

Sara Filipa Domingues

**Análise de ar expirado para diagnóstico de patologias**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2014



Análise de ar expirado para diagnóstico de patologias

Sara Filipa Domingues

**Análise de ar expirado para diagnóstico de patologias**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2014

Análise de ar expirado para diagnóstico de patologias

Sara Filipa Domingues

Análise de ar expirado para diagnóstico de patologias

---

(Sara Filipa Domingues)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a  
obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

## Resumo

O ar expirado é constituído por milhares de moléculas como gases inorgânicos (ex. óxido nítrico, dióxido e monóxido de carbono), COV's (ex. isopreno, etano, pentano e acetona) e outras substâncias não voláteis (ex. isoprostanos, peroxinitrito, citocinas, leucotrienos, peróxido de hidrogénio e azoto). A composição e os níveis de concentração comuns dos componentes no ar exalado são hoje razoavelmente bem conhecidos pelo que algumas alterações a esta matriz podem ser usados como auxiliares em diagnósticos clínicos. Para o diagnóstico de patologias recorrendo ao ar expirado, a fracção que mais informação fornece são os COV's.

De facto, os COV's têm origem endógena (isto é, resultam dos processos metabólicos do organismo) e sendo excretados por via respiratória podem ser considerados biomarcadores de patologias.

São várias as patologias que são passíveis de detecção por testes respiratórios como asma, pneumonia, diabetes, cancro, infecção por *Helicobacter pylori*, entre outras.

Os testes respiratórios são uma mais valia para a prática clínica apresentado diversas vantagens relativamente aos métodos tradicionais como: são não invasivos, indolores, rápidos, sem qualquer risco, de fácil execução, sem causar desconforto e que podem ser realizados rotineiramente em ambiente clínico.

No entanto algumas desvantagens estão associadas. É necessário desenvolver procedimentos analíticos padrão para melhorar a quantificação precisa dos compostos alvo. Mais estudos são precisos também na área da análise propriamente dita para resolver os problemas actuais com a amostragem, pré-concentração e técnica analítica.

## **Abstract**

The expired air is composed by thousands of molecules as inorganic gases (e.g. nitric oxide, carbon monoxide and carbon dioxide), VOC's (e.g. isoprene, ethane, pentane and acetone) and others non-volatile substances (e.g. isoprostanes, peroxyxynitrite, cytokines, leukotrienes, hydrogen peroxide and azote). The composition and concentration levels of species commonly present in exhaled air are now fairly well known. Therefore, some matrix changes can be used as clinical diagnostic aids. When using breath for the diagnostic of some diseases, the fraction which provides the most information are the VOC's.

In fact, the VOC's have endogenous origin (i.e. result from body metabolic processes) and as they are excreted by airway, they can be used as pathologies biomarkers.

Several diseases can be detected using breath tests such as asthma, pneumonia, diabetes, cancer, infection with *Helicobacter pylori*, among other.

Breath tests can be an important tool for clinic practice, presenting several advantages over traditional methods such as: being non-invasive procedures, painless, fast, having no risk, easy execution, causing no discomfort and can be routinely done in a clinic environment.

However, there are some disadvantages associated. It's necessary to develop analytical standard procedures to improve target compounds quantification accuracy. Further studies are needed to solve current problems with sampling, pre-concentration and analytical techniques.

## Índice

Resumo .....	V
Abstract .....	VI
Índice .....	VII
Índice de Figuras .....	IX
Índice de Tabelas .....	X
Índice de abreviaturas e acrónimos .....	XI
Introdução .....	13
Capítulo I – Origem e constituição do ar expirado .....	15
Capítulo II – Biomarcadores comuns na respiração .....	17
1. Hidrocarbonetos .....	17
2. Acetona .....	18
3. Compostos contendo enxofre .....	19
4. Óxido nítrico .....	19
5. Monóxido de carbono .....	20
6. Compostos azotados .....	21
7. Peróxido de hidrogénio .....	22
Capítulo III – Principais patologias passíveis de detecção por testes respiratórios .....	24
1. Doenças pulmonares .....	24
i. Asma .....	24
ii. Doenças Pulmonar Obstrutiva Crónica .....	25
2. Diabetes .....	26
3. Cancro .....	26
4. <i>Helicobacter pylori</i> .....	27
5. Cirrose .....	28
6. Má absorção da lactose .....	29
Capítulo IV – Procedimento para análise de biomarcadores em amostras de ar exalado .....	30
1. Amostragem – recolha e pré-concentração .....	30
i. “Vasilha” metálica .....	33
ii. Extracção em fase sólida .....	33
iii. Microextracção em fase sólida .....	34

2. Métodos analíticos.....	34
i. Espectrometria de mobilidade iónica (IMS).....	35
ii. Cromatografia gasosa (GC).....	36
ii.a. Cromatografia gasosa associada a detecção de ionização em chama (GC-FID) .....	37
ii.b. Cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS)	37
ii.c. Cromatografia gasosa associada à espectrometria de mobilidade iónica (GC-IMS) .....	38
iii. Espectrometria de massa associada à reacção de transferência de protões (PTR- MS).....	39
iv. Espectrometria de massa associada a um tubo de deriva de selecção de iões (SIFT-MS) .....	40
v. Espectrometria de laser.....	42
vi. Sensores químicos .....	42
Conclusão.....	45
Bibliografia.....	46

## Índice de figuras

Figura 1: Formação de acetona no organismo (adaptado de Miekisch <i>et alii.</i> , 2004).....	18
Figura 2: Ciclo da ureia (adaptado de Hibbard e Killard, 2011).....	22
Figura 3: Respiração dividida em várias fases tendo em conta a concentração de CO <sub>2</sub> (adaptado de Miekisch <i>et alii.</i> , 2004) .....	31
Figura 4: Representação esquemática da espectrometria de mobilidade iónica (IMS) (adaptado de Ferreira, 2011).....	36
Figura 5: Cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (adaptado de Ferreira, 2011).....	38
Figura 6: Representação esquemática de um sistema de cromatografia gasosa associada a espectrometria de mobilidade iónica (adaptado de Palmer e Limeró, 2001) .....	39
Figura 7: Espectrometria de massa associada a reacção de transferência de protões (adaptado de Hibbard e Killard, 2011) .....	40
Figura 8: Espectrometria de massa de iões selectivos do tubo de escoamento (adaptado de Hibbard e Killard, 2011).....	41
Figura 9: Representação esquemática de um sensor químico específico para a detecção de amónia (adaptado de Hibbard e Killard, 2011) .....	43

**Índice de tabelas**

Tabela 1: Métodos analíticos para a análise de ar expirado (adaptado de Kin, *et alii.*, 2012)  
..... 35

## Índice de abreviaturas e acrónimos

COV's: Compostos orgânicos voláteis

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crónica

FDA: Administração Federal de Alimentos e Medicamentos, do inglês, *Food and Drug Administration*

GC: Cromatografia gasosa, do inglês, *Gas Chromatography*

GC-MS: Cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa, do inglês, *Gas Chromatography- Mass Spectrometry*

GC-FID: Cromatografia gasosa associada a detecção de ionização em chama, do inglês, *Gas Chromatography- Flame Ionization Detector*

HO: Heme oxigenase

IMS: Espectrometria de mobilidade iónica, do inglês, *Ion mobility spectrometry* MS: Espectrometria de massa, do inglês, *Mass spectrometry*

(m/z): Relação massa – carga

NOS: Óxido nítrico sintases, do inglês, *Nitric Oxide Synthases*

NOS1/ nNOS: óxido nítrico sintases neuronal,

NOS2/ iNOS: óxido nítrico sintases induzida

NOS3/ eNOS: óxido nítrico sintase endotelial,

OMS: Organização Mundial de Saúde

ORN: Neurónios receptores olfactivos, do inglês, *olfactory receptors nose*

PTR-MS: Espectrometria de massa associada à reacção de transferência de protões, do inglês, *Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry* ppt<sub>v</sub>: Partes por trilião de volume

ppm<sub>v</sub>: Partes por milhão de volume

ROS: Espécies reactivas de oxigénio, do inglês, *reactive oxygen species*

SIFT-MS: Espectrometria de massa associada a um tubo de deriva de selecção de iões, do inglês, *Selected ion flow tube mass spectrometry*

## **Introdução**

Desde há muito tempo que se reconhece que a respiração humana pode ser utilizada como uma potencial ferramenta de diagnóstico e monitorização de certas patologias.

A utilização de testes respiratórios remonta à antiga Grécia, onde Hipócrates fazia o diagnóstico de algumas patologias com base no hálito dos pacientes. Um cheiro frutado, típico da acetona, era indício da diabetes, um hálito a mofo e peixe era indicativo de doença hepática avançada e um aroma a esgoto corresponderia a abscesso pulmonar (Francesco *et alii*, 2004; Kim *et alii*, 2012). Depois de Hipócrates vários foram os investigadores que analisaram os componentes da respiração humana. No século XVIII, Laplace e Lavoisier, detectaram a presença de dióxido de carbono no ar expirado e durante o século XIX, foram desenvolvidos testes respiratórios para detecção de álcool e acetona (Li *et alii*, 2013). A verdadeira complexidade da expiração só foi conhecida em 1971, pelas mãos de Linus Pauling, que detectou e quantificou cerca de 250 substâncias numa amostra de ar expirado por recurso à cromatografia gasosa (Minh *et alii*, 2013).

Hoje em dia, mais de 3000 compostos orgânicos voláteis (COV's) já foram detectados, pelo menos uma vez, na respiração humana. A maioria destes compostos é de origem exógena (isto é, são substâncias voláteis que são introduzidas no ar por inalação) não sendo por isso úteis para fins de diagnóstico. No entanto, alguns deles por serem endógenos, têm um significado fisiológico estando intimamente relacionados com determinadas doenças. De facto, cerca de 300 compostos podem ser utilizados como biomarcadores de stress oxidativo, inflamação ou carcinogénese, que por sua vez contribui para o diagnóstico de patologias como cancro da mama, cancro do pulmão, doenças respiratórias, doenças inflamatórias e diabetes. O grande problema do uso dos COV's como biomarcadores, está na dificuldade em conseguir correlacionar os compostos identificados com a patologia devido à complexidade dos processos metabólicos. Adicionalmente, o uso de um único composto pode não ser suficiente para o diagnóstico de uma doença já que as concentrações dos COV's podem sofrer oscilações inter e intra-individuais (Arakawa *et alii*, 2013; Francesco *et alii*, 2004).

Hoje em dia os testes respiratórios estão em crescente desenvolvimento para o diagnóstico e avaliação de várias doenças comuns apresentando várias vantagens em relação às tradicionais análises ao sangue e à urina. De entre essas vantagens destaca-se o facto de se

tratar de um método não invasivo, indolor, rápido, sem qualquer risco, de fácil execução, que não causa desconforto e que pode ser realizado rotineiramente em ambiente clínico (Li *et alii*, 2012). Pode ser facilmente aplicado a crianças, incluindo recém-nascidos, e a pacientes em ventilação mecânica com stress mínimo para os pacientes (Kim *et alii*, 2012).

Apesar das muitas vantagens, a análise da respiração está ainda numa fase inicial de desenvolvimento devido à ausência de procedimentos analíticos padrão que limitam a quantificação precisa de compostos alvo. Além do significado fisiológico e da cinética de exalação de potenciais biomarcadores, problemas como amostragem, pré-concentração, técnica analítica, normalização e expressão de dados têm de ser estudados, desenvolvidos e padronizados de modo a que estas análises possam estar disponíveis no futuro e, pelo menos parcialmente, possam substituir os bioensaios ao sangue e à urina (Kim *et alii*, 2012).

Com o presente trabalho, pretende-se fazer uma revisão sistematizada, no que diz respeito à análise de ar expirado para o diagnóstico da saúde pública, recorrendo a diversos artigos, revistas e livros, no sentido de compilar o que há de mais actual, no que diz respeito a esta temática.

## Capítulo I – Origem e constituição do ar expirado

O ar expirado é constituído por milhares de moléculas. É composto por uma mistura de gases inorgânicos (ex. óxido nítrico, dióxido e monóxido de carbono), COV's (ex. isopreno, etano, pentano e acetona) e outras substâncias não voláteis (ex. isoprostanos, peroxinitrito, citocinas, leucotrienos, peróxido de hidrogénio e azoto) (Zhou *et alii.*, 2012; Li *et alii.*, 2012; Phillips *et alii.*, 1999).

O ar expirado é constituído por diferentes fracções. Os primeiros 150 mL são de ar que se encontra nas vias aéreas superiores (“dead-space air”), isto é, espaço fisiológico entre a boca e os bronquíolos terminais, onde não há qualquer troca gasosa com o sangue. Os 350 mL seguintes, denominados de ar alveolar, têm origem nos pulmões, e resultam das trocas gasosas, entre o sangue pulmonar e o ar (Natale *et alii.*, 2014). Apesar de haver uma matriz comum na composição das amostras de ar expirado, há uma variabilidade qualitativa e quantitativa inter e intra-individual especialmente no que diz respeito aos COV's. COV's como o isopreno, pentano, acetona, etano e metanol, que são produtos do metabolismo de base, e por isso são presença comum no ar expirado. No entanto, o número de COV's por amostra ascende a mais de uma centena com concentrações que podem variar da ordem das partes por milhão (ppm) às partes por trilião (ppt), de acordo com factores como a concentração no ar inspirado, a idade, estado de saúde e estilo de vida do indivíduo (Zhou *et alii.*, 2012).

Para ser possível diagnosticar ou monitorizar qualquer processo patológico, a partir da presença e/ou concentração de substância(s) no ar expirado é necessário que a sua origem seja endógena, situação em que pode ser designada de biomarcador. Entre os compostos endógenos que podem fornecer informações sobre os diferentes processos bioquímicos incluem-se gases inorgânicos como óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO) e outros COV's (como o etano, pentano, acetona, acetaldeído e isopreno), e substâncias normalmente não voláteis, tais como os isoprostanos, peroxinitrito, leucotrienos, peróxido de hidrogénio ou citocinas que podem ser determinados no condensado do ar exalado (Natale *et alii.*, 2014; Miekisch *et alii.*, 2004).

A identificação e quantificação destes biomarcadores é depois efectuada por diferentes técnicas que podem ser divididas em três grandes grupos: os métodos baseados na espectrometria de massa (MS), frequentemente acoplados à cromatografia gasosa; os

sensores químicos (“bio-sniffers” ou narizes electrónicos), desenvolvidos nos últimos anos, que possuem elevada selectividade e sensibilidade (Arakawa *et alii.*, 2013; Biasioli *et alii.*, 2011) e a espectroscopia de absorção a laser.

Em 2005, os testes respiratórios eram utilizados em testes rotineiros de detecção de etanol na corrente sanguínea e também para o diagnóstico de infecção por *Helicobacter pylori*, através da detecção do complexo C<sub>13</sub>-Ureia. Em apenas 2 anos, os testes multiplicaram-se e em 2007 os testes, utilizando respiração humana, aprovados pela FDA eram já seis: Etanol (aplicação da lei), C<sub>13</sub>-ureia (infecção *Helicobacter pylori*), Óxido nítrico (asma), Hidrogénio (má absorção de lactose), Monóxido de carbono (icterícia neonatal), Hidratos de carbono (rejeição de transplante de coração) (Arakawa *et alii.*, 2013; Li *et alii.*, 2012; Minh *et alii.*, 2012).

## Capítulo II – Biomarcadores comuns na respiração

### 1. Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos saturados são produzidos por peroxidação lipídica, a partir de ácidos gordos. O processo desencadeia-se pela exposição a espécies reactivas de oxigénio de hidrocarbonetos insaturados, tais como os ácidos gordos omega 3 e omega 6, que são componentes básicos das membranas celulares. A peroxidação lipídica leva à produção de etano ( $C_2H_6$ ) e pentano ( $C_5H_{12}$ ) bem como alguns aldeídos tal como o malondialdeído ( $C_3H_4O_2$ ) (Miekisch *et alii.*, 2004). Os produtos finais são estáveis e têm baixa solubilidade no sangue. No entanto, misturam-se facilmente com o ar expirado alguns minutos após a sua formação. Assim sendo, o etano e pentano podem ser utilizados para monitorizar o stress oxidativo no corpo (Zhou *et alii.*, 2012).

Testes *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que a produção de etano e pentano está intimamente ligada com a exposição das células a espécies reactivas de oxigénio. Provou-se, ainda, que o aumento da concentração de etano e pentano no ar expirado está relacionada com determinadas condições clínicas, como asma, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), apneia obstrutiva do sono, pneumonia, síndrome do desconforto respiratório agudo entre outras, sendo por isso estas espécies consideradas marcadores de peroxidação lipídica (Miekisch *et alii.*, 2004; Zhou *et alii.*, 2012).

Outros estudos mostraram também que a molécula de pentano pode ser utilizada como marcador de patologias hepáticas (visto ser facilmente metabolizado por enzimas do citocromo P450) e que a sua concentração aumenta em doenças como cancro da mama, rejeição de transplante de coração, enfarte agudo do miocárdio, esquizofrenia e artrite reumatóide (Phillips *et alii.*, 1999; Zhou *et alii.*, 2012). Embora possa ser utilizado nestas patologias como biomarcador, o seu uso deve ter em conta a sua baixa especificidade (Li *et alii.*, 2012).

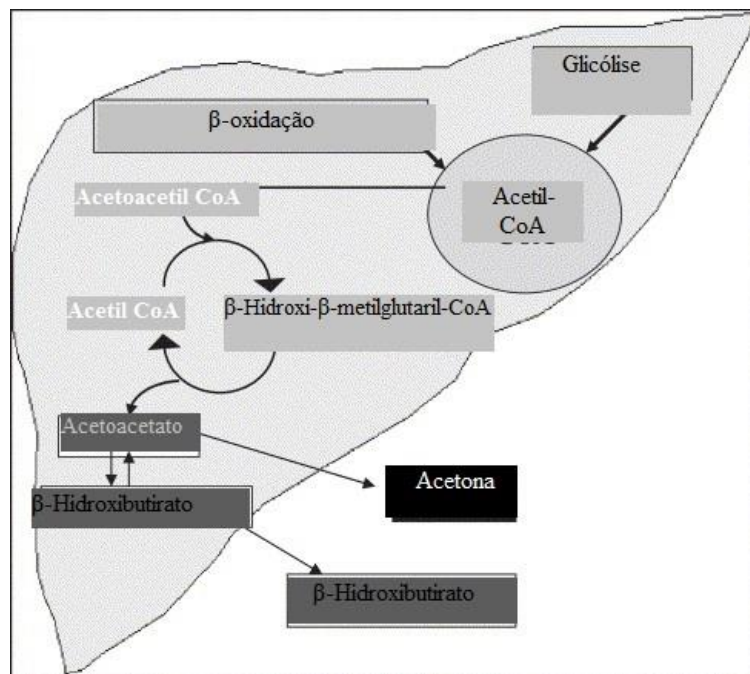
Está provado que um tratamento com vitaminas E e C, bem como uma dieta baixa em gorduras, diminuem significativamente os níveis de etano e pentano na expiração. Por outro lado, os níveis destes compostos estão aumentados em fumadores devido à elevada concentração de hidrocarbonetos no fumo do cigarro e aos danos oxidativos causados pelo tabagismo (Miekisch *et alii.*, 2004).

Alguns estudos clínicos sugerem a possibilidade de usar o isopreno ( $C_5H_8$ ) encontrado na expiração humana como marcador de danos nos pulmões e respectiva reparação (Zhou *et alii.*, 2012). A quantidade de isopreno é significativamente reduzida no caso de pacientes com DPOC, provavelmente devido ao deficiente mecanismo de reparação das células alveolares. A mesma explicação pode justificar a redução do isopreno em situações de falha cardíaca crónica e fibrose cística (Zhou *et alii.*, 2012).

## 2. Acetona

A acetona ( $C_3H_6O$ ) é dos COV's mais abundantes na respiração humana, sendo facilmente detectável em indivíduos saudáveis. A sua concentração encontra-se aumentada em estados patológicos como *Diabetes mellitus* não controlada (Miekisch *et alii.*, 2004).

A produção de acetona no organismo dá-se no fígado, e utiliza o excesso de Acetil-CoA produzido na glicólise e na  $\beta$ -oxidação (Figura 1). Este excesso, sofre descarboxilação dando origem acetoacetato, sendo a acetona formada, já fora do fígado, através do ciclo de Krebs (Miekisch *et alii.*, 2004).



**Figura1:** Formação de acetona no organismo (adaptado de Miekisch *et alii.*, 2004).

### 3. Compostos contendo enxofre

Em indivíduos saudáveis, os níveis de compostos que contêm enxofre no ar exalado são muito baixos. Um aumento dos níveis deste tipo de compostos ocorre em pacientes com transplante de fígado ou está relacionado com insuficiência hepática (Miekisch *et alii.*, 2004).

De facto, os compostos contendo enxofre são responsáveis pelo odor característico na respiração de pacientes cirróticos. As moléculas mais conhecidas são mercaptano etílico, dimetilsulfito ou dimetildisulfeto, que têm origem no incompleto metabolismo da metionina na via de transaminação. Os mercaptanos são facilmente oxidados para os seus respectivos sulfuretos (Miekisch *et alii.*, 2004).

Uma outra molécula com potencial para ser um marcador é o dissulfeto de carbono ( $CS_2$ ). Não encontrado em indivíduos saudáveis, o dissulfeto de carbono é produzido durante o metabolismo da metionina e poderia ser utilizado como indicador sensível para a rejeição de órgãos após um transplante pulmonar (Zhou *et alii.*, 2012).

### 4. Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um dos constituintes da fase inorgânica do ar expirado, tal como o dióxido de carbono ou o monóxido de carbono (Kim *et alii.*, 2012). É uma molécula endógena essencial na regulação do sistema respiratório. O NO é importante no controlo fisiológico da função pulmonar e na fisiopatologia de várias doenças pulmonares tais como a asma, a DPOC, a fibrose cística e outras situações que envolvam inflamação crónica e stress oxidativo (Augusto *et alii.*, 2009). A sua formação tem origem no processo de oxidação e desaminação da L-arginina em citrulina e NO, através de um sistema de três isoenzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS). Duas delas são constitutivas: a neuronal (NOS1 ou nNOS) e endotelial (NOS3 ou eNOS), sendo dependentes de compostos de cálcio ligados ao efeito pró-inflamatório e produzem NO em pequenas quantidades que tem um papel regulador local. A terceira forma é induzida (NOS 2 ou iNOS) (indução por citocinas inflamatórias, endotoxinas e toxinas bacterianas), independente dos compostos de cálcio é responsável pela produção de grandes quantidades de NO (Zhou *et alii.*, 2012).

A actividade da NOS3 é comum em células endoteliais da circulação brônquica e pulmonar regulando assim o fluxo vascular, contribuindo para a produção de NO periférica. Além disso, a NOS3 também pode desempenhar um papel na redução da exsudação de plasma nas vias aéreas e na regulação do batimento ciliar (Zhou *et alii.*, 2012).

No entanto, a concentração de óxido nítrico na expiração não tem como única fonte a sua produção proveniente das isoenzimas NOS. Cerca de 70-90% do NO exalado, é libertado por moléculas contendo grupos tiol (tal como a cisteína e a glutatona) que reagem com o NO formando S-nitrosoproteínas e S-nitrosotiois (Zhou *et alii.*, 2012).

Provou-se existir uma relação estreita entre a concentração de NO e a asma. (Minh *et alii.*, 2012).

A necessidade de existir uma padronização continua a ser um desafio, porque uma série de factores condicionam a concentração de óxido nítrico na respiração humana. Sabe-se que o tabagismo reduz a concentração de NO a curto e longo prazo, um aumento de L-arginina ou a terapêutica com broncodilatadores, tais como  $\beta$ -agonistas, conduzem a um aumento do NO exalado e ocorre uma diminuição dos níveis de NO nos doentes sujeitos a terapêutica oral de corticosteróides e/ou broncoconstritores. (Zhou *et alii.*, 2012).

## **5. Monóxido de carbono**

O monóxido de carbono (CO) pertence à fase inorgânica do ar expirado e as suas principais fontes são a degradação enzimática do heme, libertação não relacionada com o heme (tal como peroxidação lipídica, xenobióticos e bactérias) e exógena (Kim *et alii.*, 2012; Zhou *et alii.*, 2012).

O CO encontra-se maioritariamente ligado às hemoglobinas que se localizam nos eritrócitos circulantes. Uma pequena parte está ligada a outros compostos como à mioglobina que se localiza nos tecidos.

A heme oxigenase (HO) é a enzima responsável pela produção no organismo de aproximadamente 85% do CO exalado a partir da degradação da hemoglobina. A degradação oxidativa de proteínas heme pela HO no fígado, actuando como um

mecanismo de defesa contra o stress oxidativo, leva a que este órgão seja considerado o principal produtor de CO, seguido pelo baço, cérebro e sistema eritropoiético. Os 15% de CO remanescentes provêm da degradação da mioglobina, guanilato ciclase e citocromos (Zhou *et alii.*, 2012).

A actividade da HO é induzida prioritariamente por espécies reactivas de oxigénio. Existem três isoformas de heme oxigenase: HO-1, HO-2 e HO-3. A HO-2 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, enquanto que HO-1 é a única forma indutível e HO-3 é detectada apenas em ratos (Zhou *et alii.*, 2012).

Um aumento da concentração de CO endógeno induzido pela actividade da HO-1 pode ser causado por: stress oxidativo, hipóxia, metais pesados, arsenito de sódio, heme ou seus derivados, várias citocinas e CO exógeno.

Vários estudos revelaram que infecções virais do tracto respiratório superior podem também resultar numa indução da HO-1 levando a um aumento no CO exalado. (Zhou *et alii.*, 2012).

Assim, níveis elevados de monóxido de carbono no ar expirado, podem ser uma indicação precoce de um processo infeccioso agudo, que pode levar à exacerbação da asma e DPOC. (Zhou *et alii.*, 2012).

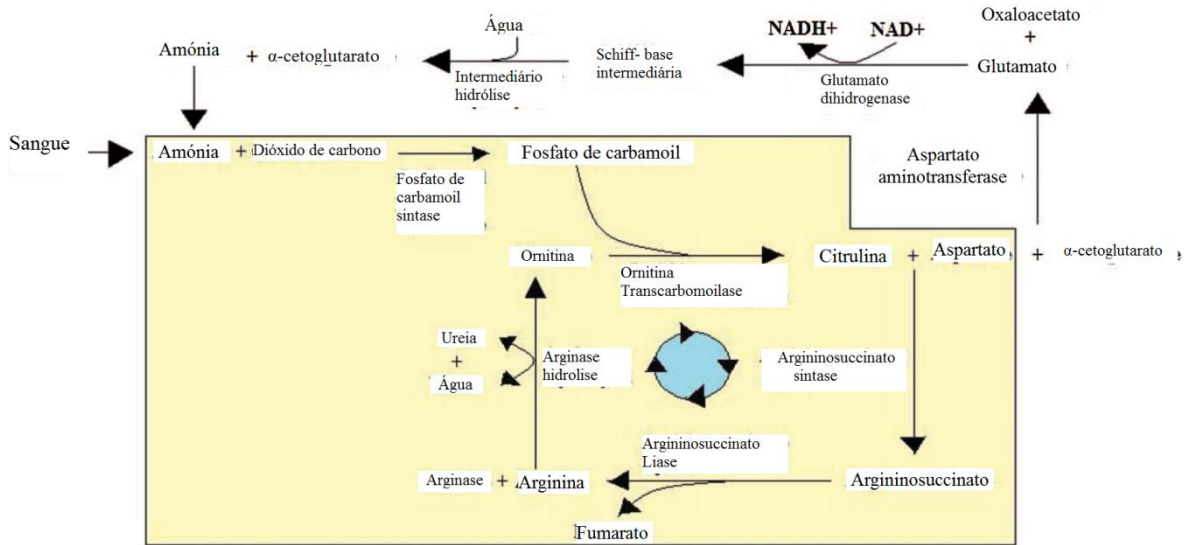
## **6. Compostos azotados**

A determinação de compostos azotados é feita desde 1977, quando algumas aminas foram detectadas e quantificadas numa amostra de respiração humana (Miekisch *et alii.*, 2004). Os compostos azotados provêm da alimentação e são depois convertidos no fígado em compostos menos tóxicos como é o caso da ureia (Hibbard e Killard, 2011). A amónia, que não é convertida a ureia, é excretada na respiração (Natale *et alii.*, 2014). No caso doença hepática, os níveis de amónia aumentam dado que a conversão em ureia se torna ineficaz (Miekisch *et alii.*, 2004).

Tal como indicado na Figura 2, a amónia é absorvida no fígado e vai reagir com o dióxido de carbono originando fosfato de carbamoil. É o fosfato de carbamoil que entra no ciclo da ureia e ao reagir com a ornitina origina citrulina. Os aminoácidos são introduzidos no ciclo

através da sua transaminação por aspartato, que se combina com a citrulina para formar argininosuccinato. O argininosuccinato é então dividido em fumarato e arginina que, por sua vez, reage com arginase e água para a produção de ureia e ornitina, iniciando-se um novo ciclo (Hibbard e Killard, 2011).

O aspartato por um processo secundário consegue controlar a amónia disponível para as primeiras reacções desta com o dióxido de carbono (Hibbard e Killard, 2011).



**Figura 2:** Ciclo da ureia (adaptado de Hibbard e Killard, 2011).

O odor característico da respiração de pacientes com urémia está associado aos níveis elevados de dimetilamina e trimetilamina (Natale *et alii.*, 2014). O aumento da concentração de amónia está também associado a insuficiência renal ou a infecção por *Helicobacter pylori* (Miekisch *et alii.*, 2004).

## 7. Peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) é considerado um potencial biomarcador da inflamação das vias aéreas e do stress oxidativo. Vários são os estudos que associam variações nos níveis de peróxido de hidrogénio com doenças pulmonares (Zhou *et alii.*, 2012).

A produção de  $H_2O_2$ , em indivíduos saudáveis, resulta da redução do oxigénio proveniente da cadeia transportadora de electrões. Esta transferência de electrões dá-se de modo espontâneo ou é catalisada por enzimas numa reacção do anião superóxido com protões de água (Zhou *et alii.*, 2012).

## Capítulo III – Principais patologias passíveis de detecção por testes respiratórios

### 1. Doenças pulmonares

Nos últimos anos a análise ao ar exalado surgiu como nova fronteira em testes médicos para o diagnóstico e monitorização de doenças pulmonares e tem tido uma rápida evolução. Níveis elevados de hidrocarbonetos (por exemplo, pentano e etano) e NO exalado foram detectados em amostras de respiração de pacientes com asma, DPOC, pneumonia e fibrose cística.

#### i. Asma

A asma é uma doença inflamatória crónica das vias aéreas que se caracteriza pela hiperresponsividade brônquica e obstrução reversível das vias aéreas. Em indivíduos susceptíveis, origina episódios recorrentes de pieira, dispneia, aperto torácico e tosse, particularmente nocturna ou no início da manhã. A maioria dos pacientes sofre de formas leves a moderadas podendo facilmente controlar os sintomas com a toma de corticosteróides (Portal da Saúde, 2014; Zhou *et alii.*, 2012). A asma afecta perto de 150 milhões de pessoas em todo o mundo. Em Portugal, os números rondam as 600 mil pessoas afectadas por esta patologia (Portal da Saúde, 2014).

As concentrações de NO encontradas no ar expirado podem ser utilizadas para a identificação de indivíduos com asma extrínseca (atópica ou alérgica) e intrínseca. Em indivíduos não-fumadores, um aumento da concentração de NO está associada a qualquer tipo de asma sendo que no caso da asma alérgica a sua concentração está relacionada com o tempo de exposição ao agente alergénico (Zhou *et alii.*, 2012). Conforme referido anteriormente o NO pode ser sintetizado por 3 isoformas da NO sintetase. Os níveis elevados de NO em pacientes com asma são atribuídos à redução das vias aéreas devido à activação da NOS2 causada por danos epiteliais das vias aéreas e/ou inflamação. Este aumento é útil no rastreio da asma pois permite diferenciá-la de outras causas de tosse crónica (Kim *et alii.*, 2012).

Numa outra linha, alguns estudos revelaram que a monitorização da eficácia do tratamento anti-inflamatório da asma em resposta à inalação de corticosteróides, pode ser comprovada pela diminuição dos níveis de óxido nítrico (Zhou *et alii.*, 2012).

Além do NO, têm sido desenvolvidos estudos que garantem uma potência melhorada em marcadores como o etano e o pentano. Esses mesmos estudos mostraram que os níveis de pentano numa crise aguda de asma estão aumentados e restabelecem a níveis normais quando tende para a recuperação (Zhou *et alii.*, 2012).

## **ii. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)**

A DPOC é uma doença inflamatória caracterizada pela falta de ar e pela obstrução das vias aéreas (Kim *et alii.*, 2012). Trata-se de uma doença geralmente progressiva e com reduzida reversibilidade. A sua origem está normalmente associada a uma resposta inflamatória anómala dos pulmões à inalação de partículas ou gases nocivos. Os sintomas verificados podem ser variados e estão relacionados com a evolução da doença. Destacam-se a hipersecreção de muco, a disfunção ciliar, a limitação do débito aéreo, a hiperinsuflação pulmonar, a ocorrência de anomalias das trocas gasosas e a hipertensão pulmonar. Estas alterações desenvolvem-se em função do processo de evolução da doença (Portal da Saúde, 2014).

Na DPOC, os níveis de NO registados no ar expirado estão interligados com a gravidade da doença. Pacientes com DPOC estável (portadores de doença ligeira ou moderada) apresentam concentrações de NO mais baixos, enquanto que pacientes com DPOC instável tendem a apresentar níveis mais elevados. Deste modo pode dizer-se que o NO pode ser utilizado como marcador útil para a monitorização clínica nestes pacientes (Kim *et alii.*, 2012; Zhou *et alii.*, 2012).

Apesar de alguns estudos relatarem valores reduzidos ou mesmo inalterados de NO em pacientes com DPOC estável, outros reportam níveis elevados de NO em pacientes na mesma situação. Esta contradição pode ser explicada pelos superóxidos produzidos em situações de stress oxidativo, que reagem com o NO formando peroxinitrito. Este peroxinitrito na sua forma instável pode assumir a forma de nitrato que vai aparecer no ar expirado de pacientes com DPOC (Zhou *et alii.*, 2012).

Conforme anteriormente referido, os hidrocarbonetos etano e pentano são biomarcadores de peroxidação lipídica (Miekisch *et alii.*, 2004) tendo ambos sido detectados no ar exalado por pacientes com DPOC. Os seus níveis encontram-se aumentados em pacientes com DPOC, sendo os níveis de etano elevados correlacionáveis com a gravidade da doença (Zhou *et alii.*, 2012).

## 2. Diabetes

A diabetes, segundo dados de 2011 da Organização Mundial de Saúde (OMS), atinge cerca de 346 milhões de pessoas em todo o Mundo. É uma doença metabólica que se caracteriza pelo aumento da concentração de glucose no sangue (Silva, 2012).

Um conjunto de reacções químicas assegura o processo contínuo de decomposição e renovação do metabolismo, ajudando a manter a homeostase do organismo. Alguns distúrbios metabólicos alteram essas reacções químicas levando à modificação das concentrações de compostos orgânicos voláteis ou a produção de novos compostos orgânicos voláteis, podendo assim ser possível a sua identificação por via respiratória (Haick *et alii.*, 2013). É o caso da diabetes que dá origem a proeminentes alterações dado que a insuficiência de insulina causa uma profunda alteração do metabolismo que conduz a um aumento da concentração em glucose ou uma intensa lipólise. Nestes pacientes há um aumento da concentração em acetona no sangue e subsequente passagem para o ar alveolar. Assim, o nível de concentração em acetona no ar exalado pode ser correlacionado indirectamente com os produtos metabólicos da diabetes.

## 3. Cancro

Segundo dados da OMS, o cancro é considerado uma das principais causas de morte a nível mundial com cerca de 12 milhões de novos casos a cada ano que passa (Haick *et alii.*, 2013). O desenvolvimento de cancro está fortemente associado ao stress oxidativo e indução das enzimas do citocromo P450. O stress oxidativo resulta do desequilíbrio entre a formação e desativação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e radicais livres. As ROS podem ser formadas na mitocôndria ou então ter origem exógena, por exemplo, fumo de cigarro, poluição ou radiação. Durante o stress oxidativo, os radicais livres e ROS saem da mitocôndria dando origem a alcanos voláteis. Além disso, enzimas do citocromo P450 que catalisam a oxidação de substâncias químicas orgânicas podem ser reguladas por moléculas de ROS no tecido humano (Haick *et alii.*, 2013).

No caso do cancro de mama, há um aumento do stress oxidativo e uma indução das enzimas do citocromo P450, levando à peroxidação lipídica dos ácidos gordos

polinsaturados das membranas celulares o que resulta num aumento da formação de alcanos voláteis na respiração (Haick *et alii.*, 2013).

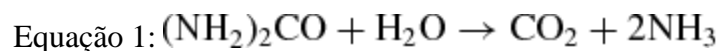
#### 4. *Helicobacter pylori*

A infecção por *Helicobacter pylori* tem sido uma das doenças gastrointestinais mais estudadas, sendo o teste respiratório à ureia amplamente aplicado para o seu diagnóstico clínico. A *Helicobacter pylori* é um agente patogénico que coloniza a mucosa gástrica humana e está associada à úlcera gástrica, úlcera duodenal, gastrite e cancro gástrico (Kim *et alii.*, 2012; Elfvin *et alii.*, 2014).

Apresenta uma taxa de infecção de 25%, nos países ocidentais, e vai aumentando proporcionalmente à idade. Uma regra de ouro diz que a prevalência da infecção pelo *H. pylori* é aproximadamente idêntica à idade (Amann *et alii.*, 2014).

Um dos problemas na erradicação da bacterica recorrendo a medicação está na resistência a antibióticos como a claritromicina. Durante a última década, a taxa de sucesso caiu de mais de 90% para aproximadamente 80% (Amann *et alii.*, 2014). Estudos recentes mostraram que a *H. pylori* interfere com as ROS, tal como o anião superóxido ( $O_2^-$ ), que está envolvido no processo de eliminação de microorganismos invasores. Numa situação considerada normal, os neutrófilos fagocitam as bactérias invasoras dando origem a um aumento das espécies reactivas. No caso da infecção por *H. pylori*, esta persiste na mucosa gástrica sugerindo que interfere com o sistema de radicais livres (Elfvin *et alii.*, 2014).

Actualmente, um dos métodos de diagnóstico é o teste de respiração de ureia e envolve a medição da actividade da urease do organismo através de ingestão de  $^{13}C$ -ureia ou  $^{14}C$ -ureia. O teste consiste no paciente ingerir uma cápsula contendo a ureia marcada com  $^{13}C$  ou  $^{14}C$ . Uma vez no estômago, se a bactéria estiver presente esta vai aumentar os níveis de urease, metabolizando a ureia, e dando origem a dióxido de carbono marcado ( $^{13}CO_2$  ou  $^{14}CO_2$ ) como mostra a equação a seguir apresentada (Equação 1)



Os compostos marcados são absorvidos pelo sangue e difundem-se até aos pulmões onde vão ser excretados na expiração permitindo ser detectados (Costanzo, 2010; Hibbard e Killard, 2011).

Trata-se de um teste não invasivo e que pode ser feito num curto espaço de tempo (apenas 30 minutos) sendo por isso uma mais valia na monitorização desta infecção (Amann et alii., 2014).

## 5. Cirrose

A cirrose, na maioria das vezes, provem de uma situação de doença hepática crónica que trás ao doente vários tipos de complicações desde o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular a hipertensão devido ao desenvolvimento de fibrose no fígado conduzindo em última instância à perda de função devido ao desaparecimento da massa funcional do fígado e de desvio portossistémico caracterizada por icterícia e encefalopatia hepática (Dadamio *et alii.*, 2012).

A biópsia hepática foi durante muito tempo o principal método de diagnóstico de cirrose, no entanto apresenta-se como um teste altamente invasivo incapaz de avaliar a capacidade funcional do fígado não sendo o ideal para uma monitorização frequente. Para contrariar estes factos, desenvolveu-se uma nova versão de testes que utilizam os COV's para a detecção e monitorização da cirrose. Os primeiros estudos feitos na área identificaram metilmercaptano e sulfureto de dimetilo no ar expirado de pacientes cirróticos em coma hepático (Dadamio *et alii.*, 2012).

Para a detecção da cirrose utilizou-se o teste de respiração usando  $^{13}\text{C}$ -galactose. O teste consiste na administração de uma dose de galactose não marcada e de  $^{13}\text{C}$ -galactose. Amostras são colhidas antes da administração e após a ingestão em intervalos de 30 minutos até decorridas 4 horas. Demonstrou-se ser possível a distinção das várias classes de cirrose (Francesco *et alii.*, 2004).

No caso da cirrose, quando se fala de níveis de COV's alterados, esta variação faz-se sentir a nível da maioria dos compostos. Este facto é explicado tendo em conta que o fígado é o principal responsável pela metabolização de produtos tóxicos para o organismo. Se a

função hepática se encontra comprometida, a concentração de metabolitos na circulação sistémica vai aumentar (Dadamio *et alii.*, 2012).

## **6. Má absorção da lactose**

A má absorção da lactose é uma realidade comum na população mundial contando com cerca de 75% da população afectada (Alexandre *et alii.*, 2013). Esta condição caracteriza-se pela incapacidade dos indivíduos em absorver ou digerir a lactose devido à falta de enzimas intestinais. Esta ausência vai-se manifestar numa permanência desta substância no lúmen intestinal levando a retenção de fluídos que causam diarreia e distensão abdominal. Cerca de 80% das pessoas com má digestão da lactose também sofrem de má absorção de frutose (Amann *et alii.*, 2003).

As bactérias do intestino metabolizam os hidratos de carbono para espécies de baixo peso molecular, tais como o dióxido de carbono, ácidos gordos de cadeia curta, ésteres, álcoois e hidrogénio, que são eliminados na expiração do ar. Isto permite um diagnóstico rotineiro e não invasivo, medindo os níveis de hidrogénio no ar após a ingestão de um açúcar com suspeita de má absorção (Amann *et alii.*, 2003). O hidrogénio forma-se a partir da fermentação de hidratos de carbono não digeridos (Alexandre *et alii.*, 2013).

Um diagnóstico de má absorção é considerado quando a concentração de hidrogénio se encontra 20 ppm acima da linha de base (Alexandre *et alii.*, 2013). Este nível é obtido após uma latência de cerca de 60-90 min (Amann *et alii.*, 2003).

## **Capítulo IV – Procedimento para a análise de biomarcadores em amostras de ar exalado**

Tal como descrito anteriormente há várias espécies que podem ser usadas como biomarcadores podendo a sua determinação ser efectuada em diversos contextos. No entanto, qualquer processo analítico tem forçosamente que se iniciar com a recolha da amostra. Seguidamente, e dependendo da espécie, utilizam-se equipamentos diferentes para efectuar a sua análise.

### **1. Amostragem – recolha e pré-concentração**

O primeiro passo para a obtenção de resultados de qualidade numa qualquer análise, é a correcta recolha de uma amostra. A variabilidade dos resultados depende em muito da ausência de procedimentos padrão para a colecta da amostra da respiração, técnica de pré-concentração e posterior método de análise (Natale *et alii.*, 2014).

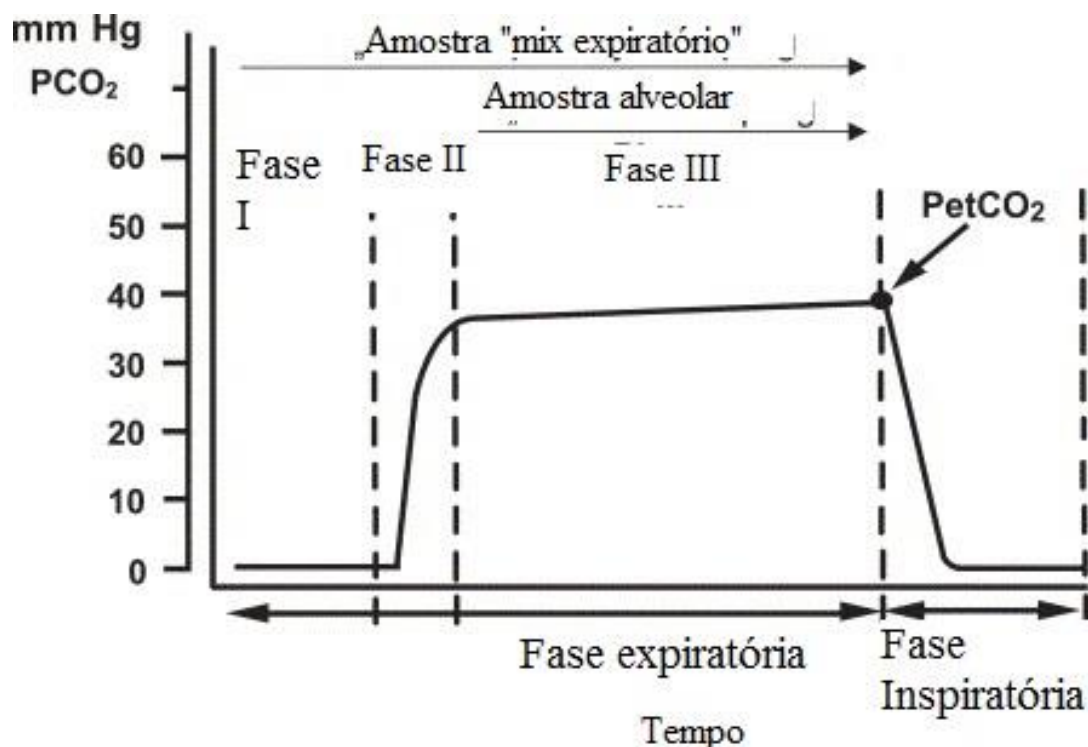
A recolha das amostras pode ser feita em modo *on-line* ou *off-line*. O modo *on-line* caracteriza-se por ser um método directo onde a recolha é feita directamente para o sistema da análise, havendo uma perda reduzida de compostos. No modo *off-line* a recolha é feita para um recipiente (saco específico, composto de retenção ou caníster). Este modo é utilizado quando não é possível proceder a uma análise imediata da amostra e/ou quando amostras que necessitam de um pré-tratamento (Ferreira, 2011). A utilização de recipientes de recolha tem ser efectuada de forma conveniente já que pode expor o ar expirado a uma série de condições que podem interferir com a integridade da amostra. Os sacos de colheita são constituídos por filmes poliméricos que podem libertar compostos que reagem quimicamente com os constituintes da amostra. Estas reacções podem levar à formação de substâncias que vão alterar a amostra em estudo. No entanto, este recurso permite estender as análises a um muito maior número de pessoas (que deste modo não têm de se deslocar a locais mais centralizados onde se encontram os equipamentos necessários para a determinação) com uma consequente redução do seu custo unitário.

Algumas características devem ser tidas em conta quando se escolhe o recipiente da amostra. Este deve ser de fácil manuseamento e transporte, ter capacidade de

armazenamento das substâncias de interesse, por um período longo (ou seja, deve garantir a estabilidade dos compostos desde a recolha até ao momento da análise) (Ferreira, 2011).

Existem no mercado vários tipos de sacos, sendo os Tedlar<sup>®</sup>, os mais utilizados e Flex Film a mais recente aposta (Ferreira, 2011).

Relativamente ao método de colheita, podem distinguir-se dois tipos (Figura 3):



**Figura 3:** Respiração dividida em várias fases tendo em conta a concentração de  $CO_2$  (adaptado de Miekisch *et alii.*, 2004) No gráfico pode observar-se as várias fases da respiração. Na Fase I inicia-se a expiração onde a concentração de  $CO_2$  é nula. Segue-se a Fase II onde o  $CO_2$  aumenta significativamente relativamente à fase anterior. A fase III onde a concentração de  $CO_2$  se mantém mais ou menos constante ao longo do tempo. É também no final desta fase que se atinge a concentração máxima de  $CO_2$ , possível num ciclo respiratório. Após esta terceira fase inicia-se a inspiração, marcando o início de um novo ciclo.

**Colheita da respiração total:** é a recolha mais directa de amostra, não necessitando de equipamentos adicionais. No entanto tem como desvantagens associadas, o efeito diluição e contaminação devido ao ar existente no espaço entre a boca e os bronquíolos terminais (“*dead-space air*”). O ar exalado recolhido corresponde ao ar total das três fases (Fase I, Fase II e Fase III) (Figura 3) (Natale *et alii.*, 2014).

**Colheita da respiração alveolar:** este tipo de colheita pressupõe a separação do ar alveolar do restante ar (Fase III), possibilitando a obtenção de concentrações aumentadas

de COV's (Natale *et alii.*, 2014). O ar alveolar por não se encontrar diluído consegue atingir concentrações de COV's três vezes superiores às concentrações detectadas na respiração total (Ferreira, 2011). Para conseguir essa separação estão disponíveis dois métodos:

- Controlo do tempo da colheita da respiração - é o método mais simples mas ao mesmo tempo menos eficaz; é efectuada a recolha automática da amostra após um tempo pré-determinado depois do início da expiração. O grande inconveniente desta técnica é a variabilidade devido às diferenças de volumes individuais do “dead-space air” e às diferenças individuais no processo da respiração.
- Controlo da amostra alveolar - é um método realmente eficaz e consiste no princípio de que a concentração de CO<sub>2</sub> expirado vai aumentando à medida que a respiração decorre atingindo-se a concentração máxima no momento que antecede um novo ciclo respiratório (tal como se pode observar na Figura 3). Assim sendo a colheita deve ser realizada no momento exacto que antecede um novo ciclo respiratório (Natale *et alii.*, 2014).

Na amostragem há, ainda, a considerar se a recolha é feita numa única respiração ou se provém de vários ciclos de respiração.

Outros factores a ter em conta são a presença de contaminantes e as condições de armazenamento. Por exemplo, os COV's provenientes do ar inalado existente no meio ambiente, podem dar uma informação errada quanto à sua concentração no corpo humano. Para contrariar este tipo de contaminação pode:

- respirar-se ar puro por um tempo pré-determinado, e só depois efectuar a recolha da amostra nas medições necessárias
- efectuar-se a subtracção do “sinal de fundo” do ar do sinal da respiração.

Apesar de teoricamente a primeira alternativa parecer simples e de fácil execução, torna-se ineficaz por ser impossível eliminar totalmente os COV's inalados e também porque muitos compostos exógenos demoram dias até serem eliminados do corpo humano. Assim, a correcção para a contaminação externa passa frequentemente por efectuar a colecta e

análise de duas amostras de ar: uma de respiração e outra do ar ambiente (Natale *et alii.*, 2014).

Já no que diz respeito às condições de armazenamento devem ser tidos todos os cuidados para evitar possíveis fontes de contaminação.

Devido à reduzida concentração das espécies em análise nas amostras ar expirado, as técnicas de pré-concentração são de grande importância para o processo de análise. Há várias técnicas que se podem adoptar: “vasilha” metálica, extracção em fase sólida em vários solventes e microextracção em fase sólida em fibras revestidas de sílica fundida (Francesco *et alii.*, 2004; Miekisch *et alii.*, 2004).

#### **i. “Vasilha” metálica**

O método consiste em recolher a amostra de ar expirado para um recipiente de aço inoxidável revestido com sílica fundida. É possível remover a água e o dióxido de carbono sem perder os COV's existentes (Francesco *et alii.*, 2004).

#### **ii. Extracção em fase sólida**

Os COV's podem ser isolados dos restantes constituintes de uma amostra recorrendo a um solvente adequado. Os analitos sofrem depois eluição por dessorção térmica o que vai permitir uma maior concentração das substâncias de interesse (Francesco *et alii.*, 2004).

As principais vantagens deste método passam por uma boa estabilidade e limites de detecção baixos (Amann *et alii.*, 2014).

Esta técnica foi aplicada em moléculas como isopreno, etano, pentano, verificando-se uma sensibilidade melhorada (Francesco *et alii.*, 2004).

### **iii. Microextração em fase sólida**

Este método de amostragem inicia-se pela colheita da amostra, em sacos de plástico Tedlar<sup>®</sup>. Depois da colheita, os sacos são aquecidos a 40 °C, onde ocorre a microextração com fibras de carboxen-polidimetilsiloxano. As fibras são utilizadas para inserir no método de análise, por exemplo, espectrometria de massa associada a cromatografia gasosa (Francesco *et alii*, 2004).

Foi também utilizado um método que recorre a um tubo de vidro em que as extremidades são fechadas onde é inserida a fibra. Este sistema tende a ser menos complexo que o anteriormente descrito, possibilitando a sua utilização em testes de rotina (Francesco *et alii*, 2004).

As principais vantagens deste método prendem-se com o facto de ser um aparelho pequeno, de fácil de manuseamento, que necessita de pequenos volumes de amostra sendo o processamento da amostra automatizado (Amann *et alii*, 2014).

## **2. Métodos analíticos**

Para a análise da expiração humana têm sido desenvolvidas várias técnicas experimentais, algumas das quais recorrendo à associação de equipamentos aproveitando as sinergias de cada um. A tabela a seguir apresentada (Tabela 1) faz um breve resumo dos métodos existentes e das suas características gerais. Na tabela podem-se comparar os vários métodos analíticos através do modo de operação, marcador utilizado bem como a sua origem e a gama de detecção de cada técnica que pode variar de ppt<sub>v</sub> (partes por trilião de volume) a ppb<sub>v</sub> (partes por bilião de volume).

**Tabela 1:** Métodos analíticos para análise de ar expirado (adaptado de Kim *et alii.*, 2012).

Método analítico	Modo de operação	Marcador	Origem do marcador	Gama de detecção
GC-MS <sup>a</sup>	Pré-concentração	Hidrocarbonetos; Aldeídos; Sulfetos	Peroxidação lipídica; Bactérias	ppt <sub>v</sub> ppb <sub>v</sub>
SIFT-MS <sup>b</sup>	Directa	Amónia; Etanol	Metabolismo de proteínas; Intoxicação e abuso	ppb <sub>v</sub>
Laser	Directa	Etano; CO	Peroxidação lipídica	ppb <sub>v</sub>
Mobilidade de iões	Pré-coluna de multi-capilar	Amoníaco; Acetona; Isopreno	Metabolismo das proteínas; Metabolismo de dextrose; Biossíntese de colesterol	ppb <sub>v</sub>
PTR-MS <sup>c</sup>	Directa	Isopreno	Biossíntese de colesterol; Peroxidação lipídica	ppt <sub>v</sub>
	Tempo real	Compostos aromáticos	Peroxidação lipídica	ppt <sub>v</sub>
Sensor	Directa	Não	Síntese do óxido nítrico	ppt <sub>v</sub> ppb <sub>v</sub>
Conjunto de sensores	Pré-concentração	Diferentes COV's	Peroxidação lipídica	ppb <sub>v</sub>

<sup>a</sup> GC-MS - cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa

<sup>b</sup> SIFT-MS - espectrometria de massa associada a um tubo de deriva de selecção de iões

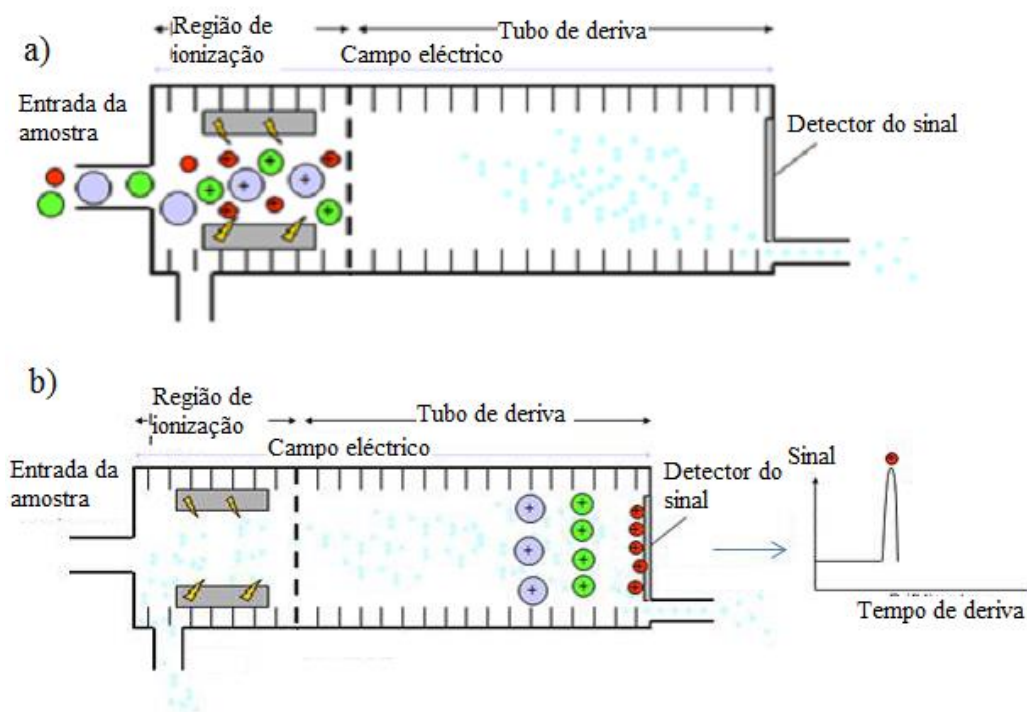
<sup>c</sup> PTR-MS - espectrometria de massa associada à reacção de transferência de protões

### i. Espectrometria de mobilidade iónica (IMS)

A IMS é um método analítico selectivo em que os iões, provenientes de moléculas de uma amostra gasosa, são separados e identificados de acordo com a sua relação massa/carga quando viajam num campo eléctrico uniforme na direcção oposta a um fluxo gás transportador neutro (Biasioli *et alii.*, 2011). O processo decorre a pressão ambiente e tem

início com a ionização do gás inerte por uma fonte de ionização. Uma série de reacções subsquentes leva à formação de iões reactivos que vão interagir com as moléculas da amostra formando iões-produto, que são inseridos num campo eléctrico estável que os faz viajar ao longo do tubo de deriva com velocidades diferentes de acordo com a sua massa e estrutura única. Ou seja, os iões-produto são separados de acordo com a sua mobilidade e no final do seu percurso são recolhidos pelo detector (Figura 4). (Kim *et alii.*, 2012).

O sinal recolhido está dependente do tempo que os iões demoram até chegar ao detector. O tempo decorrido é inversamente proporcional à mobilidade iónica do composto (Ferreira, 2011).



**Figura 4:** Representação esquemática da espectrometria de mobilidade iónica (IMS) (adaptado de Ferreira, 2011). a) a fase de ionização ocorrida na região de ionização; b) os iões-produto são detectados no detector segundo a sua mobilidade permitindo por meios gráficos a sua distinção.

## ii. Cromatografia gasosa (GC)

O método mais comum para a análise de compostos a nível vestigial na respiração humana tem sido a cromatografia gasosa associada a um detector de ionização em chama (GC-

FID), a sua combinação com um espectrómetro de massa (GC-MS) ou espectrometria de mobilidade iónica (GC-IMS) (Kim *et alii.*, 2012).

O princípio do método baseia-se na injeção da amostra numa coluna cromatográfica. A amostra é depois transportada ao longo da coluna por um fluxo de um gás inerte. É na coluna que ocorre o processo de separação dos vários compostos constituintes da amostra, separação esta que é feita de acordo com a afinidade que têm com o material que constitui o revestimento líquido da coluna e os pontos de ebulição dos compostos (Hibbard e Killard, 2011; Kim *et alii.*, 2012). Conforme referido anteriormente vários sistemas de detecção têm sido interligados ao GC constituindo uma mais valia na quantificação de compostos na respiração humana.

Entre as principais desvantagens apontadas à GC, destacam-se os factos de não ser possível uma quantificação em tempo real e de as colunas cromatográficas poderem ser danificadas pela humidade presente no ar expirado, pelo que se torna necessário recorrer um passo adicional para remover qualquer vapor de água (Hibbard e Killard, 2011).

#### ii.a. Cromatografia gasosa associada a detecção de ionização em chama (GC-FID)

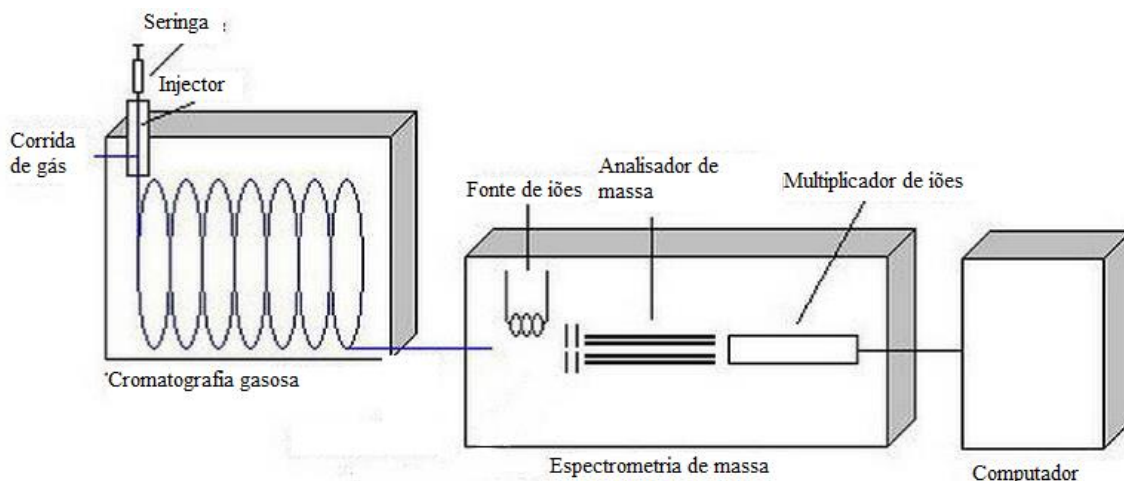
A cromatografia associada à detecção de ionização em chama é o método analítico mais utilizado nas análises a ar exalado já que é o detector comum para a determinação de compostos orgânicos. Em geral, apresenta uma sensibilidade bastante elevada, uma ampla faixa de resposta linear e um reduzido ruído de fundo. Os compostos orgânicos são queimados em chama, e dão origem a iões e electrões que conduzem a uma variação do potencial eléctrico. É esse potencial eléctrico que vai permitir a detecção quantitativa ou qualitativa dos compostos (Kim *et alii.*, 2012).

#### ii.b. Cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS)

A espectrometria de massa é uma técnica analítica em que átomos e/ou moléculas de uma amostra são ionizados e/ou fragmentados, sendo os iões produzidos separados de acordo com a sua relação massa/carga ( $m/z$ ). O padrão de fragmentação obtido permite a identificação da espécie e a quantificação dos fragmentos, o doseamento do composto alvo.

A associação do GC ao MS constitui uma enorme mais valia para a separação e identificação de COV's em matrizes complexas como é o caso do ar expirado. Inicialmente os compostos são separados na coluna cromatográfica, chegando ao detector MS

isoladamente, já que possuem tempos de retenção diferentes (Figura 5). Assim, após a separação dos vários constituintes da amostra, a sua análise qualitativa e quantitativa é feita por espectrometria de massa, tendo como base a relação e abundância dos fragmentos  $m/z$  obtidos (Arakawa *et alii.*, 2013; Bagjagbo, 2012).

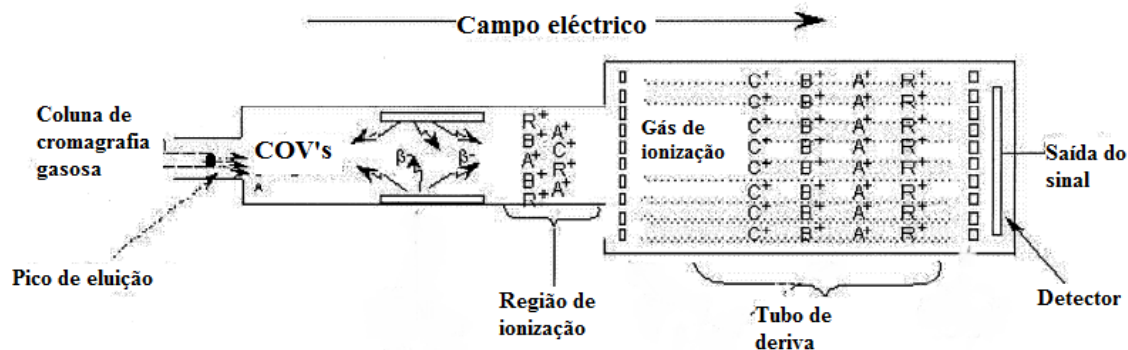


**Figura 5:** Cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (adaptado de Ferreira, 2011)

Devido às suas vantagens, a técnica de GC-MS tem sido muito utilizada na análise de COV's na respiração humana (Kim *et alii.*, 2012). Como a maioria dos COV's existentes no ar expirado se encontra em concentrações muito reduzida (na ordem do ppt), é frequentemente necessário recorrer à pré-concentração da amostra (Bagjagbo, 2012).

#### ii.c. Cromatografia gasosa associada à espectrometria de mobilidade iónica (GC-IMS)

Conforme mencionado anteriormente, o espectrómetro de mobilidade iónica é um detector capaz de identificar e quantificar moléculas ionizadas em misturas gasosas. Os compostos são separados de acordo com a sua mobilidade à medida que viajam numa fase móvel gasosa à pressão atmosférica sob o efeito de um campo eléctrico (Figura 6). O uso desta técnica hifenada permite rentabilizar as potencialidades dos dois métodos, tendo sido utilizada na análise de etanol e acetona no hálito humano. (Kim *et alii.*, 2012).



**Figura 6:** Representação esquemática de um sistema cromatografia gasosa associada a espectrometria de mobilidade iónica (adaptado de Palmer e Limero, 2001)

### iii. Espectrometria de massa associada à reacção de transferência de prótons (PTR-MS)

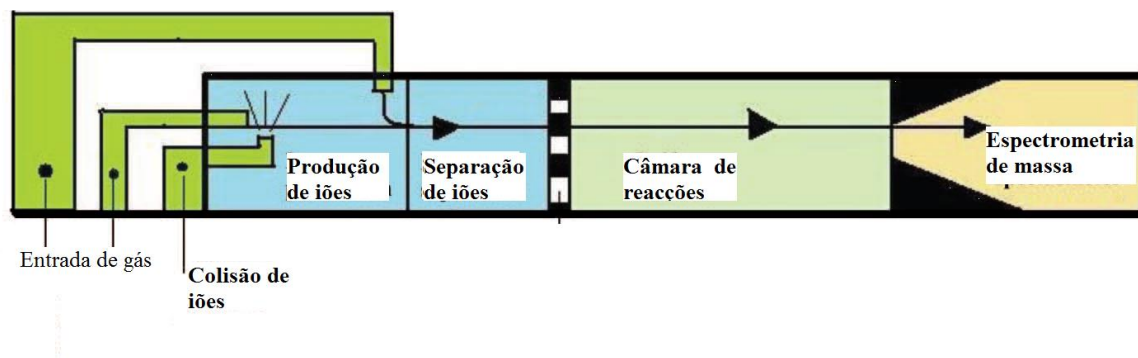
Esta técnica permite uma análise de mistura de gases sem a necessidade de recorrer a pré-concentração ou a processos de separação, sendo assim vantajosa para mistura de gases como é o caso do ar expirado (Kim *et alii.*, 2012; Amann *et alii.*, 2003). A sua medição é feita tendo em conta a razão  $m/z$ , permitindo uma elevada selectividade e sensibilidade (Amann *et alii.*, 2003). Elementos com elevada abundância no ar expirado como  $N_2$ ,  $CO_2$  ou  $H_2O$  não interferem na análise (Kim *et alii.*, 2012).

Os principais constituintes de um aparelho de medição PTR-MS são uma fonte de iões, uma câmara de reacções e um analisador de massa (Figura 7). A ionização química é induzida por reacções de transferência de prótons com o  $H_3O^+$  como ião reagente primário. (Kim *et alii.*, 2012). Como a maioria dos COV's tem grande afinidade para os prótons, a sua ionização química ocorre prontamente (Equação 2). Os iões formados, são posteriormente detectados e quantificados por espectrometria de massa, ou seja, tendo em conta a sua razão massa/carga. A quantidade de iões formados na câmara de reacção está relacionada com a concentração de compostos orgânicos voláteis existentes na amostra gasosa de respiração (Bagjagbo, 2012).



Esta metodologia é de grande vantagem na análise de amostras complexas, como é o caso do ar expirado. Não é necessário efectuar a pré-concentração e/ou separação da amostra antes da análise, tendo esta técnica sido utilizada na determinação de cerca de 30 COV's

com concentrações ao nível do ppt (Kim *et alii.*, 2012). A técnica foi também aplicada na investigação da emissão de COV's intra e inter-pacientes bem como na sua monitorização durante o sono (Kim *et alii.*, 2012). O procedimento é adequado para a observação não invasiva e *online* de processos metabólicos que, anteriormente, não era possível. A limitação apontada à técnica reside no facto de a caracterização das substâncias ser efectuada apenas pela sua razão  $m/z$  o que limita a sua identificação química. Esta restrição pode, no entanto, ser ultrapassada pela associação a uma coluna GC, de modo a que uma mistura com diferentes COV's possa ser separada antes de chegar ao sistema PTR-MS (Kim *et alii.*, 2012).



**Figura 7:** Espectrometria de massa associada a reacção de transferência de prótons (adaptado de Hibbard e Killard, 2011).

#### iv. Espectrometria de massa associada a um tubo de deriva de selecção de iões (SIFT-MS)

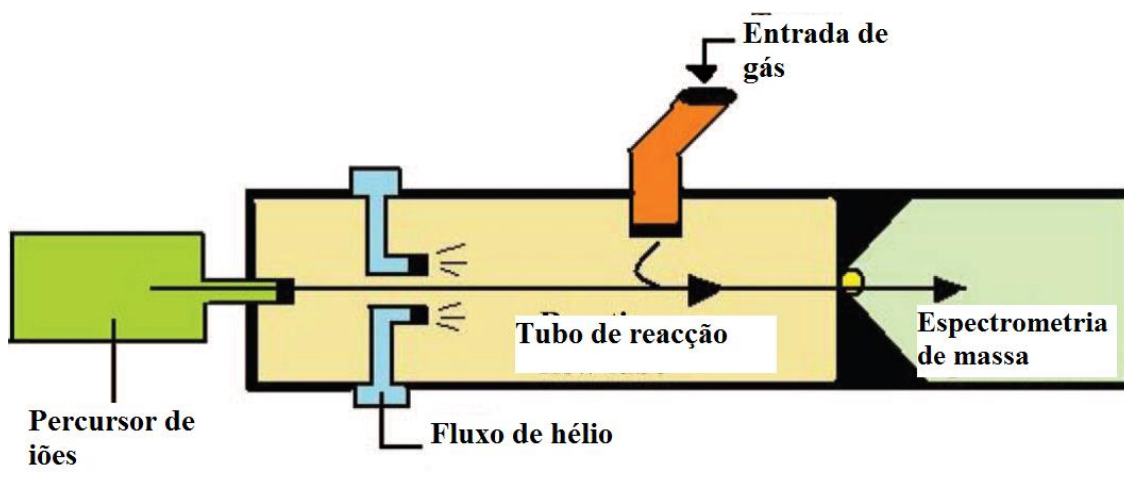
A técnica SIFT-MS é um espectrómetro de massa de ionização química que utiliza iões precursores para ionizar gases numa amostra gasosa. É uma técnica analítica relativamente recente, que está na origem da metodologia PTR-MS atrás referida. Após injeção da amostra no equipamento, são produzidos iões por uma descarga eléctrica e passam através de um quadropolo onde são separados de acordo com a sua razão  $m/z$ . Esta separação funciona como um filtro que permite que apenas os iões com uma  $m/z$  específica passem para a parte seguinte do instrumento, o tubo de deriva. Os iões que entram no tubo de deriva são misturados com um fluxo de gás inerte (hélio) e os iões positivos precursores -  $H_3O^+$ ,  $NO^+$  ou  $O_2^+$  - reagem com as moléculas da amostra (Equações 3 e 4), originando

iões-produto, que são transportados ao longo de um segundo quadrupolo (inserido no espectrómetro de massa) no final do instrumento. Os iões-produto são detectados pelo espectrómetro de massa (Figura 8) (Kim *et alii.*, 2012; Bagjagbo, 2012).



À semelhança do que acontece com a técnica PTR-MS, no SIFT-MS a fragmentação dos iões-produto é muito reduzida pelo que se pode analisar a mistura de compostos no ar sem a necessidade de utilizar técnicas de separação demoradas, como no GC-MS, o que permite uma análise em tempo real. Além disso, apresenta também como vantagens o facto de ser aplicável a uma vasta gama de compostos e de ter três reagentes disponíveis ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{NO}^+$  e  $\text{O}_2^+$ ) permitindo uma maior capacidade de identificação das moléculas. É possível constatar esta mais valia no caso da acetona, em que esta pode reagir por meio de transferência de protões com  $\text{H}_3\text{O}^+$  para originar  $\text{CH}_3\text{COCH}_3\text{H}^+$ , obtendo-se uma razão m/z de 59, através da transferência de carga com  $\text{O}_2^+$  para produzir  $\text{CH}_3\text{COCH}_3^+$  com razão m/z de 58, por último pode reagir com  $\text{NO}^+$  dando origem a  $\text{CH}_3\text{COCH}_3\text{NO}^+$  com uma razão m/z de 88. Utilização de três iões reagentes permite uma identificação inequívoca e uma quantificação precisa (Bagjagbo, 2012).

Esta técnica é aplicada na quantificação precisa de amónia em amostras de ar exalado em pacientes com suspeita de colonização do tracto gastrointestinal por *Helicobacter pylori* (Kim *et alii.*, 2012).



**Figura 8:** Espectrometria de massa de iões seleccionados do tubo de escoamento (adaptado de Hibbard e Killard, 2011).

## **v. Espectrometria de laser**

A espectrometria de laser é um método selectivo tendo sido usado na análise de um conjunto de biomarcadores como o etano (indicador para stress oxidativo), amónia (diálise renal), óxido nítrico (inflamação das vias respiratórias), formaldeídos e acetaldeídos como indicadores do cancro da mama ou pulmão ou o monóxido de carbono (Kim *et alii.*, 2012). A sua selectividade deve-se ao facto de utilizar comprimentos de onda muito específicos, não havendo possibilidade de sobreposição com espectros de compostos existentes em maiores concentrações no ar como a água ou o dióxido de carbono (Amann *et alii.*, 2014), sendo possível a detecção de compostos moleculares em concentrações muito reduzidas. Apresenta ainda como vantagem o facto de a amostra não necessitar de qualquer tipo de tratamento, sendo a análise possível em tempo real (Kim *et alii.*, 2012).

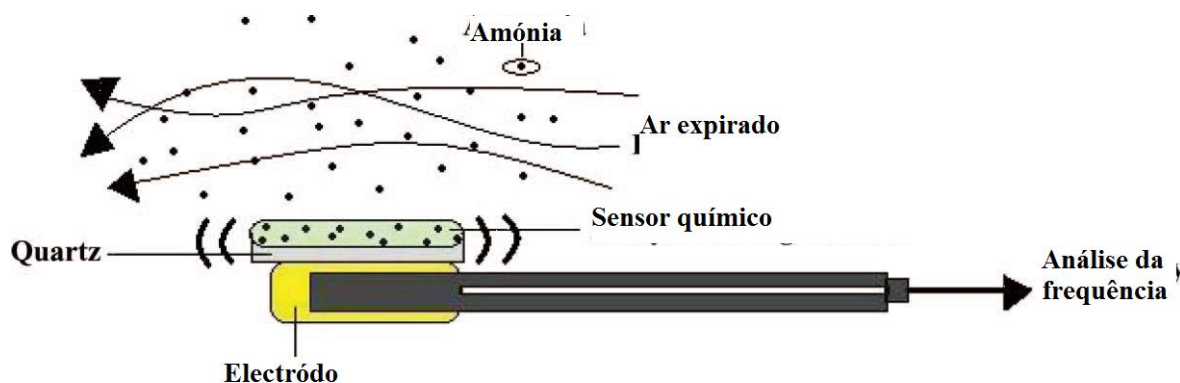
O princípio do método consiste em fazer atravessar a amostra por um feixe de laser a um comprimento de onda específico para cada molécula que se pretende detectar. Depois disso, o detector mede a quantidade do feixe de laser que foi absorvido que é proporcional à concentração da espécie em análise (Kim *et alii.*, 2012).

Actualmente estes sistemas são ainda muito complexos, pelo que ainda não se registaram utilizações em grande escala. No entanto, o rápido avanço da tecnologia faz antever que este venha a ser um método analítico importante na análise do ar exalado (Kim *et alii.*, 2012).

## **vi. Sensores químicos**

Os sensores químicos são dispositivos capazes de produzir uma impressão digital química de uma amostra respiratória (Francesco *et alii.*, 2004).

O sensor é composto por um eléctrodo, geralmente um metal e um cristal de quartzo (Figura 9). O quartzo é revestido com uma substância química específica para cada composto a medir, que fluem através do sistema. O eléctrodo é responsável pelas oscilações do quartzo, que com frequências muito específicas vai dar informação sobre a massa do analito. As alterações na frequência são proporcionais à massa do analito na amostra (Hibbard e Killard, 2011).



**Figura 9:** Representação esquemática de um sensor químico específico para a detecção de amónia (adaptado de Hibbard e Killard, 2011).

A agregação de sensores químicos em matrizes foi introduzida pela primeira vez, com o objectivo de ultrapassar a selectividade limitada dos sensores de gás em estado sólido. Um conjunto de sensores permite a quantificação e identificação de compostos com um desempenho superior ao de um único dispositivo (Natale *et alii.*, 2014). Esta capacidade é comparada com um sistema de armazenamento numa base de dados, que permite que uma amostra desconhecida seja incluída numa das classes existentes na base de dados (Francesco *et alii.*, 2004).

O conjunto de sensores de gás tem uma semelhança muito estreita com as propriedades dos neurónios receptores olfactivos (ORN) (Natale *et alii.*, 2014). Dada esta analogia, os sensores químicos são muitas vezes denominados por nariz-electrónico, dada a sua semelhança com o comportamento olfactivo do nariz humano (Biasioli *et alii.*, 2011).

Os narizes eletrónicos são bons instrumentos para a classificação dos diferentes padrões de COV. Este é o caso observado em várias patologias, onde, em vez da variação da concentração alguns dos biomarcadores, é o perfil global dos COVs que se encontra alterado (Natale *et alii.*, 2014).

Os sensores químicos são uma ajuda limitada para a identificação de doenças relacionadas com compostos voláteis, no entanto podem ser uma ferramenta valiosa na classificação dos indivíduos de acordo com a patologia de interesse (Natale *et alii.*, 2014).

Num estudo realizado para o diagnóstico do cancro do pulmão foram utilizados sensores químicos, que compreendem oito microbalanças de quartzo revestidas com diferentes metaloporfirinas. Confirmou-se a alta sensibilidade desta combinação de sensores para

alcanos e compostos aromáticos, que são reconhecidos como marcadores do cancro do pulmão (Kim *et alii.*, 2012).

Um outro estudo utilizou uma aplicação com uma microbalança de cristal de quartzo modificado com  $\text{Ag}^+$ -ZSM para o diagnóstico da diabetes. O sensor mostrou elevada sensibilidade e selectividade para a acetona (Kim *et alii.*, 2012).

## **Conclusão**

O ar expirado é constituído por diversos compostos capazes de fornecer informação sobre o estado de saúde dos indivíduos. Dada esta capacidade, tem havido um crescente interesse pela comunidade científica, pois muitos compostos encontrados no ar expirado podem ser utilizados como biomarcadores de patologias. Trata-se de um exame não-invasivo, de fácil execução, repetível e indolor face ao métodos tradicionais de diagnóstico e monitorização.

No entanto, para os testes respiratórios fazerem parte da prática clínica ainda é necessário transpor algumas barreiras. É fundamental a existência de um maior número de estudos para a compreensão e correlação da alteração dos compostos detectados no ar expirado com os processos metabólicos e respectiva associação a patologias. A uniformização dos processos de recolha e análise da amostra é mais um aspecto a melhorar nos testes respiratórios. Por último, a padronização de dados das matrizes respiratórias devem ser um aspecto a considerar visto ser essencial para a introdução destes testes no ambiente clínico.

Numa perspectiva futura, acredita-se que o ar expirado pode alargar-se para o âmbito da microbiologia e genética visto serem encontrados no ar expirado ADN e RNA de células e microorganismos sugerindo que estes podem ser utilizados para o diagnóstico de patologias. Espera-se que nos próximos anos mais testes respiratórios já aprovados pela FDA entrem na prática clínica tornando-se uma mais valia para o diagnóstico e monitorização não invasiva de patologias e que mais estudos sejam feitos no sentido de novos testes serem aprovados.

## **Bibliografia**

Alexandre, V. *et alii.* (2013). Agreement between indirect calorimetry and traditional test of lactose malabsorption, *Digestive and Liver Disease*, 45 (2), pp. 727-732.

Amann, A. *et alii.* (2003). Applications of breath gas analysis in medicine, *International Journal of Mass Spectrometry*, 239 (3), pp. 227-233.

Amann, A. *et alii.* (2014). Analysis of Exhaled Breath for Disease Detection, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 7, pp. 455-482.

Arakawa, T. *et alii.* (2013). A direct gaseous ethanol imaging system for analysis of alcohol metabolism from exhaled breath, *Sensors and Actuator B*, 186 (2), pp. 27-33.

Bagjagbo, K. (2012). Exhaled breath analysis for early cancer detection: principle and progress in direct mass spectrometry techniques, *Clinical Chemistry Laboratory Medicine.*, 50 (1), pp.1893-1902.

Biasioli, F. *et alii.* (2011). Direct-injection mass spectrometry adds the time dimension to (B) VOC analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (2), pp. 1003-1017.

Costanzo, L.S. (2010). *Fisiologia*. Saunders ElSevier.

Dadamio, J. *et alii.* (2012). Breath biomarkers of liver cirrhosis, *Journal of Chromatography B*, 905 (2), pp. 17-22.

Elfvin, A. *et alii.* (2014). Oxidative and nitrosative stress enzymes in relation to nitrotyrosine in *Helicobacter pylori*-infected humans, *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 5 (3), pp. 373-379.

Ferreira, H. (2011). Caracterização de sacos Tedlar® e Flex Film de recolha de ar exalado. Mestrado, Universidade Nova de Lisboa.

Francesco, F.D. *et alii.* (2004). Breath analysis: trends in techniques and clinical applications, *Microchemical Journal*, 79 (3), pp. 405-410.

Haick, H. *et alii.* (2013). Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers, *Royal Society of Chemistry*, 43 (3), pp. 1423-1449.

Hibbard, T. e Killard, A.J. (2011). Breath Ammonia Analysis, Clinical Application and Measurement, *Critical Review in Analytical Chemistry*, 41 (1), pp. 21-35.

Kim, K.H., Jahan, S.A. e Kabir, E. (2012). A review of breath analysis for diagnosis of human health, *Trends in Analytical Chemistry*, 33 (3), pp. 1003-1017.

Li, J., Peng, Y. e Duan, Y. (2012). Diagnosis of breast cancer based on breath analysis: An emerging method, *Critical Review in Oncology/Hematology*, 87 (3), pp. 28-40.

Miekisch, W., Schubert, J.K. e Noeldge-Schomburg, G.F.E. (2004). Diagnostic potential of breath analysis - focus on volatile organic compounds, *Clinica Chimica Acta*, 347 (1), pp. 25-39.

Minh, T.D.C., Donald, R.B. e Galassetti, P.R. (2012). The clinical potential of exhaled breath analysis for diabetes mellitus, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 97 (1), pp. 195-205.

Natale, C.D. *et alii.* (2014). Solid-state gas sensors for breath analysis: A review, *Analytica Chimica Acta*, 824 (1), pp. 1-17.

Palmer, P.T. e Limero, T.F. (2001). Mass Spectrometry in the U.S. Space Program: Past, Present, and Future, *American Society for Mass Spectrometry*, 12 (1), pp. 656-675.

Phillips, M. *et alii.* (1999). Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans, *Journal Chromatography B*, 729 (1), pp. 75-88.

Portal da Saúde. [Em linha]. Disponível em <<http://www.portaldasaude.pt/portal/conteudos/enciclopedia+da+saude/ministeriosaude/>>. [Consultado em 28/08/2014].

Silva, M. (2012). Estudo e Desenvolvimento do método de detecção de metabolitos no fluido lacrimal. Mestrado, Universidade Nova de Lisboa.

Zhou, M., Liu, Y. e Duan, Y. (2012). Breath Biomarkers in diagnosis of pulmonary diseases, *Clinica Chimica Acta*, 413 (1), pp. 1770-1780.