ativo Etilista
19 UP	Masculino	61	Próstata	-	Diabetes	Fumante ativo Etilista
20 UP **(26 SP)**	Feminino	44	Rim	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
21 UP **(15 SP)**	Masculino	40	CEC de esôfago, lesão suspeita no rim	AZT+ 3TC + EFV, atorvastatina	HIV+, Hepatite C,- tratada Dislipidemia, Disfagia	Fumante ativo Etilista
22 UP **(29 SP)**	Masculino	60	Próstata	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
23 UP	Masculino	70	Rim, próstata	-	Hipertensão	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
24 UP	Masculino	63	CEC amídala, Rim	Furosemida, Sinvastatina, Ácido acetil salicílico, Enalapril, Digoxina, Carvedilol, Omeprazol	Doença renal crônica, Insuficiência cardíaca	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool

Grupo positivo- Urina - (UP=urina positiva; SP=suor positivo)						[Conclusão]
Voluntário	**Gênero**	**Idade**	**Neoplasia**	**Uso de medicamentos**	**Outros diagnósticos médicos**	**Outras observações**
25 UP (27 SP)	Masculino	68	Próstata	Ácido acetil salicílico, Metoprolol, Enalapril	Hepatite C-tratada	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
26 UP	Masculino	65	Próstata	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
27 UP (28 SP)	Masculino	73	Próstata	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool
28 UP	Masculino	57	Próstata	-	-	Sem uso de tabaco Sem uso de álcool

Tabela 17 - Perfil geral dos voluntários participantes- amostras de urina

Perfil de voluntários- Amostras de urina						
Grupo controle (n=23)				**Grupo positivo (n=28)**		
Gênero		**Idade (média)**	**Desvio padrão**	**Gênero**	**Idade (média)**	**Desvio padrão**
Masculino	19	56,70	9,70	Masculino 25	61,89	8,53
Feminino	4			Feminino 3		

A Tabela 18 apresenta os picos de possíveis interferentes específicos destas análises. Estes picos foram desconsiderados da investigação cromatográfica.

Tabela 18 - Voláteis identificados como possíveis interferentes para as análises de urina

Possíveis interferentes presentes nas amostras de urina			[Continua...]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
Água armazenada no frasco coletor	6,23	Hidrogênio azido	2,34
	6,75	Metileno cloreto	71
	7,18	3-metil-pentano	12,4
	7,88	Ácido metanocarbotiólico	14,5

Possíveis interferentes presentes nas amostras de urina			[Conclusão]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
"Branco"' da enzima	5,67	4-amino-butanol	15,8
	5,84	3-butin-3-ol	53,7
	6,2	(2-metilpropil)-hidroxilamina	40,5
	6,66	2-metil-pentano	44,6
	6,93	Hexano	1,52
	7,16	Propen-1-amina	30,9
	7,54	Trimetoxi-metano	35,9
	7,87	Acetato de etila	87
	8,22	Dicloronitro-metano	34,5
	8,47	Butano	45,6

O APÊNDICE 3 apresenta os VOCs identificados em todas amostras de urina de voluntários do grupo controle, e o APÊNDICE 4, VOCs identificados em amostras de urina de voluntários do grupo positivo. A marcação “(E)” refere-se aos compostos somente detectados com o tratamento enzimático.

Em semelhança com o que foi apresentado pelos dados obtidos das amostras de suor, com base nos compostos listados foi construída uma tabela de frequência (Tabela 19), considerando todos os compostos que apresentaram incidência maior que, ou igual, a 3.

Tabela 19 - Tabela de frequência para VOCs detectados nas amostras de urina

Frequência dos VOCs nas amostras de urina ((E)=observado apenas após hidrólise; Inc.= Incidência; Freq.= Frequência)								[Continua...]
Tempo de retenção (minutos)	**Espectro de massas Íons (m/z)**	**Possível identidade**	**Total (n=61)**		**Grupo controle (n=23)**		**Grupo positivo (n=28)**	
			Inc. (≥3)	**Freq. (%)**	**Inc.**	**Freq. (%)**	**Inc.**	**Freq. (%)**
4,90	43,41,42	2-nitro-propano	41,0	80,4	15,0	65,2	26,0	92,9
5,37	44,42,28	2-amino-propanol	34,0	66,7	11,0	47,8	23,0	82,1
5,43	44,42,43	Alanina	25,0	49,0	5,0	21,7	20,0	71,4
6,60	41,40,39	Acetonitrila	44,0	86,3	20,0	87,0	24,0	85,7
6,68	59,43,42	2-butanol	10,0	19,6	0,0	0,0	10,0	35,7
7,75	43,42,44	Ácido acético	46,0	90,2	21,0	91,3	25,0	89,3

Frequência dos VOCs nas amostras de urina

((E)=observado apenas após hidrólise; Inc.= Incidência; Freq.= Frequência)

[Continuação]

Tempo de retenção (minutos)	Espectro de massas Íons (m/z)	Possível identidade	Total (n=61) Inc. (≥3)	Total (n=61) Freq. (%)	Grupo controle (n=23) Inc.	Grupo controle (n=23) Freq. (%)	Grupo positivo (n=28) Inc.	Grupo positivo (n=28) Freq. (%)
7,90	43,57,29	2-butanona	5,0	9,8	0,0	0,0	5,0	17,9
8,15	43,71,41	Vinil butirato	6,0	11,8	0,0	0,0	6,0	21,4
8,48	78,77,51	Isobutano	9,0	17,6	4,0	17,4	5,0	17,9
8,80	43,57,71	3-metil-hexano	4,0	7,8	0,0	0,0	4,0	14,3
8,85	73,71,70	2,3,4-tri-metil-pentano	38,0	74,5	12,0	52,2	26,0	92,9
8,96	44,43,41	2,3-butanodiona	13,0	25,5	1,0	4,3	12,0	42,9
9,07	43,27,55	2-metil-1-propeno	5,0	9,8	1,0	4,3	4,0	14,3
9,40	43,41,71	2-pentanona	51,0	100,0	23,0	100,0	28,0	100,0
9,50	44,58,57	Pentanal	34,0	66,7	11,0	47,8	23,0	82,1
10,04	39,68,40	Furano	3,0	5,9	0,0	0,0	3,0	10,7
10,11 (E)	55,42,39	2-metil-2-buteno	4,0	7,8	0,0	0,0	4,0	14,3
10,16 (E)	45,29,31	Ácido etil carbônico, metil éster	6,0	11,8	0,0	0,0	6,0	21,4
10,25	94,79,45	Dimetil dissulfeto	45,0	88,2	19,0	82,6	26,0	92,9
10,29	69,41,43	3-penten-2-ona	8,0	15,7	0,0	0,0	8,0	28,6
10,38 (E)	91,92,39	1,6-heptadien-3-ino	29,0	56,9	4,0	17,4	25,0	89,3
10,42 (E)	79,72,51	Piridina	10,0	19,6	4,0	17,4	6,0	21,4
10,56	55,84,41	Ciclopentanona	14,0	27,5	3,0	13,0	11,0	39,3
10,75	43,57,71	3-hexanona	14,0	27,5	0,0	0,0	14,0	50,0
10,87 (E)	59,41,100	Pirrol	7,0	13,7	2,0	8,7	5,0	17,9
10,89	67,39,41	Metil 2-butanoato	40,0	78,4	18,0	78,3	22,0	78,6
10,96	44,56,41	Hexanal	21,0	41,2	4,0	17,4	17,0	60,7
11,76	55,43,97	4-hepten-2-ona	3,0	5,9	0,0	0,0	3,0	10,7
11,86	43,71,41	4-heptanona	50,0	98,0	22,0	95,7	28,0	100,0
11,94	80,81,53	2-metil-pirrol	31,0	60,8	12,0	52,2	19,0	67,9
12,11 (E)	43,58,41	Dimetil-diazeno	28,0	54,9	10,0	43,5	18,0	64,3
12,28 (E)	99,41,39	4-metil-tiazol	13,0	25,5	5,0	21,7	8,0	28,6
12,36 (E)	42,108,39	2,5-dimetil-pirazina	5,0	9,8	0,0	0,0	5,0	17,9
12,60 (E)	127,71,86	1,2,3-triazol	4,0	7,8	0,0	0,0	4,0	14,3
12,72 (E)	77,91,93	2,4,6-octatrienal	12,0	23,5	0,0	0,0	12,0	42,9
12,80 (E)	71,43,100	2,4-dimetil-3-heptanona	10,0	19,6	0,0	0,0	10,0	35,7
13,06	81,53,110	2-propil-furano	5,0	9,8	0,0	0,0	5,0	17,9
13,17	43,71,41	3-octanona	25,0	49,0	0,0	0,0	25,0	89,3
13,30	110,80,40	6-metil-3,5-heptadieno-2-ona	12,0	23,5	6,0	26,1	6,0	21,4
13,39	66,65,39	Propanodinitrila	32,0	62,7	14,0	60,9	18,0	64,3
13,54	126,79,45	Dimetil trissulfeto	44,0	86,3	17,0	73,9	27,0	96,4
13,65	58,99,57	2-metil-tiazol	3,0	5,9	1,0	4,3	2,0	7,1
13,77	119,91,134	4-metil-acetofenona	4,0	7,8	0,0	0,0	4,0	14,3
13,86 (E)	57,41,43	2-etil-1-hexanol	49,0	96,1	21,0	91,3	28,0	100,0
14,05 (E)	121,93,136	Metil-tolil carbinol	9,0	17,6	2,0	8,7	7,0	25,0
14,15 (E)	94,66,65	Fenol	49,0	96,1	21,0	91,3	28,0	100,0

Frequência dos VOCs nas amostras de urina

((E)=observado apenas após hidrólise; Inc.= Incidência; Freq.= Frequência)

[Continuação]

Tempo de retenção (minutos)	Espectro de massas Íons (m/z)	Possível identidade	Total (n=61) Inc. (≥3)	Total (n=61) Freq. (%)	Grupo controle (n=23) Inc.	Grupo controle (n=23) Freq. (%)	Grupo positivo (n=28) Inc.	Grupo positivo (n=28) Freq. (%)
14,42 (E)	59,41,43	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	39,0	76,5	11,0	47,8	28,0	100,0
14,54 (E)	93,121,91	4-dimetil-benzeno metanol	10,0	19,6	3,0	13,0	7,0	25,0
14,60 (E)	109,83,71	2-etilideno-1,1-dimetil ciclopentano	19,0	37,3	10,0	43,5	9,0	32,1
14,76 (E)	73,69,55	3,7-dimetil-3-octanol	7,0	13,7	0,0	0,0	7,0	25,0
14,79 (E)	117,118,91	2-etil-2-metil-1,3-oxatiolano	11,0	21,6	1,0	4,3	10,0	35,7
14,87 (E)	93,41,79	3,7-dimetil-1,3,7-octatrieno	36,0	70,6	15,0	65,2	21,0	75,0
15,09 (E)	68,41,39	Metiltio-ciclopentano	5,0	9,8	0,0	0,0	5,0	17,9
15,11 (E)	105,77,51	1-(metiltio)-2-butil-but-2-eno	24,0	47,1	6,0	26,1	18,0	64,3
15,18 (E)	137,152,81	2,2-dihidroxi-1-fenil-etanona	5,0	9,8	2,0	8,7	3,0	10,7
15,51 (E)	109,124,81	3-metil-fenol	22,0	43,1	8,0	34,8	14,0	50,0
15,56 (E)	107,108,77	4-metil-fenol	10,0	19,6	0,0	0,0	10,0	35,7
15,58 (E)	108,107,79	Etil-pirazina	38,0	74,5	14,0	60,9	24,0	85,7
15,75 (E)	137,152,109	3,4-dihidroxi-acetofenona	5,0	9,8	0,0	0,0	5,0	17,9
15,87 (E)	81,43,93	Ment-3-en-1-ol	5,0	9,8	3,0	13,0	2,0	7,1
15,98 (E)	41,55,67	1,10-undecadieno	17,0	33,3	7,0	30,4	10,0	35,7
16,05 (E)	91,119,134	2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno	3,0	5,9	0,0	0,0	3,0	10,7
16,10 (E)	79,107,77	2,6-dimetil-1,3,7-octatetraeno	6,0	11,8	3,0	13,0	3,0	10,7
16,25 (E)	43,93,42	2,6-dimetil-6-hepten-2-ol	3,0	5,9	1,0	4,3	2,0	7,1
16,32 (E)	59,43,79	2-metil-6-metileno-7-octen-2-ol	14,0	27,5	7,0	30,4	7,0	25,0
16,45 (E)	91,92,39	1,6-heptadien-3-ino	3,0	5,9	1,0	4,3	2,0	7,1
16,58 (E)	71,91,85	2-isopropil-5-metil-3-ciclohexanol	32,0	62,7	16,0	69,6	16,0	57,1
16,63 (E)	131,91,115	1-metil-1-butenil-benzeno	7,0	13,7	2,0	8,7	5,0	17,9
16,67 (E)	95,81,67	Neodihidrocarveol	7,0	13,7	1,0	4,3	6,0	21,4
16,78 (E)	81,67,43	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	46,0	90,2	20,0	87,0	26,0	92,9
16,84 (E)	59,93,121	2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diol	9,0	17,6	3,0	13,0	6,0	21,4
16,97 (E)	93,108,77	2-metill-1-undecanol	6,0	11,8	1,0	4,3	5,0	17,9
17,12 (E)	67,95,39	4-pirridinol	27,0	52,9	6,0	26,1	21,0	75,0
17,15 (E)	80,95,81	2-etil-pirrol	12,0	23,5	5,0	21,7	7,0	25,0
17,18 (E)	93,81,59	4-hidroxifenilacetilcetona	17,0	33,3	9,0	39,1	8,0	28,6
17,32 (E)	79,93,107	Ment-3,8-dieno	7,0	13,7	3,0	13,0	4,0	14,3
17,39 (E)	69,41,70	2-etil-fenol	5,0	9,8	3,0	13,0	2,0	7,1
17,45 (E)	109,106,51	2,6-dimetil-1,3,7-octatetraeno	13,0	25,5	3,0	13,0	10,0	35,7
17,57 (E)	123,138,67	2-metoxi-5-metil-fenol	16,0	31,4	7,0	30,4	9,0	32,1
17,62 (E)	59,43,79	1-ciclopentil-etanona	12,0	23,5	4,0	17,4	8,0	28,6
17,88 (E)	91,92,119	Pinen-3-ol	5,0	9,8	3,0	13,0	2,0	7,1
17,92 (E)	145,117,115	2-metil-3-fenil-2-propenal	3,0	5,9	0,0	0,0	3,0	10,7
18,00 (E)	94,67,40	Metil-pirazina	8,0	15,7	2,0	8,7	6,0	21,4
18,95 (E)	80,81,53	3-metil-pirrol	9,0	17,6	1,0	4,3	8,0	28,6

Frequência dos VOCs nas amostras de urina ((E)=observado apenas após hidrólise; Inc.= Incidência; Freq.= Frequência)								[Conclusão]
Tempo de retenção (minutos)	Espectro de massas Íons (m/z)	Possível identidade	Total (n=61) Inc. (≥3)	Total (n=61) Freq. (%)	Grupo controle (n=23) Inc.	Grupo controle (n=23) Freq. (%)	Grupo positivo (n=28) Inc.	Grupo positivo (n=28) Freq. (%)
19,00	82,54,39	Benzoquinona	12,0	23,5	10,0	43,5	2,0	7,1
19,30	91,119,120	2-metil-benzaldeído	3,0	5,9	0,0	0,0	3,0	10,7
19,67	109,95,110	3-hidroxipiridina	9,0	17,6	4,0	17,4	5,0	17,9
19,82 (E)	137,152,122	4-etil-2-metoxi-fenol	21,0	41,2	10,0	43,5	11,0	39,3
20,18 (E)	135,150,91	Dimetiletoxi-benzeno	10,0	19,6	3,0	13,0	7,0	25,0
20,72 (E)	135,150,91	Timol	23,0	45,1	9,0	39,1	14,0	50,0
21,34 (E)	135,150,107	3-metoxi-acetofenona	7,0	13,7	0,0	0,0	7,0	25,0
21,39	135,150,107	4-hidroxi-2-metilacetofenona	18,0	35,3	8,0	34,8	10,0	35,7
22,69	71,43,89	Benzenoacetonitrila	47,0	92,2	19,0	82,6	28,0	100,0
23,01	43,71,89	Ácido 2-metil-propanoico, butil éster	11,0	21,6	3,0	13,0	8,0	28,6
23,08	71,89,43	Ácido 2-metil-propanoico, hexil éster	37,0	72,5	14,0	60,9	23,0	82,1
23,11	43,71,89	Hexil pentil éter	7,0	13,7	6,0	26,1	1,0	3,6

Partindo-se destes dados de incidências dos compostos nos dois grupos, o teste chi-quadrado foi realizado e obteve-se valor $p = 1{,}5\times10^{-7}$ quando todos compostos são avaliados e igual a 0,04 quando são desconsiderados aqueles com incidência esperada ≤ 5; Excluindo-se os compostos detectados apenas com o tratamento com enzima, $p= 1{,}1\times10^{-6}$ quando todos compostos são avaliados e igual a 0,04 quando excluídas incidências esperadas ≤ 5, sugerindo, portanto, que o perfil de distribuição de voláteis nos dois grupos estudados é diferente. Alguns compostos apresentaram incidência somente no grupo positivo, estando estes reportados na Tabela 20.

Tabela 20 - VOCs incidentes apenas nas amostras positivas de urina

Diferenças qualitativas nos VOCs- Urina (E)= observado apenas após hidrólise				[Continua...]
Tempo de retenção (minutos)	Espectro de massas Íons (m/z)	Possível identidade	Amostras positivas em que o composto foi detectado	Referência (se já reportado antes na literatura como biomarcador do câncer)
6,68	59,43,42	2-butanol	4,5,6,8,11,12,13,14,16,18	BAUMBACH et *al.,* 2011
7,90	43,57,29	2-butanona	2,3,8,9	BUSZEWSKI et *al.,* 2008
8,15	43,71,41	Vinil butirato	3,4,5,9,13,18	-

Diferenças qualitativas nos VOCs- Urina		(E)=observado apenas após hidrólise		[Continuação]
Tempo de retenção (minutos)	**Espectro de massas Íons (m/z)**	**Possível identidade**	**Amostras positivas em que o composto foi detectado**	**Referência (se já reportado antes na literatura como biomarcador do câncer)**
8,80	43,57,71	3-metil-hexano	5,6,9,21	HAKIM et *al.,* 2011
10,04	39,68,40	Furano	9,10,21	-
10,11 (E)	55,42,39	2-metil-2-buteno	3,19,21,22	BAJTAREVIC et *al.,* 2009
10,16 (E)	45,29,31	Ácido etil carbônico, metil éster	2,3,6	-
10,29	69,41,43	3-penten-2-ona	3,4,6,16,19,21	-
10,75	43,57,71	3-hexanona	1,3,4,8,9,10,11,13,15,17,20,22	SILVA; PASSOS; CÂMARA, 2012
11,76	55,43,97	4-hepten-2-ona	3,12,19	-
12,36 (E)	42,108,39	2,5-dimetil-pirazina	1,3,10,14	-
12,60 (E)	127,71,86	1,2,3-triazol	9,10,20	-
12,72 (E)	77,91,93	2,4,6-octatrienal	3,4,5,8,9,10,11,13,16,18,20	-
12,80 (E)	71,43,100	2,4-dimetil-3-heptanona	3,4,6,12,13,17,19,21,22	PHILLIPS et *al.,* 2007b; ARASARADNAM et *al.,* 2014
13,06	81,53,110	2-propil-furano	3,10,13,20	-
13,17	43,57,71	3-octanona	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14, 16,18,19,20,21	MOCHALSKI et *al.,* 2013; KHALID et *al.,* 2015;
13,77	119,91,134	4-metil-acetofenona	10,19,13	-
14,76 (E)	73,69,55	3,7-dimetil-3-octanol	3,5,6,12,14,18,22	-
15,09 (E)	68,41,39	Metiltio-ciclopentano	3,14,18,19,22	
15,56 (E)	107,108,77	4-metil-fenol	3,4,7,8,9,14,18,21	SILVA; PASSOS; CÂMARA, 2011
15,75 (E)	137,152,109	3,4-dihidroxi-acetofenona	3,9,10,19	-
16,05 (E)	91,119,134	2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno	3,11,19	-
17,92 (E)	145,117,115	2-metil-3-fenil-2-propenal	8,11,19	SILVA; PASSOS; CÂMARA, 2011

Diferenças qualitativas nos VOCs- Urina (E)= observado apenas após hidrólise [Conclusão]				
Tempo de retenção (minutos)	**Espectro de massas Íons (m/z)**	**Possível identidade**	**Amostras positivas em que o composto foi detectado**	**Referência (se já reportado antes na literatura como biomarcador do câncer)**
19,30	91,119,120	2-metil-benzaldeído	3,5,22	-
21,34 (E)	135,150,107	3-metoxi-acetofenona	6,8,10,14,19,21	-

Outros voláteis detectados apresentaram diferenças quantitativas quando em comparação com os dois grupos estudados, ressalta-se destes o fenol e o 2,6-dimetil-octen-7-ol, incidentes em todas as amostras positivas e com resposta analítica acentuada com relação aos controles. O teste U de Mann-Whitney foi aplicado para os conjuntos de valores de áreas obtidos para estes compostos, considerando-se a extração do íon de maior intensidade no espectro, com o objetivo de se reconhecer a diferença estatisticamente relevante para estes dados nos dois grupos. A Tabela 21 resume estas informações.

A Figura 29 mostra os cromatogramas sobrepostos para as amostras controle 3UC e 4UC e positivas 3UP e 9UP, indicando a maior parte dos compostos diferenciados encontrados nas amostras positivas, mas não nas controle.

Tabela 21 - VOCs incidentes nos dois grupos estudados que apresentaram maior resposta com relação ao grupo controle

Diferenças quantitativas nos VOCs- Urina - (*= íon de quantificação; (E)=observado apenas após hidrólise) [Continua...]						
Tempo de retenção (minutos)	**Espectro de massas Íons (m/z)**	**Possível identidade**	**Amostras controle em que o composto foi detectado**	**Amostras positivas em que o composto foi detectado**	**Valor p**	**Referência (se já reportado antes na literatura como biomarcador do câncer)**
8,96	44*,43,41	2,3-butanodiona	7	1,3,5,9,13,16,17,20,21,22,24,28	0,0023	ARASARADNAM et *al.,* 2014; FILIPIAK et *al.,* 2013; CAUCHI et *al.,* 2016
12,11 (E)	43*,58,41	Dimetil-diazeno	1,2,4,5,8,10,15,16, 17	1,3,4,6,8,9,10,11,13,14,16,18, 19,20,22,24,27,28	0,0196	ARASARADNAM et *al.,* 2014
14,15 (E)	94*,66,65	Fenol	Todas, exceto 10 e 15	Todas	0,0039	KUMAR et *al.,* 2015; HANAI et *al.,* 2012b; WANG et *al.,* 2016

Diferenças quantitativas nos VOCs- Urina - (*= íon de quantificação; (E)=observado apenas após hidrólise)						[Conclusão]
Tempo de retenção (minutos)	**Espectro de massas Íons (m/z)**	**Possível identidade**	**Amostras controle em que o composto foi detectado**	**Amostras positivas em que o composto foi detectado**	**Valor p**	**Referência (se já reportado antes na literatura como biomarcador do câncer)**
14,42 (E)	59*,41,43	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	1,4,5,6,7,8,18,19	Todas	0,0004	KHALID et *al.*, 2015;

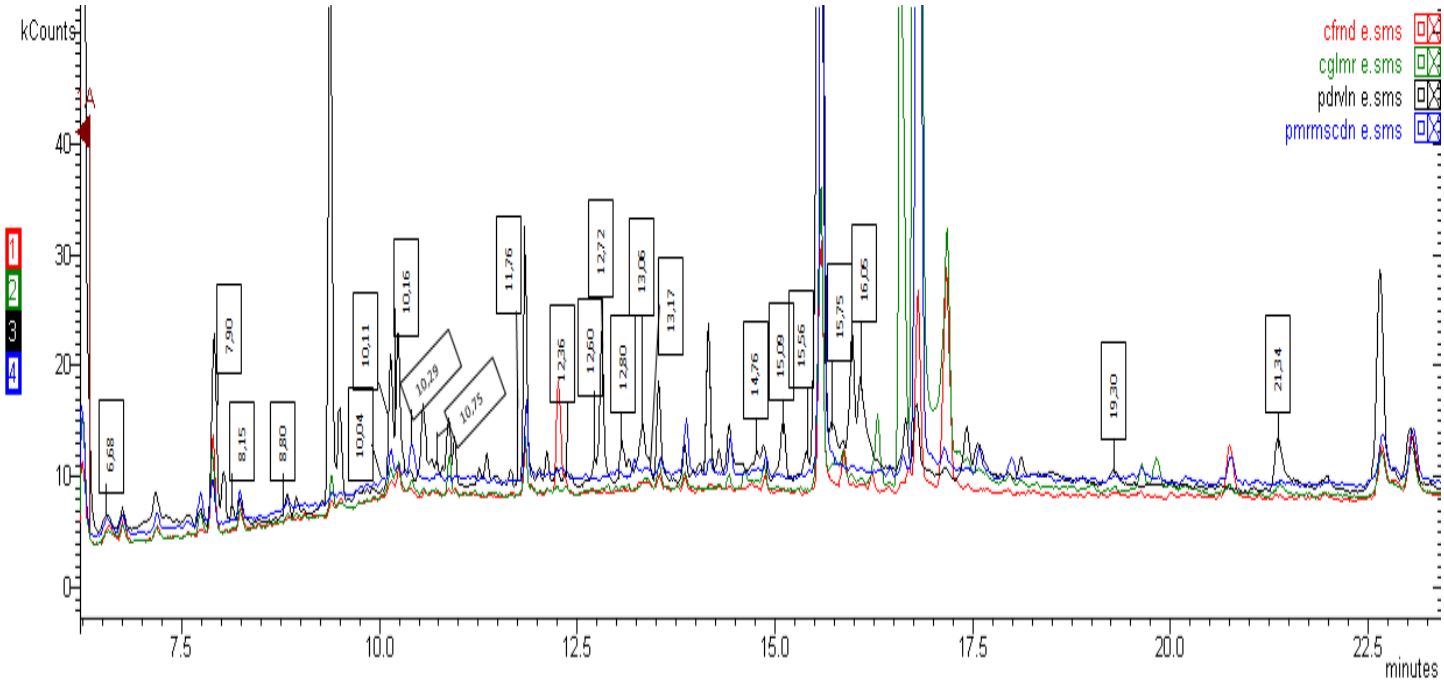


Figura 29 - VOCs com incidência registrada apenas em amostra positivas de urina. Estão sobrepostos os cromatogramas dos voluntários 3UC (em vermelho), 4UC (em verde), 3UP (em preto) e 9UP (em azul). Observação: os VOCs em 13,77 e 17,92 minutos não foram detectados nestas amostras em particular.

A Figura 30, captada em torno de 14,00 minutos nos cromatogramas sobrepostos das amostras 4UC e 3UP, mostra a diferença nas respostas obtidas para os compostos em 14,15 e 14,42 minutos que apresentaram incidência em ambos grupos. Abaixo estão os espectros de massas obtidos nestes tempos, na amostra e aquele de referência da NIST.

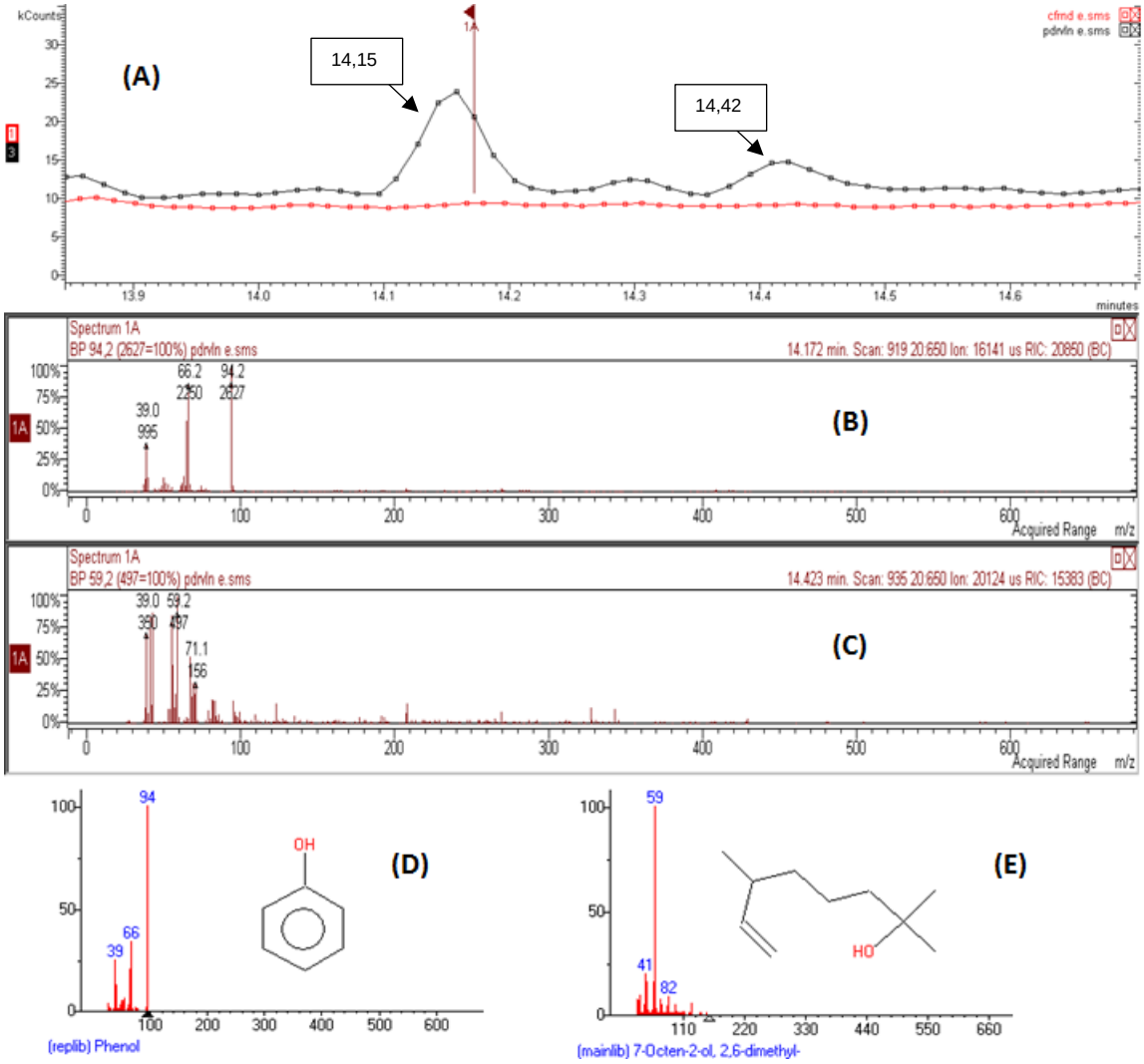


Figura 30 - Em (A), cromatogramas sobrepostos mostrando a diferença nas respostas nos picos em ~14,15 e 14,42 minutos (setas indicando) nas amostras positiva 3UP (em preto) e 3UC (em vermelho). Abaixo, espectros obtidos para os tempos ~14,15 (B) e 14,42 minutos (C), respectivamente, seguidos dos espectros de referência para os possíveis compostos fenol (D) e 2,6-dimetil-octen-2-ol (E).

4.3. Considerações

É importante destacar que todas substâncias aqui reportadas estão passíveis de interpretações errôneas do espectro de massas, por isso, não é raro pico em tempos de retenção diferentes serem identificados como substâncias equivalentes, ou

então como substâncias que mais tarde se mostrarão discordantes com aquele tempo de retenção, ou que mesmo na prática possuirão um espectro diferente daquele tido como referência pela biblioteca. A atribuição de compostos é um processo que contém subjetividade, por isso mesmo se faz importante a análise de um número considerável de amostras, é uma forma de coletar mais indícios da identidade de um dado composto. Além disso, não há como excluir totalmente a hipótese de que certos compostos sejam de fonte exógena, algo que só seria conclusivo caso experimentos totalmente controlados fossem realizados.

Acetonitrila, metacroleína, álcool benzílico e limoneno são compostos associados a um maior questionamento por parecerem ser de origem exógena. Apesar disso, estudos em amostras biológicas e *Headspace* de células cancerosas já apontaram acetonitrila, metacroleína e limoneno como estando relacionados com o câncer diante de expressivas variações em suas concentrações quando comparadas às amostras controle. Assim, ainda é necessário compreender se existe meio de produção ou transformação endógena que reflita na presença dessas substâncias ou similares. Acredita-se que o limoneno, em particular, possa também ser produzido endogenamente pela transformação do geranil pirofosfato (ou geranil difosfato), ou ainda por outros processos envolvendo degradação dos prenil-lipídios. No mais, a detecção de compostos como estes em um grupo particular pode também estar associado à uma deficiência em sua metabolização.

Em adição, o composto associado como sendo a 4-metil-2-heptanona na realidade tem como primeira sugestão da biblioteca a trifluormetilacetamida ou seus similares e isto levou a considerar, dentro do grupo positivo, a existência de alguma fonte contaminante comum aos indivíduos, ou então ao uso não relatado de medicamentos contendo o grupo trifluormetil, como antidepressivos. Contudo, sua grande incidência neste grupo específico é algo que contraria esta hipótese, sendo mais razoável relacionar isto como um caso de não conformidade com espectros de referência.

Das amostras positivas analisadas, duas eram pertencentes a indivíduos que já tinham se sujeitado à remoção cirúrgica do tumor (3SP e 4SP). Nestas, a incidência de compostos diferenciados era bem inferior, mas ainda assim existente. Algumas pesquisas constataram a presença dos marcadores mesmo em indivíduos operados

(POLI et *al.,*2005; PHILLIPS et *al.,* 2007b; PHILLIPS et *al.,* 2008), as hipóteses para esta condição incluem: que a excisão não removeu o tumor em toda sua extensão, havendo ainda resquício de atividade tumoral; que o marcador pode estar associado a um genótipo de risco relacionado à carcinogênese; ou ainda, que mesmo após a excisão, o metabolismo celular permaneceu alterado.

Quanto à busca por marcadores específicos da neoplasia, não foi possível inferir quais compostos seriam característicos de determinado tipo de neoplasia, não só porque o grupo estudado é pequeno, mas também porque todos os estudos presentes na literatura são realizados apenas com um tipo de neoplasia, assim, uma verificação em diversos artigos científicos permite notar que um mesmo composto é proposto como marcador "específico" de diferentes tipos de câncer, mas isto provavelmente deve-se à escolha do grupo estudado como associado a um tipo determinado de tumor, não excluindo, portanto, que estes marcadores sejam gerais para atividades tumorais.

Em uma outra abordagem, a Tabela 22 tem por objetivo comparar compostos com maior incidência em amostras de suor de indivíduos com câncer com o que já foi reportado na literatura, relacionando tipos específicos de neoplasia. Com isso nota-se que nem os estudos existentes são concordantes, nem os compostos indicados permitiram segregar os voluntários por tipo de neoplasia de forma concisa.

Tabela 22 - Outros compostos do suor com maior incidência no grupo positivo e registros na literatura os associando a um tipo de neoplasia

VOCs marcadores, por neoplasia				**[Continua...]**
Adenocarcinoma de pulmão				
Voluntário	**Substância distinta reportada em outros estudos**	**Tempo de retenção (minutos)**	**Referência**	**Amostra**
1SP	6-Metil-3-heptanona	13,07	FILIPIAK et *al.,* 2013	*Headspace* de cultura de células, ar exalado, tecido
6SP	2-Metil-1-penteno	7,44	FILIPIAK et *al.,* 2013 FILIPIAK et *al.,* 2010	*Headspace* de cultura de células, ar exalado, tecido *Headspace* de cultura de células

(*) Maior incidência em amostras positivas, mas também detectados em amostras controle
SP= suor positivo; CEC=carcinoma de células escamosas; (S)= encontrados apenas no suor

VOCs marcadores, por neoplasia				[Conclusão]
Adenocarcinoma de pulmão				
Voluntário	**Substância distinta reportada em outros estudos**	**Tempo de retenção (minutos)**	**Referência**	**Amostra**
9SP	Hexanal	11,00	FILIPIAK et *al.*, 2013 RUDNICKA et *al.*, 2014 FILIPIAK et *al.*, 2010	*Headspace* de cultura de células, ar exalado, tecido Ar exalado *Headspace* de cultura de células
Adenocarcinoma gástrico				
7SP	Dissulfeto de carbono (S)	6,70	BHATT et *al.*, 2015 BUSZEWSKI et *al.*, 2008 KUMAR et *al.*, 2015	Plasma Tecido Ar exalado
	Heptanal (S)	8,91*	KUMAR et *al.*, 2015	Ar exalado
	Fenol (S)	14,23	KUMAR et *al.*, 2015	Ar exalado
10SP	Ésteres de ácido hexanoico (S)	16,12 e 21,13	KUMAR et *al.*, 2015	Ar exalado
12SP	Ésteres de ácido hexanoico (S)	16,12 e 17,80	KUMAR et *al.*, 2015	Ar exalado
CEC de cabeça e pescoço				
3SP (operado)	3-Metil-hexano (S)	8,91*	HAKIM et *al.*, 2011	Ar exalado
4SP (operado)	3-Metil-hexano (S)	8,92*	HAKIM et *al.*, 2011	Ar exalado
11SP	Limoneno (S)	13,77	HAKIM et *al.*, 2011	Ar exalado
Próstata				
20SP	2,2-dimetil-decano	15,69	PENG et *al.*, 2010	Ar exalado
21SP, 24SP, 27SP, 28SP, 31SP	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	14,48	KHALID et *al.*, 2015	Urina
	Tolueno	10,44*	PENG et *al.*, 2010	Ar exalado
22SP	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	14,48	KHALID et *al.*, 2015	Urina
Rim				
23SP-25SP	Fenol	14,17	WANG et *al.*, 2016	Urina

(*) Maior incidência em amostras positivas, mas também detectados em amostras controle
SP= suor positivo; CEC=carcinoma de células escamosas; (S)= encontrados apenas no suor

4.4. Comparação: Suor e Urina

Embora uma das intenções de se estudar outro tipo de amostra fosse verificar se os mesmos compostos estariam presentes em ambas, é mais provável que o conjunto de voláteis presentes no suor e urina sejam consideravelmente divergentes

quanto a sua composição. Os compostos identificados em ambas amostras foram classificados de acordo com o grupo funcional dominante, a Tabela 23 e a Figura 31 seguintes mostram a distribuição observada.

Embora o estresse oxidativo seja apontado como principal via de formação das substâncias questionadas é necessário considerar as reações metabólicas subsequentes que podem estar envolvidas, o que determina a distribuição destes compostos nas diferentes matrizes. De modo geral, compostos mais apolares podem ser encontrados em maiores concentrações no ar exalado do que em outras matrizes, sendo compostos voláteis e de baixa solubilidade no sangue, essa parece ser uma via de eliminação importante, podendo colaborar para o fato de que alcanos, lineares e ramificados, serem apontados mais frequentemente como marcadores do câncer nesta matriz. Já as espécies oxidadas poderiam ser esperadas de forma mais expressiva nas matrizes aquosas, como urina e também suor.

Tabela 23 - Distribuição de VOCs de acordo com a classe química, no suor e urina

Amostra	**Suor**	**Urina**
N° de compostos (incidência ≥ 3)	52	96
Hidrocarbonetos	20	20
Álcoois	9	20
Cetonas	6	19
Aldeídos	9	4
VNCs*	1	16
VSCs **	1	6
Ácidos	4	4
Ésteres	1	2
Éteres	0	2
Outros	1	3
Correspondentes	9	
Hidrólise-dependentes	56	

(*) VNCs: compostos voláteis de nitrogênio
(**) VSCs: compostos voláteis de enxofre
“Outros”: compostos de grupo funcional misto

Com relação à porcentagem total, enquanto no suor são mais recorrentes hidrocarbonetos e moléculas oxidadas simples, na urina é presente um número maior

de componentes, de classes químicas mais variadas. Compostos aromáticos, contendo enxofre e nitrogênio, mais incidentes na urina, estão associados à metabolização de aminoácidos ou compostos de origem vegetal (derivados fenólicos que podem ser provenientes da degradação da tirosina ou fenilpropanoides) e também medicamentos, justificando sua presença associada à rota de eliminação. Outros também são elencados como metabólitos da atividade de bactérias que compõem o microbioma gastro-intestinal e das vias urinárias (indol, pirazinas e derivados do furano) (SCHULZ; DICKSCHAD, 2007) sendo razoável admitir a presença de muitos destes compostos em maior concentração na urina, e talvez não-detectáveis no suor.

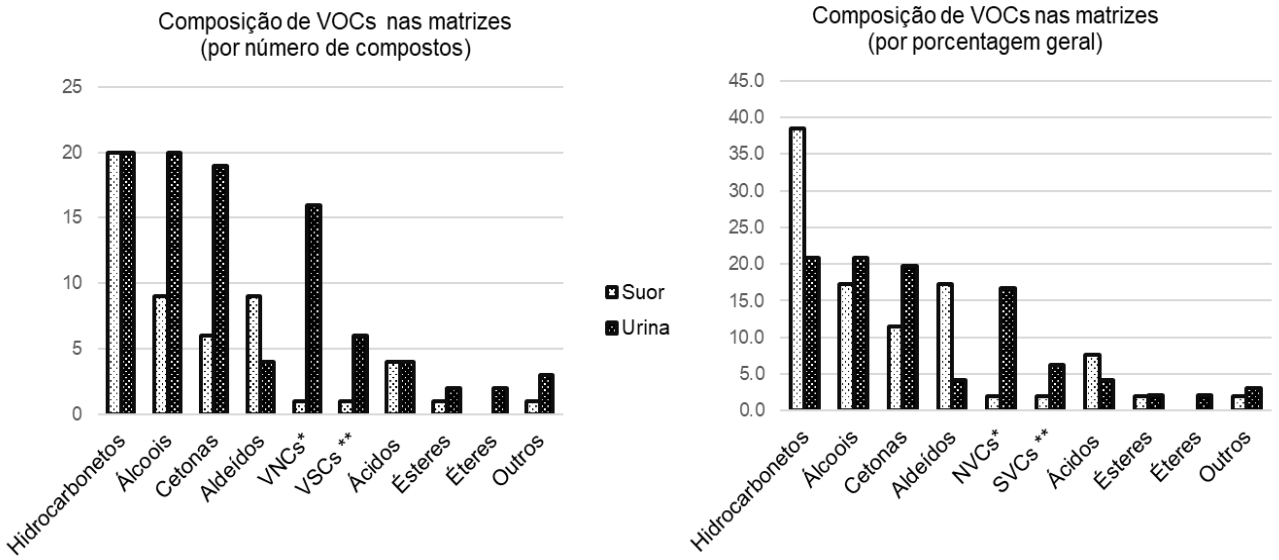


Figura 31 - Gráficos de distribuição de VOCs segundo a classe química, de acordo com (A) número de compostos, (B) frequência no número total de VOCs, por matriz. (*) VNCs: compostos voláteis de nitrogênio; (**) VSCs: compostos voláteis de enxofre.

A Tabela 24 traz os compostos encontrados como equivalentes, detectados no suor e urina.

Tabela 24 - VOCs correspondentes nas amostras de suor e urina

Amostra	Suor			Urina		
Tempo de retenção médio (minutos)	Possível identidade	Espectro de massas Íons (m/z)	Frequência total nas amostras (%)	Possível identidade	Espectro de massas Íons (m/z)	Frequência total nas amostras (%)
7,88	2-butanona	43,57,29	95,3	2-butanona	43,57,29	9,8
8,85	3-etil-pentano	43,71,41,70	45,9	3-metil-hexano	43,57,71	68,3
9,50	2-pentenal	55,84,80,41	8,2	Pentanal	44,58,57	68,3
10,16	3-metil-1-butanol	55,42,43,41	4,9	2-metil-2-buteno	45,29,31	7,3
10,96	Hexanal	43,44,56,84/81	31,1	Hexanal	44,56,41	41,5
13,86	2-etil-1-hexanol	57,41,43,55	52,5	2-etil-1-hexanol	57,41,43	95,1
14,15	Fenol	94,66,65,39	19,7	Fenol	94,66,65	95,1
14,42	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	59,43,55,69	19,7	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	59,41,43	73,2
14,77	2-metil-3-decanol	69,73,55,57	4,9	3,7-dimetil-3-octanol	73,69,55	17,1

O suor é uma matriz, que devido aos mecanismos de incorporação de substâncias neste fluido presentes, corresponde-se melhor com o sangue, mas possuindo uma maior janela de detecção. Assim, neste tipo de amostra são encontradas majoritariamente moléculas em sua forma inalterada. Por outro lado, a urina possui substâncias, em grande parte, na forma de metabólitos. Aplicando estes conceitos aos compostos estudados, é razoável apontar evidências de que os compostos detectados no suor possam estar sendo eliminados na urina também como metabólitos. A princípio, a verificação da própria extensão do processo de conjugação dos compostos orgânicos originalmente voláteis é um indicativo de que os VOCs, mesmo que considerando sua origem endógena, passem por processos de transformação diversos.

Evidências demonstram (MOCHALSKI et *al.,* 2013; HAKIM et *al.,* 2012) que, uma vez no organismo, aldeídos, por um processo comum, possam ser convertidos em ácidos carboxílicos por ação da enzima aldeído-desidrogenase.

Compostos diferenciados encontrados na urina como 3-octanona e 2-pentanona podem, respectivamente, corresponder à conversão de octanal e hexanal- aldeídos derivados da peroxidação lipídica e detectados no suor- a ácidos carboxílicos (ácido hexanoico e octanoico), sofrendo então reação de β-oxidação, que os converte em corpos cetônicos (MOCHALSKI et *al.,* 2013; WALKER; MILLS, 2014). Desta

maneira, a ausência da detecção destes aldeídos na urina pode se dever ao fato de que nesta matriz apresentam-se majoritariamente na forma transformada.

O composto 2-etil-1-hexanol também foi detectado nas amostras de urina e embora sendo uma molécula pouca complexa, ao que se indica, estava presente na forma de glicuronídeo na amostra. Como este composto apresentou-se como potencial marcador, distinto com relação às amostras positivas e controle no suor, avaliou-se se este apresentava resposta aumentada para as amostras positivas nestas amostras de urina, no entanto, diferenças significativas não puderam ser constatadas.

Álcoois podem passar por reações mediadas pelas enzimas álcool-desidrogenase e Citocromo P450 a aldeídos, que, por sua vez podem ser convertidos a ácidos carboxílicos. A álcool-desidrogenase demonstra apresentar atividade significativamente maior em tecidos tumorais, podendo ser responsável pela rápida conversão de álcoois secundários a ácidos carboxílicos, e destes a cetonas. Aparentemente é o caso do composto citado, 2-etil-1-hexanol, que no organismo mostrou que pode convertido em ácido graxo pela ação da enzima álcool desidrogenase seguida de oxidação promovida pela aldeído-desidrogenase, chegando, por reação de β oxidação, à forma de metabólito 2-heptanona e/ou 4-heptanona (WALKER; MILLS, 2001).

Quanto à 4-heptanona, esta é uma substância que se apresentou muito recorrente nas amostras de urina, correspondendo ao tempo de retenção ~11,86 minutos. Sua frequência total nas amostras foi de 98,0% e de 100% no grupo positivo. Uma abordagem diferente pode ser feita se forem consideradas as somas de [4-heptanona]+[2-etil-1-hexanol] em ambos grupos pesquisados, com isto em consideração observa-se que, em grande parte dos casos, o total correspondente faz superar em muito o mesmo valor para as amostras controle, mesmo assim, uma análise mais minuciosa deve ser conduzida quanto à dedução de quais compostos seriam metabólitos de outros reportados e, ainda, se a mesma via de transformação seria a favorecida para os dois tipos diferentes de grupos estudados.

Dos compostos apresentados na última tabela destacam-se fenol e 2,6-dimetil-7-octen-2-ol, ambos, para ambas amostras, apresentados como potenciais

biomarcadores. No caso da urina, embora dependentes de processo de hidrólise para sua detecção, podem ser apontados como marcadores ainda mais consistentes, pois foram detectados, em níveis superiores, para todas amostras positivas analisadas.

Não foram constatadas diferenças significativas em algumas condições avaliadas, tais como a idade, o uso de medicamentos, consumo de álcool ou tabaco. É possível que para tanto seja necessária a avaliação de um número maior de amostras associadas com condições específicas para permitir estabelecer tais correlações.

4.5. Seleção e confirmação de marcadores

Foram adquiridos os padrões analíticos referentes aos potenciais biomarcadores aqui reportados. Foi possível verificar a concordância do tempo de retenção e do espectro de massas para 12 compostos, cujos padrões se encontraram disponíveis. Para todos compostos testados os tempos de retenção foram correspondentes, com variações inferiores a 1%. Mais detalhes e o conjunto de marcadores selecionado encontram-se na seção 3.2.2. do Capítulo IV.

5. CONCLUSÕES

A etapa de otimização de método mostrou-se de grande importância para realizar as análises das amostras reais. Embora técnicas mais sofisticadas de extração e amostragem de voláteis possam ser utilizadas, a técnica de *Headspace* é muito simples, rápida e de baixo custo.

Apesar de o número de amostras analisadas não ser elevado, o estudo pode oferecer perspectivas sobre a utilização de VOCs como biomarcadores. O método desenvolvido provou ser capaz de fornecer um perfil cromatográfico para voláteis em amostras de suor e alguns dos compostos detectados mostraram concordância com a literatura. Para a amostra de urina é possível derivar a mesma conclusão, além disso, a etapa de tratamento com a enzima β-glucuronidase mostrou-se importante para que um número muito maior de substâncias pudesse ser detectado (especialmente moléculas mais apolares, contendo ciclos e anéis aromáticos).

Com o que foi demonstrado até o momento o suor provou ser uma matriz adequada para investigação de VOCs, parecendo razoável assumir que a detecção de compostos como: dissulfeto de carbono, 2-butenal,1,3-butanodiol, 3-metil-hexeno, pentanal, 4-metil-2-heptanona, heptanal, octanol, octanal, limoneno, 1-undeceno, fenol, 2,6-dimetil-7-octen-2-ol, trimetil-decano/tridecano e, sobretudo, 2-etil-1-hexanol pode ser útil para distinguir as amostras de suor dos grupos de indivíduos estudados, também, os níveis de hexanal, 2-decen-1-ol ou nonanal e dodecanal ou decanal mostraram estar relacionados com a presença do tumor.

Diferenças nos perfis de voláteis também foram constatadas no caso da urina, embora muitos compostos nesta detectados sejam diversos daqueles apresentados no suor. Entretanto, dois compostos, incidentes em todas amostras positivas: fenol e 2,6-dimetil-7-octen-2-ol, também detectados no suor, apresentaram-se em concentrações muito superiores às observadas nas amostras controle.

CAPÍTULO IV- VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE MARCADORES

1. INTRODUÇÃO

1.1. Análise GC-FID

O detector por ionização de chama (FID) é o detector mais comum em cromatografia gasosa, é não-específico, possuindo larga aplicabilidade e baixo custo em relação aos demais. A detecção se baseia na pirólise dos compostos eluídos da coluna por uma chama de hidrogênio, alimentada com ar sintético. Este processo leva à ionização da maioria dos compostos, os quais são coletados e medidos em termos de corrente elétrica- o que fornece a resposta analítica. Possui larga faixa linear, baixo ruído, alta robustez e baixa necessidade de manutenção. No entanto, pode não oferecer grande sensibilidade a compostos altamente oxigenados ou funcionalizados (SKOOG et al., 2006). É também um aparelho compatível com a análise de amostras com maior percentual de água, diferente do espectrômetro de massas, em que a água tende a danificar o sistema.

1.2. Validação analítica

A validação pode ser entendida como uma avaliação sistemática de um método analítico. Esta compreende uma série de ensaios experimentais realizados com o intuito de verificar se o método atende às exigências para as aplicações às quais se destina, no propósito de assegurar resultados confiáveis. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão regulador, dispõe definições e os requisitos necessários para validação de métodos bioanalíticos, descritos na resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. São definições a serem consideradas:

1.2.1. Definições

- Amostra branco: amostra isenta de analitos;
- Amostra zero: amostra branco adicionada do PI apenas;
- LD: limite de detecção, menor concentração que pode ser detectada pelo método, não necessariamente quantificável;
- LIQ: limite inferior de quantificação, menor concentração que pode ser quantificada pelo método (menor e primeiro ponto que deve compor a curva analítica);

- LSQ: limite superior de quantificação, maior concentração quantificada pelo método (maior ponto que deve compor a curva analítica);

- CQB: controle de qualidade baixo (amostra de controle de qualidade de baixa concentração), amostra fortificada a uma concentração até 3 vezes a do LIQ;

- CQM: controle de qualidade médio (amostra de controle de qualidade de média concentração), amostra fortificada em concentração próxima à média dos limites inferior e superior de quantificação;

- CQA: controle de qualidade alto (amostra de controle de qualidade de alta concentração), amostra fortificada a concentração de 75 a 85% do valor de concentração do LSQ.

São parâmetros a serem avaliados:

1.2.2. Seletividade

Diz respeito à avaliação da interferência causada por outras espécies que produzem resposta na amostra. A seletividade garante que não haja equívocos quanto à identificação do pico do analito em uma amostra complexa. A ANVISA estabelece para esta avaliação que sejam comparadas as análises de 6 amostras provenientes de fontes distintas. Os picos interferentes próximos ao tempo de retenção do composto de interesse devem possuir respostas inferiores a 20% quando em comparação com a resposta do analito em concentração correspondentes ao LIQ e inferiores a 5 % quando em relação com a resposta do padrão interno (PI).

1.2.3. Efeito residual ou *carry-over*

Avalia a interferência de resquícios, eventualmente presentes no sistema, provenientes das análises anteriores na presente análise.

Para tal avaliação, devem ser feitas injeções seguidas de uma mesma amostra branco (tida como isenta dos analitos a se determinar), uma vez antes e mais duas vezes após a análise de amostras correspondentes ao LSQ, de modo que, resíduos observados na mesma região dos compostos de interesse devem possuir resposta inferior a 20% do LIQ e 5% do PI.

1.2.4. Linearidade e curva analítica

Este parâmetro relaciona-se com a capacidade do método de fornecer respostas que são diretamente proporcionais às concentrações dos analitos nas amostras, para uma dada faixa de aplicação. A linearidade é avaliada de acordo com a construção da curva analítica, a qual deve ser avaliada em triplicata e conter no mínimo 6 pontos (correspondentes a diferentes concentrações distribuídas de forma equilibrado no intervalo), além das amostras branco e zero. A curva deve ser feita aplicando-se a mesma matriz biológica do estudo e as concentrações teóricas devem ser plotadas *versus* as referidas proporções área do analito / área do padrão interno. A regressão linear é indicada para obtenção da equação da reta e o coeficiente de determinação associado (R) não deve exceder o valor de 0,99.

1.2.5. Efeito matriz

Este parâmetro tem relação com a afinidade do analito pela matriz biológica em questão, o que se relaciona com as propriedades físico-químicas de ambos. Indica-se a análise de 6 amostras branco de fontes distintas, processadas e então adicionadas dos analitos, a concentrações correspondentes ao CQB e CQA, e PI. Tais ensaios deverão ser comparados com análises de soluções de analitos e PI em concentrações correspondentes. Para cada amostra o fator de matriz normalizado por PI (FMN) deve ser calculado conforme a Equação 6, e os referidos coeficientes de variação (CV) não devem exceder 15%:

$$\mathrm{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}} \quad \text{(Equação 6)}$$

1.2.6. Precisão

Refere-se à proximidade entre os resultados obtidos para reproduções de um ensaio. A ANVISA preconiza a avaliação da precisão nas concentrações equivalentes ao LIQ, CQB, CQM e CQA. É averiguada a precisão intra-corrida (com relação às 5 replicatas analisadas na mesma corrida analítica) e inter-corrida (com relação a replicatas correspondentes a corridas realizadas em 3 dias distintos). Este parâmetro

é expresso em termos do DPR (desvio padrão relativo) ou coeficiente de variação (CV%), calculado de acordo com:

$$\mathrm{CV\%} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \times 100 \qquad \text{(Equação 7)}$$

São admitidos valores de CV até 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite o desvio de 20%.

1.2.7. Exatidão

Refere-se à concordância entre os valores de concentração experimental obtidos a partir do emprego do método e o valor teórico. De forma similar à precisão, deve ser calculada intra-corrida e inter-corrida, considerando os valores LIQ, CQB, CQM e CQA. É expressa segundo o EPR (erro padrão relativo) (Equação 8):

$$\mathrm{EPR} = \frac{\text{Concentração média experimental} - \text{Concentração nominal}}{\text{Valor nominal}} \times 100 \qquad \text{(Equação 8)}$$

Para os quais são admitidos valores até ± 15% do valor nominal, e até ± 20%, exclusivamente para o LIQ.

1.2.8. Estabilidade

Este ensaio permite avaliar se o analito apresenta-se estável sob certas condições simuladas, exigidas nos processos que compreendem os experimentos. Devem ser avaliadas:

I) Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (as amostras preparadas devem ser submetidas ao mesmo número de ciclos de congelamento e descongelamento imposto às amostras reais);

II) Estabilidade de curta duração (determinada para amostras antes de processadas, mantidas sob condições idênticas às impostas para as amostras do

estudo durante os experimentos e por período acima do demandado para este processo);

III) Estabilidade de longa duração (simulada para o período total em que as amostras do estudo permaneceram armazenadas, sob as mesmas condições a estas aplicadas);

IV) Estabilidade pós-processamento (refere-se a amostras já processadas, que devem se apresentar estáveis por período superior ao demandado durante condições reais da análise);

V) Estabilidade da solução do analito e do PI (reproduzindo as condições de período e temperatura de armazenamento das soluções utilizadas).

Para todos ensaios devem ser consideradas amostras fortificadas nos níveis do CQB e CQA, em 3 replicatas e estes devem ser comparados com os valores teóricos de concentração. São admitidos desvios da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal de até ± 15%. Com relação à estabilidade das soluções-padrão devem ser comparadas 3 replicatas de amostras das soluções-estoque (de maior concentração, adequadamente diluídas para este propósito) e das soluções de trabalho (a de menor concentração), a comparação para cálculo do desvio deve ser feita com base nas respostas obtidas para soluções do analito e PI recém-preparadas. Neste caso os desvios admitidos são de até 10%.

2. OBJETIVOS

- Desenvolver um método HS-GC-MS simples, configurado para determinação dos marcadores definidos nas amostras;
- Validar o método a fim de estabelecer um procedimento padrão para a aplicação nas amostras, avaliando sua adequabilidade e atendimento aos parâmetros de validação.

3. MÉTODO

3.1. Materiais e reagentes

Padrões analíticos (pureza >99%) de 2-etil-1-hexanol, pentanal, octanal, heptanal, -(-) limoneno e dodecanal (todos em volume de 1 mL) foram adquiridos da Sigma-

Aldrich (EUA), assim como, nonanal 95% (1 mL), hexanal 98% (2 mL), decanal ≥ 98% (25 g) e 1-undeceno 99% (1 mL), tridecano 99% (1mL), 1-heptanol 99% (1mL), docecano 99 %. Dihidromircenol (2,6-dimetil-7-octen-2-ol) 99% (1000 g) foi obtido da Sigma-Aldrich, e fenol 99,5% (1000 g) da Synth (Brasil). Seringa *gas-tight* de 2,5 mL foi obtida da SGE (Austrália).

Os demais materiais empregados são descritos na seção 3.1. do Capítulo II.

3.2. Metodologia experimental

3.2.1. Preparo de soluções

A) Soluções de mistura de marcadores- Suor

Para o preparo da soluções-padrão de estoque (1 mg mL^{-1}), partiu-se dos padrões adquiridos dos compostos puros. No caso dos padrões líquidos a temperatura ambiente (pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, 2-etil-1-hexanol, 2,6-dimetil-7-octen-2-ol, limoneno, 1-undeceno e tridecano), baseando-se nos valores de densidade destes respectivos compostos, foi calculado o volume aproximado a ser coletado como sendo o equivalente a 10 mg. No caso do fenol, este foi pesado em 10 mg em um béquer de 5 mL e solubilizado em 1 mL de hexano HPLC com auxílio de banho ultrassom (à temperatura ambiente, por 10 minutos), para após compor à solução final de mistura dos marcadores. Em um balão volumétrico de 10,00 mL, previamente enchido até a metade com o solvente hexano, os volumes correspondentes foram sucessivamente adicionados. O volume do balão foi completado, o menisco ajustado e o frasco foi tampado e agitado manualmente para promover a solubilização dos compostos, dando origem à solução 1 mg mL^{-1}. Desta última solução, transferiu-se 100 µL para novo balão volumétrico de 10,00 mL, posteriormente ajustado em volume com hexano. Esta solução foi homogeneizada no balão, produzindo-se assim uma solução 10 µg mL^{-1}. Por último, empregando-se o mesmo procedimento, a solução de 1 µg mL^{-1} foi produzida, pela diluição em 10,00 mL de 10 µL coletados da solução anterior de 1 mg mL^{-1}.

B) Soluções de mistura de padrões internos- Suor

Uma mesma sequência de diluições foi empregada para preparação de soluções 1 mg mL^{-1} e 10 µg mL^{-1} de mistura apenas de heptanol, dodecano e dodecanal (padrões líquidos).

C) Soluções de mistura de marcadores- Urina

10 mg de fenol foram pesados, diluídos em 1 mL de hexano e adicionados a um balão de 10,00 mL, contendo solvente até aproximadamente sua metade. Em seguida, o volume equivalente a aproximadamente 10 mg de 2,6-dimetil-7-octen-2-ol foi adicionado a este balão, o mesmo foi então completado de solvente e agitado, dando origem a uma solução 1 mg mL^{-1} destes analitos. Desta mesma solução, 1 mL foi recolhido e diluído para 10,00 mL em procedimento equivalente ao anterior, produzindo uma solução 100 µg mL^{-1}. Da primeira solução (solução estoque de 1 mg mL^{-1}), também 100 µL foram pipetados e diluídos em 10,00 mL de solvente, levando a uma solução 10 µg mL^{-1} e, por fim, 10 µL da solução estoque diluídos para igual volume de hexano deram origem à solução 1 µg mL^{-1}.

D) Soluções do padrão interno- Urina

Uma mesma sequência de diluições foi empregada para preparação de soluções 1 mg mL^{-1} e 10 µg mL^{-1} de heptanol, apenas.

Todas as soluções foram preparadas para uso imediato e foram armazenadas em frasco de vidro e vedados com tampa de rosca que foram envolvidas com Parafilm, o corpo dos frascos foi envolvido com papel alumínio e estas soluções foram armazenadas a - 20°C. As soluções foram manuseadas cuidadosamente durante os experimentos, precavendo-se de perdas por evaporação e exposição à luz. A Tabela 25 indica os padrões utilizados e os volumes equivalentes a 10 mg, conforme citado anteriormente.

Tabela 25 - Compostos de interesse- densidade e solubilidade

Compostos de interesse	Densidade ($g\ mL^{-1}$)	10 mg equivalente a (µL)	Solubilidade em água a 25 °C ($mg\ L^{-1}$ água)
Pentanal	0,806	12,41	11700
Heptanal	0,809	12,36	1250
Octanal	0,820	12,20	560
Limoneno	0,842	11,88	7,57
2-Etil-1-hexanol	0,833	12,00	880
1-Undeceno	0,760	13,16	0,000794
Fenol	1,070	-	82800
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	0,837	11,95	252,2
Tridecano	0,756	13,23	0,0047
Hexanal	0,815	12,27	6000
Nonanal	0,827	12,09	96,000
Decanal	0,830	12,05	0,00156
Dodecano	0,750	13,33	0,0037
Heptanol	0,822	12,17	1670
Dodecanal	0,831	12,03	4,64

*Fonte de dados: PubChem (base de dados livre *online- National Center for Biotechnology Information*)

A baixa solubilidade em água de grande parte dos analitos deste estudo justifica o emprego do solvente apolar hexano, uma vez que, mesmo os compostos mais solúveis em água, quando preparados neste solvente, produziam soluções de baixíssima estabilidade e, portanto, nas análises forneciam baixas respostas para os analitos e ausência de reprodutibilidade nos ensaios.

Para o procedimento de validação, soluções recém-preparadas de suor artificial, cloreto de sódio 300 g L^{-1}, tampão fosfato pH 6,8 e solução 20 KU mL^{-1} de β-glucuronidase foram empregadas, conforme descrito pelo Capítulo II, seção 3.2.1.

3.2.2. Seleção de analitos e padrões internos

Os analitos neste capítulo do estudo referem-se aos potenciais biomarcadores, selecionados com base nos resultados obtidos no capítulo anterior. Os critérios utilizados para esta seleção foram:

- Compostos que permitiram diferenciação estatisticamente relevante entre os grupos positivo e controle de amostras (por distinção qualitativa ou quantitativa);
- Compostos avaliados como incidentes em um maior número de amostras;
- Compostos que puderam ter a identidade confirmada pela análise dos padrões adquiridos, através da correspondência quanto ao espectro de massas e ao tempo de retenção do composto detectado nas amostras;
- Compostos já reportados como associados ao processo de carcinogênese por estudo anterior.

Os padrões internos foram atribuídos em conformidade:

- Compostos avaliados como ausentes nas análises compreensivas de todas as amostras estudadas;
- Com a disponibilidade comercial destes compostos;
- Com referência à classe química à qual os marcadores em questão pertencem. A fim de que possam, de forma mais eficiente o possível, corrigir os erros associados à injeção da fase gasosa, perdas por evaporação e interação com a matriz. Isto por possuírem propriedades físico-químicas mais correspondentes, conferindo coeficientes de partição para fase gasosa proporcionais aos dos analitos e relações de afinidade com a matriz provavelmente similares, podendo corrigir alterações na composição da amostra biológica (pH, percentual de água e lipofílico etc).

Com base nisso, o conjunto de compostos selecionado para a etapa de determinação de marcadores nas amostras está mostrado na Tabela 26.

Tabela 26 - Marcadores selecionados e respectivos padrões internos

Observação		Analito (marcador)	n° CAS	Estrutura química	Padrão interno	n° CAS	Estrutura química
Suor	Urina						
✦	-	Pentanal	110-62-3				
↑	-	Hexanal	66-25-1				
✦	-	Heptanal	111-71-7				
✦	-	Octanal	124-13-0		Dodecanal (aldeídos)	112-54-9	
↑	-	Nonanal	124-19-6				
↑	-	Decanal	112-31-2				
✦	-	2-Etil-1-hexanol	104-76-7				
✦	↑	Fenol	108-95-2		Heptanol (álcoois)	111-70-6	
✦	↑	2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	18479-58-8				
✦	-	Limoneno	5989-54-8				
✦	-	1-Undeceno	821-95-4		Dodecano (hidrocarbonetos)	112-40-3	
✦	-	Tridecano	629-50-5				

✦ Observado apenas nas amostras positivas
↑ Observado com resposta aumentada nas amostras positivas

3.2.3. Método HS-GC-FID

Para escolha do método cromatográfico mais adequado, foram testados nove conjuntos de parâmetros diferentes, baseados no método GC-MS anteriormente aplicado às amostras. Os critérios avaliados foram: obtenção de melhor resolução e separação dos picos dos analitos, minimização de interferentes nas proximidades dos tempos de retenção dos compostos de interesse e menor tempo de análise requerido considerando os critérios anteriores.

As análises foram realizadas em cromatógrafo em fase gasosa 7890A, da Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA), associado a amostrador automático GC

Sampler 80 e detector FID também da Agilent Technologies. Foi empregada a mesma coluna SPB-624 (60 m x 0,32 mm x 1,8 µm), da Sigma-Aldrich.

O injetor foi mantido a 240ºC, e o programa de temperatura da coluna iniciou-se em 50°C, permanecendo nesta por 1 minuto, e após indo, a uma taxa de 25°C/minuto a 240° C e permanecendo nesta última temperatura por 8 minutos, o que resultou em um tempo de corrida de 16,60 minutos. O fluxo de nitrogênio 5.0 foi mantido a 1,3 mL/ minuto. A temperatura do detector era de 300 °C, os fluxos de hidrogênio e ar sintético correspondendo a 40 mL/minuto e 400 mL/minuto, respectivamente, com o gás de *make-up* a 20 mL/minuto.

A limpeza da seringa *gas-tight* de 2,5 mL (SGE, Austrália) foi realizada com um fluxo de gás nitrogênio 4.5 pelo período de 60 segundos. A velocidade de aspiração de amostra empregada foi de 500 µL/s e o mesmo valor foi ajustado para velocidade de injeção da amostra. O volume de amostra injetada no equipamento foi de 1000 µL da fase gasosa, com taxa de *split* de 5:1.

A etapa de *Headspace* seguiu o demonstrado pelos experimentos de otimização, confirmado por experimentos adicionais envolvendo apenas os analitos em questão, portanto correspondendo a 10 minutos de incubação, a 90°C e agitação a 500 RPM. Foi demonstrado também que o emprego de 5 minutos, a 90°C também produzia boas resposta analíticas neste caso, no entanto, observou-se que a reprodutibilidade consistente não era alcançada, provavelmente porque este período não foi suficiente para promover equilíbrio termodinâmico adequado entre o analitos.

Foi utilizado para a operação e aquisição de dados o *software* OpenLAB versão A.01.04. A Tabela 27 mostra os tempos de retenção correspondentes aos compostos de interesse, apenas consideração de desvios inferiores a 1% no tempo de retenção foi critério utilizado para identificação dos picos. A Figura 32 esquematiza o processamento das amostras:

Tabela 27 - Tempos de retenção dos analitos – Método HS-GC-FID

Composto (PI= padrão interno)	Tempo de retenção (minutos)
Pentanal	8,20
Hexanal	9,09
Heptanal	9,97
Heptanol **(PI)**	10,52
Octanal	10,85
Limoneno	10,99
2-Etil-1-hexanol	11,06
1-Undeceno	11,17
Fenol	11,24
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	11,40
Nonanal	11,78
Dodecano **(PI)**	12,11
Decanal	12,82
Tridecano	13,14
Dodecanal **(PI)**	15,63

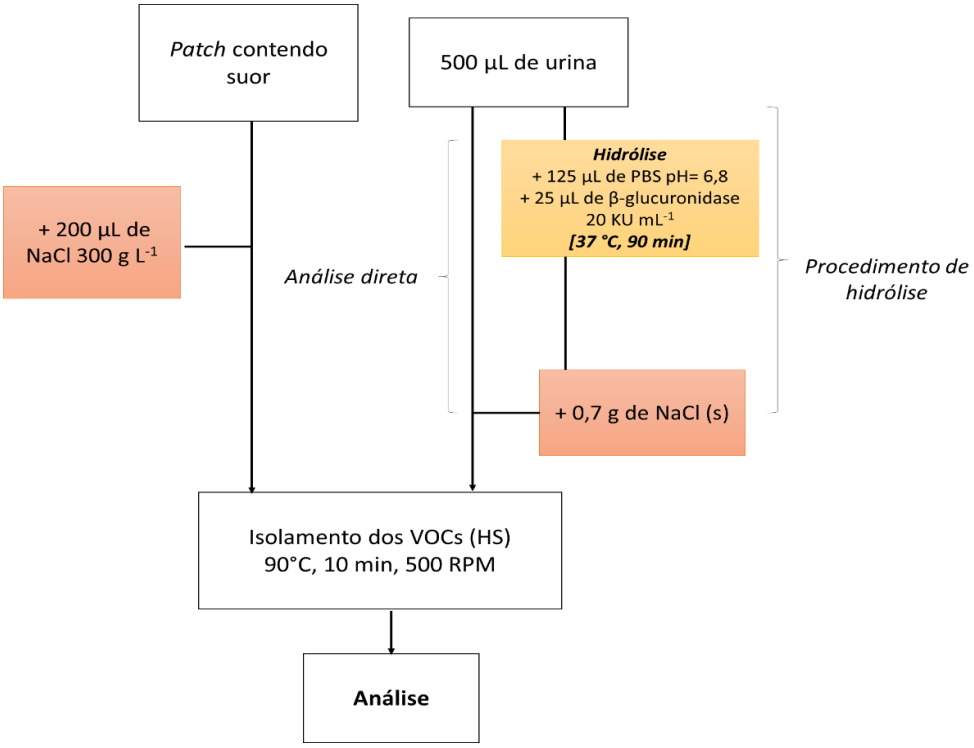


Figura 32 - Esquematização do processo de preparo de amostras

3.2.4. Validação analítica- Suor

Uma vez que no presente contexto a matriz biológica real não teria como ser isenta dos analitos, pois estes são justamente compostos supostamente endógenos, foi empregado o suor artificial para os exames da validação, além disso, em substituição ao *patch* original foi empregado o papel filtro (de similar gramatura e mesmas dimensões), conforme justificado no Capítulo II. O processamento procedeu como sendo a adição inicial de 200 µL do suor artificial, adição dos analitos e, por fim, adição de 200 µL de NaCl 300 g L^{-1}.

Ainda, esclarece-se que, de acordo com o procedimento de coleta descrito no Capítulo I, duas amostras foram coletadas de cada voluntário. A primeira delas foi empregada na etapa de aquisição de perfis de VOCs, no Capítulo III, a amostra adicional permaneceu armazenada para ser utilizada pela primeira vez nesta etapa do estudo (determinação dos marcadores com o método validado), além disso, para efeito de comparação as primeiras amostras citadas foram também aqui reanalisadas para avaliação de diferenças quanto a este processo de nova análise.

A) Definição de LDs, LIQs e CQs (limites e controles de qualidade)

- LD- Foi determinado pelo Método do Sinal/ Ruído (S/N): foram analisadas concentrações sucessivamente menores dos analitos, até que, para pico visualmente identificável, o S/N de até 3 fosse observado.
- LIQ- Foi determinado com a análise de concentrações sucessivamente menores do analitos, para as quais foram observadas, para pico identificável, precisão e exatidão, conforme preconizado pela agência reguladora.
- O intervalo de quantificação foi determinado com base em observações experimentais prévias considerando as respostas obtidas para algumas amostras reanalisadas, as quais demonstraram menores e maiores respostas quando na análise GC-MS. Uma vez com o valor dos LIQ definidos, os CQs foram atribuídos conforme a norma.

B) Seletividade

Como os compostos analisados são também endógenos, este ensaio foi feito com as seguintes adaptações/abordagens: suor de 6 indivíduos controle diferentes foi coletado e analisado para demonstrar o cálculo quanto aos picos interferentes nas regiões dos picos dos analitos e PI. Suor artificial foi fortificado no nível do LIQ mais o PI e adicionado a possíveis interferentes de origem exógena, a alta concentração (1µg- 2µg/ adesivo) foram estes o etanol, isopropanol butanol, isobutanol, acetona, metanol (polares); clorofórmio, tolueno, heptano, acetonitrila, acetato de etila, diclorometano, éter etílico (apolares).

C) Efeito residual ou *carry over*

Compreendeu injeções de amostras de suor artificial (amostras branco) antes e após injeção do LSQ.

D) Linearidade

Foram avaliadas três curvas analíticas, para tanto, as amostras foram fortificadas conforme: 1, 2, 5, 10, 30, 50, 70, 100, 130 e 150 ng/adesivo, para tanto, os volumes de 1, 2, 5 e 10 µL da solução 1 µg mL^{-1} e 3, 5, 7, 10, 13 e 15 µL da solução 10 µg mL^{-1} foram adicionados a papel filtro contendo suor artificial, acondicionado dentro do frasco de *Headspace* de 20 mL, logo em sequência do padrão interno, a concentração sempre fixa e determinada em 50 ng/adesivo (5 µL da solução de misturas de PIs a 10 µg mL^{-1}).

Cada ponto da curva foi analisado em quintuplicata e estas amostras foram preparadas gradativamente para minimizar o possível efeito de instabilidade destes voláteis na *rack* de análise até o momento de sua injeção.

E) Efeito matriz

A norma cita a análise de amostras branco de fontes distintas, no entanto, assim como o ensaio de seletividade, esta metodologia precisou ser modificada, considerando-se então a análise de amostras proveniente de 6 indivíduos controle diferentes e as seguintes comparações: análise dos CQBs e CQAs em papéis filtros de diferentes lotes (por replicata), com e sem o suor artificial, e análise de soluções nas concentrações correspondentes. Os valores de FMN para estas situações foram calculados.

F) Precisão

Avaliada em conjunto com o experimento de linearidade/curva analítica, empregou como parâmetro o CV calculado entre as referidas quintuplicatas de cada ponto por corrida (intra-corrida) e entre os correspondentes nos 3 dias distintos em que a curva foi executada (inter-corrida).

G) Exatidão

Da mesma forma que a precisão, o parâmetro EPR foi calculado considerando os mesmos valores do ensaio anterior, para obtenção da exatidão intra-corrida e inter-corrida.

H) Estabilidade

I) Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: as amostras fortificadas, preparadas em triplicatas a níveis do CQB e CQA foram armazenadas a -20°C, tal qual as amostras da pesquisa, após 12h, removidas e deixadas para descongelar a temperatura ambiente, pelo período de 1h. Em seguida, foram congeladas por mais 12h e descongeladas e então processadas e analisadas, produzindo a averiguação para dois ciclos de congelamento e descongelamento;

II) Estabilidade de curta duração: as amostras fortificadas foram deixadas pelo período de 14h a temperatura ambiente, na bancada de laboratório. Passado este período, as amostras foram processadas e analisadas.

III) Estabilidade de longa duração: amostras fortificadas foram preparadas e deixadas pelo período de 6 meses, sob congelamento. No entanto, algumas amostras do estudo (iniciais) permaneceram armazenadas por período superior. O ensaio de longa duração só pôde ser preparado para este período máximo, isto devido ao fato de que os analitos da pesquisa não foram determinados no início desta, e sim, elegidos por consequências dos resultados obtidos com a prévia análise das amostras reais.

IV) Estabilidade pós-processamento: as amostras fortificadas foram preparadas, processadas (adicionadas com solução de NaCl), deixadas por um período de 14 h, a temperatura ambiente no laboratório, e só então encaminhadas para análise.

V) Estabilidade da solução do analito e do PI: quando em relação à estabilidade das soluções dos analitos e PI, foram analisadas as concentrações de 10 ng (para as soluções de trabalho, referentes a 10 µL da solução 1 µg mL^{-1}) e 100 ng (referentes a 1 µL da diluição em 10 vezes solução-estoque 1 mg mL^{-1}). Foi calculado o desvio, entre a razões de resposta obtidas para a solução utilizada na validação (neste ponto, preparada há 6 dias) e soluções de analitos e PI recém-preparadas.

O princípio da avaliação das demais estabilidades foi o cálculo do desvio das médias das concentrações experimentais obtidas (para as amostras submetidas a diferentes condições associadas a formas de alteração da estabilidade dos analitos) com relação ao valor nominal. O padrão interno foi adicionado às amostras deste ensaio apenas antes das análises serem executadas, já que o objetivo é justamente verificar as influências das condições adversas nas respostas.

3.2.5. Verificação da influência da substituição do PharmChek® por papel filtro

Foi calculado o coeficiente de variação (CV%) para a razão entre área do analito/área do PI considerando a comparação entre *patchs* de diferentes lotes (por replicata) + suor artificial e soluções-padrão, nas mesmas concentrações, equivalentes ao CQB e CQA, e analisadas em triplicata cada.

3.2.6. Verificação da influência da contaminação do *patch* por produtos cosméticos

Um mesmo indivíduo utilizou o dispositivo de coleta em 4 formas de tratamento:

- Normalmente, pelo período estipulado, o qual foi em seguida coletado.

Após 24h passadas do período:

- Fazendo aplicação de água e sabonete sobre toda a superfície do adesivo;
- Fazendo aplicação de loção hidratante sobre toda superfície do adesivo;
- Fazendo aplicação de perfume diretamente sobre toda extensão do adesivo,

Terminadas as 24 h restantes da permanência exigida pelo método, os dispositivos nestas três últimas condições foram removidos e armazenados normalmente para

posterior análise comparando os cromatogramas obtidos para as quatro condições relatadas.

3.2.7. Validação analítica- Urina

Os dois analitos selecionados para análise na amostra de urina foram Fenol e 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol, ambos dependentes de hidrólise para serem verificados em termos de distinção entre os dois grupos de amostra.

No entanto, não seria possível fazer a validação como desejável, englobando todo o processo de incubação de enzima, porque os compostos em questão são, na verdade, conjugados de ácido glicurônico (são glicuronídeos), e ambos não se encontram disponíveis comercialmente nesta forma.

Novamente, também não se pode garantir que uma porcentagem dos analitos livres não estará presente na matriz biológica branco, já que se referem a compostos endógenos. Considerando o exposto optou-se for fazer a validação como se considerando o processo após liberação dos conjugados, ou seja, baseando-se na urina fortificada com os analitos livres. Além disso, para efeito da validação foi preparada uma “urina isenta”. Esta urina era preparada pela formação de um *pool* de urinas controle, preenchendo até 2/3 do mesmo frasco utilizado nas análises, cada frasco contendo o *pool* foi lacrado e levado ao bloco aquecedor, a 80°C e, após o período de 30 minutos eram dali retirados e deixados abertos em capela de exaustão por mais 30 minutos; assim progressivamente, até completar 5 ciclos deste processo. Por fim, esta “urina isenta” era analisada para confirmar a inexistência de picos na região do tempo de retenção dos analitos.

As amostras reais analisadas nesta etapa são alíquotas das amostras de urina originalmente coletadas, sendo o volume de amostra igual a 0,5 mL e o processamento correspondendo a adição de 125 µL de tampão fosfato pH 6,8; adição de 25 µL de β-glucuronidase 20 KU mL-1 ; incubação por 90 minutos, a 37 °C e, por fim, adição de 0,7 g de NaCl sólido; Todos as etapas conforme estabelecido na seção de desenvolvimento de método, no Capítulo II. Para as amostras da validação, 0,5 mL de urina isenta era adicionada de 150 µL (125+25 µL) de tampão fosfato pH 6,8 e, por fim, adição de 0,7 g de sal.

Um experimento à parte avaliou a influência de se submeter ou não estas preparações para validação à simulação do processo de incubação com a enzima (ao que se mostrou não existir alteração na composição da urina fortificada prontamente analisada e aquele submetida a aquecimento de 37 °C, por 90 minutos, antes da análise).

A) Definição de LDs, LIQs e CQs (limites e controles de qualidade)

Os LDs, LIQs e CQs foram definidos da mesma forma que o suor (referir à seção 3.2.4., item A).

B) Seletividade

Urina de 6 indivíduos controle diferentes foi coletada e analisada (com e sem hidrólise) para demonstrar o cálculo quanto aos picos interferentes nas regiões dos picos dos analitos e PI. Urina isenta foi também fortificada no nível do LIQ mais o PI e adicionada de possíveis interferentes de origem exógena, a alta concentração (1µg-2µg/ adesivo), foram estes o etanol, isopropanol butanol, isobutanol, acetona, metanol (polares); hexano, clorofórmio, tolueno, heptano, acetonitrila, acetato de etila, diclorometano (apolares).

C) Efeito residual ou *carry over*

Compreendeu injeções de amostras de urina isenta antes e após injeção do LSQ.

D) Linearidade

Foram avaliadas três curvas analíticas, para tanto, as amostras foram fortificadas conforme: 2, 4, 20, 60, 100, 140, 200, 260, 320 e 400 ng mL^{-1} de urina, para tanto, os volumes de 1, 2 e 10 µL da solução 1 µg mL^{-1} ; 3, 5, e 7 da solução 10 µg mL^{-1} , 1; 1,3; 1,6 e 2 µL da solução 100 µg mL^{-1} foram adicionados à urina isenta, acondicionada dentro do frasco de *Headspace* de 20 mL, logo em sequência do padrão interno (Heptanol), a concentração sempre fixa e determinada em 200 ng mL^{-1} (10 µL da solução de PI a 10 µg mL^{-1}).

Cada ponto da curva foi analisado em quintuplicata e estas amostras foram preparadas gradativamente para minimizar o possível efeito de instabilidade destes voláteis na *rack* de análise até o momento de sua injeção.

E) Efeito matriz

Considerou-se a análise de amostras proveniente de 6 indivíduos controle diferentes, análise dos CQBs e CQAs preparados em urina isenta e análise de soluções nas concentrações correspondentes. Os valores de FMN para estas situações foram calculados.

F) Precisão

Referir ao item F da seção 3.2.4.

G) Exatidão

Referir ao item G da seção 3.2.4.

H) Estabilidade

I) Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: estudada da mesma forma que para a seção anterior, mas para 3 ciclos de congelamento e descongelamento.

II) Estabilidade de curta duração: estudada da mesma forma que para a seção anterior, mas para o período de 18h.

III) Estabilidade de longa duração: amostras fortificadas foram preparadas e deixadas pelo período de 6 meses, sob congelamento. A mesma ressalva, a respeito do período para avaliação inferior ao recomendado, feita com relação ao suor deve ser aqui considerada.

IV) Estabilidade pós-processamento: as amostras fortificadas foram preparadas, processadas (adicionadas de tampão e NaCl), deixadas por um período de 18 h, a temperatura ambiente no laboratório, e só então encaminhadas para análise.

V) Estabilidade da solução do analito e do PI: considerar o mesmo procedimento da seção anterior e o mesmo período testado (6 dias do preparo).

3.2.8. Eficiência da interrupção da atividade da enzima/ Estabilidade pós-processamento com enzima

Para este teste, passadas 18h do preparo e análise de três amostras reais positivas processadas com enzima, estas foram deixadas na própria *rack* de análise e

reinjetadas para se verificar significantes diferenças quanto às respostas calculadas dos analitos, através do cálculo do desvio padrão relativo para as razões de área do analito/área do PI.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Validação analítica- Suor

Um exemplo de cromatograma obtido para uma amostra fortificada pode ser observado na Figura 33 seguinte:

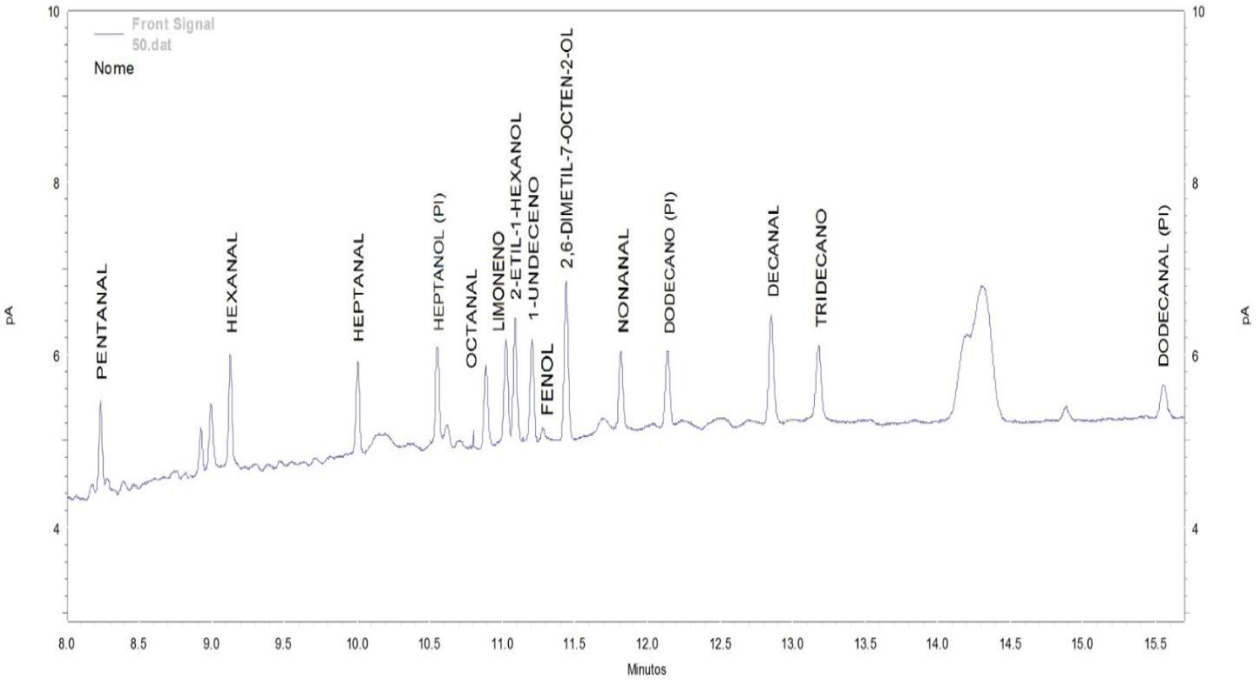


Figura 33 - Cromatograma de amostra de suor fortificada com marcadores em 50 ng/adesivo e adicionadas de PI (50 ng).

Os LDs, LIQs e CQs foram atribuídos conforme mostrado na Tabela 28 a seguir.

Tabela 28 - LDs, LIQs e CQs atribuídos aos analitos- Suor

Analito	Tempo de retenção (minutos)	LD	LIQ	LSQ	CQB	CQM	CQA
		(ng/adesivo)					
Pentanal	8,20	0,5	1	150	2	70	130
Hexanal	9,09	0,5	1	150	2	70	130
Heptanal	9,97	0,5	1	150	2	70	130
Octanal	10,85	0,5	1	150	2	70	130
Limoneno	10,99	0,5	1	150	2	70	130
2-Etil-1-hexanol	11,06	0,5	1	150	2	70	130
1-Undeceno	11,17	0,5	1	150	2	70	130
Fenol	11,24	1	5	150	10	70	130
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	11,40	0,5	1	150	2	70	130
Nonanal	11,78	0,5	1	150	2	70	130
Decanal	12,82	0,5	1	150	2	70	130
Tridecano	13,14	0,5	1	150	2	70	130

LD= limite de detecção; LIQ= limite inferior de quantificação; LSQ=limite superior de quantificação; CQB= controle de qualidade baixo; CQM= controle de qualidade médio; CQA= controle de qualidade alto

4.1.2. Seletividade

Quanto ao ensaio de seletividade, não foi observada influência dos interferentes em alta concentração, propositalmente adicionados à amostra LIQ. Também, não foram observados picos na região até 4% do tempo de retenção dos analitos ou PI, que pudessem interferir na identificação destes compostos, a ondulação da linha de base na região também não atingiu 10% do pico no LIQ. A Figura 34 mostra esta observação. Quanto à seletividade considerando a amostra real, interferentes na região dos analitos e PI não foram verificados, observar o exemplo de cromatogramas obtidos na Figura 35.

4.1.3. Efeito residual

Efeito residual não foi observado, de forma que picos na região do tempo de retenção dos analitos e dos PI não foram detectados. A Figura 36 ilustra o descrito.

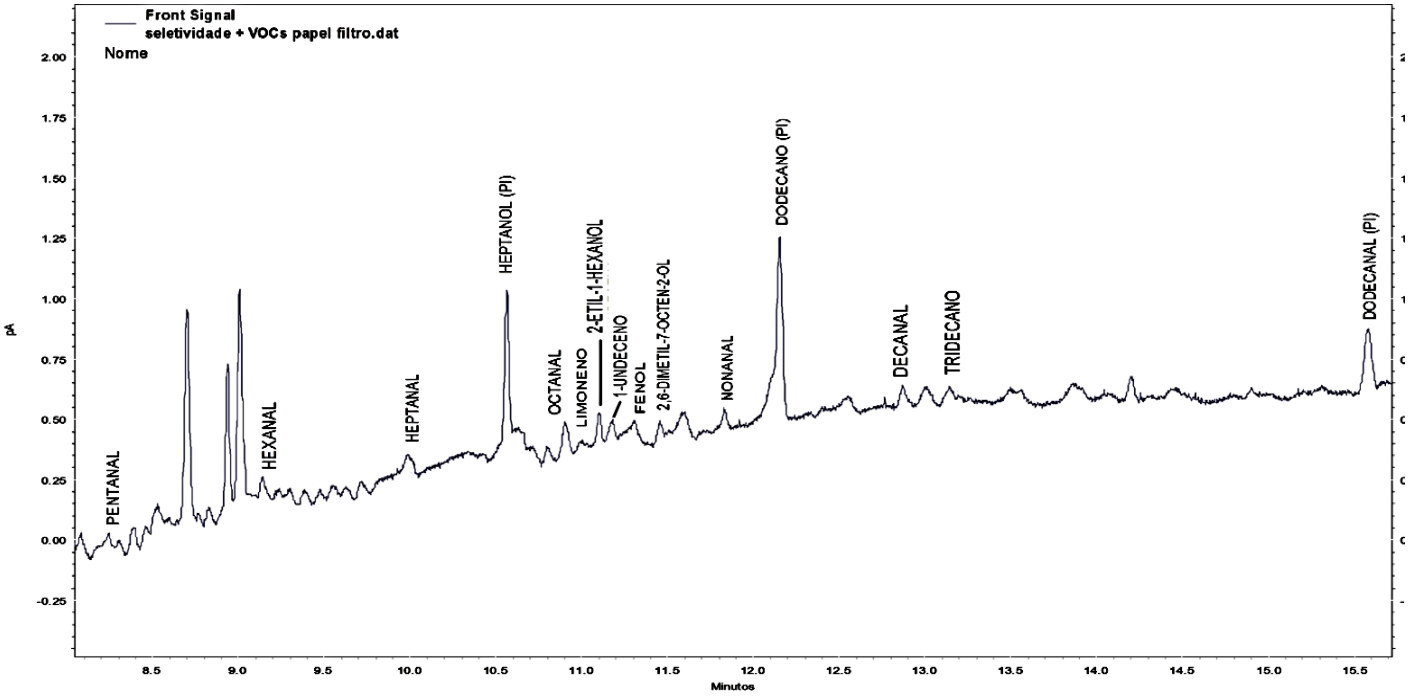


Figura 34 - Cromatograma de amostra fortificada a nível do LIQ, adicionada de 13 interferentes voláteis a 1- 2 µg/adesivo.

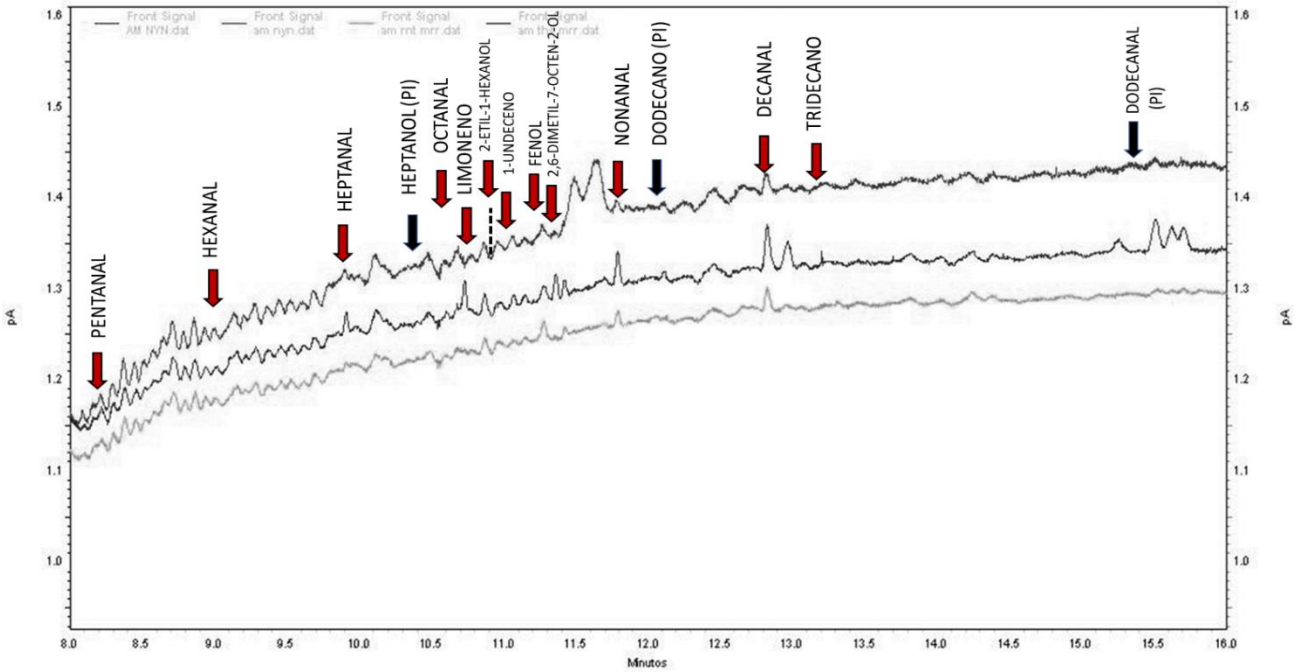


Figura 35 - Cromatogramas sobrepostos para amostras de três indivíduos controle diferentes, demonstrando ausência de interferentes nas regiões (demarcadas) dos tempos de retenção dos analitos e PI, a não ser pelo próprio pico referente ao analito e presente na matriz

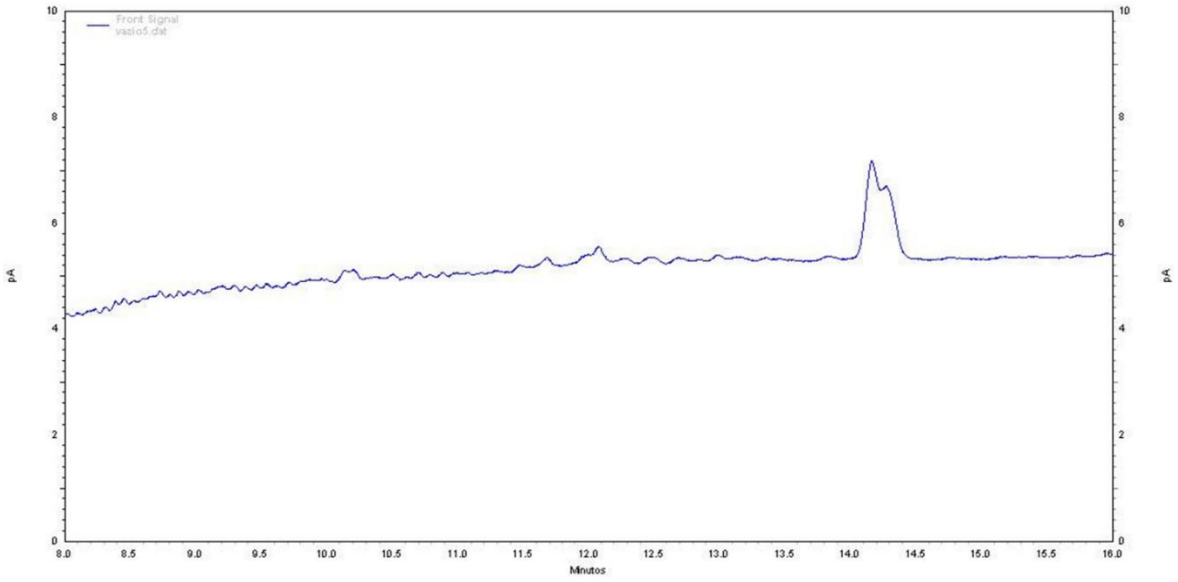


Figura 36 - Amostra branco de suor, analisada logo após amostra do LSQ

4.1.4. Linearidade

A linearidade foi observada, na faixa de 1 a 150 ng/adesivo para todos analitos, com exceção do Fenol, para qual a faixa de linearidade foi de 5 a 150 ng/adesivo. A Figura 37 exibe as faixas de linearidade, os valores do coeficiente de determinação em termos de R^2 e as respectivas equações da reta, empregadas, neste caso, para o cálculo das concentrações experimentais nas amostras reais. Como é possível observar, os valores do coeficiente de determinação linear em termos de R (raiz quadrada de R^2), como citado pela norma, são todos superiores a 0,99 (e menores que 1), certificando o critério de linearidade.

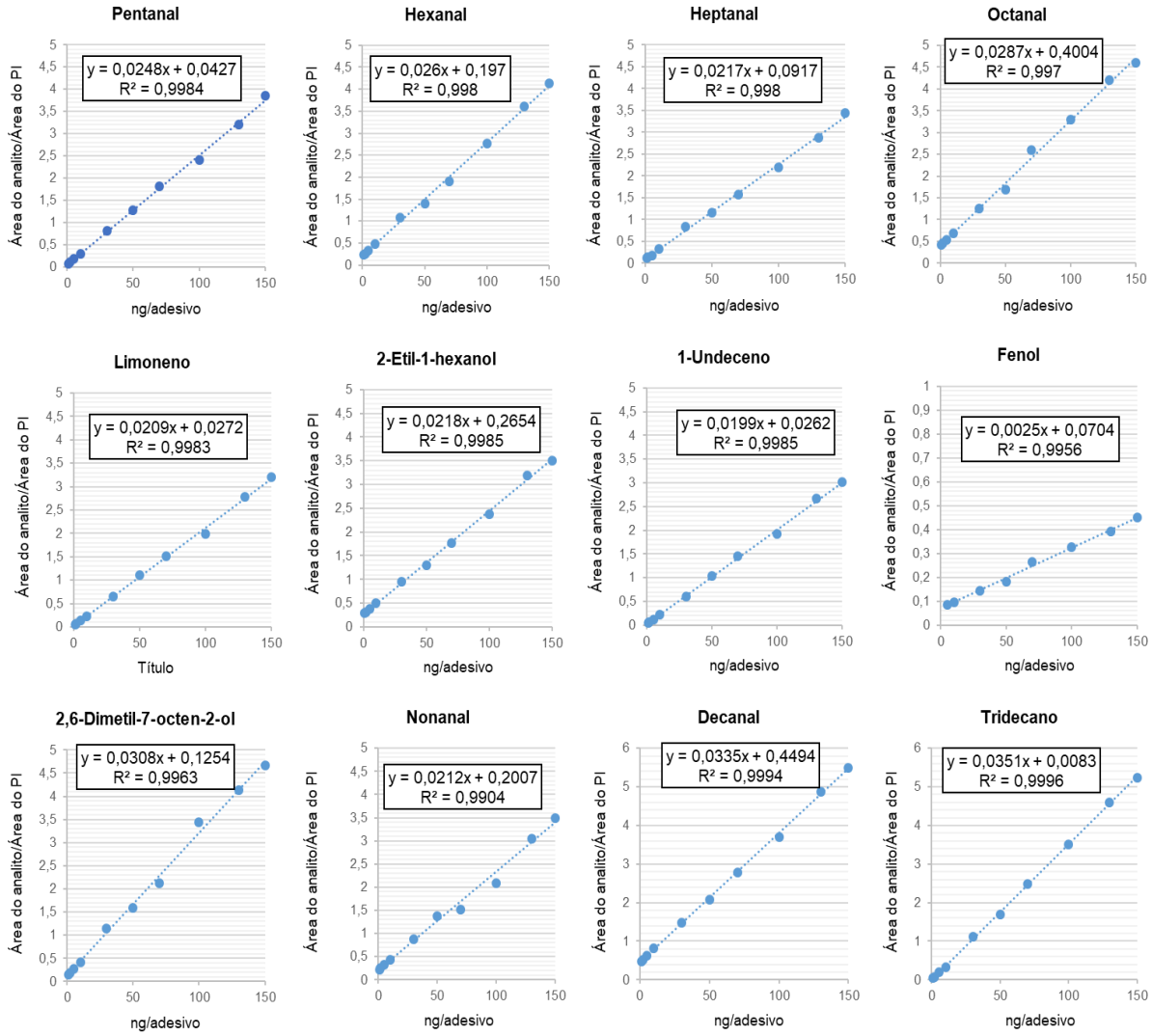


Figura 37 - Curva analíticas obtidas para os marcadores- Suor

4.1.5. Efeito matriz

O ensaio do efeito matriz foi adaptado para as condições deste estudo, como a própria norma sugere que seja feito. Para isso, considerou-se o efeito matriz atuante entre os analitos e a matriz suor, e entre os analitos e o suporte de celulose. O parâmetro FMN foi calculado de forma a verificar a extensão do efeito destas interações e os coeficientes de variação entre estes, para um mesmo experimento, foram calculados. A Tabela 29 traz o resultado dos cálculos do FMN e dos respectivos CVs.

Tabela 29 - Efeito matriz: Fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN) e coeficientes de variação (CV%)- Suor

Analito	Papel filtro com suor artificial - Solução +200µL NaCl				Papel filtro sem suor artificial - Solução +200µL NaCl			
	CQB		CQA		CQB		CQA	
	FMN médio	CV %	FMN médio	CV %	FMN médio	CV %	FMN médio	CV %
Pentanal	0,838	6,21	0,836	2,76	0,803	2,57	0,813	8,60
Hexanal	0,843	3,93	0,802	2,20	0,817	2,94	0,795	5,64
Heptanal	0,843	2,69	0,830	1,21	0,805	2,56	0,794	11,26
Octanal	0,861	5,54	0,868	1,28	0,803	3,45	0,838	4,81
Limoneno	0,645	7,93	0,845	11,04	0,636	6,26	0,760	5,03
2-Etil-1-hexanol	0,737	7,01	0,799	3,25	0,870	10,32	0,873	8,85
1-Undeceno	0,710	3,77	0,863	4,46	0,690	3,77	0,812	11,71
Fenol	0,212	4,96	0,287	5,70	0,404	10,98	0,454	13,46
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	0,818	6,45	0,818	10,24	0,814	5,49	0,819	1,89
Nonanal	0,867	4,32	0,852	6,34	0,879	3,76	0,791	8,26
Decanal	0,865	1,48	0,865	8,10	0,881	9,42	0,811	12,57
Tridecano	0,567	3,68	0,876	4,05	0,613	13,08	0,819	0,50

CQB= controle de qualidade baixo; CQA= controle de qualidade alto

O FMN pode representar o efeito matriz da seguinte forma: quando mais próximo a 1 o valor, menor seria a influência desse efeito, pois as respostas têm pouca alteração devido a presença da matriz. Os analitos sofrem considerável efeito, sendo possível ordenar, da menor para a maior extensão do efeito matriz aldeídos<2-Etil-1-hexanol<2,6-Dimetil-7-octen-2-ol<hidrocarbonetos<Fenol. De fato, se observada, o pico do Fenol em amostra é o menor entre os analitos. Para todos analitos observa-se ainda, que, para a menor a concentração testada, menor o FM. Além disso, nota-se que é o papel como “matriz” que possui grande influência neste parâmetro, mas que o suor deve interagir especialmente com o 2-Etil-1-hexanol e o Fenol (pois seus valores de FMN aumentaram substancialmente na ausência deste). Os CV% permaneceram dentro do limite descrito pela resolução.

4.1.6. Precisão

A precisão, calculada em termos de coeficiente de variação (CV%), pode ser verificada na Tabela 30 a seguir, na qual é apresentada as médias deste parâmetro

para os mesmos dias (precisão intra-corrida, com cada ponto verificado em quintuplicata, considerando-se no cálculo todos valores obtidos) e o parâmetro calculado com relação a três dias diferentes (precisão inter-corrida). Nota-se que nenhum valor de coeficiente superou o estabelecido pela norma (até 20% para os LIQs e 15% para os demais).

Tabela 30 - Precisão intra e inter-corrida: coeficientes de variação (CV%) calculados-Suor

Analito	Precisão intra-corrida (CV%)				Precisão inter-corrida (CV%)			
	LIQ	CQB	CQM	CQA	LIQ	CQB	CQM	CQA
Pentanal	1,56	1,06	0,21	0,26	12,35	11,17	5,24	1,81
Hexanal	5,75	2,94	0,40	0,15	10,19	9,98	0,65	0,29
Heptanal	0,81	1,02	0,28	0,14	11,79	3,97	0,80	0,15
Octanal	7,22	2,44	0,24	0,16	11,54	10,85	5,75	0,66
Limoneno	0,98	0,57	0,30	0,20	11,20	8,33	0,74	0,93
2-Etil-1-hexanol	2,75	0,85	0,22	0,10	11,82	3,77	3,34	2,08
1-Undeceno	1,47	0,62	0,19	0,11	10,93	8,22	6,40	1,22
Fenol	0,22	0,24	0,13	0,08	1,02	3,26	0,28	2,41
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	2,47	1,29	0,21	0,12	4,75	8,29	2,27	0,51
Nonanal	5,63	1,86	0,17	0,12	6,10	4,36	1,45	1,91
Decanal	4,62	1,37	0,26	0,14	7,99	7,17	1,55	0,99
Tridecano	1,92	0,66	0,36	0,18	7,16	5,94	1,91	1,03

LIQ=limite inferior de quantificação; CQB= controle de qualidade baixo; CQM= controle de qualidade médio; CQA= controle de qualidade alto

4.1.7. Exatidão

De forma equivalente, a Tabela 31 dispõe os dados de exatidão. Como a exatidão compreende um intervalo negativo a positivo, se feita uma média dos valores intra-corrida, um valor não condizente com a realidade pode ser obtido e a variação ocorre em mais de um sentido, por isso salienta-se que estes são médias de valores que variaram apenas em um sentido. Quanto ao critério de exatidão, os resultados obtidos também encontram-se dentro do aprovado.

Tabela 31 - Exatidão intra e inter-corrida: erros padrão relativos (EPR-%) calculados- Suor

Analito	Exatidão intra-corrida (EPR-%)				Exatidão inter-corrida (EPR-%)			
	LIQ	CQB	CQM	CQA	LIQ	CQB	CQM	CQA
Pentanal	-5,46	5,33	-0,52	-2,67	5,33	-1,58	1,76	1,31
Hexanal	-13,15	-4,14	-6,72	0,90	-2,26	-4,14	-6,72	0,90
Heptanal	-9,86	10,14	-1,88	-1,17	4,34	10,14	-1,88	-1,17
Octanal	-8,71	-11,99	6,05	1,34	0,59	-3,76	3,10	1,34
Limoneno	-10,48	4,21	0,89	1,42	-5,65	4,21	0,55	1,42
2-Etil-1-hexanol	-11,44	7,30	-1,84	4,88	-11,44	7,30	0,07	4,88
1-Undeceno	19,48	-15,82	4,72	3,52	6,60	-5,94	1,12	3,52
Fenol	17,45	-2,27	10,65	-2,28	17,45	-0,45	10,65	-2,28
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	-13,57	-4,73	-9,61	-0,24	-13,57	0,41	-9,61	0,02
Nonanal	-8,40	9,22	-9,61	3,70	-8,40	9,22	-9,61	3,70
Decanal	-14,53	6,88	0,82	1,25	-14,53	3,81	0,82	1,25
Tridecano	-8,63	-14,76	3,25	1,58	0,78	-14,76	3,25	1,58

LIQ=limite inferior de quantificação; CQB= controle de qualidade baixo; CQM= controle de qualidade médio; CQA= controle de qualidade alto

Observa-se que os parâmetros CV% e EPR possuem maiores valores, assim indicando maiores variações, para menores concentrações. Isto é esperado, devido às suas menores estabilidades, além da menor resolução dos picos correspondentes, acarretando em maiores dificuldades quanto à integração do sinal.

4.1.8. Estabilidade

As Tabelas 32 e 33 a seguir sumarizam os resultados obtidos para os experimentos de estabilidade. Como esperado, todas condições impostas geraram leituras correspondentemente inferiores ao valor nominal. Também como previsto, a condições de armazenamento por 6 meses foi a mais drástica, produzindo maiores valores de desvio, sobretudo para os hidrocarbonetos- os quais demonstraram ser os mais instáveis. Ao que se infere, o Fenol é o composto mais estável, paralelamente isso pode ser explicado devido à sua maior afinidade pela matriz, demonstrada anteriormente. Quanto à estabilidade dos analitos e PI em solução, Limoneno exibiu menor estabilidade, possivelmente devido à sua volatilidade.

Para todos os casos os parâmetros mantiveram-se conforme o estabelecido pela ANVISA, no entanto, atenção especial deve ser tomada quando em relação ao manuseio e armazenagem destes compostos. Acredita-se que o fato de as amostras serem prontamente acondicionadas no próprio frasco de análise e tampadas com septo intacto foi essencial para que tais resultados, ainda que não muito satisfatórios, fossem obtidos.

A Figura 38 mostra comparação entre cromatogramas obtidos para uma amostra 10 ng/adesivo recém preparada e uma armazenada por 6 meses.

Tabela 32 - Ensaios de estabilidade dos analitos na matriz suor, em termos de desvio da concentração nominal (%)

Analito	**Ensaio de estabilidade- Desvio da concentração nominal (%)**							
	Longa duração (6 meses)		Curta duração (14h)		Pós-processamento (14h)		Ciclo de descongelamento (2 ciclos)	
	CQB	**CQA**	**CQB**	**CQA**	**CQB**	**CQA**	**CQB**	**CQA**
Pentanal	-12,05	-9,00	-0,14	-2,17	-4,81	-5,19	-0,58	-0,82
Hexanal	-12,64	-7,74	-1,53	-0,28	-6,16	-6,21	-4,83	-2,84
Heptanal	-9,98	-7,84	-4,56	-5,12	-3,57	-3,68	-4,91	-3,84
Octanal	-9,06	-7,62	-4,50	-3,15	-3,01	-4,98	-4,25	-2,67
Limoneno	-13,92	-11,77	-8,31	-9,33	-10,15	-7,74	-5,34	-2,74
2-Etil-1-hexanol	-9,10	-8,02	-3,47	-1,41	-8,43	-4,57	-2,87	-2,75
1-Undeceno	-12,35	-11,54	-7,36	-6,57	-3,48	-7,02	-9,47	-2,96
Fenol	-7,83	-10,22	-8,08	-0,36	-7,59	-9,78	-5,02	-3,99
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	-11,38	-10,78	-4,59	-5,86	-7,79	-5,55	-9,33	-1,04
Nonanal	-12,69	-10,09	-5,03	-3,75	-7,87	-5,62	-8,80	-2,83
Decanal	-12,92	-9,72	-5,74	-3,87	-6,22	-7,80	-9,10	-5,45
Tridecano	-14,36	-13,43	-6,85	-5,93	-9,82	-8,01	-10,64	-4,92

CQB= controle de qualidade baixo; CQA= controle de qualidade alto

Tabela 33 - Ensaio de estabilidade dos analitos em solução, em termos de desvio quanto à resposta analítica (%)

Composto	Desvio quanto à resposta (%)	
	Solução primária	Solução de trabalho
Pentanal	2,46	2,46
Hexanal	3,91	6,00
Heptanal	2,63	3,21
Octanal	2,31	4,83
Limoneno	7,03	6,81
2-Etil-1-hexanol	7,00	2,52
1-Undeceno	4,68	3,47
Fenol	3,86	3,98
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	3,87	8,12
Nonanal	4,11	5,69
Decanal	5,99	6,92
Tridecano	5,57	5,82
Heptanol (PI)	1,71	3,65
Dodecano (PI)	4,97	5,21
Dodecanal (PI)	4,43	5,62

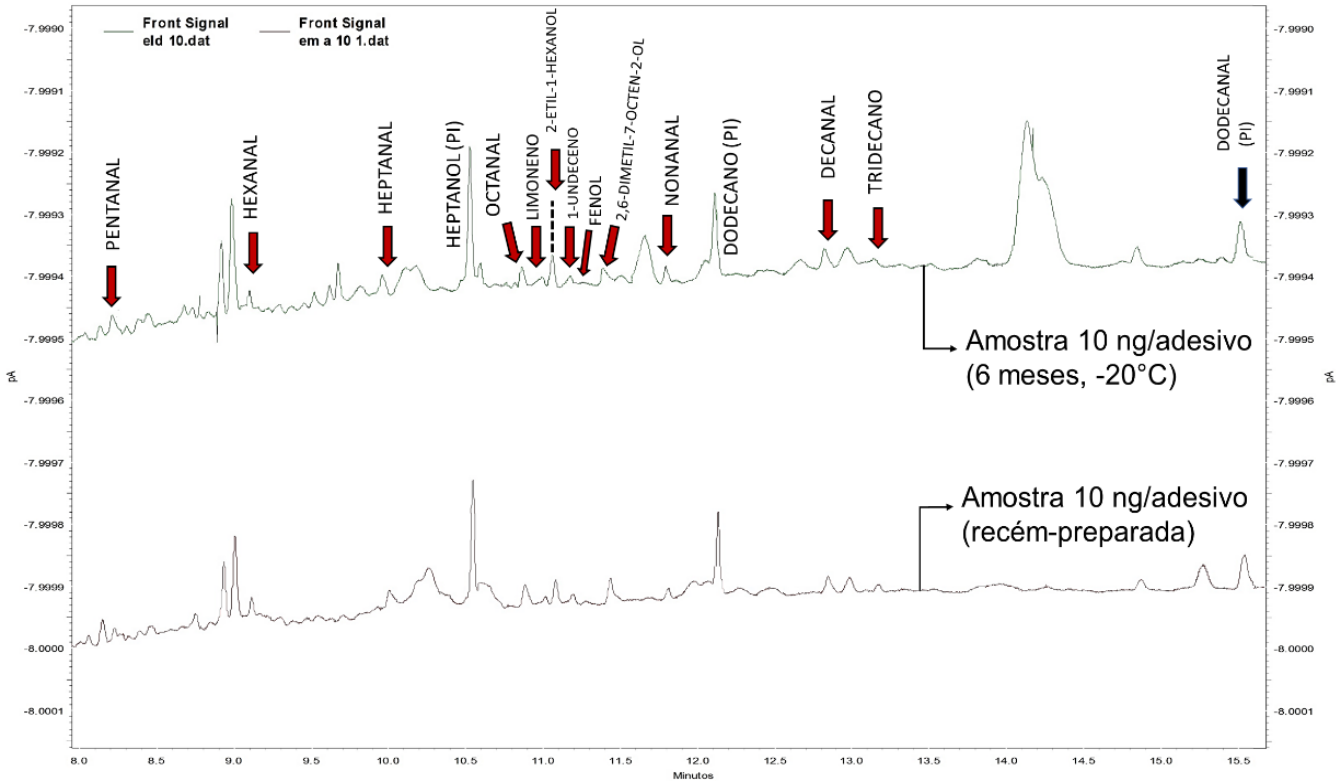


Figura 38 - Amostra fortificada com 10 ng de analitos, armazenada por 6 meses *versus* recém-preparada

4.2. Verificação da influência da substituição do PharmChek® por papel filtro

A Tabela 34 apresenta os coeficientes de variação observados para a comparação entre respostas feita. A Figura 39 mostra cromatogramas de amostras "branco" em ambos suportes.

Tabela 34 - Desvios observados para respostas dos analitos na comparação entre *patch* e papel filtro

PharmChek® - Papel filtro		
Analito	**CV %**	
	CQB	**CQA**
Pentanal	1,28	2,40
Hexanal	1,57	0,44
Heptanal	0,66	1,92
Octanal	1,66	1,30
Limoneno	1,36	1,85
2-Etil-1-hexanol	1,41	3,50
1-Undeceno	0,16	2,26
Fenol	1,45	3,21
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	0,85	1,58
Nonanal	0,99	1,79
Decanal	1,63	0,64
Tridecano	4,35	4,91

CQB= controle de qualidade baixo; CQA= controle de qualidade alto

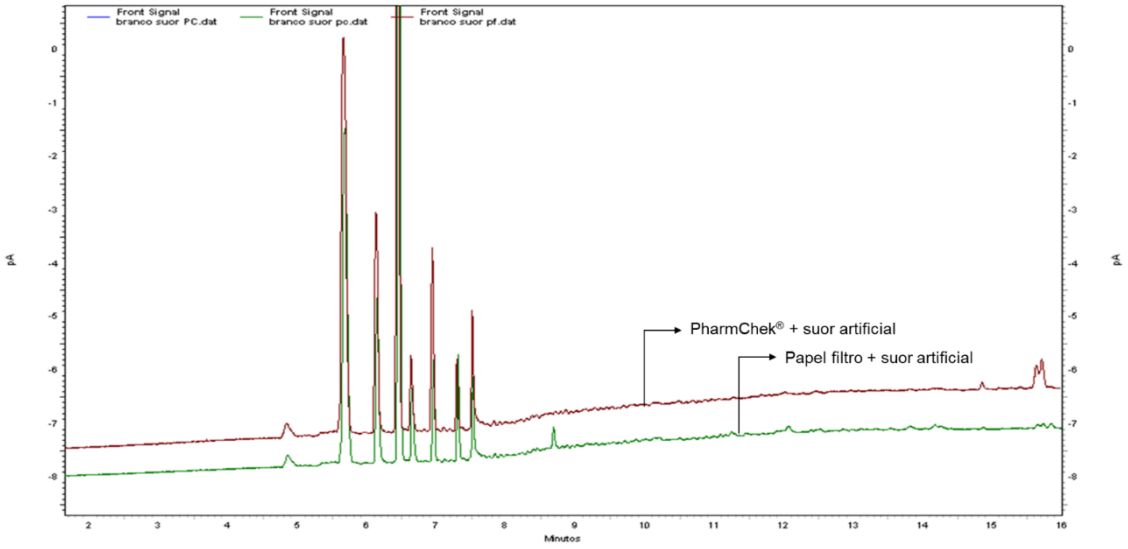


Figura 39 - Cromatogramas de amostras branco preparadas em ambos suportes

4.3. Verificação da influência da contaminação do *patch* por produtos cosméticos

Embora as situações testadas tenham sido extremas e advertidas na situação de permanência com o adesivo, este experimento foi importante para descartar a influência de produtos cosméticos, utilizados na higiene pessoal, na determinação dos analitos. Embora muitos dos analitos sejam descritos como endógenos, também podem ser encontrados em produtos diversos, como metabólitos de degradação de um produto sintético ou como formulação de essências, devido a suas propriedades organolépticas. Não foi observada alteração que pudesse prejudicar a análise e isso é mais um indício da resistência do dispositivo com relação a contaminação externa. A Figura 40 a seguir compara os cromatogramas obtidos, no entanto, mais estudos são necessários nesta área, pois é fundamental discriminar contribuições endógenas nas exógenas neste tipo de estudo.

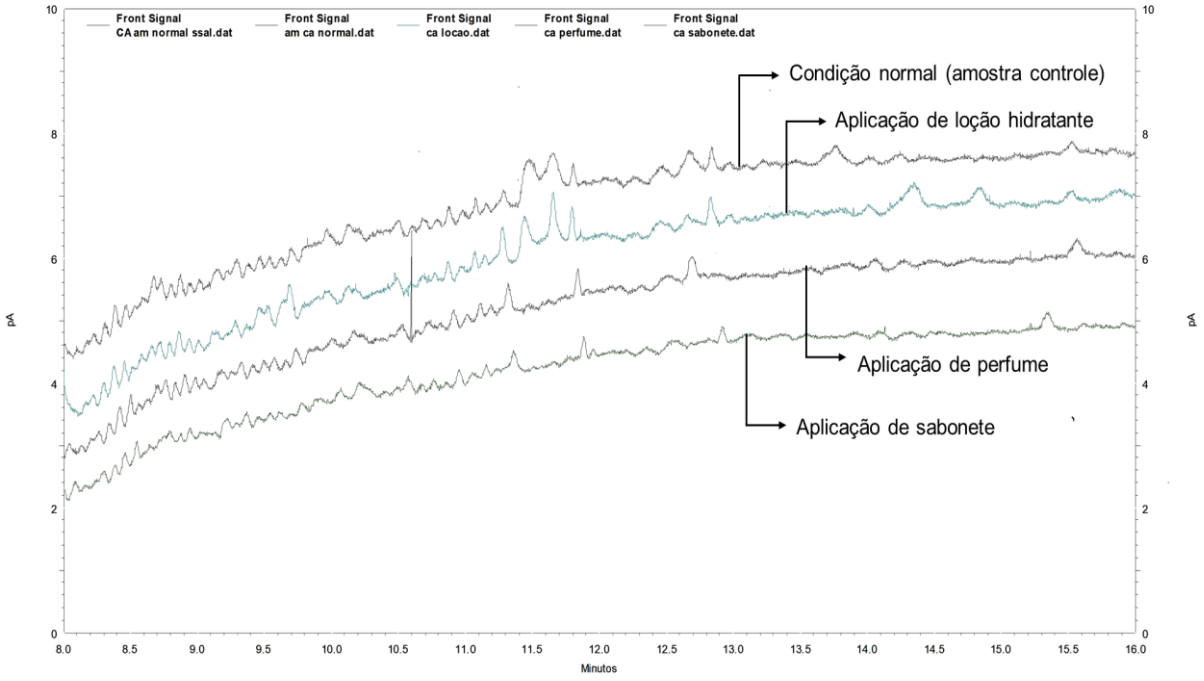


Figura 40 - Cromatogramas normal e obtidos sob diferentes formas de contaminação externa

4.4. Validação analítica- Urina

Como citado na seção Método, objetivou-se verificar que não existiam alterações a serem consideradas quando a urina era prontamente fortificada ou fortificada somente após passar por uma simulação da incubação com a enzima. Os testes pertinentes demonstraram que diferenças cromatográficas não foram observadas, portanto, assim que preparadas as amostras de urina já eram encaminhadas para a análise. A Figura 41 mostra exemplos de cromatogramas de urinas fortificadas frescas e incubadas.

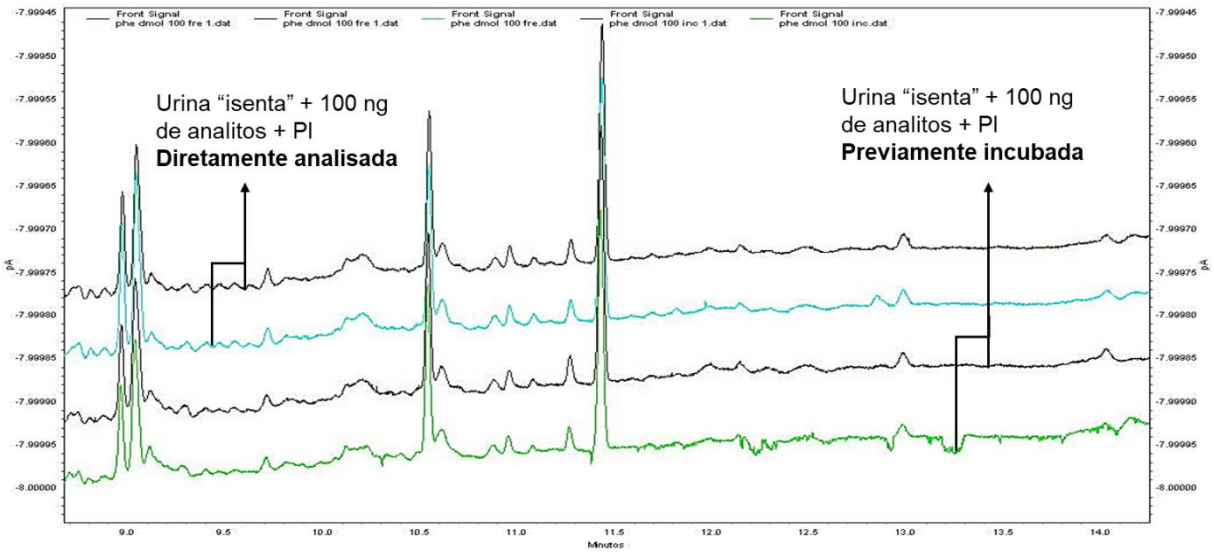


Figura 41 - Cromatogramas obtidos para amostras de urina sem e com prévia incubação

Um exemplo de cromatograma obtido para uma amostra de urina fortificada pode ser observado na Figura 42 a seguir.

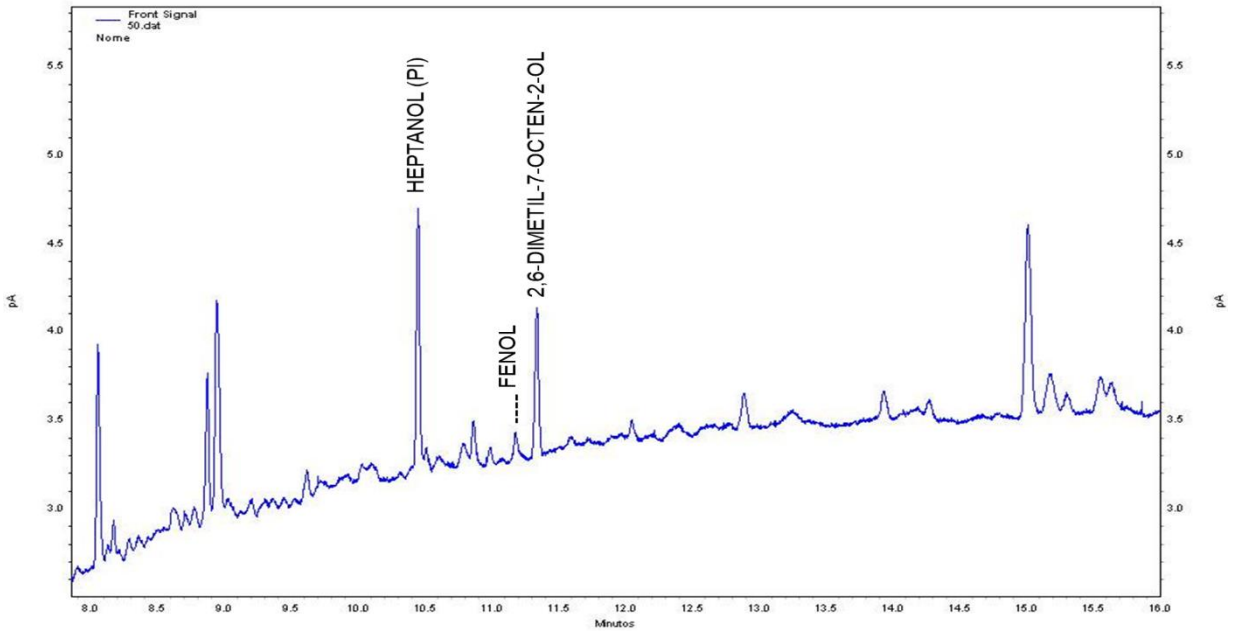


Figura 42 - Cromatograma para urina fortificada com 50 ng de analitos e PI (200 ng mL^{-1})

4.4.1. Definições

Os LDs, LIQs e CQs foram atribuídos conforme mostrado na Tabela 35.

Tabela 35 - LDs, LIQs e CQs atribuídos aos analitos- Urina

Analito	Tempo de retenção (minutos)	LD	LIQ	LSQ	CQB	CQM	CQA
		(ng mL^{-1} de urina)					
Fenol	11,24	5	10	400	20	200	320
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	11,40	1	2	400	4	200	320

LD= limite de detecção; LIQ= limite inferior de quantificação; LSQ=limite superior de quantificação; CQB= controle de qualidade baixo; CQM= controle de qualidade médio; CQA= controle de qualidade alto

4.4.2. Seletividade

Interferências na região dos tempos de retenção dos analitos e PI não foram identificadas, o pico adjacente ao PI apresentou resposta inferior a 5% deste útimo. A Figura 43 mostra o cromatograma resultado de uma urina fortificada com analito no nível do LIQ e adicionada dos possíveis interferentes voláteis supracitados.

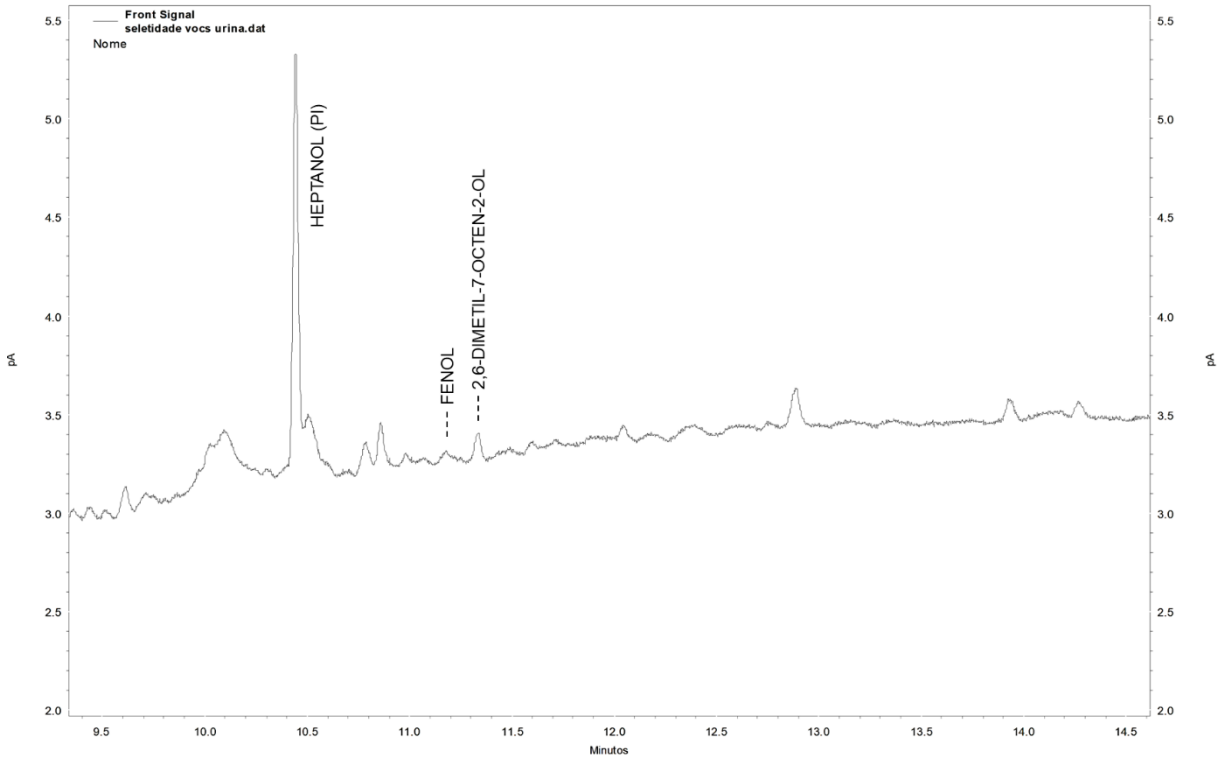


Figura 43 - Cromatograma de urina fortificada ao nível do LIQ, adicionada de 13 interferentes voláteis a concentração de 1 – 2 µg mL^{-1} de urina.

Nas amostras reais, de 6 fontes diferentes, avaliamos que potenciais picos interferentes não foram observados nas regiões dos analitos e PI. As próximas Figuras, 44 e 45, ilustram cromatogramas de urinas originais controle, obtidas de três indivíduos diferentes, uma delas após tratamento de hidrólise (caso em que os analitos, geralmente encontrados em todas amostras, inclusive controles, não foram detectados); e o “branco” da enzima, em que o processo de incubação foi realizado com igual volume de água ao invés de urina, para demonstrar picos advindos somente da enzima. Mais adiante será possível observar que para diferentes amostras reais e tratadas com enzima, não se verificou a presença de interferentes próximos aos tempos de retenção dos compostos de interesse.

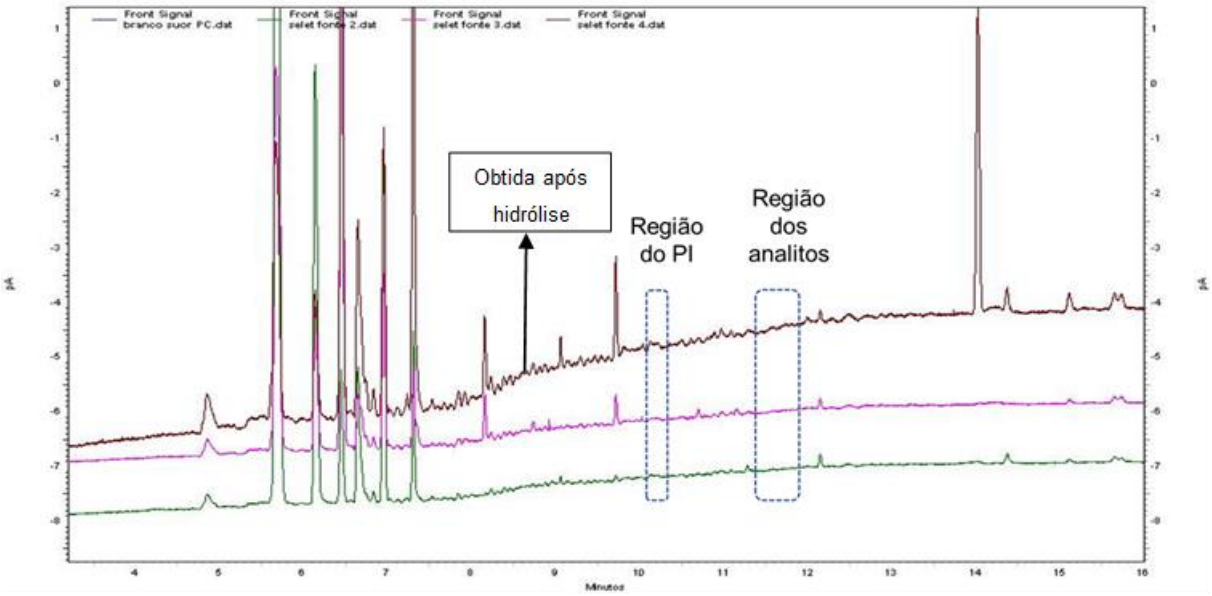


Figura 44 - Cromatogramas para análise de urina de três indivíduos diferentes, demonstrando ausência de picos interferentes nas regiões dos analitos e PI

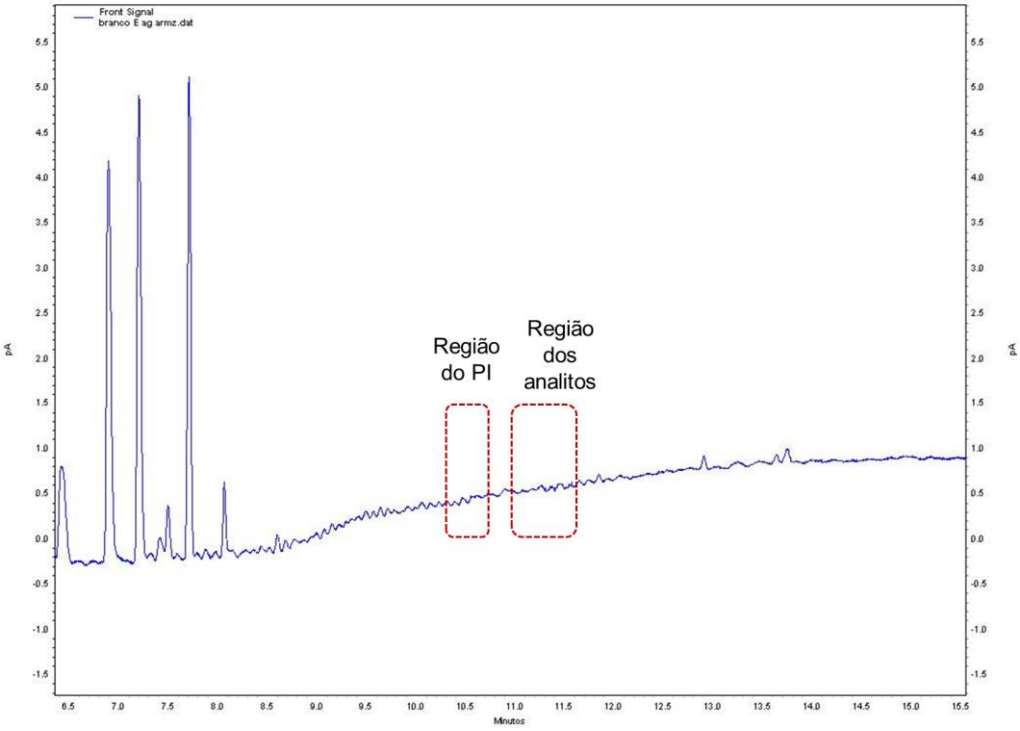


Figura 45 - Cromatograma demonstrando o “branco” da enzima para o método

4.4.3. Efeito residual ou *carry over*

O efeito residual não foi observado para o método empregado. A Figura 46, em sequência, demonstra um exemplo de urina branco (isenta) injetada logo em seguida do LSQ.

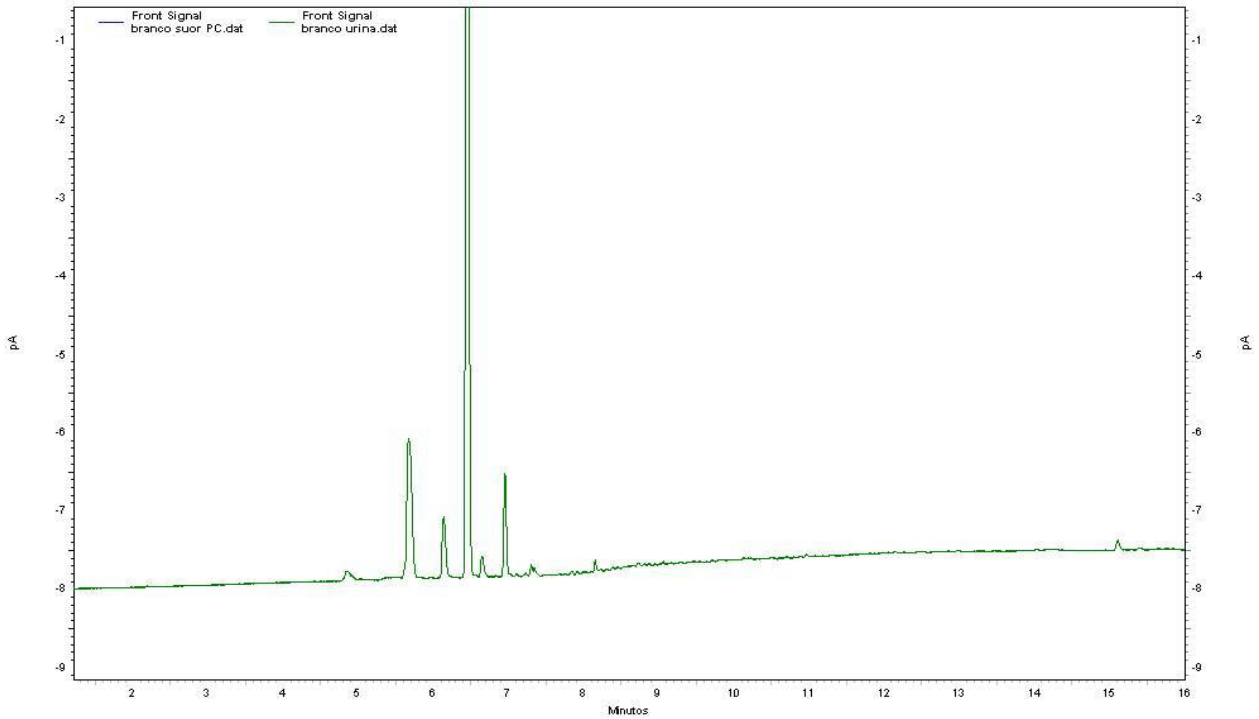


Figura 46 - Cromatograma para amostra branco (urina isenta) após análise do LSQ

4.4.4. Linearidade

A linearidade foi observada para o intervalo de 10 a 400 ng mL^{-1} para o Fenol e de 2 a 400 ng mL^{-1} para o 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol. A Figura 47 apresenta os coeficientes de determinação linear em termos de R^2 e as equações da reta utilizadas para o cálculo das concentrações nas amostras da pesquisa. Como nota-se, os valores de R (raiz quadrada de R^2) não seriam menores que o valor de 0,99, citado pela norma.

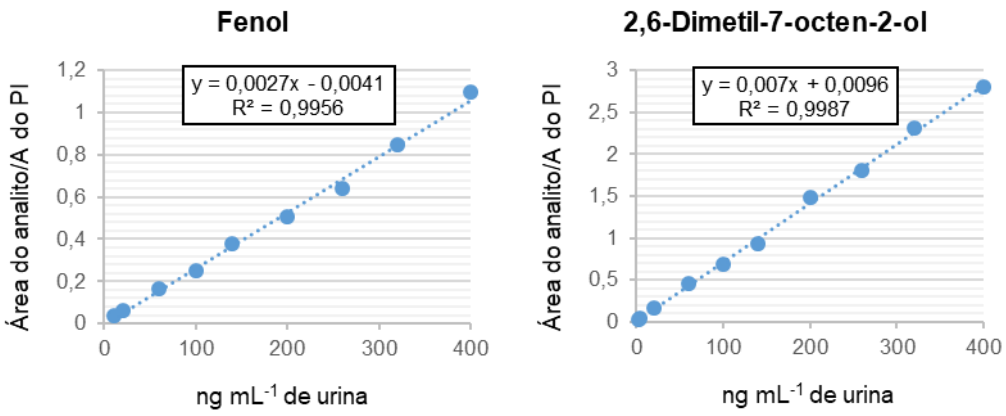


Figura 47 - Curvas analíticas construídas os marcadores- Urina

4.4.5. Efeito matriz

A Tabela 36 traz o resultado dos cálculos do FMNs e dos respectivos CVs.

Tabela 36 - Efeito matriz: Fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN) e coeficientes de variação (CV%)- Urina

Analito	Urina isenta fortificada - Solução +150 µL PBS + 0,7g NaCl			
	CQB		CQA	
	FMN médio	CV %	FMN médio	CV %
Fenol	0,199	3,27	0,210	2,88
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	0,601	4,02	0,721	3,10

PBS= tampão fosfato; CQB= controle de qualidade baixo; CQA= controle de qualidade alto

Infere-se que a extensão do efeito matriz para os analitos nas amostras de urina é representativo, sendo maior para o Fenol. Conforme Tabela apresentando solubilidades dos compostos em água, o Fenol é consideravelmente solúvel neste solvente. Os CVs não ultrapassaram 15%, portanto este parâmetro se encontra aprovado.

4.4.6. Precisão

Apresentam-se os cálculos na Tabela 37 a seguir.

Tabela 37 - Precisão intra e inter-corrida: coeficientes de variação (CV%) calculados- Urina

Analito	Precisão intra-corrida (CV%)				Precisão inter-corrida (CV%)			
	LIQ	CQB	CQM	CQA	LIQ	CQB	CQM	CQA
Fenol	0,07	0,07	0,06	0,07	0,63	4,53	2,63	2,42
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	3,55	0,28	0,09	0,24	12,42	3,15	4,09	1,38

LIQ=limite inferior de quantificação; CQB= controle de qualidade baixo; CQM= controle de qualidade médio; CQA= controle de qualidade alto

4.4.7. Exatidão

Apresentam-se os cálculos na Tabela 38 a seguir.

Tabela 38 - Exatidão intra e inter-corrida: erros padrão relativos (EPR-%) calculados- Urina

Analito	Exatidão intra-corrida (EPR-%)				Exatidão inter-corrida (EPR-%)			
	LIQ	CQB	CQM	CQA	LIQ	CQB	CQM	CQA
Fenol	18,55	9,79	-3,14	3,16	18,50	9,79	-3,14	1,99
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	-12,96	10,21	-2,65	1,83	-6,93	10,21	-0,32	1,83

LIQ=limite inferior de quantificação; CQB= controle de qualidade baixo; CQM= controle de qualidade médio; CQA= controle de qualidade alto

Os valores obtidos para os parâmetros encontram-se dentro do preconizado pelo guia de validação e é possível inferir que Fenol é, neste caso, o analito para o qual se provê melhor precisão e para o 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol observa-se melhor exatidão, provavelmente devido à sua melhor resolução no cromatograma.

4.4.8. Estabilidade

As Tabelas 39 e 40 sumarizam os resultados obtidos dos testes de estabilidade. Os parâmetros encontram-se dentro do preconizado pela resolução.

Tabela 39 - Ensaios de estabilidade dos analitos na matriz urina, em termos de desvio da concentração nominal (%)

Analito	Ensaio de estabilidade- Desvio da concentração nominal (%)							
	Longa duração (6 meses)		Curta duração (18h)		Pós-processamento (18h)		Ciclo de descongelamento (3 ciclos)	
	CQB	**CQA**	**CQB**	**CQA**	**CQB**	**CQA**	**CQB**	**CQA**
Fenol	8,50	6,70	1,08	0,89	5,98	5,74	5,30	5,55
2,6-Dimetil-octen-2-ol	9,04	7,42	1,98	1,02	6,54	5,91	9,11	8,84

Tabela 40 - Ensaio de estabilidade dos analitos em solução, em termos de desvio quanto à resposta analítica (%)

Composto	Desvio quanto à resposta (%)	
	Solução primária	**Solução de trabalho**
Fenol	5,01	7,41
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	4,12	5,98
Heptanol (PI)	2,03	3,01

Para a urina, a estabilidade de longa e curta duração foi maior, se comparado ao suor. Indícios apontam que a urina é mais estável que o suor a temperatura ambiente também. Isso pode estar relacionada à composição da urina, com a qual estes analitos parecem possuir maior “solubilidade”. Para a urina também se observa efetiva queda nas repostas dos analitos após o processamento, sugerindo que o pH mais básico que o normal (pH PBS= 6,8, pH médio das urinas= entre 5 e 6) e o aumento da força iônica (pela adição do sal), contribuem para diminuição da estabilidade dos analitos na amostra, provavelmente por aumentarem, de certa forma, sua volatilidade.

4.5. Eficiência da interrupção da atividade da enzima/ Estabilidade pós-processamento com enzima

Para estes experimentos verificou-se baixa alteração nas respostas obtidas, podendo extrair-se que a enzima interrompe a sua atividade assim que removida do bloco a 37°C e pela adição do sal, não contribuindo efetivamente, portanto, para variações observadas nos analitos ao longo do tempo. Para o Fenol o desvio obtido

foi de 1,20 %; 1,8% e 0,97%, para a primeira, segunda e terceira amostras, respectivamente; para o 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol, foram de 1,51%, 1,87% e 1,42%. Valores que, se observados, podem ser equiparados aos resultados obtidos para a estabilidade de curta duração. A Figura 48 ilustra exemplo de cromatograma de uma das amostras (positivas) para o antes e depois do procedimento.

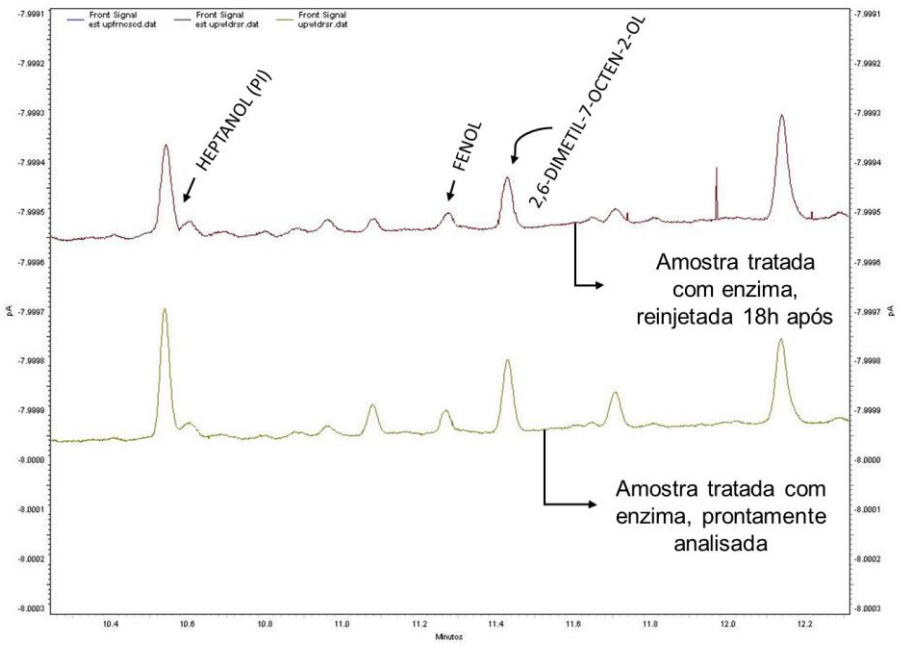


Figura 48 - Urina positiva hidrolisada e analisada *vs.* reinjetada 18h após

4.6. Considerações

A ANVISA também estabelece a determinação do CQD (controle de qualidade de diluição), no entanto, devido à técnica empregada para extração e introdução de amostra dos voláteis, não foi possível incorporar um meio de diluição apropriado, que oferecesse resposta linear.

No geral, a confirmação dos potenciais marcadores e sua subsequente determinação nas amostras empregando um método analítico validado, não é uma prática comum na linha de pesquisa associada. Há o foco em se detectar os padrões distintos de VOCs entre os grupos de amostras através da avaliação de diferenças nas respostas por meio de ferramentas estatísticas, sobretudo, análise de

componentes principais (PCA), isso porque o perfil de voláteis obtido pode ser um dado muito complexo para se racionalizar isoladamente, especialmente se a técnica empregada é muito sensível.

Considerando-se a abordagem de quantificação com um método certificado de alguns parâmetros, muito embora a metodologia e matriz empregados no presente estudo sejam diferentes, alguns paralelos podem tentar ser traçados. FUCHS et al. (2010) dosaram aldeídos (C1-C10) pré-selecionados como possíveis marcadores associados ao câncer de pulmão, em ar exalado. A mistura de padrões era solubilizada em nitrogênio para os experimentos de validação e os analitos derivatizados em conjunto com o passo de HS-SPME (*on fiber derivatization*). Os limites de detecção obtidos variaram de 96 pptV (partes por trilhão, por volume) a 5,1 ppbV (partes por bilhão, por volume). Em método e contexto similar, Poli et al., 2010 verificaram n-aldeídos, obtendo limite de quantificação de 3 pM (10^{-12} mols), Exatidão 93-97% e precisão intra e inter-corrida variando 7,2 a 15,10%; A estabilidade verificada foi de 10 dias para os analitos adsorvidos em fibra e 17h para armazenamento no cartucho adsorvente, a 4°C, mas a variação de 20% foi parâmetro. As concentrações nas amostras positivas variaram de 12,9 a 59,3 pM. Rudnicka et al. (2011), analisando ar exalado de pacientes com câncer de pulmão empregando HS-SPME/GC-TOF-MS, obtiveram limites de quantificação de 0,94 a 2,25 ppb, para marcadores de diversas classes químicas. As concentrações dos marcadores em amostras positivas variaram de 0,31 a 423,60 ppb. Li et al., (2014), em relação à presença do câncer de mama, também verificaram aldeídos no ar exalado. Obtiveram limites de 2,49 a 3,75 ppbv, porém também avaliaram a exatidão (93-108%) e precisão intra e inter-corrida (2,81 a 4,67%), os analitos apresentaram-se em concentrações entre 22,52 a 47,27 ppbV. Assumindo-se a de escala ppb comparável a ng, os métodos anteriormente citados são mais sensíveis ou consideravelmente similares, e o LIQ aqui atingido, de 1 ng para grande parte dos analitos investigados, pode estar então adequado ao propósito, contudo, é difícil fazer a quantificação no suor em termos de volume, no presente trabalho isto não foi possível e é uma limitação da metodologia. Há, contudo, a interessante sugestão da determinação do volume do

suor no *patch* através da dosagem de sódio (APPENZELLER et al., 2007), que pode ser um prospecto para pesquisas futuras com o suor.

Existe ainda uma ausência de estudos quantitativos validados em um aspecto analítico. Também não foram identificados trabalhos baseados em guias de validação, que apresentem informação de estabilidade, efeito matriz, entre outros.

5. CONCLUSÕES

Embora necessária a aplicação de uma série de adaptações para realização dos ensaios pertinentes à validação seguindo-se a resolução ANVISA (27/2012), os métodos se apresentaram adequados quanto a todos os parâmetros propostos.

Limites de detecção e quantificação baixos foram obtidos, se consideradas as limitações das técnicas envolvidas, que são simples e muito comumente empregadas em análise de rotina (*Headspace* estático e GC-FID). Mesmo estes sendo compostos voláteis, a estabilidade sob as condições testadas foram razoáveis, o que provavelmente é devido ao protocolo de armazenagem de amostras e a inexistência de múltiplos passos de processamento/manipulação destas últimas. Ainda, deve-se considerar a afinidade pelo suporte demonstrada pelos ensaios do efeito matriz- embora este fator seja um limitante em termos de recuperação dos analitos, aparentemente contribui para estabilização dos voláteis na amostra coletada. O suor é uma amostra de baixa complexidade, o que também é favorável em termos da obtenção de parâmetros de qualidade analítica.

Os dados ainda sugerem que embora os padrões internos empregados não tenham sido ideais, serviram ao objetivo proposto e a atribuição destes de acordo com a classe química foi importante, pois esta é uma variável que interfere extensamente na partição de um composto.

A detectabilidade provida pelo equipamento foi satisfatória, foram obtidos picos com boa resolução e a injeção de grande número de amostras de fase gasosa contendo alto percentual de água não acarretou em danos no sistema, como teria ocorrido se uma coluna mais apolar fosse utilizada, ou, ainda mais, se o espectrômetro de massas fosse empregado para detecção.

Embora a estabilidade de longa duração seja um fator determinante e que não possa ter sido avaliada para o mesmo período o qual as amostras encontraram-se armazenadas, existem fortes indícios que a determinação destes marcadores possa ser feita de forma apropriada e que os resultados obtidos serão fundamentados e poderão refletir em uma avaliação confiável do contexto estudado.

CAPÍTULO V- DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES NAS AMOSTRAS E ASSOCIAÇÕES ENTRE VOCs E O CÂNCER

1. INTRODUÇÃO

Como já comentado, os mecanismos de formação de compostos orgânicos voláteis específicos relacionados ao câncer são desconhecidos, dificultando apontar qual via bioquímica estaria associada. Nesta seção pretende-se aprofundar acerca dos principais mecanismos de alterações metabólicas que demonstraram estar vinculados ao câncer e à formação dos VOCs, em particular, aqueles indicados por este estudo como potenciais biomarcadores da doença.

1.1. Estresse oxidativo

A concentração de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS) é reportada como elevada em tumores.

Estas espécies estariam relacionadas aos estágios promotores de tumor:

- Na iniciação: por serem reativas, podem causar danos às biomoléculas como o DNA e assim propiciar a perpetuação de mutações;

- Na promoção: em que as ROS atuam como transdutores moleculares de sinais em vias relacionadas à proliferação celular

- Na propagação: atuando na viabilização da metástase e angiogênese (WARIS; AHSAN, 2006, LIOU; STORZ, 2010).

O estresse oxidativo também favorece o ataque de ácidos graxos presentes nas membranas celulares, no processo de peroxidação lipídica. A Figura 49 representa a ideia geral deste mecanismo.

Este mecanismo ocorre com o ataque no ácido graxo de uma espécie reativa capaz de abstrair um átomo de hidrogênio a partir do grupo metileno, levando a formação de um radical de carbono. Esse radical será estabilizado por um rearranjo molecular, que forma um dieno conjugado (duas duplas ligações intercaladas com uma ligação simples). O dieno, que é um radical alquila, em meios aeróbicos reage com o oxigênio formando o radical peroxil (ROO•). O radical peróxido por sua vez pode reagir com outro ácido graxo e ser reduzido pelos metais de transição, ou então se rearranjar e se estabilizar por meio de cisões, o que origina espécies como aldeídos de cadeias lineares variadas, etano e pentano (estes dois últimos sendo produtos majoritários da peroxidação dos ácidos graxos ômega 3 e 6), outros alcanos, e

malonaldeído – já muito investigado como marcador do estresse oxidativo (MIEKISCH; SCHUBERT; NOELDGE-SCHOMBURG, 2004). Variações na estabilização do radical alcoxil (RO•) podem levar a diferentes produtos.

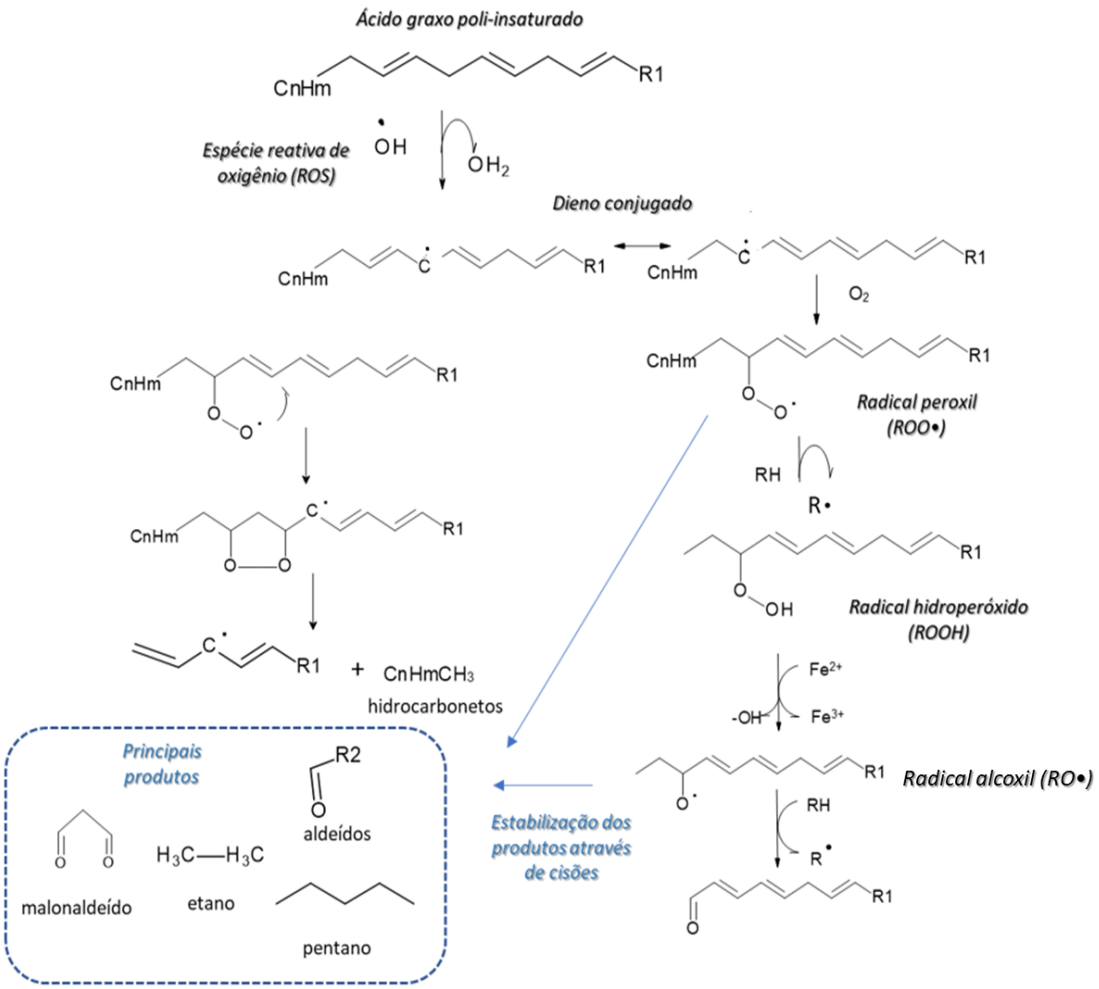


Figura 49- Esquema proposto para processo de peroxidação oxidativa. Adaptado de Miekisch, Schubert e Noeldge-Schomburg (2004).

Sendo assim, os alcanos e aldeídos podem ser produtos da lipoperoxidação acarretada pelo estresse oxidativo atrelado ao processo de carcinogênese pela concentração elevada de espécies reativas (MIEKISCH et *al.,* 2004; HAKIM et *al.,* 2012).

1.2. Alterações na atividade enzimática

Outra condição observada em tumores são alterações na atividade da Citocromo P450, família de enzimas encarregada por reações oxidativas dos compostos orgânicos no organismo. Isto ocorre por indução de sua atividade, ou pela expressão aumentada das formas individuais do complexo enzimático, observadas para alguns tumores. A Citocromo P450 seria a responsável por oxidar alcanos a álcoois. Fatores como este, alterados no tumor, podem estar relacionados à aceleração do metabolismo de produtos do estresse oxidativo, modificando, portanto, a abundância destes produtos nas amostras biológicas (HAKIM et *al.,* 2012).

A álcool desidrogenase (ADH) é responsável pela metabolização de álcool a aldeído. A enzima encarregada de oxidar o aldeído é a aldeído desidrogenase (ALDH). A atividade destas classes de enzimas se mostra estatisticamente superior em diversos tumores quando comparada com tecidos normais, com ADH possuindo a atividade ainda mais pronunciada, indicando até mesmo um acúmulo de aldeídos no meio tumoral (JELSKI; SZMITOWSKI, 2008; JELSKI et al., 2011). Além disso estuda-se que o NADH (co-enzima reduzida) produzido pela ação da ALDH talvez funcione de forma específica para produção do ATP, a fim de se gerar energia para as células cancerosas (KANG et al., 2016).

1.3. Efeito Warburg

Como discutido anteriormente, o efeito Warburg se caracteriza pela presença, nas células cancerosas, de altas taxas de glicólise seguido de fermentação lática no citosol, esta observação é relacionada especialmente ao estágio inicial do câncer, em que há uma proliferação bastante rápida das células. Como consequência, o limite de difusão do oxigênio é atingido e este se apresenta com baixa disponibilidade no ambiente celular. Este efeito mostrou-se relacionado à danos nas mitocôndrias (SENYILMAZ; TELEMAN, 2015), condição que também pode refletir em um perfil diferenciado de espécies oxidadas no organismo.

1.4. Alterações na via do mevalonato

A via do mevalonato (VMA) trata-se de uma via metabólica responsável por gerar precursores (isopentenil pirofosfato- IPP e dimetil alil pirofosfato- DMAP) que são

redirecionados para produção de esteróis e isoprenoides, os quais possuem importantes funções estruturais na célula. A Figura 50 ilustra a via de forma geral.

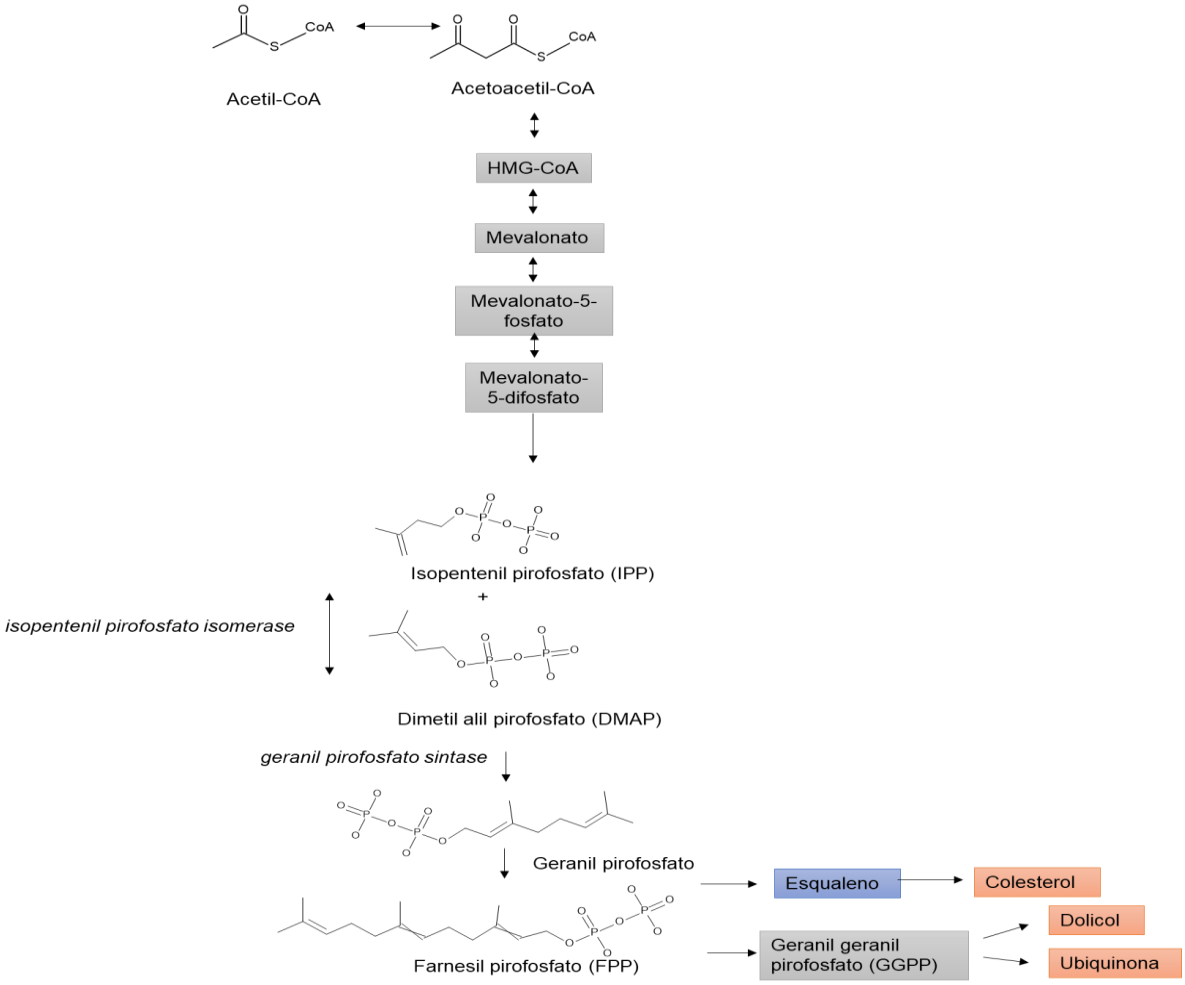


Figura 50- Via do mevalonato. Adaptado de Mullen et al. (2016)

Ao que se indica, durante a carcinogênese, há uma série de sinalizações moleculares que culminam na ativação da transcrição de genes ligados à via do MVA, e este seria um mecanismo de auto-manutenção das células tumorais, a fim de se restabelecer os níveis das moléculas produto desta via, essenciais para o crescimento de novas células e, assim, do tumor (MULLEN et al., 2016). A ativação anormal da via MVA mostrou acarretar um acúmulo de IPP na célula e disfunções nos níveis dos metabólitos intermediários característicos da via (MULLEN, et al., 2016; TAMANOI et al., 2017).

1.5. Expressão gênica individual

Conforme também foi possível se observar experimentalmente, a composição endógena da amostra é resultado da variação inter-individual.

De forma semelhante, aponta-se que uma vez que o crescimento tumoral é acompanhado de mutações genéticas e modificações no funcionamento de proteínas, a expressão gênica individual neste caso poderia contribuir também para criação de uma assinatura específica de compostos orgânicos voláteis secretados nos fluidos biológicos, o que ficou demonstrado em experimentos na literatura. Aksenov et *al*. (2012) avaliaram uma linhagem de células humanas com diferença de um alelo, que vieram a fornecer perfis de VOCs diferentes aos anteriormente observados. Barash et *al.* (2015), de forma aplicada, compararam perfis de VOCs para ar exalado de voluntárias com câncer e, baseando-se na assinatura "volatilômica" obtida, pôde distinguir entre os subtipos celulares do câncer de mama.

2. OBJETIVOS

- Aplicar o método HS-GC-FID às amostras coletadas dos voluntários;
- Verificar capacidade discriminadora dos marcadores e estabelecer valores de *cut-off*;
- Traçar correlações entre os biomarcadores observados e aspectos do câncer.

3. MÉTODO

3.1. Quantificação dos analitos nas amostras

A análise das amostras também seguiu as resoluções da ANVISA (27/2012). Para quantificação foram utilizadas as curvas de calibração apresentadas no capítulo anterior. Estas foram curvas que possuíam acima de 6 pontos (níveis de calibração), com todos níveis apresentando precisão e exatidão adequada, até 15%, exceto pelo LIQ, em que até 20% de variação para estes parâmetros pode ser admitido. Amostras com concentrações registradas abaixo do LIQ foram reanalisadas (por reinjeção, no caso do suor, uma vez que este não tem como ser aliquotado). Os valores de razão

área do analito/ área do PI foram calculados e substituídos nas respectivas equações da reta.

3.2. Abordagens estatísticas

Os valores de concentração foram avaliados para verificação de correlações com dados associados a estadiamento e localização da neoplasia, empregando-se cálculo do coeficiente de correlação de Spearman (valor rô). Foram admitidas correlações relevantes apenas para valores $p<0,05$.

Curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foram construídas para cada analito para verificar seu poder discriminativo entre o conjunto de amostras. Os *cut-off* foram elegidos pelo máximo valor de sensibilidade+especificidade dada pelo teste.

Análise de componentes principais (PCA) foi realizada assumindo os níveis dos analitos como variáveis, para verificar o potencial de discriminação destes entre positivo e controle e testar se as observações para os marcadores seriam capazes de agrupar as amostras quanto à estadiamento e neoplasia. Nesta seção foram utilizados os *softwares* XLSTAT 2017 e IBM SPSS Statistics versão 24.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Dados e quantificação dos marcadores

Os dados coletados acerca de neoplasia e estadiamento estão dispostos na Tabela 41. Esta apresenta a escala TNM para estadiamento: T= tamanho/invasão do tumor primário, N= linfonodos adjacentes, M= número de metástases; Os índices crescentes variam de 0 a 4 ou X, o qual significa “indeterminado”. É apresentado o ECG (estadiamento clínico geral), que varia de 0 a 4, este último sendo o grau mais severo, referente a tumor localmente avançado ou metástase. O índice P se refere a estadiamento realizado de peça extraída, ou seja, tumor que foi posteriormente removido e classificado. Nas neoplasias de próstata a escala Gleason é utilizada, cada fator que compõe o *score* se refere ao grau de diferenciação observado nas células, baseando-se em um primeiro e um segundo padrão predominante observado no tecido. O *score* final pode ser obtido da soma dos s*cores* atribuídos anteriormente e varia de 2 a 10, com maiores valores indicando tumores mais agressivos.

Tabela 41 - Dados dos voluntários, acerca de neoplasia e estadiamento

Informações de neoplasia e estadiamento dos voluntários (SP= suor positivo; UP= urina positiva; CEC=Carcinoma de células escamosas, *IND*= informação indisponível)						**[Continua...]**
Voluntário/Amostra		**Neoplasia**	**Estadiamento**			**Observações**
Suor	**Urina**		**Estadiamento clínico geral**	**Detalhamento**	**Gleason (Próstata)**	
1 SP	**-**	Adenocarcinoma de pulmão	**4**	CT1BCN0CM1		Metástase óssea
2 SP	**-**	Adenocarcinoma de vias biliares, metastático	**4**	TXNXM1		Metástase: fígado, pulmão
3 SP	**-**	CEC de esôfago (operado)	**2**			
4 SP	**-**	CEC de boca, com invasão da língua (operado)	**4**	PT4APN2CM0		
5 SP	**-**	Adenocarcinoma de pâncreas, metastático	**4**			
6 SP	**-**	Adenocarcinoma de pulmão	*IND*			
7 SP	**-**	Adenocarcinoma gástrico, metastático	**4**			
8 SP	**-**	Linfoma	*IND*			
9 SP	**-**	Adenocarcinoma de pulmão	*IND*			
10 SP	**-**	Adenocarcinoma gástrico	**1**	PT2N0M0		
11 SP	**-**	CEC de boca	**2**			

Informações de neoplasia e estadiamento dos voluntários **[Continuação]**
(SP= suor positivo; UP= urina positiva;
CEC=Carcinoma de células escamosas; *IND*= informação indisponível)

Voluntário/Amostra		Neoplasia	Estadiamento			Observações
Suor	**Urina**		**Estadiamento clínico geral**	**Detalhamento**	**Gleason (Próstata)**	
12 SP	**-**	Adenocarcinoma gástrico	**1**			
13 SP	***15 UP***	Adenocarcinoma de cólon do reto, metastático	**4**			Metástase: ovário, ometo, pulmão
14 SP	***2 UP***	Próstata	*IND*		G4+4	
15 SP	***21 UP***	CEC de esôfago, lesão suspeita no rim	**2**			
16 SP	**-**	Próstata	**2**	PT2C	G4+3	Metastático: fígado
17 SP	**-**	Adenocarcinoma gástrico, metastático	**4**			
18 SP	**-**	CEC de esôfago, metástatico	**4**	CT4CNXCM1		Metástase: pâncreas
19 SP	***5 UP***	Próstata	*IND*		G4+3	
20 SP	***17 UP***	Próstata	**2**	PT2C	G3+4	
21 SP	***13 UP***	Próstata	*IND*		G5+4	
22 SP	**-**	Próstata	**2**	PT2C	G4+3	

Informações de neoplasia e estadiamento dos voluntários **[Continuação]**
(SP= suor positivo; UP= urina positiva;
CEC=Carcinoma de células escamosas; *IND*= informação indisponível)

Voluntário/Amostra		Neoplasia	Estadiamento			Observações
Suor	**Urina**		**Estadiamento clínico geral**	**Detalhamento**	**Gleason (Próstata)**	
23 SP	***6 UP***	Rim	**1**	T1B		
24 SP	***11 UP***	Rim, próstata	*IND*		G5+5	
25 SP	***3 UP***	Rim	*IND*			
26 SP	***20 UP***	Rim	**1**	PT1B		
27 SP	***25 UP***	Próstata	**2**	PT2C	G3+3	
28 SP	***27 UP***	Próstata	**3**	PT3B	G4+3	
29 SP	***22 UP***	Próstata	*IND*		G7	
30 SP	**-**	Adenocarcinoma gástrico	**3**	T3N0		
31 SP	***1 UP***	Próstata	**2**	PT2C	G4+3	
32 SP	**-**	Adenocarcinoma gástrico, metastático	**4**	TXNXM1		
-	***4 UP***	Próstata	*IND*		G3+4	
-	***7 UP***	Próstata	**2**	PT2N0		

Informações de neoplasia e estadiamento dos voluntários **[Conclusão]**
(SP= suor positivo; UP= urina positiva;
CEC=Carcinoma de células escamosas; *IND*= informação indisponível)

Voluntário/Amostra		Neoplasia	Estadiamento			Observações
Suor	**Urina**		**Estadiamento clínico geral**	**Detalhamento**	**Gleason (Próstata)**	
-	***8 UP***	Próstata	*IND*		G4+3	
-	***9 UP***	Bexiga	**1**	PT1		
-	***10 UP***	Próstata	*IND*		G3+3	
-	***12 UP***	Próstata	*IND*		G3+3	
-	***14 UP***	Próstata	*IND*		G3+3	
-	***16 UP***	Rim	**1**	T1B		
-	***18 UP***	Rim	*IND*			
-	***19 UP***	Próstata				
-	***23 UP***	Rim, próstata	*IND*			
	24 UP	CEC de amídala, Rim	**4**	T1N2MX		
	26 UP	Próstata	*IND*		G3+4	
	28 UP	Próstata	*IND*			

Exemplos de cromatogramas obtidos para ambos grupos de amostras, para ambas matrizes são mostrados nas Figuras 51 e 52. Os quadros de dados de quantificação, para amostras positivas e controle, apresentam-se na Tabela 42, para o suor, e Tabela 43, para a urina.

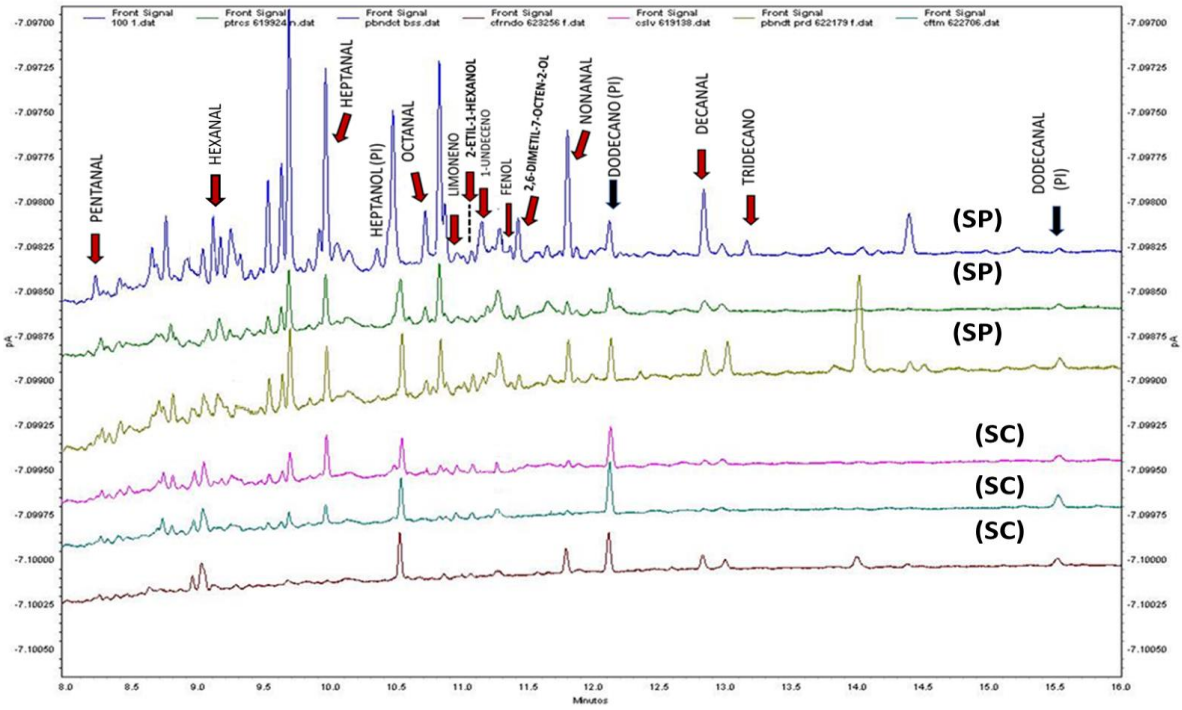


Figura 51- Cromatogramas sobrepostos para amostras, positivas (SP) e controle (SC), no suor

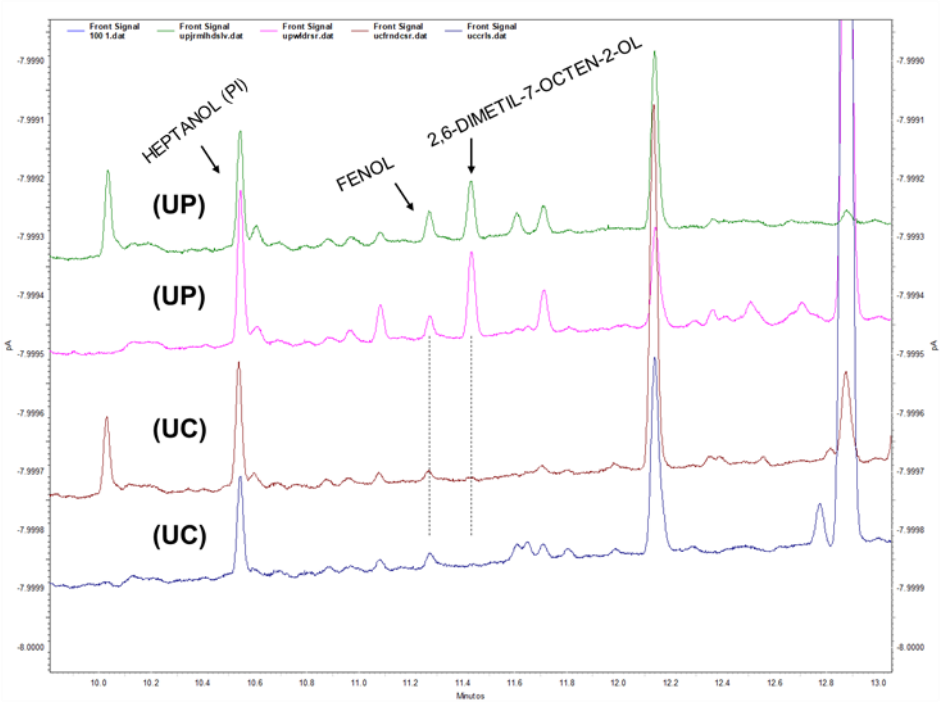


Figura 52- Cromatogramas sobrepostos para amostras, positivas (UP) e controle (UC), na urina

Tabela 42- Dados de quantificação dos marcadores- Suor

Dados de quantificação dos marcadores- Suor **[Continua...]**

(SC = suor controle; SP = suor positivo; <LIQ= abaixo do limite de quantificação; ND= não-detectado)
PNTL=pentanal; HXNL=hexanal; HPTL=heptanal; OCTL=octanal; LIM=limoneno; 2E1H=2-etil-1-hexanol; UND=1-undeceno; DMOL=2,6-dimetil-7-octen-2-ol; NONL=nonanal; DCL=decanal; TRID=tridecano

"Ausência" | **Menor concentração** | **Ponto médio** | **Maior concentração**

Voluntário	PNTL	HXNL	HPTL	OCTL	LIM	2E1H	UND	Fenol	DMOL	NONL	DCL	TRID
	(ng/adesivo)											
1 SC	1,33	ND	6,78	ND	2,02	ND	<LIQ	ND	ND	ND	ND	ND
2 SC	ND	ND	5,42	4,69	2,70	ND	1,51	ND	ND	13,34	12,91	ND
3 SC	5,07	2,31	ND	ND	ND	ND	<LIQ	ND	ND	24,99	14,09	ND
4 SC	3,34	ND	ND	ND	7,64	1,04	1,64	11,83	ND	31,99	14,53	ND
5 SC	4,54	6,67	4,84	ND	<LIQ	ND	ND	ND	ND	2,03	ND	ND
6 SC	2,98	<LIQ	9,69	ND	ND	1,15	<LIQ	14,16	ND	7,40	1,20	ND
7 SC	1,95	5,46	2,29	ND	1,55	1,04	ND	ND	ND	14,99	17,56	ND
8 SC	<LIQ	1,76	ND	ND	3,44	ND	2,53	ND	ND	18,76	12,60	ND
9 SC	3,76	ND	10,11	ND	2,30	ND	1,51	ND	ND	18,76	14,08	ND
10 SC	4,31	ND	ND	ND	ND	ND	2,47	12,96	ND	29,65	14,45	<LIQ
11 SC	1,98	ND	1,45	ND	1,00	ND	ND	ND	ND	19,82	ND	ND
12 SC	2,88	7,02	13,56	ND	ND	ND	1,31	ND	ND	25,36	23,72	ND
13 SC	14,68	5,09	ND	ND	3,82	1,15	1,24	ND	ND	8,77	ND	ND
14 SC	4,59	5,64	15,53	ND	1,58	ND	3,19	8,88	1,71	41,62	12,30	ND

Dados de quantificação dos marcadores- Suor **[Continuação]**

(SC = suor controle; SP = suor positivo; <LIQ= abaixo do limite de quantificação; ND= não-detectado)
PNTL=pentanal; HXNL=hexanal; HPTL=heptanal; OCTL=octanal; LIM=limoneno; 2E1H=2-etil-1-hexanol; UND=1-undeceno; DMOL=2,6-dimetil-7-octen-2-ol; NONL=nonanal; DCL=decanal; TRID=tridecano

"Ausência"	Menor concentração	Ponto médio	Maior concentração

Voluntário	PNTL	HXNL	HPTL	OCTL	LIM	2E1H	UND	Fenol	DMOL	NONL	DCL	TRID
	(ng/adesivo)											
15 SC	4,49	ND	2,37	1,81	2,53	ND	<LIQ	<LIQ	ND	7,50	13,83	ND
16 SC	ND	ND	5,56	ND	ND	1,40	ND	13,37	ND	ND	ND	ND
17 SC	2,82	<LIQ	<LIQ	ND	ND	ND	2,20	ND	ND	15,87	5,65	ND
18 SC	3,92	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4,62	ND	ND	ND	ND
19 SC	2,00	7,27	5,93	ND	4,37	1,50	1,11	27,10	1,08	ND	26,65	ND
20 SC	4,97	6,33	2,22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	39,98	14,95	ND
21 SC	1,33	ND	6,78	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22 SC	3,88	ND	5,91	ND	ND	ND	ND	ND	ND	23,53	13,48	ND
23 SC	4,85	ND	5,18	ND	2,25	ND	2,01	7,85	1,18	28,98	11,43	ND
24 SC	4,45	ND	12,78	ND	<LIQ	ND	2,36	4,03	1,69	12,74	14,61	ND
25 SC	3,76	ND	10,11	ND	2,30	ND	1,51	ND	ND	18,76	14,08	ND
26 SC	4,80	ND	9,49	ND	ND	ND	<LIQ	<LIQ	1,02	3,99	3,31	ND
27 SC	3,90	ND	9,35	ND	1,52	ND	2,22	14,94	ND	2,33	8,12	ND
28 SC	4,41	1,83	15,02	ND	1,35	1,48	3,09	<LIQ	1,08	35,44	19,91	ND
29 SC	9,35	1,08	11,07	ND	1,57	ND	4,82	14,07	ND	10,26	<LIQ	ND
30 SC	4,56	ND	4,51	ND	2,69	ND	ND	11,06	ND	ND	ND	ND
31 SC	1,35	2,24	ND	ND	1,24	ND	1,29	ND	ND	15,73	2,41	ND
32 SC	4,96	ND	8,84	ND	7,37	2,01	ND	10,11	ND	3,06	ND	ND
1 SP	8,42	8,95	16,51	20,31	11,13	6,80	6,98	120,96	10,85	47,49	28,32	6,91
2 SP	11,50	68,31	124,61	75,94	7,92	5,43	6,23	148,92	6,33	40,53	31,23	1,44
3 SP	10,93	57,92	73,04	51,88	8,52	4,86	5,60	103,69	3,90	43,12	29,70	0,94
4 SP	17,70	75,89	87,43	62,50	11,12	7,65	7,46	128,60	5,94	68,39	43,58	1,81
5 SP	11,74	65,40	129,49	71,63	6,69	3,92	5,58	103,19	6,55	38,93	28,36	1,45
6 SP	9,26	9,10	18,46	61,09	11,38	6,98	6,96	112,38	10,98	47,96	28,44	7,14
7 SP	12,79	66,46	114,43	90,32	8,63	5,54	11,66	122,27	5,14	132,57	79,96	1,83
8 SP	14,23	8,57	16,73	15,14	9,44	6,00	17,26	48,37	4,54	144,43	97,24	1,07
9 SP	23,62	42,09	131,01	31,72	58,91	20,76	109,15	137,80	30,66	144,57	146,49	5,27
10 SP	10,79	8,61	75,30	56,49	7,39	6,95	7,05	146,73	4,13	115,42	56,13	2,91
11 SP	11,54	47,39	147,75	158,60	8,15	7,48	15,84	142,15	10,22	41,94	34,39	ND
12 SP	8,33	25,57	74,10	53,49	7,35	7,77	6,09	143,91	7,44	39,65	34,01	1,17
13 SP	22,91	9,30	39,22	19,23	18,61	6,19	12,13	136,73	6,71	39,48	25,59	1,90
14 SP	18,16	27,68	104,78	128,15	10,73	6,67	31,22	72,96	6,92	39,46	27,54	1,66
15 SP	10,69	25,52	16,17	45,26	16,83	8,40	6,27	140,92	4,98	146,59	51,23	1,13
16 SP	13,34	7,99	101,34	53,79	7,00	5,92	7,73	99,30	4,74	80,90	30,89	4,99
17 SP	10,84	23,47	55,01	12,36	7,18	5,30	5,64	142,61	5,01	40,46	25,54	1,29
18 SP	10,88	23,82	99,80	61,29	17,53	8,06	15,87	112,07	5,03	138,83	71,46	3,36
19 SP	8,14	18,36	53,82	15,45	7,07	23,69	28,67	54,41	6,18	42,98	29,26	ND
20 SP	9,79	7,42	15,44	15,41	7,93	5,97	5,62	89,43	6,29	40,07	30,13	2,43
21 SP	48,03	62,81	147,49	11,43	9,93	5,38	18,49	133,41	29,56	91,83	51,71	ND
22 SP	11,93	8,18	60,93	34,80	7,08	6,54	5,81	147,32	6,20	41,21	27,76	ND
23 SP	12,21	9,03	85,14	70,27	7,75	7,66	6,76	144,38	6,00	44,58	29,84	1,07
24 SP	8,49	52,27	104,51	134,63	7,85	9,15	5,61	125,16	48,75	40,08	28,35	1,41
25 SP	8,11	28,98	18,21	20,18	7,09	7,66	6,59	45,72	4,66	81,85	83,32	1,22
26 SP	47,72	25,59	148,62	23,19	7,74	5,99	16,26	133,30	15,00	64,38	27,01	1,56
27 SP	8,57	46,23	43,19	54,38	7,44	5,16	6,22	135,02	5,75	39,72	26,33	1,39

Dados de quantificação dos marcadores- Suor **[Conclusão]**

(SC = suor controle; SP = suor positivo; <LIQ= abaixo do limite de quantificação; ND= não-detectado)
PNTL=pentanal; HXNL=hexanal; HPTL=heptanal; OCT=octanal; LIM=limoneno; 2E1H=2-etil-1-hexanol; UND=1-undeceno; DMOL=2,6-dimetil-7-octen-2-ol; NONL=nonanal; DCL=decanal; TRID=tridecano

	"Ausência"		Menor concentração			Ponto médio		Maior concentração				
Voluntário	**PNTL**	**HXNL**	**HPTL**	**OCTL**	**LIM**	**2E1H**	**UND**	**DMOL**	**Fenol**	**NONL**	**DCL**	**TRID**
						(ng/adesivo)						
28 SP	17,71	65,37	30,77	81,22	35,78	27,47	48,82	144,21	5,86	142,10	143,36	7,59
29 SP	7,97	10,97	23,37	11,72	8,65	5,75	5,72	115,79	6,27	45,69	100,42	1,79
30 SP	35,56	20,49	145,97	141,43	10,07	5,86	17,99	137,15	10,54	143,37	78,53	3,13
31 SP	18,23	23,49	141,35	81,70	19,52	10,90	12,07	141,88	5,09	143,25	95,02	2,34
32 SP	57,62	146,17	147,57	138,17	10,29	5,83	53,45	125,55	48,69	124,71	144,56	15,04

Tabela 43- Dados de quantificação dos marcadores- Urina

Dados de quantificação dos marcadores- Urina					
(UC= urina controle; UP= urina positiva; <LIQ= menor que o limite de detecção; ND= não detectado; DMOL= 2,6-dimetil-7-octen-2-ol)					
"Ausência"	Menor concentração		Ponto médio	Maior concentração	
Voluntário	**Fenol**	**DMOL**	**Voluntário**	**Fenol**	**DMOL**
		(ng mL^{-1})			
1 UC	42,73	ND	**1 UP**	64,81	23,61
2 UC	33,31	ND	**2 UP**	58,52	20,99
3 UC	26,73	ND	**3 UP**	369,32	16,03
4 UC	43,15	ND	**4 UP**	172,25	24,78
5 UC	60,77	4,81	**5 UP**	82,83	15,87
6 UC	21,60	4,06	**6 UP**	62,47	33,00
7 UC	34,51	4,69	**7 UP**	100,68	157,55
8 UC	30,52	4,94	**8 UP**	125,55	83,69
9 UC	38,45	4,75	**9 UP**	182,35	20,97
10 UC	40,05	ND	**10 UP**	326,39	26,62
11 UC	48,28	8,71	**11 UP**	83,24	124,69
12 UC	27,47	ND	**12 UP**	247,73	50,55
13 UC	60,14	17,57	**13 UP**	106,30	14,20
14 UC	33,85	4,60	**14 UP**	346,66	90,26
15 UC	26,19	3,12	**15 UP**	346,38	24,18
16 UC	42,72	4,43	**16 UP**	72,80	13,50
17 UC	42,48	2,31	**17 UP**	78,17	23,38
18 UC	42,92	<LIQ	**18 UP**	159,64	46,60
19 UC	36,81	2,88	**19 UP**	341,80	28,06
20 UC	32,00	5,11	**20 UP**	153,33	13,84
21 UC	52,86	4,70	**21 UP**	353,26	13,64
22 UC	43,52	2,34	**22 UP**	77,52	104,45
23 UC	19,97	<LIQ	**23 UP**	54,37	13,79
-	-	-	**24 UP**	86,94	13,38
-	-	-	**25 UP**	68,12	16,71
-	-	-	**26 UP**	88,70	17,25
-	-	-	**27 UP**	267,05	42,57
-	-	-	**28 UP**	56,48	35,65

4.2. Curvas ROC

A curva ROC é uma representação gráfica utilizada para avaliar sistemas diagnósticos, baseada em discriminação binária. Quando considerado um método diagnóstico, se uma observação questionada é positiva e classificada como tal, tem-se um "verdadeiro positivo", de modo que sua classificação incorreta é um "falso

negativo". Estas relações são estendidas gerando os conceitos de "verdadeiro negativo" e "falso positivo" (observação negativa classificada como positiva) (FAWCETT, 2006). A sensibilidade (= acertos positivos/total de positivos) é uma definição relacionada à classificação positiva onde a condição existe. A especificidade (= acertos negativos/ total de negativos) é a definição relacionada à classificação negativa onde a condição é realmente ausente (HAJIAN-TILAKI, 2013).

Em uma situação real, a sensibilidade é priorizada quando se tem testes de *screening*/rastreamento, pois é preferível confirmar-se a condição relacionada com um exame mais específico após do que descartar um caso com chances de portar tal condição. O gráfico representa o plote de valores de corte (*cut-off*) de acordo com os a especificidade e sensibilidade testadas, o *cut-off* eleito para o teste representaria o valor acima do qual a amostra pode ser considerada positiva. A área sob a curva (*area under curve,* AUC) é o meio de se inferir o desempenho do teste, sendo valor igual a 1 indicativo de exatidão (MANDREKAR, 2010), ao menos perante o conjunto de observações analisadas. As curvas ROC adquiridas para os analitos estão demonstradas na Figura 53 e Figura 54, exibindo os valores de AUC quanto às amostras do suor e urina, respectivamente. Na Tabela 44 estão dispostos os valores de *cut-off* obtidos.

Tabela 44- Valores de *cut-off* obtidos para os marcadores

Marcador (S= no suor; U= na urina)	**Valores de *cut-off*** [ng/adesivo] [ng mL^{-1} (U)]	Sensibilidade	Especificidade
Pentanal	5,07	1	0,938
Hexanal	7,27	1	1
Heptanal	15,53	1	0,969
Octanal	4,69	1	1
Limoneno	4,37	1	0,938
2-Etil-1-hexanol	2,01	1	1
1-Undeceno	4,82	1	1
Fenol **(S)**	27,1	1	1
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol **(S)**	1,71	1	1
Nonanal	35,44	1	0,938
Decanal	23,72	1	0,969
Tridecano	0	0,875	1
Fenol **(U)**	52,86	1	0,913
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol **(U)**	8,71	1	0,957

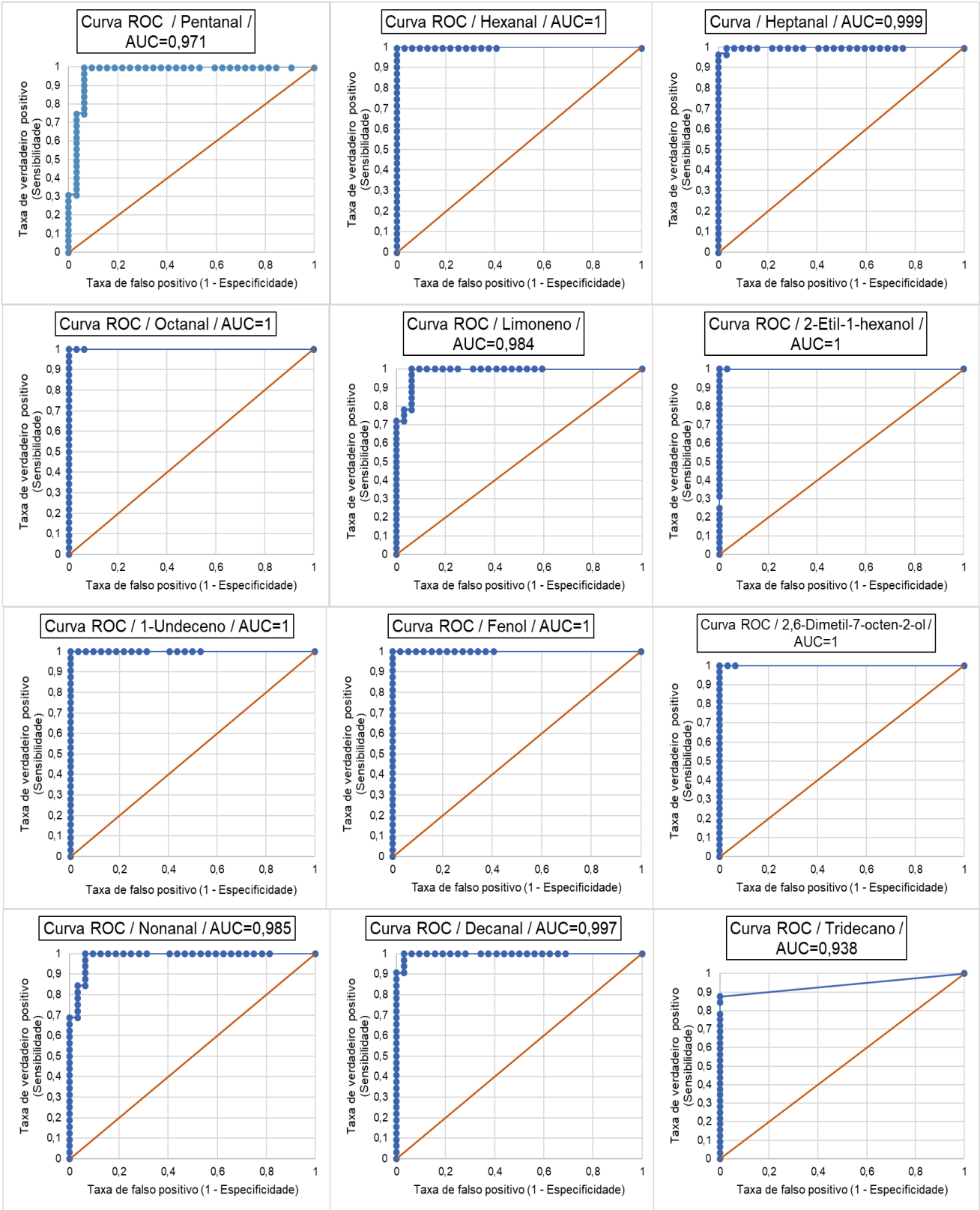


Figura 53- Curvas ROC- marcadores no suor

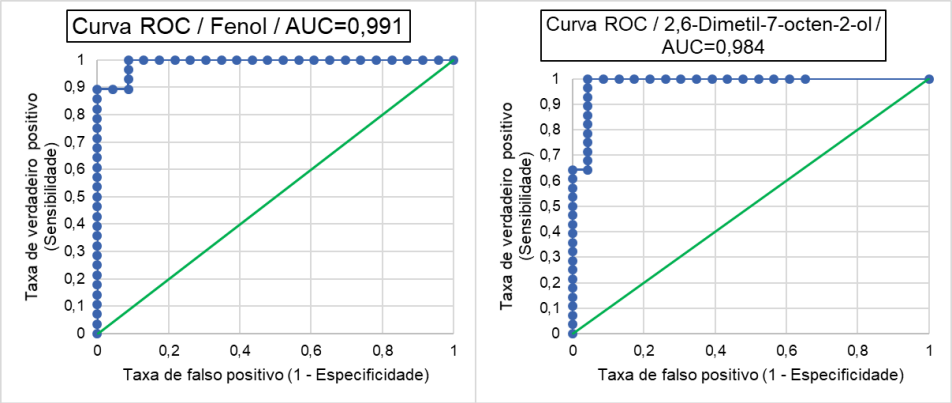


Figura 54- Curvas ROC- marcadores na urina

Para casos em que não existiu intercalação entre valores do grupo controle com o positivo, a curva ROC ofereceu AUC=1, porque se baseia apenas no conjunto de dados oferecidos, o que ocorreu apenas para compostos que anteriormente foram somente detectados nas amostras de indivíduos com câncer. Krilaviciute et al. (2015), reuniram estudos com VOCs em ar exalado neste mesmo contexto, que empregaram a análise da curva ROC. Os valores de *cut-off* variaram de ~1,64 a 23,14 ng L^{-1}, inferiores a semelhantes a este estudo (difícil se estabelecer devido à matriz diferente) e os valores de AUC para biomarcadores foram de 0,672 a 0,960, com sensibilidades e especificidades variando de 63,6 a 93,0 e 87,5 a 92,7 %, respectivamente. Isto indica que o presente método possui qualidades de sensibilidade e especificidade satisfatórias quanto aos demais.

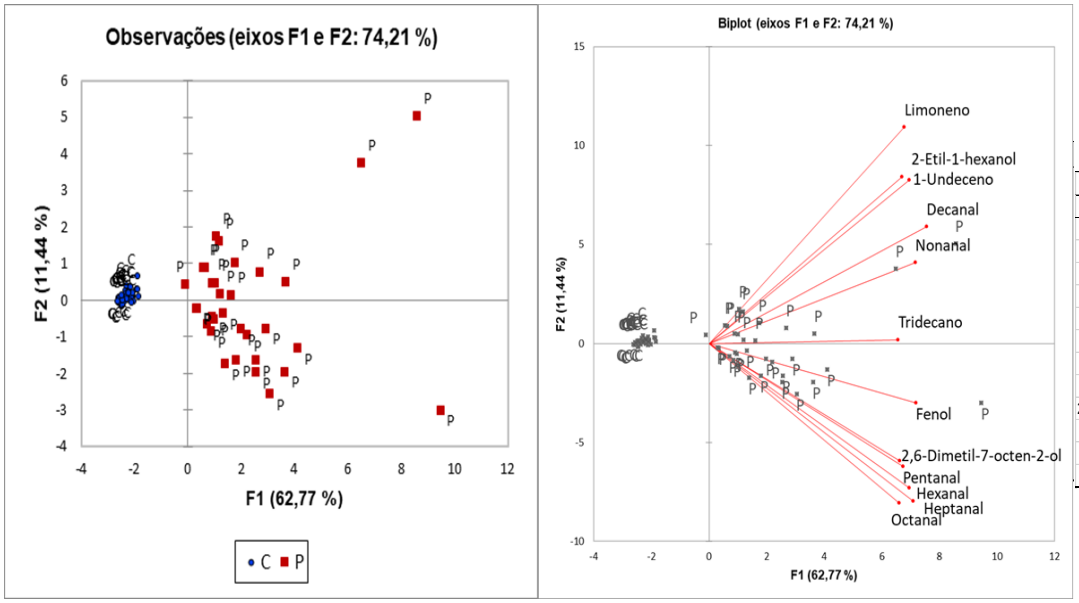
4.3. Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA) é uma metodologia estatística que consiste na redução de variáveis, particularmente importante em análises complexas, em que múltiplos fatores podem contribuir para existência ou não de um padrão.

Para isso, o método matemático consiste na transformação ortogonal das variáveis para criação de um novo sistema de coordenadas, cujos eixos correspondem ao conjunto de variáveis de comportamento mais proeminente no sistema, ou seja, que possuem maiores variâncias, sendo nomeados o primeiro e segundo componente. Com isso, é possível agrupar eventos ou indivíduos de acordo com suas variâncias,

isto é, seu "comportamento" numa população (HONGYU; SANDANIELO; JUNIOR, 2016). Esta aproximação pode servir para verificar correlações no conjunto de dados não passíveis de serem identificadas tradicionalmente.

O resultado da PCA do tipo correlação está ilustrado na Figura 55. Observa-se, como já apontado pelo caráter discriminativo mostrado com a avaliação da curva ROC, que a análise foi capaz de distinguir as características (no caso, o conjunto dos níveis de marcadores) dos voluntários em grupos distintos. Os indivíduos controles puderam ser agrupados de forma eficiente e a razão da distinção é justamente devido a valores associados às variáveis de maiores valores nas amostras positivas. Ainda quanto ao plote das variáveis nos eixos designados, verifica-se quanto às correlações entre estas (quanto menor o ângulo entre as varáveis, mais estão correlacionadas, o mesmo se aplica ao ângulo formado com o eixo): nota-se que os aldeídos menores (C5-C8) mostram-se mais positivamente relacionados, assim como 2-Etil-1-hexanol para com 1-Undeceno, e para Nonanal com Decanal. O comportamento do grupo de marcadores na parte superior do quadrante é mais distinto com relação àqueles no quadrante inferior.



Carregamentos dos fatores		
Variável	**F1**	**F2**
Pentanal	0,772	-0,303
Hexanal	0,797	-0,357
Heptanal	0,812	-0,390
Octanal	0,756	-0,395
Limoneno	0,777	0,534
2-Etil-1-hexanol	0,768	0,412
1-Undeceno	0,796	0,403
Fenol	0,822	-0,146
2,6-Dimetil-7-octen-2-ol	0,759	-0,290
Nonanal	0,822	0,200
Decanal	0,866	0,289
Tridecano	0,752	0,009

Figura 55- Verificação- PCA (C= indivíduo controle; P= indivíduo positivo)

Diversas tentativas (selecionando conjunto diferentes de varáveis e indivíduos) foram feitas no objetivo de se verificar o agrupamento para indivíduos de mesma neoplasia, ou em mesmo estágio clínico, porém, não se obteve sucesso nesta abordagem, apontando que o conjunto de variáveis não tem potencial de realizar esta caracterização tão específica.

4.4. Tentativa de se estabelecer correlações

Foram verificados diversos tipos de relações: entre concentração de cada marcador (do suor e urina), soma de marcadores gerais, soma de marcadores da mesma classe química, com respeito à sítio da neoplasia, estágio clínico e *score* Gleason. Descreve-se as correlações mais relevantes na Tabela 45:

Tabela 45- Correlações observadas

Relação:	***Score* Gleason**		**ECG (Adenocarcinomas)**	**ECG (Adenocarcinomas -Próstata)**
Variável	2,6-Dimetil-7-octen-2-ol **(S)**	Aldeídos C5-C8	2-Etil-1-hexanol	2-Etil-1-hexanol
Coeficiente de correlação (rô)	0,779	0,684	-0,527	-0,710
p =	0,007	0,025	0,027	0,013

*(S)= no suor; ECG= estágio clínico geral

Pode-se inferir que 2-Etil-1-hexanol, portando, estaria associado a mecanismo característico mais prevalente na fase inicial do desenvolvimento do tumor, podendo mesmo ser útil como marcador para diagnóstico precoce em adenocarcinomas. Esta observação ser adquirida apenas para adenocarcinomas demonstra que o 2-Etil-1-hexanol estaria envolvido com algum fator relacionado ao tipo celular, como, por exemplo, a sua composição. Já o 2,6-Dimetil-2-octen-2-ol estaria ligado ao grau de comprometimento nos tumores de próstata. É interessante que este último composto apenas se relacione desta forma quando apenas neoplasias de próstata são avaliadas, em especulação, isso pode ser derivado deste marcador ter como possível fonte a ativação aberrante da via MVA, a qual possui como principal produto o colesterol, que por sua vez é precursor na síntese de hormônios e o câncer de próstata

possui particular relação com a interferência nos receptores andrógenos (TAVERNA; COTE; GRIZZI, 2015).

Os resultados reforçam também que cada tipo específico de neoplasia tem ainda suas relações químicas específicas, decorrentes dos mecanismos particulares envolvidos no seu desenvolvimento.

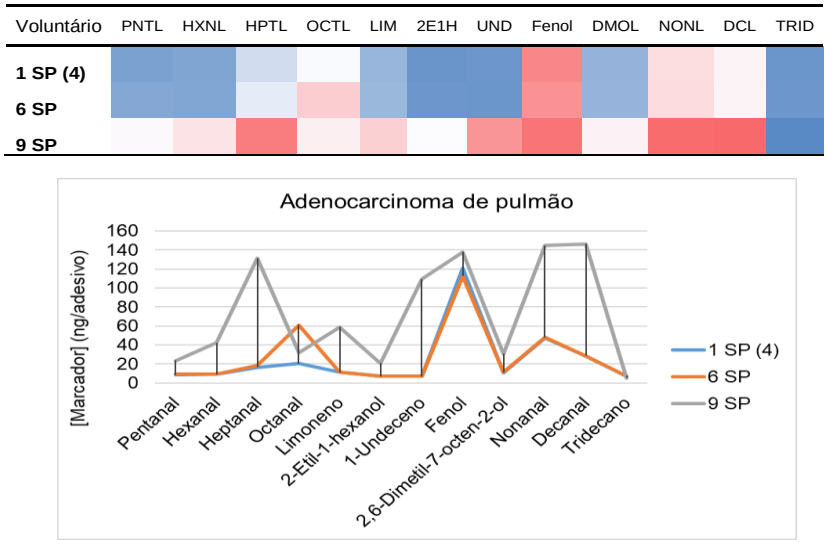
Algumas correlações encontradas foram estatisticamente não-relevantes ($p>0,05$), sobretudo porque o número de amostras para comparação era baixo ($n=5$): o Fenol no suor apresentou coeficiente de 0,707 ($p=0,233$) quando relacionado ao *score* Gleason; o Tridecano apresentou coeficiente de 0,866 ($p=0,133$), para os estágios clínicos nos CECs.

Também foi averiguado se os níveis de Fenol e 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol eram correspondentes nas duas matrizes estudadas, mas o resultado obtido não apontou significância estatística.

Em outra abordagem, procurou-se verificar os perfis de níveis VOCs, de acordo com tipo de neoplasia e informação de estágio do tumor. As Figuras 55, 57, 58, 59, 60 e 61 apresentam dados dispostos nesta forma (novamente, uma escala de cor foi aplicada como “mapa de calor”, variando de forma crescente quanto à concentração, de azul escuro a vermelho, com branco indicando o ponto médio).

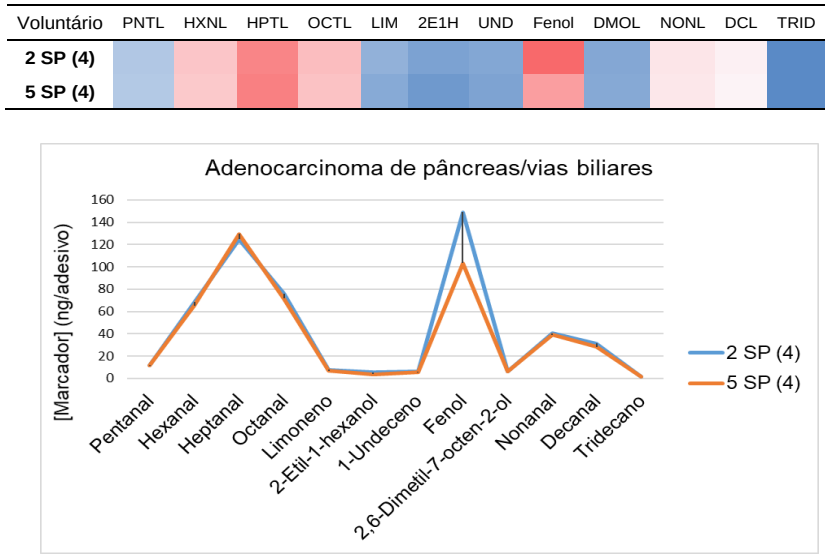
Na Figura 56, a tendência mostrada pela amostra 1, que é estágio 4, denota-se por menor concentração de Octanal, no entanto, diferenças razoáveis não são observadas, o que é dificultado pela ausência da informação de estadiamento a respeito de 6 e 9.

Na Figura 57, as tendências para os perfis nos indivíduos agrupados (ambos estágio 4) parece ser bastante concordantes.



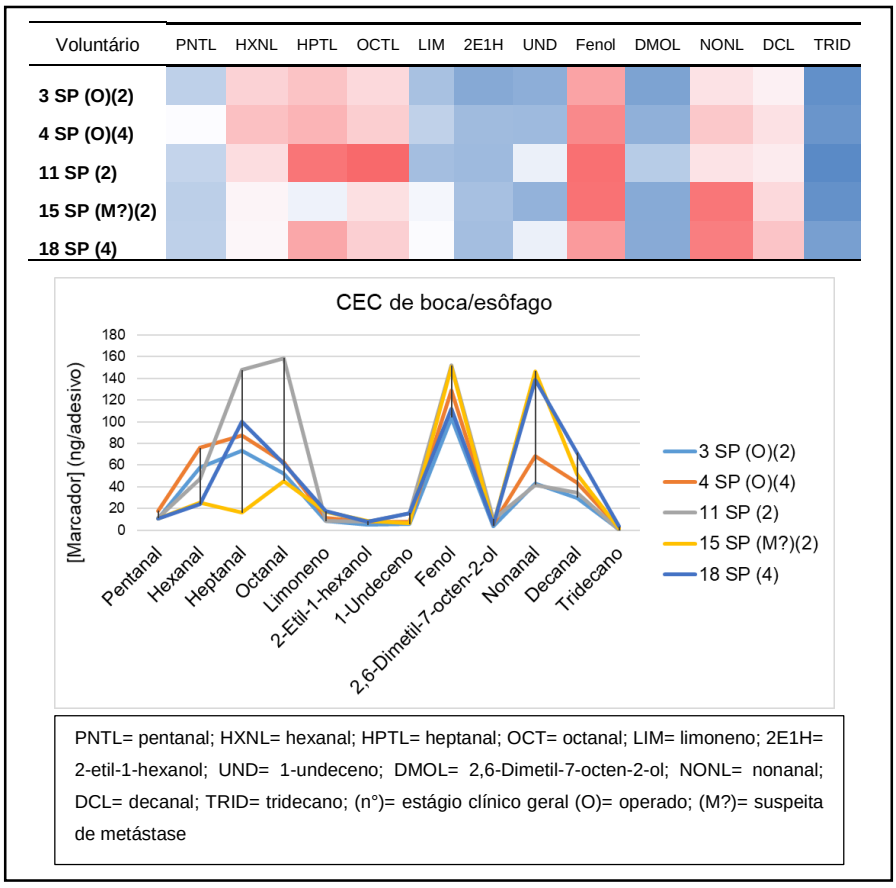
PNTL= pentanal; HXNL= hexanal; HPTL= heptanal; OCT= octanal; LIM= limoneno; 2E1H= 2-etil-1-hexanol; UND= 1-undeceno; DMOL= 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol; NONL= nonanal; DCL= decanal; TRID= tridecano; (n°)= estágio clínico geral

Figura 56- Perfil para adenocarcinoma de pulmão



PNTL= pentanal; HXNL= hexanal; HPTL= heptanal; OCT= octanal; LIM= limoneno; 2E1H= 2-etil-1-hexanol; UND= 1-undeceno; DMOL= 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol; NONL= nonanal; DCL= decanal; TRID= tridecano; (n°)= estágio clínico geral

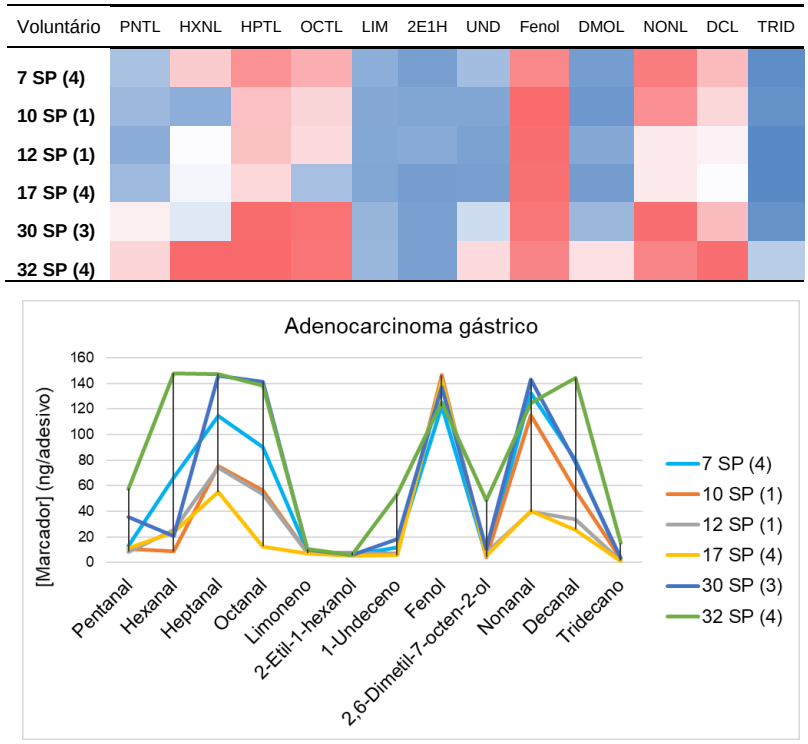
Figura 57- Perfil para adenocarcinoma de pâncreas/vias biliares



PNTL= pentanal; HXNL= hexanal; HPTL= heptanal; OCT= octanal; LIM= limoneno; 2E1H= 2-etil-1-hexanol; UND= 1-undeceno; DMOL= 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol; NONL= nonanal; DCL= decanal; TRID= tridecano; (n°)= estágio clínico geral (O)= operado; (M?)= suspeita de metástase

Figura 58- Perfil para CEC de boca/esôfago

Na Figura 58, as tendências observadas para as amostras dos voluntários 3 e 4, ambos operados, demonstraram ser similares. Para resultados dos voluntários 15 e 18, ambos com câncer metástatico, observa-se um considerável aumento na concentração de Nonanal e Decanal- as concentrações de ambos são similares em ambas amostras. O voluntário 11 está em estágio 2 e apresenta maiores níveis de Heptanal e Octanal que os demais.



PNTL= pentanal; HXNL= hexanal; HPTL= heptanal; OCT= octanal; LIM= limoneno; 2E1H= 2-etil-1-hexanol; UND= 1-undeceno; DMOL= 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol; NONL= nonanal; DCL= decanal; TRID= tridecano; (n°)= estágio clínico geral

Figura 59- Perfil para adenocarcinoma gástrico

Na Figura 59, as tendências dos perfis 10 e 12 são coincidentes, em especial com relação aos níveis dos primeiros aldeídos, ambos estão em estágio 1. Em geral, níveis maiores dos marcadores são observados para 30, que é estágio 3. Para os demais, em estágio 4, padrões de tendências não puderam ser verificados, o que talvez invalide a significância das observações anteriores.

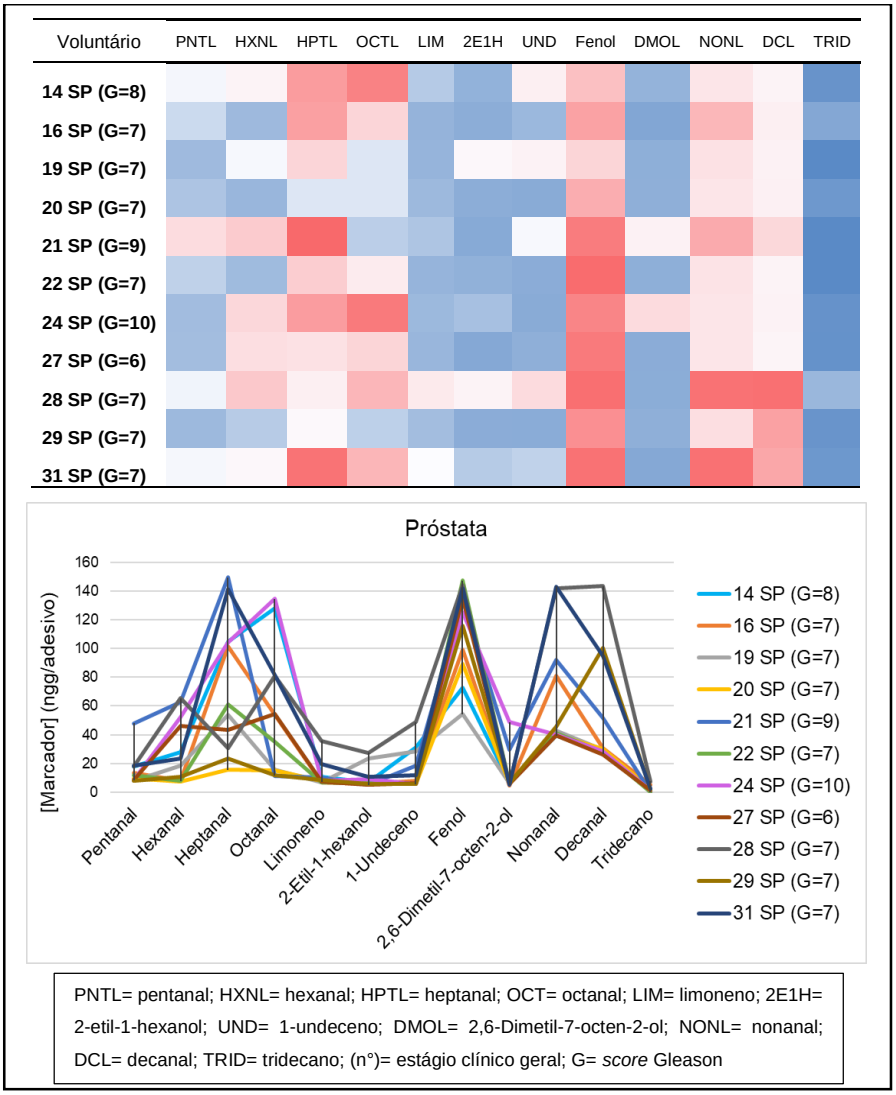
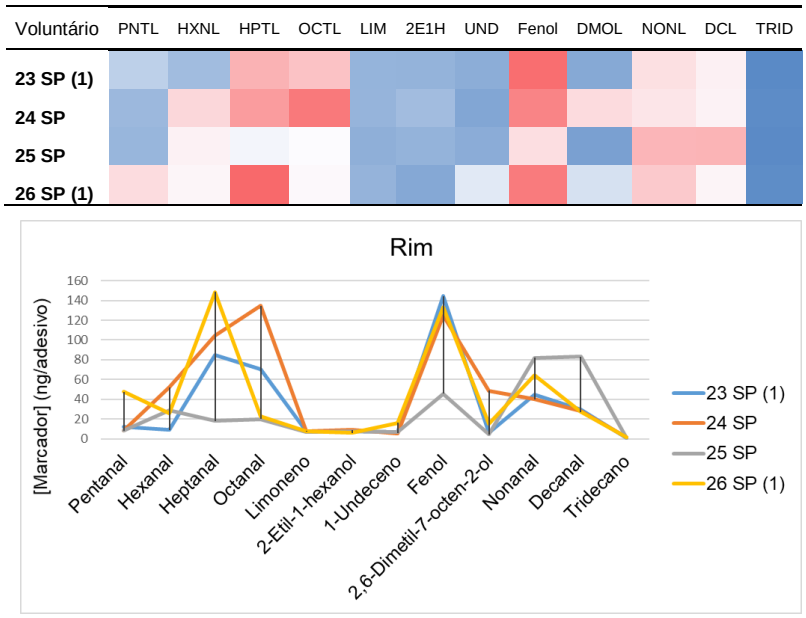


Figura 60- Perfil para adenocarcinoma gástrico

Na Figura 60, as amostras associadas a estágios mais avançados têm como principal característica o nível mais elevado de 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol e de Octanal. No entanto, é difícil racionalizar qualquer tendência.



PNTL= pentanal; HXNL= hexanal; HPTL= heptanal; OCT= octanal; LIM= limoneno; 2E1H= 2-etil-1-hexanol; UND= 1-undeceno; DMOL= 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol; NONL= nonanal; DCL= decanal; TRID= tridecano; (n°)= estágio clínico geral

Figura 61- Perfil para neoplasia de rim

Na Figura 61, há apenas a informação de duas amostras, 23 e 26, que são estágio 1, seus perfis quanto aos níveis de Fenol, 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol, Nonanal e Decanal são bastantes concordantes. As amostras 24 (também portador de câncer de próstata) e 25 são bem diversas das duas primeiras e entre si, a ausência de melhores detalhes para caracterização destas amostras dificultam racionalizar suas tendências quanto aos níveis de marcadores.

Quanto ao processo de traçar correlações entre neoplasias, graus do tumor e respostas dos marcadores é necessário enfatizar que observações ideais não puderam ser realizadas por uma série de fatores a se considerar nesta pesquisa:

- Influência pela presença de comorbidades e doenças crônicas até mesmo não reportadas;

- Influência da ausência de informações de estadiamento para vários voluntários;

- Influência do tipo celular específico e estágio detalhado do tumor (informação aqui não disponível), entre outros fatores que podem alterar a composição do

microambiente do tumor e que estão relacionados ao desenvolvimento das células envolvidas e assim e refletindo no seu atual quadro metabólico.
- Variabilidade quanto à atribuição do estágio clínico, dependente do tipo de câncer.

4.5. Possíveis relações entre alterações metabólicas e formação dos marcadores propostos

A pesquisa de Kakuta et al. (2013), de promoção da peroxidação lipídica *in vitro*, partindo-se de componentes da membrana celular, permitiu a detecção de muitos metabólitos voláteis, incluindo os aldeídos aqui reportados e o 2-Etil-1-hexanol. Isto leva a crer que, além das suposições sobre a fonte destes compostos ser o estresse oxidativo acentuado, dados experimentais corroboram isto. No experimento, Pentanal e Hexanal surgiram como associados à oxidação das porções de ácido linoleico e araquidônico; Heptanal e Nonanal, à porção do ácido oleico e araquidônico e Octanal exclusivamente ligado à oxidação da cadeia do ácido oleico, assim como o 2-Etil-1-hexanol.

Além destes fatores, deve ser considerar diferenças nos conteúdos de ácidos graxos para células tumorais. Fermor et al. (1992) e Meng et al. (1999) estudaram a composição em termos de ácidos graxos de linhagens de células cancerosas e células normais. Foram verificadas diferenças, de maneira que, para o segundo estudo, assim como no primeiro, apontou-se menor conteúdos de ácido graxos saturados de cadeias longa- sugerindo uma membrana mais fluida e talvez mais apropriada ao metabolismo muito ativo das células malignas; menor percentual total de ácidos graxos poli-insaturados para células malignas, mas uma maior concentração de 20:2 n-6 (sugerida como sendo consequência da ação de enzima elongase- catalisadora de extensões de cadeias carbônicas).

O 1-Undeceno também pode ser apontado como proveniente das reações da lipoperoxidação, no entanto é também metabólito característico da ação de bactérias, sobretudo *Pseudomonas,* ubíqua e parte do microbioma humano. Originalmente já associado à via de metabolização dos ácidos graxos nos microorganismos, demonstrou-se ainda que as bactérias possuem uma família de oxidases especializadas em converter ácidos graxos em respectivas olefinas, desta maneira, 1-

undeceno mostrou-se como metabólito primário do ácido láurico (12) (RUI et al., 2014)), o qual juntamente com o ácido palmítico (C16) desempenha funções na condutividade da bicamada fosfolipídica (TSOFINA; MOKHOVA, 1998) e, como apontado pelos estudos citados anteriormente, são ácido saturados de cadeia curta a média e estão em maior concentração nas células cancerosas quando em comparação com as normais. Tais ácidos graxos podem ser liberados na degradação da membrana ou mesmo serem outros subprodutos não-voláteis da lipoperoxidação.

Quanto ao Tridecano pode ser razoável admitir que esteja relacionado também com a lipoperoxidação, proveniente de uma cisão e associação específicas, favorecidas no ambiente tumoral. Alguns mecanismos propostos para a formação dos potenciais marcadores encontram-se nas Figuras 62, 63, 64, 65 e 66.

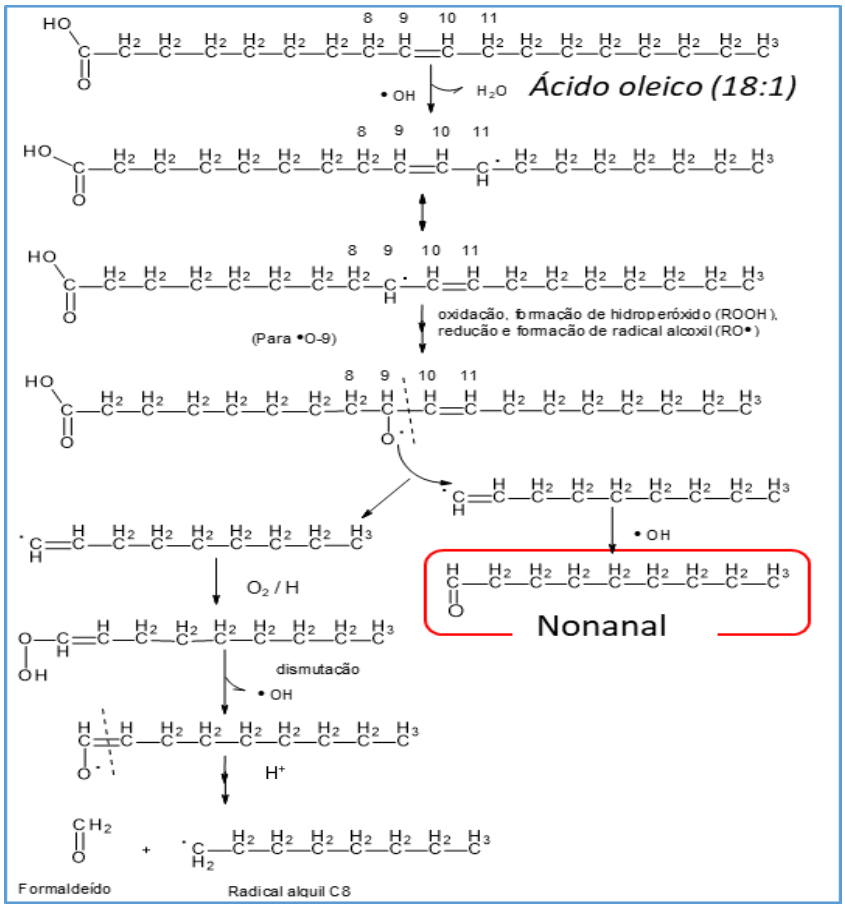


Figura 62- Possível mecanismo de formação do Nonanal, através da peroxidação lipídica. Adaptado de Frankel (1980), Miekisch, Schubert e Noeldge-Schomburg (2004) e SCHAICH et al. (2013).

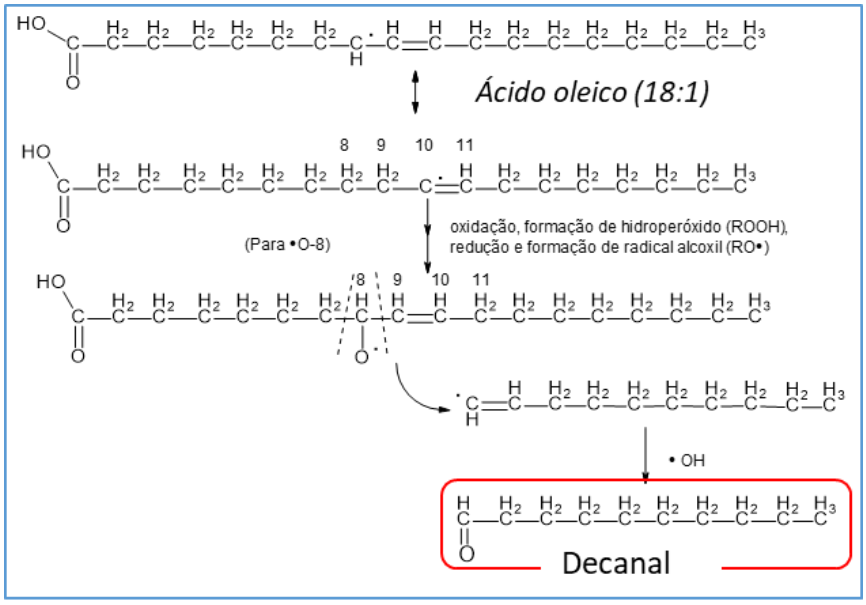


Figura 63- Possível mecanismo de formação do Decanal, através da peroxidação lipídica. Adaptado de Frankel (1980), Miekisch, Schubert e Noeldge-Schomburg (2004) e SCHAICH et al. (2013).

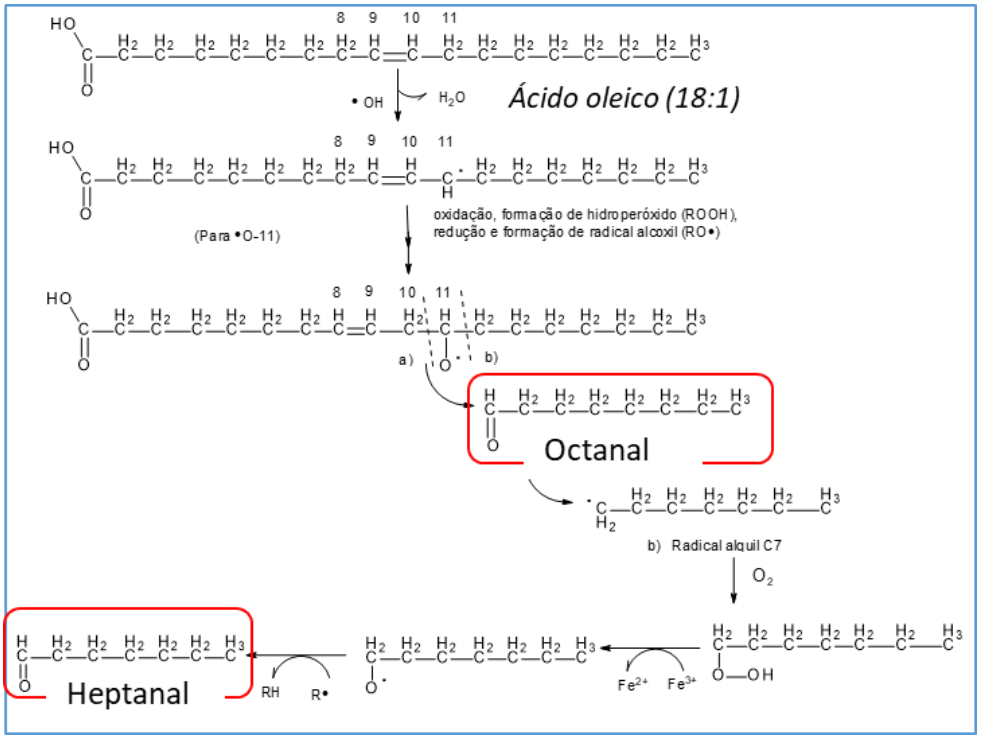


Figura 64- Possível mecanismo de formação do Octanal e Heptanal, através da peroxidação lipídica. Adaptado de Frankel (1980), Miekisch, Schubert e Noeldge-Schomburg (2004) e SCHAICH et al. (2013).

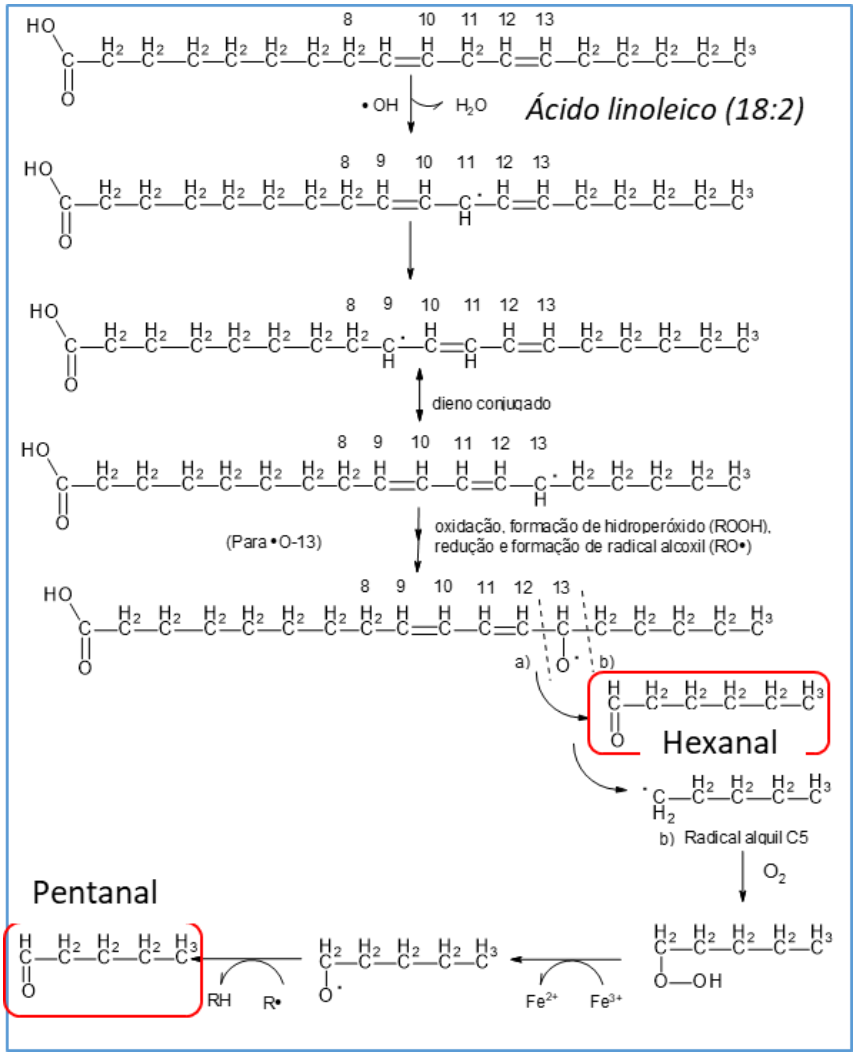


Figura 65- Possível mecanismo de formação do Hexanal e Pentanal, através da peroxidação lipídica. Adaptado de Frankel (1980), Miekisch, Schubert e Noeldge-Schomburg (2004) e SCHAICH et al. (2013).

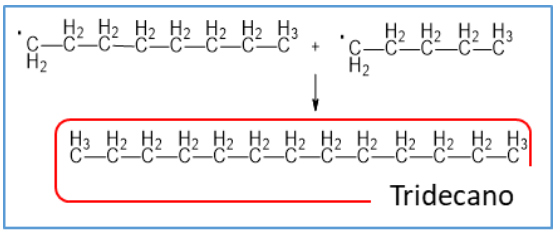


Figura 66- Possível mecanismo de formação do Tridecano, através da combinação de radicais alquil (C5 e C8) formados anteriormente na peroxidação lipídica.

A revisão de Wiggins et al. (2015) reúne estudos em que tirosina, fenilalanina e triptofano (todos aminoácidos aromáticos), dosados em fluidos biológicos, mostraram estar relacionados ao câncer gastroesofágico. As concentrações elevadas de aminoácidos se mostram ligadas à prevalência de Fenol, e este composto seria produzido do metabolismo destes aminoácidos. Em especial, é determinado que a tirosina se converte a Fenol, por ação da enzima bacteriana tirosina fenol-liase.

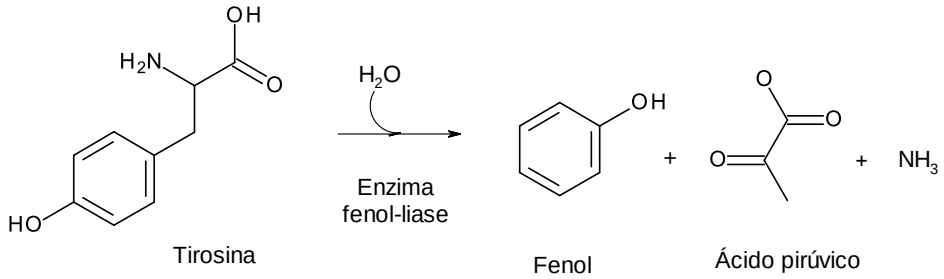


Figura 67- Possível mecanismo de formação do Fenol a partir de aminoácido aromático. Adaptado de Sato e Kumagai (2013).

A elucidação de contexto mais complexo é com relação ao Limoneno e 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol. Embora detectado em amostras biológicas humanas e até referidos como potenciais biomarcadores (como mostrado no Capítulo III), estes são compostos sabidamente biossintetizados por organismos vegetais, ambos produtos derivados de intermediários da via do mevalonato, desta forma, poderiam ser considerados como provindos da dieta e da exposição humana a produtos como óleos essenciais. Deve-se considerar que os voláteis ocorrem por meio de diferentes fontes na natureza, como emissões de plantas, feromônios animais e moléculas provenientes de atividade de microorganismos; além de ocorrerem relacionados a emissões de polímeros e outros produtos sintetizados industrialmente. A nível clínico, é de externa importância possuir métodos que inibem a influência da contaminação ambiental e valores de referência “basais”, para estes compostos. Como pouco foi consolidado até então para explicação da biossíntese deste VOCs no corpo humano, optou-se por avaliar com o método validado estes compostos também. No entanto, pode ser considerado mais seguro descartá-los como marcadores.

Por outro lado, conforme mencionado, a MVA passa a ser bastante alterada no câncer, sendo que muitas opções terapêuticas atuantes nesta via têm se mostrado promissoras. Propõe-se que o meio tumoral ácido possa favorecer cisão e rearranjo do intermediário geranil pirofosfato, gerando os produtos mencionados, por consequência do meio, ou por possuírem qualquer funcionalidade no tumor, ou, ainda compostos muito similares, incapacitando a distinção ainda que com o emprego de espectrometria de massas e análise de padrões- sendo assim necessário se empregar técnicas mais sensíveis para identificação precisa destas substâncias, contudo, provavelmente demandando ao menos sua purificação parcial da amostra.

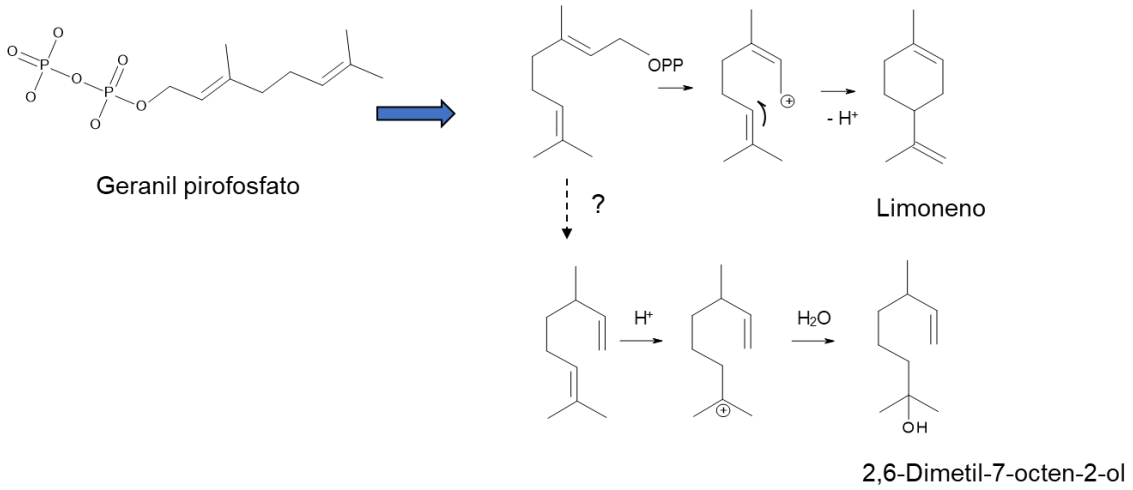


Figura 68- Reações possivelmente envolvidas na produção de Limoneno e 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol. Adaptado de Croteaus e Satterwhite (1989)

5. CONCLUSÕES

São muitos os mecanismos químicos relacionados ao câncer, que são alterados ou desenvolvidos por esta condição. Ainda, ao que se indica, estas substâncias de interesse podem sofrer algumas transformações até sua eliminação, o que torna complexa a tarefa de estabelecer quais vias bioquímicas existentes atuam, de fato, nos processos de formação e transformação destes supostos marcadores e

então o porquê seriam diversificadas na presença do câncer. Com isso, a validação e elucidação destes compostos como marcadores é uma tarefa desafiadora.

Com a avaliação da curva ROC e PCA, o potencial discriminador do método pôde ser corroborado. Foram observadas poucas correlações entre os níveis de marcadores e outras variáveis, mas a concentração de 2-Etil-1-hexanol é inversamente proporcional ao estágio do câncer, enquanto que a de 2,6-Dimetil-7-octen-2-ol parece diretamente proporcional ao estágio do câncer de próstata. Outras correlações não puderam ser consideradas estatisticamente relevantes pelo pequeno número de amostras nesta avaliação. Em adição, é possível verificar tendências de relações de concentração para tipos específicos de neoplasia, mas não foi possível classificar uma tendência padrão para cada sítio de tumor, pois a variabilidade dos dados é grande e não uniforme dentro de um mesmo conjunto de amostras.

No geral, este estudo apresenta indícios de compostos voláteis como possivelmente relacionados à carcinogênese e no emprego dessas substâncias como potenciais biomarcadores desta condição. Estudos específicos são necessários para verificar a incidência e concentração destas moléculas em outras matrizes, para oferecer um panorama das rotas envolvidas na sua distribuição; também, mais pesquisas devem ser dedicadas em relação ao estabelecimento de um conjunto padronizado de fatores que possam ser medidos e associados com outros parâmetros de interesse neste contexto, como a localização da neoplasia e o estadiamento do tumor.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**. v. 26, p. 1324–1337, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA)- RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027_17_05_2012.pdf>. Acessado em 26 de janeiro de 2018.

AKSENOV, A. A.; GOJOVA, A.; ZHAO, W.; MORGAN, J. T.; SANKARAN, S.; SANDROCK, C. E.; DAVIS, C. E. Characterization of volatile organic compounds in human leukocyte antigen heterologous expression systems: a cell's "chemical odor". **Chembiochem : a European Journal of Chemical Biology**, v. 13, n. 7, p. 1053–1059, 2012.

ALTOMARE, D.F.; DI LENA, M.; PORCELLI, F.; TRIZIO, L.; TRAVAGLIO, E.; TUTINO, M.; DRAGONIERI, S.; MEMEO, V.; DE GENNARO, G. Exhaled volatic organic compounds identify patients with colorectal cancer. **British Journal of Surgery**. v. 100, p. 144-150, 2013.

ALWIS, K.U.; BLOUNT, B.C.; BRITT, A.S.; PATEL, D.; ASHLEY, D.A. Simultaneous analysis of 28 urinary VOC metabolites using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-ESI/MSMS). **Analytica Chimica Acta**. v. 750, n. 31, p. 152–160, 2012.

AMAL, H.; DING, L.; BIN-BIN, L.; TISCH.; XU, Z.; ZHAO, Y.; CHEN, J.; SUN, R.; LIU, H. The scent fingerprint of hepatocarcinoma: in-vitro metastasis prediction with volatile organic compounds (VOCs). **International Journal of Nanomedicine**. v. 7, p. 4135–4146, 2012.

AMANN, A.; COSTELLO, B. de L.; MIEKISCH, W.; SCHUBERT, J.; BUSZEWSKI, B.; PLEIL, J.; RATCLIFFE, N.; RISBY, T. The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. **Journal of Breath Research**, v. 8, n. 3, p. 34001, 19 jun. 2014.

APPENZELLER, B. M. R.; SCHUMMER, C.; RODRIGUES, S. B.; WENNIG, R. Determination of the volume of sweat accumulated in a sweat-patch using sodium and potassium as internal reference. **Journal of Chromatography B**, v. 852, n. 1–2, p. 333–337, jun. 2007.

ARASARADNAM, R. P.; MCFARLANE, M. J.; RYAN-FISHER, C.; WESTENBRINK, E.; HODGES, P.; HODGES, P.; THOMAS, M. G.; CHAMBERS, S.; O'CONNELL, N.; BAILEY, C.; HARMSTON, C.; NWOKOLO, C. U.; BARDHAN, K. D.; COVINGTON, J. A. Detection of colorectal cancer (CRC) by urinary volatile organic compound analysis. **PloS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108750, jan. 2014.

BAERISWYL, V.; CHRISTOFORI, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology.** v. 19, n. 5. p. 329-337, 2009.

BAJTAREVIC, A.; AGER, C.; PIENZ, M.; KLIEBER, M.; SCHWARZ, K.; LIGOR, M.; LIGOR, T.; FILIPIAK, W.; DENZ, H.; FIEGL, M.; HILBE, W.; WEISS, W.; LUKAS, P.; JAMNIG, H.; HACKL, M.; HAIDENBERGER, A.; BUSZEWSKI, B.; MIEKISCH, W.; SCHUBERT, J.; AMANN, A. Cancer Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath. **BMC Cancer**, v. 9, n. 348, p. 1–16, 2009.

BANDAY, K.M.; PASIKANTI, K.K.; CHAN, E.C.Y.; SINGLA, R.; RAO, K.V.S., CHAUHAN, V.S.; NANDA, R.K. Use of Urine Volatile Organic Compounds To Discriminate Tuberculosis Patients from Healthy Subjects**. Analytical Chemistry**. v. 83, n. 14, p. 5526–5534, 2011.

BANDODKAR, A. J.; JIA, W.; YARDIMCI, C.; WANG, X.; RAMIREZ, J.; WANG, J. Tattoo-Based Noninvasive Glucose Monitoring: A Proof-of-Concept Study. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 394–398, 6 jan. 2015.

BARASH, O.; ZHANG, W.; HALPERN, J. M.; HUA, Q.-L.; PAN, Y.-Y.; KAYAL, H.; KHOURY, K.; LIU, H.; DAVIES, M. P. A.; HAICK, H. Differentiation between genetic mutations of breast cancer by breath volatolomics. **Oncotarget**, v. 6, n. 42, p. 44864–76, 29 dez. 2015.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARDEESY, N; SHARPLESS, N.E. RAS unplugged: Negative feedback and oncogene-induced senescence. **Cancer Cell.** v. 10, n. 6, p. 451–453, 2006.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Química Nova**. v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BAUMBACH, J. I.; MADDULA, S.; SOMMERWERCK, U.; BESA, V.; KURTH, I.; BÖDEKER, B.; TESCHLER, H.; FREITAG, L.; DARWICHE, K. Significant different volatile biomarker during bronchoscopic ion mobility spectrometry investigation of patients suffering lung carcinoma. **International Journal for Ion Mobility Spectrometry**, v. 14, n. 4, p. 159–166, 12 dez. 2011.

BERDASCO, M.; ESTELLER, M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. **Developmental Cell**. v. 19, n. 5, p. 698-711, 2010.

BERNAL, E. Determination of Volatile Substances in Forensic Samples by Static Headspace Gas Chromatography. In: SALIH, B (Ed.). Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications. Local de publicação: InTech, 2012. p. 197-224.

BHATT, A.; PARSI, M. A.; STEVENS, T.; GABBARD, S.; KUMARAVEL, A.; JANG, S.; GROVE, D.; LOPEZ, R.; MURTHY, S.; VARGO, J. J.; DWEIK, R. Volatile organic

compounds in plasma for the diagnosis of esophageal adenocarcinoma: a pilot study. **Gastrointestinal endoscopy**, v. 0, 2 dez. 2015.

BHOWMICK, N.A.; NEILSON, E.G.; MOSES, H.L.Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**. v. 432, p. 332-337, 2004.

BITTENCOURT, R.; SCALETZKY, A.; BOEHL, J.A.R; Perfil epidemiológico do câncer na rede pública em Porto Alegre - RS. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 50, n. 2, p. 95-101, 2004.

BLASCO, M.A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond**. Nature Reviews Genetics**. v. 6, n. 8, p.611-622, 2005.

BORUSIEWICZ, R. Fire Debris Analysis – A Survey of Techniques Used for Accelerants Isolation and Concentration. **Zagadnień Nauk Sądowych (Issues of Forensic Sciences)**. v. 50, p. 44–63, 2002.

BULLOCK, G.P. Determination of Partition and Activity Coefficients Using Headspace-Gas Chromatography. 2009. 153f. Tese (Doutorado em Química) - Seton Hall University, New Jersey.

BUSZEWSKI, B.; LIGOR, T.; JEZIERSKI, T.; WENDA-PIESIK, A.; WALCZAK, M.; RUDNICKA, J. Identification of volatile lung cancer markers by gas chromatography-mass spectrometry: comparision with discrimination by canines. **Analytical and Bioanalytical Chemistry.** v. 404, n. 1, p. 141-146, 2012a.

BUSZEWSKI, B.; ULANOWSKA, A.; KOWALKOWSKI, T.; CIEŚLIŃSKI, K. Investigation of lung cancer biomarkers by hyphenated separation techniques and chemometrics. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 50, n. 3, 1 jan. 2012b.

BUSZEWSKI, B.; ULANOWSKA, A.; LIGOR, T.; SZELIGA, J. Identification of volatile organic compounds secreted from cancer tissues and bacterial cultures. **Journal of Chromatography B**, v. 868, p. 88–94, 2008.

CALDERÓN-SANTIAGO, M.; PRIEGO-CAPOTE, F.; TURCK, N.; ROBIN, X.; JURADO-GÓMEZ, B.; SANCHEZ, J. C.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Human sweat metabolomics for lung cancer screening. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 5381–5392, 2015.

CAUCHI, M.; WEBER, C. M.; BOLT, B. J.; SPRATT, P. B.; BESSANT, C.; TURNER, D. C.; WILLIS, C. M.; BRITTON, L. E.; TURNER, C.; MORGAN, G. Evaluation of gas chromatography mass spectrometry and pattern recognition for the identification of bladder cancer from urine headspace. **Analytical Methods**, v. 8, n. 20, p. 4037–4046, 2016.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nature Reviews Cancer.** v. 4, p. 118-132, 2004.

CHOI, M.; OH, C. 2nd Dimensional GC-MS analysis of sweat volatile organic compounds prepared by solid phase micro-extraction. **Technology and Health Care**. v. 22, n. 3, p. 481-488, 2014.

CHURCH, J.; WILLIAMS, H. Another sniffer dog for the clinic? Lancet (London, England), v. 358, n. 9285, p. 930, 15 set. 2001.

COOKE, M.S.; EVANS, M.D; MIRAL, D.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. The FASEB Journal. v. 17, p. 1195-1214, 2003.

CROTEAUS, R.; SATTERWHITE, D. M. Biosynthesis of Monoterpenes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 26, p. 15309–15315, 1989.

DE GIOVANNI, N.; FUCCI, N. The current status of sweat testing for drugs of abuse: a review. **Current Medicinal Chemistry**. v. 20, n. 4, p. 545-561, 2013.

DE MARTINIS, B.S.; BARNES, A.J.; SCHEIDWEILER, K.B.; HUESTIS, M.A. Development and validation of a disk solid phase extraction and gas chromatography mass spectrometry method for MDMA, MDA, HMMA, HMA, MDEA, methamphetamine and amphetamine in sweat. **Journal of Chromatography B**. v. 852, p. 450-458, 2007.

DEBERARDINIS, R.J.; SAYED, N.; DITSWORTH, D.; THOMPSON, C.B. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. **Current Opinion in Genetics & Development.** v. 18, n.1, p. 54–61, 2008.

DEL NOGAL SÁNCHEZ, M.; HERNÁNDEZ GARCÍA, E.; PÉREZ PAVÓN, J. L.; MORENO CORDERO, B. Fast analytical methodology based on mass spectrometry for the determination of volatile biomarkers in saliva. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 379–385, 2012.

DENARDO, D.G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L.M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. **Cancer and Metastasis Reviews**. v. 29, p. 309–316, 2010.

DENG, C.; ZHANG, X.; LI, N. Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 808, n. 2, p. 269–277, 5 set. 2004.

DOMINGUES, J.S. Gompertz Model: Resolution and Analysis for Tumors. **Mathematical and Computer Modelling**. v. 1, n. 7, p. 70-77, 2012.

DRAGONIERI, S.; SCHOT, R.; MERTENS, B.J., LE CESSIE, S.; GAUW, S.A.; SPANEVELLO, A.; RESTA, O.; WILLARD, N.P.; VINK, T.J.; RABE, K.F., *et al*. An

electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 120, n. 4, p. 856-862, 2007.

ELUF NETO, J.; WÜNSCH FILHO, V. Screening faz bem à saúde? **Revista da Associação Médica Brasileira** v. 46, n. 4, p. 310-311, 2000.

FAWCETT, T. An introduction to ROC analysis. **Pattern Recognition Letters**, v. 27, n. 8, p. 861–874, 1 jun. 2006.

FENS, N.; ZWINDERMAN, A.H.; VAN DER SCHEE, M.P.; DE NIJS, S.B.; DIJKERS, E.; ROLDAAN, A.C.; CHEUNG, D.; BEL, E.H.; STERK, P.J. Exhaled Breath Profiling Enables Discrimination of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Ashtma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 180, p. 1076-1082, 2009.

FERMOR, B. F.; MASTERS, J. R..; WOOD, C. B.; MILLER, J.; APOSTOLOV, K.; HABIB, N. A. Fatty acid composition of normal and malignant cells and cytotoxicity of stearic, oleic and sterculic acids in vitro. **European Journal of Cancer**, v. 28, n. 6–7, p. 1143–1147, 1 maio 1992.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 29, p. 789–791, 2009.

FILIPIAK, W.; FILIPIAK, A.; SPONRING, A.; SCHMID, T.; ZELGER, B.; AGER, C.; KLODZINSKA, E.; DENZ, H.; PIZZINI, A.; LUCCIARINI, P.; JAMNIG, H.; TROPPMAIR, J.; AMANN, A.;. Comparative analyses of volatile organic compounds (VOCs) from patients, tumors and transformed cell lines for the validation of lung cancer-derived breath markers. **Journal of Breath Research**, v. 8, n. 2, p. 27-41, 1 jun. 2014.

FILIPIAK, W.; FILIPIAK, A.; SPONRING, A.; SCHMID, T.; ZELGER, B.; AGER, C.; KLODZINSKA, E.; DENZ, H.; PIZZINI, A.; LUCCIARINI, P.; JAMNIG, H.; TROPPMAIR, J.; AMANN, A.; LUCCIARINI, P.; TROPPMAIR, J. Comparative

analyses of volatile organic compounds (VOCs) from patients, tumors and transformed cell lines for the validation of lung cancer-derived breath markers. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 8, n. 0, p. 22-31, 2013.

FILIPIAK, W.; SPONRING, A.; FILIPIAK, A.; AGER, C.; SCHUBERT, J.; MIEKISCH, W.; AMANN, A.; TROPPMAIR, J. TD-GC-MS Analysis of Volatile Metabolites of Human Lung Cancer and Normal Cells In vitro. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 1, p. 182–195, 2010.

FILIPIAK, W.; SPONRING, A.; MIKOVINY, T.; AGER, C.; SCHUBERT, J.; MIEKISCH, W.; AMANN, A.; TROPPMAIR, J. Release of volatile organic compounds (VOCs) from the lung cancer cell line CALU-1 *in vitro*. **Cancer Cell International**. v. 8, n. 17, 2008.

FORTNER, N. A. The Detection of Drugs in Sweat. In: JENKINS, A.J. (Org.). **Drug Testing in Alternative Biological Specimens**. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. p. 101–116.

FRANKEL, E. N. Lipid oxidation. **Progress in Lipid Research**, v. 19, n. 1–2, p. 1–22, 1980.

FUCHS, P.; LOESEKEN, C.; SCHUBERT, J. K.; MIEKISCH, W. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. **International Journal of Cancer.** v. 126, n. 11, p. 2663–70, 2010.

FUNG, E.T.; WRIGHT, G.L.Jr; DALMASSO, E.A. Proteomic strategies for biomarker identification: progress and challenges. **Current Opinion in Molecular Therapeutics.** v. 6, n. 2, p. 643-650, 2000.

GALLAGHER, M.; WYSOCKI, C. J.; LEYDEN, J. J.; SPIELMAN, A. I.; SUN, X.; PRETI, G. Analyses of volatile organic compounds from human skin. **The British Journal of Dermatology**, v. 159, n. 4, p. 780–91, set. 2008.

GAO, W.; EMAMINEJAD, S.; YIN, H.; NYEIN, Y.; CHALLA, S.; CHEN, K.; PECK, A.; FAHAD, H. M.; OTA, H.; SHIRAKI, H.; KIRIYA, D.; LIEN, D.-H.; BROOKS, G. A.; DAVIS, R. W.; JAVEY, A. Fully integrated wearable sensor arrays for multiplexed in situ perspiration analysis. **Nature**, v. 529, p. 509–514, 2016.

GRIVENNIKOV, S.I; GRETEN, F.R.; KARIN, M. Cell. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**. v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.

GRUBER, M.; TISCH, U.; JERIES, R.; AMAL, H.; HAKIM, M.; RONEN, O.; MARSHAK, T.; ZIMMERMAN, D.; ISRAEL, O.; AMIGA, E.; DOWECK, I.; HAICK, H. Analysis of exhaled breath for diagnosing head and neck squamous cell carcinoma: a feasibility study. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 4, p. 790–8, 2014.

GUERRA, M.R.; GALLO, C.V.M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

HAJIAN-TILAKI, K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 4, n. 2, p. 627–35, 2013.

HAKIM, M.; BILLAN, S.; TISCH, U.; PENG, G.; DVROKIND, I.; MAROM, O.; ABDAH-BORTNYAK, R.; KUTEN, a; HAICK, H. Diagnosis of head-and-neck cancer from exhaled breath. **British Journal of Cancer**, v. 104, n. 10, p. 1649–1655, 2011.

HAKIM, M.; BROZA, Y. Y.; BARASH, O.; PELED, N.; PHILLIPS, M.; AMANN, A.; HAICK, H. Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 11, p. 5949–5966, 2012.

HANAHAN, D; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**. v. 100, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**. v. 144, p. 646-674, 2011.

HANAI, Y.; SHIMONO, K.; MATSUMURA, K.; VACHANI, A.; ALBELDA, S.; YAMAZAKI, K.; BEAUCHAMP, G. K.; OKA, H. Urinary Volatile Compounds as Biomarkers for Lung Cancer. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 76, n. 4, p. 679–84, 2012a.

HANAI, Y.; SHIMONO, K.; OKA, H.; BABA, Y.; YAMAZAKI, K.; BEAUCHAMP, G. K. Analysis of volatile organic compounds released from human lung cancer cells and from the urine of tumor-bearing mice. **Cancer Cell International**, v. 12, n. 1, p. 7, 2012b.

HIBBS, R.G.; BURCH, G.E.; PHILLIPS, J.H. The fine structure of the small blood vessels of normal human dermis and subcutis. **American Heart Journal**. v. 56, n. 5, p. 662-670, 1958.

HOFFMAN, E.M.; CURRAN, A.M.; DULGERIAN, N.; STOCKHAM, R.A.; ECKENRODE, B.A. Characterization of the volatile organic compounds present in the headspace of decomposing human remains. **Forensic Science International**. v. 186, p. 6-13, 2009.

HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; JUNIOR, G. J. de O. Análise de Componentes Principais: Resumo Teórico, Aplicação e Interpretação. **E&S Engineering and Science**, v. 5, n. 1, p. 83, 2016.

HUSSAIN, J. N.; MANTRI, N.; COHEN, M. M. Working Up a Good Sweat - The Challenges of Standardising Sweat Collection for Metabolomics Analysis. **The Clinical Biochemistry Reviews**, v. 38, n. 1, p. 13–34, fev. 2017.

INSTITUTO DE TRATAMENTO DO CÂNCER. Diagnóstico do Câncer. Disponível em: <http://www.itcancer.com.br/site/index.php/o-cancer/diagnostico>. Acesso em: 16 de mar. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). ABC do Câncer- Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. 2ª ed. Rio de Janeiro, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Ações de Enfermagem para o Controle do Câncer: Uma proposta de integração ensino-serviço. 3ª ed. Rio de Janeiro, 2008.
INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2016- Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015.

JACKSON, S.P; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**. v. 461, n. 7267, p. 1071-1078, 2009.

JADOON, S.; KARIM, S.; AKRAM, M. R.; KALSOOM KHAN, A.; ZIA, M. A.; SIDDIQI, A. R.; MURTAZA, G. Recent Developments in Sweat Analysis and Its Applications. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

JANASIK, B.; JAKUBOWSKI, M.; JAŁOWIECKI. Excretion of unchanged volatile organic compounds (toluene, ethylbenzene, xylene and mesitylene) in urine as result of experimental human volunteer exposure**. International Archives of Occupational and Environmental Health**. v. 81, n. 4, p. 443-449, 2008.

JONES, R.G.J; THOMPSOM, C.B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. **Genes & Development.** v. 23, p.537-548, 2009.

JUNTTILA, M., R.; EVAN, G.I. p53 — a Jack of all trades but master of none. **Nature Reviews Cancer**. v. 9, p. 821-829, 2009.

KACINKO, S.L.; BARNES, A.J.; SCHWILKE, E.W.; CONE, E.J.; MOOLCHAN, E.T.; HUESTIS, M.A. Disposition of Cocaine and Its Metabolites in Human Sweat after Controlled Cocaine Administration. **Clinical Chemistry.** v. 51, n. 11, p. 2085-2094, 2005.

KAKUTA, S.; BANDO, Y.; NISHIUMI, S.; YOSHIDA, M.; FUKUSAKI, E.; BAMBA, T. Metabolic profiling of oxidized lipid-derived volatiles in blood by gas chromatography/mass spectrometry with in-tube extraction. **Mass Spectrometry**, v. 2, n. 1, p. A0018, 2013.

KHALID, T.; AGGIO, R.; WHITE, P.; DE LACY COSTELLO, B.; PERSAD, R.; AL-KATEB, H.; JONES, P.; PROBERT, C. S.; RATCLIFFE, N. Urinary Volatile Organic Compounds for the Detection of Prostate Cancer. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–15, 24 nov. 2015.

KIDWELL, D.A.; SMITH, F.P. Susceptibility of Pharmchek ™ drugs of abuse patch to environmental contamination. **Forensic Science International**. v. 116, p. 89–106, 2000.

KOLK, A.H.; VAN BERKEL, J.J.; CLAASSENS, M.M.; WALTERS, E.; KUIJIPER, S.; DALLINGA, J.W.; VAN SCHOOTEN, F.J. Breath analysis as a potential diagnostic tool for tuberculosis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.** v. 16, n. 6, p. 777-782, 2012.

KRILAVICIUTE, A.; HEISS, J. A.; LEJA, M.; KUPCINSKAS, J.; HAICK, H.; BRENNER, H. Detection of cancer through exhaled breath: a systematic review. **Oncotarget**, v. 6, n. 36, p. 38643–57, 17 nov. 2015.

KUMAR, S.; HUANG, J.; ABBASSI-GHADI, N.; MACKENZIE, H. a.; VESELKOV, K. a.; HOARE, J. M.; LOVAT, L. B.; ŠPANĚL, P.; SMITH, D.; HANNA, G. B. Mass Spectrometric Analysis of Exhaled Breath for the Identification of Volatile Organic

Compound Biomarkers in Esophageal and Gastric Adenocarcinoma. **Annals of Surgery**, v. 00, n. 00, p. 1, 2015.

KUTYSHENKO, V.P.; MOLCHANOV, M.; BESKARAVAYNY, P.; UVERSKY, V.N.; TIMCHENKO, M.A. Analyzing and Mapping Sweat Metabolomics by High-Resolution NMR Spectroscopy. **PLoS ONE**. v. 6, n. 12: e28824, 2011.

LAVRA, L.; CATINI, A.; ULIVIERI, A.; CAPUANO, R.; BAGHERNAJAD SALEHI, L.; SCIACCHITANO, S.; BARTOLAZZI, A.; NARDIS, S.; PAOLESSE, R.; MARTINELLI, E.; DI NATALE, C. Investigation of VOCs associated with different characteristics of breast cancer cells. **Scientific Reports**, v. 5, p. 13246, 2015,

LI, J.; PENG, Y.; LIU, Y.; LI, W.; JIN, Y.; TANG, Z.; DUAN, Y. Investigation of potential breath biomarkers for the early diagnosis of breast cancer using gas chromatography-mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 59–67, 2014.

LOFT, S.; POULSEN, H.E. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. **Journal Molecular Medicine**. v. 74, p. 297-312, 1996.

MANDREKAR, J. N. Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 5, n. 9, p. 1315–1316, 1 set. 2010.

MENA-BRAVO, A.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Sweat: A sample with limited present applications and promising future in metabolomics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 90, p. 139–147, 2014.

MENG, X.; RIORDAN I, N. H.; RIORDAN, H. D.; JACKSON ', J.; ZHONG ', J.; LI ', Y.; GONZALEZ, M. J.; MCCLUNE ', B.; PAPPAN ', K. Different fatty acid composition between normal and malignant cell lines. **BioMedicina**, v. 2, n. 4, 1999.

MIEKISCH, W.; SCHUBERT, J. K.; NOELDGE-SCHOMBURG, G. F. E. Diagnostic potential of breath analysis--focus on volatile organic compounds. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 347, n. 1-2, p. 25–39, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. COORDENAÇÃO NACIONAL DE CONTROLE DE TABAGISMO - CONTAPP. "Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco". Rio de Janeiro, 1996.

MOCHALSKI, P.; KING, J.; UNTERKOFLER, K.; HINTERHUBER, H.; AMANN, A. Emission rates of selected volatile organic compounds from skin of healthy volunteers. **Journal of Chromatography. B,** v. 959, n. 100, p. 62–70, 2014.

MOCHALSKI, P.; SPONRING, A.; KING, J.; UNTERKOFLER, K.; TROPPMAIR, J.; AMANN, A. Release and uptake of volatile organic compounds by human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) in vitro. **Cancer Cell Internationa**l, v. 13, n. 1, p. 72, 17 jul. 2013.

MONTEIRO, M.; CARVALHO, M.; HENRIQUE, R.; JERÓNIMO, C.; MOREIRA, N.; DE LOURDES BASTOS, M.; DE PINHO, P. G. Analysis of volatile human urinary metabolome by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry for biomarker discovery: application in a pilot study to discriminate patients with renal cell carcinoma. **European journal of Cancer**, v. 50, n. 11, p. 1993–2002, jul. 2014.

MOYER, J.; WILSON, D.; FINKELSHTEIN, I.; WONG, B.; POTTS, R. Correlation Between Sweat Glucose and Blood Glucose in Subjects with Diabetes. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 14, n. 5, p. 398–402, 2012.

MULLEN, P. J.; YU, R.; LONGO, J.; ARCHER, M. C.; PENN, L. Z. The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 11, p. 718–731, 2016.

PAULING, L.; ROBINSON, A.B.; TERANISHI, R.; CARY, P. Quantitative Analysis of Urine Vapor and Breath by Gas-Liquid Partition Chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 68, n. 10, p. 2374-2376, 1971.

PENG, G.; HAKIM, M.; BROZA, Y. Y.; BILLAN, S.; KUTEN, A.; TISCH, U.; HAICK, H. Detection of lung , breast , colorectal , and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors. **British Journal of Cancer**, v. 103, n. 4, p. 542–551, 2010.

PHILLIPS, M.; CATANEO, R.N.; CONDOS, R.; RING ERICKSON, G.A.; GREENBERG, J.; LA BOMBARDI, V.; MUNAWAR, M.I.; TIETJE, O. Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath. **Tuberculosis**. v. 87, n. 1, p. 44-52, 2007a.

PHILLIPS, M.; ALTORKI, N.; AUSTIN, J. H. M.; CAMERON, R. B.; CATANEO, R. N.; GREENBERG, J.; KLOSS, R.; MAXFIELD, R. a; MUNAWAR, M. I.; PASS, H. I.; RASHID, A.; ROM, W. N.; SCHMITT, P. Prediction of lung cancer using volatile biomarkers in breath**. Cancer biomarkers**, v. 3, n. 2, p. 95–109, 2007b.

PHILLIPS, M.; ALTORKI, N.; AUSTIN, J. H. M.; CAMERON, R. B.; CATANEO, R. N.; KLOSS, R.; MAXFIELD, R. A.; MUNAWAR, M. I.; PASS, H. I.; RASHID, A.; ROM, W. N.; SCHMITT, P.; WAI, J. Detection of lung cancer using weighted digital analysis of breath biomarkers. **Clinica Chimica Acta**, v. 393, n. 2, p. 76–84, 2008.

PHILLIPS, M.; BASA-DALAY, V. ;BLAIS, J.;BOTHAMLEY, G.; CHATURVEDI, A.; MODI, K.D.; PANDYA, M.; NATIVIDADA, M.P.; PATEL, U.; PAMRAJE, N.N.; *et al*. Point-of-care breath test for biomarkers of active pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis**. v. 92, n. 4, p. 314-320, 2012.

PHILLIPS, M.; CATANEO, R. N.; DITKOFF, B. A.; FISHER, P.; GREENBERG, J.; GUNAWARDENA, R.; KWON, C. S.; RAHBARI-OSKOUI, F.; WONG, C. Volatile markers of breast cancer in the breath. **Breast Journal**, v. 9, n. 3, p. 184–191, 2003a.

PHILLIPS, M.; CATANEO, R. N.; SAUNDERS, C.; HOPE, P.; SCHMITT, P.; WAI, J. Volatile biomarkers in the breath of women with breast cancer. **Journal of Breath Research**, v. 4, n. 2, p. 20-25, 2010.

PHILLIPS, M.; CATANEO, R.N.; CUMMIN, A.R.C.; GAGLIARDI, A.J.; GLEESON, K.; GREENBERG, B.S.; MAXFIELD, R.A.; ROM, W.N. Detection of Lung Cancer With Volatile Markers in the Breath. **Chest Journal**. v. 123, n. 6, p. 2115-2123, 2003b.

PHILLIPS, M.; GLEESON, K.; HUGHES, J. M. B.; GREENBERG, J.; CATANEO, R. N.; BAKER, L.; MCVAY, W. P. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. **The Lancet**, v. 353, n. 9168, p. 1930–1933, 5 jun. 1999.

POLI, D.; CARBOGNANI, P.; CORRADI, M.; GOLDONI, M.; ACAMPA, O.; BALBI, B.; BIANCHI, L.; RUSCA, M.; MUTTI, A. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study. **Respiratory Research**, v. 6, p. 71, 2005.

POLI, D.; GOLDONI, M.; CORRADI, M.; ACAMPA, O.; CARBOGNANI, P.; INTERNULLO, E.; CASALINI, A.; MUTTI, A. Determination of aldehydes in exhaled breath of patients with lung cancer by means of on-fiber-derivatisation SPME–GC/MS. **Journal of Chromatography B,** v. 878, n. 27, p. 2643–2651, 1 out. 2010.

PRETI, G.; LEYDEN, J. J. Genetic Influences on Human Body Odor: From Genes to the Axillae. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 2, p. 344–346, fev. 2010.

QIN, T.; LIU, H.; SONG, Q.; SONG, G.; WANG, H.; PAN, Y.; XIONG, F.; GU, K.; SUN, G.; CHEN, Z. The screening of volatile markers for hepatocellular carcinoma. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 9, p. 2247–53, 2010.

RIBEIRO, J. D.; RIBEIRO, M. Â. G. de O.; RIBEIRO, A. F. Controvérsias na fibrose cística: do pediatra ao especialista. **Jornal de Pediatria**, v. 78, p. 171–186, dez. 2002.

RUDNICKA, J.; KOWALKOWSKI, T.; LIGOR, T.; BUSZEWSKI, B. Determination of volatile organic compounds as biomarkers of lung cancer by SPME–GC–TOF/MS and chemometrics. **Journal of Chromatography B,** v. 879, n. 30, p. 3360–3366, 2011.

RUDNICKA, J.; WALCZAK, M.; KOWALKOWSKI, T.; JEZIERSKI, T.; BUSZEWSKI, B. Determination of volatile organic compounds as potential markers of lung cancer by gas chromatography-mass spectrometry versus trained dogs. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 202, p. 615–621, 2014.

RUI, Z.; LI, X.; ZHU, X.; LIU, J.; DOMIGAN, B.; BARR, I.; CATE, J. H. D.; ZHANG, W. Microbial biosynthesis of medium-chain 1-alkenes by a nonheme iron oxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 51, p. 18237–42, 23 dez. 2014.

SATO, F.; KUMAGAI, H. Microbial production of isoquinoline alkaloids as plant secondary metabolites based on metabolic engineering research. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 89, n. 5, p. 165–182, 2013.

SCHAICH, K. M.; SHAHIDI, F.; ZHONG, Y.; ESKIN, N. A. M. Lipid Oxidation. In: ESKIN, M.; SHAHIDI, F. (Orgs.). **Biochemistry of Foods**. 3. ed. Elsevier, 2013. cap. 11. p. 419–478.

SCHULZ, S.; DICKSCHAT, J. S. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 4, p. 814, ago. 2007.

SEARS, M. E.; KERR, K. J.; BRAY, R. I. Arsenic, Cadmium, Lead, and Mercury in Sweat: A Systematic Review. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2012, p. 1–10, 22 fev. 2012.

SENYILMAZ, D.; TELEMAN, A. A. Chicken or the egg: Warburg effect and mitochondrial dysfunction. **F1000prime reports**, v. 7, p. 41, 2015.

SILVA, C. L.; PASSOS, M.; CÂMARA, J. S. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. **British Journal of Cancer**, v. 105, n. 12, p. 1894–904, 6 dez. 2011.

SILVA, C. L.; PASSOS, M.; CÂMARA, J. S. Solid phase microextraction, mass spectrometry and metabolomic approaches for detection of potential urinary cancer biomarkers--a powerful strategy for breast cancer diagnosis. **Talanta**, v. 89, p. 360–8, 2012.

SILVA, C. L.; PERESTRELO, R.; SILVA, P.; TOMÁS, H.; CÂMARA, J. S. Volatile metabolomic signature of human breast cancer cell lines. **Scientific Reports**, v. 7, p. 43969, 2017.

SKOOG, D.A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed. São Paulo: Editora Thomson, 2006, p. 904.

SMITH, K.; THOMPSON, G.F.; KOSTER, H.D. Sweat in Schizophrenic Patients: Identification of the Odorous Substance. **Science**. v. 166, n. 3903, p. 398-399, 1969.

SOMPARAYC, L. **How Cancer Works**. 1st ed. Mississauga: Jones and Bartlett Publishera, Inc, 2004. p 4-6.

SPIELMAN, A. I.; ZENG, X. N.; LEYDEN, J. J.; PRETI, G. Proteinaceous precursors of human axillary odor: isolation of two novel odor-binding proteins. **Experientia**, v. 51, n. 1, p. 40–7, 15 jan. 1995.

SPONRING, A.; FILIPIAK, W.; MIKOVINY, T.; AGER, C.; SCHUBERT, J.; MIEKISCH, W.; AMANN, A.; TROPPMAIR, J. Release of volatile organic compounds from the lung cancer cell line NCI-H2087 in vitro. **Anticancer**, v. 29, n. 1, p. 419–426, 2009.

STATHEROPOULOS, M.; AGAPIOU, A.; SPILIOPOULOU, C.; PALLIS, G.C.; SIANOS, E. Environmental aspects of VOCs evolved in the early stages of human decomposition. **Sci Total Environ**. v. 385, p. 221-227, 2007.

STATHEROPOULOS, M.; SIANOS, E.; AGAPIOU, A. GEORGIADOU, A.; PAPPA, A.; TZAMTZIS, N.; GIOTALI, H.; PAPAGEORGIOU, C.; KOLOSTOUMBIS, D. Preliminary investigation of using volatile organic compounds from human expired air, blood and urine for locating entrapped people in earthquakes. **Journal of Chromatography B**. v. 822, p. 112-117, 2005.

SYHRE, M.; MANNING, L.; PHUANUKOONNON, S.; HARINO, P.; CHAMBERS, S.T. The scent of Mycobacterium tuberculosis- part II breath. **Tuberculosis**. v. 84, n. 4, p. 263-266, 2009.

TAMANOI, F.; AZIZIAN, M.; ASHRAFI, M.; BATHAIE, S. Mevalonate Pathway and Human Cancers. **Current Molecular Pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 77–85, 1 mar. 2017.

TAVERNA, G.; COTE, R. J.; GRIZZI, F. Editorial: Prostate Cancer: What We Know and What We Would Like to Know. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 114, 2015.

TRANTHIM-FRYER, D.J.; HANSSON, R.C.; NORMAN, K.W. Headspace/solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry: a screening technique for the recovery and identification of volatile organic compounds (VOC's) in postmortem blood and viscera samples. **Journal of Forensic Sciences**. v. 46, n. 4, p. 934-946, 2001.

TSOFINA, L. M.; MOKHOVA, E. N. Effect of palmitic and lauric acids on the phospholipid bilayer membrane conductivity. **Bioscience reports**, v. 18, n. 2, p. 91–5, abr. 1998.

UEMURA, N.; NATH, R.P.; HARKEY, M.R.; HENDERSON, G.L.; MENDELSON, J.; JONES, R.T. Cocaine levels in sweat collection patches vary by location of patch placement and decline over time. **Journal of Analytical Toxicology**. v. 28, p. 253–259, 2004.

VAN DE KANT, K.D.G.; VAN DER SANDE, L.J.T.M.; JÖBSIS, Q.; VAN SCHAYCK, O.C.P.; DOMPELING, E. Clinical use of exhaled volatile organic compounds in pulmonary diseases: a systematic review. **Respiratory Research**. v. 117, n. 13, 2012.

VANDER HEIDEN, M.G.; CANTLEY; L.C. THOMPSON, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**. v. 324, n. 5930, p. 1029-1033, 2009.

VOSS, A.; WITT, K.; FISCHER, C.; REULECKE, S.; POITZ, W.; KECHAGIAS, V.; SUBER, R.; FIGULLA, H.R. Smelling heart failure from human skin odor with an electronic nose. 34th Annual International Conference of the IEEE EMBS. San Diego, California USA. 28 Aug - 1 Sept, 2012.

WAGENSTALLER, M.; BUETTNER, A. Quantitative Determination of Common Urinary Odorants and Their Glucuronide Conjugates in Human Urine. **Metabolites**, v. 3, p. 637–657, 2013.

WALKER, V.; MILLS, G. A. 2-Pentanone Production from Hexanoic Acid by Penicillium roqueforti from Blue Cheese: Is This the Pathway Used in Humans? **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

WALKER, V.; MILLS, G. A. Urine 4-heptanone: a β-oxidation product of 2-ethylhexanoic acid from plasticisers. **Clinica Chimica Acta**, v. 306, n. 1, p. 51–61, 2001.

WANG, B-L.; TAKIGAWA, T.; TAKEUCHI, A.; YAMASAKI, Y.; KATAOKA, H.; WANG, D-H; OGINO, K. Unmetabolized VOCs in Urine as Biomarkers of Low Level Exposure

in Indoor Environments. **Journal of Occupational Health**. v. 49, n. 2, p. 104-110, 2007.

WANG, C.; DONG, R.; WANG, X.; LIAN, A.; CHI, C.; KE, C.; GUO, L.; LIU, S.; ZHAO, W.; XU, G.; LI, E. Exhaled volatile organic compounds as lung cancer biomarkers during one-lung ventilation. **Scientific reports**, v. 4, p. 7312, 2014.

WANG, D.; WANG, C.; PI, X. I. N.; GUO, L. E. I.; WANG, Y. U. E.; LI, M.; FENG, Y. U. E.; LIN, Z.; HOU, W. E. I.; LI, E. Urinary volatile organic compounds as potential biomarkers for renal cell carcinoma. **Biomedical Reports,** v. 5. p. 68–72, 2016.

WANG, Y.; HU, Y.; WANG, D.; YU, K.; WANG, L.; ZOU, Y.; ZHAO, C.; ZHANG, X.; WANG, P.; YING, K. The analysis of volatile organic compounds biomarkers for lung cancer in exhaled breath, tissues and cell lines**. Cancer Biomarkers**, v. 11, n. 4, p. 129–137, 2012.

WIGGINS, T.; KUMAR, S.; MARKAR, S. R.; ANTONOWICZ, S.; HANNA, G. B. Tyrosine, Phenylalanine, and Tryptophan in Gastroesophageal Malignancy: A Systematic Review. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 24, n. 1, p. 32–38, 1 jan. 2015.

WILLIAMS, H.; PEMBROKE, A. Sniffer dogs in the melanoma clinic? Lancet (London, England), v. 1, n. 8640, p. 734, 1 abr. 1989.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemical Journal**. v. 313, p. 17-29, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/>. Acesso em 30 de março de 2018.

ZLATIKS, A.; BRAZELL, R.S.; POOLE, C.F. The Role of Organic Volatile Profiles in Clinical Diagnosis. **Clinical Chemistry**. v. 27, n. 6, p. 789-797, 1981.

APÊNDICE 1- VOCs identificados em amostras de suor de voluntários do grupo controle

Amostra de voluntários do grupo controle - (SC= suor controle)					[Continua...]
Amostra	Tempo de retenção (minutos)	Identidade fornecida NIST08	Probabilidade (%)	Identidade fonecida AMDIS	Probabilidade (%)
1SC	6,76	3-metilbutil-hidroxilamina	5,33	2-metil-propanoil cloreto	47,70
	7,02	2-dimetil-N-nitroso-2-propanamina	4,55	2-propen-1-amina	66,30
	7,96	2-ciclopropil-propano	24,40	Etil-ciclobutano	62,40
	15,10	Undecanal	2,69	-	
	15,37	2,2-dihidroxi-1-fenilletanona	2,74	Metil benzoato	8,40
	16,99	3,7-dimetil-6-octen-1-ol, formiato	2,68	-	
	34,99	9-hexil-heptadecano	5,19	-	
2SC	6,75	-		2-metil-pentano	13,10
	7,02	2-metil-nitro-1-propano	5,41	2-propen-1-amina	8,77
	7,96	Metil-ciclopentano	36,60	Etil-ciclobutano	67,20
	12,18	2-metil-ciclopentanol, acetato	10,80	2-metil-ciclopentanol, acetato	45,40
	13,37	6-metil-5-hepten-2-ona	27,30	6-metil-hepten-2-ona	5,60
	15,08	Undecanal	2,41	Undeceno	5,34
	15,39	-	7,84	Metil benzoato	9,10
	16,97	Cânfora	42,10	Cânfora	21,30
	20,44	Tetrametildecano	3,40	Tretadecano	14,00
3SC	12,18	2-metil-ciclopentanol, acetato	4,62	-	
	13,39	6-metil-5-hepten-2-ona	5,22	6-metil-5-he-pten-2-ona	3,50
	15,39	Dihidroxiacetofenona	7,83	Ácido benzoico metil éster	11,00
	16,96	Tetradecanal	2,00	-	
	20,42	Decil propil éster, ácido oxálico	3,25	Tridecano	6,00
	25,25	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	17,30	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	12,00
4SC	6,82	Dicloroacetaldeído	3,90	-	
	7,96	Metilciclopentano	29,30	1-hexanol	41,00
	14,82	3,7-dimetil-3-octanol	28,00	3,4-dimetil-heptano	18,90
	19,49	1-metoxi-4-(1-propenil)benzeno	23,60	1-metoxi-4-(1-propenil)benzeno	32,00
	19,70	Isobornilformato	8,54	-	
	20,42	5,8-dietildodecano	2,52	Tridecano	2,40
	25,23	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	4,64	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	3,30
	35,03	Octil éter	13,30	3,7-dimetil-1-octanol	67,00
5SC	7,96	Metil ciclopentano	16,00	-	
	12,18	2-metilciclopentanol acetato	7,11	-	
	15,09	2-pentadecen-1-ol	3,37	-	
	15,37	-		Metilbenzoato	13,00
	16,96	5-decen-1-ol	2,65	Ciclohexano etanol	7,50
	34,54	Decil decanoato	3,11	-	
	35,01	3-etil-5-(2-etilbutil) octadecano	8,56	-	
6SC	7,94	-		Propil-ciclopropano	36,00
	12,17	-	6,64	2-metil-ciclopentanol, acetato	45,60
	13,40	5-metileno-9-decen-2-ona	3,30	2,5-dimetil-pirazina	3,00
	15,08	7-tetradecen-1-ol	4,11	-	
	16,96	10-pentadecen-1-ol	4,00	-	

Amostra de voluntários do grupo controle - (SC= suor controle)					[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fonecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
6SC	20,42	2-metil-undecano	2,40	-	
	34,55	3-etil-5-(2-etilbutil)octadecano	2,81	-	
	35,03	2-metil-pentadeceno	1,48	-	
7SC	5,76	2-methoxiethanol	16,11	-	
	7,94	4-metil-1-penteno	2,80		
	12,18	2-metil-ciclopentanol, acetato	6,64	2-metil-ciclopentanol, acetato	45,60
	15,37	Dihidroxiacetofenona	10,00	Isopropilfenil cetona	
	20,42	o-decil hidroxilamina	3,70	Tridecano	
	20,44	-		2,2-dimetilbutanona	
	34,52	Ácido pentanoico, 2,2,4-trimetil-3-carboxiisopropil, isobutil éster	68,70	-	
	35,031	2-metil-pentadeceno	1,48	-	
8SC	5,76	2-metoxiethanol	14,95	2-hidroxil etil éster ácido propanoico	32,00
	7,80	Triacetilhidroxilamina	8,60	Anidrido acético	9,27
	12,18	-		2-metil-ciclopentanol, acetato	40,60
	15,37	Ácido 3-benzoilpropanoico	10,05	-	
9SC	6,75	3-metilbutil-hidroxilamina	6,08	Vinil butirato	27,90
	7,02	3-metil-pentano	13,67	3-metil-pentano	18,00
	7,94	Etil-ciclobutanona	5,57	4-metil-1-pentanol	19,00
	8,89	5-metil-hexanal	3,62	3-isopropoxipropilamina	6,32
	10,45	2-metilpropil-benzeno	2,22	Feniletil alcohol	
	11,07	3-metil-4metileno-hexano	2,80	-	
	12,18	2-metil-ciclopentanol, acetato	5,08	2-metil-ciclopentanol, acetato	6,99
	15,09	2-decen-1-ol	3,47	-	
	16,94	Dodecanal	8,11	2-dodecenol	6,20
	22,80	2-tertbutil-4-metilfenol	13,60	3,4-Metilenodioxiacetofenona	11,40
10SC	7,97	3,4-dimetilpentanol	14,9	Etil-ciclobutanona	12,40
	8,92	2-buten-1-ol	3,92	2-propen-1-ol	30,90
	12,21	2-metil-ciclopentanol acetato	9,77	2-metil-ciclopentanol acetato	65,50
	13,44	6-metil-5-hepten-2-ona	16,3	Butanoic ácido,3-metil-fenil éster	40,30
	14,06	3-deceno	3,04	-	
	15,11	7-metil-nonane	2,92	-	
	17,00	10-pentadecen-1-ol	4,44	-	
11SC	7,97	Ácido 3-hexenoico	3,22	-	
	8,92	3,5-dimetil-2-octanona	6,68	-	
	15,11	7-metil-nonano	3,32	-	
	17,00	Dodecanal	5,65	-	
	20,48	o-decil-hidroxilamina	2,02	-	
12SC	6,74	2-metilpropil-hidroxilamina	34,70	-	
	7,02	3-metil-pentano	4,91	3-metil-pentano	28,30
	7,94	Metil-ciclopropano	21,10	Etil-ciclobutano	52,90
	8,31	Tert-butilmetilnitrosamina	4,94	-	
	8,57	Metil-ciclopentano	16,90	Metil-ciclopentano	69,20
	8,90	Pentil-hidroxilamina	8,90	3-etil-pentano	43,90

Amostra de voluntários do grupo controle - (SC= suor controle)					[Continuação]
Amostra	Tempo de retenção (minutos)	Identidade fornecida NIST08	Probabilidade (%)	Identidade fonecida AMDIS	Probabilidade (%)
12SC	15,09	2-decen-1-ol	3,37	-	
	16,97	Dodecanal	4,69	-	
	19,24	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	2,82	-	
13SC	6,76	3-metilbutil-hidroxilamina	9,81	2-metil-pentano	31,10
	7,00	3-metil-pentano	4,58	2-metil-1-butanol	14,30
	7,22	3-metil-pentano	13,80	3-metil-pentano	10,40
	7,94	Etil-ciclobutano	15,70	Metil-ciclopentano	63,60
	12,13	2-metil-ciclopentanol, acetato	8,83	3-metil-2-hexanona	12,50
	15,09	Undecanal	2,20	-	
	16,98	2-Dodecenol	5,35	-	
	19,29	6- metil-tridecano	2,00	Ácido oxálico, isobutil nonil éster	13,90
14SC	6,80	Metileno cloreto	11,10	Metileno cloreto	93,80
	6,98	2-metil-1-nitro-propano	9,72	-	
	7,95	Etil-ciclobutano	39,60	Etil-ciclobutano	43,90
	12,18	2-metil-ciclopentanol, acetato		3,4-dimetil-2-hexanona	23,30
	15,09	Undecanal	2,72	-	
	16,94	1-Dodeceno	2,14	1,11-dodecadieno	15,20
	20,47	2,4,6-trimetil-decano	2,13	-	
	24,27	2,2-dimetil-propanoic ácido, octil éster	2,48	-	
	25,25	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	2,18	-	
	29,64	5,8-dietil-dodecano	3,49	-	
15SC	6,74	3-metilbutil-hidroxilamina	8,43	2-metil-pentano	54,70
	7,00	2-metil-1-nitro-propano	4,34	3-metil-pentano	27,70
	7,94	Metil-ciclobutano	8,90	Etil-ciclopentano	34,00
	8,18	3-metil-pentano	5,39	-	
	8,91	2,4-dimetil-3-pentanona	4,93	-	
	12,19	2-metil-ciclopentanol, acetato	8,66	2-metil-ciclopentanol, acetato	62,90
	13,41	6-metil-5-hepten-2-ona	10,90	4-hepten-2-ona	44,50
	15,09	Dodecanal	5,84	-	
	16,97	2-tridecen-1-ol	4,27	-	
	19,47	2-pentadecen-1-ol	2,64	-	
	20,45	O-decil-hidroxilamina	10,60	-	
	25,26	3,711-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol	7,52	-	
	34,59	Ácido oxálico, allil nonil éster	2,02	-	
16SC	6,74	2-metil-pentano	18,10	2-metil-pentano	53,90
	7,02	3-metil-pentano	15,00	3-metil-pentano	36,30
	7,95	Metil-ciclopentano	23,30	Etil-ciclobutano	62,50
	12,19	2-metil-ciclopentanol	14,80	2-metil-ciclopentanol	57,80
	15,09	Nonanal	5,27	6-metil-3-octeno	34,00
	16,98	1-Dodeceno	6,36	Dodecenol	18,00
	25,29	6,10-dimehil-5,9-undecadien-2-ona	6,60	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	44,20
17SC	6,75	2-metil-pentano	28,10	Heptano	37,30
	7,00	2-metil-3-(1-metiletil)-oxirano	33,60	3-metil-pentano	20,30
	7,94	Metil-ciclopentano	27,40	Metil-ciclopentano	64,40
	8,92	3-metil-hexano	6,78	3-metil-hexano	67,90

Amostra de voluntários do grupo controle - (SC= suor controle)					[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fonecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
17SC	15,09	Nonanal	7,03	-	
	16,92	1-trideceno	5,67	-	
	28,19	Hidroxitolueno butilato	16,80	6,7-dimethoxi-2,2-dimetil-12H-1-benzopirano	41,50
	29,68	1-tetradecanamina	5,09	-	
18SC	6,74	2-metil-pentano	4,71	2-metil-pentano	49,20
	7,02	2,2-dimetil-3-hidroxipropionaldeído	7,66	3-metil-pentano	28,40
	7,94	Metil-ciclopentano	26,30	Metil-ciclopentano	46,20
	12,19	3-acetonilciclopentanona	3,32	-	
	15,09	2-dodecenal	2,68	-	
19SC	6,76	O-pentil-hidroxilamina	4,88	2-metil-pentano	30,10
	7,00	3-metil-pentano	23,3	3-metil-pentano	22,50
	8,89	1-metilhexil-hidroxiperoxide	1,58	3-etil-pentano	10,40
	12,19	2,4-dimetil-1-heptanol	1,66	-	
	13,41	6-metil-5-hepten-2-ona	26,0	6-metil-5-hepten-2-ona	30,40
	15,09	2-decen-1-ol	4,31	4-isopropilciclohexilamina	28,90
	16,20	Benzenoacetaldeído	8,21	Tolueno	28,40
	16,98	Dodecanal	2,37	Dodeceno	5,92
	20,42	O-decil-hidroxilamina	5,01	-	
	22,07	4-Dodecenol	3,52	-	
	25,27	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	10,80	-	
20SC	6,75	3-metilbutil-hidroxilamina	4,23	2-metil-pentano	35,10
	7,02	2-metil-1-nitro-propano	9,19	-	
	7,94	Metil-ciclopentano	19,80	Etil-ciclobutano	46,50
	8,89	2,4-dimetil-3-pentanona	3,26	2-propeniloxi-pentano	45,50
	12,19	2-etil-hexanal	10,30	-	
	15,08	2-decen-1-ol	6,90	-	
	16,95	2-dodecenol	7,03		
	25,24	-		6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	7,05
21SC	6,76	2-metil-propil-hidroxilamina	20,90	2-metil-pentano	25,10
	7,02	3-metil-pentano	10,30	3-metil-pentano	13,90
	7,94	Metil-ciclopentano	24,60	Metil-ciclopentano	72,90
	15,09	Nonanal	8,46	1-deceno	27,50
	16,97	1-dodeceno	5,00	2-dodecenol	13,00
	25,27	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	6,52	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	7,80
22SC	6,77	2-metilpropilhidroxilamina	3,18	2-metil-pentano	52,10
	7,02	3-metil-pentano	9,04	3-metil-pentano	9,27
	7,95	Metil-ciclopentano	16,60	Metil-ciclopentano	35,40
	15,09	6-nonanal	5,08	-	
	16,97	1-dodeceno	4,20	-	
	25,27	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-on	5,99	-	
	35,05	2-metil-pentadeceno	2,00	-	
23SC	6,77	Tetrahidro-2-furanometanol	8,57	(Aminometil)ciclopropano	64,80
	7,00	3-metil-pentano	17,20	-	
	7,96	Metil-ciclopentano	11,40	Metil-ciclopentano	35,20

Amostra de voluntários do grupo controle - (SC= suor controle)					[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fonecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
23SC	9,57	Propenal dimetilhidrazona	4,93	Ácido acético, 2-propeni éster	60,00
	12,19	2-metil-ciclopentanol, acetato	20,10	2-metil-ciclopentanol, acetato	18,90
	15,09	2-decen-1-ol	4,31	-	
	16,98	Dodecanal	8,09	-	
	25,26	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	7,79	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	48,20
24SC	7,91	2,3-dihidroxipropanal	10,20	4-hidroxi-2-butanona	6,67
	12,13	3,6-dimetil-octan-2-ona	1,03	3-metil-1,4-pentadiona	24,00
	13,35	6-metil-5-hepten-2-ona	5,84	6-metil-5-hepten-2-ona	69,60
	14,09	5-etil-2,2,3-trimetil-heptano	1,35	ácido butanoico, 1,1,-dimetiletil éster	1,16
	14,40	ácido octanoico, 7-oxo	1,80	-	
	15,03	2-decen-1-ol	3,73	nonanal	7,42
	15,13	5,8-dietil-dodecano	3,52	-	
	15,53	3-octin-2-ona		6-metil-3,5-heptadien-2-ona	1,37
	16,89	dodecanal	5,60	2-undecen-1-ol	4,53
	19,36	tetradecanal	2,53	-	
	25,13	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	8,68	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	43,30
25SC	6,60	acetonitrila	5,00	acetonitrila	60,00
	7,89	acetato de etila	10,80	ácido hidroxi-acético, propil éster	65,00
	8,84	4-metil-1-penteno	4,14	-	
	9,07	5-metil-hexen-2-eno	2,90	-	
	10,16	2-pentanol	18,20	-	
	12,14	-		-	
	15,02	2-decen-1-ol	3,73	-	
26SC	6,60	acetonitrila	5,53	acetonitrila	30,40
	7,90	anidrido acético	11,10	4-hidroxi-2-butanona	16,60
	12,12	2-metil-ciclopentanol		3-etil-2-pentanona	1,05
	13,34	6-metil-5-hepten-2-ona	1,78	6-metil-5-hepten-2-ona	66,00
	14,77	3,7-dimetil-3-octanol	2,40	-	
	15,02	2-nonen-1-ol	8,57	2-decen-1-ol	6,81
	16,18	3,7-dimetil-6-octen-1-ol	1,85	-	
	16,88	10-pentadecen-1-ol	3,91	dodecenol	1,78
	22,67	ácido 2-metil-propanoico, 2-etilhexil éster	1,85	ácido 2-metil-propanoico, pentil éster	1,67
	23,07	ácido 2-hidroxi-tetranoico	3,90	ácido butanoico, heptil éster	33,00
	25,08	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	1,69	-	
27SC	7,89	ácido pentanoico, 3-metil-4-oxo	14,20	4-hidroxi-2-butanona	17,20
	12,12	lisina	1,20	2-metil-2-propen-1-ol	1,12
	13,34	6-metil-5-hepten-2-ona	5,97	-	
	14,77	2-metil-3-decanol	12,50	3,7-dimetil-3-octanol	32,00
	14,88	3,7-dimetil-1,3,7-octatrieno	1,36	-	
	15,02	2-decen-1-ol	2,84	2-nonen-1-ol	16,10
	16,86	1-decino	3,42	mentol	11,20
	23,07	ácido butanoico, octil éster	4,12	ácido 2-metil-propanoico, butil éster	54,90
	25,20	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	2,95	-	

Amostra de voluntários do grupo controle - (SC= suor controle)					[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fonecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
28SC	6,59	acetonitrila	10,30	acetonitrila	14,50
	6,95	4-metil-4-penten-2-ol	1,66	-	
	7,90	acetato de etila		propil acetato	22,20
	8,52	3,4-dimetilpentanol	4,35	-	
	8,85	2-metilpropil-hidroxilamina	1,72	2-metil-pentano	15,00
	10,41	1,5-heptadien-3-ino	1,76	1,3,5-ciclohetatrieno	32,40
	11,02	3-metil-2-butenal	9,09	3-metil-2-butenal	24,20
	11,66	-		etilbenzeno	1,12
	11,74	-		etil ciclo butano	2,00
	12,13	-		3,4-dimetil-2-hexanona	10,80
	13,34	6-metil-5-hepten-2-ona	15,60	6-metil-5-hepten-2-ona	54,70
	14,10	2-metil-decano	5,00	2,2,5-trimetil-3,4-hexadiona	34,00
	14,42	7-meti-1-nonino	1,76	-	
	15,01	2-decen-1-ol	6,69	2-nonen-1-ol	10,30
	15,52	-		3-octin-2-ona	13,50
	16,88	2-dodecen-1-ol	3,39	2-undecen-1-ol	6,80
	25,11	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	5,79	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	68,80
	29,79	indan-1,3-diol monopropionato	4,67	-	
	34,79	2-metil-1-hexadecanol	3,52	-	
29SC	6,60	acetonitrila	10,10	acetonitrila	25,40
	7,89	4-hidroxi-butanol	14,00	propil acetato	30,10
	8,11	hexano	2,68	-	
	8,25	3,5,5-trimetil-hexanal	3,68	-	
	8,48	2-metil-butano	6,86	pentano	3,44
	8,87	2-metilpropil-hidroxilamina	2,85	ácido 2-metil-propanoico, 2-propenil éster	73,90
	9,07	5-metil-2-hexeno	3,60	etil-ciclobutano	17,40
	10,40	benzenoacetamida	3,25	2-propenilideno-ciclobuteno	28,70
	11,76	xileno	3,65	xileno	7,47
	15,02	1-tridecino	3,26	1-decino	9,50
	20,34	5,8-dietil-dodecano	3,51	4,7-dimetil-undecano	18,30
	24,11	2-metil-hexadecanol	1,13	4,7-dimetil-undecano	4,77
	25,13	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	1,11	-	
	29,45	5-butil-hexadecano	2,84	-	
30SC	6,60	acetonitrila	6,30	acetonitrila	30,40
	7,90	anidrido acético	13,20	-	
	12,12	estireno	5,60	-	
	13,32	6-metil-5-hepten-2-ona	2,40	6-metil-5-hepten-2-ona	66,00
	14,77	3,7-dimetil-3-octanol	4,80	-	
	15,01	nonanal	1,04	2-decen-1-ol	12,40
	16,88	2-dodecen-1-ol	3,39	dodecenol	1,40
	20,34	5,8-dietil-dodecano	2,40	-	
	25,11	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	4,40	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	50,60
31SC	7,91	2-butanona	30,40	4-hidroxi-2-butanona	23,20
	10,40	-		tolueno	14,10
	12,13	-		2-metil-ciclopentanol	19,20

Amostra de voluntários do grupo controle - (SC= suor controle)					[Conclusão]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fonecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
31SC	13,35	6-metil-5-hepten-2-ona	6,80	6-metil-5-hepten-2-ona	34,00
	14,09	2,6,7-trimetil-decano	13,30	-	
	15,01	2-nonen-1-ol	5,40	nonanal	23,00
	16,88	decanal	17,80	2-undecen-1-ol	7,90
	25,11	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	6,80	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	79,00
32SC	6,60	acetonitrila	12,00	acetonitrila	30,10
	6,95	2-metil-butano	3,20	-	
	7,89	4-hidroxi-butanona	12,80	-	
	8,11	hexano	8,90	-	
	8,25	3-metil-pentano	2,40	-	
	8,48	2-metil-butano	1,40	metil-ciclopentano	13,80
	12,13	2-metil-ciclopentanol	13,40	-	
	13,34	6-metil-5-hepten-2-ona	5,60	6-metil-5-hepten-2-ona	47,30
	15,01	2-decen-1-ol	5,60	nonanal	13,00
	16,88	2-dodecen-1-ol	17,10	2-undecen-1-ol	7,80
	25,11	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	4,20	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	11,70

APÊNDICE 2- VOCs identificados em amostras de suor de voluntários do grupo positivo

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer - (SP= suor positivo)					[Continua...]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
1SP	6,74	2-metil-pentano	13,70	-	
	7,01	2-metil-1-nitropropano	7,11	2-propen-1-amina	32,10
	7,25	2-metil-1-nitro-propano	18,80	Ácido 4-pentenoico	4,59
	7,63	Metoxi-formamida	14,30	-	
	7,94	2-cloro-2-metil-pentano	3,56	Metil-ciclopentano	23,50
	12,18	3-metil-2,4-pentadiona	3,66	3-metil-2,4-pentanodiona	13,00
	13,05	5-metil-2-heptanol	4,23	-	
	13,07	6-metil-3-heptanona	3,21	-	
	13,30	Ácido 3-benzoilpropanoico	5,56	1-fenil-1,2-propanodiona	11,60
	13,99	3,5-dimetil-1-hexeno	11,70	2-etil-1-hexanol	45,30
	20,42	Ácido 2-propenoico ácido, 2-etilhexiléster	2,93	-	
2SP	5,35	Metil-1,2-etanotioamina	14,00	-	
	5,44	Desmetildoxepina	26,70	-	9,70
	5,76	2-metoxietanol	3,40	-	
	7,93	4-metil-4-penten-2-ol	27,39	3-metilpentano	
	7,55	4-penten-2-ol	39,55	-	
	7,61	2,3-butanodiol	29,08	-	
	7,94	1-hexanol	17,20		
	9,57	4-metil-1-penten-3-ona	4,79	Oxálico ácido, ciclopropil éster	32,50
	10,89	4-metil-2-heptanona	8,87	4-metil-2-heptanona	21,40
	12,19	3-metil-2,4-pentanodiona	4,31	3,4-dimetil-2-hexanona	9,46
	12,58	Metoxi-fenil-oxime	33,00	Metoxi-fenil-oxime	55,60
	13,99	2-etil-1-hexanol	11,00	2-etil-1-hexanol	18,00
	15,10	2-decen-1-ol	5,66	2-nonan-1-ol	11,30
	16,97	1-dodeceno	3,17	4-dodecenol	8,09
3SP	6,75	2-metilpropil-hidroxilamina	14,40	2-metil-pentano	38,20
	7,03	3-metil-pentano	9,10	3-metil-pentano	23,00
	7,94	Ciclopentano	31,20	Etil-ciclobutano	23,20
	8,91	3-metil-hexano	3,50	Ácido butanoico, 2-propenil éster	47,00
	10,45	-		Feniletil álcool	6,30
	12,20	2,5-hexadieno-3,4-diol	1,87	Ácido acético, 1-metilciclopentil éster	12,10
	13,99	3,5-dimetil-1-hexeno	8,21	2-etil-1-hexanol	13,50
	15,07	10-undecenal	4,55	1-deceno	5,00
	15,37	Benzoilpropanoico ácido	4,30	Ácido benzoico, metil éster	7,70
	16,96	9-Tetradecen-1-ol	5,55	-	
	20,44	Ácido 2,2-dimetil-propanoico, octil éster	3,33	-	
4SP	5,76	2-metoxietanol	26,88	-	
	6,74	3-hidroxi-butanal	6,51	-	3,10
	7,02	2-metil-1-nitro-propano	11,70	Propen-1-amina	24,30
	7,41	1,3-butadien-1-ol	8,90	2,5-dihidro-furano	65,20
	7,95	4-hidroxi-2-butanona	21,10	Etil-ciclobutanona	68,80
	8,92	3-metilhexano	10,10	-	
	11,09	3-etil-2-metil-1-penteno	2,92	2,3,3-trimetil-1-hexeno	9,50
	12,18	Trimetilhexano	2,75	2-metil-ciclopentanol	37,70
	13,41	-		6-metil-5-hepten-2-ona	5,85
	13,63	10-pentadecen-1-ol	3,99	1,1- dietilmetil-ciclohexano	44,60
	13,99	2-etil-1-1-hexanol	11,30		
	15,07	2-nonan-1-ol	3,50	-	

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer - (SP= suor positivo)					[Continuação]
Amostra	Tempo de retenção (minutos)	Identidade fornecida NIST08	Probabilidade (%)	Identidade fornecida AMDIS	Probabilidade (%)
4SP	16,96	Dodecanal	4,57	2-dodecenol	6,65
5SP	6,64	Acetonitrila	47,10	Acetonitrila	56,00
	6,81	-		2-metil-pentano	46,70
	7,62	1-metoxi-1-propanol	26,29	-	
	7,95	1-hexanol	17,20	1-hexanol	12,00
	12,18	2-metil-ciclopentanol, acetate	7,26	3,4-dimetil-2-hexanona	20,30
	13,60	2-metil-2-octeno	2,27	-	
	13,98	2-etil-1-hexanol	5,84	2-etil-1-hexanol	25,20
	15,09	2-decenal	2,04	1-dodeceno	11,00
	16,97	9-tetradecen-1-ol, acetate	2,17	-	
	20,44	Ácido carbônico, isobutil nonil éster	23,10	-	
	22,25	2,4,6-trimetil-decano	2,08	-	
6SP	7,02	3-metilpentano	14,40	3-metil-pentano	11,70
	7,44	2-metil-1-buten-3-ina	5,69	-	
	7,61	Metoxi-formamida	15,60	Glicoaldeído, dimetil acetal	80,40
	7,94	1-hexanol	7,00	4-metil-1-penteno	28,90
	8,58	2-metil-1-penteno	9,09	-	
	12,20	2,4-dimetil-1-heptanol	1,64	-	
	12,58	Metoxi-fenil-oxime	18,80	-	
	13,08	2-butanodiamida	5,08	-	
	13,29	1-fenil-1,2-propanodiona	5,89	-	
	13,99	2-etil-1-hexanol	16,90	2-etil-1-hexanol	23,00
	16,95	Dodecanal	4,51	-	
7SP	6,70	Dissulfeto de carbono	57,00	-	
	7,96	1-hexanol	7,92	4-metil-1-penteno	64,40
	8,91	Heptanal	3,04	Ácido acético,2-propenil éster	34,30
	9,24	1-etoxi-1-propoxietano	4,12	-	
	10,46	Benzeno acetaldehide	5,90	-	
	10,64	Metilfluoracetamida	95,40	Metilfluoracetamida	95,50
	11,01	2-butoxi-3,4-dihidropiran	2,08	-	
	12,20	2-metil-ciclopentanol, acetate	4,35	2-metil-ciclopentanol, acetate	23,40
	12,29	2-nonan-1-ol	3,70	-	
	13,41	6-metil-5-hepten-2-ona	57,10	-	
	13,60	Undecanal	3,18	10-metil-4-undeceno	5,83
	13,76	Limoneno	8,22	-	
	13,93	3,5-dimetil-1-hexeno	4,21	2-etil-1-hexanol	28,00
	14,04	2-metil-1-trideceno	4,43	-	
	14,23	Fenol	45,00	Fenol	26,00
	12,22	-		1,3-dihidro-2 h-inden-2-ona	16,00
	15,09	2-decen-1-ol	12,90	2-decen-1-ol	8,90
	16,97	Dodecanal	6,73	Dodecanal	7,00
	19,18	-		Nonanoico ácido, metil éster	2,50
	20,45	O-decilhidroxilamina	4,80	Tridecano	5,90
	25,24	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	4,64	-	
	27,21	Ácido 2-metil-dodecanoico	11,50	Ácido dodecanoico, metil éster	6,50
8SP	6,69	Dissulfeto de carbono	57,0	Tiourea	22,80
	7,96	1-hexanol	7,05	Propil-acetate	
	9,14	2-metil-1-penteno	6,13	Formic ácido butil éster	7,80
	10,64	2,2,2-trifluormetil-acetamida	77,20	2,2,2-trifluorometil-acetamida	96,30
	11,01	Octanal	6,35	2,2,3-trimetil-pentano	5,52
	12,19	Lisina	5,36	3-metil-2-heptanona	28,70
	12,30	2-decenal	3,51	3,5-dimetil-2-octano	4,00

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer - (SP= suor positivo)					[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
8SP	13,60	1-undeceno	2,00	-	
	13,94	2-etil-1-hexanol	14,00	2-etil-1-hexanol	35,10
	14,79	Álcool benzílico	27,00	Álcool benzílico	56,00
	15,09	2-undecen-1-ol	4,17	Nonanal	27,00
	20,24	Ácido hexanodioico, dioctil éster	20,30	-	
	27,20	Ácido 2-metil decanoico	16,50	Ácido dodecanoico, metil éster	52,60
9SP	7,44	Dimetil ceteno	8,01	-	
	7,95	4-penten-2-ona	9,35	-	
	8,92	2,2-dimetil butano	2,40	-	
	9,13	3-pentenil amina	7,86	-	
	10,63	2,2,2-trifluormetilacetamida	87,00	-	
	11,00	4-isopropil ciclo hexil amina	5,25	Hexanal	10,00
	12,19	2-metil-ciclopentano, acetato	15,20	2-metil-ciclopentano, acetato	31,60
	12,32	2-nonenal	6,08	-	
	13,41	5-hepten-2-ona	24,90	-	
	13,48	-		2,6-dimetil-3-octeno	6,60
	13,98	3,5-dimetil-1-hexeno	4,25	2-etil-1-hexanol	14,00
	14,07	3-deceno	3,35	-	
	14,76	Álcool benzílico	22,80	Álcool benzílico	48,00
	15,10	2-undecen-1-ol	4,17	Undeceno	7,94
	16,97	Dodecanal	4,98	Dodecen-1-ol	21,80
	27,19	Ácido 2-metil-dodecanoico	8,70	Ácido dodecanoico, metil éster	8,00
10SP	7,80	Ácido hidrazoico	57,50	Ácido hidrazoico	68,40
	7,95	1-hexanol	6,57	Etil ciclobutano	51,00
	8,92	3-metil butanal	6,97	3-propoxi 1-propeno	46,80
	9,13	2-ciclopropil propano	13,80	-	
	9,44	2,4-dimetil-3-pentanona	9,47	Ácido acético etenil éster	45,40
	11,91	Etil ciclobutano	5,70	Etil ciclobutano	55,80
	12,20	-		2-etil butanal	61,10
	13,40	6-metil-5-hepten-2-ona	10,10	Ácido acético, etil éster	16,30
	13,63	1-undecino	2,97	Fenilglioxal	9,62
	13,77	Limoneno	5,20	Dimetil sulfona	75,00
	13,94	2-etil-1-hexanol	3,93	4,4-dimetil-1-penteno	74,70
	14,06	1-undecanol	2,04	Ácido 2-propenoico, 2-metil-etenil éster	36,30
	15,11	Z-4-dodecanol	11,10	4-isopropilcicloheilamina	19,80
	16,12	Ácido hexanoico, butil éster	14,90	Ácido exanoico, butil éster	59,00
	17,06	Ácido butanoico, 2-metil-, hexil éster	28,70	2,6,7-trimetildecano	66,30
	21,13	Ácido hexanoico, hexil éster	26,50	Ácido hexanoico, butil éster	61,60
11SP	7,03	O-n-butilhidroxilamina	10,40	3-metil pentano	10,30
	7,80	1,3-dicloro-2-propanol	29,80		
	7,95	Metil-ciclopentano	41,30	Etil ciclobutanona	48,00
	8,58	2-cloro-2-metilhexano	3,98	-	
	8,92	1-Imidazol-1-il-2-metilpropan-1-ona	11,30	-	
	9,03	Acetaminde, oxime	7,04	-	
	9,59	Nitro-benzeno	2,28	-	
	12,21	1-nonan-3-ol	3,06	2-metilciclopentil acetate	31,40
	13,14	5-metil-3-heptina	6,47	-	
	13,40	6-metil-5-hepten-2-ona	30,70	6-metil-5-hepten-2-ona	27,10
	13,48	6-metil-1-heptanol	4,89	-	
	13,63	Undecano	3,00	-	
	13,77	Limoneno	3,00	-	
	13,94	5-butoxi-2-penteno	2,70	-	

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer - (SP= suor positivo)					[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
11SP	14,06	3,3-dimetil-1-octeno	7,59	3,3,6-trimetil-1,5-heptadieno	2,00
	14,13	4-nonano	3,20	-	
	14,78	Álcool benzílico	16,10	Álcool benzílico	6,32
	15,11	Nonanal	4,56	Nonanal	26,10
	16,95	Decanal	4,49	3-tetradecino	8,70
	18,76	2-fenoxi etanol	32,80	2-fenoxi-etanol	92,2
	20,44	2,2,3-trimetil-nonano	4,50	-	
	25,31	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	3,84	-	
12SP	7,94	Etil-ciclobutano	16,60	Etil-ciclobutano	51,00
	8,85	2-metil pentanal	3,05	-	
	11,91	1-hexanol	5,11	Propil-ciclopropano	59,50
	12,19	3-metil-2-hexanona	5,35	3,4-dimehtil-2-hexanona	60,00
	13,40	2-metil-1-pentanol, acetato	4,49	-	
	13,77	Limoneno		2-metil-6-metilleno 1,7-Octadieno	11,30
	13,94	2-etil-1-hexanol	4,09	-	
	14,50	2-butil-ciclohexanona	3,08	-	
	15,09	3-metil-6-hepten-1-ol	4,00	4-isopropilcicicloxilamina	23,70
	16,11	Ácido hexanoico, butil éster	28,30	Ácido hexanoico, butil éster	86,30
	17,06	Ácido 2-metil-butanoico, hexil éster	47,30	Ácido 2-metil-butanoico, hexil éster	69,50
	17,80	Ácido hexanoico, hexil éster	32,90	2,6,7-trimetildecano	67,30
	25,27	-		6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	61,90
13SP	6,67	Acetronitrila	60,80	Acetronitrila	86,10
	7,94	4-hidroxi-2-pentanona	3,20	1-nitropropano	39,10
	12,20	2-metil ciclopentanol	6,80	-	
	12,56	-		1-metil-2-fenoxietilamina	1,10
	13,39	1-octin-3-ol	5,90	6-metil-5-hepten-2-ona	1,50
	13,59	Octanal	3,50	-	
	13,91	3,5-dimetil-1-hexeno	5,60	2-etil-1-hexanol	24,00
	14,02	2-undeceno	2,40	-	
	14,48	2,7-dimetil-1,7-octanodiol	5,30	8-metil-1,8-nonanodiol	19,00
	15,08	Decanal	4,80	2-decen-1-ol	4,20
	16,45	Ácido 2-metil-2-butenodioico	3,70	-	
	16,95	Dodecanal	6,50	Ácido heptanoico, 3-hexenil éster	41,30
	23,16	Ácido propanoico, 2-etilhexil éster	2,20	-	
	25,23	6,10-dimetil,5,9-undecadien-2-ona	2,80	-	
14SP	6,65	Acetonitrila	34,0	Acetonitrila	18,00
	7,02	3-metil-pentano	7,90	4-metil-hexeno	18,40
	7,42	2-butenal	6,00	-	
	7,93	4-metil-10pentanol	7,20	1-hexanol	11,40
	8,89	3-metilbutil-hidroxilamina	8,10	Ácido propanoico, 2-propenilester	61,90
	10,18	Ácido carbônico, etil metil éster	3,00	-	
	10,61	Tramadol	3,20	2,2,2-trifluormetilacetamida	88,90
	11,00	Hexanal	3,00	-	
	12,20	-		2-metil ciclopentanol, acetato	67,80
	13,39	5-metil-5-hepten-2-ona	10,20	-	
	13,61	2-benzoilloxi propanal	6,00	-	
	13,93	2-etil-1-hexanol	3,40	-	
	14,04	5-metil-5-undeceno	1,80	-	
	14,13	2-noneno	3,30	-	
	14,22	Fenol	12,60	-	
	15,08	2-decen-1-ol	3,60	-	

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer - (SP= suor positivo)					[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
14SP	16,96	1-dodecino	2,50	-	
	19,19	Ácido heptadecanoico, metil éster	1,30	-	
	27,18	Ácido 12-metil tetranoico, metil éster	7,40	-	
	30,29	Ácido 2-hidroxi-hexadecanoico, metil éster, acetato	2,50	-	
15SP	7,94	Isociano butano	5,98	Ácido tioacético	28,20
	8,89	2,4-dimetil-3-pentanona	1,14	-	
	12,18	Lisina	5,22	3-metil-2,24-pentanodiona	18,50
	13,37	6-metil-5-hepten-2-ona	4,39	6-metil-5-hepten-2-ona	62,20
	13,91	Decanal	2,30	2-etil-1-hexanol	1,40
	14,02	2-etil-hexeno-1-ol	1,66	-	
	15,06	2-decen-1-ol	2,82	2-none-1-ol	9,55
	16,94	Dodecanal	4,22	-	
	25,21	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	4,80	-	
16SP	6,64	Acetonitrila	28,40	Butanonitrila	71,80
	7,02	3-metil-2-pentanol	4,74	2-propen-1-amina	15,40
	7,92	1-hexanol	5,98	Ácido acético, hexil éster	51,70
	8,89	2,2-dimetil-1-butanol	4,21	Pirrolidina	36,00
	10,99	2-hexen-1-ol	2,00	3-metil-pentano	5,62
	12,20	Estireno	11,80	-	
	13,10	2-pentilfurano	7,18	-	
	13,59	1,2-ciclopentanodiol	5,28	-	
	13,92	2-etil-1-hexanol	2,13	-	
	14,04	1,4-diclorobenzeno	24,00	-	
	14,94	2-metil-2-butenodiamida	5,69	-	
	16,93	Dodecanal	4,44	-	
	18,72	Fenoxi propoxi metano	8,64	-	
	25,26	Ácido decanoico, metil éster	1,56	-	
17SP	6,63	Acetonitrila	19,60	Acetonitrila	66,00
	7,62	1-metoxi-2-propanol	31,00	4-hidroxi-2-butanona	14,80
	7,94	1-hexanol	8,89	4-hidroxi-2-butanona	14,80
	8,19	4-metil-4-penten-2-ol	6,73		
	8,89	3-metil-hexano	6,70	Pirrolidina	57,30
	10,44	Benzenoacetaldeído	2,98	1,3,5-cicloheptatrieno	20,00
	10,61	4-ciano-metil-butanamida	2,18		
	11,00	2-hexanol	7,62		
	11,72	Etilbenzeno	21,30	Etilbenzeno	32,90
	12,19	-		3,4-dimetil-2-hexanona	18,70
	13,74	Limoneno	4,65		
	13,93	5,5-dimetil-2-hexeno	4,11	2,2,4-trimetil-hexano	18,20
	14,04	1,3-diclorobenzeno	8,69	1,2-diclorobenzeno	22,30
	14,48	1-dodecino	1,68	1-ciclohexil-2-propanona	1,14
	15,08	2-decen-1-ol	3,31	2-dodecenol	8,66
	16,96	Dodecanal	5,46		
18SP	6,67	Dissulfeto de carbono	56,40	Dissulfeto de carbono	96,10
	7,00	1-butanol	5,56	2-propen-1-amina	36,90
	7,94	1-hexanol	22,30	Amil nitrito	19,20
	8,89	3-metil-pentanal	3,27	Ácido 2-metilpropanoico, 2-propenil éster	76,50
	10,98	Hexanal	3,05	Hexanal	68,20
	12,18	2-metil ciclopentanol, acetato	3,40	2-metil ciclopentanol, acetato	49,20

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer - (SP= suor positivo)					[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
18SP	13,10	2-pentilfurano	7,70	2-pentilfurano	74,20
	13,39	6-metil-5-hepten-2-ona	17,30	5-metileno-9-decen-2-ona	1,76
	13,45	Isooctanol	4,28	Isooctanol	44,90
	13,59	Octanal	3,78	5-metil-1-hexeno	2,98
	13,74	Diidrocarveol	2,14	-	
	13,91	2-etil-1-hexanol	4,82	2-etil-1-hexanol	8,12
	14,02	3,3-dimetil-1-octeno	3,54	4-metil-1-deceno	10,50
	14,12	6-metil-1-heptanol	6,29	-	
	14,48	3-deceno	3,50	-	
	15,06	Nonanal	17,50	2-decen-1-ol	6,31
	16,94	Decanal	7,38	3-dodecino	4,98
	18,72	2-fenoxietanol	7,80	2-fenoxietanol	95,40
	19,06	Fenoxi propoxi metano	4,90	-	
	25,21	6,10,14-trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona	5,61	-	
19SP	7,36	Ácido fórmico, 1-metiletil éster	13,00	(1-metiletil)-hidrazina	28,00
	7,77	Anidrido acético	3,71	Anidrido acético	24,80
	7,92	Acetato de etila	78,70	Acetato de etila	71,60
		4-hidroxi-2-butanona	6,94	4-hidroxi-2-butanona	13,90
	8,18	1,1-di-2-propenil-hidrazina	8,02	-	
	9,36	1-metiltio-1-propeno	35,50	1-metiltio-1-propeno	56,10
	9,45	Parametadiona	4,61	-	
	9,55	1,1-dietoxi-etano	79,20	1,1-dietoxi-etano	96,10
	10,16	3-metil-1-butanol	9,87	-	
	11,40	Ácido butenoico, etil éster	9,44	Ácido butenoico, etil éster	66,50
	12,18	2-metil ciclopentanol, acetato	5,90	-	
	13,45	6-metil-1-heptanol	2,08	-	
	13,74	Limoneno	9,16	Limoneno	22,50
	13,91	2-etil-1-hexanol	8,32	2-etil-1-hexanol	45,00
	14,02	7-metil-1-octeno	2,21	-	
	14,10	1-metil-4(1-metiletil)-1,4-ciclohexadieno	4,35	-	
	15,01	2-nonen-1-ol	4,50	-	
	16,96	Dodecanal	3,60	-	
20SP	6,64	Acetonitrila	29,50	Butanonitrila	58,20
	7,00	2-metil-1-nitropropano	3,72	2-propen-1-amina	29,70
	7,42	Ácido 2-propinoico, metil éster	3,74	-	
	7,92	3-metil-1-pentanol	8,75	1-hexanol	16,20
	8,17	2-propenil-acetamida	6,74	-	
	8,28	Ácido dicloroacético, butil éster	15,40	Triclorometano	37,50
	10,99	2-hexen-1-ol	3,20	Hexanal	7,81
	12,20	2-metil ciclopentanol	10,60	-	
	13,37	1-hexanol	4,90	1-hexanol	7,01
	13,59	Octanal	3,04	-	
	13,74	Limoneno	5,87	Limoneno	13,50
	13,91	1-heptanol	2,07	2,2-dimetilhexano	3,26
	14,14	Decil-hidroxilamina		Decano	3,29
		Undecano		-	
	14,30	Ácido oxálico, alil nonil éster	3,20	2,3-octanodiona	20,90
	14,97	Tert-butil-3-metilbutildissulfeto	3,98	-	
	15,06	2-undecen-1-ol	6,41	1-decino	10,90
	15,25	3-metil-undecano	1,36	-	
	15,69	2,3-dimetildecano	7,81	4-metil-1-undeceno	6,04

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer - (SP= suor positivo)					[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
20SP	15,96	2-butil-1-octanol	2,86		
	16,67	-		-	
	16,94	Dodecanal	3,68	-	
	17,11	2,6,7-trimetil-decano	3,08	-	
	17,96	Ácido oxálico, isobutil nonil éster	4,09	3,7-dimetil-undecano	6,91
	19,19	2,6,7-trimetil-decano	2,11	-	
	20,41	2,3,5,8-tetrametil-decano	2,82	Ácido oxálico, isobutil nonil éster	5,69
21SP	6,63	Acetonitrila	19,60	Acetonitrila	24,00
	7,00	Butilhidroxilamina	5,81	2-metil-1-butanol	5,12
	7,42	Metacroleína	12,60	-	
	7,92	1-hexanol	6,89	Propil ciclopropano	24,50
	8,89	2-metil-butanal	2,84	3-propoxii-1-propeno	24,70
	10,44	Tolueno	6,40	-	
	10,61	Ácido-2-metil-2-propenoico-2(dimetilamino) etil éster	3,55	-	
	10,99	Hexanal	9,17	Hexanal	11,30
	12,19	2-metil-ciclopentano, acetato	13,40	-	
	12,35	Ácido 4-metilpentanoico, metil éster	7,81	Ácido hexanoico, metil éster	24,00
	13,39	5-metil-5-hepten-2-ona	49,90	5-metil-5-hepten-2-ona	72,50
	13,59			4-isopropilciclohexamina	32,80
	13,76	Ácido 2-etilhexanoico, metil éster	30,50	Limoneno	1,48
	13,91	2-etil-1-hexanol	2,04	2-etil-1-hexanol	8,89
	14,04	1,3-diclorobenzeno	47,40	1,3-diclorobenzeno	39,00
	14,21	Fenol	52,70	Fenol	49,30
	14,48	1-dodecino	2,22	2,5-dimetil-7-octen-2-ol	32,20
	14,67	-		Ácido 2-metil-hexanoico, etil éster	21,40
	14,76	-		-	
	15,07	2-decen-1-ol	3,36	2-decen-1-ol	7,35
	15,40	2-undecenal	5,11	3-metil-heptil-acetato	9,28
	16,94	Decanal	7,75	1-dodecino	2,08
	17,08	9-metil-5-undeceno	2,51	-	
	18,36	3-dodeceno	2,12	-	
	20,42	Tetradecano	2,17	-	
	27,15	Ácido 2-metil dodecanoico	11,90		
22SP	7,94	Ácido acético, butil éster	3,25	Amil nitrito	13,90
	12,20	2-metil-ciclopentano, acetato	4,46	2-metil-ciclopentanol	6,32
	13,60	Ftalaldeído	2,50	-	
	13,97	5,5-dimetil-2-hexeno	3,01	-	
	14,21	Fenol	36,60	Fenol	59,40
	14,48	3,7-dimetil-1,7-octanodiol	5,07	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	27,20
	15,08	Nonanal	6,76	1-decino	5,24
	16,96	Decanal	5,77	-	
	17,70	2,6,7-trimetil-decano	2,88	2,5,9-trimetil-decano	6,88
23SP	6,60	Acetonitrila	40,00	Acetonitrila	12,50
	6,98	3-metil-pentano	2,34	-	
	7,19	2,3-dimetil-pentano	4,27	-	
	7,89	2,3-hidroxipropanal	4,20	Anidrido acético	2,91
	8,09	4-metil-1-hexeno	2,33	-	
	8,25	5-metil-5-hexen-3-ol	1,93	-	
	8,52	2-ciclopropil-propano	3,99	2-metil-1-penteno	21,80
	8,85	2-metilpropil-hidroxilamina	4,35	3-metil-hexano	3,65
	9,08	Etil-ciclobutano	3,02	Diidro-3-metil-2-furanona	52,50

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer - (SP= suor positivo)					[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
23P	9,51	Pentanal	1,69	-	
	10,41	-		2-proprenilideno-ciclobuteno	21,40
	10,58	2,2,2-trifluoro-metil-acetamida	39,70	-	
	10,95	Hexanal	12,90	Hexanal	59,00
	11,37	Acetamidoacetaldeído	1,95	-	
	11,68	Etilbenzeno	35,20	Etilbenzeno	61,90
	12,15	Estireno	13,50	Ácido fenilbutanodioico	52,90
	12,16	Heptanal	1,88	Estireno	25,00
	13,05	-		3-metil-3-penten-3-ino	8,06
	13,35	6-metil-5-hepten-2-ona	2,09	Isopropil dissulfeto	1,60
	13,54	1-undecino	2,91	2,4-dimetil-1-hexeno	4,06
	13,86	2-etil-1-hexanol	2,91	-	
	13,98	Diclorobenzeno	2,04	-	
	14,17	Fenol	34,90	Fenol	42,80
	14,43	Ácido tetradecenoico	1,44	3-etil-2-metil-2-pentanol	1,02
	15,02	2-decen-1-ol	2,42	1-decino	6,37
	16,88	11-dodecenol	3,88	1,10-decanodiol	5,45
	25,16	Ácido 11-decanoico, etil éster	1,32		
	27,05	Ácido 14-metil-hexadecanoico, metil éster	3,90	Ácido 2-metil-dodecanoico	37,10
24SP	6,61	Acetonitrila	12,60	Acetonitrila	40,10
	6,94	-		2-propen-1-amina	19,50
	7,77	2-metilpropil-hidroxilamina	12,20	Anidrido acético	2,91
	7,90	Ácido acético, pentil éster	13,30	-	
	8,16	Hexano	7,50	-	
	8,26	2,4-dimetilpentano	1,97	-	
	8,52	Metil-ciclopentano	10,10	2-metil-1-penteno	20,30
	8,86	2,4-dimetil-3-pentanona	2,60	2,3,4-trimetilpentano	37,80
	9,08	2-buteno	6,61	3,3-dimetil-oxetano	18,90
	9,51	2-buten-1-ol	1,55	-	
	10,40	Benzenoacetaldeído	6,60	Tolueno	8,82
	10,59	2,2,2-trifluoro-metil-acetamida	18,00	-	
	10,96	Hexanal	9,30	Hexanal	48,60
	11,67	Etilbenzeno	30,10	Etilbenzeno	66,90
	12,15	Estireno	11,10	2-metil-ciclopentanol, acetato	45,80
	12,26	Ácido hexadecanoico, metil éster		-	
	13,06	-		2-pentilfurano	6,72
	13,35	6-metil-5-hepten-2-ona	8,31	6-metil-5-hepten-2-ona	58,80
	13,54	-		Octanal	43,50
	13,70	Limoneno	6,70	-	
	13,87	5-metil-2-hepteno	1,76	-	
	13,98	1,3-diclorobenzeno	6,61	-	
	14,07	5-metil-1-heptanol	1,70	-	
	14,17	Fenol	11,60	Fenol	58,90
	14,44	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	19,60	-	
	15,02	3-nonen-1-ol	2,18	1-decino	18,80
	16,88	1-undecino	1,93	2-dodecenol	1,69
	18,69	2-fenoxietanol	2,75	-	
	25,15	Ácido 16-octadecanoico, metil éster	2,01	-	
	27,07	Ácido hexadecanoico, metil éster	4,99	Ácido 2-metil-dodecanoico	44,30
25SP	6,61	Acetonitrila	5,10	Acetonitrila	10,60
	7,75	Diacetil sulfeto	7,52	Anidrido acético	32,00

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer - (SP= suor positivo)					[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
25SP	7,90	4-hidroxi-2-butanona	4,07	4-hidroxi-2-butanona	7,09
	8,15	2-etil-1,3-butanonitrila	1,55	-	
	8,85	4-metil-2-hexanona	3,55	2-metil-pentanal	18,80
	9,51	Pentanal	1,20	-	
	10,41	-		Tolueno	4,55
	10,96	Hexanal	25,40	Hexanal	79,80
	12,13	2-metil ciclopentanol, acetato	25,80	2-metil-ciclopentanol, acetato	40,50
	12,25	Heptanal	3,15	3-metil-hexanal	56,20
	13,07	2-pentil furano	20,70	2-pentilfurano	79,50
	13,35	6-metil-5-hepten-2-ona	1,46	Isopropil dissulfeto	1,12
	13,55	Octanal	7,41	Octanal	3,53
	13,77	Limoneno	4,31	-	
	13,88	2-etil-1-hexanol	2,10	-	
	13,97	3-deceno	5,70	-	
	14,10	2,6,7-trimetil-decano	2,07	-	
	14,44	4-deceno	1,50	3-metil-1-hepteno	2,29
	14,49	1-undecino	1,96	-	
	15,03	2-decen-1-ol	2,16	-	
	16,11	2-pentil-1-hepteno	1,08	3,5-dimetil-1-hexeno	1,46
	16,18	1,12-tridecadieno	1,65	-	
	16,89	Dodecanal	1,82	-	
	19,17	3,7,11-trimetil-1-dodecanol	1,20	-	
	19,38	2-hexil-tetrahidrofurano	2,25	-	
	20,36	5,8-dietil-dodecano	1,28	2,6,10-trimetil-dodecano	1,15
	23,09	2-metil-1-hexadecanol	4,19	-	
	25,16	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	1,11	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	9,88
26SP	6,60	Acetonitrila	6,80	Acetonitrila	7,50
	7,89	4-hidroxi-2-butanona	10,10	Ácido hidroxi-acético, propil éster	50,30
	8,13	4-metil-1-hexeno	4,84	-	
	8,24	2,4-dimetil-pentano	1,73	-	
	8,52	Metilciclopentano	19,20	2-metil-penteno	33,50
	8,86	3-metil-hexano	11,20	3-metil-hexano	62,20
	9,06	2-metilciclopropiil-propano	2,96	Etil-ciclobutano	1,04
	10,40	Tolueno	6,31	Tolueno	6,04
	10,58	4-ciano-metil-butanamida	1,11	-	
	11,67	Etilbenzeno	53,30	Etilbenzeno	58,20
	12,14	Estireno	13,70	Estireno	23,10
	13,34	-		3-etilideno-1-metil-ciclopenteno	1,34
	13,55	Octanal	1,70	1-fenil-1,2-propanodiona	6,69
	13,69	Limoneno	1,10	1-propenil-ciclopropano	35,90
	13,87	3,35-dimetil-1-hexeno	1,56	-	
	13,90	1,3-diclorobenzeno	24,00	-	
	14,17	Fenol	5,60	Fenol	44,50
	14,44	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	2,30	-	
	15,03	2-decen-1-ol	2,00	Decanal	10,50
	16,89	Dodecanal	1,27	Dodecanol	7,00
	20,35	5,8-dietil-dodecano	1,82	-	
	25,16	Ácido 14-metil-hexadecanoico, metil éster	3,54	Acetohidrazida	71,60
	27,03	Ácido heptadecanoico, metil éster	3,07	Ácido 10,13-dimetil-tetradecanoico, metil éster	50,30
27SP	6,66	Acetonitrila	9,49	Acetonitrila	19,00
	7,89	4-hidroxi-2-butanona	6,38	4-hidroxi-2-butanona	2,86
	8,14	4-metil-4-penten-2-ol	3,49	-	
	8,25	2,2,3-trimetil-butano	1,69	-	

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer - (SP= suor positivo)					[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
27SP	8,86	2-metilpropil-hidroxilamina	2,46	Ácido 2-metil-2-propenil-propanoico	34,90
	9,09	-		1-buteno	1,00
	10,41	-		Tolueno	19,30
	11,68	Etilbenzeno	26,50	Etilbenzeno	53,50
	12,17	Estireno	10,80	Estireno	27,20
	13,35	-		1,3,5-octatrieno	1,58
	13,54	Octanal	1,20	-	
	13,70	Limoneno	1,10	Ciclopenteno	17,80
	13,88	2-etil-1-hexanol	3,63	2-etil-1-hexanol	5,50
	13,98	-		Diclorobenzeno	38,80
	15,07	2-decenal	1,28	1-decino	17,10
	16,82	1-undecino	1,77	2,6-dimetil-2,6-octadieno	1,54
	16,88	1,8-dodecadieno	1,13	Dodecenol	3,91
	20,19	-		4-hidroxi-2-metil-acetofenona	9,24
	25,16	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	1,36	-	
28SP	6,63	2-metil-pentano	1,40	-	
	6,98	Ácido fórmico, 2-propenil éster	1,67	-	
	7,64	1-metoxi-3-hexeno	1,06	-	
	7,90	Ácido acético, butil éster	2,40	-	
	8,15	3-metil-ciclopentanol	3,94	-	
	8,26	2,4-dimetil-1-hexeno	1,87	-	
	8,53	2-metil-1-noneno	1,65	-	
	8,87	3-metil-ciclopentanol	1,73	-	
	10,41	Benzilindol	5,77	Tolueno	5,90
	10,96	Hexanal	12,50	Hexanal	7,60
	11,02	3-metil-butenal	4,99	-	
	11,67	Etilbenzeno	1,17	-	
	12,14	2-metil-ciclopentanol, acetato	29,40	-	
	12,24	Heptanal	2,48	-	
	12,45	3,4-dimetil-fenol	8,21	3,4-dimetil-fenol	11,20
	13,07	3-isobutil-ciclohexeno	1,94	-	
	13,36	6-metil-5-hepten-2-ona	18,80	6-metil-5-hepten-2-ona	22,00
	13,55	Octanal	12,10	-	
	13,98	3,3-dimetil-1-octeno	3,05	2-etil-1-hexanol	5,40
	14,07	3,3-dimetil-2-octeno	2,28	1-undecino	9,20
	14,44	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	7,70	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	11,00
	14,70	5-metil-5-hexen-3-in-2-ol	1,21	-	
	15,02	2-decen-1-ol	2,46	2-nonen-1-ol	9,50
	16,89	Dodecanal	1,44	2-decen-1-ol	9,60
	19,39	2,4-dodecadienal	1,92	-	
	21,83	2,5-pentadecadien-1-ol	1,69	-	
	25,13	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	23,60	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	26,00
29SP	7,75	Anidrido acético	11,90	-	
	7,91	4-hidroxi-2-butanona	11,60	Butano	1,73
	8,85	3-metil-butanal	11,30	3-metil-butanal	71,80
	10,95	Hexil hidroperóxido	1,40	-	
	11,96			2-metil-pirrol	57,60
	12,13	2-metil-ciclopentanol, acetato	10,10	2-metil-propanal	82,80
	13,07	1-butil-pirrol	1,47	-	
	13,34	3-isopropenil, 1,2-dimetilciclopentanol	1,20	-	
	13,56	Benzaldeído	5,21	Fenilglioxal	9,46

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer - (SP= suor positivo)					[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
29SP	13,88	2-etil-1-hexanol	3,36	2-etil-1-hexanol	1,96
	13,98	3-metilpenta-1,3-dieno	1,30	2-metil-3-butin-2-ol	29,80
	14,07	1,2-ciclopentanodiol	1,14	-	
	14,79	2-propenildieno-ciclobuteno	1,62	1,6-heptadien-3-ino	20,50
	15,03	1,9-nonanodiol	2,77	1-decino	8,03
	15,43	-		Metil-vinil-cetona	83,20
	16,88	Dodecanal	4,85	Dodecenol	5,31
	17,64	2-metil-undecano	1,23	3,7-dimetil-nonano	1,87
	20,35	Tetradecano	1,49	2,5,9-trimetil-decano	1,01
	25,13	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	13,30	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	30,30
	27,80	Metil-octadec-6,9-dien-12-inoato	1,64	-	
30SP	6,58	Dissulfeto de carbono	2,10	-	4,00
	7,75	Anidrido acético	33,70	-	
	7,91	4-hidroxi-2-butanona	4,79	4-hidroxi-2-butanona	28,40
	8,26	2-etil-4-metil-1-pentanol	1,05	-	
	8,48	Ácido 3-metil-butanoico	4,54	1,3-butanodiol	1,77
	8,86	5-metil-hexanal	1,82	3-metil-butanal	8,67
	8,97	1,2-ciclopentanodiol	1,25	-	
	10,40	Tolueno	3,60	Tolueno	10,70
	10,58	-		-	
	11,67	Etilbenzeno	14,70	Etilbenzeno	43,10
	12,15	Estireno	6,78	Estireno	24,70
	12,24	-		2-hexen-2-ona	72,10
	13,07	2-pentilfurano	1,83	-	
	13,43	6-metil-1-heptanol	1,04	-	
	13,54	Ácido benzoico	4,59	Trimetil-pirazina	94,80
	13,87	3,5-dimetil-1-hexeno	4,03	5-metil-2-hepteno	16,80
	13,97	5-deceno	1,59	-	
	14,17	Fenol	16,10	Fenol	57,50
	14,65	Tetrametil-pirazina	72,90	Tetrametil-pirazina	91,50
	15,03	6-nonenal	13,00	1,6-hexanodiol	6,22
	15,22	3-metil-undecano	2,10	-	
	16,88	Dodecanal	2,76	2-octenal	6,57
	25,12	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	3,72	-	
31SP	6,60	Acetonitrila	3,50	Acetonitrila	4,60
	7,90	2,3-dihidroxi-propanal	7,75	-	
	8,26	4-metil-1-hexeno	1,32	2-metil-butano	6,30
	8,50	4-metil-1-penteno	2,87	2-metil-1-propanol	4,35
	8,86	Heptano	3,09	3-metil-hexano	61,40
	9,08	-		1-butanol	3,69
	9,51	3-metil-butanal	2,40	-	
	10,41	Tolueno	2,01	2-propenilideno-ciclobuteno	18,60
	10,60	2,2,2-trifluoro-metil-acetamida	20,30	-	
	10,95	Octanal	1,55	2,2,3-trimetil-pentano	5,63
	11,67	Etilbenzeno	59,10	Etilbenzeno	57,30
	12,15	Estireno	12,90	Estireno	30,20
	12,25	Decenal	2,33	3-etil-5-metileno-heptano	2,51
	13,07	2-pentilfurano	21,20	-	
	13,35	5-metil-5-hepten-2-ona	2,20	-	
	13,55	Octanal	1,20	-	
	13,70	Limoneno	4,59	Limoneno	1,33
	13,86	2-etil-1-hexanol	1,47	-	
	13,98	1,3-diclorobenzeno	16,80	-	

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer - (SP= suor positivo)					[Conclusão]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida NIST08**	**Probabilidade (%)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
31SP	14,17	-		Fenol	64,10
	14,44	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	2,60	-	
	15,02	2-decen-1-ol	2,85	Decanal	6,93
	16,71	-		Ácido 2-metil-decanoico	21,80
	16,89	Dodecanal	2,17	Dodecanal	1,04
	19,10	Ácido 14-metil-hexadecanoico, metil éster	2,26	Ácido 2-metil-undecanoico	1,23
	27,08	Ácido 15-metil-hexadecanoico	2,71	-	
32SP	6,62	Acetonitrila		-	
	7,38	Butenal		2,5-dihidrofurano	55,60
	7,78	4-etil,2,5-dimetil-isoxazolidina	5,26	Ácido 2-propenoico, etenil éster	44,40
	7,89	4-hidroxi-2-butanona	8,88	Anidrido acético	8,99
	8,14	2-metil-1-penten-3-ol	12,00	2-metil-3-buten-2-ol	50,10
	8,58	3-propoxi-1-propeno	8,75	1,3-propanodiol	35,10
	8,98	2-metil-butanal	1,53	-	
	9,50	3-metil-butanal	28,60	Pentanal	46,80
	10,29	2-hexin-1-ol	2,39	1-heptanol	29,60
	10,40	2-propenildieno-ciclobuteno	1,44	1,3,5-cicloheptatrieno	27,10
	10,56	3-etil-2,4-pentadien-1-ol	1,08	3-hexeno	1,42
	10,67	Ácido butanoico, etil éster	27,90	Ácido butanoico, etil éster	89,30
	10,95	2-metil-ciclopentano	37,00	Hexanal	61,70
	11,59	3,5-dimetil-1-hexeno	6,39	3,3-dimetil-hexeno	5,58
	11,66	Etilbenzeno	3,90	Etilbenzeno	28,90
	11,76	Xileno	11,90	Xileno	22,60
	12,13	2-metil-ciclopentanol, acetato	25,30	3,4-dimetil-2-hexanona	1,11
	12,26	Heptanal	19,60	Heptanal	57,60
	12,80	-		2,3,4-trimetil-hexano	14,30
	13,06	2-pentilfurano	29,70	3-pentilfurano	86,30
	13,34	6-metil-5-hepten-2-ona	56,00	6-metil-5-hepten-2-ona	77,50
	13,40	3-etil-4-metilpentanol	4,01	5-metil-1-heptanol	7,85
	13,53	Octanal	27,10	-	
	13,69	Limoneno	14,10	Limoneno	44,70
	13,86	2-etil-1-hexanol	2,68	2-etil-1-hexanol	8,39
	13,97	3,3-dimetil-1-octeno	1,94	3,4-dimetil-pentanol	5,46
	14,06	1-octin-3-ol	3,65	3-etil-2-metil-1-penteno	1,00
	14,43	7-metil-3-octeno	4,74	2-metil-3-hepteno	1,72
	14,68	-		Ácido 2-metil-hexanoico, metil éster	2,52
	15,02	Nonanal	8,03	2-decen-1-ol	2,81
	15,51	-		6-metil-3,5-heptadien-2-ona	33,10
	15,64	2,3-dimetildecano	3,85	Undecano	4,43
	16,87	Decanal	2,26	-	
	17,63	2,6,8-trimetil-decano	1,60	2-metil-decano	2,84
	20,33	Tetradecano	2,64	3,5-dimetil-4-octanona	4,70
	25,15	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	2,84	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	20,00

APÊNDICE 3- VOCs identificados em amostras de urina de voluntários do grupo controle

Amostras de voluntários do grupo controle (UC=urina controle; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continua ...]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
1UC	5,43	Alanina	1,48
	6,26	4-penten-2-ona	4,75
	6,60	Acetonitrila	66,30
	7,75	Anidrido acético	5,58
	8,87	2-nitro-propano	71,70
	9,41	2-pentanona	87,30
	10,25	Dimetildissulfeto	34,70
	10,40 (E)	Piridina	1,40
	10,90	Pirrol	80,80
	11,88	2-metil-3-hexanona	49,50
	11,94 (E)	2-metil-pirrol	64,40
	12,12 (E)	Ácido acético, 2-propenil éster	2,10
	12,28	Alil isotiocianato	43,00
	13,39	Propanodinitrila	12,20
	13,55 (E)	Dimetil trissulfeto	91,40
	13,65	Piridina	1,45
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	32,60
	14,15 (E)	Fenol	53,70
	14,42 (E)	3-etil-4,5-dimetil-1,4-hexadieno	13,30
	14,63 (E)	3,3,5-trimetil-ciclohexanol	46,70
	14,70 (E)	Linaloloxido	32,10
	14,87 (E)	3,7-dimetil-1,6-octan-3-ol	8,14
	14,96 (E)	Linalil óxido	3,02
	15,20 (E)	Ácido benzeno acético, metil éster	5,40
	15,51 (E)	2-metoxi-fenol	27,60
	16,30 (E)	2,3-dihidro-5-metil-furano	4,38
	16,60 (E)	Piridinona	44,00
	16,79 (E)	Mentol	24,90
	16,97 (E)	1,3,7-octatrieno	4,86
	17,34 (E)	Menta-3,8-dieno	17,34
	17,60 (E)	Metil-salicilato	68,70
	19,00	Carvona	53,20
	19,67	2-etil-4-metil-1H-imidazol	38,40
	19,82 (E)	4-etil-2-metoxi-fenol	48,40
	22,69	Ácido 2,2,4-trimetil-3-hidroxi-pentanoico, isobutil éster	5,36
	23,08	Ácido 2-etil-propanoico, 3-hidroxihexil éster	34,70

Amostras de voluntários do grupo controle (UC=urina controle; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
1UC	23,11	Ácido butanoico, octil éster	3,96
2UC	4,90	Isobutano	1,44
	5,39	Alanina	21,40
	6,27	Anidrido acético	5,19
	7,75	2-nitro-propano	28,80
	8,87	Vinil butirato	67,50
	9,41	2-pentanona	82,00
	10,24 (E)	2-metil-pirrol	80,30
	11,86	4-heptanona	57,70
	11,93 (E)	Pirazina	58,20
	12,13 (E)	Dimetil-diazeno	78,40
	12,84 (E)	1,6-heptadien-3-ino	21,60
	13,31	6-metil-3,5-heptadien-2-ona	1,38
	13,32	4-metoxi-piridina	33,50
	13,86 (E)	3,5-dimetil-1-hexeno	16,70
	14,17 (E)	Fenol	48,20
	14,62 (E)	5-amino-4-isoxazolecarbonitrila	54,40
	14,87 (E)	6-metil-5-metileno-2-heptanona	26,90
	15,58 (E)	2-metil-fenol	28,60
	16,31 (E)	3-metileno-1,6-heptadieno	13,60
	16,61 (E)	Mentol	18,10
	16,67 (E)	2,4-dihidroxifenilbenzil cetona	12,60
	16,80 (E)	Mentol	17,70
	17,15 (E)	Borneol	17,14
	17,65 (E)	Ácido 2-metil-2-propenoico, etenil éster	1,91
	18,84 (E)	6-metil-5-hepten-2-ona	14,40
	21,41	2-metoxi-4-vinil-fenol	7,09
	22,71	Ácido 2-metil-propanoico, propil éster	62,40
	22,74	Ácido 2-metil-propanoico, propil éster	61,90
	23,11	Ácido 2-metil-propanoico, pentil éster	1,30
3UC	4,91	2-nitro-propano	34,80
	5,38	Alanina	24,90
	6,59	Acetonitrila	56,40
	7,75	Anidrido acético	2,01
	9,40	2-pentanona	44,40
	9,52	Butanodial	3,43
	10,25	Dimetil dissulfeto	92,00
	10,37 (E)	Tolueno	14,10
	10,90	Metil 2-butinoato	39,60
	11,86	2-metil-3-hexanona	48,40

Amostras de voluntários do grupo controle (UC=urina controle; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
3UC	12,28	Alil isotiocianato	79,90
	13,31	4-metoxi-pirazina	17,10
	13,56	Dimetil trissulfeto	39,00
	13,88 (E)	2-etil-1-hexanol	20,10
	14,16 (E)	3-metil-pirazina	60,90
	14,80 (E)	2-metil-1,5-heptadien-4-ol	42,30
	15,58 (E)	2-metil-fenol	18,90
	15,87 (E)	2,6-dimetil-5,7-octadien-2-ol	1,79
	16,67 (E)	Menta-3,8-dieno	4,02
	16,80 (E)	2,4-hexadienal	1,80
	17,17 (E)	4-hidroxi-2-metilacetofenona	69,70
	20,75 (E)	2-etil-4,5-dimetil-fenol	16,30
	22,70	Ácido 2-metil-propanoico, propil éster	46,40
	23,09	Ácido 2-metil-propanoico, pentil éster	10,20
4UC	4,91	2-nitro-propano	32,70
	5,40	Alanina	10,20
	6,25	Anidrido acético	6,26
	6,61	Acetonitrila	57,50
	7,74	2-nitro-propano	1,94
	8,84 (E)	Butano	50,60
	9,40	2-pentanona	84,20
	10,25	Dimetil dissulfeto	73,10
	10,89	Pirrol	55,10
	11,58	4-heptanona	59,90
	11,93 (E)	2-metil-pirrol	57,90
	12,11 (E)	Acetona	47,70
	12,88 (E)	1,2,4-triazolo(4,3a)pirazina	39,80
	13,39	Propanodinitrila	12,20
	13,54	Dimetil trissulfeto	1,00
	13,88 (E)	2-etil-1-hexanol	19,20
	14,16 (E)	Fenol	45,10
	14,41 (E)	Dimetil-ciclopentanometanol	44,90
	14,61 (E)	3,3,5-trimetil-ciclohexanol	18,60
	14,86 (E)	3,7-dimetil-1,6-octan-3-ol	7,47
	15,59	4-metil-fenol	57,60
	15,86 (E)	Ment-3-en-1-ol	13,70
	16,25 (E)	Ment-8-en-8-ol	28,10
	16,59 (E)	Mentol	14,00
	16,79 (E)	Mentol	16,79
	17,13 (E)	Hept-3-in-2-ona	26,30

Amostras de voluntários do grupo controle (UC=urina controle; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
4UC	19,64	2-isopropil-5-metil-3-ciclohexen-1-ona	57,90
	19,66	2-etil-4-metil-1H-imidazol	24,20
	22,67	Ácido 2-metil-propanoico, 2-propenil éster	3,49
	23,06	Ácido 2-metil-propanoco, pentil éster	37,40
5UC	5,38	Metil-taurina	1,24
	6,26	Ciclobutilamina	21,20
	7,75	2-nitro-propano	1,94
	8,86	1,6-heptadien-4-ol	1,54
	9,40	2-pentanona	86,70
	9,51	3-metil-4-penten-2-ol	14,80
	10,25	Dimetil dissulfeto	96,80
	10,43 (E)	Piridina	89,50
	10,89	Pirrol	80,80
	11,93 (E)	2-metil-piridina	48,30
	11,86	4-heptanona	29,00
	12,15 (E)	Estireno	16,70
	13,39	3-isopropil-1-ciclopenteno	10,70
	13,55	Dimetil trissulfeto	
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	17,50
	14,16 (E)	Fenol	47,40
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	40,10
	14,53	1,1-dipropil-hidrazina	94,90
	14,87 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	27,60
	15,12	Metil-ciclopentanometanol	32,90
	15,22	1-fenil-1,2-propanodiona	4,48
	15,53 (E)	2-metil-fenol	30,90
	15,98 (E)	2-piridinona	66,30
	16,31 (E)	Canfeno	1,91
	16,45	1,-nonadiino	9,15
	16,60 (E)	Pulegona	7,48
	16,90 (E)	Mentol	15,10
	17,11 (E)	7-metil-1-nonino	16,30
	17,39 (E)	2,7-dimetil-2,6-octadieno	22,50
	17,57 (E)	1,4-dimetoxi-benzeno	21,90
	17,99 (E)	1-undecino	6,11
	16,83	3-propil-1,4-pentadieno	4,30
	18,99	2-ciclopenten-1-ona	16,30
	19,00	1,2-ditiolano	7,19
	21,40	4-hidroxi-2-metilacetofenona	32,50
6UC	4,90	Isobutano	1,44

Amostras de voluntários do grupo controle (UC=urina controle; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
6UC	6,60	Acetonitrila	67,90
	7,75	Anidrido acético	15,10
	8,89	2,3,4-trimetil-pentano	35,60
	9,40	2-pentanona	79,10
	9,44	3-metil-4-penten-2-ol	14,80
	9,50 (E)	Pentanal	7,84
	10,25	Dimetil dissulfeto	95,70
	10,88	Metil-2-butanoato	55,00
	10,95 (E)	3-metil-pentano	42,80
	11,86	2-metil-3-hexanona	58,20
	11,92 (E)	2-metil-pirrol	57,10
	13,39	Pirrol	43,80
	13,55	Dimetil trissulfeto	90,70
	13,86 (E)	4,4-dimetil-1-penteno	3,56
	14,05	Fenil-propanamida	1,20
	14,16 (E)	Fenol	61,40
	14,43 (E)	3,3,5-trimetil-ciclohexanol	25,50
	14,61 (E)	3,3,5-trimetil-ciclohexanol	55,40
	14,86 (E)	3,7-dimetil-1,6-octan-3-ol	40,70
	15,57 (E)	3-metil-fenol	30,10
	16,60 (E)	Ácido butanoico, 3,7-dimetil-6-octenil éster	1,55
	16,78 (E)	3,7-dimetil-1,6-octan-3-ol	1,28
	16,82	6-nitro-2-hexeno	10,80
	17,17 (E)	Ment-1-en-8-ol	15,50
	17,18 (E)	Limoneno	1,23
	17,33 (E)	Menta-3,8-dieno	28,00
	17,87 (E)	Carveol	25,60
	18,24 (E)	2-metil-acetofenona	37,50
	18,99	Carvona	43,00
	19,82 (E)	Etilguaiacol	87,00
	20,72 (E)	2-etil-4,5-dimetil-fenol	15,60
	21,39	3-metoxi-acetofenona	44,50
	22,70	Ácido butanoico, hexil éster	15,30
	23,08	Ácido butanoico, heptil éster	1,12
7UC	4,91	Iobutano	1,44
	5,40	2-amino propanol	1,34
	6,60	Acetonitrila	67,10
	7,74	1-nitro-propano	31,70
	8,46 (E)	Isobutano	11,10
	8,79 (E)	Benzeno	69,00

Amostras de voluntários do grupo controle (UC=urina controle; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
7UC	8,96	2,3-butanodiona	77,20
	9,07	2-butanol	53,00
	9,08	Propeno	80,80
	9,40	2-pentanona	82,70
	9,50 (E)	Pentanal	29,50
	10,25	Dimetil dissulfeto	98,50
	10,36 (E)	3-metil-2-pentanona	87,00
	10,89	Metil-2-butanoato	38,70
	11,86	2-metil-3-hexanona	29,00
	13,22	1-fenil-1,2-propanodiona	13,10
	13,31	4-metoxi-piridina	34,70
	13,39	Propanodinitrila	12,20
	13,55	Dimetil trissulfeto	98,00
	13,86 (E)	2-etil-4-metil-1-pentanol	11,00
	13,88	4-metil-piridina	3,65
	14,15 (E)	Fenol	48,30
	14,42 (E)	1-dodecino	7,82
	14,61 (E)	3,3,5-trimetil-ciclohexanol	43,00
	14,86 (E)	Fenil-butanamida	1,54
	15,12	1-metoxi-2-metil-3-buteno	49,80
	15,58	2-metil-fenol	21,30
	16,59 (E)	Mentol	12,20
	16,78 (E)	3-metil-1-isobutilideno-ciclopentano	1,56
	11,71 (E)	4-piridinol	1,95
	17,61 (E)	Ácido butanoico, 3-metilbut-2-enil éster	1,15
	22,69	Ácido butanoico, heptil éster	15,60
	23,06	Ácido butanoico, octil éster	2,21
8UC	5,42	Alanina	2,48
	6,59	Acetonitrila	58,20
	7,74	Anidrido acético	2,91
	8,16	Vinil butirato	32,40
	8,50 (E)	Isobutano	27,80
	8,85	2,3,4-trimetil-pentano	28,40
	9,40	2-pentanona	81,80
	9,51	Butanodial	18,10
	10,25	Dimetil dissulfeto	97,00
	10,56 (E)	2-metil-2-buteno	27,70
	10,89	Pirrol	81,40
	10,96 (E)	3-metil-pentano	5,01
	11,86	2-metil-3-hexanona	48,80

Amostras de voluntários do grupo controle (UC=urina controle; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
8UC	11,93 (E)	2-metil-pirrol	56,80
	12,14 (E)	2,3-hexanodiona	33,40
	13,39	Propanodinitrila	12,20
	13,56	Dimetil trissulfeto	96,70
	13,88 (E)	2-etil-1-hexanol	27,40
	14,17 (E)	Fenol	42,40
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	29,10
	14,55	1,1-dipropil-hidrazina	91,80
	14,58	3,4-didehidro-prolina	12,80
	14,62 (E)	3,3,5-trimetil-ciclohexanol	57,90
	14,87 (E)	2,6-dimetil-2,7-octadieno-1,6-diol	10,70
	15,13	Metil-ciclopentanometanol	22,00
	15,58 (E)	3-metil-fenol	30,30
	15,98 (E)	1,10-undecadieno	13,40
	16,10 (E)	Tolueno	20,20
	16,60 (E)	5,10-pentadecadien-1-ol	32,90
	16,80 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	1,41
	17,45 (E)	2-ciclopentiletanol	1,14
	17,58 (E)	4-metoxi-3-metil-fenol	23,50
	18,98 (E)	Carvona	62,20
	19,83 (E)	4-etil-2-metoxi-fenol	72,40
	20,18 (E)	Tert-butil-fenol	14,50
	20,74 (E)	1,1-dimetiletoxi-benzeno	52,30
	21,42	3-metoxi-acetofenona	41,10
	22,70	Ácido 3-hidroxi-decanoico	38,10
	23,11	Ácido butanoico, hexil éster	1,51
9UC	4,90	Isobutano	1,44
	5,37	Alanina	1,31
	7,88	1-nitro-propano	27,20
	9,39	3-metil-2-butanona	77,60
	10,24	Dimetil dissulfeto	93,00
	10,58	Butanodial	3,43
	11,86	4-heptanona	38,40
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	18,50
	14,15 (E)	Fenol	12,98
	15,53 (E)	2-metil-fenol	12,75
	15,98 (E)	2-piridinona	10,70
	16,31 (E)	Canfeno	14,40
	16,45	1,5-nonadi-ino	9,15
	16,80 (E)	Mentol	2,43
	17,11 (E)	7-metil-1-nonino	2,04

Amostras de voluntários do grupo controle (UC=urina controle; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
10UC	17,39 (E)	2,7-dimetil-2,6-octadieno	19,80
	17,57 (E)	1,4-dimetoxi-benzeno	11,23
	18,00 (E)	1-undecino	2,90
	18,99 (E)	Carvona	11,20
	19,83 (E)	4-etil-2-metoxi-fenol	2,50
	23,09	Ácido butanoico, heptil éster	1,41
10UC	4,90	Isobutano	1,44
	5,37	Alanina	2,32
	6,58	Acetonitrila	58,00
	7,75	Anidrido acético	2,91
	9,40	2-pentanona	4,05
	11,85	Vinil butirato	19,10
	11,93 (E)	2-metil-pirrol	43,70
	12,14 (E)	2,3-hexanodiona	12,13
	12,26	Alil isotiocianato	79,40
	13,36	Isopentil-benzeno	1,08
	15,58	2-metil-fenol	41,00
	15,98 (E)	1,10-undecadieno	12,50
	16,60 (E)	5,10-pentadecadien-1-ol	23,40
	16,80 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	2,50
	16,90 (E)	5-metil-3-heptino	1,80
	17,14 (E)	Ácido sórbico, vinil éster	6,30
	17,18 (E)	Ment-1-en-8-ol	12,20
	17,45 (E)	2-ciclopentiletanol	21,90
	17,58 (E)	4-metoxi-3-metil-fenol	40,80
	18,98 (E)	Carvona	60,70
	19,83 (E)	4-etil-2-metoxi-fenol	7,80
	20,18 (E)	Tert-butil-fenol	9,70
	20,74	1,1-dimetiletoxi-benzeno	3,97
	23,05	Ácido 2-metil propanoico, butil éster	65,20
11UC	4,89	Isobutano	1,44
	5,41	Alanina	2,03
	6,60	Acetonitrila	57,40
	7,75	Anidrido acético	2,91
	9,40	2,4-butanodiona	74,80
	10,25	Dimetil dissulfeto	24,20
	10,88	Pirrol	69,90
	11,85	2-metil-3-hexanona	46,70
	13,34	2,3,6-trimetil-piridina	56,80
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	1,42
	14,17 (E)	Fenol	44,10

Amostras de voluntários do grupo controle (UC=urina controle; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
12UC	15,50 (E)	2-metoxi-fenol	44,30
	16,61 (E)	Mentil acetato	2,89
	16,80 (E)	3,7-dimetil-6-octen-1-ol	1,34
	17,15 (E)	Fenil metilcarbamato	4,00
	17,18 (E)	Ment-1-en-8-ol	40,80
	22,69	Hexil pentil éter	14,40
	23,05	Ácido butanoico, butil éster	1,40
12UC	4,89	Isobutano	1,44
	6,59	Butanonitrila	73,50
	7,75	Anidrido acético	2,01
	9,39	2-pentanona	25,00
	10,40 (E)	1,5-heptadi-ino	5,75
	10,88	Pirrol	66,10
	11,85	4-heptanona	37,00
	11,93	Pirazina	63,90
	12,26	Alil isotiocianato	71,90
	13,32	2,3-dimetil-benzenoamina	10,40
	13,55	Dimetil trissulfeto	1,29
	13,86 (E)	4,4-dimetil-penteno	5,07
	14,16 (E)	3-metilpiridazina	66,60
	14,61 (E)	3,3,5-trimetil-ciclohexanol	35,60
	14,69 (E)	Betahistina	1,33
	14,87 (E)	Ácido 2-metil-propanoico, anidrido	1,93
	15,51 (E)	2-metoxi-fenol	32,60
	15,58 (E)	2-metil-fenol	32,40
	16,60 (E)	Mentan-8-ol	1,12
	16,80 (E)	3,7-dimetil-6-octen-1-ol	1,52
	18,97 (E)	Carvona	40,90
	19,82 (E)	2,5-dimetoxi-tolueno	5,59
	21,37	2,4,6-undecatrieno	60,80
	22,67	Ácido butanoico, heptil éster	5,22
	23,03	Ácido 2-metil propanoico, hexil éster	6,73
13UC	4,90	Acetileno	42,00
	6,60	Acetonitrila	18,20
	7,75	Anidrido acético	1,20
	8,85	Ciclo-butilamina	9,19
	9,39	2-pentanona	86,00
	10,88	Pirrol	1,23
	11,86	4-heptanona	75,10
	12,68	Diacetil sulfeto	1,25
	12,89	Purina	16,40

Amostras de voluntários do grupo controle (UC=urina controle; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
13UC	13,88 (E)	5-metil-2-hepteno	24,30
	14,15 (E)	Fenol	10,60
	14,89 (E)	6-metil-4-metileno-2-heptanona	13,40
	15,89 (E)	4-metil-fenol	30,30
	16,60 (E)	Piridinona	17,80
	16,81 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	1,20
	17,17 (E)	4-hidroxi-2-metil-acetofenona	14,80
	20,05	Dimetil-benzenoacetaldeído	50,50
	22,68	Pentil éter	1,87
	23,06	Ácido 2-metil-propanoico, butil éster	24,10
14UC	5,39	Metil-taurina	23,20
	6,59	Acetonitrila	58,10
	7,75	Anidrido acético	2,91
	9,40	2,3-butanodiona	71,50
	10,24	Dimetil dissulfeto	24,50
	10,40	Tolueno	1,67
	10,89	Pirrol	12,70
	11,86	2-metil-3-hexanona	40,40
	11,93 (E)	2-metil-pirrol	9,32
	13,55	Dimetil trissulfeto	21,90
	13,86 (E)	4,4-dimetil-1-hexeno	17,60
	14,18 (E)	Fenol	35,40
	15,53 (E)	4-acetil-ciclohexeno	10,90
	15,59 (E)	4-metil-fenol	41,90
	16,62 (E)	Mentil acetato	1,44
	16,82 (E)	3,7-dimetil-6-octen-1-ol	1,52
	17,20 (E)	Ment-1-en-8-ol	34,10
	22,70	Ácido 2-metil-propanoico, butil éster	42,60
	23,09	Ácido butanoico, octil éster	2,18
15UC	4,92	2-nitro-propano	28,80
	5,38	Alanina	2,92
	6,60	Acetonitrila	2,19
	7,74	Anidrido acético	11,90
	9,39	2-pentanona	41,70
	10,25	Dimetil dissulfeto	19,80
	10,89	Pirrol	14,20
	11,86	2-metil-3-hexanona	38,90
	12,12 (E)	4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	1,11
	13,38	Alil isotiocianato	66,10
	13,55	Trimetil dissulfeto	2,80
	13,87 (E)	2,2,4-trimetil-pentano	20,90

Amostras de voluntários do grupo controle (UC=urina controle; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
15UC	15,20 (E)	3-piridina-carbonitrila	2,05
	16,30 (E)	Canfeno	12,30
	16,80 (E)	2,4-hexanodial	1,20
	17,12 (E)	7-metil-1-nonino	2,60
	18,98 (E)	Carvona	39,20
	19,66 (E)	2-isopropil-5-metil-3-ciclohexen-1-ona	57,20
	19,82 (E)	4-etil-2-metoxi-fenol	17,60
	22,69	5-metil-1-undeceno	3,29
	23,07	Ácido 2-metil-propanoico, hexil éster	5,17
16UC	6,59	Acetonitrila	44,30
	7,74	Anidrido acético	2,13
	9,40	2-pentanona	22,40
	9,51	Butanodial	1,75
	10,25	Dimetil dissulfeto	20,50
	10,89	Pirrol	43,40
	11,86	2-metil-3-hexanona	12,70
	11,93 (E)	2-metil-pirrol	3,20
	12,14 (E)	2,3-hexanodiona	7,20
	13,39	Propanodinitrila	16,10
	13,56	Dimetil trissulfeto	36,50
	13,88 (E)	2-etil-1-hexanol	1,80
	14,17 (E)	Fenol	12,30
	14,58	3,4-didehidro-prolina	3,40
	14,62 (E)	3,3,5-trimetil-ciclohexanol	12,02
	14,87 (E)	2,6-dimetil-2,7-octadieno-1,6-diol	1,12
	15,13	2,2-dihidroxi-1-fenil-etanona	2,16
	15,58 (E)	2-metil-fenol	19,80
	15,98 (E)	1,10-undecadieno	6,30
	16,60 (E)	5,10-pentadecadien-1-ol	3,60
	16,80 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	15,60
	17,45 (E)	2-ciclopentiletanol	43,00
	17,58 (E)	4-metoxi-3-metil-fenol	21,80
	18,98 (E)	Carvona	10,70
	19,83 (E)	4-etil-2-metoxi-fenol	12,00
	20,18 (E)	Tert-butil-fenol	7,69
	20,74 (E)	1,1-dimetiletoxi-benzeno	9,20
	22,70	Ácido 3-hidroxi-decanoico	11,90
	23,11	Ácido butanoico, hexil éster	2,34
17UC	4,92	2-nitro-propano	1,94
	6,60	Acetonitrila	3,65

Amostras de voluntários do grupo controle (UC=urina controle; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
17UC	7,75	Anidrido acético	9,76
	8,85	Propil acetato	33,20
	9,40	2-pentanona	77,70
	10,25	Dimetil dissulfeto	89,50
	10,89	Pirrol	84,60
	11,86	Vinil butirato	3,65
	12,13 (E)	4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	1,21
	12,27	Alil isotiocianato	81,10
	13,39	Propanodinitrila	12,20
	13,56	2,2-dihidroxi-1-fenil-etanona	10,10
	13,87 (E)	4,4-dimetil-penteno	78,20
	14,16 (E)	Fenol	11,30
	15,12	1-fenil-1,2-propanodiona	5,76
	15,50 (E)	2-metoxi-fenol	9,80
	15,98 (E)	1,9-decadieno	3,40
	16,80 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	2,04
	17,13 (E)	4-piridona	3,20
	18,99 (E)	Carvona	53,70
	19,66 (E)	1-etil-2-metil-imidazol	12,00
	20,73 (E)	4-hidroxi-2-metil-acetofenona	9,60
	22,67	Hexil pentil éter	42,20
	23,08	Ácido 2-metil-propanoico, hexil éster	17,40
18UC	4,88	1-nitro-propano	2,04
	5,39	Alanina	1,38
	6,57	Acetonitrila	44,40
	7,74	Anidrido acético	4,98
	9,38	2-pentanona	81,50
	10,23	Dimetil dissulfeto	98,00
	10,88	1,3,5-cicloheptatrieno	30,90
	10,89	Pirrol	82,00
	11,11	Glicoaldeído dimetil acetal	37,50
	11,84	2-metil-3-hexanona	36,90
	12,88	2-etil-6-piridina	17,00
	13,36	Propanodinitrila	12,20
	13,54	Dimetil trissulfeto	19,40
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	25,70
	14,15 (E)	Fenol	58,10
	14,41 (E)	Mentan-8-ol	39,30
	14,61 (E)	3,4-piridinadiamina	1,13
	14,86 (E)	2,6-dimetil-2,7-octadieno-1,6-diol	1,23
	15,77 (E)	2,6-dihidroacetofenona	5,67

Amostras de voluntários do grupo controle (UC=urina controle; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
18UC	15,97 (E)	4-ciclopropil-1-buteno	36,90
	16,29 (E)	Isopulegol	46,60
	16,60 (E)	2-isopropil-5-metil-3-ciclohexanol	3,55
	16,78 (E)	Etil-mentil-carbonato	2,16
	17,18 (E)	Ment-1-en-8-ol	33,30
	19,81 (E)	4-etil-2-metoxi-fenol	63,40
	21,36 (E)	4-hidroxi-4-metil-acetofenona	28,20
	22,65	Ácido 2,2,4-trimetil-3-hidroxi-pentanoico, isobutil éster	15,60
	23,04	Ácido 2-metil-propanoico, 2-etil-3-hidroxihexil éster	30,10
19UC	6,60	Acetonitrila	2,40
	7,75	Anidrido acético	2,19
	8,89	2,3,4-trimetil-pentano	5,60
	9,40	2-pentanona	3,78
	10,25	Dimetil dissulfeto	40,30
	10,88	Pirrol	54,20
	11,86	2-metil-3-hexanona	12,90
	11,92 (E)	2-metil-pirrol	8,07
	13,55	Dimetil trissulfeto	78,20
	13,86 (E)	4,4-dimetil-1-penteno	3,54
	14,05	Fenil-propanamida	7,62
	14,16 (E)	Fenol	14,30
	14,43 (E)	3,3,5-trimetil-ciclohexanol	8,98
	14,61 (E)	3,3,5-trimetil-ciclohexanol	12,30
	14,86 (E)	3,7-dimetil-1,6-octan-3-ol	9,82
	15,57 (E)	3-metil-fenol	11,80
	16,60 (E)	Ácido butanoico, 3,7-dimetil-6-octenil éster	13,80
	16,78 (E)	3,7-dimetil-1,6-octan-3-ol	16,10
	17,17 (E)	Ment-1-en-8-ol	10,54
	17,33 (E)	Menta-3,8-dieno	8,65
	17,87 (E)	Carveol	19,22
	18,99	Carvona	11,75
	19,82 (E)	Etilguaiacol	4,98
	20,72 (E)	2-etil-4,5-dimetil-fenol	14,52
	21,39	3-metoxi-acetofenona	6,45
	22,70	Ácido butanoico, hexil éster	17,62
	23,08	Ácido butanoico, heptil éster	5,66
21UC	4,91	Isobutano	1,44
	5,40	2-amino propanol	2,34
	6,60	Acetonitrila	57,10
	7,74	1-nitro-propano	17,90

Amostras de voluntários do grupo controle (UC=urina controle; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
21UC	8,46 (E)	Isobutano	12,50
	8,86	2,3,4-trimetil-pentano	45,20
	9,40	2-pentanona	45,90
	9,50 (E)	Pentanal	25,60
	10,25	Dimetil dissulfeto	88,90
	10,36 (E)	3-metil-2-pentanona	67,00
	10,89	Metil-2-butanoato	18,90
	11,86	2-metil-3-hexanona	31,00
	13,22	1-fenil-1,2-propanodiona	11,30
	13,31	4-metoxi-piridina	24,80
	13,39	Propanodinitrila	13,50
	13,55	Dimetil trissulfeto	90,70
	13,86 (E)	2-etil-4-metil-1-pentanol	5,60
	14,15 (E)	Fenol	54,30
	14,42 (E)	2-metil-1-heptanol	8,60
	14,86 (E)	Fenil-butanamida	2,54
	15,12	Furano	19,80
	15,58	2-metil-fenol	11,30
	16,59 (E)	Mentol	2,20
	16,78 (E)	Isomentol	2,56
	17,61 (E)	Ácido butanoico, 3-metilbut-2-enil éster	5,20
	22,69	Ácido butanoico, heptil éster	5,60
	23,06	Ácido butanoico, octil éster	12,30
22UC	5,42	Alanina	2,40
	6,59	Acetonitrila	56,00
	7,74	Anidrido acético	15,10
	8,50	Isobutano	11,20
	8,85	2,3,4-trimetil-pentano	25,60
	9,40	2-pentanona	34,00
	9,51	Pentanal	40,40
	10,25	Dimetil dissulfeto	93,00
	10,56 (E)	2-metil-2-buteno	17,80
	10,89	Pirrol	18,00
	10,96 (E)	3-metil-pentano	23,30
	11,86	2-metil-3-hexanona	12,80
	11,93 (E)	2-metil-pirrol	47,00
	12,14 (E)	2,3-hexanodiona	13,10
	13,39	Propanodinitrila	10,50
	13,56	Dimetil trissulfeto	68,90
	13,88 (E)	2-etil-1-hexanol	14,30
	14,17 (E)	Fenol	43,00
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	12,90

Amostras de voluntários do grupo controle (UC=urina controle; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Conclusão]
Amostra	**Tempo de retenção (minutos)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
22UC	14,87 (E)	2,6-dimetil-2,7-octadieno-1,6-diol	6,70
	15,58 (E)	3-metil-fenol	13,40
	16,10 (E)	Tolueno	12,80
	16,80 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	14,10
	17,58 (E)	4-metoxi-3-metil-fenol	23,50
	20,74 (E)	1,1-dimetiletoxi-benzeno	52,30
	22,70	Ácido 3-hidroxi-decanoico	18,60
	23,11	Ácido butanoico, octil éster	1,54
23UC	5,38	Isobutano	1,24
	7,75	2-nitro-propano	1,40
	8,86	2-metil-pentanal	2,50
	9,40	2-pentanona	40,20
	9,51	Pentanal	11,30
	10,25	Dimetil dissulfeto	93,00
	10,43 (E)	Piridina	14,00
	10,89	Pirrol	57,00
	11,86	4-heptanona	12,10
	13,55	Dimetil trissulfeto	67,00
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	14,10
	14,16 (E)	Fenol	46,50
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	11,20
	15,53 (E)	2-metil-fenol	13,70
	16,31 (E)	2-furanocarbonitrila	1,40
	16,60 (E)	1-metil-1-butenil-benzeno	6,20
	16,90 (E)	Mentol	11,90
	17,11 (E)	7-metil-1-nonino	22,10
	17,39 (E)	2,7-dimetil-2,6-octadieno	3,40
	17,57 (E)	Mentil	8,90
	18,99	2-ciclopenten-1-ona	11,30
	21,40	4-hidroxi-2-metilacetofenona	9,70
	23,11	Ácido butanoico, hexil éster	13,20

APÊNDICE 4- VOCs identificados em amostras de urina de voluntários do grupo positivo

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continua ...]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
1UP	4,88	2-nitro-propano	4,20
	5,39	Alanina	1,96
	6,68	2-metil-propanol	59,50
	7,73	Isobutano	1,44
	8,96	2,3-butanodiona	77,00
	9,40	2-pentanona	46,70
	9,51	Butanal	5,43
	10,23 (E)	Dimetil dissulfeto	98,00
	10,43 (E)	Piridina	88,80
	10,75	3-hexanona	3,60
	10,88 (E)	Propanodinitrila	12,20
	11,86	2-metil-3-hexanona	46,60
	11,93 (E)	2-metil-pirrol	55,20
	12,12 (E)	Dimetil diazeno	27,20
	12,27	Alil isotiocianato	74,50
	12,36 (E)	3-metil-4-penten-2-ol	14,80
	13,17	2,5-hexadiona	2,07
	13,37 (E)	1,3,7-octatrieno	5,78
	13,54 (E)	Dimetil trissulfeto	83,20
	13,64	4-isotiocianato-1-buteno	87,90
	13,65	2-metil-tiazol	6,89
	13,87	2,2,4,4-tetrametil-pentano	3,12
	13,87 (E)	2-etil-1-hexanol	38,00
	14,05	2-metil-1,5-heptadien-4-ol	1,05
	14,16 (E)	Fenol	49,00
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	68,00
	14,62 (E)	3-etil-4,5-dimetil-1,4-hexadieno	6,46
	14,87 (E)	2-metil-6-metileno-7-octen-2-ol	19,00
	15,22 (E)	2-etil-5-metiltiazol	31,40
	15,51 (E)	1-butil-pirrol	1,70
	15,58 (E)	4-metil-fenol	61,60
	16,60 (E)	Mentol	16,60
	16,79 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	2,72
	16,84	2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diol	28,60
	16,92 (E)	2-metill-1-undecanol	3,52
	20,73 (E)	1,1-dimetiletoxi-benzeno	45,60
	22,70	Ácido butanoico, octil éster	3,30
	22,75	Ácido 2-metil-propanoico, nonil éster	1,78

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
1UC	22,96	Ácido 2,2,4-trimetil-3-hidroxi-pentanoico, isobutil éster	16,30
	23,08	Ácido 2,2,4-trimetil-3-hidroxi-pentanoico, isobutil éster	8,98
2UP	4,87	2-nitro-propano	28,40
	5,37	Alanina	1,49
	5,45	Hidroxi-ureia	33,50
	6,59	Acetonitrila	57,90
	7,75	Anidrido acético	24,80
	7,80	2-metil-1-buteno	1,92
	7,90	4-hidroxi-2-butanona	5,24
	8,43	Benzeno	17,80
	8,86	2,3,4-trimetil-pentano	18,20
	9,40	2-pentanona	79,60
	10,16	Ácido etil carbônico, metil éster	1,29
	10,25	Dimetil dissulfeto	86,90
	10,37 (E)	Piridina	81,40
	10,89	Pirrol	83,00
	11,85	2,3-hexanodiona	37,70
	11,92 (E)	2-metil-pirrol	56,60
	12,27	Alil isotiocianato	78,10
	13,14	Ácido caproico, etil éster	20,90
	13,39	3-decino	1,48
	13,65	2,2,4-trimetil-hexano	1,06
	13,54 (E)	Dimetil trissulfeto	1,20
	13,63 (E)	2-dimetilamino-etanotiol	69,30
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	9,56
	14,16 (E)	Fenol	61,00
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	20,60
	15,51 (E)	2-metoxi-fenol	13,20
	15,59	Etil-pirazina	9,47
	16,60 (E)	3-isobutil-ciclohexeno	1,31
	16,78 (E)	1-undecino	1,98
	17,10 (E)	1,5-dimetil-1-piridinona	1,76
	18,97 (E)	Benzoquinona	73,00
	19,82 (E)	4,8-dimetil-1,7-nonadieno	6,47
	21,88	1-isotiacianato-3-metiltio-propano	74,50
	22,70	Ácido 2-metil-propanoico, 2-etilhexil éster	1,13
	23,07	Ácido 2-metil propanoico, 2-etil-3-hidroxihexil éster	5,80
	23,10	Hexil pentil éter	1,12
3UP	4,90	Ciclobutilamina	13,00
	5,06	Hidroxi-ureia	1,91
	5,37	2-amino-1-propanol	5,19

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
3UP	5,41	Propanodiamina	1,00
	7,18	Butanonitrila	1,15
	7,30	Ciclopropano	5,62
	7,72	2-nitro-propano	17,50
	7,74	Diacetil sulfeto	1,00
	7,90	Ácido metoxi-acético, etil éster	20,60
	7,91	2-butanona	77,80
	8,05	2-metil-1,3-pentadieno	8,40
	8,15	2-metil-3-buten-2-ol	8,55
	8,85	3-metil-hexano	52,60
	8,86	Ácido 2-metil propanoico, 2-propenil éster	81,30
	8,93 (E)	2,3-butanodiona	74,20
	8,95 (E)	Alil butil éter	2,08
	9,26 (E)	3-furaldeído	54,00
	9,39	2-pentanona	69,20
	9,51	Pentanal	34,80
	10,12 (E)	2-metil-2-buteno	19,80
	10,16	4-metil-2-pentanol	1,85
	10,25	Dimetil dissulfeto	98,10
	10,28 (E)	3-penten-2-ona	14,80
	10,31	Furano	8,27
	10,36 (E)	2-metil-propanal	10,90
	10,55 (E)	1-pentanol	14,30
	10,56	1,2-dimetil-ciclopropano	8,02
	10,66 (E)	Propil acetato	16,00
	10,73 (E)	3-hexanona	74,10
	10,74	2,2-dimetil-heptano	1,78
	10,80 (E)	1,3,5-trimetil-pirazol	52,00
	10,89	Pirrol	83,90
	10,96	Hexanal	87,40
	11,26 (E)	Ácido 2-hidroxi-propanoico, etil éster	1,37
	11,37	2-hexanol	1,06
	11,46 (E)	2,2-dimetil-propanal	4,29
	11,51 (E)	3-propoxi-1-propeno	5,17
	11,65 (E)	5-etil-2-furaldeído	30,20
	11,75 (E)	4-hepten-2-ona	75,20
	11,85	2-metil-3-hexanona	40,60
	11,90 (E)	3-metil-ciclopentanona	8,94
	12,01 (E)	Tetrahidro-6,6-dimetil-piran-2-ona	19,20
	12,14	3-pentanamina	1,46
	12,23	3-etil-5-metileno-heptano	42,90

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
3UP	12,37 (E)	2,5-dimetil-pirimidina	54,10
	12,73 (E)	2,4,6-octatrienal	25,00
	12,80 (E)	2,4-dimetil-3-heptanona	89,70
	13,06 (E)	1-heptanol	4,56
	13,16	2,4-dimetil-3-heptanona	1,11
	13,26 (E)	3-octanona	25,40
	13,32 (E)	1-ciclobutil-etanona	1,92
	13,40 (E)	3-etilciclopentanona	56,70
	13,55	Dimetil trissulfeto	96,70
	13,85 (E)	2-etil-1-hexanol	34,00
	13,96 (E)	1,5-heptadieno	20,30
	14,04 (E)	5,5-dimetil-2,4-hexanodiona	1,12
	14,14 (E)	Fenol	61,40
	14,30 (E)	3-tertbutil-hexan-2-ona	26,30
	14,41 (E)	3,3-dimetil-1,6-heptadieno	13,90
	14,76 (E)	Tolueno	5,29
	14,80 (E)	4-hidroxi-3-propil-2-hexanona	1,34
	14,85 (E)	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	7,96
	15,10 (E)	Metiltio-ciclopentano	38,30
	15,12	3,4-didehidro-prolina	76,20
	15,39 (E)	2,5-dimetil-1,6-octadieno	15,60
	15,56 (E)	2-metil-fenol	35,80
	15,58	4-metil-fenol	6,96
	15,72 (E)	Fenilmetil-hidroxilamina	2,60
	15,80	3-etil-pirrol	43,00
	15,97 (E)	Propanodinitrila	12,20
	15,88	5-propil-1,3-benzodioxol	1,02
	16,08 (E)	4-deceno	1,97
	16,65 (E)	Ácido propil benzoico	2,49
	16,78 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	1,93
	17,41 (E)	2-etil-fenol	2,08
	17,55 (E)	4-metoxi-3-metil-fenol	25,00
	18,10 (E)	Pineno	26,10
	19,27 (E)	2-metil-benzaldeído	26,00
	21,37	4-hidroxi-2-metilacetofenona	44,00
	21,97 (E)	3-metoxifenil-etanona	15,50
	22,71	Ácido 2-metil-propanoico, pentil éster	1,15
	23,02 (E)	Ácido butanoico, heptil éster	20,40
4UP	5,36	Alanina	1,48
	5,42	1-propanol	13,90

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
4UP	6,65	Acetona	7,20
	7,75	Isobutano	1,44
	8,14	Vinilbutirato	5,51
	8,86	3-etil-pentano	4,71
	8,87	3-metil-hexano	1,59
	9,40	2-pentanona	78,10
	9,52	Pentanal	67,00
	10,25	Dimetildissulfeto	96,60
	10,31	Furano	8,27
	10,38	3-metil-2-pentanona	1,14
	10,75	3-hexanona	10,20
	10,88	Pirrol	84,10
	10,96	Hexanal	92,60
	11,86	4-heptanona	20,30
	11,95 (E)	2-metil-pirrol	55,90
	12,13 (E)	2-heptanona	18,30
	12,74 (E)	1,4,6-octatrienal	18,20
	12,81 (E)	2-etil-butanal	43,60
	13,17	2,5-hexanodiona	6,69
	13,39	1,3,7-octatrieno	1,94
	13,55	Dimetil trissulfeto	97,20
	13,87 (E)	2-etil-1-hexanol	38,10
	14,17 (E)	Fenol	56,20
	14,43 (E)	1-dodecino	7,28
	14,82 (E)	Ácido acético, 2-propenil éster	1,13
	14,88 (E)	3,7-dimetil-1,3,7-octatrieno	6,42
	15,13	2-ciclo-hexen-1-ona	1,76
	15,52 (E)	2-metoxi-fenol	35,20
	15,60 (E)	Etil-pirazina	35,40
	16,32 (E)	2-metil-6-metileno-7-octen-2-ol	83,50
	16,61 (E)	3,7-dimetil-6-octen-1-ol	1,33
	16,66 (E)	Ácido 2-metil-pentanoico, metil éster	3,82
	16,81 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	1,37
	17,15 (E)	2-etil-pirrol	4,00
	17,17 (E)	2,4-dimetil-1-hepten-4-ol	5,46
	17,57 (E)	2-metoxi-5-metil-fenol	25,90
	17,99 (E)	4-tert-butil-ciclohexanol	61,50
	19,64 (E)	3-hidroxipiridina	1,16
	19,82 (E)	4-etil-2-metoxi-fenol	49,80
	20,17 (E)	Dimetiletoxi-benzeno	56,10
	22,70	Ácido butanoico, heptil éster	32,20

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
4UP	23,07	Ácido 2-metil-propanoico, hexil éster	47,80
5UP	4,89	2-nitro-propano	29,10
	5,40	Alanina	1,59
	5,42	2-amino-1-propanol	2,97
	6,60	Acetonitrila	44,30
	6,68	Ácido 2-hidroxi-2-metil-propanoico, metil éster	12,40
	7,74	Anidrido acético	2,91
	8,13	Vinilbutirato	62,40
	8,32	Metanotiol	94,00
	8,80	2,3,4-trimetil-pentano	29,90
	8,87	Pirrol	27,20
	8,97 (E)	Pentanal	2,31
	9,40	2-pentanona	84,50
	9,51	Pentanal	52,50
	10,25	Dimetil dissulfeto	96,20
	10,38 (E)	Piridina	81,80
	10,89	Metil-2-butinoato	39,60
	10,96	Hexanal	2,72
	11,86	4-heptanona	58,90
	11,93 (E)	3-metil-pirrol	75,50
	12,05 (E)	3-metil-pirazina	63,90
	12,73 (E)	2,4,6-octatrienal	29,80
	13,18	2,5-hexanodiona	3,79
	13,39	2-metil-hex-2-in-4-ona	72,60
	13,55	Dimetil trissulfeto	84,10
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	11,90
	14,16 (E)	Fenol	47,30
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	12,60
	14,78 (E)	1,3,5-cicloheptatrieno	16,9
	14,87 (E)	Tolueno	9,33
	15,11 (E)	Butanonitrila	5,25
	15,52 (E)	2-metoxi-fenol	74,70
	15,58 (E)	4-metil-fenol	36,70
	16,80 (E)	5-dimetilaminopirimidina	2,47
	16,81 (E)	1,6-dimetilhepta-1,3,5-trieno	1,73
	17,44 (E)	Benzaldeído	5,62
	19,28 (E)	1,4-dimetoxi-benzeno	30,80
	19,30 (E)	Etanoditioamida	1,07
	19,83 (E)	4-etil-2-metoxi-fenol	69,70
	21,40	4-hidroxi-2-metilacetofenona	28,10
	22,67	Ácido butanoico, heptil éster	32,20

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
5UP	22,70	Ácido butanoico, heptil éster	21,70
	23,06	Ácido butanoico, hexil éster	1,78
6UP	4,86	2-nitro-propano	1,94
	5,32	Hidroxiureia	1,20
	6,61	Acetonitrila	47,90
	6,68	Acetona	7,20
	7,74	4-penten-2-ona	1,15
	8,43	Benzeno	32,90
	8,80	Dissulfeto de carbono	6,39
	8,85	2,3-dimetil-pentano	6,93
	8,86	3-metil-hexano	48,10
	9,40	2-pentanona	82,60
	9,51	Ácido fórmico, 2-propenil éster	38,80
	10,16	Ácido 2-hidroxi-propanoico, etil éster	2,17
	10,25	Dimetil dissulfeto	96,90
	10,29 (E)	Furano	10,29
	10,39 (E)	Piridina	72,30
	10,55 (E)	2-metil-1-buteno	12,15
	10,89	Pirrol	93,40
	10,96	Hexanal	10,10
	11,86	2-metil-3-hexanona	42,20
	11,93 (E)	2-metil-pirrol	75,10
	12,12 (E)	2-metil-pentanal	36,90
	12,83 (E)	1,3,5-cicloheptatrieno	15,20
	13,17	2,5-hexanodiona	3,97
	13,35 (E)	3-(2-propenil)-ciclopenteno	
	13,39	1,3-ciclopentadieno	12,20
	13,57	Trimetil dissulfeto/feniglioxal	12,50
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	35,90
	14,16 (E)	Fenol	61,40
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	49,40
	14,76 (E)	3,7-dimetil-3-octanol	42,50
	14,87 (E)	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	23,40
	15,51 (E)	2-metil-2-ciclopenten-1-il-etanona	61,40
	15,58 (E)	4-metil-fenol	35,40
	15,59 (E)	1-metiletenil-ciclopentano	17,10
	16,30 (E)	Isopulegol	32,60
	16,60 (E)	Ment-8-eno	1,84
	16,80 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	1,76
	17,12 (E)	4-pirridinol	33,10
	17,17 (E)	Ment-1-en-8-ol	38,30

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
6UP	17,42 (E)	4-etil-fenol	48,40
	17,43 (E)	Metil-benzenometanol	1,38
	19,62 (E)	3-hidroxipiridina	2,01
	19,81 (E)	4-etil-2-metoxi-fenol	57,80
	20,74 (E)	2-fenilmetoxi-propanal	4,20
	21,36 (E)	3-metoxi-acetofenona	43,20
	22,68	Ácido 3-hidroxidecanoico	6,93
	22,72	Ácido butanoico, heptil éster	6,72
	23,07	Ácido butanoico, heptil éster	70,30
7UP	4,86	Isobutano	1,44
	5,36	Alanina	1,25
	5,43	2-amino-1-propanol	3,20
	6,57	Acetonitrila	54,40
	7,75	Anidrido acético	2,91
	8,86	Metacroleína	2,30
	9,40	2-pentanona	82,10
	9,52	3-metil-4-penten-2-ol	14,80
	10,25	Dimetil dissulfeto	96,70
	10,39 (E)	1,3,5-cicloheptatrieno	32,60
	10,55 (E)	Metil-ciclobutano	10,60
	11,86	2-metil-3-hexanona	36,90
	13,17	2,3-octanodiona	5,10
	13,23	3-heptanol	4,11
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	21,40
	14,15 (E)	Fenol	33,80
	14,41 (E)	4-trimetil-ciclohexanometanol	42,40
	14,86 (E)	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	10,70
	15,57 (E)	4-metil-fenol	36,40
	16,60 (E)	3-isobutil-ciclohexeno	1,83
	16,79 (E)	1-dodecino	1,59
	17,13 (E)	5-metil-piridina	4,00
	13,55	Dimetil dissulfeto	88,50
	22,70	Tetrahidro-2-furano-metanol,acetato	1,47
	23,07	Ácido 2-metil-propanoico, pentil éster	55,90
8UP	4,87	1-nitro-propano	31,60
	5,36	Alanina	1,20
	5,40	2-amino-1-propanol	34,60
	6,59	Acetonitrila	18,10
	6,66	Guanidina	50,80
	7,75	Isobutano	1,44

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
8UP	7,91	Ácido metano carbotiólico	3,44
	8,87	3-etil-pentano	21,80
	9,40	2-pentanona	75,60
	9,51	Ciclopentanol	1,05
	10,25	Dimetil dissulfeto	98,30
	10,38 (E)	1,3,5-cicloheptatrieno	19,70
	10,75	3-hexanona	4,57
	10,89	Hex-4-in-3-ona	32,60
	10,96	Hexanal	71,80
	11,86	2-metil-3-hexanona	38,30
	11,92 (E)	Dimetil sulfóxido	7,41
	12,11 (E)	Dimetil diazeno	35,50
	12,27	Alil isotiocianato	76,20
	12,71 (E)	2,4,6-octatrienal	2,93
	13,17	Diacetil sulfeto	1,25
	13,55	Dimetil trissulfeto	28,00
	13,85 (E)	2-etil-1-hexanol	42,00
	14,15 (E)	Fenol	48,90
	14,41 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	57,70
	14,61 (E)	3,3,5-trimetil-ciclohexanol	37,70
	14,86 (E)	3-careno	11,40
	15,57 (E)	2-metil-fenol	27,70
	16,79 (E)	Carano	8,58
	17,11 (E)	Ácido metil-carbâmico	4,00
	17,21 (E)	2,4-dimetil-benzenamina	14,80
	17,62 (E)	1-ciclopentil-etanona	49,80
	17,96 (E)	1-undecino	6,48
	18,86 (E)	4-trimetil-ciclohexanometanol	10,90
	21,36 (E)	Dimetil-benzenamida	1,02
	21,88	Pirroldinetiona	18,30
	22,67	Ácido butanoico, heptil éster	18,80
	23,07	Ácido butanoico, octil éster	62,70
9UP	4,89	2-nitro-propano	25,90
	5,00	Acetileno	1,51
	5,38	2-amino-1-propanol	4,97
	5,40	Alanina	1,94
	6,60	Acetonitrila	57,90
	7,74	2,3-butanodiona	1,18
	7,91	4-hidroxi-2-butanona	13,70
	8,16	Vinilbutirato	43,00
	8,83	3-metil-hexano	6,94

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
9UP	8,97	Etil-1-propenil éter	10,10
	9,40	2-pentanona	77,30
	9,51	Pentanal	6,04
	10,06	4-penten-2-ona	1,15
	10,24 (E)	Dimetil dissulfeto	8,29
	10,40 (E)	Piridina	60,60
	10,58	2,6-octadieno	4,82
	10,75	3-hexanona	61,70
	10,89	2-metil-hex-2-in-4-ona	2,95
	10,96	1-hexanol	13,80
	11,86	2,3-hexanodiona	1,53
	12,13	2-heptanona	1,02
	12,31	5-hexen-1-ol	1,46
	12,67 (E)	2-hidroxi-2-ciclopenten-1-ona	33,30
	13,17	2,3-octanodiona	2,61
	13,22 (E)	1-fenil-1,2-propanodiona	15,40
	13,39	1,3-ciclopentadieno	12,20
	13,54	Trimetil dissulfeto	80,00
	13,87 (E)	2-etil-1-hexanol	43,80
	14,05	Terpineno	30,20
	14,17 (E)	Fenol	55,90
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	33,50
	14,54	Isoterpinoleno	25,80
	14,80	1,6-heptadien-3-ino	20,00
	14,81	1,3,5-cicloheptatrieno	1,78
	14,87 (E)	2,6-dimetil-2,7-octadieno	23,80
	15,12	3,4-didehidro-prolina	83,20
	15,53 (E)	2-metoxi-fenol	41,50
	15,59 (E)	4-metil-fenol	38,00
	15,76	Felandreno	12,60
	16,61 (E)	1-metil-3-(2-metil-1-propenil)-ciclopentano	4,73
	16,84	4-terpineol	48,20
	17,12 (E)	2-piridinona	4,81
	17,14 (E)	Ácido carbâmico, fenil éster	4,00
	17,58 (E)	2-metoxi-5-metil-fenol	32,00
	17,98 (E)	1-isopentil-ciclopenteno	11,80
	20,76 (E)	4-hidroxi-2-metilacetofenona	43,70
	22,68	Ácido butanoico, hexil éster	14,70
	22,70	Ácido butanoico, heptil éster	10,70
	23,07	Ácido 2-metil-propanoico, hexil éster	29,60
	23,09	Ácido 2metil-propanoico, hexil éster	15,90

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
10UP	4,87	2-nitro-propano	32,50
	5,38	2-amino-1-propanol	3,35
	5,40	Alanina	1,35
	6,57	Acetonitrila	57,80
	7,72	Anidrido acético	4,90
	8,85	3-metil-butanal	15,90
	8,89	2,3-hexanodiona	16,90
	9,40	2-pentanona	77,30
	9,51	Pentanal	60,20
	10,04 (E)	2,3-dimetil-butano	1,46
	10,25	Dimetil dissulfeto	65,80
	10,40 (E)	Tolueno	2,10
	10,56	Ciclopentanona	7,44
	10,74	3-hexanona	82,40
	10,89	Hex-4-in-3-ona	40,60
	10,96	3-metil-pentano	2,18
	11,33	Metil pirazina	72,50
	11,85	2-metil-3-hexanona	39,20
	11,93 (E)	3-metil-1-pirrol	74,10
	11,94 (E)	2-metil-pirrol	58,40
	12,12 (E)	2-heptanona	53,20
	12,25 (E)	Felandreno	10,40
	12,39	2,5-dimetil-pirazina	50,60
	12,59 (E)	4-metil-4-hepten-3-ona	1,02
	12,66 (E)	Ácido 2-propenoico, etenil éster	6,65
	12,73 (E)	2,4,6-octatrienal	13,10
	13,00 (E)	Felandreno	28,50
	13,16	2,3-octanodiona	13,20
	13,38 (E)	Tolueno	1,08
	13,41 (E)	3,3,6-trimetil-1,5-heptadien-4-ona	5,35
	13,55	Dimetil trissulfeto	97,10
	13,79 (E)	Metil-estireno	1,94
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	23,00
	14,04 (E)	Terpineno	19,00
	14,16 (E)	Fenol	53,50
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	48,10
	14,53 (E)	Isoterpinoleno	8,50
	14,55	4-tiometil-prolina	1,94
	14,79	1,3,5-cicloheptatrieno	26,80
	14,86 (E)	Fenil-butanamida	7,45
	15,12	1-metoxi-2-metil-3-butanol	30,90

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
10UP	15,14 (E)	Careno	3,36
	15,58 (E)	2-metil-fenol	32,80
	15,74 (E)	Dimetil-benzenometanamida	1,19
	15,97 (E)	1,10-undecadieno	4,88
	16,60 (E)	Carano	5,92
	16,61 (E)	Etenil-ciclohexano	2,91
	16,80 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	1,81
	17,13 (E)	Ácido carbâmico, fenil éster	4,00
	17,14 (E)	3(2-propenil)-ciclopenteno	10,80
	17,43 (E)	1,4-dihidro-3-piridinacarbonitrila	5,62
	17,55 (E)	2-metoxi-5-metil-fenol	25,60
	18,97 (E)	2-ciclopenten-1-ona	6,18
	20,17 (E)	2-etil-4,5-dimetil-fenol	2,82
	20,74 (E)	3-metil-4-isopropil-fenol	9,29
	21,36 (E)	4-hidroxi-2-metilacetofenona	33,10
	22,54 (E)	2-metoxi-4-propenil-fenol	12,50
	22,69	Ácido butanoico, heptil éster	5,45
	23,08	Ácido 2-metil-propanoico, hexil éster	19,10
11UP	4,87	Acetona	4,23
	5,35	2-amino-1-propanol	5,22
	5,40	Alanina	1,36
	6,58	Acetonitrila	52,50
	6,64	Acetona	7,20
	7,74	Anidrido acético	2,91
	8,86	3-metil-hexano	48,40
	9,40	2-pentanona	77,80
	9,52	Ácido propanoico, 2-propenil éster	21,10
	10,23 (E)	1-metil-pirrol	63,50
	10,39 (E)	1,3,5-cicloheptatrieno	21,10
	10,74	3-metil-2-pentanona	37,10
	10,75	3-hexanona	17,20
	10,88 (E)	Pirrol	3,78
	10,96	Hexanal	62,90
	11,85	Ácido 2-metil-propanoico, 2-propenil éster	28,00
	12,13	4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	1,22
	12,73 (E)	2,4,6-octatrienal	3,93
	13,17	2,3-octanodiona	9,85
	13,23 (E)	2,6-dimetil-2-heptanol	4,25
	13,35 (E)	Guanidina	78,50
	13,54	Trimetil dissulfeto	13,80
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	21,30

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
11UP	14,05	Terpineno	27,30
	14,16 (E)	Fenol	61,20
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	29,40
	14,79	2-propenilideno-ciclobuteno	7,50
	14,86 (E)	3,7-dimetil-1,3,7-octatrieno	8,37
	15,11 (E)	3,4-didehidro-prolina	33,10
	15,40 (E)	Octanodinitrila	8,32
	15,51 (E)	2-metoxi-fenol	31,80
	15,58	Etil-pirazina	7,72
	15,71 (E)	1-etil-1,3-dimetil-ciclohexano	1,27
	16,00 (E)	3-nonino	4,70
	16,60 (E)	Ment-3-eno	1,09
	16,79 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	1,16
	16,86	4-terpineol	35,60
	17,14 (E)	3,3,5,5-tetrametilciclohexanol	43,70
	17,42 (E)	4-etil-fenol	2,07
	17,96 (E)	2,5-dicloro-fenol	65,50
	18,97 (E)	Benzoquinona	40,90
	19,83 (E)	4-etil-2-metoxi-fenol	48,10
	20,75 (E)	2-etil-benzaldeído	1,28
	21,37 (E)	3-metoxi-acetofenona	42,60
	22,67	Ácido butanoico, hexil éster	3,14
	22,70	Ácido 2-metil-propanoico, hexil éster	3,29
	23,06	Ácido butanico, heptil éster	1,24
12UP	4,90	2-nitro-propano	1,48
	5,34	Hidrogênio sulfeto	98,70
	5,38	Alanina	1,60
	5,42	2-amino-1-propanol	3,62
	5,90	Acetileno	89,00
	6,25	Anidrido acético	38,80
	6,59	Acetonitrila	16,40
	6,66	Acetona	7,20
	8,85	Vinilbutirato	1,22
	9,40	2,3-butanodiona	75,60
	9,48 (E)	Isobutano	4,00
	10,25	Dimetil dissulfeto	94,50
	10,38 (E)	1,3,5-cicloheptatrieno	18,30
	11,81	2-ciclopentiletanol	12,10
	11,85	4,5-octadieno	19,40
	11,92 (E)	2-metil-pirrol	59,10
	12,83 (E)	1,6-heptadien-3-ino	18,10

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
12UP	13,17	2,3-heptanodiona	2,80
	13,38 (E)	Benzil metil cetona	15,10
	13,55	Dimetil trissulfeto	92,10
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	19,40
	14,15 (E)	Fenol	42,60
	14,41 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	67,70
	14,75 (E)	3,7-dimetil-3-octanol	40,70
	14,86 (E)	Pineno	11,30
	15,12	3-hidroxipropanonitrila	5,25
	15,52 (E)	2-metoxi-fenol	75,80
	15,57 (E)	4-metil-fenol	49,80
	16,79 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	3,80
	17,11 (E)	Piridona	20,70
	17,61 (E)	1,6-heptadien-4-ol	7,81
	18,22 (E)	Dietil-tioureia	1,86
	19,81 (E)	4,8-dimetil-1,7-nonadieno	5,66
	19,98 (E)	1-metil-1,4-ciclohexadieno	13,20
	21,40	4-hidroxi-2-metilacetofenona	33,00
	21,94	Lumazina	28,50
	22,02	4-hidroxi-2-metilacetofenona	37,90
	22,67	Ácido butanoico, heptil éster	5,06
	23,07	Ácido butanoico, octil éster	4,32
13UP	4,91	2-nitro-propano	28,80
	5,34	Glicina	73,40
	5,41	Acetileno	36,50
	5,42	2-amino-1-propanol	5,37
	5,92	Dietilamina	19,70
	6,60	Acetonitrila	67,00
	6,67	Acetona	7,20
	7,74	Anidrido acético	32,20
	8,15	Vinilbutirato	14,40
	8,85	2,2-dimetil-butano	42,80
	8,86	3-metil-hexano	3,89
	8,96	Diacetil sulfeto	1,25
	9,39	3-metil-2-butanona	83,40
	9,51	2-metil-butanal	5,55
	10,25	Dimetil dissulfeto	98,20
	10,40 (E)	Piridina	28,10
	10,57	2,4-diaminopiridina	4,45
	10,74	3-hexanona	70,40
	10,89	Pirrol	73,50

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
13UP	10,96	Hexanal	89,70
	11,48	3-metil-4-penten-2-ol	14,80
	11,85	2,3-hexanodiona	36,50
	11,91	2-etil-3-metil-1-buteno	16,60
	11,93 (E)	3-metil-pirrol	59,30
	12,13	2-metil-pentanal	37,60
	12,73 (E)	2,4,6-octatrienal	27,70
	12,84 (E)	Ftalan	25,50
	13,06	2-propil-furano	3,41
	13,16	2-metil-3-octanona	10,30
	13,30	6-metil-3,5-heptadieno-2-ona	17,10
	13,39	2-metil-hex-2-in-4-ona	9,84
	13,42	3-etil-ciclopentano	28,70
	13,55	Dimetil trissulfeto	98,00
	13,79 (E)	4-metil-acetofenona	6,83
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	37,60
	17,16 (E)	Fenol	31,50
	14,22 (E)	3-octen-2-ona	9,47
	14,42 (E)	2,5-dimetil-7-octen-2-ol	32,60
	14,62 (E)	3,4-diamino-piridina	75,40
	14,79	3-butenil-benzeno	51,50
	14,88 (E)	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	7,40
	15,11 (E)	3,4-didehidro-prolina	78,70
	15,14	1-metoxi-2-metil-3-buteno	30,10
	15,30 (E)	2-metil-6-metileno-7-octen-2-ol	31,60
	15,52 (E)	3,7-dimetil-1,3,7-octatrieno	3,31
	15,58 (E)	2-metoxi-fenol	28,80
	15,86 (E)	Ment-3-en-1-ol	20,10
	15,98 (E)	1-undecino	1,96
	16,23 (E)	2-acetil-3-metilpirazina	1,90
	16,31 (E)	Terpineol	4,75
	16,35 (E)	3-nitro-fenol	10,30
	16,60 (E)	Ment-8-eno	1,14
	16,69 (E)	2-dimetilamino-3-metilpiridina	24,60
	16,80 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	3,93
	16,91 (E)	2-metileno-6-metil-ciclohexanol	1,72
	17,14 (E)	3-piridinol	9,13
	17,16	4-trimetil-benzenometanol	16,60
	17,18	4-hidroxifenilacetilcetona	77,20
	17,29 (E)	Isoterpinoleno	43,50
	17,70 (E)	4-isopropenil-1-metil-2-ciclohexen-1-ol	44,80

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
13UP	18,98	2-ciclopenten-1-ona	15,20
	19,83 (E)	4,8-dimetil-1,7-nonadieno	7,40
	20,14 (E)	4,6-dimetil-2,7-nonadien-5-ona	1,89
	20,75 (E)	Timol	18,40
	21,38	3-metoxi-acetofenona	38,50
	22,66 (E)	Ácido butanoico, heptil éster	8,27
	23,09	2,4-dimetil-3-heptanona	1,64
14UP	4,91	Isobutano	1,44
	5,40	2-amino-1-propanol	3,82
	6,58	Acetonitrila	18,00
	6,67	Guanidina	31,80
	7,74	Anidrido acético	2,91
	8,87	4-metil-1-hexeno	11,50
	9,40	2-pentanona	78,50
	9,50	Pentanal	5,60
	10,25	Dimetil dissulfeto	97,70
	10,89	Metil-2-butinoato	81,20
	11,85	2-metil-3-hexanona	53,00
	11,92 (E)	2-metil-pirrol	4,93
	12,12 (E)	Ácido acético, 2-propenil éster	3,23
	12,27	Alil isotiocianato	80,80
	12,33	5-metil-tiazol	1,12
	12,83 (E)	1,6-heptadi-ino	1,59
	13,17	2,4-dimetil-3-heptanona	3,30
	13,55	Dimetil trissulfeto	12,00
	13,85 (E)	2-etil-1-hexanol	40,20
	14,15 (E)	Fenol	45,30
	14,41 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	65,80
	14,61 (E)	3,3,5-trimetil-ciclohexanol	57,40
	14,75 (E)	3,7-dimetil-3-octanol	42,10
	14,86 (E)	3,7-dimetil-1,3,7-octatrieno	38,00
	15,09 (E)	3-hidroxipropanonitrila	5,25
	15,55 (E)	1-fenil-1,2-etanodiol	7,33
	15,59	4-metil-fenol	48,10
	15,96 (E)	Ciclohexanoetanol	30,00
	16,29 (E)	10-undecin-1-ol	7,92
	16,53 (E)	Fenil-formamida	26,90
	16,59 (E)	2-piridinona	23,10
	16,78 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	1,90
	17,11 (E)	Ment-2-eno	6,06
	17,12 (E)	Aminopirazina	16,10

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
14UP	17,42 (E)	4-etil-fenol	64,10
	17,55 (E)	2-metoxi-5-metil-fenol	37,10
	17,62 (E)	1-ciclopentil-etanona	4,20
	19,61 (E)	2-furanil-1-pentanona	3,81
	20,05	1-fenil-2-butanona	9,39
	20,73 (E)	4-hidroxi-2-metilacetofenona	22,00
	21,35 (E)	2-metoxi-4-vinilfenol	35,30
	22,69	Ácido butanoico, octil éster	3,98
	23,07	Ácido 2-metil-propanoico, hexil éster	1,77
15UP	4,90	1-nitro-propano	26,80
	5,09	Ácido hidroxi-acético	54,30
	5,43	1-hidroxi-butanona	1,00
	5,63	Formaldeído	33,00
	6,26	Anidrido acético	6,26
	6,60	Acetonitirla	7,25
	8,86	3-metil-hexano	62,20
	9,39	2-pentanona	82,70
	9,50	Pentanal	9,60
	10,25	Dimetil dissulfeto	98,00
	10,40 (E)	Tolueno	22,10
	10,75	3-metil-2-pentanona	86,60
	10,89	Propanodinitrila	12,20
	11,85	4-heptanona	39,10
	13,54	Dimetil trissulfeto	96,30
	13,85 (E)	2-etil-1-hexanol	12,50
	14,15 (E)	Fenol	36,50
	14,41 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	46,20
	14,88	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	6,11
	15,12	Metiltio-ciclopentano	6,43
	15,57 (E)	2-metil-fenol	28,30
	16,59 (E)	4,4-dimetil-hexanal	5,11
	16,75 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	10,96
	17,13 (E)	2-etil-pirrol	4,00
	17,19	2-metil-6-metileno-7-octen-2-ol	10,30
	20,73 (E)	Tert-butoxi-benzeno	53,20
	22,68	Ácido butanoico, heptil éster	14,90
	23,07	Ácido butanoico, octil éster	1,56
16UP	4,91	Butano	1,67
	5,23	1-propanol	21,50
	5,40		

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
16UP	6,21	Isobutano	1,44
	6,24	Alanina	15,40
	6,26	Propanal	3,13
	6,61	Acetonitrila	55,00
	6,68	2-butanol	14,60
	7,75	Anidrido acético	2,91
	8,87	3-metil-hexeno	62,30
	8,94 (E)	2-pentanona	7,48
	9,40	2-pentanona	82,50
	9,51	Pentanal	22,40
	10,25	Dimetil dissulfeto	98,10
	10,31	1,2,3-triazol	65,10
	10,40 (E)	Tolueno	1,58
	10,90	Propanodinitrila	12,20
	10,97	Hexanal	55,90
	11,86	2,4-dimetil-3-pentanona	45,30
	11,93 (E)	2-metil-pirrol	29,10
	12,14	Ácido acético, 2-propenil éster	2,49
	12,73 (E)	2-metil-1-octen-3-ino	10,10
	13,17	2,4-octanodiona	1,70
	13,55	Dimetil trissulfeto	83,30
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	35,80
	14,18	Dimetil-estireno	25,90
	14,42 (E)	2-metil-1-heptanol	18,10
	14,44 (E)	3-acetil-5,7-octadien-2-ona	2,03
	14,79 (E)	4-dimetil-estireno	35,20
	14,87 (E)	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	23,80
	15,13	Furano	10,90
	15,52 (E)	2-metoxi-fenol	24,70
	15,58 (E)	4-metil-fenol	44,80
	15,98 (E)	3-nonen-1-ol	14,20
	16,09 (E)	1,3,5-cicloheptatrieno	22,40
	16,80 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	2,38
	16,98 (E)	2,4,6-octatrieno	4,11
	17,14 (E)	2-piridinona	11,00
	17,16 (E)	4-piridazinamina	54,00
	17,43 (E)	2,7-dimetil-1,7-octadieno	8,92
	17,44 (E)	1,10-undecadieno	4,22
	17,51 (E)	Ment-1,5-dien-ol	61,60
	17,65	Benzotriazol	14,60
	18,30 (E)	2,5-dietil-fenol	2,09

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
16UP	20,20 (E)	Tert-butil-fenol	26,60
	20,75 (E)	Tert-butil-fenl- éter	39,90
	21,41	4-hidroxi-3-metilacetofenona	30,90
	22,70	Ácido butanoico, heptil éster	16,00
	23,07	Ácido butanoico, octil éster	1,20
17UP	4,92	2-nitro-propano	30,40
	5,38	Hidrogênio sulfeto	37,30
	5,40	2-amino-1-propanol	3,01
	7,75	Anidrido acético	2,91
	8,85	2,2-dimetil-butane	5,60
	8,96 (E)	2,2-dimetil-propano	6,63
	9,40	2-pentanona	79,80
	9,51	Pentanal	51,10
	10,25	Dimetil dissulfeto	97,20
	10,40 (E)	1,3,5-cicloheptatrieno	20,40
	10,75	3-hexanona	2,45
	11,86	2-metil-3-hexanona	27,50
	11,93 (E)	3-metil-pirrol	53,80
	12,84 (E)	1,6-hepta-3-ino	8,98
	13,39	Propanodinitrila	12,20
	13,55	Dimetil trissulfeto	87,30
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	15,20
	14,17 (E)	Fenol	47,50
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	41,20
	14,78 (E)	Tolueno	1,15
	14,87 (E)	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	9,99
	15,12	Furano	2,97
	15,52 (E)	1-acetil-ciclohexeno	29,00
	15,59 (E)	2-metil-fenol	28,70
	16,61 (E)	Mentil	2,49
	16,83	Hept-3-in-2-ona	1,09
	17,13 (E)	2,6-dimetil-3,7-octadieno-2,6-diol	1,86
	17,61 (E)	Mentil	61,10
	17,98 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	1,99
	19,83 (E)	4-hidroxibenzamida	16,10
	21,37 (E)	4-hidroxi-2-metilacetofenona	40,70
	22,70	Ácido butanoico, heptil éster	20,40
	23,05	Ácido butanoico, octil éster	1,04
18UP	4,91	2,3-butanodiona	1,49
	5,42	Alanina	1,32

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
18UP	6,59	Acetonitrila	59,40
	6,67	Guanidina	71,50
	7,75	Anidrido acético	2,91
	8,15	Vinilbutirato	30,80
	8,85	2,3,4-trimetil-pentano	15,60
	9,07	2-propenal	7,04
	9,39	2-pentanona	79,40
	9,51	Pentanal	59,50
	10,25	Dimetil dissulfeto	97,30
	10,39 (E)	1,3,5-cicloheptatrieno	30,60
	10,59	Metil 2-butinoato	10,89
	10,96	Hexanal	33,90
	11,86	2-heptanona	64,50
	12,11 (E)	2-metil-pentanal	37,60
	12,72 (E)	Etil-benzenometanol	4,13
	13,16	2,5-octanodiona	3,03
	13,31	4-metoxi-piridina	33,60
	13,38	Pirrol	89,70
	13,42	3,4-dimetil-2-hexeno	21,30
	13,54	Dimetil trissulfeto	95,40
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	37,60
	14,17	Fenol	19,20
	14,41 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	51,10
	14,56	Dipropil acetal	43,20
	14,77 (E)	Alil ditioacetato	62,60
	14,86 (E)	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	11,40
	14,96 (E)	2-piridinacarboxaldeído	4,36
	15,09 (E)	3,4-didehidro-prolina	56,00
	15,12	3,4-didehidro-prolina	86,10
	15,57 (E)	4-metil-fenol	26,40
	15,77 (E)	3,4-dihidroxiacetofenona	8,29
	15,88	1,3-ciclohexadieno	35,60
	15,96 (E)	1,10-undecadieno	6,76
	16,24 (E)	2,6-dimetil-6-hepten-2-ol	8,69
	16,28 (E)	Isopulegol	34,70
	16,60 (E)	Mentil	1,37
	16,78 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	1,98
	16,80	4-trideceno	1,39
	16,81	Mentol	10,20
	17,02 (E)	2,3-dihidro-5-metil-furano	10,50
	17,11 (E)	2-piridinona	16,80

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
18UP	17,31 (E)	Ment-3,8-dieno	10,60
	17,64	Metil-estireno	1,94
	17,87 (E)	Menta-6,8-dien-2-ol	30,30
	18,94 (E)	Carvona	59,30
	19,40	5-metil-2-furancarboxaldeído	26,90
	19,61 (E)	2-isopropil-5-metil-3-ciclohexen-1-ona	50,10
	19,65	Carvomentona	6,36
	20,72 (E)	2-metil-5-isopropil-fenol	12,00
	21,37	3-metoxi-acetofenona	42,50
	21,97 (E)	4-hidroxi-2-metilacetofenona	37,80
	22,02	4-hidroxi-2-metilacetofenona	39,40
	22,67	Ácido 3-hidroxidecanoico	48,80
	22,70	Ácido butanoico, heptil éster	19,00
	23,07	Etil, hexil éster	1,66
19UP	4,90	2-nitro-propano	39,90
	5,39	Alanina	1,45
	5,43	2-amino-1-propanol	1,71
	6,60	Acetonitrila	65,40
	7,76	Anidrido acético	2,91
	8,48	Isobutano	38,20
	8,85	Metacroleína	8,85
	9,07	2-metil-1-propeno	
	9,39	2-pentanona	85,00
	9,50	Pentanal	59,20
	10,11 (E)	3-metil-1-buteno	3,59
	10,29	3-penten-2-ona	2,55
	10,38 (E)	1,6-heptadien-3-ino	21,50
	10,42 (E)	Piridina	57,00
	10,56	2-metil-2-buteno	14,10
	10,87 (E)	Pirrol	73,10
	10,89	Metil-2-butinoato	86,40
	10,96	Hexanal	64,00
	11,76	4-penten-2-ona	37,80
	11,85	2,4-dimetil-3-pentanona	63,00
	12,11 (E)	Dimetil diazeno	42,90
	12,72 (E)	2,4,6-octatrienal	37,80
	12,82 (E)	2-propenilideno-ciclobuteno	16,70
	13,16	3-octanona	4,42
	13,30	6-metil-3,5-heptadieno-2-ona	2,32
	13,54	Dimetil trissulfeto	90,60
	13,77	Dimetil-metanotioamida	1,89

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
19UP	13,70	Fenol	14,17
	13,85 (E)	2-etil-1-hexanol	19,70
	14,15 (E)	Fenol	52,50
	14,40 (E)	2-metil-6-metileno-7-octen-2-ol	38,50
	14,54	4-penten-2-ol	1,33
	14,60 (E)	2-etilideno-1,1-dimetil-ciclopentano	2,84
	14,79	2-etil-2-metil-1,3-oxatiolano	1,10
	14,87	3,7-dimetil-1,3,7-octatrieno	3,23
	14,88	Isobutiranilida	18,40
	15,09	1,3,8-mentatrieno	28,90
	15,11	Metiltio-ciclopentano	19,40
	15,18 (E)	2,2-dihidroxi-1-fenil-etanona	9,74
	15,46	Benzotriazol	8,93
	15,58	Etil-pirazina	8,95
	15,75	Menta-2,8-dien-1-ol	9,17
	16,05	2,6-dimetil-1,3,7-octatetraeno	22,00
	16,10 (E)	1-ciclohexilideno-2-propanona	20,60
	16,21 (E)	Ment-8-en-1-ol	29,70
	16,32	2-cloro-benzaldeído	26,20
	16,45	1,2-benzioxazol	27,30
	16,58 (E)	2-isopropil-5-metil-3-ciclohexanol	4,58
	16,63 (E)	1-metil-1-butenil-benzeno	11,10
	16,66 (E)	3-propil-fenol	7,11
	16,67 (E)	Neodihidrocarveol	11,70
	16,71	5,5-dimetil-1,3-ciclopentadieno	5,97
	16,78 (E)	1-undecino	4,71
	16,84	4,5-dimetil-2,6-octadieno	14,10
	17,12 (E)	2-piridinona	5,24
	17,15 (E)	Ment-1-en-8-ol	48,20
	17,18	2,6-dimetil-5,7-octadien-2-ol	10,60
	17,32 (E)	Ment-3,8-dieno	17,80
	17,45 (E)	2,6-dimetil-1,3,7-octatetraeno	14,10
	17,48	2,6-dimetil-1,3,7-octatetraeno	12,60
	17,62 (E)	Ácido butanoico, 3-metilbut-2-enil éster	1,59
	17,78	Isopropil-benzilamina	32,20
	17,88	Pinen-3-ol	26,20
	17,92 (E)	2-metil-3-fenil-2-propenal	58,00
	18,00 (E)	Metil-pirazina	4,70
	18,21 (E)	4-metil-acetofenona	35,30
	18,95 (E)	3-metil-pirrol	4,39
	19,97 (E)	Menta-1,8-dien-7-ol	4,57

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
19UP	20,72 (E)	Timol	17,50
	21,34 (E)	3-metoxi-acetofenona	42,60
	21,39	4-hidroxi-2-metilacetofenona	32,80
	22,69	Benzenoacetonitrila	58,50
	23,01 (E)	Ácido 2-metil-propanoico, butil éster	27,10
	23,70	Ácido 2-metil propanoico, butil éster	53,30
	28,01 (E)	Ment-1-en-9-al	20,80
20UP	4,91	2-nitro-propano	28,80
	5,06	Propadieno	1,02
	5,35	Hidrogênio sulfeto	17,70
	5,40	Alanina	1,24
	5,43	2-amino-1-propanol	4,70
	6,60	Acetonitrila	15,20
	7,75	Anidrido acético	4,93
	8,85	2,3,4-trimetil-pentano	5,45
	8,95 (E)	Isobutano	1,44
	9,40	2-pentanona	76,00
	9,51	Pentanal	63,60
	10,25	Dimetil dissulfeto	97,70
	10,40 (E)	Ácido carbônico, dietil éster	1,47
	10,75	3-hexanona	1,40
	10,89	Metil-2-butinoato	69,00
	10,96	3,4-dimetil-hexano	1,48
	11,85	4-heptanona	47,70
	11,93 (E)	2-metil-pirrol	56,80
	12,13	2-metil-pentanal	20,90
	12,60	1,2,3-triazol	68,70
	13,00 (E)	Hidrazinacarbotioamida	9,33
	13,17	2,5-hexanodiona	2,96
	13,38	Propanodinitrila	12,20
	13,54	Dimetil trissulfeto	29,70
	13,87 (E)	2-etil-1-hexanol	27,10
	14,05	Metil-tolil-carbinol	29,30
	14,16 (E)	Fenol	58,60
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	10,24
	14,55	4-dimetil-benzenometanol	42,30
	14,57	2-metil-6-metileno-7-octen-2-ol	9,18
	14,87 (E)	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	16,60
	15,12 (E)	1-(metiltio)-2-butilbut-2-eno	6,05
	15,52 (E)	2-metoxi-fenol	59,20
	15,98 (E)	3-propil-1,4-pentadieno	8,59

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
20UP	16,61 (E)	2-metil-1,5-heptadieno	6,77
	16,81 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	1,43
	16,83	Felandreno	20,40
	17,11 (E)	1,3,7-octatrieno	13,00
	17,99 (E)	4-tert-butil-ciclohexanol	16,40
	18,97	Carvona	41,50
	20,11 (E)	Tert-butil-fenil éter	31,90
	20,75 (E)	4-hidroxi-2-metilacetofenona	10,7
	22,56 (E)	Eugenol	23,3
	22,68	Ácido butanoico, heptil éster	8,70
	23,07	Ácido butanoico, octil éster	1,24
21UP	4,92	Butano	1,45
	5,38	Hidrogênio sulfeto	70,40
	5,41	Etanotioamida	1,28
	6,60	Acetonitrila	54,90
	7,75	2-nitro-propano	21,90
	8,43	1,5-hexadi-ino	60,60
	8,81	Benzeno	72,50
	8,86	2-metil-pentanal	2,25
	8,96 (E)	2-metil-butanal	5,04
	9,04	Butanodial	3,43
	9,40	2-pentanona	82,40
	9,41	3-metil-2-butanona	78,50
	9,52	Pentanal	21,10
	10,04	Furano	8,27
	10,12 (E)	2-metil-1-buteno	9,57
	10,25	Dimetil dissulfeto	98,40
	10,29 (E)	Imidazol	8,27
	10,39 (E)	1,3,5-cicloheptatrieno	14,00
	10,89	Pirrol	83,90
	10,96	Hexanal	10,00
	10,99	1,3,5-cicloheptatrieno	20,40
	11,27	4-metil-piridina	5,38
	11,86	4-heptanona	55,00
	11,93 (E)	2-metil-pirrol	19,60
	12,28	4-metil-tiazol	29,10
	12,83 (E)	2-propenilideno-ciclobuteno	4,14
	13,15 (E)	3-octanona	16,80
	13,38	Propanodinitrila	12,20
	13,41 (E)	4-metil-4-hexen-3-ona	26,80
	13,43	2-octeno	1,74

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
22UP	13,55	Dimetil trissulfeto	83,60
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	8,16
	14,16 (E)	Fenol	46,80
	14,41 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	13,10
	14,78 (E)	3-butenil-benzeno	11,20
	14,79 (E)	2-metil-6-propilfenol	2,68
	15,12	1-metoxi-2-metil-3-buteno	50,60
	15,50 (E)	3-metil-fenol	21,90
	15,51 (E)	1-acetil-2-metilciclopenteno	19,50
	15,57 (E)	4-metil-fenol	15,00
	15,97 (E)	1,10-undecadieno	1,68
	16,69	2-etil-benzaldeído	1,28
	16,78 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	2,54
	17,42 (E)	4-etil-fenol	38,40
	17,56 (E)	4-metoxi-3-metil-fenol	34,90
	18,92 (E)	Benzenoacetaldeído	2,85
	19,62 (E)	4-propil-3-oxabiciclo(4.4.0)decano	24,30
	19,82 (E)	1,3-benzodioxol-2-ona	1,21
	21,34 (E)	2-etil-benzaldeído	1,28
	21,36 (E)	3-metoxi-acetofenona	45,1
	21,39 (E)	4-hidroxi-2-metilacetofenona	43,4
	22,66 (E)	Ácido 2-metil propanoico, heptil éster	7,81
	22,71	Ácido 2-metil-propanoico, butil éster	21,60
	23,03 (E)	Ácido 2-metil-2-etil-propanoico, 3-hidroxihexil éster	26,40
22UP	4,91	2-nitro-propano	39,50
	5,37	2-amino-1-propanol	2,66
	6,60	Acetonitrila	39,60
	7,75	2-nitro-propano	1,94
	8,86	1,6-heptadien-4-ol	2,60
	8,95	Ácido acético, etenil éster	60,60
	9,19	1-metoxi-2-propanol	46,60
	9,40	2-pentanona	75,90
	9,50	Pentanal	20,10
	10,12 (E)	2-metil-2-buteno	10,80
	10,25	Dimetil dissulfeto	94,40
	10,39 (E)	1,3,5-cicloheptatrieno	20,10
	10,53 (E)	Ciclopentanona	6,54
	10,75	3-hexanona	72,10
	10,89	Pirrol	80,80
	10,96	2,3-dimetil-pentano	1,51
	11,86	4-heptanona	49,00

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
22UP	11,93 (E)	2-metil-pirrol	58,50
	12,12 (E)	Dimetil diazeno	42,40
	12,20	Propanodinitrila	12,20
	12,83 (E)	Tolueno	2,25
	13,37 (E)	2-hidroxi-benzonitrila	6,59
	13,55	Dimetil dissulfeto	1,00
	13,57	Fenil glioxal	8,15
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	41,90
	14,05	1-octen-4-ino	2,07
	14,16 (E)	Fenol	48,80
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	40,00
	14,55	2-etil-tetrahidro-tiofeno	8,22
	14,77 (E)	4-fenil-2-butanol	12,60
	14,86 (E)	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	2,92
	15,10 (E)	3,4-didehidro-prolina	67,40
	15,11	Metiltio-ciclopentano	4,52
	15,50 (E)	2-metoxi-fenol	57,30
	15,57 (E)	4-metil-fenol	33,70
	15,97 (E)	1,9-decadieno	1,96
	15,98 (E)	1,10-undecadieno	9,03
	16,09 (E)	Feniletil álcool	26,50
	16,29 (E)	2-furanocarbonitrila	3,52
	16,44	1,6-heptadien-3-ino	5,76
	16,54 (E)	Fenil-formamida	5,81
	16,79 (E)	1-isobutilideno-3-metil-ciclopentano	1,82
	17,13 (E)	4-pirridona	24,60
	17,49 (E)	Ment-1,5-dien-8-ol	61,00
	17,58 (E)	Metil salicilato	19,80
	17,62 (E)	2-metil-6-metileno-7-octen-2-ol	36,60
	19,25 (E)	Butilbenzilamina	4,59
	19,80 (E)	3,6-dimetileno-1,7-octadieno	11,80
	20,01 (E)	2,5-decadi-ino	20,10
	20,73 (E)	2-etil-4,5-dimetil-fenol	18,90
	22,52 (E)	Eugenol	47,20
	22,69	1-ciclobutil-etanona	66,40
	23,03 (E)	Ácido 2-metil-2-etil-propanoico,3-hidroxihexil éster	36,60
	27,53	2-metil-isotiazolona	12,20
23UP	4,87	2-nitro-propano	29,10
	5,35	2-amino-1-propanol	3,05
	6,60	Acetonitrila	57,10
	7,74	Anidrido acético	6,86

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
23UP	8,86	2,3,4-trimetil-pentano	27,70
	9,40	4-metil-2,3-pentanodiona	18,20
	10,25	Dimetil dissulfeto	80,20
	10,38 (E)	1,3,5-cicloheptatrieno	17,00
	10,89	Pirrol	76,10
	11,83 (E)	4-heptanona	61,60
	11,85	2-metil-3-hexanona	54,50
	13,16	2,4-octanodiona	1,56
	13,54 (E)	Dimetil trissulfeto	1,28
	13,85 (E)	2-etil-1-hexanol	14,20
	14,14 (E)	Fenol	57,10
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	14,00
	15,59	Metil-piridinamina	50,70
	16,78 (E)	2-metil-1,5-heptadieno	3,01
	22,62 (E)	Ácido butanoico, heptil éster	16,90
	22,64 (E)	2-propil-1-heptanol	1,81
	23,07	Ácido 2-metil-propanoico butil éster	52,10
24UP	4,90	Butano	1,34
	5,40	N-metil-taurina	34,70
	7,75	Etenona	60,50
	8,84	Hexanal	12,00
	8,95	3-metil-2-butanona	76,90
	9,31	3-hidroxi-2-butanona	1,73
	9,38	2-pentanona	81,80
	9,50	Pentanal	33,30
	10,14	Etanotioamida	14,80
	10,24	Dimetil dissulfeto	97,00
	10,29	1,2,3-triazol	66,40
	10,42 (E)	Piridina	86,40
	10,55	2-propin-1-ol	23,80
	10,56	4-piridazinamina	54,20
	10,73	3-hexanona	79,60
	10,79 (E)	Isopropil lactato	56,70
	10,87	Pirrol	86,70
	10,95	Hexanal	89,30
	11,21 (E)	2-etil-pirrol	18,40
	11,38	3-heptanona	1,53
	11,47 (E)	3-pentanona	69,00
	11,84	2-metil-3-hexanona	60,20
	11,92 (E)	3-metil-pirrol	79,00
	12,11	2-octanone	45,50

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
26UP	12,72 (E)	2,4,6-octatrienal	2,21
	12,73 (E)	Etoxi-benzeno	6,25
	12,80 (E)	3,3-dimetil-diaziridina	29,60
	13,05 (E)	1,3-diazina	8,06
	13,16	2,3-octanodiona	12,60
	13,21	Ácido benzoil-fórmico	8,58
	13,37	4-metil-1-pentino	6,71
	13,53	Dimetil trissulfeto	97,30
	13,55	Fenil-glioxal	12,30
	13,85	2-metil-1-nitropropano	39,60
	13,86	2-etil-4-pentenal	6,54
	14,15 (E)	Fenol	33,10
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	19,70
	14,87	Hidrazinacarbotioamida	9,33
	15,10	Furano	49,40
	15,51 (E)	4-metil-1,2-benzenodiol	1,89
	15,57	4-metil-fenol	37,00
	15,74 (E)	Vinil sulfonamida	11,40
	15,97 (E)	Ciclopenteno	33,30
	16,59 (E)	Isomentol	2,46
	16,79	Mentol	9,81
	16,97 (E)	6-canfenol	12,10
	17,13 (E)	Isoborneol	6,69
	17,42 (E)	Benzoil isotiocianato	26,60
	17,56 (E)	2-mentoxi-5-metilfenol	20,60
	18,96	Carvona	58,00
	19,81 (E)	4-etil-2-metoxi-fenol	52,20
	21,34 (E)	4-hidroxi-2-metilacetofenona	30,90
	22,67	Ácido 3-hidroxidecanoico	20,40
	23,04	Ácido 2-metil-propanoico, hexil éster	24,80
	27,51	2-metil-3(2H)-isotiazolona	15,40
25UP	4,89	Isobutano	14,20
	5,30	Acetileno	1,23
	5,37	Alanina	1,31
	5,41	1-metoxi-2-propanamina	2,80
	5,47	Hidroxi-ureia	71,20
	6,60	Acetonitrila	57,20
	7,75	2-nitro-propano	28,70
	8,85	3-metil-hexano	5,18
	9,40	2-pentanona	79,20

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
25UP	10,23 (E)	4-metil-1,3-oxatiolano	3,98
	10,31	Furano	8,27
	10,41	Piridina	83,60
	10,89	Pirrol	50,00
	11,86	2-metil-3-hexanona	61,80
	13,16	2,4-octanodiona	11,00
	13,36	2,3,6-trimetil-piridina	68,20
	13,77	Benzoil isotiocianato	9,08
	13,86 (E)	3,4-dimetil-1-hexeno	2,15
	14,16 (E)	Metil-pirazina	66,30
	14,42 (E)	2,3-dimetil-4-penten-2-ol	8,45
	15,19 (E)	2,2-dihidroxi-1-fenil-etanona	7,55
	15,57 (E)	2-metil-fenol	31,00
	15,59	3-metil-fenol	29,50
	16,69 (E)	Carano	5,41
	16,79 (E)	2-metil-1,5-heptadieno	1,28
	17,12 (E)	Ácido sórbico, vinil éster	13,60
	17,17 (E)	Ment-1-en-8-ol	31,20
	17,33 (E)	Fenil-formamida	1,89
	18,98	Carvona	63,40
	22,68	Ácido butanoico, heptil éster	2,51
	22,71	Ácido 2-metil-propanoico, heptil éster	5,74
	23,07	Ácido butanoico, octil éster	3,91
26UP	5,06	Acetileno	1,14
	5,41	2-amino-1-propanol	15,90
	6,60 (E)	Acetonitrila	57,50
	7,74 (E)	Isobutano	1,44
	7,88 (E)	Diacetil sulfeto	1,25
	8,86	2,3,4-trimetil-pentano	21,80
	9,39	2-pentanona	76,20
	10,15 (E)	Etanotioamida	14,80
	10,18	1,4-dioxano-2,6-diona	10,50
	10,24 (E)	Dimetil dissulfeto	95,80
	10,39 (E)	Tolueno	1,56
	10,47 (E)	Piridina	83,20
	11,85	2,3-hexanodiona	46,70
	13,17	2,4-octanodiona	18,00
	13,54 (E)	Dimetil trissulfeto	26,10
	13,86 (E)	4-metil-1-hexanol	8,07
	14,16 (E)	Fenol	56,90
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	10,50

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Continuação]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
26UP	15,57 (E)	2-metil-fenol	29,00
	16,79 (E)	Mentol	14,00
	17,13 (E)	5-metil-pirimidina	4,00
	17,17 (E)	3-hidroxi-acetofenona	36,20
	20,72 (E)	4-hidroxi-2-metil-acetofenona	12,00
	22,67 (E)	Ácido butanoico, heptil éster	3,31
	22,71	Ácido 2-metil-propanoico, propil éster	22,40
	23,06	Ácido 3-hidroxidecanoico	26,80
27UP	4,90	Isobutano	1,44
	5,40	2-amino-1-propanol	1,50
	6,59	Acetonitrila	64,80
	6,67	Acetona	7,20
	8,49	2-metil-1-propanol	26,10
	8,85	3-etil-pentano	23,40
	9,06	1-butanol	60,00
	9,40	2-pentanona	80,40
	10,25	Dimetil dissulfeto	94,00
	10,39 (E)	1,6-heptadien-3-ino	23,20
	10,42 (E)	Piridina	62,40
	10,58	3-aminoheptano	10,58
	10,89	Propanodinitrila	12,20
	11,85	2-metil-3-hexanona	48,40
	11,86	2,4-dimetil-3-pentanona	76,10
	11,93 (E)	2-metil-pirrol	21,40
	12,12 (E)	Dimetil diazeno	25,80
	13,17	2,4-octanodiona	12,10
	13,55	Dimetil trissulfeto	1,30
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	4,31
	14,16 (E)	Fenol	54,80
	14,41 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	45,30
	15,51 (E)	2-metóxi-fenol	28,50
	15,57 (E)	4-metil-fenol	31,00
	16,78 (E)	4-undecino	16,78
	17,13 (E)	2-etil-pirrol	4,00
	22,67	Ácido 2-metil propanoico, hexil éster	8,66
	23,02 (E)	Ácido 2-metil propanoico, hexil éster	
	23,08	Ácido butanoico, heptil éster	46,10
28UP	4,90	Anidrido acético	41,60
	5,40	N-metil-taurina	22,50
	7,75	Isobutano	1,44

Amostras de voluntários diagnosticados com câncer (UP= urina positiva; (E)= observado apenas após hidrólise)			[Conclusão]
Amostra	**Tempo de retenção (minuto)**	**Identidade fornecida AMDIS**	**Probabilidade (%)**
28UP	8,85	3-metil-butanal	58,20
	8,98	2-metil-butanal	4,46
	9,38	2-pentanone	77,30
	9,50	Pentanal	60,20
	10,15	Etanotioamida	14,80
	10,25	Dimetil dissulfeto	65,80
	10,40 (E)	Tolueno	2,57
	10,56	Ciclopentanona	7,44
	10,74	3-hexanona	82,40
	10,89	Metil-2-butinoato	34,30
	10,95	2-propen-1-amina	16,20
	11,33	Metil-pirazina	72,50
	11,85	2-metil-3-hexanona	39,20
	11,94 (E)	Pirazina	68,60
	12,13	Dimetil diazeno	34,10
	12,40	2,5-dimetil-pirazina	50,60
	12,55	2,3-dimetil-pirazina	89,90
	13,16	2,3-octanodiona	13,20
	13,55	Dimetil trissulfeto	97,10
	13,86 (E)	2-etil-1-hexanol	22,40
	14,16 (E)	Fenol	62,00
	14,42 (E)	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	60,10
	14,55	1,1-dipropil-hidrazina	49,30
	14,79	Tolueno	1,74
	14,87 (E)	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	30,10
	15,12	1-metoxi-2-metil-3-buteno	30,90
	15,58 (E)	2-metil-fenol	31,60
	16,60 (E)	Isomentol	5,36
	16,80 (E)	Mentol	14,10
	17,13 (E)	Ácido sórbico, vinil éster	34,00
	20,18 (E)	2-etil-benzaldeído	1,28
	22,70	Ácido butanoico, heptil éster	5,85
	23,08	Ácido 2-metil-propanoico, hexil éster	19,10

ANEXO 1- Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa, como voluntário. Esta pesquisa está sendo promovida pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. Os pesquisadores responsáveis são Fernanda Ferreira da Silva Souza Monedeiro (tel. (11) 97046-6520, (16) 3315-0471) Avenida Bandeirantes, 3900 – DQ-FFCLRP, e-mail: fernandamonedeiro@usp.br) e Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis (CRQ N° 04.100.360 – tel. (16) 3315-0471, Avenida Bandeirantes, 3900 – DQ-FFCLRP, e-mail: martinis@usp.br).

O título da pesquisa é **"Investigação de compostos orgânicos voláteis em amostras de suor como biomarcadores no diagnóstico de câncer"**.

Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte da pesquisa, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma das cópias deste termo ficará com você, e a outra é dos pesquisadores responsáveis.

Partindo-se da ideia de que em uma determinada condição de doença, substâncias químicas diferentes das comuns, ou em concentrações diferentes, passam a ser produzidas e eliminadas pelo organismo, o objetivo dessa pesquisa é investigar estas substâncias e verificar como podem ser relacionadas com o câncer.

Feita uma avaliação de quais substâncias presentes em amostras de suor são específicas em indivíduos com câncer, a detecção destas poderá auxiliar no desenvolvimento de um método para diagnosticar o câncer precocemente e de maneira simples (a partir da análise dos compostos da amostra de suor).

Se você concordar em participar da pesquisa, será colocado um adesivo próprio para a coleta do suor na região de suas costas. Antes da fixação do adesivo, a região da pele aonde será colocado será limpa com álcool, o que servirá para higienizar a área e melhorar a fixação do adesivo.

Este procedimento será realizado uma única vez em uma etapa que levará menos de 5 minutos.

O adesivo serve **exclusivamente** para absorver suor, não contendo nenhuma substância que possa ser transferida para o seu corpo.

Caso concorde, também será coletada uma amostra de urina, para análise dos mesmos compostos. Neste caso será fornecido a você um frasco coletor plástico para que forneça uma amostra de urina ao fim desta abordagem (não sendo necessário que seja a primeira urina do dia, nem que você esteja de jejum ou que se prepare de alguma forma como é pedido em alguns exames).

O adesivo será deixado fixado por um período de no mínimo 24 horas, após isso, é retirado pelo pesquisador no dia de seu retorno a este local, sem que você precise se deslocar exclusivamente em razão desta pesquisa. Suas amostras serão armazenadas e depois analisadas para verificar a presença das substâncias explicadas acima.

Você poderá fazer suas atividades habituais normalmente (tomar banho, nadar, correr etc.) enquanto estiver com o adesivo.

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP
Avenida Bandeirantes, 3900 - Bloco 23 – Casa 37 - 14040-901 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fone: (16) 3315-4811 / Fax: (16) 3633-2660
E-mail: coetp@ffclrp.usp.br

Um possível desconforto será alguma irritação local na região em que o adesivo foi colocado, porém, o adesivo em questão é apropriado para não causar alergias, ainda não existindo relatos de reações alérgicas ou qualquer dano à pele.

Caso você sinta algum desconforto, poderá retirar o adesivo a qualquer momento, sem que ocorra qualquer penalização por isso.

Você não receberá nenhuma gratificação por participar desta pesquisa. Esta pesquisa não lhe trará benefícios diretos.

Os seus dados são confidenciais. Você será identificado por um número. As informações obtidas no resultado da análise sobre a presença ou ausência das substâncias nas amostras coletadas serão mantidas em segredo e você não será identificado em nenhum trabalho que possa resultar dessa pesquisa.

Se você tiver alguma pergunta ou qualquer dúvida sobre essa pesquisa, entre em contato com **Fernanda Ferreira da Silva Souza Monedeiro** ou **Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis**, pelo telefone: **(16) 3315-0471**. Em caso de dúvida sobre os aspectos éticos desta pesquisa, você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP, tel. (16) 3315-4811.

Você é livre para não querer participar ou desistir da pesquisa a qualquer momento que desejar. Caso mude de ideia, você não será prejudicado. **Se você recebe atendimento no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, tal atendimento continuará sendo dado da mesma forma, independentemente de você participar ou não da pesquisa**. Você tem direito a perguntar o que quiser em qualquer etapa da pesquisa. Você não pagará nada e também não receberá nenhum dinheiro adicional. Caso você tenha despesas adicionais de transporte decorrentes de sua participação na pesquisa você será ressarcido integralmente.

Se tiver lido o termo de consentimento livre e esclarecido, tiver entendido a informação e concordar voluntariamente em participar desse estudo, por favor, assine abaixo:

Nome do voluntário:_____ Data:_____/_____/_____

Assinatura do Voluntário: _____ RG:_____

Eu expliquei o propósito desse estudo ao voluntário. Estou certo de que ele entendeu o propósito, os procedimentos, riscos e benefícios desse estudo.

Nome do pesquisador: _____Data: _____/_____/_____

Assinatura do pesquisador: _____

ANEXO 2- Carta De Acordo- Unidade de Pesquisa Clínica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

UPC HCFMRP - USP

www.hcrp.fmrp.usp.br

HC USP - RIBEIRÃO

PROJETO DE PESQUISA

Ribeirão Preto, 16 de JANEIRO 2014.

Sistema UPC nº 7300

Ilustríssima Senhora
Dr.ª Marcia Guimarães Villanova
MD. Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Senhora Coordenadora,
Encaminho em anexo o projeto de pesquisa intitulado
INVESTIGAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM AMOSTRAS DE SUOR COMO BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO DE CÂNCER

juntamente com a documentação necessária para avaliação ética deste Comitê.
O projeto acima mencionado será desenvolvido no (a) junto aos ambulatórios e Enfermaria de Oncologia Clínica do HCFMRP-USP.

Informo também que o pesquisador responsável e o orientador possuem currículo Lattes.
O orçamento do presente projeto foi analisado pela equipe técnica da UPC antes da submissão ao Comitê e foi APROVADO.

Equipe Técnica UPC
Henrique Clé Carvalho
Escriturário
Matrícula: 5278

Atenciosamente,
Fernanda Ferreira da Silva Sousa Monteiro
Fernanda F. S. Monteiro
Pesquisador Principal ou Aluno (nome completo e assinatura)

Bruno Spinosa De Martin
Pesquisador Principal ou Orientador (nome completo e assinatura)

De acordo:

Profa. Dra. Margaret de Castro
Chefe do Departamento de Clínica Médica
Chefe de Departamento (assinatura e carimbo)

Profª Dra Fernanda Perna
Oncologista Clínica
CRM/SP 91.802
Chefe do Ambulatório/ Laboratório (assinatura e carimbo)
ambulatorio e Enfermaria de Oncologia clínica

Obs.: Caso algum chefe possua vinculo com a pesquisa, deverá ser solicitada assinatura do suplente.
Após assinatura em todos os campos, digitalizar toda a documentação do check list e encaminhar ao CEP via Plataforma Brasil.

HC - Campus Universitário
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

UNIDADE DE PESQUISA CLÍNICA
Fone: (16) 3602-2956 FAX: 3602-2956

ANEXO 3- Carta de aprovação do CEP FFCLRP- USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Campus de Ribeirão Preto

Of.CEtP/FFCLRP-USP/073/-vjmc

Ribeirão Preto, 11 de agosto de 2014

Prezada Pesquisadora,

Comunicamos a V. Sa. que o projeto de pesquisa intitulado **"INVESTIGAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM AMOSTRAS DE SUOR COMO BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO DE CÂNCER"** foi reanalisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP-USP, em sua 134ª Reunião Ordinária, realizada em 07.08.2014, e enquadrado na categoria: **APROVADO** (CAAE n.º 20879114.0.0000.5407).

Solicitamos que eventuais modificações ou emendas ao projeto de pesquisa sejam apresentadas ao CEP, de forma sucinta, identificando a parte do projeto a ser modificada e suas justificativas, e que, ao término do estudo, um relatório final seja entregue, via Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª ANDRÉIA SCHMIDT
Coordenadora

À Senhora
Fernanda Ferreira da Silva Souza Monedeiro
Programa de Pós-graduação em Química da FFCLRP USP

c/c:
Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis
Departamento de Química da FFCLRP – USP

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP USP
Fone: (16) 3602-4811
Fax: (16) 3633-2660 (direto) ou 3633-5015
Avenida Bandeirantes, 3900 - bloco 3 - sala 16 - 14040-901 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Homepage: http://www.ffclrp.usp.br - e-mail: coetp@ffclrp.usp.br

ANEXO 4- Carta de aprovação do CEP HC-FMRP/USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

HC FMRP-USP RIBEIRÃO PRETO

Ribeirão Preto, 01 de setembro de 2014

Projeto de pesquisa: "INVESTIGAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM AMOSTRAS DE SUOR COMO BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO DE CÂNCER"

Pesquisador responsável: Fernanda Ferreira da Silva Souza Monedeiro e Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martins

Instituição Proponente: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP

"O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Ciente e de acordo:

Prof. Dr. Eduardo B. Coelho
Coodenador Técnico Científico
da Unidade de Pesquisa Clínica
HCFMRP-USP

Drª Marcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - HCFMRP-USP

Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho
Coordenador Técnico Científico da Unidade de Pesquisa Clínica – HCFMRP-USP

Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil/CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO 5- Carta de aprovação de emenda - CEP FFCLRP- USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of.CEtP/FFCLRP-USP/86-dgfs. Campus de Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 30 de setembro de 2016.

Prezada Pesquisadora,

Comunicamos a V. Sa. que a emenda ao projeto de pesquisa intitulado **"Investigação de compostos orgânicos voláteis em amostras de suor como biomarcadores no diagnóstico de câncer"** foi analisada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP-USP, em sua 159ª Reunião Ordinária, realizada em 29.09.2016 enquadrada na categoria: **APROVADO** (CAAE n.º20879114.0.0000.5407).

Solicitamos que ao término do estudo um relatório final seja entregue via Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Marina Rezende Bazon
Coordenadora

À Senhora
Fernanda Ferreira da Silva Souza Monedeiro
Programa de Pós-Graduação em Química da FFCLRP/USP

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP USP
Fone: (16) 3315-4811 / Fax: (16) 3315-9101
Avenida Bandeirantes, 3900 - bloco 23 - casa 37 - 14040-901 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Homepage: http://www.ffclrp.usp.br - e-mail: coetp@ffclrp.usp.br