

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE QUÍMICA LICENCIATURA

LARISSA ABDANUR RIBEIRO

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES EM AR EXALADO COMO FERRAMENTA
PARA RASTREIO DIAGNÓSTICO PRECOCE DE DOENÇAS**

Uberlândia-MG

2020

LARISSA ABDANUR RIBEIRO

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES EM AR EXALADO COMO FERRAMENTA
PARA RASTREIO DIAGNÓSTICO PRECOCE DE DOENÇAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à banca examinadora do Curso de Química Licenciatura da Universidade Federal de Uberlândia. O objetivo do trabalho é encontrar métodos para a detecção de insuficiência cardíaca utilizando como biomarcador a acetona.

Orientador: João Flávio da Silveira
Petrucci

Uberlândia-MG

2020

LARISSA ABDANUR RIBEIRO

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES EM AR EXALADO COMO FERRAMENTA
PARA RASTREIO DIAGNÓSTICO PRECOCE DE DOENÇAS**

Trabalho de conclusão de curso julgado e
aprovado, para obtenção do grau de
Licenciado em Química na Universidade
Federal de Uberlândia.

Uberlândia, _____ de _____ de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. João Flávio da Silveira Petrucci

Orientador

Examinador

Uberlândia-MG

2020

Dedicatória

Aos meus pais, Luiz e Lélia, minhas irmãs, Lillian e Luanna, a toda minha família e amigos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à **Deus**, pela sabedoria e força para conseguir alcançar os meus objetivos.

A **minha família**, em especial aos meus pais Lélia e Luiz, minhas irmãs Lillian e Luanna, meu cunhado Fernando e minha afilhada Fernanda, por sempre me apoiarem e, mesmo na distância, se fazerem presentes em todos os meus desafios e conquistas.

Aos **meus amigos** pela parceria e companheirismo.

A **Universidade Federal de Uberlândia** por todo o aprendizado.

Ao meu orientador **João Flávio** pela paciência e parceria.

RESUMO

O presente Trabalho de Conclusão de Curso apresenta uma revisão bibliográfica acerca do tema análise de biomarcadores determinados em ar exalado de pacientes, com a intenção de diagnosticar doenças precocemente. A insuficiência cardíaca é uma doença com alta mortalidade e, em destaque, esses pacientes possuem um odor específico.

A insuficiência cardíaca (IC) pode ser definida como uma síndrome complexa caracterizada por falência do coração e incapacidade deste de propiciar suprimento adequado de sangue para atender às necessidades metabólicas dos tecidos na presença de pressões de enchimento normais ou fazê-lo somente com pressões de enchimento elevadas. (Nogueira, P. 2010, p.1)

Com isso, os estudos que buscam novas estratégias para o diagnóstico dessa doença se tornam promissores, e, com base nessa característica do cheiro específico nesses pacientes, uma alternativa viável é a análise do ar exalado. Essa análise é uma técnica não invasiva já utilizada no diagnóstico de outras doenças. Porém para que essa avaliação tenha sucesso, é necessário a utilização de um biomarcador que detecta essa doença em específico. Uma alternativa, no caso de diagnóstico de insuficiência cardíaca, é a acetona, que também pode identificar pacientes com diabetes.

Assim, o objetivo desse estudo é encontrar métodos e técnicas que possam ser utilizadas a fim de detectar a insuficiência cardíaca (IC) por meio do biomarcador acetona.

Palavras-chaves: biomarcadores, acetona, ar exalado, prognóstico, espectrofotometria.

ABSTRACT

This undergraduate thesis presents a bibliographic review on the subject of biomarkers analysis determined in exhaled air by patients, with the intention of diagnosing diseases early. Heart failure is a disease with high mortality and it is relevant to emphasize that these patients have a specific odor. Thus, studies that seek new strategies for this disease's diagnosis become promising. Therefore, based on this distinctive smell characteristic in these patients, a viable alternative is the analysis of exhaled air. This analysis is a non-invasive technique already used in other diseases' diagnosis. However, for this evaluation to be successful, it is necessary to use a biomarker that detects this specific disease. An alternative, in the case of heart failure diagnosis, is acetone, which can also identify patients with diabetes.

Thus, the objective of this study is to find methods and techniques that can be used in order to detect heart failure (HF) using the acetone biomarker.

Keywords: biomarkers, acetone, exhaled air, diagnosis, spectrophotom

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de trocas gasosas durante o processo de respiração.....	13
Figura 2: Coletor baseado na adsorção de acetona exalada por copolímero de ácido etacrílico e etilenoglicol.....	15
Figura 3: Estrutura química do 3-B-hidroxi-butirato, acetoacetato e acetona.....	19
Figura 4: Formação da acetona através da descarboxilação do acetoacetato.....	19
Figura 5: Formação da acetona através da desidrogenação do isopropanol.....	19
Figura 6: Reação de condensação aldólica entre acetona e salicilaldeído.....	21
Figura 7: Sistema de amostragem desenvolvido. 1- Tubo de polietileno; 2- Conexão; 3-Impinger; 4- Difusor de ar; 5- Água deionizada; 6- Banho de gelo e água; 7- Frasco para termostatização; 8- Saco plástico para definição de volume.....	22
Figura 8: Cromatógrafo Shimadzu GC-17 ^a	23
Figura 9: Interface do software GLASS-GC5000. a) Cromatograma exibindo corrente iônica total no detector b) Excerto do cromatograma a c)Espectro de massas obtido.....	24
Figura 10: Reação entre acetona e salicilaldeído em meio básico.....	25
Figura 11: Espectrofotômetro tipo diode array HP8452A.....	26
Figura 12: Curvas de calibração analíticas de acetona realizada em GC-MS. Quantificação pela integração dos sinais de picos dos íons m/z 43 (em azul) e 58 (em vermelho).....	27
Figura 13: Cromatogramas da corrente iônica do íon m/z 43 para uma mesma amostra analisada em ocasiões diferentes.....	27
Figura 14: Análise espectrofotométrica de padrões de acetona após reação com salicilaldeído em meio básico.....	28

- Figura 15: Parâmetros de regressão linear dos padrões de acetona após reação com salicilaldeído em meio básico, utilizando espectrofotometria em diferentes comprimentos de onda..... 29
- Figura 16: Estudo cinético da reação entre salicilaldeído e acetona a 25°C. Cada ponto do gráfico corresponde ao coeficiente angular da regressão linear nas soluções de 0; 0,3 e 12,0 mg/L. Comprimento de onda: 474 nm..... 29
- Figura 17: Curva de calibração analítica para método espectrofotométrico (474 nm) após 10 horas de reação com salicilaldeído (descartando a absorbância do branco)..... 30
- Figura 18: Absorbância (474 nm) de padrões de acetona em concentrações conhecidas..... 31
- Figura 19: Correlação entre coeficientes das curvas com tempo de 10 a 24 horas de duração (figura 14) e as concentrações nominais de acetona..... 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Correlação de espécies químicas voláteis encontradas no ar exalado....	14
Tabela 2: Técnicas para análise de acetona	20

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	12
2.	Tipos de amostragem do ar exalado.....	14
3.	Principais biomarcadores.....	17
4.	Acetona.....	18
4.1.	Métodos para determinação de acetona em ar exalado.....	20
5.	Análise de acetona em ar exalado.....	22
5.1	Amostragem.....	22
5.2	Principais métodos e técnicas utilizadas.....	23
5.2.1.	Cromatografia gasosa – espectrometria de massa (GC-MS).....	23
5.2.2.	Espectrofotometria.....	25
5.3	Resultados obtidos dos métodos analíticos utilizados.....	26
5.3.1.	Cromatografia gasosa – espectrometria de massa (GC-MS).....	26
5.3.2.	Espectrofotometria.....	28
6.	Conclusão.....	32
7.	Referências bibliográficas.....	33

1- Introdução

Atualmente, uma das questões mais importantes sobre tratamento de doenças é referente a possibilidade de sua detecção precoce, ou seja, em estágios iniciais de seu desenvolvimento. Com isso, diversos campos da investigação científica buscam novos métodos para o rastreio/diagnóstico precoce de doenças, sendo uma das principais alternativas a análise dos componentes químicos contidos no ar exalado de pacientes. Essa técnica não invasiva já é utilizada há séculos para o diagnóstico de determinadas doenças, sendo utilizada inicialmente por Hipócrates, pai da medicina na Grécia Antiga, que conseguia relacionar o cheiro do hálito de seus pacientes a doenças como, por exemplo, diabetes, abscesso no pulmão e problemas hepáticos e renais (BATISTA, 2010, p. 13). Porém o primeiro estudo da composição química no ar exalado ocorreu em 1971, por Pauling L. et al., que detectou vários compostos químicos em uma única amostra.

Ar exalado é definido como ar expelido durante a respiração através da expiração (BATISTA, 2010, p. 14). Ao inspirar o ar atmosférico, parte do ar inalado é consumido ou incorporado pelo organismo, podendo ser liberado por outra via de excreção, ou também pode ser incrementado por substâncias produzidas pelo organismo. Sendo assim, vários compostos orgânicos e inorgânicos voláteis podem ser caracterizados por meio de análises desse ar expelido.

Para melhor entendimento, segue esquema (Figura 1) do processo respiratório que consiste em duas etapas: inspiração e expiração. As trocas gasosas ocorrem, essencialmente, através da membrana respiratória em todo o pulmão. Porém, destacamos os alvéolos pulmonares, pois as paredes são extremamente finas, ocorrendo uma maior proximidade com a rede de capilares sanguíneos. Por ser uma área pequena e fina, facilita a passagem dos gases, tornando a difusão rápida. Difusão é o processo que consiste na passagem aleatória de moléculas em todas as direções através da membrana respiratória e líquidos adjacentes.

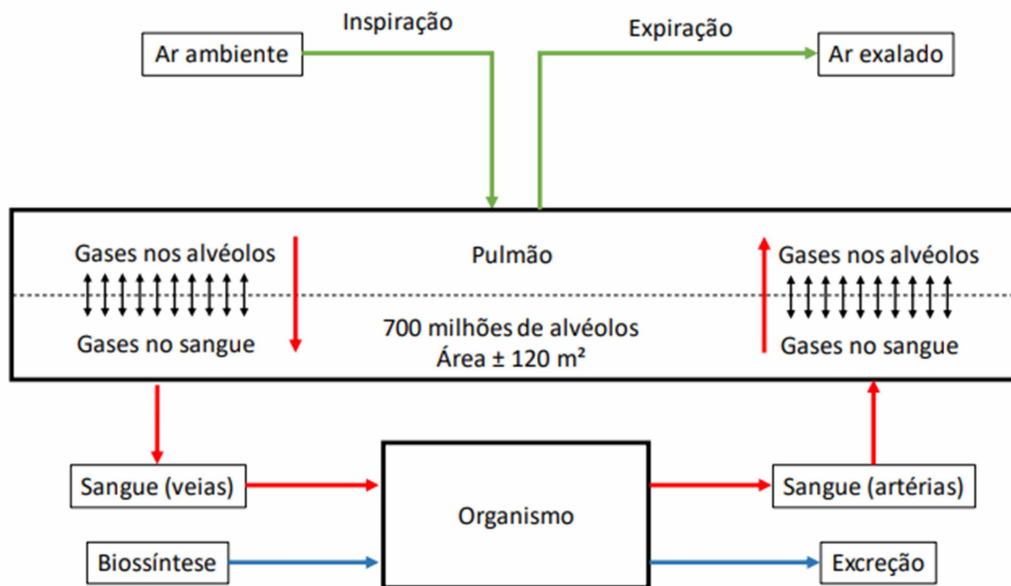


Figura 1- Esquema de trocas gasosas durante o processo de respiração. (Fonte: RINCO, 2019, p. 10)

Diversas substâncias químicas estão presentes no ar exalado, sendo que alguns trabalhos apontam cerca de 3500 espécies detectadas em diferentes níveis de concentração, podendo ser de ordem de ppmv (parte por milhão em volume), ppbv (partes por bilhão em volume) ou pptv (partes por trilhão em volume) (RINCO, 2019, p. 11). Conforme mencionado anteriormente, a presença ou mudança na concentração de algumas substâncias ou classes de substâncias pode ser um indicativo de alteração metabólica relacionado com o estado de saúde de um paciente e, portanto, ser utilizado como biomarcador dessa determinada doença. Segue uma relação de substâncias químicas que podem ser encontradas no ar exalado, sua respectiva origem metabólica e aplicação clínica para diagnóstico precoce em potencial (Tabela 1):

Espécie Química	Origem metabólica	Aplicação clínica em potencial
Acetaldeído	Metabolismo do etanol	Monitoramento do metabolismo do etanol ou estresse oxidativo
Acetona	Descarboxilação do acetoacetato ou desidrogenação do isopropanol	Monitoramento da diabetes ou perda de peso
Amônia	Metabolismo proteico	Doenças renais em estágio final
Etano	Produto da peroxidação lipídica	Monitoramento do estresse oxidativo
Etileno	Produto da peroxidação lipídica	Monitoramento do estresse oxidativo
Metano	Bactérias intestinais	Doenças gastrointestinais
Propofol	Anestesia intravenosa	Monitoramento de fármacos durante a anestesia

Tabela 1- Correlação de espécies químicas voláteis encontradas no ar exalado. (Adaptado de: Fonte: RINCO, 2019, p. 12).

A análise do ar exalado tem sido considerada ferramenta promissora na avaliação de diferentes doenças por ter o potencial de responder às necessidades médicas de expandir o número de ensaios não invasivos para compreender os múltiplos mecanismos patológicos que envolvem doenças respiratórias e/ou sistêmicas. (BRAGA, 2012, p. 43).

2- Tipos de amostragem do ar exalado

A análise do ar exalado é uma técnica completamente não invasiva, onde as amostras do ar podem ser coletadas várias vezes e em um curto período de tempo entre elas. A amostragem do ar exalado pode ser realizada por três diferentes estratégias: através da coleta de certo volume da fase gasosa, através da condensação do analito com a umidade contida no ar exalado, ou captura-lo com uma fase sólida ou líquida (Figura 2) adequada em que o analito tenha afinidade.

Um sistema ideal de amostragem de ar deve atender aos seguintes requisitos: a amostra deve ser representativa da matriz; o procedimento de amostragem deve ser simples, para que possa ser utilizado em qualquer região (inclusive em áreas remotas); o tamanho da amostra obtida deve ser compatível com a sensibilidade do método analítico e, não devem ocorrer perdas e/ou degradação da amostra durante o período de amostragem, ou durante o tempo entre a amostragem e a análise. (CRUZ, 2008, p. 1).

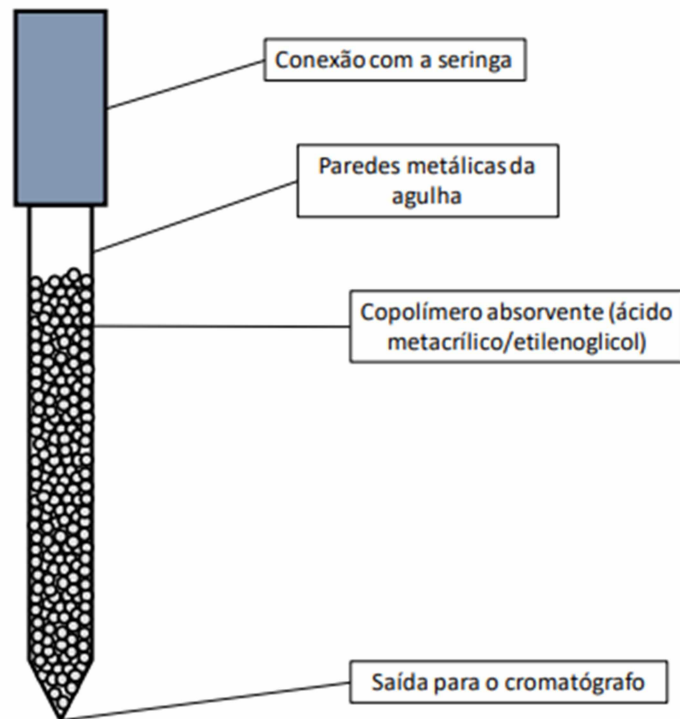


Figura 2- Coletor baseado na adsorção de acetona exalada por copolímero de ácido etacrílico e etilenoglicol. (Fonte: RINCO, 2019, p. 18)

As coletas na fase gasosa geralmente utilizam canisters ou sacos poliméricos inertes do tipo Tedlar. Os canisters (vasilhas) são bastante inertes e são muito robustos. Já os sacos Tedlar são mais baratos e adquiridos em grandes quantidades, geralmente indicados para análises ppmv (BATISTA, 2010, p. 15). O mais comum é utilizar o saco Tedlar com um bocal onde o paciente assopra e o ar é armazenado.

Outra estratégia bastante utilizada na amostragem é o emprego de coletores que condensam a umidade presente no ar exalado, retendo parte dos analitos solúveis (BATISTA, 2010, p. 16). Nesse caso o coletor possui um tubo encamisado com material refrigerante, no qual a parede do tubo fique gelada e condense o ar exalado quando o paciente assopra o bocal. Ao entrar em contato com a superfície gelada, o vapor de água se condensa formando líquido e é armazenado antes da análise.

No caso da extração das espécies sólidas, o dispositivo possui sólidos granulados ou porosos com um material que pode absorver ou adsorver o ar exalado pelo paciente. Geralmente essa forma é utilizada em combinação com a cromatografia gasosa.

Existem vários tipos de métodos de amostragem para compostos gasosos, porém os mais utilizados com base nas estratégias já apresentadas, são a amostragem sem pré-concentração, utilizada para as estratégias na fase gasosa e na condensação da umidade da amostra, e a amostragem de adsorção em sólidos ou metais, utilizada para a estratégia de extração de espécies sólidas (CRUZ e CAMPOS, 2008, p. 1182). Ambas amostragens são do tipo ativas, no qual o ar é succionado para dentro do recipiente de amostra sem a necessidade de medidores para determinação de volume de ar.

Na amostragem sem pré-concentração é utilizada para coleta as bolsas plásticas (tipo Tedlar) e os canisters. A principal vantagem desse método é a eficiência, que normalmente é de 100%, porém esse método tem a limitação do volume da amostra, que é limitado a poucos litros que pode ser insuficiente dependendo da análise, e a possibilidade de perda de compostos amostrados, que pode ser por adsorção nas paredes do recipiente, reações químicas com outros compostos presentes no ar, e até mesmo a instabilidade do analito de interesse.

Já na amostragem de adsorção em sólidos ou metais suas principais vantagens são a simplicidade, baixo custo, seletividade quando utilizado o adsorvente adequado, rapidez de análise com dessorção térmica e cromatografia gasosa (CRUZ e CAMPOS, 2008, p. 1184). Como desvantagens do método temos pequena eficiência de recuperação de alguns compostos, analitos coletados podem ser dessorvidos mais facilmente, e a sua eficiência pode ser influenciada pelo vapor d'água.

3- Principais biomarcadores

“Biomarcadores são marcadores biológicos que podem ser objetivamente medidos e quantificados como indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas a intervenções terapêuticas. [...] Desta forma, biomarcadores podem ser usados tanto para determinar a susceptibilidade à determinada doença como definir a elegibilidade para terapias específicas” (BRAGA, 2012, p. 36).

Os compostos orgânicos voláteis (VOCs) encontrados no ar exalado podem ser de influência externas, tais como contaminantes no ambiente, ou interna, através de processos metabólicos do organismo. Sendo assim, é fundamental que a distinção da origem desses biomarcadores para fins de diagnósticos de doenças.

Existem três tipos de biomarcadores que correspondem a diferentes estágios da doença: (i) biomarcador de triagem diagnóstica, que é utilizado por pacientes que, aparentemente, não possui a doença, (ii) biomarcador diagnóstico, que são para pacientes que tem suspeita da doença, e (iii) biomarcador prognóstico, no qual o paciente sabe que possui a doença.

“A acetona no ar exalado humano foi estabelecida como um biomarcador para o diabetes tipo 1 (T1D). Usar a acetona como biomarcador de análise não invasiva do ar exalado para diagnóstico de diabetes depende da disponibilidade de um dispositivo de detecção de acetona portátil, de resposta rápida e sensível.” (WANG, 2007, p.2)

A Insuficiência Cardíaca (IC) corresponde a 3% do total de internações nos hospitais do Brasil, possuindo assim um grande interesse no desenvolvimento de métodos prognósticos (BRAGA, 2012, p. 2). Os pesquisadores do InCor notaram um odor característico no ar exalado pelos pacientes diabéticos, surgindo uma possibilidade de processos bioquímicos para detecção por meio do ar exalado. Até o momento, o biomarcador de diagnóstico para essa doença são os peptídeos natriuréticos, e compreendem o peptídeo natriurético do tipo B (BNP), a fração N-terminal do pró-hormônio BNP (NT-proBNP) e o peptídeo natriurético atrial (ANP) (BRAGA, 2012, p. 4). Porém temos estudos no ramo de diagnóstico de diabetes e insuficiência cardíaca utilizando como biomarcador a acetona.

A diabetes mellitus é uma doença que também possui destaque, pois atinge cerca de 6,9% da população brasileira e é causada pela insuficiência ou má formação de insulina no organismo (Wang, 2013). Já foi comprovado que a acetona presente no ar exalado dos pacientes com essa doença pode corresponder até sete vezes maior concentração do que em pessoas que não são diabéticas. Com isso, é possível realizar algumas técnicas de análises no ar exalado desses pacientes, como, por exemplo, a cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) e espectroscopia de absorção a laser (LAS, do inglês, *laser absorption spectroscopy*). Essas técnicas podem ser utilizadas como monitoramentos não invasivos da doença, a fim de substituir os medidores portáteis de glicose que é realizado por meio de uma pequena incisão feita em um dos dedos do paciente. O avanço em alterar o método de acompanhamento dos pacientes com diabetes é, principalmente, a facilidade e melhor comodidade dos mesmos, pois os medidores atuais são invasivos e dolorosos, e, como exemplo, portadores de diabetes tipo 1 dependem da injeção de insulina diariamente, e precisam fazer a medição de glicose plasmática várias vezes no mesmo dia (BARRETO, 2020, p.3).

Sendo assim, a acetona já é utilizada como principal biomarcador para pacientes com diabetes, porém conforme dito, há estudos de utilização desse biomarcador para a detecção de pacientes com IC, no qual será abordado nos próximos tópicos.

4- Acetona

Um biomarcador que vem se destacando no diagnóstico de doenças é a acetona, pois o mesmo consegue identificar algumas condições no organismo, como por exemplo a cetoacidose, cetonúria, diabetes descompensada, intoxicação por álcool, insuficiência cardíaca e perda de peso. (RINCO, 2019, p.13)

Além da acetona, o fígado humano produz outros dois tipos de “corpos cetônicos”: o acetoacetato e o 3-B-hidroxiacetato. A Figura 3 mostra a estrutura química dessas espécies.

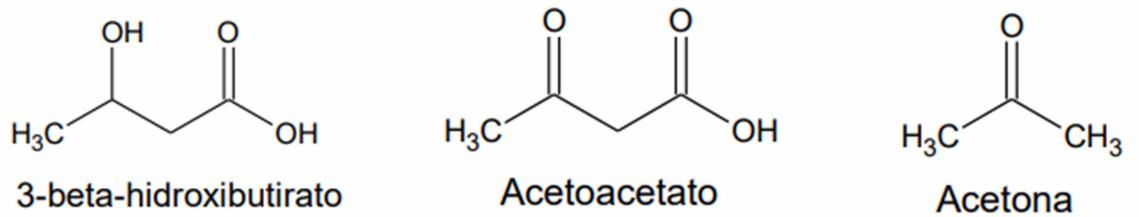


Figura 3- Estrutura química do 3-B-hidroxibutirato, acetoacetato e acetona. (Fonte: RINCO, 2019, p. 14)

A produção metabólica desses compostos são resultados do metabolismo de ácidos graxos por via hepática. A acetona se forma pela descarboxilação do acetoacetato (Figura 4) ou gerada pela desidrogenação do isopropanol (Figura 5).

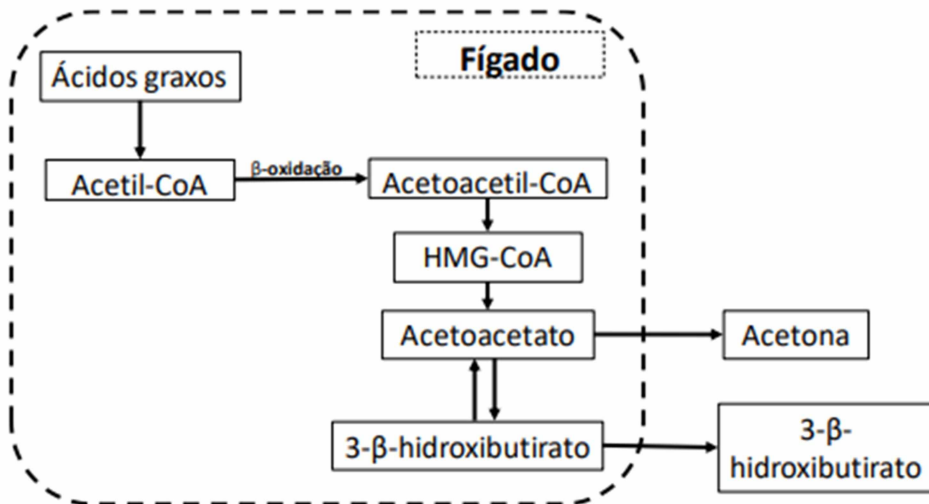


Figura 4- Formação da acetona através da descarboxilação do acetoacetato. (Fonte: RINCO, 2019, p. 15)

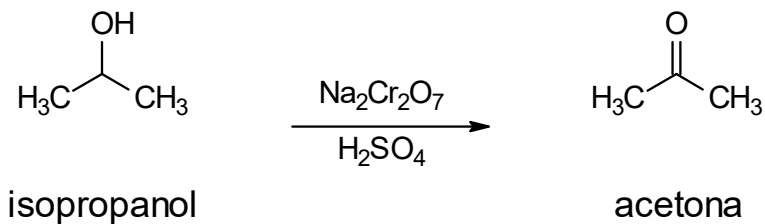


Figura 5- Formação da acetona através da desidrogenação do isopropanol. (Fonte: autor desconhecido).

Alguns estudos do ar exalado de pacientes com insuficiência cardíaca do INCOR conduziram a proposição da acetona como biomarcador efetivo para IC. No estudo realizado por Batista e Braga (BATISTA, 2010, 2015; MARCONDES-BRAGA, 2012; MARCONDES-BRAGA et al., 2012, 2016) foi comparado a concentração de acetona em ar exalado em pacientes saudáveis e pacientes com a doença, e foi determinado que a média de concentração da acetona em pessoas saudáveis era de $0,4 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$, e pacientes com a doença apresentava essa concentração cerca de 10 vezes maior.

Após, Braga conseguiu diferenciar graus de avanço da insuficiência cardíaca por meio da curva ROC, que é uma ferramenta para medir e especificar problemas no desempenho na medicina, para diagnóstico da insuficiência cardíaca por meio da acetona exalada, em consonância com dados obtidos para o BNP plasmático (peptídeo natriurético do tipo B).

4.1 - Métodos para determinação de acetona em ar exalado

Diversas técnicas analíticas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de sensores para determinação de acetona em ar exalado. Esses sensores podem ser aplicados diretamente a amostra de ar exalado ou etapas de pré-concentração podem ser adaptadas. Os principais desafios da análise de biomarcadores em ar exalado é a sensibilidade e seletividade. A tabela 2 apresenta as principais técnicas utilizadas para análise de acetona:

Técnicas/Métodos	Recursos
Com base em MS (PTR-MS, SIFT-MS, IMS-MS)	Tempo de resposta de centenas de milissegundos, até a detecção de nível ppb limite; utilizar ions reagentes diferentes para distinguir compostos isoméricos e espécies diferentes na mesma massa nominal, IMS-MS potencialmente supera o problema de sobreposição de massa, fornecendo mais informações sobre seções transversais de colisão compostas (ou seja, tamanho e forma) além de massa e carga.
Sensores eletroquímicos e nanosensores / nariz eletrônico	Custo-benefício e tamanho compacto; Vários sensores foram desenvolvido com o objetivo de melhorar a sensibilidade e seletividade.
Baseado em espectroscopia de laser técnicas	Até o limite de detecção de nível ppb; alta seletividade, quase em tempo real resposta, baixo custo do instrumento e função POC; até agora, CRDS, Fourier transformar banda larga CEAS e ICOS foram usados.
Baseado em espectrofotometria de absorção do infravermelho	Facilidade de preparação da amostra; possibilidade do uso de amostras em filmes sólidos, amostras líquidas e gasosas; Custo-benefício e tamanho compacto.

Tabela 2- Técnicas para análise de acetona (Adaptado de: WANG e WANG, 2013, p.11).

A determinação da acetona no ar exalado feita por analisadores que utilizam de sensores catalíticos se baseiam em semicondutores de óxidos metálicos devido a rapidez e boa reversibilidade a acetona. Porém, esses sensores possuem baixa seletividade, pois além de detectar a acetona, ele também responde a vapor d'água e etanol, além da necessidade de ser aquecido.

Também já foi estudado a interferência da acetona em técnicas como espectrofotometria de absorção do infravermelho, sensores de estado sólido (óxidos semicondutores) e eletroquímicos (eletrooxidação), porém também pode ocorrer interferência do etanol quando ambos estão em baixas concentrações.

O destaque, sendo assim, é para a técnica de cromatografia gasosa, que atingem limites de detecção suficientemente baixos e com possibilidade direta na fase gasosa. Também pode-se usar a espectrometria de massas, sem prévia separação cromatográfica.

Um método espectrofotométrico clássico, adotado por Batista e Braga, se baseia na reação de condensação aldólica entre acetona e salicilaldeído em meio alcalino com a formação de di-salicilidenoacetona, conforme figura 6. O método é válido devido a simplicidade, confiabilidade, baixo custo e seletividade, porém demora a obtenção de resultados devido o elevado tempo da reação (20 horas).

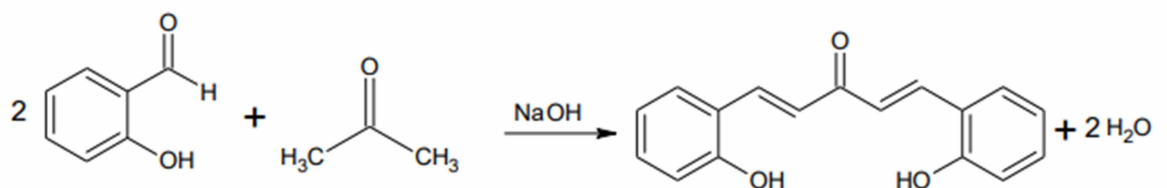


Figura 6- Reação de condensação aldólica entre acetona e salicilaldeído. (Fonte: RINCO, 2019, p. 25)

Com isso, a busca constante de aperfeiçoamento das técnicas para tornar mais rápido e prático os métodos de amostragem e de determinação de acetona em ar exalado se tornou importante para o campo da pesquisa.

5- Análise de Acetona em ar exalado

Na revisão será utilizada a experimentação realizada por Guilherme Batista (BATISTA, 2010). Seu estudo teve vários objetivos, porém nesse trabalho vamos focar sobre a identificação da acetona como biomarcador em ar exalado relacionado com o quadro clínico de IC e a adaptação do método espectrofotométrico para determinação de acetona.

5.1- Amostragem:

Foi desenvolvido um sistema no qual o paciente expira o ar em um canudo de polietileno descartável conectado ao impinger que possui água deionizada. Também adaptou-se a extremidade do tubo de entrada um difusor de gás feito de vidro sinterizado e descartável. A água que está no impinger é resfriada num banho de água e gelo. Foi acoplado na saída do sistema uma bolsa de polietileno lacrada descartável para definição do volume no final da coleta. O ar é exalado pelo coletor em ritmo normal de respiração até que a bolsa fique completamente inflada.

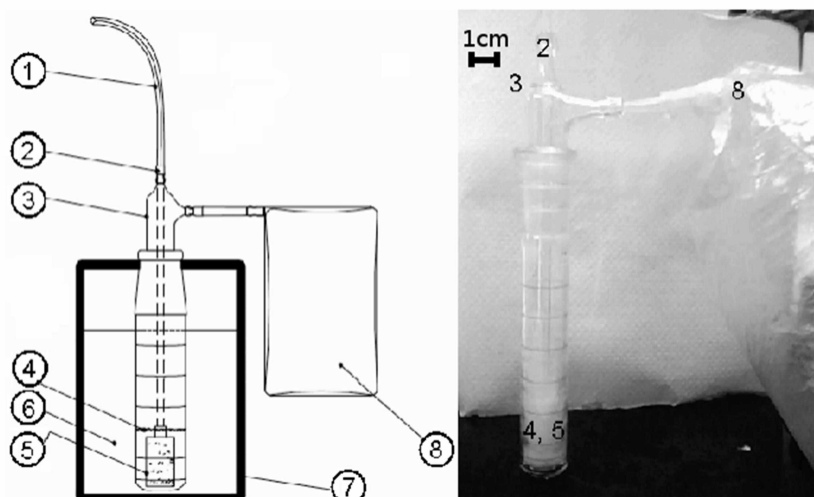


Figura 7- Sistema de amostragem desenvolvido. 1- Tubo de polietileno; 2- Conexão; 3-Impinger; 4- Difusor de ar; 5- Água deionizada; 6- Banho de gelo e água; 7- Frasco para termostatização; 8- Saco plástico para definição de volume

Após a amostragem, o sistema é desmontado e as gotas do líquido contidas no difusor são transferidas para um frasco com capacidade de 5 mL através do ar injetado por uma seringa de 10 mL pelo tubo de entrada. O líquido é conservado em freezer a -80°C .

5.2- Principais métodos e técnicas utilizadas:

5.2.1- Cromatografia gasosa – espectrometria de massa (CG-EM)

Foi utilizado o cromatógrafo GC 17A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) acoplado ao espectrômetro de massas QP5050A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) utilizando a ionização por impacto de elétrons e coluna de politienoglicol 30m x 0,25 mm.



Figura 8- Cromatógrafo Shimadzu GC-17^a. (Fonte: Medwow, 2014).

A amostra foi descongelada em temperatura ambiente e injetada 5 μL no GC com as seguintes configurações: injetor a 220°C , fluxo de 4,9 mL/min, temperatura inicial da coluna 60°C durante 3 minutos, com rampa de aquecimento a $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$, atingindo 220°C , no qual permaneceu durante 10 minutos. O monitoramento dos íons foi realizado por Selected Ion Monitoring (SIC) nos fragmentos de relação m/z 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 58 e 59. As amostras foram coletadas num período de 20 meses.

A análise das correntes iônicas foi realizada pelo software GLASS-GC5000 e registradas nos arquivos gerados pelo cromatógrafo com o auxílio do editor hexadecimal (GHex). A curva de calibração foi utilizada com padrões recém-preparados de acetona em água deionizada nas seguintes concentrações em mg/L: 0,0 (branco), 0,6; 1,3; 3,3; 6,5 e 32,7.

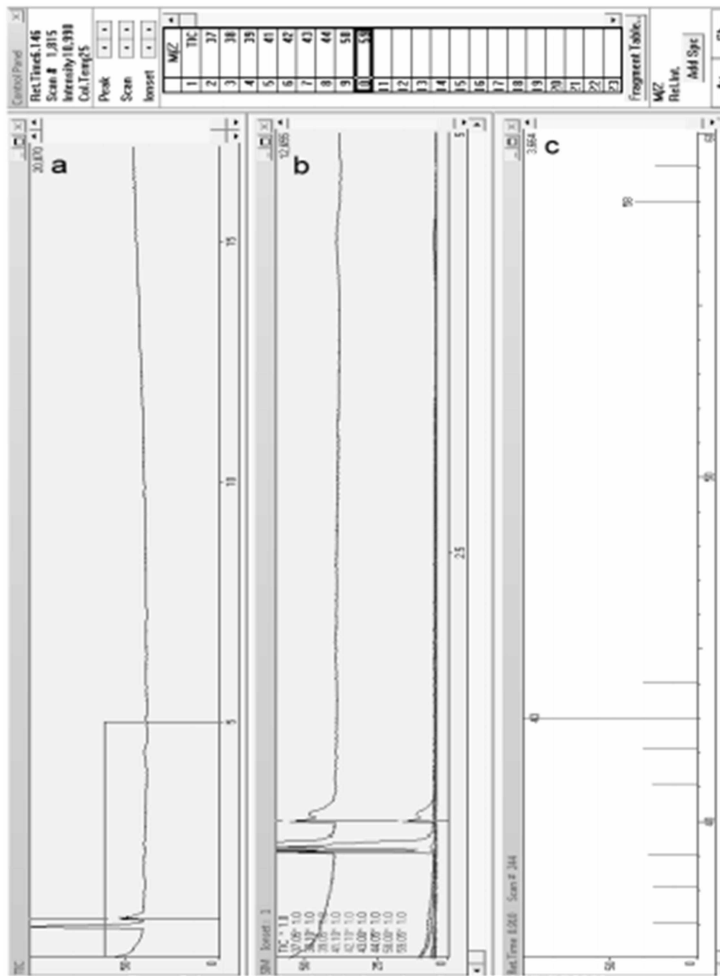


Figura 9- Interface do software GLASS-GC5000. a) Cromatograma exibindo corrente iônica total no detector b) Excerto do cromatograma a c) Espectro de massas obtido (Fonte: BATISTA, 2010, p. 41)

5.2.2- Espectrofotometria

Em meio básico, a acetona sofre condensação aldólica com solução aquosa de salicilaldeído, gerando um produto que possui uma coloração distinta. É uma reação lenta, porém é possível definir condições em que a absorbância do produto de reação possui relação linear com a concentração de acetona.

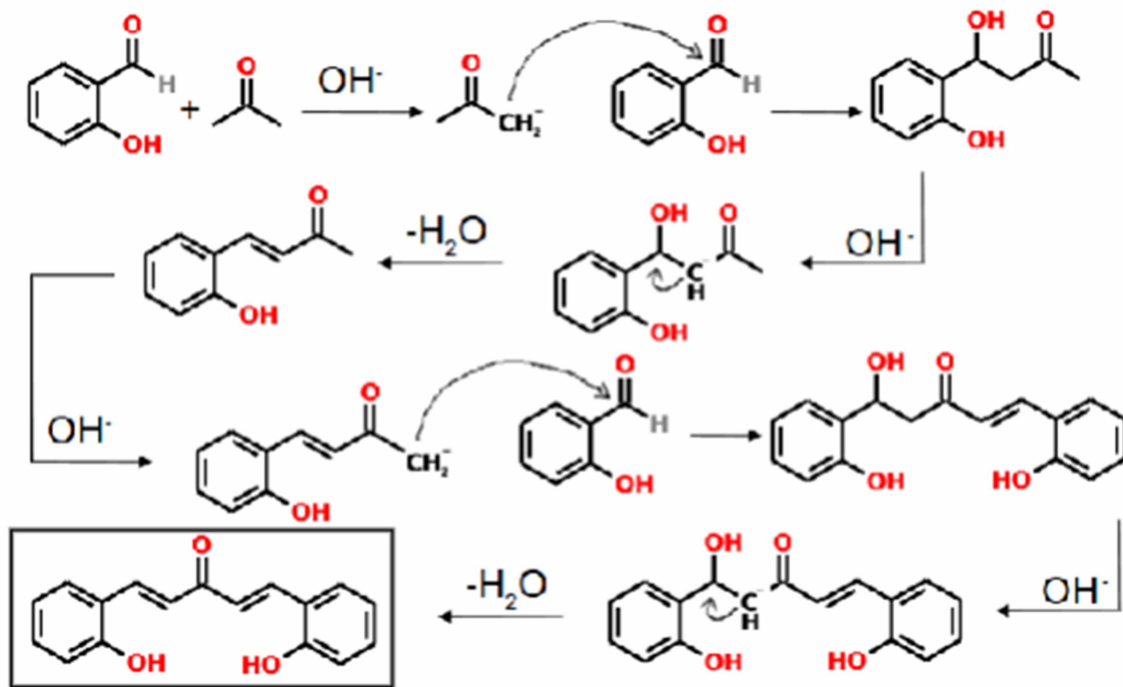


Figura 10- Reação entre acetona e salicilaldeído em meio básico. (Fonte: BATISTA, 2010, p. 42)

Foi adicionado 2mL de hidróxido de sódio 11mol/L em um balão de 50 mL com 25mL de água deionizada. Após, foi misturado 600 μL de salicilaldeído e 20 mL de solução de hidróxido de sódio, completando o balão com água deionizada.

Na determinação, foi misturado 500 μL de amostra e aguardou de 10 a 24 horas para que a reação acontecesse. Foi considerado os comprimentos de ondas de 450 a 600 nm (a cada 2 nm) pois as ondas inferiores possuíam alta absorbância (maior que 2,5) mesmo no branco (ausência de acetona). O espectrofotômetro utilizado foi do tipo diode array HP8452A.



Figura 11- Espectrofotômetro tipo diode array HP8452A. (Fonte: Evisa. 2003)

A curva de calibração foi construída com soluções de concentração conhecidas entre 0,3 e 30,0 mg/L feitas por diluições de acetona pura (Sigma-Aldrich, 99,5%).

5.3- Resultados obtidos dos métodos analíticos utilizados

5.3.1- Cromatografia gasosa – espectrometria de massa (GC-MS)

Foi possível verificar nas amostras a presença de um composto de íon molecular m/z 58 em concentrações variáveis, e um pico base m/z 43, reconhecido com acetona. Com o objetivo de otimizar a sensibilidade e a capacidade de quantificação dessa técnica, o método foi adaptado para injeção direta da fração aquosa no GC-MS e monitoramento iônico por SIM (*Selected Ion Monitoring*) dos íons m/z 43 e 58 (que são referentes a acetona), e 44 e 59 (outro composto encontrado nas amostras, não descrito em literatura e não investigado em análise).

O valor da integração dos picos da acetona (m/z 43 e 58) foi proporcional às concentrações de acetona em padrões analisados (Figura 12), sendo 4,2 vezes mais sensível quando realizada pelo íon m/z 43 (Figura 13), devido a proporção dos íons quando da fragmentação por impacto de elétrons.

A técnica possui boa repetitividade, porém baixa reprodutibilidade, o que impossibilitou a quantificação das amostras, conforme observado em duplicata na figura abaixo.

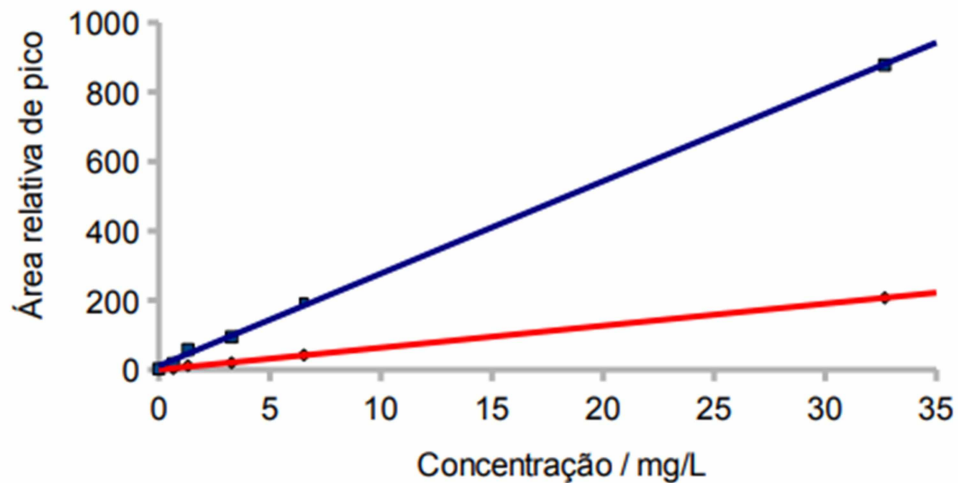


Figura 12- Curvas de calibração analíticas de acetona realizada em GC-MS. Quantificação pela integração dos sinais de picos dos íons m/z 43 (em azul) e 58 (em vermelho) (Fonte: BATISTA, 2010, p. 49)

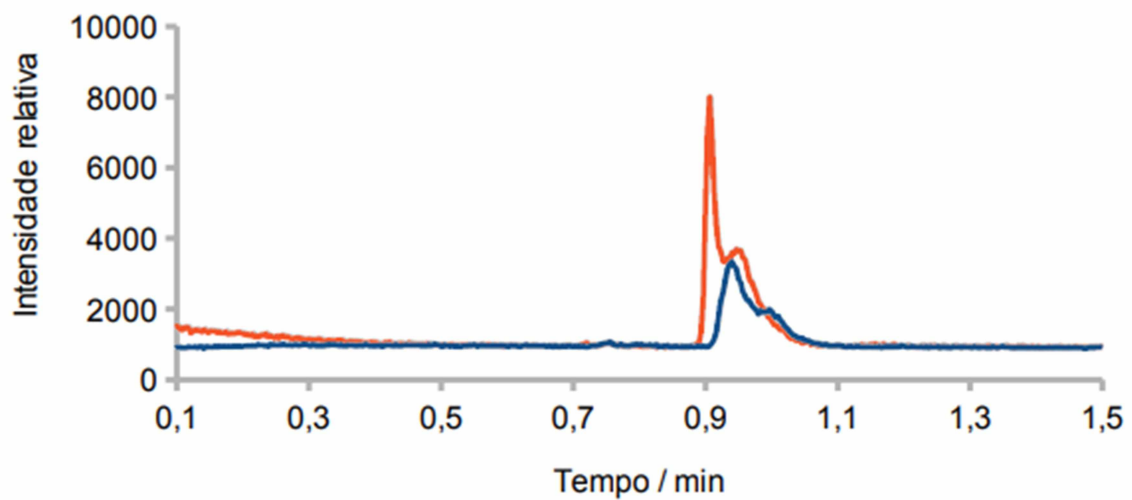


Figura 13- Cromatogramas da corrente iônica do íon m/z 43 para uma mesma amostra analisada em ocasiões diferentes. (Fonte: BATISTA, 2010, p. 49)

Essa análise permitiu identificar a acetona como biomarcador de interesse a ser considerado no ar exalado de pacientes com IC. Porém o sinal de outro composto possui, aparentemente, correlação inversa frente o sinal da acetona.

5.3.2- Espectrofotometria

O período para que ocorra a reação quantitativamente é de 10 horas a 25°C, sendo que a absorvância fica estável no período de 10 e 24 horas do início da reação. Aquecer a reação para verificar um possível aumento de velocidade da reação, não foi viável em termos de repetibilidade, provavelmente devido perdas do analito por meio de evaporação ou permeação pelo frasco.

O limite de detecção estimado foi de 0,3 mg de acetona por litro de solução, correspondendo a um limite de quantificação de 1,0 mg/L. A determinação semi-quantitativa com uma resposta linear são nas concentrações entre 0,6 mg/L a 15 mg/L, após 10 horas reação (Figura 14).

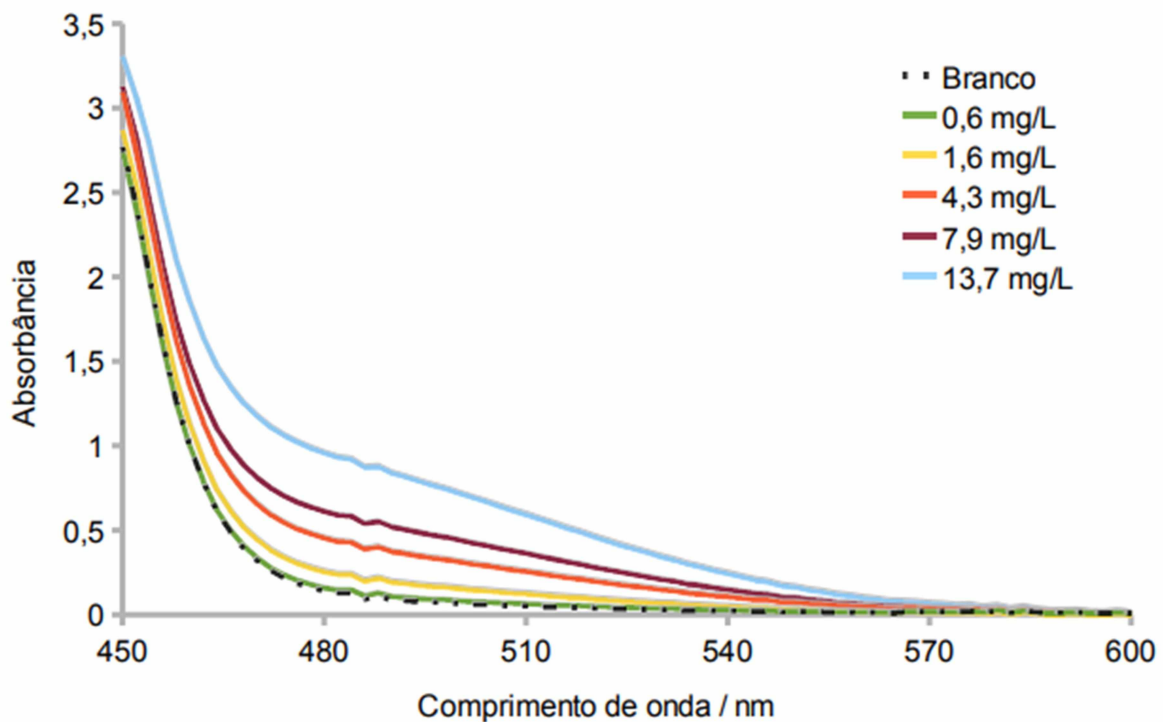


Figura 14- Análise espectrofotométrica de padrões de acetona após reação com salicilaldeído em meio básico. (Fonte: BATISTA, 2010, p. 51)

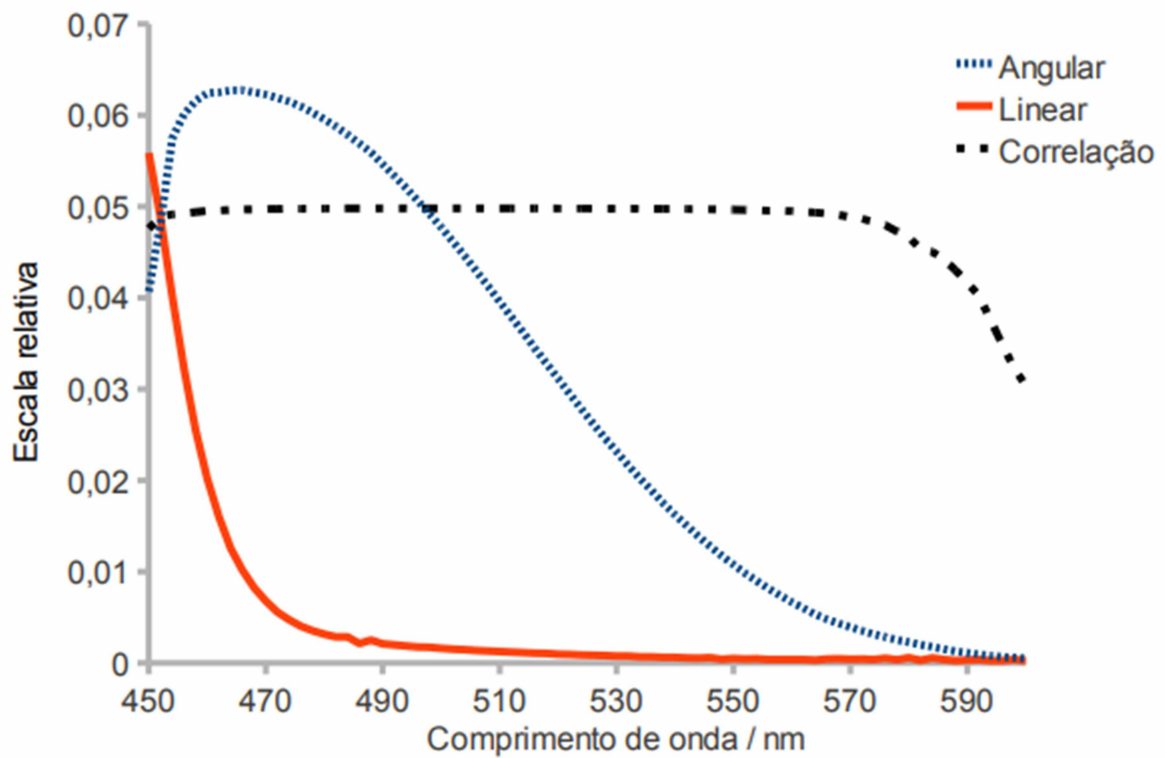


Figura 15- Parâmetros de regressão linear dos padrões de acetona após reação com salicilaldeído em meio básico, utilizando espectrofotometria em diferentes comprimentos de onda. (Fonte: BATISTA, 2010, p. 51)

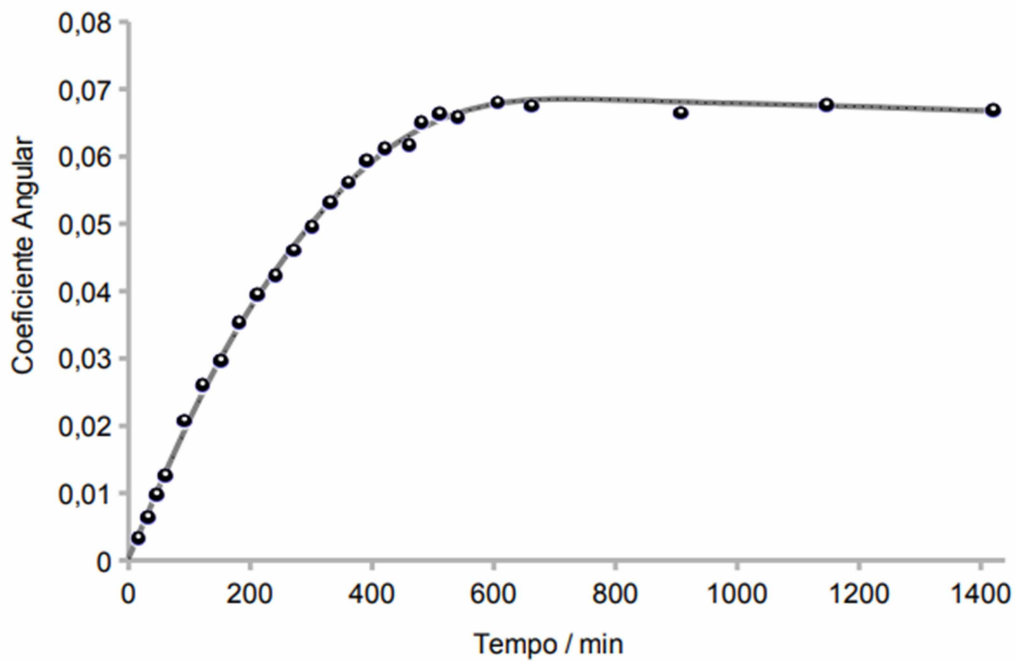


Figura 16- Estudo cinético da reação entre salicilaldeído e acetona a 25°C. Cada ponto do gráfico corresponde ao coeficiente angular da regressão linear nas soluções de 0; 0,3 e 12,0 mg/L. Comprimento de onda: 474 nm (Fonte: BATISTA, 2010, p. 52)

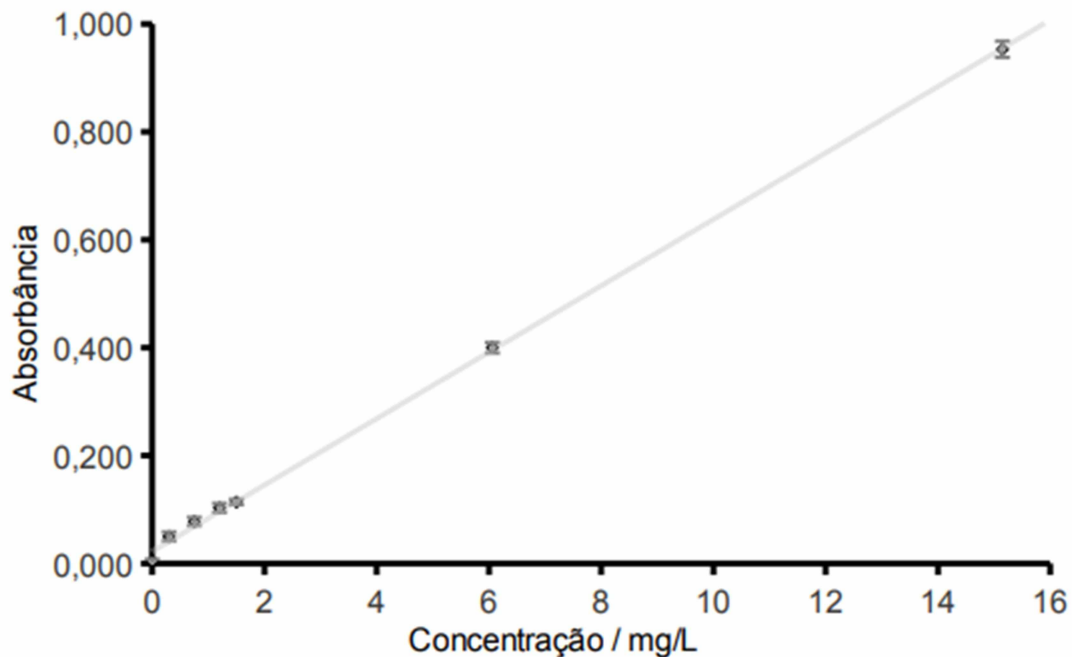


Figura 17- Curva de calibração analítica para método espectrofotométrico (474 nm) após 10 horas de reação com salicilaldeído (descartando a absorbância do branco). (Fonte: BATISTA, 2010, p. 52)

Esse método de determinação da acetona possui fácil replicabilidade, porém a reação de condensação entre acetona e salicilaldeído é lenta. Sendo assim, é possível aplicar um método cinético reduzindo para uma hora o tempo de determinação. A sensibilidade desse método é suficiente, pelo menos, para detectar os casos mais graves de IC.

O método cinético é uma medição em tempos bem definidos e temperatura controlada. Sendo assim, soluções padrão foram medidas em 15, 30, 45 e 60 minutos após a adição de reagente calorimétrico não especificado, e o coeficiente angular obtido para cada grupo de soluções foi lançado em gráfico em função da concentração da amostra. Pode-se observar a correlação linear em todas as situações.

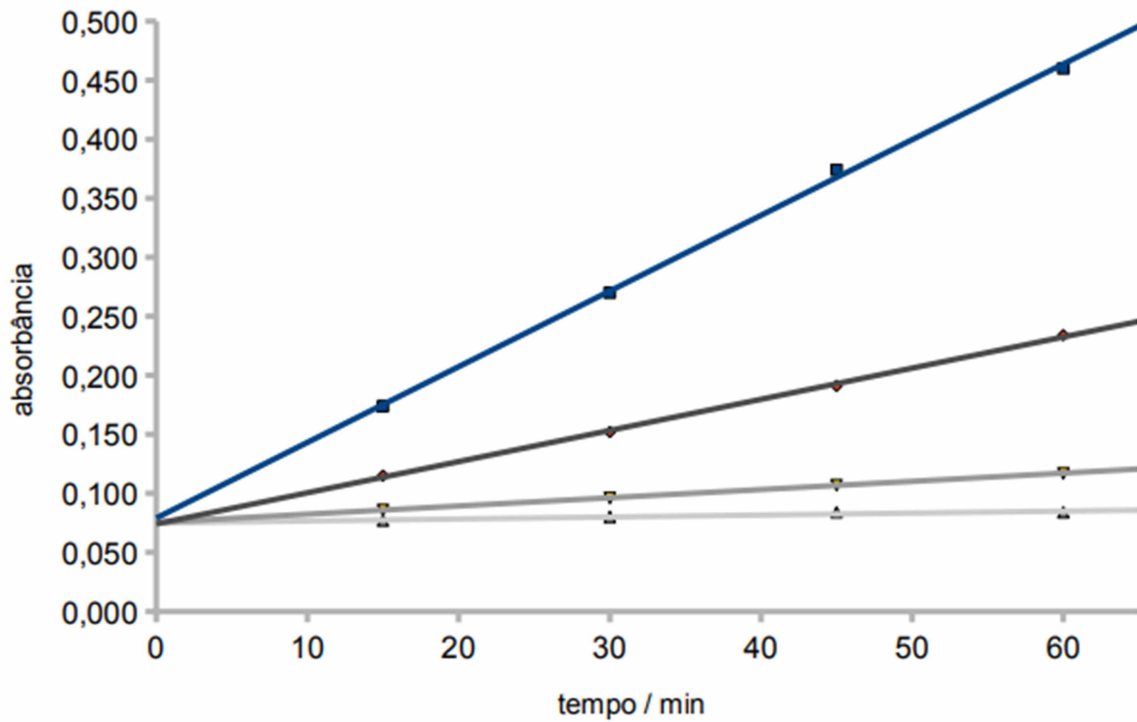


Figura 18- Absorvância (474 nm) de padrões de acetona em concentrações conhecidas. (Fonte: BATISTA, 2010, p. 53)

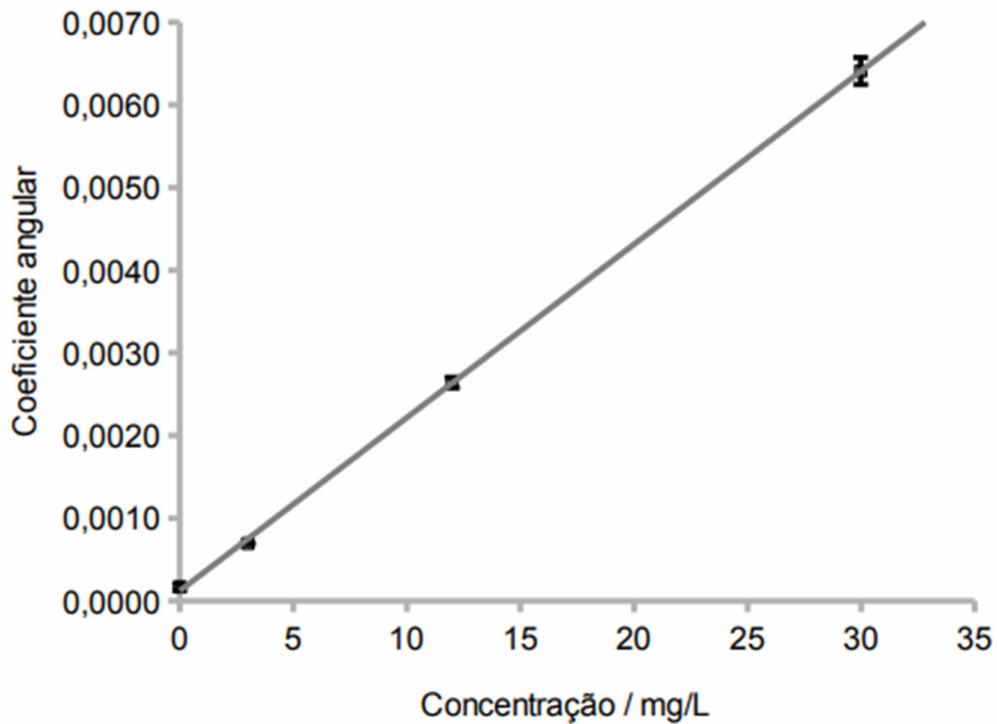


Figura 19- Correlação entre coeficientes das curvas com tempo de 10 a 24 horas de duração (figura 14) e as concentrações nominais de acetona. (Fonte: BATISTA, 2010, p. 54)

6- Conclusão

O estudo permitiu comprovar que a acetona pode ser utilizada como biomarcador em ar exalado de pacientes com doença de insuficiência cardíaca, além de já ser utilizado para pacientes com diabetes. Porém, nas revisões realizadas, ainda não foi possível identificar um método que consiga detectar a doença precocemente.

Dos métodos revistos nesse trabalho, a determinação da acetona do ar exalado em pacientes com IC foi melhor identificado na determinação por espectrofotometria, sendo o principal desafio a identificação em pacientes que não estão em grau avançado da doença. Esse método é considerado replicável apenas em menor duração (uma hora), visto que possui resultados confiáveis.

Outro ponto que devemos considerar é a possível perda de analito na coleta ou na preservação da amostra, que pode impactar a obtenção de resultados.

Em relação a revisão bibliográfica, foi encontrado poucos estudos sobre a utilização da acetona como biomarcador, e utilizando as mesmas técnicas de determinação. Porém o resultado foi satisfatório visto que atingiu o objetivo proposto.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, G. L. Análise de acetona em ar exalado: metodologia para estudo em pacientes hospitalizados. São Paulo. 2010. 74 p.

BRAGA, F. G. M. Acetona exalada como novo biomarcador do diagnóstico de insuficiência cardíaca. São Paulo. 2012. 167 p.

RINCO, R. S. Aperfeiçoamento de métodos de determinação de acetona para análise em ar exalado. São Paulo. 2019. 89 p.

NASCIMENTO, L. R. e DOMINGUETI, C. P. MicroRNAs: novos biomarcadores e alvos terapêuticos promissores da doença renal do diabetes. Divinópolis. 2018.

DIAS, J. W. C. Amostragem e análise do ar com canisters e bolsas de Tedlar. Rio de Janeiro. 2013. 22 p.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. Belo Horizonte. 2002.

ALVES, R. E. P. Estudo dos biomarcadores associados a doenças renais. Lisboa. 2012. 99 p.

WANG, C. A new acetone detection device using cavity ringdown spectroscopy at 266 nm: evaluation of the instrument performance using acetone sample solutions. Starkville. 2007. 12p.

CRUZ, L. P. S e CAMPOS, V. P. Métodos de amostragem e análise para compostos reduzidos de enxofre atmosférico. Salvador. 2008. 10 p.

WANG, Z e WANG, C. Is breath acetone a biomarker of diabetes? A historical review on breath acetone measurements. Starkville. 2013. 21 p.

NOGUEIRA, P. R., RASSI S. e CORRÊA K. S. Perfil epidemiológico, clínico e terapêutico da insuficiência cardíaca em hospital terciário. São Paulo. 2010.