



**Ricardo Emanuel Pinheiro Alves**

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

## **Estudo dos Biomarcadores associados a doenças renais**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Doutora Valentina Vassilenko, Prof.  
Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca

Vogais: Prof. Doutor Mário Emanuel Santos de Sousa Diniz  
Prof<sup>a</sup>. Doutora Valentina Borissovna Vassilenko



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro, 2012



## **Estudo dos Biomarcadores associados a doenças renais**

Copyright © Ricardo Emanuel Pinheiro Alves, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*“Visions are worth fighting for. Why spend your life making  
someone else’s dreams?”*

*- Tim Burton*



# Agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha orientadora, a Professora Valentina Vassilenko, pelo seu apoio, entusiasmo e orientação na elaboração deste estudo.

A todas as pessoas da empresa NMT onde o trabalho foi realizado, que sempre se demonstraram prontos a ajudar em tudo o que fosse possível e necessário. Um agradecimento especial, neste caso, para a Helena Ferreira que foi sempre incansável no apoio à realização do trabalho, sempre pronta a responder a todas as dúvidas na medida dos seus conhecimentos, e sem a qual a recolha das análises para o estudo não teria sido possível.

Agradeço, também, ao Dr. Pedro Bravo, à Dra. Cristina Outerelo e à Dra. Aura Ramos, médicos do Serviço de Nefrologia do Hospital Garcia de Orta pela disponibilidade, simpatia e vontade de colaborar neste projecto. Aos pacientes deste serviço por participarem no estudo sem os quais não haveria resultado.

Aos meus colegas de trabalho, Mónica, Fábio e Néilson, pela companhia e por estarem sempre dispostos a ajudar a resolver problemas que possam surgir.

Resta-me ainda agradecer aos meus amigos e colegas de faculdade Cátia, Rodolfo, Ana, Mafalda, Teresa, Margarida, Filipa, Sofia, Joana e Francisco pelos jantares, festas e, principalmente disparates ao longo de todos estes anos, e que, de uma forma ou de outra, tornaram este período de trabalho de dissertação, e todo o percurso académico uma experiência excepcional. Agradeço, igualmente, aos meus amigos Ana, Catarina, Jorge, André, Tiago, Filipe, Nikesh e Constança também companheiros de diversão e parvoíces, demonstrando sempre preocupação e incentivo nos momentos certos.

Nunca menos importante, um agradecimento aos meus pais Rui e Rosa que sempre me proporcionaram o que precisei ao longo destes 23 anos. Agradeço ainda à minha Tia Paula, e aos meus avós, que sempre se mostraram interessados e preocupados com o meu percurso académico. A todos os familiares e amigos um obrigado pela presença constante e importante ao longo deste tempo.





# Resumo

---

As matrizes biológicas, como o sangue ou a urina, requerem métodos selectivos e caros de preparação da amostra, para posterior identificação dos seus componentes. Assim, dada a grande variedade de compostos orgânicos voláteis (VOCs) presentes no ar exalado humano, tornou-se bastante relevante a sua análise.

Muitos destes VOCs têm origem endógena, resultado de processos metabólicos do organismo, podendo ser encontrados no sangue. A sua passagem através da membrana alveolar pode fornecer informações relevantes do estado patológico do paciente. No entanto, a matriz respiratória é complexa pelo que a sua análise exige uma técnica analítica não só extremamente sensível assim como rápida. Com este intuito, surge a técnica de espectrometria de mobilidade iónica associada a uma coluna multicapilar (MCC-IMS) que combina alta sensibilidade (limites de detecção de  $ppb_v - ppt_v$ ) e portabilidade.

O presente trabalho experimental teve como objectivo analisar o ar exalado de doentes renais, em tratamento de hemodiálise, utilizando o BreathSpec<sup>®</sup>, que recorre às potencialidades inovadoras da MCC-IMS. Realizou-se um estudo do tipo prova de conceito, adquirindo espectros dos participantes em hemodiálise, comparativamente com um grupo de controlo. O estudo foi realizado em colaboração com o serviço de Nefrologia do Hospital Garcia de Orta.

Durante a realização do trabalho ocorreu um período de aprendizagem desta técnica única em Portugal, com a realização de um *workshop* teórico-prático: "Introdução à Espectrometria de Mobilidade Iónica no contexto de análise de ar exalado". Procedeu-se também à requalificação da mobilidade do aparelho para facilitar o transporte até ao local. O estudo realizado é pioneiro a nível nacional e internacional, com uma comunicação no ciclo de conferências iMed 4.0 e no "Breath Analysis Summit 2013", na Alemanha, e ainda com submissão de um artigo no *Journal of Breath Research*.

Futuramente, pretende-se que esta técnica seja utilizada como forma de detecção precoce dos estágios de doença renal dos pacientes.

**Palavras-chave:** BreathSpec, ar exalado, IMS, insuficiência renal, hemodiálise.

---



# Abstract

---

Nowadays, the identification of the elements present in biological matrices, like blood or urine, requires expensive and selective methods of sample preparation. Due to this fact, and the fact that exhaled air contains a large number of organic volatile compounds (VOCs), its analysis became very important.

Many of these VOCs have endogenous origin, as a result of metabolic processes in the body, and can be found in blood. They can cross the alveolar membrane and appear on human breath, giving possible information about the pathological state of the patient. Exhaled air is quite complex, so it requires an analytical technique that is not only highly sensitive as well as fast. With this purpose, many studies started using the innovative technique of ion mobility spectrometry (IMS), combined with a multi-capillary column (MCC-IMS). This way it is possible to combine high sensitivity (detection limits in  $ppb_v$  –  $ppt_v$ ) and portability.

In this study, the exhaled air of kidney patients, on hemodialysis, was analyzed, with BreathSpec<sup>®</sup>. This was a proof-of-concept trial, where the hemodialysis patient's characteristic spectrum was acquired, in comparison with a control group. The study was conducted in collaboration with de Nephrology Service of Hospital Garcia de Orta.

In the course of work, there was a learning period of this technique, unique in Portugal, with the participation on a theoretical and practical workshop entitled "Introdução à Espectrometria de Mobilidade Iónica no contexto de análise de ar exalado". To facilitate the equipment transport, the mobility requalification of BreathSpec<sup>®</sup> was taken into account. In addition, the conducted study is original both nationally and internationally speaking, with a communication on the cycle of conferences iMed 4.0 and on "Breath Analysis Summit 2013", and also with the submission of an article on the Journal of Breath Research.

In the future, it is intended to utilize this technique as an early detection method for the different stages of acute renal failure.

**Keywords:** BreathSpec, breath analysis, IMS, renal failure, hemodialysis.

---



# Conteúdo

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Conceitos Teóricos</b>	<b>5</b>
2.1	Difusão Gasosa . . . . .	5
2.2	Análise do ar exalado: técnica analítica promissora . . . . .	6
2.2.1	Amónia . . . . .	10
2.3	Sistema Urinário . . . . .	11
2.3.1	Os rins e os seus constituintes . . . . .	11
2.3.2	Doenças Renais: Insuficiência Renal . . . . .	12
2.3.3	Hemodiálise em Portugal . . . . .	15
<b>3</b>	<b>Espectrometria de Mobilidade Iónica</b>	<b>17</b>
3.1	IMS - Espectrometria de Mobilidade Iónica . . . . .	18
3.1.1	Princípio de análise por IMS de compostos orgânicos voláteis . . . . .	18
3.1.2	Formação de iões reactivos . . . . .	20
3.1.3	Formação de iões produto . . . . .	22
3.1.4	Mobilidade Reduzida . . . . .	22
3.1.5	Aplicações da IMS . . . . .	23
3.1.6	MCC - IMS . . . . .	24
<b>4</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>27</b>
4.1	Equipamento de análise: BreathSpec® . . . . .	27
4.1.1	Interface com o utilizador . . . . .	31
4.2	Requalificação da Mobilidade . . . . .	33
4.2.1	Montagem da Estrutura de Transporte . . . . .	33
4.3	Ligações e Configurações . . . . .	34
4.4	Material . . . . .	35
4.5	Protocolo de limpeza . . . . .	36
4.6	Testes de optimização dos parâmetros experimentais . . . . .	37

4.6.1	Definição do programa de análise . . . . .	39
4.7	Procedimento experimental . . . . .	40
4.8	Análise dos resultados: <i>Software LAV</i> . . . . .	42
<b>5</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>47</b>
5.1	Tratamento de dados . . . . .	47
5.1.1	Análise dos espectros e definição do <i>Areaset</i> . . . . .	47
5.2	Variação da Intensidade dos picos . . . . .	51
5.3	Cálculo da Mobilidade Reduzida . . . . .	53
5.4	Verificação do pico característico da amónia . . . . .	54
5.5	Tratamento de dados dos espectros do Grupo A . . . . .	57
<b>6</b>	<b>Conclusão e Perspectivas Futuras</b>	<b>61</b>
6.1	Perspectivas Futuras . . . . .	62
<b>A</b>	<b>Anexo A</b>	<b>71</b>
<b>B</b>	<b>Anexo B</b>	<b>73</b>
<b>C</b>	<b>Anexo C</b>	<b>75</b>
<b>D</b>	<b>Anexo D</b>	<b>77</b>

# Lista de Figuras

2.1	a) Alvéolo - unidade respiratória. b) Estrutura da membrana respiratória alveolar, em corte seccional . . . . .	6
2.2	Imagem representativa da libertação de VOCs . . . . .	8
2.3	Representação da anatomia de um rim . . . . .	12
2.4	Evolução do número de doentes em hemodiálise . . . . .	15
2.5	Custos de hemodiálise em 2010 . . . . .	15
3.1	Representação dos diferentes elementos de um tubo de medição de um espectrómetro de mobilidade iónica, com apresentação de um esquema ilustrativo do principio de funcionamento . . . . .	19
3.2	Exemplo de um espectro de mobilidade . . . . .	20
3.3	Exemplo de um espectro, em mapa de cores . . . . .	25
4.1	a) Imagem do BreathSpec <sup>®</sup> b) Imagem do painel frontal do equipamento. . . . .	28
4.2	Imagem do espirómetro associado ao BreathSpec <sup>®</sup> . . . . .	29
4.3	Esquema dos elementos internos do BreathSpec <sup>®</sup> . . . . .	30
4.4	Imagem da janela principal da interface do BreathSpec <sup>®</sup> . Obtida em laboratório. . . . .	32
4.5	a) Imagem de inicialização do espirómetro, após a selecção do botão <i>Breath</i> b) Imagem do <i>display</i> gráfico do fluxo da respiração. Inicia-se no momento de início de exalação. . . . .	32
4.6	Estrutura em aço inoxidável . . . . .	33
4.7	a) Imagem da estrutura de transporte montada. b) Imagem da estrutura final de transporte, com o BreathSpec <sup>®</sup> e o computador portátil utilizado para visualização dos espectros. . . . .	34
4.8	Espectro obtido da limpeza periódica de uma superfície de aço inoxidável. Imagem obtida em laboratório. . . . .	37
4.9	Exemplo da visualização no <i>software LAV</i> de uma análise obtida em laboratório . . . . .	43

4.10	Janela principal do programa <i>LAV</i> . . . . .	44
5.1	Imagem do espectro de análise do ar exalado de um paciente com insuficiência renal . . . . .	47
5.2	a) Imagem do espectro de análise do ar exalado de um paciente em tratamento por hemodiálise b) Imagem de um espectro de análise do ar exalado de um participante do grupo de controlo. . . . .	48
5.3	Imagem do espectro de análise do ar exalado de um paciente com insuficiência renal, com identificação do <i>Areaset</i> . . . . .	49
5.4	a) Imagem do espectro de análise do ar exalado de um paciente com insuficiência renal, com identificação do <i>Areaset</i> b) Imagem de um espectro de análise do ar exalado de um participante do grupo de controlo, , com identificação do <i>Areaset</i> . . . . .	50
5.5	Imagem do espectro de análise do ar exalado de um participante do grupo de controlo, apresentando o Pico 3 em evidência . . . . .	50
5.6	Gráfico da variação de intensidade do Pico 1 nos diferentes espectros do grupo de pacientes . . . . .	52
5.7	Gráfico da variação de intensidade do Pico 2 nos diferentes espectros do grupo de pacientes . . . . .	52
5.8	Gráfico da variação de intensidade do Pico 3 nos diferentes espectros do grupo de pacientes . . . . .	53
5.9	Imagem do espectro de análise da amostra de amónia. . . . .	55
5.10	a) Imagem do espectro de análise da amostra de amónia. b) Imagem de um espectro de análise do ar exalado de um paciente em hemodiálise . . .	56
5.11	Imagem do espectro pertencente a um dos pacientes do Grupo A . . . . .	57
5.12	Gráfico da variação de intensidade do Pico 1 no grupo A e nos grupos B e C	58
5.13	Gráfico da variação de intensidade do Pico 2 no grupo A e nos grupos B e C	58
5.14	Gráfico da variação de intensidade do Pico 3 no grupo A e nos grupos B e C	59
5.15	Imagem do espectro de análise do ar exalado de um paciente, em que se evidenciam alguns picos diferentes . . . . .	60



# Lista de Tabelas

2.1	Tabela dos principais Biomarcadores (VOCs) e distúrbios metabólicos a que se associam. . . . .	8
4.1	Tabela com as características do espirómetro acoplado ao BreathSpec® . .	28
4.2	Algumas características técnicas do BreathSpec® utilizado neste trabalho experimental . . . . .	31
4.3	Hipóteses de optimização dos parâmetros de análise. . . . .	38
4.4	Parâmetros experimentais do BreathSpec®. . . . .	39
4.5	Programa HEMODIALISE utilizado no BreathSpec®. Definido previamente para os procedimentos de recolha do ar exalado dos pacientes em hemodiálise. . . . .	39
4.6	Tabela com os dados referentes ao Grupo A, de pacientes em hemodiálise do turno intermédio do primeiro dia de recolha. . . . .	41
4.7	Programa de análise BREATH_1,5M, definido no BreathSpec®. . . . .	41
4.8	Tabela com os dados referentes ao Grupo B, de pacientes em hemodiálise do turno final do primeiro dia de recolha. . . . .	42
4.9	Tabela com os dados referentes ao Grupo C, de pacientes em hemodiálise do turno intermédio do segundo dia de recolha. . . . .	42
4.10	Tabela com os dados referentes ao Grupo de Controlo. . . . .	43
5.1	Variação das intensidades dos picos num exemplo do grupo de controlo, e em 3 pacientes diferentes . . . . .	51
5.2	Mobilidade iónica reduzida ( $K_0$ ) para cada um dos picos, assim como o respectivo tempo de deriva ( $t_d$ ) e tempo de retenção ( $t_r$ ). . . . .	54
5.3	Programa HEMODIALISE . . . . .	55
5.4	Mobilidade iónica reduzida ( $K_0$ ) para o pico da amónia, assim como o respectivo tempo de deriva ( $t_d$ ) e tempo de retenção ( $t_r$ ). . . . .	56
5.5	Mobilidade iónica reduzida ( $K_0$ ) para cada um dos picos do Grupo A, assim como o respectivo tempo de deriva ( $t_d$ ) tempo de retenção ( $t_r$ ). . . . .	59

D.1	Informações relativas aos pacientes em hemodiálise, do Grupo A . . . . .	77
D.2	Informações relativas aos pacientes em hemodiálise, do Grupo B . . . . .	78
D.3	Informações relativas aos pacientes em hemodiálise, do Grupo C . . . . .	78

# Lista de Acrónimos e Abreviaturas

$\Delta\tau$	Tempo de abertura da grelha	<b>IMS</b>	Espectrometria de Mobilidade Iónica
$v_d$	Velocidade de deriva	<b>IRA</b>	Insuficiência renal aguda
$K$	Mobilidade iónica	<b>IRC</b>	Insuficiência renal crónica
$K_0$	Mobilidade iónica reduzida	<b>LAV</b>	<i>Software</i> de análise dos espectros
$l_d$	Comprimento do tubo de deriva	<b>M</b>	Masculino
$t_{dcor}$	Tempo de deriva corrigido	<b>MCC</b>	Coluna multicapilar
$t_d$	Tempo de deriva	<b>MCC-IMS</b>	Espectrometria de mobilidade iónica com a coluna multicapilar
$t_r$	Tempo de retenção	<b>P</b>	Bomba de sucção
<b>BUN</b>	<i>Blood urea nitrogen</i>	<b>P<sub>0</sub></b>	Pressão ambiente
<b>CAPD</b>	Diálise peritoneal contínua ambulatória	<b>P<sub>d</sub></b>	Pressão no tubo de deriva
<b>E</b>	Campo eléctrico	<b>pA</b>	picoampere
<b>E1</b>	Valores do fluxo do gás de deriva	<b>ppb<sub>v</sub></b>	partes por bilião de volume
<b>E2</b>	Valores do fluxo do gás de arraste	<b>ppm</b>	partes por milhão
<b>EPC1</b>	Controlador de pressão electrónico do gás de deriva	<b>ppt<sub>v</sub></b>	partes por trilião de volume
<b>EPC2</b>	Controlador de pressão electrónico do gás de arraste	<b>R</b>	Gravação do espectro
<b>F</b>	Feminino	<b>RIP</b>	Pico de iões reactivos
		<b>S</b>	Área de análise de substâncias
		<b>SPN</b>	Sociedade Portuguesa de Nefrologia
		<b>T<sub>0</sub></b>	Temperatura ambiente

<b>T<sub>d</sub></b>	Temperatura no tubo de deriva	<b>TMA</b>	Trimetilamina
<b>T1</b>	Temperatura do IMS	<b>TMNO</b>	N-óxido de trimetilamina
<b>T2</b>	Temperatura do MCC	<b>V</b>	válvula de seis vias
<b>T3</b>	Temperatura do <i>loop</i>	<b>VOCs</b>	Compostos orgânicos voláteis
<b>TFG</b>	Taxa de filtração glomerular		

# 1

## Introdução

Actualmente, a principal questão no que diz respeito ao tratamento de doenças está relacionado com a sua detecção precoce. De facto, tem-se verificado, cada vez mais, que a probabilidade de sobrevivência aumenta quando é feito o diagnóstico antecipado da patologia em questão. Isto é especialmente relevante no caso de tumores, por exemplo. Com isto, a investigação científica e procura por métodos de diagnóstico que permitam efectuar o rastreio de algumas doenças tem sido cada vez maior.

De entre os inúmeros tipos de testes e exames que se realizam, no tempo corrente, em termos de auxiliar de diagnóstico, destacam-se essencialmente as análises sanguíneas e a análise da matriz urinária. Através destas é possível observar a ocorrência de determinados compostos, que se encontram devidamente associados a patologias conhecidas [1]. De facto, sabe-se que os metabolitos provenientes do organismo, e que podem portanto surgir neste tipo de fluídos, são transportadores de informações sobre o estado do próprio organismo ou sobre influências do meio ambiente circundante. São, também, possíveis marcadores de deterioração do organismo, resultantes de doenças a que este possa estar sujeito [1].

De igual modo, também se verifica a presença de alguns biomarcadores no ar exalado humano. A barreira entre os vasos sanguíneos e os pulmões é transparente a muitas moléculas de menores dimensões, fazendo com que a matriz respiratória seja uma mistura complexa de diversos gases em concentrações variadas [2].

Este conhecimento data da Grécia Antiga e, na década de 70, com os avanços tecnológicos foram identificados mais de duas centenas de compostos orgânicos voláteis (VOCs) na respiração [3, 4]. Assim, em comparação com as análises convencionais, as técnicas de análise do ar exalado têm o potencial de constituir um método auxiliar de diagnóstico

não-invasivo [2] e indolor [3] de algumas doenças. Este tipo de análises pode ser efectuado de forma rápida, não só ao mesmo paciente mas a um grupo de pacientes e com baixos custos de obtenção de resultados [4]. São já cerca de 35 biomarcadores estabelecidos associados a patologias, como é o caso da acetona e da amónia [5].

No conjunto de técnicas existentes que têm sido utilizadas para efectuar as análises ao ar exalado humano, uma das que apresenta grandes potencialidades é a técnica de espectrometria de mobilidade iónica (IMS). Permite aliar a elevada sensibilidade e o baixo custo de análise, à rapidez de aquisição de espectros, entre 10 a 50 *ms* [6]. A sua combinação com uma coluna multicapilar (MCC-IMS) permite aumentar a selectividade [6], em termos de propriedades físico-químicas dos analitos, e reduzir o efeito da humidade inerente à exalação.

Pretende-se, com a realização deste trabalho experimental, realizar um estudo do tipo de prova de conceito, com recurso à técnica IMS, para identificar um padrão característico de compostos associados a doenças renais, nomeadamente, em pacientes que estejam em fase de tratamento por hemodiálise. O trabalho foi realizado em colaboração com a empresa NMT – Tecnologia, Inovação e Consultoria, SA, utilizando o BreathSpec<sup>®</sup>, com a recolha das análises a ser efectuada no serviço de Nefrologia do Hospital Garcia de Orta.

No que diz respeito ao diagnóstico precoce, a insuficiência renal é uma área com possibilidade de desenvolvimento. No caso dos pacientes em hemodiálise este não é possível mas, através da identificação da "impressão digital" destes pacientes, pode constituir-se um ponto de partida para a detecção da patologia referida em fases iniciais.

Em Portugal, no ano de 2011, estimou-se que cerca de 800 mil portugueses sofriam de doença renal crónica, nos diferentes estágios [7]. Destes surgem, a cada ano, 2000 novos casos de doentes que necessitam de tratamento por hemodiálise, sendo já cerca de 16000 doentes que o realizam [7]. Em termos de custos, o tratamento de hemodiálise representa um custo convencionalizado de cerca de 78,28 € por cada paciente por dia [8], verificando-se que estes custos são bastantes superiores nas regiões Norte e Lisboa e Vale do Tejo [8, 9]. Conseguindo identificar marcadores característicos da insuficiência renal e associando-os com o tratamento de hemodiálise pode também ser possível um melhor ajustamento do tratamento a efectuar, ou facilitar a monitorização de parâmetros relevantes nestes casos, como a ureia ou a creatinina.

No decorrer deste trabalho, ocorreu um período de aprendizagem desta técnica única em Portugal, com a realização de um *workshop* teórico-prático intitulado: "Introdução à Espectrometria de Mobilidade Iónica no contexto de análise de ar exalado". Para além disso, o estudo realizado é pioneiro a nível nacional e internacional, com uma comunicação no ciclo de conferências iMed 4.0 e no "Breath Analysis Summit 2013", em Saarbrücken, na Alemanha, e ainda com a submissão de um artigo no *Journal of Breath Research*.

A escrita desta dissertação de mestrado foi definida em 6 capítulos. No capítulo 2 abordam-se os conceitos teóricos relevantes. Inicia-se pelo estado de arte associado à análise do ar exalado, e sua forte ligação com os processos metabólicos do organismo.

Faz-se em seguida uma breve descrição do sistema urinário, assim como da insuficiência renal, o seu possível tratamento por meio de diálise, e a situação do país no que diz respeito a esta patologia e respectivo tratamento. Todo o capítulo 3 foi reservado para a descrição da técnica IMS utilizada, desde o princípio físico a possíveis aplicações. No capítulo 4 é feita a descrição dos materiais e do método experimental. Aqui faz-se referência à requalificação da mobilidade efectuada para o BreathSpec<sup>®</sup>, e são definidos os grupos de análise, cujos resultados são apresentados no capítulo 5. Desta forma, o capítulo 5 apresenta o tratamento de dados e os resultados obtidos, assim como a respectiva discussão. Por fim, surge o capítulo 6 onde são tecidas as conclusões e referem-se algumas perspectivas futuras para a continuação do estudo.







## Conceitos Teóricos

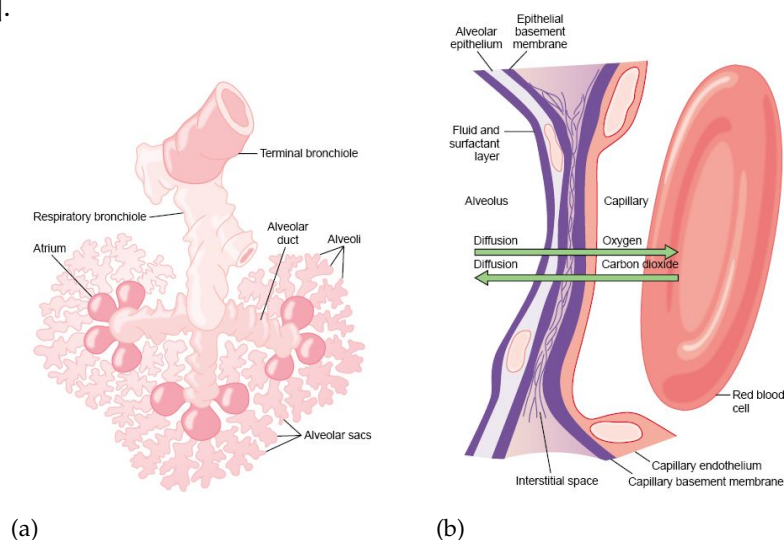
A respiração é uma das funções mais básicas do organismo. É um mecanismo característico do sistema respiratório, através do qual este efectua trocas gasosas entre o ar e o sangue. Para além disso, a respiração é um mecanismo essencial na medida em que todas as células vivas do corpo necessitam de oxigénio para funcionar [10]. Para tal recorre ao sistema ventilatório e ao sistema circulatório, ambos sistemas de convecção extremamente eficientes [11]. Verifica-se que o oxigénio presente no ar passa para o sangue para que possa ser transportado até às células onde é necessário. Dá-se também, em sentido contrário, o movimento do dióxido carbono para que seja removido das células [10]. Com isto, pode dizer-se que há uma complementaridade entre o sistema respiratório e o sistema cardiovascular [10, 11].

### 2.1 Difusão Gasosa

Ao processo que consiste na passagem aleatória de moléculas em todas as direcções através da membrana respiratória e líquidos adjacentes dá-se o nome de difusão. Estes movimentos ocorrem não só para o oxigénio e para o dióxido de carbono mas também para os restantes gases importantes para a fisiologia respiratória [12].

As trocas gasosas ocorrem, essencialmente, através da membrana respiratória em todas as porções terminais dos pulmões [12]. No entanto, há um maior destaque na região alveolar, pois as paredes são extremamente finas, havendo uma maior proximidade com a rede de capilares sanguíneos. O facto de a parede alveolar ser, em algumas regiões, tão pequena como  $0,2 \mu m$ , facilita a passagem dos gases tornando a difusão extremamente rápida [12]. Além disso, frequentemente, as membranas das células sanguíneas na zona

capilar estão em contacto com a parede capilar, evitando que os gases tenham que atravessar uma grande quantidade de plasma, contribuindo também para a rápida difusão referida [12].



**Figura 2.1:** **a)** Alvéolo - unidade respiratória. **b)** Estrutura da membrana respiratória alveolar, em corte seccional. Imagem adaptada de [12]

Tal como o nome indica, a região alveolar é constituída pelos alvéolos pulmonares, que é a unidade fundamental das trocas gasosas (figura 2.1 a) [10, 12].

Os alvéolos pulmonares são pequenas estruturas hemisféricas (cerca de 300 milhões nos dois pulmões), que quando consideradas em conjunto, têm uma área entre 50 e 100  $m^2$  e suportando um volume máximo de 5 a 6 litros, nos dois pulmões [11, 12]. Estes pequenos constituintes dos pulmões são revestidos por dois tipos diferentes de células epiteliais, tipo-I e tipo-II e, apesar de ambos estarem presentes, as células do tipo-I cobrem mais de 90% da superfície alveolar, representando o caminho mais curto para a difusão gasosa [11].

Ainda em relação à região alveolar, a difusão é determinada pela diferença entre as pressões parciais do gás, quer no sangue quer no ar alveolar. Assim, dá-se o movimento do gás do sangue para o ar alveolar quando a pressão é superior no primeiro, e o movimento contrário quando a pressão é superior no segundo. Em suma, para um gás, o movimento através da membrana alveolar ocorre das regiões de alta pressão para regiões de baixa pressão [11, 12].

Dada a forte relação do ar alveolar com a corrente sanguínea, facilmente se compreende a sua importância, podendo conter substâncias provenientes de diferentes partes do organismo.

## 2.2 Análise do ar exalado: técnica analítica promissora

O ar exalado (ou ar expirado) não é homogéneo, mas sim uma combinação do ar alveolar com o ar do espaço morto [12]. Este último corresponde ao ar que permanece nas

vias aéreas superiores e que não efectua trocas gasosas com o sangue através dos vasos pulmonares [13]. Num individuo saudável, o "espaço morto" corresponde a cerca de 150 ml e o ar alveolar cerca de 350 ml [14].

Tal como foi referido, existe uma proximidade entre os capilares e a membrana dos alvéolos o que facilita a troca de substâncias entre o sangue e o ar alveolar. Desta forma, a análise do ar exalado pode permitir observar o resultado de processos bioquímicos no organismo [15]. Este conhecimento data já da Grécia antiga, em que os médicos da época compreenderam que algumas doenças poderiam ser diagnosticadas através do odor característico da respiração dos pacientes [15]. É o que se verifica no caso dos indivíduos com diabetes, que apresentam uma respiração com odor doce, por exemplo [16].

No entanto, a realização, em maior número, de testes de análise destes componentes só começou a surgir por volta de 1970 [3, 5]. Nesta altura, e utilizando a técnica de cromatografia gasosa, Linus Pauling detectou mais de duzentos componentes presentes no ar exalado [3, 15, 17]. Com esta descoberta, por mais de uma década o principal problema prendia-se com a separação e identificação efectiva das substâncias exaladas, mas com diversos avanços na tecnologia esta dificuldade foi ultrapassada [14].

Desde cedo se reconheceu a grande complexidade da matriz gasosa, cuja constituição consiste numa mistura de azoto, oxigénio, dióxido de carbono, água e gases inertes, que surgem no ar exalado em concentrações percentuais elevadas [5, 15]. Mas a referida mistura constitui apenas uma pequena parte dos compostos já identificados, pelo que a restante fracção consiste de um conjunto de compostos orgânicos voláteis (frequentemente designados por VOCs, do inglês *volatile organic compounds*) em menores concentrações desde partes por milhão (ppm), partes por bilião (ppb) e até partes-por-trilião (ppt) [6, 15].

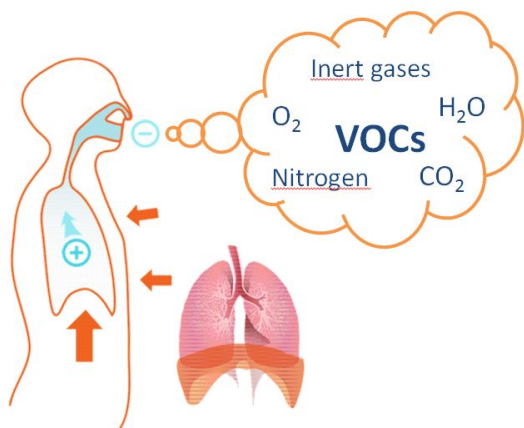
Quanto à sua origem, o aparecimento destes VOCs na respiração pode ser por influências externas, com absorção de contaminantes do meio ambiente, ou por influência interna, resultando de processos metabólicos do organismo [15]. Desta forma, é feita a distinção entre compostos de origem exógena e endógena, sendo que, para fins de diagnóstico, é mais relevante o conhecimentos aprofundado dos VOCs provenientes de processos metabólicos (biomarcadores) [15, 18]. Estes compostos endógenos incluem não só os VOCs já mencionados, como também gases inorgânicos, como o óxido nítrico e o monóxido de carbono, e outras substâncias não voláteis [15].

Com o reconhecimento da possível utilização da análise do ar exalado como método de diagnóstico auxiliar, rapidamente se estabeleceu um conjunto de VOCs cuja ligação a determinadas doenças é inevitável. De entre estes biomarcadores destacam-se os que se apresentam na tabela 2.1, onde se identificam também as patologias ou distúrbios metabólicos a que se encontram associados mais frequentemente.

**Tabela 2.1:** Tabela dos principais Biomarcadores (VOCs) e distúrbios metabólicos a que se associam.

Biomarcador	Distúrbios Metabólicos	Referência
Amónia	Insuficiência Renal ou Hepática	[5], [6], [16], [19], [20] [21], [22], [23], [24], [25]
Dimetilamina e Trimetilamina	Insuficiência Renal	[15], [16], [22], [26]
Acetona	Diabetes	[1], [6], [15], [16], [24], [25], [27], [28], [29]
Isopreno	Biossíntese de Colesterol	[5], [15], [30]
Óxido Nitríco	Inflamações das vias aéreas, Asma	[15], [25], [29]
Etano e Pentano	Asma, Peroxidação Lipídica	[4], [15], [27], [29],
Pentano	Alguns tipos de cancro, Fibrose Quística	[25], [31]

O crescente interesse que se tem verificado por esta área deve-se principalmente por esta ligação entre os diversos VOCs com algumas patologias. Todavia, quando em comparação com os exames de diagnóstico convencionais, ou seja, as análises sanguíneas e da urina, o ar exalado tem algumas vantagens importantes, que poderão aumentar este interesse científico pela área e contribuir para o estabelecimento destes métodos analíticos como auxiliares de diagnóstico [3].

**Figura 2.2:** Imagem representativa da libertação de VOCs. Adaptada de [32]

A análise dos compostos presentes na respiração humana tem a potencial vantagem de ser um método analítico não-invasivo [29, 33]. Os métodos de análise considerados obtêm resultados, na sua maioria através por exemplo de um espirómetro ou de sacos *Tedlar*, sem necessidade de agulhas [2, 34]. Isto facilita a obtenção de resultados e é um atractivo na medida em que não provoca incómodo para o paciente, podendo ser utilizado em crianças e pessoas idosas, que são os grupos etários mais sensíveis [6].

Para além disso, as amostras recolhidas por estes métodos reflectem, aproximadamente, as concentrações arteriais das substâncias biológicas, fornecendo informações que as análises sanguíneas não podem fornecer, na medida em que a recolha de sangue arterial é muito mais complicada [29]. A análise do ar exalado pode ser extremamente vantajosa quando há necessidade de recolher diversas amostras arteriais, como em casos de monitorização de pacientes [29]. Nestes casos, a análise do ar exalado torna-se especialmente relevante, facilitando o controlo diário de determinados parâmetros, que é aquilo que se verifica, por exemplo, no

caso da glicémia ou da ureia [29, 33].

Destaca-se também o baixo custo de realização das análises, com possibilidade de obtenção resultados de forma imediata, sem necessidade de recorrer a laboratórios especializados, que apenas encarecem o processo [2]. O facto de se poder avaliar os resultados pouco tempo após a análise permite que o médico possa actuar de forma quase imediata [2].

Há que ter ainda em conta o facto de se efectuarem análises sem que seja necessário recorrer a instrumentos demasiado sofisticados, ou a pessoal médico especializado [33, 34].

Por outro lado, apesar dos inúmeros componentes que se podem encontrar na matriz respiratória esta continua a ser mais simples que as matrizes sanguínea e de outros fluidos corporais [3, 29]. Desta forma, não é preciso realizar pré-tratamento da amostra recolhida, usando reagentes [29].

Contudo, e apesar da simplicidade de análise bem como todas as vantagens referidas, não é ainda um método auxiliar clínico muito divulgado [3]. Para tal facto contribui a falta de um método de separação e de identificação de substâncias simples e adequado, mas principalmente a ausência de uniformização e normalização das técnicas utilizadas [3, 29]. Como consequência, observa-se uma grande variação nos resultados dos diferentes estudos realizados [29].

De igual modo, muitas vezes a origem dos compostos orgânicos voláteis que surgem na matriz respiratória têm origem biológica desconhecida, ou o seu significado fisiológico não é totalmente compreendido, não sendo possível garantir a associação destes VOCs a determinada doença [3, 6, 29]. Verifica-se ainda que apenas os compostos de origem endógena com baixos pesos moleculares são suficientemente voláteis para que possam surgir em concentrações mensuráveis no ar exalado [6], e sendo de baixas concentrações apenas são detectáveis, de forma considerável pela maioria das técnicas, após um processo de pré-concentração [29].

Outro factor importante a ter em consideração é a elevada humidade das amostras, que dificulta a detecção de compostos isolados [29].

Apesar disto, considerando as vantagens das técnicas de análise do ar exalado, existem já algumas aplicações de testes respiratórios dos quais se destacam a avaliação das concentrações de etanol e acetaldeído após o consumo de álcool, o reconhecimento da asma por presença de óxido nítrico, o teste de análise de hidrogéneo para diagnosticar o excesso de bactérias no intestino delgado, os testes de identificação de amónia ou  $^{13}\text{C}$ -ureia para diagnósticação de infecções por *Helicobacter pylori* [3, 14, 34]. O último teste referido, está associado ao cancro do estômago, e é considerado um dos testes de maior sensibilidade e especificidade [3].

### 2.2.1 Amónia

De entre os biomarcadores que são indicados na tabela 2.1, a amónia ( $\text{NH}_3$ ) é aquele que apresenta uma maior ligação a patologias renais. Nesse sentido, é dado uma maior destaque a este VOC.

O organismo não possui mecanismos de armazenamento de compostos contendo azoto e portanto, em caso de consumo excessivo de alimentos com este composto, é essencial a existência de um mecanismo de excreção [35]. Este processo envolve a conversão do azoto em amónia e, no caso do ser humano, a sua posterior eliminação através do ciclo de ureia [35]. Este foi o primeiro ciclo metabólico a ser descoberto, por Hans Krebs e Kurt Henseleit em 1932, e, de uma forma simplista, consiste na conversão da amónia em ureia [36].

A amónia é um produto do metabolismo proteico, e cujos níveis de concentração são muito dinâmicos [30]. Num indivíduo saudável, os iões de amónia e derivados, gerados nos intestinos durante o processo de digestão, são transportados para a corrente sanguínea [2]. Percorrendo o organismo, são convertidos em ureia no fígado, que é novamente inserida na corrente sanguínea para ser transportada e excretada através dos rins [2, 3, 36]. Desta forma, evita-se a acumulação de amónia no corpo que, quando em quantidades exageradas, pode ter um efeito nocivo para o organismo, na medida em que consegue passar, de forma relativamente fácil, através das membranas dos órgãos [2]. Das consequências do excesso deste metabolito destacam-se principalmente os problemas ao nível neurológico [2].

A excreção da amónia pode ocorrer não só através da urina, mas também através do ar exalado. Sendo moléculas de reduzidas dimensões, os iões de amónia conseguem passar a membrana respiratória [2, 19]. Este metabolito é encontrado no ar exalado de qualquer ser humano, pelo que quando surge em quantidades elevadas pode ser um bom indicativo de patologia [37]. A concentração da amónia no ar exalado normal está no intervalo de 0.25-2.9 *ppm* [5], mais concretamente, cerca de 833 *ppb* [38], e a sua concentração normal no sangue situa-se no intervalo de 12-48 *mmol/L* [39].

Para além da amónia, também a trimetilamina (TMA) se encontra fortemente relacionada com as doenças renais. Esta é uma amina alifática volátil, que pode surgir pelo consumo de determinados alimentos, como o peixe, ou por metabolismo de algumas bactérias. A sua absorção ocorre no tracto gastrointestinal, sendo depois metabolizada no fígado para que se forme N-óxido de trimetilamina (TMNO) [26]. Tal como a amónia, também estas aminas são normalmente removidas por excreção renal, com possibilidade de surgirem no ar exalado [26]. Em pacientes com função renal normal a TMA é rapidamente absorvida no intestino e excretada pelos rins, sem aparecer na respiração [22]. Assim, quando se verifica a presença deste composto na respiração é um indicativo de que os rins não estão a efectuar a sua correcta excreção.

Desta forma, a análise do ar exalado centrando-se na detecção da amónia e da trimetilamina pode ter um grande interesse na área da nefrologia.

## 2.3 Sistema Urinário

Uma vez que o presente estudo experimental tem o seu foco na análise do ar exalado de doentes renais, mais concretamente com participantes em tratamento por hemodiálise, é importante fazer uma breve descrição dos pontos mais relevantes do sistema urinário. Existem já estudos que fazem esta análise do ar exalado de pacientes em tratamento por hemodiálise, utilizando diferentes técnicas. Dá-se especial destaque, a um estudo recente, realizado na Alemanha que, utilizando a mesma técnica descrita neste trabalho, com algumas diferenças, procederam à identificação de picos característicos destes pacientes [40].

O sistema urinário tem a responsabilidade de proceder à limpeza do sangue de produtos metabólicos em excesso, iões e água, sob a forma de urina, através dos seus componentes [41]. De uma forma geral, o aparelho urinário é constituído pelos rins, a bexiga, dois tubos (ureteres) responsáveis pelo transporte da urina dos rins para a bexiga, e a uretra que permite transportar a urina para o exterior [10].

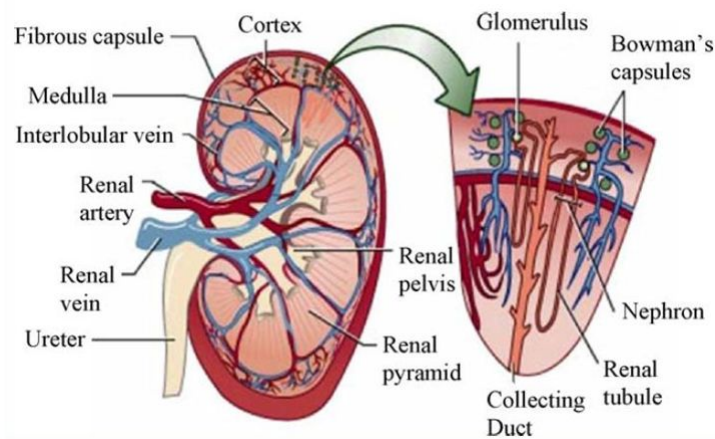
### 2.3.1 Os rins e os seus constituintes

Os rins são órgãos sólidos considerados os principais elementos constituintes do sistema urinário, e portanto como os elementos excretores e purificadores de excelência do organismo [10]. Funcionam como filtros através dos quais são removidos os produtos metabólicos e toxinas do sangue através da urina [10, 11]. Outros órgãos, como a pele e os pulmões, têm igualmente uma função excretora, mas quando ocorrem falhas no funcionamento dos rins estes órgãos não têm capacidade de a compensar [10].

Para além da reconhecida função excretora, os rins têm outras funções essenciais que permitem manter as condições de homeostasia favoráveis ao funcionamento do organismo. Deste modo destacam-se as seguintes: são órgãos responsáveis por produzir hormonas que estão envolvidas em diversos processos importantes para o organismo, como a regulação da pressão sanguínea, colaborando nas variações de composição e volume do sangue [10, 11, 12]; possuem também um papel de regulador homeostático importante no controlo do estado dos fluídos corporais, da concentração de eletrólitos e do balanço ácido-base do organismo [11, 12]; e ainda contribuem para a perda obrigatória do excesso de água pelo organismo através da urina [42].

No ser humano, estes órgãos surgem em pares e com uma forma de feijão, medindo cerca de 11 *cm* de comprimento cada um deles [10, 11]. Quanto à sua constituição, encontram-se divididos em duas regiões: uma região externa, designada por córtex, e uma região interna, a medula. Na região interna é possível identificar umas estruturas conhecidas por pirâmides renais, cuja base permite determinar a separação entre cada uma das regiões referidas anteriormente [10]. A organização das diferentes estruturas presentes nas regiões do rim permitem a passagem da urina para a bexiga [10].

Mais pormenorizadamente, sabe-se que as unidades funcionais e histológicas dos rins



**Figura 2.3:** Representação da anatomia de um rim. Retirada de [20]

são os nefrônios, que existem em grande número em cada um dos rins [10, 11]. Estes consistem de uma estrutura tubular com uma porção denominada de Cápsula de Bowman, onde se dá a reunião do aglomerado de vasos sanguíneos responsável pela formação do filtrado, e um túbulo que, por sua vez, é uma estrutura epitelial que tem como função a de converter o filtrado em urina [10, 11]. Destas pequenas estruturas (a maioria mede entre 50 e 55 *mm*) fazem ainda parte o tubo contornado proximal, a ansa de Henle e o tubo contornado distal [10].

No processamento, os nefrônios recebem o sangue através das artérias renais, processam-no e enviam-no de volta à corrente sanguínea através das veias renais [42]. Neste percurso, recolhem os produtos de metabolismo desnecessários, através de uma estrutura a que se chama cálice, sendo finalmente enviados até à bexiga pelo uréter, um tubo de pequeno diâmetro [10, 42].

Importa ainda referir que, de acordo com a localização dos nefrônios, estes podem designar-se por nefrônios justamedulares ou nefrônios corticais. A diferença reside especialmente no facto de a ansa de Henle dos últimos não penetrar profundamente na região medular [10].

### 2.3.2 Doenças Renais: Insuficiência Renal

Para que o organismo consiga manter as condições de homeostasia favoráveis é crucial que todos os seus sistemas se encontrem em correcto funcionamento. Deste modo, é de extrema importância a preservação de todos os órgãos para que possam realizar as funções a que estão destinados.

No caso dos rins, mesmo quando ocorrem lesões extensas, estes têm capacidade de manter as suas funções até determinado ponto [10]. No entanto, isto nem sempre acontece e, quando estas funções não se verificam não há a manutenção da homeostasia e refere-se que se está perante um caso de doença renal [43]. A origem destas patologias



pode ser infecciosa, genética, traumática, vascular, imunológica, metabólica ou degenerativa [42].

Em particular, destaca-se a Insuficiência Renal que é um tipo de patologia que resulta de qualquer situação que interfira com as funções básicas dos rins [10]. Pode ter inúmeras causas e muitas delas têm início noutros sistemas do organismo, atingindo o sistema urinário posteriormente. De entre estas causas destacam-se o fornecimento de sangue insuficiente na zona renal, agentes tóxicos e organismos infecciosos [43].

Independentemente do motivo que origina a insuficiência renal esta pode manifestar-se como insuficiência renal aguda (IRA) ou insuficiência renal crónica (IRC), sendo que o último caso é um tipo de patologia que não pode ser revertido [10, 43].

Na situação de insuficiência renal crónica dá-se a perda das funções renais de forma lenta e progressiva com destruição do tecido renal [43]. Em diversos casos, pode tornar-se fatal na medida em que grande parte do tecido renal pode ser destruído sem que se note a ausência imediata do funcionamento dos rins. Este reconhecimento ocorre quando a percentagem de tecido renal funcional é inferior a 25%, e passa a estar-se perante um caso de insuficiência renal em estado terminal quando esta percentagem desce abaixo de 10% [43]. Com esta percentagem o número de nefrónios funcionais é demasiado baixo, não tendo capacidade para compensar as funções daqueles cujas funções foram perdidas [10].

Um dos métodos de monitorização mais utilizados em situações de insuficiência renal é a determinação da taxa de filtração glomerular (TFG ou GFR, do inglês *Glomerular Filtration Rate*), cujo valor normal é de cerca de 120 *ml/min* [42]. Esta taxa corresponde ao volume de plasma filtrado através dos capilares glomerulares por unidade de tempo [20].

Outro parâmetro a que se recorre frequentemente é o nível de ureia no sangue (BUN, do inglês *Blood Urea Nitrogen*). O aparecimento deste composto em excesso no sangue não é particularmente tóxico, no entanto, é indicativo de mau funcionamento dos rins e do possível aparecimento de outros compostos [42].

Tendo isto em conta, nos casos em que o diagnóstico do paciente é de insuficiência renal, e há a perda das funções renais, o tratamento tem como principal objectivo a manutenção destas por métodos alternativos como o transplante de rins ou, com maior destaque neste caso, o processo de diálise [43].

### 2.3.2.1 Processo de Diálise

A substituição do funcionamento do rim por uma máquina ou por um dispositivo sintético foi um dos primeiros processos a ser conseguidos no que diz respeito aos órgãos sólidos. De facto, esta substituição através da hemodiálise ou da diálise peritoneal tem sido um dos poucos procedimentos com sucesso até a data [42]. Apesar disso, não é uma terapia com substituição total na medida em que apenas providencia a função de filtração do rim [42].

O processo de diálise é um método que permite realizar a função de filtração associada aos rins de forma artificial, aquando da ocorrência de IRC. Possibilita, desta forma, a manutenção do balanço de fluidos eletrólitos em níveis normais e a remoção de toxinas desnecessárias ao organismo [43]. Realiza-se através da máquina de diálise, também conhecida como rim artificial, podendo substituir a função dos rins por grandes períodos de tempo [10].

Num caso particular, e o mais comum, do processo de diálise encontra-se a hemodiálise. Nesta dá-se a circulação do sangue através de tubos com membranas permeáveis selectivamente, ou seja, o sangue do paciente é bombeado através de um tubo de celofane, rodeado por um fluido semelhante ao plasma normal [10, 43]. Este líquido circundante contém a mesma concentração de solutos do plasma, exceptuando os produtos de degradação metabólica [10, 41]. Verifica-se ainda que a ureia e outras toxinas não se encontram, de igual modo, presentes no líquido de diálise (ou dialisante) [41, 43].

Uma vez que estes componentes presentes no sangue não se encontram no dialisante origina-se um gradiente de difusão favorável à saída destas substâncias do sangue para o líquido [10, 41, 43]. O movimento ocorre até que se atinja o equilíbrio entre os dois fluidos [43]. Por outro lado, os poros da membrana do tubo são demasiado pequenos para permitir a passagem de proteínas plasmáticas e algumas substâncias apresentam concentrações idênticas em ambos os fluidos, pelo que não se dá qualquer movimento ao longo do tubo [10]. É também o caso da glucose, do sódio e do potássio, que não são regulados pelo rim mantendo a sua concentração normal no percurso do sangue [10, 43]. Para além disso, a glucose tem ainda outro papel importante, pois a sua presença no dialisante permite criar um gradiente osmótico que facilita a saída de água da corrente sanguínea [41].

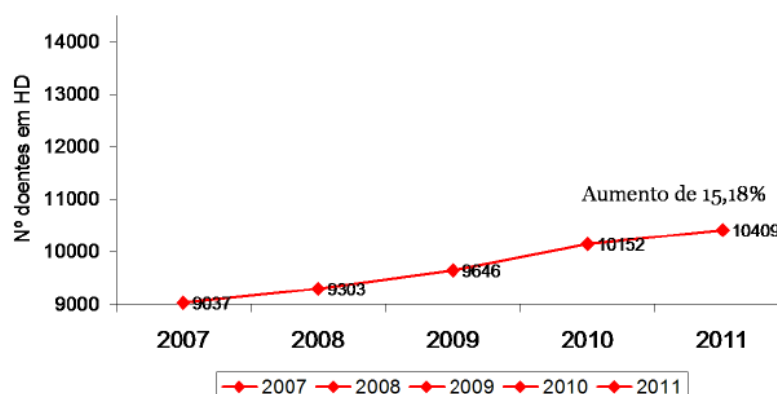
Após esta fase de processamento, o sangue é injectado novamente no sistema circulatório do paciente [43]. Usualmente, obtém-se o sangue a partir de uma artéria do paciente, reentrando no organismo através de uma veia [10].

Todo o processo é repetido o número de vezes necessário para que a constituição do plasma seja mantida o mais normal possível. Normalmente, realiza-se o tratamento de hemodiálise três a quatro vezes por semana em sessões com duração de cerca de quatro horas [43].

Noutro tipo de diálise considera-se a diálise peritoneal. Esta baseia-se na utilização de uma membrana semelhante ao tecido, colocada na região abdominal, de forma a efectuar as trocas de água e solutos necessárias [42]. Pode também considerar-se a diálise peritoneal ambulatoria contínua (CAPD, *Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis*), um procedimento em que a lavagem da cavidade peritoneal é conduzida continuamente através da introdução, equilíbrio e drenagem do dialisante [42].

### 2.3.3 Hemodiálise em Portugal

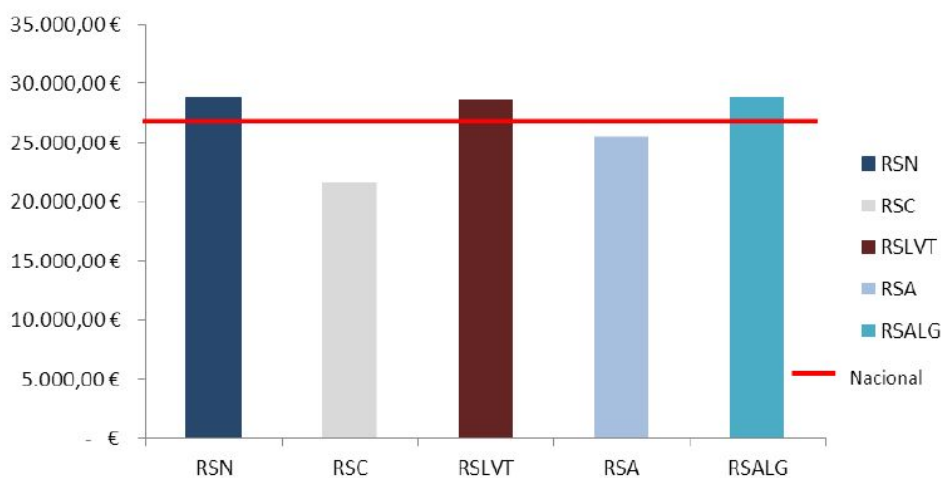
No ano de 2011, em Portugal, estimou-se que cerca de 800 mil pessoas sofriam de doença renal crónica, em qualquer um dos seus diferentes estágios. De acordo com o presidente da Sociedade Portuguesa de Nefrologia (SPN), Portugal tem uma das maiores taxas de doentes renais do mundo desenvolvido [7]. Verifica-se que este número ascende a mais de 16 mil doentes em tratamento por diálise, nas suas diversas vertentes [7].



**Figura 2.4:** Evolução do número de doentes em tratamento por hemodiálise em Portugal, entre 2007 e 2011. Retirado de [44]

De acordo com os dados do relatório anual da SPN tem-se verificado um aumento progressivo do número de doentes em tratamento por hemodiálise. Isto pode ser observado no gráfico da figura 2.4, que apresenta os dados referentes aos doentes em hemodiálise desde 2007 [44].

Quando se refere este tipo de patologias é também importante ter em conta os custos associados ao tratamento. A figura 2.5 apresenta os dados de 2010 referentes ao custo por doente e por região do tratamento por hemodiálise [9].



**Figura 2.5:** Custos de hemodiálise por doente e por região em 2010 [9]. **RSN**- Região de Saúde do Norte; **RSC**- Região de Saúde Central; **RSLVT**- Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo; **RSA**- Região de Saúde do Alentejo; **RSALG**- Região de Saúde do Algarve; [9]

Observa-se que três das principais regiões do país apresentam um custo por doente com o tratamento por hemodiálise próximo dos 30.000 €, superior ao custo médio nacional representado pela linha vermelha.

Ainda, em termos de custos com estes tratamentos, vários relatórios têm comprovado que há uma redução significativa dos gastos do Serviço Nacional de Saúde, quando este é realizado por meio de Diálise Peritoneal. No entanto, a utilização deste método ainda está pouco difundida. Tal como noticia o jornal *Destak*, segundo o director do Hospital de S. João no Porto, apenas cerca de 5% dos doentes realizam tratamento por diálise peritoneal [45]. O uso generalizado deste tipo de diálise permitiria uma redução de 87 milhões de euros ao estado [45].

# 3

## Espectrometria de Mobilidade Iónica

No capítulo 2, foram descritas as características e as principais vantagens da análise do ar exalado. Essencialmente, é um método de análise não-invasivo que pode ser utilizado como forma de monitorização dos processos metabólicos do ser humano [27].

No entanto, apesar de ser uma técnica extremamente vantajosa em comparação com algumas das análises mais convencionais, a sua utilização como método auxiliar de diagnóstico apenas começará a adquirir um maior peso se houver a possibilidade de recolha de informações de forma *online*, rápida e em tempo real [6].

Existem já diversas técnicas de análise do ar exalado, mas a grande maioria destas técnicas não englobam todas estas características relevantes. Muitas das que então surgiram, obrigam a que seja efectuado um processo de pré-concentração das amostras em análise, o que faz aumentar não só os custos associados, que são já elevados devido aos próprios equipamentos utilizados, bem como o tempo de análise que se torna demasiado extenso [18]. Para além disso, muitos dos estudos de análise do ar exalado têm o seu principal foco num só analito, não sendo suficiente para a sua possível utilização como auxiliar de diagnóstico [18]. De facto, um dos maiores desafios das técnicas consideradas prende-se com a identificação precisa de todos os componentes da matriz respiratória complexa, assim como o reconhecimento da sua origem.

Além da complexidade da mistura, outro obstáculo que dificulta a identificação dos compostos com este tipo de método analítico é a baixa concentração dos gases da respiração, que é diversas vezes semelhante à concentração em que os mesmos se encontram no ar ambiente [34]. Há que ter ainda em conta o elevado nível de humidade da respiração humana que pode mascarar alguns compostos de maior relevância [34].

Desta forma, idealmente, a técnica a utilizar para análises do ar exalado deveria ser

uma técnica que permita identificar e quantificar de forma precisa quais os VOCs presentes, através de uma análise directa, e em tempo real, permitindo ainda reconhecer facilmente qual a origem fisiológica dos mesmos [34]. Para além destas características, a aplicação do referido método analítico como auxiliar de diagnóstico médico requer ainda a rapidez de análise, facilidade de utilização, portabilidade, ser não-invasivo e indolor, entre outras características, essenciais para diminuir o desconforto para o paciente [46].

Com o intuito de ultrapassar estas dificuldades, começaram a surgir diferentes estudos utilizando a Espectrometria de Mobilidade Iónica (IMS, do inglês *ion mobility spectrometry*) como novo método analítico, que permite aliar a elevada sensibilidade à rapidez de análise [47].

### 3.1 IMS - Espectrometria de Mobilidade Iónica

A IMS é uma técnica de análise que permite detectar os analitos em fase gasosa, ou VOCs, referidos no capítulo anterior [18]. Neste método de análise dá-se a rápida separação das moléculas do analito, previamente ionizado, com base na velocidade dos seus iões em fase gasosa, quando na presença de um campo eléctrico [48, 49]. Todo este processo decorre a pressão ambiente [49].

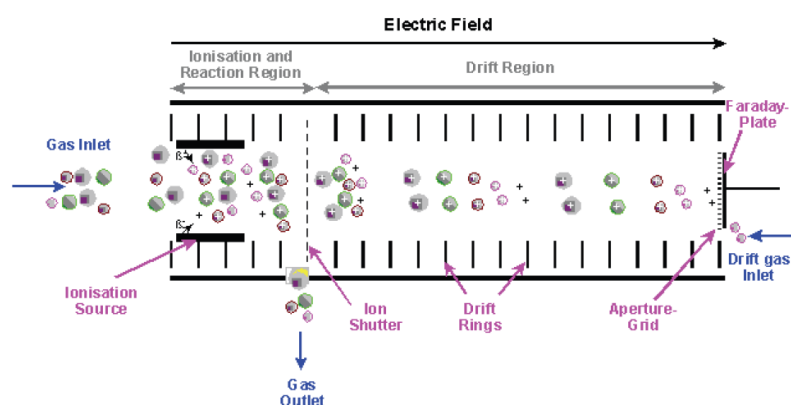
No final do século XIX, investigadores pioneiros concluíram que alterações na condutividade do ar eram devidas à formação de iões e electrões [49]. Desta forma, passaram a questionar-se quanto à origem dos iões e à estrutura da própria matéria. Estes estudos foram progredindo, até por volta de 1938, reconhecendo-se o significado de mobilidade iónica [49]. Rutherford realizou a medição da mobilidade de alguns iões formados por ionização de raios-x, ainda antes desta radiação ter sido descoberta por Roentgen [49].

Por esta altura existia já uma considerável quantidade de informação respeitante à formação de iões nos gases e a sua respectiva mobilidade, assim como a sua relação com a temperatura, pressão e grau de pureza [49]. A continuação da investigação nesta área permitiu a evolução nos equipamentos utilizados e uma maior compreensão do fenómeno de mobilidade até que, em 1970, surgiu o primeiro espectrómetro comercial utilizando a técnica de IMS [49].

#### 3.1.1 Princípio de análise por IMS de compostos orgânicos voláteis

O espectrómetro de mobilidade iónica (também frequentemente designado como IMS) tem como elemento básico um tubo de medição, onde se encontram os restantes constituintes [47]. De uma forma geral, pode considerar-se o interior deste tubo de medição como sendo dividido em duas regiões distintas: uma câmara de reacção ou ionização, onde os iões são gerados por uma fonte de radiação  $\beta$ , e uma região de deriva, onde se dá a circulação da nuvem iónica [18, 47].

As referidas regiões do tubo são separadas por uma grelha, designada por grelha de



**Figura 3.1:** Representação dos diferentes elementos de um tubo de medição de um espectrômetro de mobilidade iônica, com apresentação de um esquema ilustrativo do princípio de funcionamento. Adaptado de [50].

*Bradbury-Nielsen*. Esta designação é devida ao arranjo dos elementos da grelha que é feita a um só nível. Com a abertura da grelha, normalmente por um período de cerca de 300  $\mu s$  a cada 100  $ms$ , dá-se então a passagem de uma parte dos iões formados na câmara de ionização para a região de deriva [18, 51].

Na câmara de reacção é onde se dá a entrada do gás inerte que compõe a atmosfera do IMS [49]. Este gás, designado por gás de deriva, pode ser o ar ambiente mas na maioria dos casos é utilizado o azoto [47]. Ao entrar na referida região, o gás de deriva sofre um conjunto de reacções de ionização, por meio da actividade da fonte de radiação  $\beta$ , com a libertação de electrões [49]. Nos equipamentos IMS originais, e em alguns ainda utilizados, o processo de ionização deve-se à actividade de uma fonte de  $^{63}Ni$ , responsável pela emissão de electrões com uma energia de 17  $keV$  [49]. Com estas reacções dá-se a formação de iões designados por iões reactivos, que tanto podem ter polaridade positiva, do tipo  $H^+(H_2O)_n$ , como polaridade negativa, do tipo  $O_2^-(H_2O)_n$ , que são de grande importância para o processo de ionização das moléculas da amostra [49].

Ainda nesta região do espectrômetro verifica-se a formação dos iões-produto, que resultam das colisões das moléculas de analito a entrar no tubo com os iões reactivos anteriormente formados, e que permanecem na câmara de ionização [47, 49]. Com isto forma-se o que se pode designar por nuvem iónica que irá passar para a região de deriva, pela abertura da grelha [47].

O movimento da nuvem iónica na região de deriva dá-se por influência de um campo eléctrico presente nesta zona, normalmente com gradientes de campo entre 150 e 300  $V/cm$  [18]. O tubo de medição do espectrômetro é composto por diversos anéis de metal separados por anéis isoladores de vidro ou cerâmica [47], e é a existência desta configuração em anéis de metal que permite que se forme o campo eléctrico ao longo da região de deriva. Desta forma, a homogeneidade do campo irá então estar dependente do raio dos anéis de metal considerados, bem como da distância a que estes se encontram colocados uns dos outros [47].

Simultaneamente, enquanto se dá a movimentação da nuvem iónica num sentido verifica-se o movimento de um fluxo de gás de deriva com sentido oposto [18, 47]. Devido à existência deste gás, os iões-produto são sujeitos a colisões com as moléculas do mesmo no seu percurso até ao detector, o Detector de Faraday, que se encontra no final do tubo [18, 47]. Assim, os iões do analito sofrem alterações na sua velocidade de acordo com a sua massa e/ou forma, permitindo então a sua separação ao atingirem o detector em momentos distintos [47]. Na colisão com o detector os iões são neutralizados provocando uma corrente que pode ir de 10 a 1000  $pA$ , e que é depois convertida em voltagem permitindo elaborar o espectro de mobilidade [49], como o que se apresenta na figura 3.2.



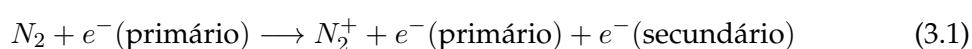
**Figura 3.2:** Exemplo de um espectro de mobilidade. No eixo das abcissas apresenta-se o tempo de deriva, em milissegundos, e no eixo das ordenadas a intensidade, em volts. Imagem obtida em laboratório.

Neste espectro observa-se a intensidade, em volts, dos picos de cada analito em função do tempo de deriva, em milissegundos. A posição relativa de cada pico no espectro está desta forma relacionada com o tempo que as moléculas do analito demoram a atravessar o tubo até atingir o detector.

Num caso ideal os iões da nuvem iónica são totalmente separados, permitindo observar picos bem distintos no espectro correspondendo a cada uma das substâncias em análise [18].

### 3.1.2 Formação de iões reactivos

A formação de iões nos aparelhos de espectrometria de mobilidade iónica é, por norma, devido a fontes de ionização emissora de electrões, como a fonte de  $^{63}Ni$  [47]. Para algumas aplicações pode ser utilizado o trítio [47]. Os electrões emitidos colidem com as moléculas do gás de deriva e ocorre a produção de electrões secundários [49]. Este processo de ionização apenas se verifica enquanto a energia da radiação for superior ao potencial de ionização do gás [49].



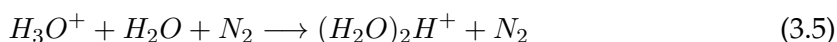
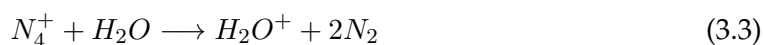
Na reacção apresentada considera-se o azoto como o gás de deriva. Nesta reacção forma-se o ião positivo do respectivo gás, e verifica-se a libertação de um electrão secundário. A quantidade de energia libertada por cada colisão, neste caso, é de 35  $eV$ , e a



ionização das moléculas de azoto continua enquanto a energia da radiação for superior ao seu potencial de ionização de  $15.58 \text{ eV}$ . Após esta reacção os electrões formados têm ainda energia suficiente para prosseguir e interagir com novas moléculas de azoto [49].

- **Formação de iões reactivos na polaridade positiva**

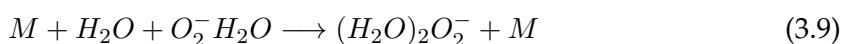
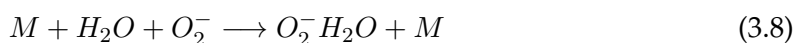
A formação dos iões de azoto desencadeia a sequência de reacções de formação dos iões reactivos de polaridade positiva, sequência esta que se apresenta de seguida, obtidas de [47].



Os *clusters* de água carregados positivamente, como se observam nas equações 3.5 e 3.6, são formados dependendo da temperatura e da quantidade de água presente no gás de deriva [47].

- **Formação de iões reactivos na polaridade negativa**

À pressão ambiente, os electrões emitidos pela fonte radioactiva são rapidamente termalizados pelas reacções descritas anteriormente de formação positiva [49]. No caso em que se considera o azoto puro a termalização é de facto muito eficiente pelo que estes electrões podem ser vistos como livres no espectro de mobilidade. No ar os electrões termalizados podem ligar-se ao oxigénio de acordo com as reacções seguintes [49].

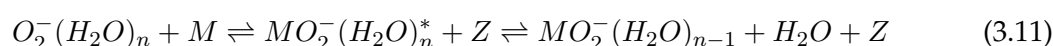
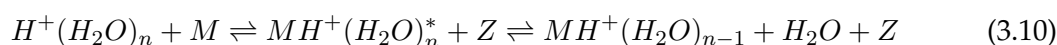


Nas equações anteriores M pode representar  $O_2$ ,  $H_2O$  ou outra molécula neutra. No caso em que esta representa o  $CO_2$  há a formação de mais *clusters* do que nas outras moléculas [49].

A fonte radioactiva leva a uma produção constante de iões reactivos, e a quantidade de iões reactivos positivos e negativos formados é idêntica [49]. A presença destes iões é notada nos espectros obtidos devido ao aparecimento de um pico chamado *RIP* (do inglês *reactant ion peak*), que surge normalmente com maior intensidade.

### 3.1.3 Formação de iões produto

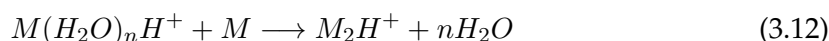
Tal como os iões reactivos formados podem ter polaridade positiva ou negativa também nos iões produto isto se verifica. Quando as moléculas da amostra em análise são introduzidas na câmara de reacção reagem com os iões reactivos formados [49]. Estas reacções são apresentadas em seguida, em que  $M$  representa a molécula de analito e  $Z$  um elemento de estabilização do produto [49]. A reacção 3.10 representa a formação positiva enquanto que a reacção 3.11 representa a formação negativa.



No processo de colisão origina-se um produto intermediário que pode dissociar de volta a iões reactivos ou prosseguir para a formação de iões produto [49].

Relativamente à formação positiva destes iões esta está dependente da afinidade prótonica do composto a ser ionizado [47]. No caso da água, sendo esta afinidade muito baixa faz com os *clusters* formados ionizem um grande número de compostos, como aldeídos, aminas, ou álcoois [47].

Quando a concentração de analito é mais elevada é possível observar-se a formação de dímeros, como se verifica pela equação 3.12 [47].



Nesta situação há o consumo de muitos dos iões reactivos e a consequente redução do RIP no espectro de mobilidade [49]. O consumo total de iões reactivos não é desejado, mas quando se verifica está-se perante uma situação de saturação [49].

Em qualquer um dos casos as reacções são consideradas de ionização suave, e não se verifica fragmentação dos iões produto [49, 52]. Para além disso, estas dependem fortemente da temperatura, da concentração de analito e da humidade presente no tubo de medição [47].

### 3.1.4 Mobilidade Reduzida

Nesta técnica, a diferenciação entre os diferentes VOCs, depois de percorrerem o tubo de deriva, é feita através do seu tempo de chegada ao detector, que se designa por tempo de deriva,  $t_d$  [18]. Conhecendo a distância de deriva, ou seja, o comprimento do tubo,  $l_d$ , e tendo em conta o tempo atrás referido, a velocidade de deriva,  $v_d$ , pode ser determinada [18]. Efectuando o quociente entre esta velocidade e a intensidade do campo eléctrico ( $E$ ) a que os iões estão sujeitos no seu percurso determina-se a mobilidade iónica,  $K$  [47, 53].

$$K = \frac{\vartheta_d}{E} = \frac{l_d}{Et_{dcor}} \quad (3.13)$$

Na equação 3.13  $t_{dcor}$  representa o tempo de deriva corrigido.

Posteriormente, considerando a normalização em relação à pressão e temperatura ( $P_0 = 101,325kPa$  e  $T_0 = 273K$ , respectivamente), obtém-se o que se designa por mobilidade iónica reduzida,  $K_0$  [18, 47]. Assim, e considerando que  $P_d$  e  $T_d$  são os valores específicos de pressão e temperatura medidos no tubo de deriva considerado, vem [47, 53]

$$K_0 = K \left( \frac{P_d}{P_0} \right) \left( \frac{T_0}{T_d} \right) \quad (3.14)$$

A mobilidade iónica reduzida determinada pela equação (3.14) é um valor característico de cada substância e, uma vez que é uma medida normalizada, é independente do aparelho e das condições ambientais utilizadas [18, 47].

### 3.1.5 Aplicações da IMS

As técnicas de análise consideradas actualmente nem sempre englobam a totalidade das características que se consideram importantes quando se pretende proceder a análises do ar exalado. É desta forma que se começa a considerar a utilização da IMS como método analítico.

Ao longo dos últimos anos, tem-se verificado que a IMS é um método de análise cuja utilização está já bem estabelecida no campo militar e da segurança [48]. Assim, recorre-se frequentemente à IMS para, por exemplo, detectar agentes químicos de guerra ou detectar drogas ilegais e explosivos [18, 47, 48, 50, 51, 54]. No entanto, com o passar dos anos, esta técnica tem sido alvo de um crescente interesse de outras áreas para diferentes tipos de aplicações [48]. Destacam-se então as aplicações em análises biológicas, aplicações relacionadas com segurança e qualidade da alimentação, aplicações de controlo de processos industriais ou mesmo aplicações médicas [18, 47, 48, 54].

Relativamente à análise da qualidade e segurança alimentar, o que esta técnica tenta avaliar é a presença de determinado tipo de amins biogénicas voláteis que poderão ser um indicador de má qualidade [48]. Da mesma forma, tem-se verificado também que a avaliação destes compostos bacterianos voláteis podem ser de extrema importância para aplicações médicas, pois podem fornecer informação quando ao estado do organismo em determinado momento [48].

A IMS tem conseguido um maior destaque no meio científico por ser uma técnica de elevada sensibilidade, possibilitando a detecção de substâncias com concentrações muito pequenas, de ppb e ppt [34, 54]. Para além disso, permite aliar a esta elevada sensibilidade a rapidez de análise, sendo possível adquirir um único espectro entre 20 - 50 ms, e o baixo custo associado à técnica [34, 51, 54].

Como grandes vantagens relativamente a outras técnicas tem também o facto de ser possível utilizar o ar ambiente como gás de arraste, não sendo necessário recorrer a azoto puro ou hélio, e o facto de não utilizar vácuo para realizar as análises [54].

É, no entanto, um método analítico que geralmente não se considera quando se pretende identificar compostos desconhecidos [34]. A sua aplicação é feita em casos cujos processos envolvidos são conhecidos [54].

### 3.1.6 MCC - IMS

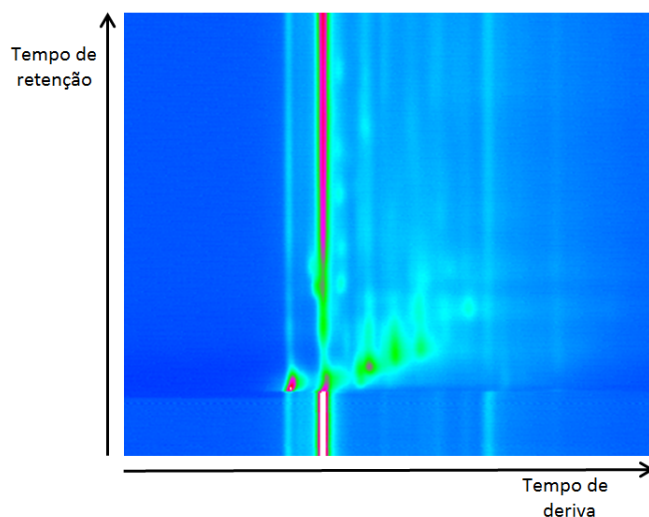
Dada a grande complexidade da mistura correspondente à matriz do ar exalado passou a utilizar-se uma coluna multicapilar (MCC), em combinação com a técnica de espectrometria de mobilidade iónica, constituindo a MCC - IMS, de forma a permitir uma maior eficiência na separação dos analitos [50, 51]. O MCC consiste, fundamentalmente, num feixe de capilares formados a partir de inúmeros outros capilares individuais, no interior de um pequeno tubo. Tem como grande vantagem as suas reduzidas dimensões (o comprimento do tubo no intervalo 50-300 *mm*, e o diâmetro do feixe de cerca de 3 *mm*) e portabilidade, que são características de extrema importância quando se pretende a associação a outros aparelhos de análise, como é o caso do IMS já referido [55].

As colunas multicapilares, desenvolvidas inicialmente para fins militares, são também caracterizadas por elevadas taxas de fluxo e capacidade para amostras, o que aumenta a sua preferência comparativamente com as colunas com um único capilar [55]. Estas características tornam favoráveis a utilização do MCC em combinação com o IMS [55].

Para além disto, considerando a utilização deste conjunto torna-se possível efectuar uma pré-separação dos analitos da respiração humana, e obter uma maior sensibilidade a baixas concentrações, na gama de  $ngL^{-1}$  e  $pgL^{-1}$  [50, 51]. Assim, esta elevada sensibilidade permite fazer a detecção dos compostos voláteis de forma directa, sem que seja necessário recorrer a qualquer processo de pré-concentração [50, 54]. Como outra grande vantagem desta adição está a rapidez de análise que permite a quantificação e identificação de analitos em menos de 10 minutos [50, 54].

Considerando a combinação MCC - IMS é possível obter um novo tipo de espectros, nos quais a separação das substâncias ocorre tendo em conta o seu tempo de deriva e o tempo de retenção [54]. Tal como já foi referido, o tempo de deriva está relacionado com o tempo que a nuvem iónica demora a percorrer o tubo de deriva até atingir o detector [54]. Por outro lado, este novo tempo considerado, o tempo de retenção, relaciona-se com o tempo que demora a ocorrer a pré-separação na coluna multicapilar adicionada. A figura 3.3 apresenta um exemplo destes espectros.

Ao ocorrer a referida pré-separação da amostra, previamente complexa, dá-se uma redução do número de interações aquando da formação de *clusters* na região de ionização do IMS. Com isto, evita-se a transferência de carga e de descarga simultânea, fazendo com que os analitos cheguem a região com tempos diferentes. Garante-se assim que



**Figura 3.3:** Exemplo de um espectro, em mapa de cores. No eixo das abcissas apresenta-se o tempo de deriva, e no eixo das ordenadas o tempo de retenção, obtido pela adição da coluna multicapilar. Imagem obtida em laboratório.

ocorre uma ionização efectiva da maioria dos analitos da amostra [54].

É ainda importante referir que quando se pretende analisar uma amostra do ar exalado humano, esta amostra apresenta uma quantidade demasiado elevada de humidade. Nestes casos, utilizando a coluna multicapilar, a influência da humidade é reduzida de forma significativa, evitando interpretações erróneas dos espectros obtidos [54].



# 4

## Materiais e Métodos

A análise do ar exalado como método auxiliar de diagnóstico não-invasivo não tem recebido o devido reconhecimento, apesar da sua associação aos diferentes estados metabólicos dos pacientes. Da mesma forma, a sua utilização em maior escala em locais de interesse, como hospitais e clínicas, não se tem verificado por diversas razões. Entre estas razões destaca-se, especialmente, o tipo de instrumentação inadequado para o seu fácil transporte e utilização. [30].

Desta forma, para que os métodos de análise do ar exalado possam constituir uma alternativa às análises convencionais, nomeadamente de sangue e urina, é necessário que os instrumentos considerados sejam fáceis de utilizar, portáteis e com possibilidade de adquirir informações em tempo real [30].

### 4.1 Equipamento de análise: BreathSpec<sup>®</sup>

Para a realização dos testes e análises constituintes deste trabalho experimental foi utilizado o BreathSpec<sup>®</sup>, fabricado pela empresa *G.A.S. Gesellschaft für analytische Sensorysysteme mbH*, sediada em Dortmund, na Alemanha.

Pela figura 4.1 identifica-se, de forma imediata, no painel frontal do BreathSpec<sup>®</sup>, um ecrã que permite apresentar o interface gráfico com o utilizador. Destaca-se também, na parte frontal, a existência de dois botões: um botão de *escape*, que permite cancelar acções, e um botão rotativo, para facilitar a interacção do utilizador com os elementos da interface do aparelho. Para além disso, observa-se igualmente um LED *Power*, que indica se o equipamento está ou não em funcionamento, e uma entrada USB que permite não só transferir os ficheiros dos espectros obtidos, mas também realizar actualizações do *firmware* e guardar informações relativas às definições do próprio sistema.



(a)



(b)

**Figura 4.1:** a) Imagem do BreathSpec®. b) Imagem do painel frontal do equipamento.

Por último, e talvez a componente mais relevante, destaca-se a entrada indicada como *Sample* e que, tal como o nome indica, é onde se dá a entrada da amostra em análise. Aqui se efectua a ligação de um tubo que por sua vez se encontra ligado ao espirómetro, como o que se apresenta na figura 4.2. O espirómetro é um elemento de extrema importância, pois é através deste que o participante no processo de análise irá soprar para que se dê a entrada do ar exalado no interior do BreathSpec®. A recolha das amostras, por este método, é simples e confiável devido à existência de um sensor de  $CO_2/O_2$  no próprio espirómetro que permite garantir que somente ar alveolar entra no BreathSpec® para análise.

Na tabela 4.1 são apresentadas as características do espirómetro utilizado.

**Tabela 4.1:** Tabela com as características do espirómetro acoplado ao BreathSpec®

	$CO_2$	$O_2$	Volume do fluxo
<b>Amplitude</b>	0-10 Vol% $CO_2$	10-21 Vol% $O_2$	0-16 l/s
<b>Resolução</b>	0,01 Vol% $CO_2$	0,01 Vol% $O_2$	
<b>Precisão</b>	$\pm 0,1$ Vol% $CO_2$	$\pm 0,1$ Vol% $O_2$	< 0,3 %
<b>T10-90</b>	< 100 ms	< 100 ms	< 100 ms

A alimentação do aparelho é feita por meio da corrente eléctrica, através de um um





**Figura 4.2:** Imagem do espirômetro associado ao BreathSpec®

transformador com ligação no painel posterior do BreathSpec®. Neste painel destacam-se também o botão de *Power*, para colocar o aparelho em funcionamento, e um conjunto de entradas para permitir conectar o aparelho com outros equipamentos externos, como um modem ou um computador portátil.

Há que referir, devido à sua importância no momento de análise, as entradas para os gases de deriva e de arraste (indicados no painel como *Driftgas* e *Carriergas*), e as saídas quer da amostra (*Sample*) quer do gás. Com isto, permite-se a entrada dos gases que são importantes para o transporte da amostra ou a formação do *RIP*, e também a saída destes mesmos gases e da quantidade excedente da amostra. Habitualmente, uma vez que o BreathSpec® se encontra permanentemente no laboratório, a evacuação dos excedentes é feita através dos mecanismos adequados. No caso em que se pretende transportar o aparelho para outro local o evacuamento pode ser realizado para a atmosfera circundante, na medida em que nenhum dos componentes envolvidos nas análises é tóxico.

Feita a descrição física do aparelho passa-se agora à descrição do interior do mesmo. Este equipamento tem como princípio de funcionamento a Espectrometria de Mobilidade Iónica, descrita no capítulo 3, e portanto permite a obtenção de resultados em poucos minutos. Detecta marcadores no ar exalado com concentrações ao nível dos ppb e ppt.

De forma mais detalhada, pode observar-se na figura 4.3 os elementos constituintes do interior deste aparelho. Este é então constituído por:

- um espirômetro (*Breath*);
- uma válvula de 6 vias (V);
- um *loop*;
- uma bomba de sucção (P);
- dois fluxómetros (EPC1 e EPC2);
- uma coluna multicapilar (MCC);

- sensores de temperatura (T1, T2 e T3)
- o IMS propriamente dito.

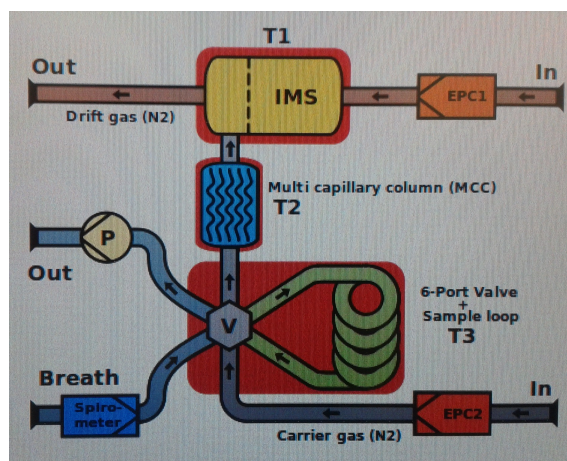


Figura 4.3: Esquema dos elementos internos do BreathSpec<sup>®</sup>

O espirômetro, tal como mencionado anteriormente, é o elemento que permite a entrada do ar exalado a ser analisado. Quanto à entrada do gás de arraste e do gás de deriva é feita através dos fluxômetros, EPC1 no caso do gás de deriva e EPC2 no caso do gás de arraste. É importante salientar que o gás utilizado nestas análises é o azoto, ou ar sintético 5.0, 99,999%.

Por sua vez, a válvula alterna entre duas posições de funcionamento e é responsável por auxiliar na passagem quer do analito quer do gás de arraste, fazendo a ligação entre os diferentes componentes do aparelho. Assim, inicialmente, quando a válvula se encontra na sua posição normal (designada por posição A), dá-se a entrada do gás transportador para a coluna multicapilar, onde as substâncias são pré-separadas de acordo com as suas propriedades físico-químicas. Em simultâneo, nesta situação, o analito flui através do *loop* (um tubo de vidro em espiral), com auxílio da bomba. O excesso de analito é expulso através da respectiva saída, ficando o restante retido no próprio *loop*. A bomba, usualmente, encontra-se a funcionar com uma potência de 25% pois é o sugerido pelo manual do BreathSpec<sup>®</sup>. Esta potência permite a entrada de 200 *ml/min* de amostra no *loop*.

Para se dar início à análise propriamente dita a válvula de seis vias muda para a segunda posição (Posição B). Com a válvula nesta posição dá-se a entrada do gás de arraste no *loop* permitindo transportar a amostra até à coluna multicapilar, onde irá sofrer a primeira separação. Após esta pré-separação os compostos vão entrando no IMS para serem analisados de acordo com o princípio descrito no capítulo 3. No IMS a entrada do gás de deriva faz-se pelo fluxómetro EPC1, como já foi referido, e a sua saída ocorre no lado oposto do tubo de medição.

Os sensores de temperatura presentes, tal como se observa pelo esquema, encontram-se nas regiões mais relevantes, ou seja, no IMS, na coluna multicapilar e no conjunto da válvula com o *loop*. Estes permitem indicar a cada momento qual a temperatura nestas zonas evitando portanto o sobreaquecimento. A temperatura normal de funcionamento para estes componentes é de 40 °C para o MCC e para o *loop*, e 45 °C para o IMS.

A tabela 4.2 sumariza algumas das características do aparelho utilizado no procedimento experimental.

**Tabela 4.2:** Algumas características técnicas do BreathSpec® utilizado neste trabalho experimental

<b>Dimensões</b>	449 × 375 × 177 mm ( <i>L × P × A</i> )
<b>Peso</b>	15,5 kg
<b>Consumo Energético</b>	< 160 Watt
<b>Princípio de Funcionamento</b>	IMS
<b>Ionização</b>	Fonte de radiação $\beta$ (Trítio - $^3\text{H}$ )
<b>Radioactividade da fonte</b>	300 MBq
<b>Volume do loop</b>	5 ml
<b>Comprimento do tubo de deriva (<math>l_d</math>)</b>	5 cm
<b>Comprimento da Coluna Multicapilar</b>	20 cm

#### 4.1.1 Interface com o utilizador

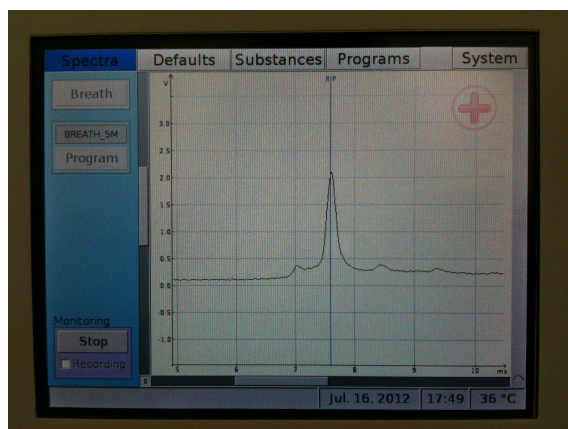
Como já foi mencionado na secção anterior, o BreathSpec® possui um ecrã e um botão rotativo para permitir a interface com o utilizador. O programa utilizado pelo aparelho é de utilização simples e intuitiva, fazendo uso somente do botão rotativo com possibilidade de seleccionar o que se pretende pressionando-o.

O programa em questão foi desenhado de forma a permitir a visualização a qualquer momento do espectro de mobilidade. Isto constitui uma vantagem pois é possível monitorizar o aparelho quando não está em processo de análise, mas também permite observar aquilo que se está a obter durante o mesmo.

Para além disso, nesta interface, existe um conjunto de menus nos quais o utilizador pode navegar e realizar diferentes funções, desde alterar configurações do sistema ou definir diferentes programas de análise.

De uma forma geral, o utilizador pode alterar diversos parâmetros desde a potência da bomba, aos fluxos de gás a entrar no sistema de acordo com as necessidades, ou mesmo alternar entre as polaridades positiva e negativa de análise. Através do menu *Defaults* pode-se verificar estes parâmetros e, mais importante, verificar os níveis dos gases utilizados e as temperaturas identificadas anteriormente.

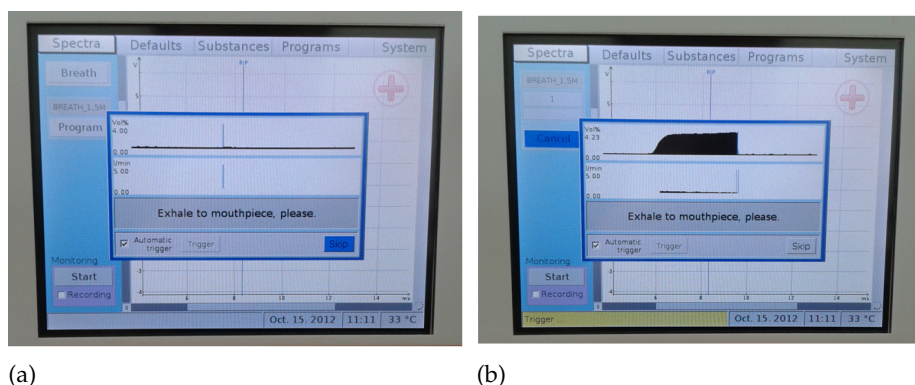
Mais relevante pode considerar-se a janela *Spectra* na qual se encontra o botão que permite iniciar o programa escolhido. No caso do BreathSpec® esta acção pode ser manual, seleccionando o botão *Program*, ou automática, pela selecção do botão *Breath*.



**Figura 4.4:** Imagem da janela principal da interface do BreathSpec<sup>®</sup>. Obtida em laboratório.

Uma imagem desta interface pode ser observada na figura 4.4. Neste caso, encontra-se seleccionada a janela *Spectra* com a opção de monitorização activada, podendo ver-se o pico dos iões reactivos naquele instante.

Accionando este botão surge uma janela referente ao espirómetro que inicia neste momento o seu funcionamento. Neste momento a interface mostra um gráfico de forma a acompanhar o processo de expiração, figura 4.5. Quando este é iniciado observa-se um gráfico que vai demonstrando a sua regularidade. É desejável que o participante prossiga a soprar pelo espirómetro até ao momento em que se consegue ouvir o barulho de mudança de posição da válvula.



**Figura 4.5:** a) Imagem de inicialização do espirómetro, após a selecção do botão *Breath*. b) Imagem do *display* gráfico do fluxo da respiração. Inicia-se no momento de início de exalação. Imagens obtidas em laboratório.

## 4.2 Requalificação da Mobilidade

### 4.2.1 Montagem da Estrutura de Transporte

Apesar de, em comparação com outros métodos, o IMS apresentar a vantagem da mobilidade, esta ainda não era adequada ao seu transporte e fácil utilização em hospitais onde era pretendido. Com este intuito procedeu-se à requalificação da mobilidade do aparelho.

Numa fase inicial, foram medidas as várias dimensões do BreathSpec<sup>®</sup> para, desta forma, ser possível decidir quanto ao tipo de mecanismo a considerar. Tal como foi referido, estas medidas, assim como outras características importantes do equipamento, estão destacadas na tabela 4.2.

Para além do problema da fácil mobilidade, problema este que foi resolvido com o recurso a quatro rodas, foi também necessário ter em conta a necessidade de espaço para guardar todo o tipo de materiais a utilizar, desde filtros, bocais e luvas, a material de recolha de dados, entre outros. No planeamento efectuado considerou-se ainda uma prateleira superior, com o objectivo de servir de base para um computador portátil que, em ligação ao IMS, permite obter os espectros poucos minutos após a recolha. Por fim, mas não menos relevante, as dimensões do equipamento de transporte foram decididas considerando a altura e diâmetro da garrafa de gás necessária ao funcionamento do BreathSpec<sup>®</sup>. Tendo em conta todas estas informações optou-se pelo equipamento todo em aço inoxidável que se apresenta na figura 4.6, com dimensões de  $98 \times 57 \times 86$  ( $C \times L \times A$ ).



**Figura 4.6:** Estrutura em aço inoxidável

De seguida, e já com toda a estrutura principal de transporte definida, procedeu-se à decisão da melhor forma de incluir a garrafa de azoto. Por questões estéticas e de facilidade de ligações esta ficou colocada na parte traseira da estrutura, pelo que foi necessário efectuar dois furos nas prateleiras superiores com o diâmetro adequado à garrafa. Para

além disso, estes furos foram projectados de forma a ficarem o mais centrados possível para que, aquando do esvaziamento da garrafa de gás, não ocorressem problemas de equilíbrio de todo o equipamento de transporte.

Por último, optou-se por revestir as zonas laterais da estrutura com uma tela para ficar esteticamente mais apresentável, e esconder todos os cabos e materiais necessários ao funcionamento, mas que não é preciso estarem visíveis. Numa das extremidades desta tela fez-se um pequeno furo para permitir a saída do suporte do espirómetro. A figura 4.7 permite visualizar a estrutura final obtida, e a mesma estrutura após a colocação do BreathSpec<sup>®</sup>.



(a)



(b)

**Figura 4.7:** a) Imagem da estrutura de transporte montada. b) Imagem da estrutura final de transporte, com o BreathSpec<sup>®</sup> e o computador portátil utilizado para visualização dos espectros.

### 4.3 Ligações e Configurações

No processo de requalificação da mobilidade é essencial ter em conta as ligações a realizar, de forma a que estejam asseguradas todas as condições para o início do processo de análise. Com isto as principais ligações a considerar são a ligação do equipamento à corrente, a ligação que se estabelece entre o BreathSpec<sup>®</sup> e a garrafa de azoto e

a ligação do computador ao próprio aparelho.

A primeira ligação referida é bastante simples, ligando o transformador do aparelho directamente à corrente eléctrica. Por uma questão de ser mais prático optou-se por incluir no material que acompanha o BreathSpec<sup>®</sup> uma extensão, permitindo desta forma que caso o local de análise não possua várias tomadas seja possível ter a alimentação necessária, não só para o aparelho mas também para o computador e para o *router*.

Por outro lado, a ligação da botija de gás faz-se pelas entradas presentes no aparelho, permitindo desta forma a passagem do azoto essencial para a formação dos iões reactivos e para ser usado como gás de transporte. Existe ainda uma saída na face posterior do equipamento para que se dê a evacuação do gás após a utilização, no entanto, neste caso, esta é feita directamente para o exterior.

Por último, a ligação entre o computador portátil e o BreathSpec<sup>®</sup> é feita com recurso a um *router* e a cabos de rede. Assim, liga-se um cabo de rede do computador ao *router*, e outro cabo de rede do *router* ao aparelho.

Inicialmente, estas ligações eram efectuadas com recurso a um cabo de rede cruzado directamente do aparelho ao computador. Com isto o BreathSpec<sup>®</sup> adquiria um IP e a informação era passada para o portátil. Verificou-se no entanto que, mudando o aparelho para outro local, e quando é necessário desligá-lo da corrente, este admite o IP anteriormente adquirido como certo. Isto trazia diversos problemas pois noutra local com uma rede de internet diferente, ou que não tenha mesmo ligação à internet, não havia facilidade na passagem dos espectros para o computador. Nesta situação esta apenas poderia ser feita através da entrada USB do BreathSpec<sup>®</sup>, o que não se tornava prático. A solução referida com utilização do *router* permite desta forma que seja adquirido um IP em qualquer situação.

## 4.4 Material

Após todo o planeamento e construção da estrutura para a deslocação do BreathSpec<sup>®</sup>, elaborou-se a lista em que são discriminados os materiais necessários para o início do processo de análise. Desta lista fazem parte não só elementos de ligações entre o aparelho e outros equipamentos, como o computador, mas também materiais importantes para a parte de recolha de dados propriamente dita. A referida lista é apresentada a seguir:

- Filtros e boquilhas descartáveis
- Luvas
- Bata de laboratório
- Álcool, papel absorvente e outro material de limpeza
- Computador e acessórios
- Router e respectivo transformador

- Cabos de rede
- Extensão
- Manorredutor
- Botija de gás de azoto 5.0
- Chave inglesa e chave n° 12
- Peças *swagelok*
- Tubo de *Teflon* de 3 mm
- Medidor de tensão
- Higrómetro
- *BreathSpec*<sup>®</sup> *User Manual*
- Manual de ligações
- Protocolos e questionários (quando necessário)

## 4.5 Protocolo de limpeza

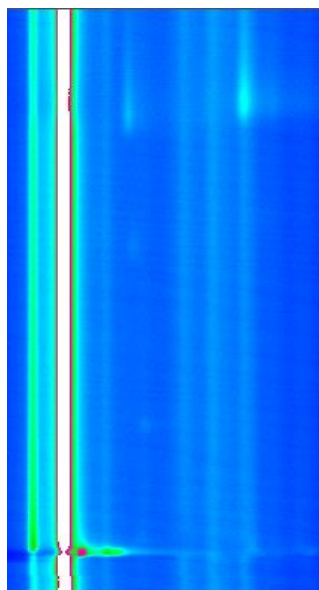
O ambiente hospitalar é um ambiente em que se pretende que o material clínico utilizado seja devidamente limpo e esterilizado para a sua utilização.

Desta forma, e, uma vez que o principal objectivo deste trabalho está relacionado com a possível utilização do *BreathSpec*<sup>®</sup> em centros hospitalares ou semelhante, a questão da limpeza e desinfecção do material adquire uma maior relevância. Nesse sentido, optou-se por verificar a melhor forma de proceder à limpeza periódica da estrutura, evitando a contaminação dos espectros com agentes externos às análises.

A superfície da estrutura metálica construída para o transporte dos instrumentos de análise é de aço inoxidável. Assim, considerou-se a utilização de álcool etílico 96% para a limpeza da estrutura com auxílio de papel absorvente. Durante os procedimentos experimentais optou-se por limpar, de igual modo, a pega do espirómetro, sempre que possível.

Sendo o álcool etílico uma substância extremamente volátil poderia haver o risco de, após o processo de limpeza, ser detectado pelo IMS contaminando desta forma as análises realizadas posteriormente. Considerando essa situação tomou-se a decisão de testar a influência do álcool nos espectros obtidos. Para tal, limpou-se uma superfície de aço inoxidável com álcool etílico 96% e após um minuto efectuou-se análise. A análise foi executada com recurso a um dispositivo desenvolvido na empresa para análise dos VOCs em dispositivos médicos, e que é acoplado ao MCC-IMS [56]. O espectro obtido pode ser verificado pela figura 4.8.





**Figura 4.8:** Espectro obtido da limpeza periódica de uma superfície de aço inoxidável. Imagem obtida em laboratório.

Como se observa, após o passagem com o álcool a superfície em questão apresenta apenas um pico a um tempo de retenção baixo. Este pode, realmente, ser por influência do álcool na superfície, mas pode também ser devido ao ar da sala que apresenta sempre alguns compostos nos espectros. De qualquer modo, a intensidade e localização do pico que se observa não afecta a interpretação das análises. Como se poderá verificar no capítulo 5, os picos relevantes para este estudo não se encontram nesta região que, só por si, já é contaminada pelo isopreno e acetona característicos do ar exalado de qualquer pessoa. Com isto confirma-se o procedimento de limpeza considerado como adequado.

## 4.6 Testes de otimização dos parâmetros experimentais

No processo de preparação para o início das análises, considerando ainda o que se refere ao próprio BreathSpec<sup>®</sup>, é fundamental a elaboração dos cálculos para determinar alguns parâmetros, como o tempo de abertura da válvula ou o volume de amostra a entrar no *loop*.

Inicialmente, mediu-se o comprimento do tubo que permite fazer a ligação entre o espirómetro e o próprio aparelho, que tem cerca de cerca de 103 *cm* e um diâmetro de 1,5 *mm*. Com isto, determinou-se o volume do tubo, 1,82 *cm*<sup>3</sup>, correspondendo a 1,82 *ml* de amostra que preenche este volume.

Por sua vez, sabe-se que, durante o procedimento de recolha de amostra, a bomba é iniciada a uma potência de 25%, o que permite sugar o volume calculado. Considerando este volume, ou seja, 1,82 *ml*, e com a potência da bomba referida, correspondendo a 200 *ml/min*, determina-se que a válvula terá que se manter na posição inicial no mínimo

0,546 s para puxar toda esta quantidade. No entanto, este volume não é suficiente para encher o *loop*, que possuiu uma capacidade de 5 ml. Assim, tem que se considerar um tempo maior para o participante estar a exalar para o espirómetro e um tempo maior para a mudança de posição da válvula.

Tendo então em conta a capacidade do *loop* e o volume que preenche o tubo do espirómetro (6,82 ml), foi determinado um tempo até mudança de posição da válvula de 2,046 s. Até este momento, enquanto o participantes estiver a soprar, verifica-se a entrada de amostra no *loop*, que será arrastada para a coluna multicapilar após este período.

Em relação ao volume dos gases de deriva e de arraste considera-se, nas análises habituais, 500 ml/min e 25 ml/min, respectivamente. Mantendo o volume do gás de deriva, uma vez que por experiências anteriores se verificou que este permite uma melhor separação dos compostos, optou-se por realizar testes alterando o volume do gás de arraste. Assim, realizaram-se testes para um volume de arraste de 15 ml/min e 50 ml/min com consequentes alterações no tempo em que a válvula se encontra aberta e no volume de gás a entrar no *loop*. As hipóteses testadas encontram-se resumidas na tabela 4.3.

**Tabela 4.3:** Hipóteses de otimização dos parâmetros de análise.

Hipótese	Fluxo de arraste (ml/min)	Tempo de abertura da válvula (s)	Volume a entrar no <i>loop</i> (ml)
1	25	3,024	1,26
2	15	5,040	1,26
3	15	8	2
4	50	1,512	1,26
5	50	3,024	2,52

Em seguida, avaliaram-se os espectros obtidos em cada uma das situações indicadas, e concluiu-se que a hipótese mais indicada foi a de manter o gás de arraste de 25 ml/min.

A tabela 4.4 apresenta de forma sucinta os parâmetros atrás definidos, assim como outros parâmetros importantes para a análise e que foram mantidos nos valores recomendados pelo manual do BreathSpec®.

**Tabela 4.4:** Parâmetros experimentais do BreathSpec<sup>®</sup>.

<b>Gás de deriva e gás de arraste</b>	Azoto 5.0, 99,999%
<b>Fluxo do gás de deriva</b>	500 <i>ml/min</i>
<b>Fluxo do gás de arraste</b>	25 <i>ml/min</i>
<b>Temperatura do IMS (T1)</b>	45 °C
<b>Temperatura do MCC (T2)</b>	40 °C
<b>Temperatura da válvula e <i>loop</i> (T3)</b>	40 °C
<b>Tempo de abertura da grelha (<math>\Delta\tau</math>)</b>	100 $\mu s$
<b>Potência da bomba</b>	25%
<b>Averaging</b>	5
<b>Tensão</b>	Positiva (2 <i>kV</i> )
<b>Intensidade do campo</b>	400 <i>V cm<sup>-1</sup></i>

#### 4.6.1 Definição do programa de análise

Determinados os parâmetros fundamentais para a análise elaborou-se, no próprio BreathSpec<sup>®</sup>, o programa de análise (a que se chamou HEMODIALISE) como se apresenta na tabela que se segue.

**Tabela 4.5:** Programa HEMODIALISE utilizado no BreathSpec<sup>®</sup>. Definido previamente para os procedimentos de recolha do ar exalado dos pacientes em hemodiálise.

Spectra	Time	V	P	R	E1	E2	T1	T2	S
0	0 ms			rec					
18	2.268 s	open							
42	5.292 s	close							
717	01m30s			stop					
718	01m30s								

#### Legenda:

- V – Válvula: definir a alteração da posição da válvula
- P – Bomba: determinação do fluxo de funcionamento (%)
- R – Gravação do espectro (*rec* ou *stop*)
- E1 – Valores do fluxo do gás de deriva
- E2 – Valores do fluxo do gás de arraste
- T1 – temperatura do IMS
- T2 – Temperatura da MCC
- S – Área de análise de substâncias

Neste programa definiu-se um tempo de mudança da válvula de 2,268 *s*. Este valor é superior ao determinado anteriormente, e corresponde a um volume consequentemente superior a entrar no sistema, 7,56 *ml*. O excedente considerado serve para compensar possíveis perdas de analito durante o percurso até ao IMS onde será analisado.

Na tabela 4.5 definiram-se mais dois tempos diferentes. O primeiro tempo determinado foi de 5,292 s e diz respeito ao tempo em que a válvula se mantém na sua posição B (explicada anteriormente), durante o qual se dá a passagem do gás de arraste para fazer chegar a amostra contida no *loop* até à coluna multicapilar. Os valores seguintes são iguais e referem-se ao tempo total de análise. Neste momento é terminado o processo de aquisição de dados. Este tempo ficou definido em 1 minuto e 30 segundos, uma vez que considerando que se tratam de análises realizadas num centro hospitalar na unidade de hemodiálise, com horários altamente controlados, não é possível reter os pacientes por muito tempo. Este tempo é mais relevante após a acção de exalação por parte do paciente, pois representa um período em que o BreathSpec<sup>®</sup> está a processar os analitos não se podendo realizar novas análises.

Considerou-se também um outro programa idêntico ao apresentado na tabela 4.5 mas com um tempo de análise inferior (1 minuto). Este programa foi criado previamente para ser escolhido caso se verificasse que o programa inicial era demasiado longo.

## 4.7 Procedimento experimental

Em suma, até este momento, foi feita a descrição do processo de preparação das análises a realizar no Hospital Garcia de Orta. Procedeu-se à requalificação da mobilidade do BreathSpec<sup>®</sup> e definiu-se o material importante para as análises, e que portanto tem que acompanhar o transporte do aparelho. Foi ainda realizado um conjunto de testes para determinar a melhor forma de proceder à limpeza periódica do equipamento, assim como testes para determinação dos parâmetros adequados à análise. Reunidas todas estas condições, iniciou-se o processo de recolha do ar exalado de alguns pacientes em tratamento por hemodiálise no hospital.

O grupo de pacientes que participaram nos testes deste estudo de prova de conceito foram seleccionados pelos médicos responsáveis pelo serviço de Nefrologia do Hospital Garcia de Orta, de entre turnos dos dois dias de recolha combinados. Como critério de selecção foi tido em conta, essencialmente, a capacidade do paciente de poder soprar pelo bocal descartável colocado no espirómetro, durante o tempo necessário. Todos os participantes aceitaram contribuir para este estudo voluntariamente e de forma anónima, assinando para tal um consentimento informado. Um exemplo deste consentimento encontra-se em anexo (Anexo A).

Somente os dados mais relevantes destes pacientes foram fornecidos, de igual modo, pelos médicos responsáveis de acordo com o questionário, também apresentado em anexo (Anexo B). Para alguns dos pacientes não foi possível adquirir as referidas informações, por motivos alheios ao estudo. Como é referido no consentimento, as informações recolhidas no decorrer deste estudo são anónimas e não serão de forma alguma divulgadas fora do âmbito deste estudo.

Assim, os participantes em tratamento de hemodiálise foram divididos em três grupos consoante o horário de hemodiálise que realizam: grupo A, para os pacientes do

turno intermédio do primeiro dia de recolha; grupo B, dos pacientes do último turno, igualmente, do primeiro dia; e grupo C, para os pacientes do turno intermédio do segundo dia de recolha de amostras.

A tabela 4.6 engloba as informações relativas aos pacientes pertencentes ao primeiro grupo de análise (Grupo A).

**Tabela 4.6:** Tabela com os dados referentes ao Grupo A, de pacientes em hemodiálise do turno intermédio do primeiro dia de recolha.

Paciente	Idade	Género	Peso no início da sessão (kg)	Peso no final da sessão (kg)	Tensão arterial
1	53	F	72,7	70,0	142/73
2	53	M	64,1	60,9	153/63
3	60	F	91,5	88,5	163/113
4	70	F	37,6	35,9	177/81
5	-	M	-	-	-

**Legenda:**

F Feminino

M Masculino

- Informação não disponível

Durante a realização da recolha do ar exalado dos voluntários deste grupo verificou-se que, devido às suas condições físicas mais debilitadas, exibiam algumas dificuldades em exalar o tempo necessário para adquirir a quantidade de amostra pretendida, ou não compreendiam o procedimento correcto para o fazer. Nesse sentido, no capítulo 5, a análise dos resultados respeitantes a este grupo será efectuada em separado dos restantes.

Inicialmente, utilizou-se o programa HEMODIALISE descrito anteriormente mas, dadas as dificuldades sentidas, optou-se por reduzir o tempo até a válvula mudar de posição. Para tal, elaborou-se um novo programa designado por BREATH\_1,5M, cujas características se descrevem na tabela 4.7.

**Tabela 4.7:** Programa de análise BREATH\_1,5M, definido no BreathSpec®.

Spectra	Time	V	P	R	E1	E2	T1	T2	S
0	0 ms			rec					
16	2.016 s	open							
40	5.040 s	close							
717	01m30s			stop					
718	01m30s								

De seguida, nas tabelas 4.8 e 4.9, transcrevem-se os dados respeitantes aos pacientes dos outros dois grupos. Foram considerados 6 voluntários adultos para o Grupo B e 5 voluntários, igualmente adultos, para o Grupo C.

**Tabela 4.8:** Tabela com os dados referentes ao Grupo B, de pacientes em hemodiálise do turno final do primeiro dia de recolha.

Paciente	Idade	Género	Peso no início da sessão (kg)	Peso no final da sessão (kg)	Tensão arterial
1	55	M	97,5	93,4	179/83
2	80	M	77,0	74,5	144/51
3	-	M	-	-	-
4	-	M	-	-	-
5	63	F	59,0	57,4	113/72
6	52	F	113,9	108,6	148/69

**Tabela 4.9:** Tabela com os dados referentes ao Grupo C, de pacientes em hemodiálise do turno intermédio do segundo dia de recolha.

Paciente	Idade	Género	Peso no início da sessão (kg)	Peso no final da sessão (kg)	Tensão arterial
1	50	F	73,6	69,9	183/95
2	84	M	61,0	59,0	137/70
3	65	F	57,8	56,5	104/57
4	73	F	103,0	99,8	142/35
5	26	M	66,6	63,3	162/85

É importante referir que as informações aqui apresentadas são gerais, apresentando-se em anexo um conjunto de informações mais específicas (Anexo D).

Como método de comparação para se determinar a existência de picos característicos no ar exalado dos doentes renais, foi pedido a um conjunto de voluntários saudáveis, que constituem o grupo de controlo, que realizassem o mesmo teste com o BreathSpec<sup>®</sup>. Foram considerados 11 voluntários adultos, e também a estes participantes foi pedido que assinassem o consentimento informado do anexo. Registaram-se também algumas informações de acordo com o questionário no anexo C. A tabela 4.10 reúne as informações relativas a este grupo de controlo.

Ainda para termo de comparação, foi efectuada a análise ao ar da sala no período antes e após a realização de cada conjunto de análises.

## 4.8 Análise dos resultados: *Software LAV*

A visualização e análise dos espectros obtidos com a recolha do ar exalado utilizando o BreathSpec<sup>®</sup> recorre ao *software* de análise *LAV*, que funciona em conjunto com este equipamento. Para este estudo experimental foi utilizada a versão 1.5.19 do *LAV*, desenvolvida pela empresa G.A.S. *Gesellschaft für analytische Sensorsysteme mbH*.

Após a realização da análise pelo BreathSpec<sup>®</sup>, este guarda um ficheiro de extensão *.mea* que é transferido para o computador, onde pode ser visualizado como mapa de cores. No caso específico do BreathSpec<sup>®</sup> é também criado um ficheiro *.mea.spr* associado

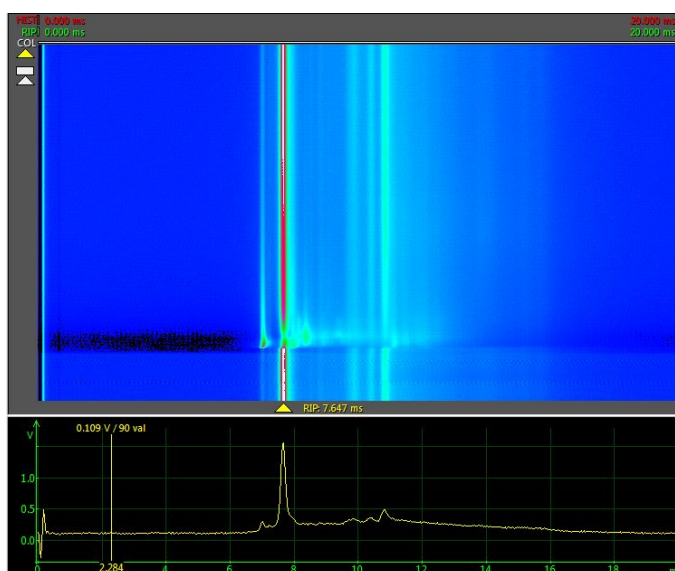
**Tabela 4.10:** Tabela com os dados referentes ao Grupo de Controlo.

Participante	Idade	Género	Peso (kg)	Tensão arterial inicial	Doenças relevantes	Medicamentos
1	23	F	72	143/83	Não	Não
2	23	M	75	123/77	Não	Não
3	23	M	79	140/62	Não	Não
4	23	F	45	102/63	Não	Não
5	24	M	52	116/70	Não	Não
6	23	M	80	152/83	Não	Não
7	23	F	63	109/68	Não	Não
8	22	F	55	121/73	Não	Não
9	27	F	63	139/92	Não	Sim
10	27	M	70	134/71	Não	Não
11	27	F	50	126/79	Não	Não

à utilização do espirómetro.

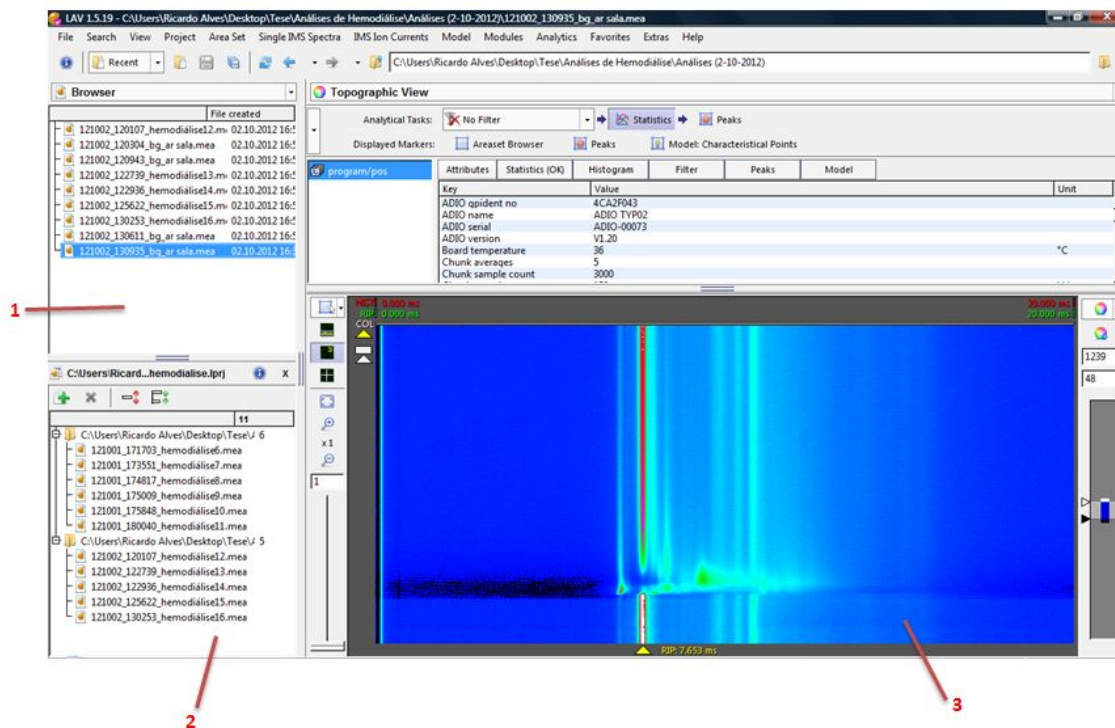
O *LAV* permite não só observar os picos associados à amostra recolhida através de um mapa de cores, mas possui também a opção de visualizar em simultâneo o espectro individual de cada um dos picos obtidos. Este espectro corresponde ao espectro de mobilidade mencionado no capítulo 3, indicando assim o resultado obtido pela análise no tubo de medição IMS, enquanto que o mapa de cores acrescenta o tempo de retenção associado à coluna multicapilar.

Na figura 4.9 apresenta-se um exemplo dos espectros referidos, obtidos em laboratório.



**Figura 4.9:** Exemplo da visualização no *software LAV* de uma análise obtida em laboratório. Na figura de cima observam-se os picos em mapa de cores, com o tempo de retenção no eixo dos yy e o tempo de deriva no eixo dos xx. Em baixo o respectivo espectro de mobilidade.

O programa em questão possui diversas funcionalidades que facilitam a análise dos espectros. Na janela de visualização principal destacam-se, essencialmente, três regiões mais importantes (figura 4.10).



**Figura 4.10:** Janela principal do programa LAV. 1- Ficheiros de análise; 2- Conjunto de ficheiros de um projecto criado; 3- Janela de visualização principal do espectro.

A região indicada na figura como 1 permite verificar os ficheiros que se encontram na pasta seleccionada, podendo o utilizador alternar entre cada um deles. Aquele que for escolhido é o que surge na janela de visualização dos espectros.

Por baixo desta região, e indicada com o número 2, encontra-se a zona de projectos. Estes são ficheiros do tipo *.lpr* que consistem num conjunto de espectros escolhidos pelo próprio utilizador de acordo com o seu interesse. Esta funcionalidade possibilita uma melhor organização dos dados.

A região 3 corresponde à visualização dos espectros em mapa de cores, como a imagem 4.9. Esta é a região de maior interesse pois é a que permite ao utilizador observar os resultados das análises. Associada a esta janela existe um conjunto de botões que permitem, por exemplo, fazer aparecer o espectro de mobilidade já referido, apresentar alguns parâmetros relevantes ou alterar o *zoom* de visualização. Do lado esquerdo desta janela encontra-se uma barra de alteração de cores também extremamente importante no tratamento dos dados

O LAV possui um conjunto variado de funcionalidades, no entanto, uma das mais utilizadas é a definição do *Areaset*. Através desta o utilizador delimita os picos que considera mais relevantes para a sua análise, podendo também nomeá-los. Este processo é



bastante útil na medida em que possibilita a verificação de ocorrência de determinado pico seleccionado nos restantes ficheiros.

Em relação à obtenção de resultados, o *LAV* permite realizar um conjunto de tarefas. A mais interessante é a função de *Analyze Areaset* que, tal como o nome indica, permite que após a definição do *Areaset* pretendido sejam verificados os valores de diferentes parâmetros, nomeadamente, o tempo de deriva, a intensidade dos picos e o tempo de retenção. Esta função permite também obter as informações relativas ao *RIP*. Por cada projecto analisado com esta ferramenta obtêm-se 13 ficheiros do tipo *.csv*, um ficheiro *pdf* e um ficheiro do tipo *.lmc* (ficheiro de configuração) que contêm todas as informações referentes aos picos.

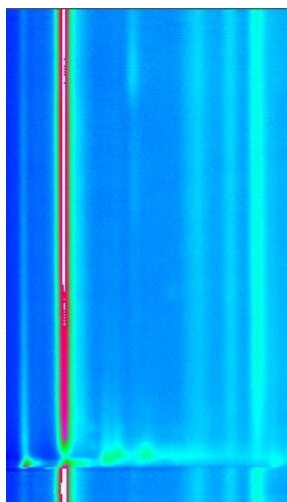


## Resultados e Discussão

### 5.1 Tratamento de dados

#### 5.1.1 Análise dos espectros e definição do *Areaset*

Depois de definidos os grupos de participantes, como foi descrito no capítulo anterior, e recolhidas as amostras respectivas para o estudo em curso, procedeu-se ao tratamento e análise dos resultados. Tal como foi mencionado, os procedimentos de análise dos espectros foram feitos com recurso ao *software LAV*, na sua versão 1.5.19.



**Figura 5.1:** Imagem do espectro de análise do ar exalado de um paciente com insuficiência renal, no período antes de iniciar o tratamento de hemodiálise

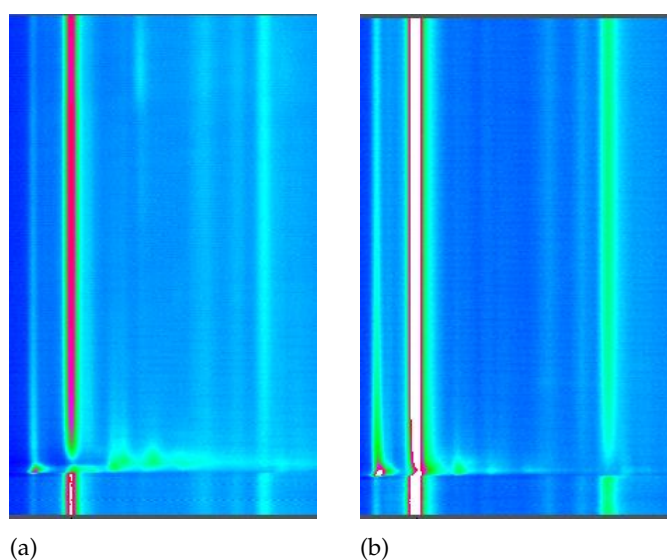
Na medida em que o estudo em questão se trata de uma prova de conceito, o principal

objectivo é observar os espectros da recolha do ar exalado dos pacientes em tratamento de hemodiálise e tentar identificar os picos característicos destas condições. Na figura 5.1 é apresentado um espectro relativo a uma amostra do ar exalado recolhida. Neste caso trata-se do espectro associado ao paciente em tratamento de hemodialise com o número 3 do Grupo C, de acordo com a tabela 4.9.

Uma primeira observação da imagem permite distinguir diferentes picos. No entanto, sabe-se que o ar ambiente pode entrar pelo tubo do espirómetro contaminando assim o espectro final. Quer isto dizer que, o espectro obtido pode conter informações que são de facto relevantes para este estudo, ou seja, biomarcadores associados às doença renais, mas pode também ter outro tipo de compostos indesejados.

Uma das vantagens de utilização deste método de análise está na possibilidade de eliminar o *background* do ar da sala, e para tal procedeu-se à recolha deste utilizando o mesmo método. Para além da contaminação pelo ar da sala, existe um conjunto de picos, nomeadamente a acetona e o isopreno, que são picos característicos do ar exalado humano e que podem induzir em erro no momento de análise dos espectros. Por este motivo foi também recolhido o ar exalado de alguns voluntários para grupo de controlo, como foi referido no capítulo anterior.

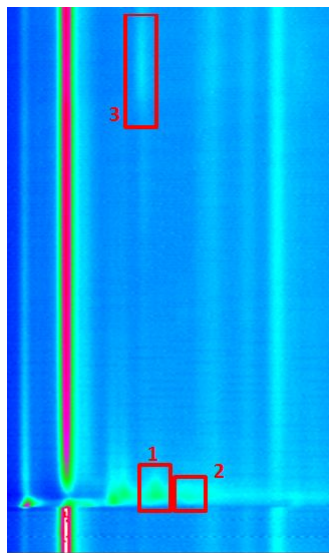
Na figura 5.2 apresenta-se, como exemplo, o espectro referente a um outro paciente em hemodiálise, e um espectro referente a um participante do grupo de controlo.



**Figura 5.2:** **a)** Imagem do espectro de análise do ar exalado de um paciente em tratamento por hemodiálise. **b)** Imagem de um espectro de análise do ar exalado de um participante do grupo de controlo.

Pela análise visual dos espectros, incluindo não só todos os espectros de controlo e do ar da sala, mas também todos os espectros dos pacientes, foi possível definir um *Areaset*. Nesta observação verifica-se que no conjunto de picos que foram obtidos, três deles aparecem de forma mais evidente nas imagens referentes ao grupo de pacientes, e não se verifica a sua ocorrência nos outros casos. Desta forma, concluiu-se que estes picos

podem estar de alguma forma associados à condição de insuficiência renal dos participantes no estudo. A figura 5.3 apresenta novamente o espectro anterior (pertencente ao paciente número 2 do Grupo B) mas, desta vez, com o *Areaset* definido assinalado a vermelho. A cada um dos picos foi atribuído um número de 1 a 3 para facilitar a posterior identificação.



**Figura 5.3:** Imagem do espectro de análise do ar exalado de um paciente com insuficiência renal, no período antes de iniciar o tratamento de hemodiálise. A vermelho são identificados os picos de interesse que definem o *Areaset*, numerados de 1 a 3.

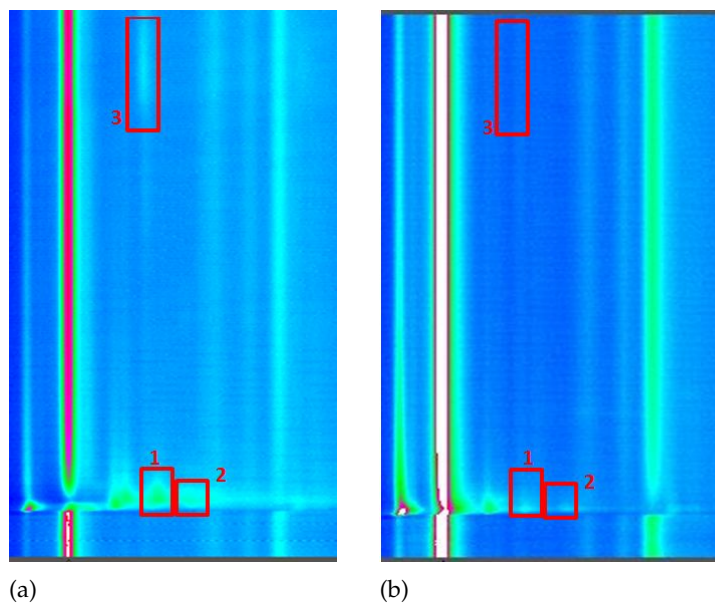
Assim que ficou devidamente definido o *Areaset*, como mostra a figura, optou-se por reavaliar os restantes espectros e reverificar se de facto os picos considerados surgiam somente nos espectros do grupo de pacientes.

No geral, como se tinha observado na análise inicial, isto verifica-se tanto para os espectros adquiridos da avaliação do ar da sala como para o caso dos espectros do grupo de controlo. É especialmente notório em relação ao Pico 3.

No que diz respeito aos outros dois picos é necessário uma avaliação mais cuidadosa, na medida em que, a baixos tempos de retenção há maior contaminação de outros compostos. Apesar disto, em qualquer um dos casos é possível ver que exibem maior intensidade e definição no grupo de pacientes. No caso particular do Pico 1 apesar de nos espectros do grupo de controlo surgir um pico nesta região, este é menos intenso e o seus tempos de retenção e deriva ligeiramente diferentes pelo que se pode concluir que não se trata do mesmo composto.

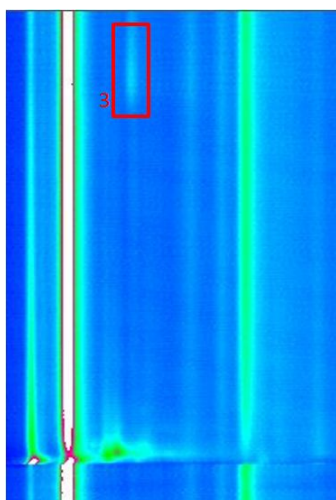
Como forma de comparação, optou-se por apresentar o espectro da 5.3 lado a lado com o espectro de um dos participantes de controlo (correspondente ao número 7 da tabela) com o *Areaset* definido.

Por fim, é importante referir que o Pico 3, como foi dito, apresenta a mais notória



**Figura 5.4:** a) Imagem do espectro de análise do ar exalado de um paciente com insuficiência renal, com identificação do *Areaset*. b) Imagem de um espectro de análise do ar exalado de um participante do grupo de controlo, com identificação do *Areaset*.

diferença entre o grupo de pacientes e o grupo de controlo, com excepção para o participante número 1 do grupo de controlo. Neste caso surge um pico na mesma região e relativamente intenso, como se observa na figura 5.5. Na fase inicial de estudo em que nos encontramos não é possível efectuar uma conclusão sobre este caso, sendo no entanto um participante a ter em atenção em estudos futuros.



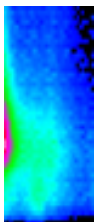
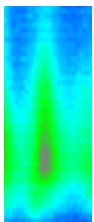
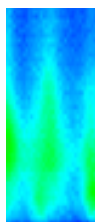
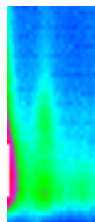
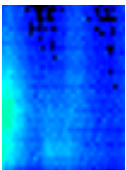
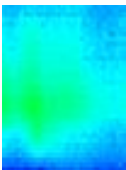
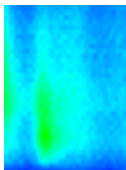
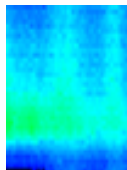
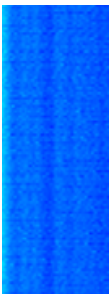
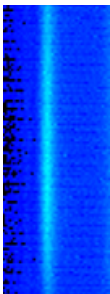
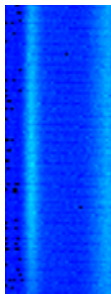
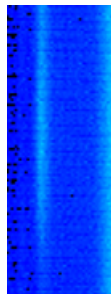
**Figura 5.5:** Imagem do espectro de análise do ar exalado do participante com o número 1 do grupo de controlo, apresentando o Pico 3 em evidência.

## 5.2 Variação da Intensidade dos picos

Encontrados os picos característicos, e que portanto se verificam de uma forma geral nos espectros pertencentes ao grupo de pacientes, é interessante avaliar as variações de intensidade em cada um dos picos seleccionados.

Com isto, na tabela 5.1 são apresentadas aproximações dos três picos identificados em diferentes situações: no caso de um exemplo de um participante do grupo de controlo, e em 3 pacientes diferentes.

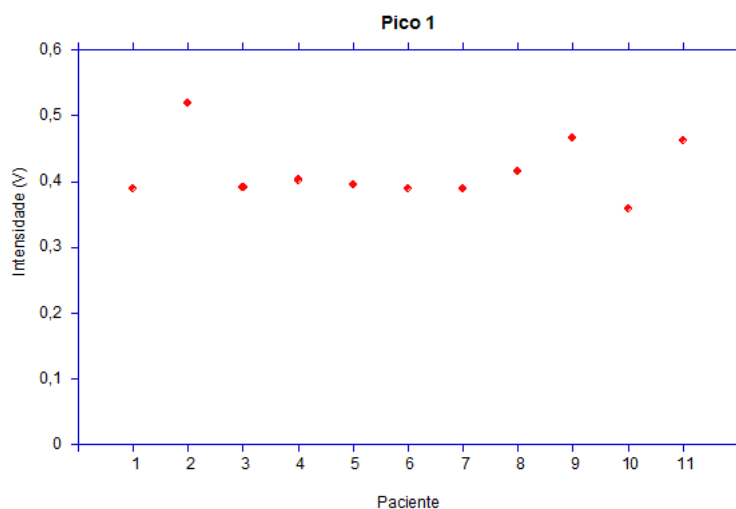
**Tabela 5.1:** Variação das intensidades dos picos num exemplo do grupo de controlo, e em 3 pacientes diferentes

	Controlo	Paciente 2 Grupo B	Paciente 4 Grupo B	Paciente 5 Grupo C
<b>Pico 1</b>				
<b>Pico 2</b>				
<b>Pico 3</b>				

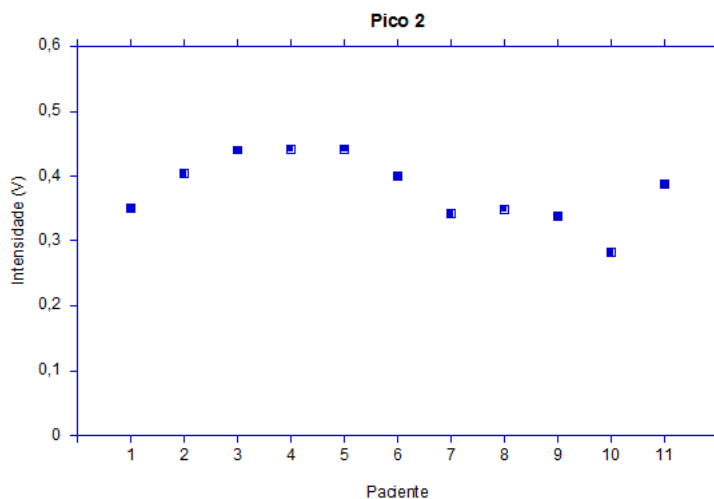
Em qualquer um dos casos, observa-se que os picos seleccionados não aparecem, de forma relevante, no grupo de controlo. É possível ainda verificar que o pico 3, apesar de surgir mais arrastado que os restantes, é o que se identifica mais facilmente aparecendo isolado. Apesar de surgir na proximidade de outros picos o Pico 1 surge, relativamente, bem definido contrariamente ao Pico 2. De uma forma geral, os picos aparentam ter intensidades semelhantes nos diferentes pacientes, e inexistentes no caso dos exemplos de controlo.

Recorrendo às funções do *LAV* é possível avaliar de forma quantitativa esta variação de intensidades dos picos. Nesse sentido, utilizou-se a funcionalidade *Analyze Areset* que permite obter diversos dados, como o tempo de deriva ou o tempo de retenção, para

os picos seleccionados no *Areaset*. Desta forma foi também permitido obter os valores pretendidos de intensidade, em volts, de cada pico. Com isto obtiveram-se os gráficos apresentados nas figuras 5.6, 5.7 e 5.8, que foram elaborados utilizando o *software* Kaleidagraph®.



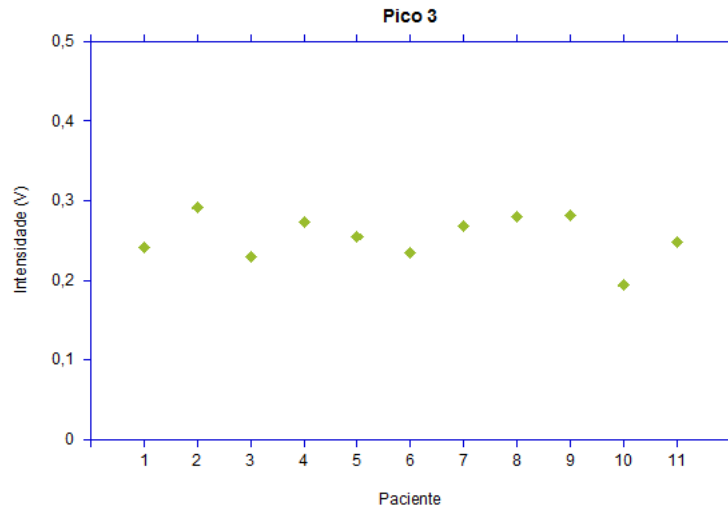
**Figura 5.6:** Gráfico da variação de intensidade do Pico 1, em cada um dos espectros do grupo de pacientes



**Figura 5.7:** Gráfico da variação de intensidade do Pico 2, em cada um dos espectros do grupo de pacientes

Tratando-se de um estudo de prova de conceito, como foi referido, o que é mais relevante é a identificação dos picos que poderão ou não estar associados ao grupo de pacientes seleccionados, pelo que a análise gráfica efectuada é simples. Desta forma, dos três gráficos elaborados verifica-se que a variação de intensidades nos diferentes espectros é menor no caso do Pico 1 (figura 5.6). Na sua maioria, este pico tem valores de intensidade





**Figura 5.8:** Gráfico da variação de intensidade do Pico 3, em cada um dos espectros do grupo de pacientes

por volta de  $0,4V$ . Nos restantes dois picos as variações de intensidade são mais notadas. No entanto, em ambos os casos o intervalo de variação não é muito elevado: pouco mais de  $0,15 V$  relativamente ao Pico 2, e uma diferença menor que  $0,8 V$  em relação ao Pico 3. Novamente, é importante referir que esta análise é meramente qualitativa, sendo necessário um estudo mais aprofundado para permitir concluir com maior exactidão as referidas diferenças.

### 5.3 Cálculo da Mobilidade Reduzida

Depois de seleccionados os picos característicos e após a análise dos espectros obtidos, foram efectuados os cálculos de mobilidade para cada um deles.

A mobilidade iónica ( $K$ ) e a mobilidade iónica reduzida ( $K_0$ ) foram calculadas recorrendo às seguintes equações, previamente indicadas no capítulo 3:

#### Mobilidade Iónica:

$$K = \frac{l_d}{Et_{dcor}} \quad (5.1)$$

$l_d$  - comprimento do tubo de deriva =  $5cm$

$E$  - intensidade do campo eléctrico =  $400Vcm^{-1}$

$t_{dcor}$  - correcção do tempo de deriva, dado por  $t_{dcor} = t_d - 0,5 \times \Delta\tau$  em que  $t_d$  representa o tempo de deriva e  $\Delta\tau$  o tempo de abertura da grelha =  $100\mu s$

**Mobilidade Iónica Reduzida:**

$$K_0 = K \left( \frac{P_d}{P_0} \right) \left( \frac{T_0}{T_d} \right) \quad (5.2)$$

$P_0$  - Pressão ambiente, 101,325 kPa

$T_0$  - Temperatura ambiente, 273 K

$P_d$  - Pressão no tubo de deriva = 101 kPa

$T_d$  - Temperatura no tubo de deriva = 313 K

Os valores dos parâmetros característicos do próprio BreathSpec<sup>®</sup> são, igualmente, indicados em cima e podem ser consultados no capítulo 4.

Na tabela 5.2 apresentam-se os valores calculados para a mobilidade reduzida de cada um dos picos considerados, assim como os valores de tempo de deriva ( $t_d$ ) e tempo de retenção ( $t_r$ ).

**Tabela 5.2:** Mobilidade iónica reduzida ( $K_0$ ) para cada um dos picos, assim como o respectivo tempo de deriva ( $t_d$ ) e tempo de retenção ( $t_r$ ).

Pico	$t_d$ (ms)	$t_r$ (s)	$K$ ( $cm^2V^{-1}s^{-1}$ )	$K_0$ ( $cm^2V^{-1}s^{-1}$ )	$1/K_0$ ( $cm^{-2}Vs$ )
1	8,984	8,316	1,399	1,220	0,819
2	9,474	9,450	1,326	1,157	0,864
3	8,779	79,380	1,432	1,249	0,801

A mobilidade reduzida é um parâmetro característico de cada substância facilitando o processo de identificação da mesma. Após a consulta da literatura não foi possível encontrar substâncias com os parâmetros idênticos aos determinados. Assim, a identificação do composto associado a cada um dos picos obtidos não foi possível.

## 5.4 Verificação do pico característico da amónia

De acordo com a literatura, um dos compostos que se observa mais frequentemente em análises do ar exalado de doentes com insuficiência renal é a amónia ( $NH_3$ ). Também segundo a literatura [27], este composto apresenta mobilidade reduzida de 2,06  $cm^2V^{-1}s^{-1}$ , e surge, no espectro resultante, antes do RIP.

Tendo isto em conta optou-se por analisar uma amostra de amónia e verificar a posição do seu pico característico para fins de comparação com os espectros obtidos com os pacientes de hemodiálise. A amónia analisada é uma solução aquosa deste composto de cerca de 25%, com peso molecular de 35.05 g/mol, da empresa Sigma-Aldrich<sup>®</sup>.

Para o procedimento de análise do composto utilizou-se o aparelho MCC-IMS, que faz uso do mesmo princípio físico de espectrometria de mobilidade iónica.

Cortou-se um pedaço de compressa esterilizado e colocou-se num vial. A amónia foi retirada do respectivo frasco e, com uma pipeta, embebeu-se a compressa com a solução.

O vial foi imediatamente encerrado.

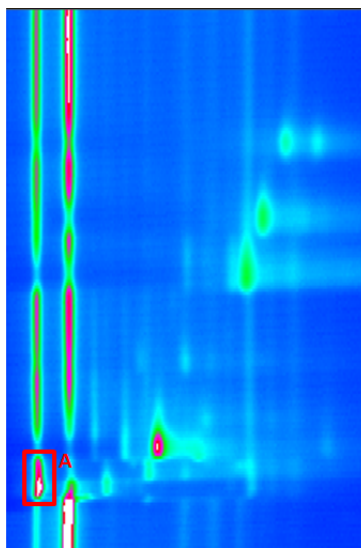
No MCC-IMS foi definido um programa semelhante ao programa de análise do BreathSpec<sup>®</sup>, cujas características se encontram na tabela 5.3.

**Tabela 5.3:** Programa HEMODIALISE

Spectra	Time	V	P	R	E1	E2	T1	T2	S
0	0 ms		25%	rec					
9	2.079 s	open	off						
22	5.082 s	close							
390	01m30s			stop					
391	01m30s								

Para esta análise colocou-se o frasco contendo a amostra em aquecimento, a 40 °C, durante 10 minutos para estabilização do *headspace*. Durante este período colocou-se a agulha de análise no frasco e ligada ao MCC-IMS. Com este procedimento, uma vez que a amônia é extremamente volátil, observou-se imediatamente alterações no espectro de monitorização do aparelho, com conseqüente redução do *RIP*. Isto aconteceu ainda antes de se iniciar a análise. Como *background* utilizaram-se as mesmas condições para analisar um pedaço de compressa esterilizado, sem qualquer amostra.

Terminada a análise obteve-se o espectro da figura 5.9.



**Figura 5.9:** Imagem do espectro de análise da amostra de amônia. A vermelho delimita-se o pico correspondente a esta substância.

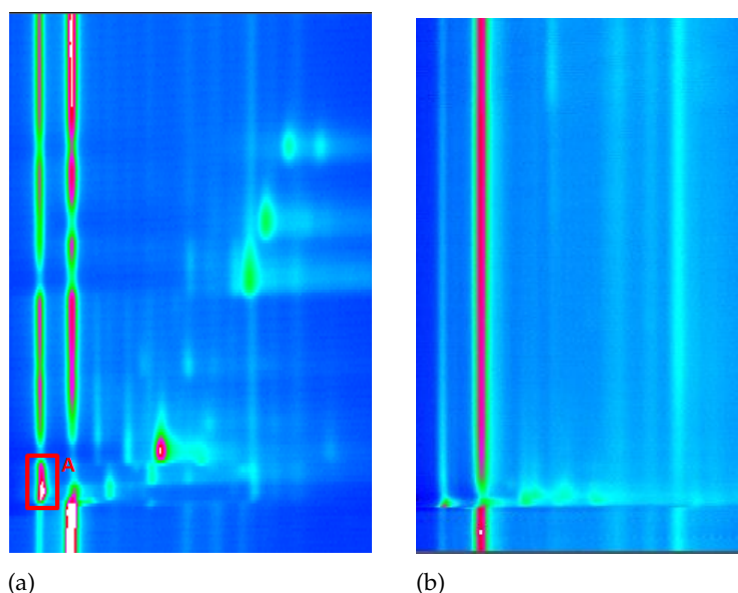
No espectro da amônia apresentado é possível observar uma variedade de picos com diferentes intensidades. Alguns destes picos são comuns ao espectro da compressa esterilizada, enquanto que outros pertencem à solução propriamente dita. Na figura 5.9 realçou-se o pico que, de acordo com a literatura, representa a amônia e determinaram-se os parâmetros característicos (tabela 5.4) de acordo com as equações de mobilidade já apresentadas.

**Tabela 5.4:** Mobilidade iónica reduzida ( $K_0$ ) para o pico da amónia, assim como o respectivo tempo de deriva ( $t_d$ ) e tempo de retenção ( $t_r$ ).

$t_d(ms)$	$t_r(s)$	$K(cm^2V^{-1}s^{-1})$	$K_0(cm^2V^{-1}s^{-1})$	$1/K_0(cm^{-2}Vs)$
6,784	8,547	1,856251856	1,619031172	0,617653333

Comparando o valor de mobilidade reduzida obtido com o valor referenciado ( $2,06 cm^2V^{-1}s^{-1}$ , retirado de [27]) verifica-se alguma diferença ( $0,441 cm^2V^{-1}s^{-1}$ ). Isto pode ser devido ao facto de o pico da amónia aparecer, nos espectros, como *cluster* com o pico relativo à água. De facto, muitas vezes a sua separação é difícil de observar o que pode levar a uma determinação incorrecta do tempo de deriva e, conseqüentemente, da mobilidade reduzida. Por outro lado, a técnica IMS está dependente de variados parâmetros que, quando alterados, podem contribuir para diferentes resultados. É o exemplo da fonte de ionização que no caso deste estudo é o trítio, mas no caso da fonte referenciada é o níquel ( $^{63}Ni$ ).

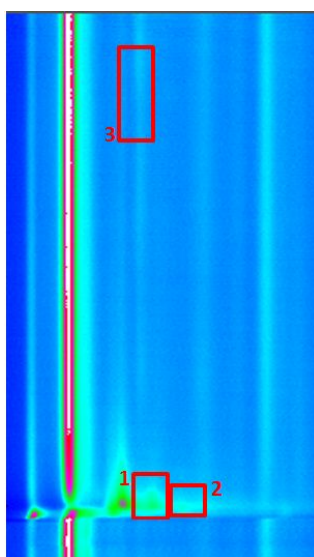
Em seguida, comparando o espectro obtido da análise da solução de amónia com qualquer um dos espectros dos pacientes dos grupos de hemodiálise não se verificam semelhanças. Realmente, o pico característico intenso que se observa no espectro da amónia não surge de forma evidente nos restantes casos como seria de esperar. A figura 5.10 apresenta a comparação entre o espectro de amónia obtido e um espectro correspondente a um dos pacientes em hemodiálise.



**Figura 5.10:** **a)** Imagem do espectro de análise da amostra de amónia. A vermelho delimita-se o pico correspondente a esta substância. **b)** Imagem de um espectro de análise do ar exalado de um paciente em hemodiálise

## 5.5 Tratamento de dados dos espectros do Grupo A

No capítulo 4 mencionaram-se os problemas iniciais de recolha de ar exalado com o primeiro grupo de pacientes. De facto, dadas as suas condições físicas e idade avançada a aquisição dos espectros não foi regular em todos os casos. Verificou-se que, em alguns casos, não tinham capacidade para expirar o tempo suficiente. Com isto optou-se por separar a análise de resultados dos restantes pacientes, e no fim tecer as devidas comparações. A figura 5.11 representa um dos espectros obtidos neste grupo de pacientes.



**Figura 5.11:** Imagem do espectro pertencente a um dos pacientes do Grupo A. Apresenta-se igualmente o *Areaset* a vermelho

É ainda importante referir que dos 5 pacientes deste grupo não será considerado para análise o espectro do último paciente, pois este não conseguiu realizar o teste correctamente em nenhuma das tentativas.

Novamente, considerando o *Areaset* já definido e fazendo uso da funcionalidade *Analyze Areaset* do *LAV* obtiveram-se os valores de intensidades e tempo de deriva para os picos destes quatro espectros.

Para comparação, elaboraram-se os gráficos referentes a cada pico com os valores de intensidade adquiridos para este grupo em simultâneo com as variações de intensidade dos grupos B e C.

Pelas figuras 5.12, 5.13 e 5.14 observa-se que, de uma forma geral, os picos pertencentes ao grupo A têm menor intensidade que os picos dos restantes grupos. O Pico 1 pode considerar-se a excepção uma vez que em dois dos casos apresenta valores semelhantes e nos outros dois valores superiores. Relativamente aos picos 2 e 3 verifica-se que estes possuem valores de intensidade mais constantes do que os que se verificam nos grupos B e C. Tal como anteriormente, esta análise é bastante simples. Em todo o caso, pode

dizer-se que as diferenças de intensidades nos grupos considerados não são muito significativas pelo que também os picos observados nos pacientes do grupo A podem ser considerados.

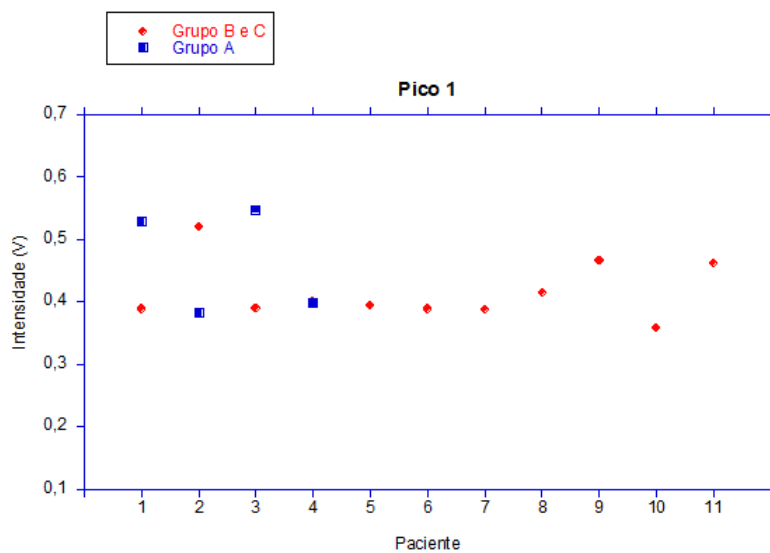


Figura 5.12: Gráfico da variação de intensidade do Pico 1 no grupo A e nos grupos B e C

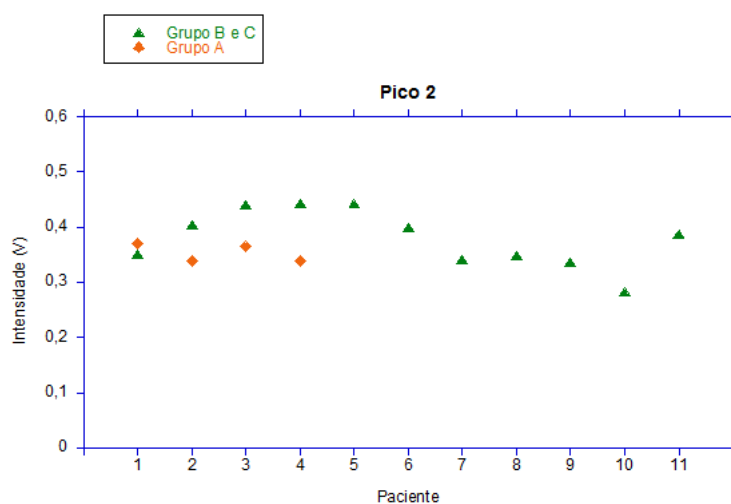
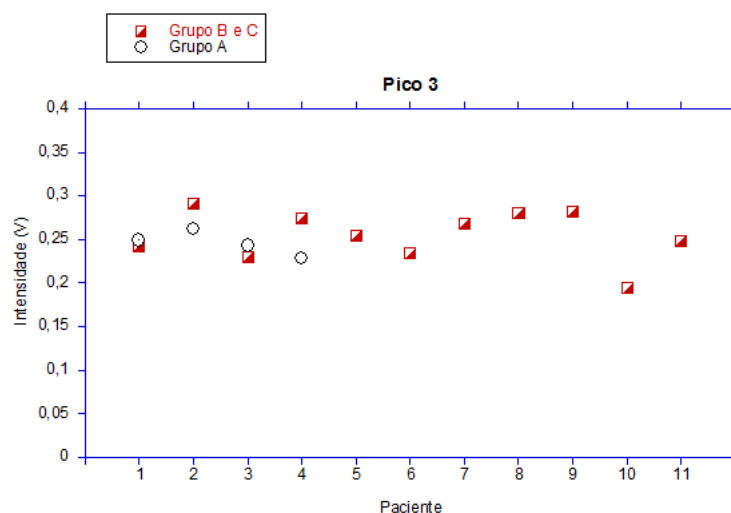


Figura 5.13: Gráfico da variação de intensidade do Pico 2 no grupo A e nos grupos B e C



**Figura 5.14:** Gráfico da variação de intensidade do Pico 3 no grupo A e nos grupos B e C

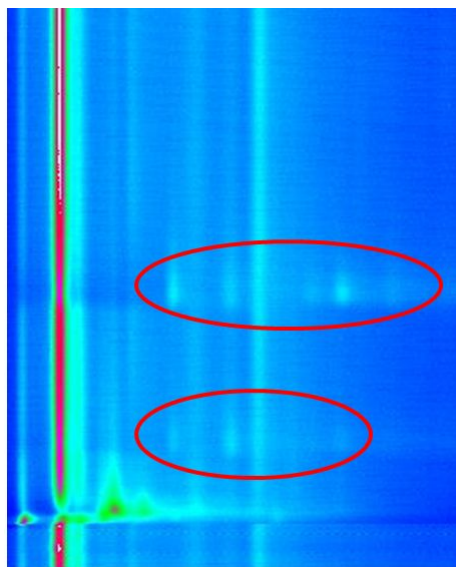
Também para estes espectros se efectuaram os cálculos de mobilidade e mobilidade reduzida, que se encontram na tabela 5.5.

**Tabela 5.5:** Mobilidade iónica reduzida ( $K_0$ ) para cada um dos picos do Grupo A, assim como o respectivo tempo de deriva ( $t_d$ ) tempo de retenção ( $t_r$ ).

Pico	$t_d$ (ms)	$t_r$ (s)	$K$ ( $cm^2V^{-1}s^{-1}$ )	$K_0$ ( $cm^2V^{-1}s^{-1}$ )	$1/K_0$ ( $cm^{-2}Vs$ )
1	9,023	8,442	1,393	1,215	0,823
2	9,446	9,576	1,330	1,160	0,862
3	8,822	78,372	1,425	1,243	0,805

Comparando estes valores de mobilidade reduzida com os obtidos para os grupos B e C verificam-se ligeiras diferenças, que se devem aos tempos de deriva também diferentes. No entanto, tratando-se de um valor obtido pela média de todos os espectros esta diferença não é apreciável.

Por fim, é relevante fazer referência a um caso particular. No espectro adquirido do paciente 3 do grupo A (figura 5.15) visualiza-se um conjunto de picos que não aparecem em mais nenhum caso. Não é possível determinar o que origina este pico, mas pode supor-se que estão associados a outras patologias que o paciente possa ter, ou mesmo, efeito de medicação a que está sujeito. Não foi possível obter informações mais concretas quanto à medicação dos pacientes, na medida em que se tratam de doentes com muitos medicamentos e cuja dose varia mensalmente. Para aumentar a dificuldade, muitas vezes não tomam a medicação como ela está prescrita.



**Figura 5.15:** Imagem do espectro de análise do ar exalado de um paciente, em que se evidenciam alguns picos diferentes





## Conclusão e Perspectivas Futuras

A matriz respiratória é constituída por diversos compostos, em diferentes concentrações. Dada a sua proximidade com os capilares sanguíneos e, uma vez que, se verificam trocas constantes nesta região, a possibilidade de que os compostos voláteis da matriz estejam associados ao metabolismo do organismo é muito grande. Neste sentido, o interesse pela área de análise do ar exalado tem sido crescente, pois muitos dos compostos libertados podem constituir biomarcadores de algumas patologias.

Com o estudo do tipo prova de conceito realizado pretendia-se conseguir detectar um conjunto de picos característicos de pacientes em tratamento por hemodiálise, utilizando o BreathSpec<sup>®</sup>, cujo princípio de funcionamento se baseia na espectrometria de mobilidade iónica. Das análises efectuadas e pela observação dos espectros resultantes foi possível isolar três picos diferentes que apresentam maior intensidade nos grupos de pacientes seleccionados. Para corroborar esta informação, procedeu-se à recolha do ar exalado de um grupo de controlo. De facto, neste grupo não se observou a ocorrência dos picos seleccionados. Isto é especialmente notório em um dos picos que surge mais isolado nos espectros, e logo de mais fácil identificação.

Por outro lado, o cálculo da mobilidade reduzida para estes picos não apresentou valores que se verifiquem na literatura. Esta é uma característica de cada substância e, uma vez que não foram encontrados parâmetros iguais não é possível determinar qual o composto associado a cada um dos picos.

Optou-se, também, por separar um conjunto de 5 pacientes dos restantes, pois apresentaram algumas dificuldades em efectuar o exame. A análise de resultados destes espectros não revelou diferenças significativas em relação aos restantes grupos. Observou-se que a variação de intensidades dos picos é, na sua maioria, inferior aos dos restantes mas sem valores discrepantes. Em relação à mobilidade reduzida também as diferenças

não são significativas. Concluiu-se desta forma que, considerando o mesmo programa de análise, também estes espectros poderiam ser incluídos no estudo.

A técnica de IMS utilizada é uma técnica de grande sensibilidade. Este facto foi verificado neste trabalho por diversas vezes, especialmente na observação do espectro pertencente a um dos pacientes. Neste caso, observa-se um conjunto de picos que não se verificam em mais nenhum caso, e que pode supor-se serem resultado de outro tipo de patologia ou medicação do participante.

Sendo a amónia um dos biomarcadores estabelecidos com maior ligação à insuficiência renal, realizou-se a análise de uma amostra de amónia utilizando o MCC-IMS. Esta análise apresentou como resultado um pico bem definido no espectro, numa posição anterior ao *RIP*. Em comparação com os espectros dos pacientes não se observa, em nenhum deles, o aparecimento deste pico, como era expectável. O cálculo dos valores de mobilidade reduzida também não permitiu elaborar as devidas conclusões. Isto pode querer dizer que, apesar da elevada sensibilidade da técnica, a amónia exalada não tem concentrações mensuráveis, ou pode mesmo estar mascarada por outros compostos. Uma solução pode ser a realização de pré-concentração das amostras.

Outro dos objectivos deste trabalho experimental, e que está claramente associado ao objectivo principal, era a possibilidade de utilizar o BreathSpec<sup>®</sup> em ambientes hospitalares. Apesar de ser um equipamento portátil a sua portabilidade e deslocação não estava facilitada. Nesse sentido, procedeu-se á requalificação da mobilidade do aparelho. O planeamento foi bem conseguido, e todas as análises constituintes do objectivo principal do estudo foram realizadas no Hospital Garcia de Orta, como era pretendido.

Em suma, o objectivo principal de detectar picos característicos nos pacientes de hemodiálise foi conseguido, pelo que a continuação de estudos nesta área pode ser muito vantajosa e permitir obter novas informações.

## 6.1 Perspectivas Futuras

Numa perspectiva futura, pretende-se que esta técnica possa ser utilizada como método auxiliar de diagnóstico. Assim, no caso particular da nefrologia, a continuação da realização deste estudo pode ser benéfico, e constituir um método de rastreio da insuficiência renal.

Para tal, é necessário conseguir uma maior amostra de pacientes em tratamento de hemodiálise, para se proceder ao tratamento estatístico e retirar mais conclusões. Desta forma, será possível verificar a ocorrência dos picos aqui identificados como estando, de facto, associados à insuficiência renal, e caso isto se verifique proceder ao seu estabelecimento como possível biomarcador. Seria também interessante conseguir analisar doentes com insuficiência renal em diferentes estágios, por forma a observar quais as diferenças entre eles e tentar estabelecer um padrão.

Uma vez que os picos (biomarcadores) aqui identificados podem, por diversas razões, ter não só alguma ligação com doenças renais mas também com outras patologias, seria

interessante alargar estudos semelhantes a outro tipo de doenças, por exemplo a diabetes que é uma das principais causas das patologias renais.

Relativamente à técnica, esta permite detectar um conjunto vasto de VOCs, no entanto o avanço mais importante que terá que ocorrer é a elaboração de uma biblioteca de compostos. A criação de uma base de dados com os tempos de deriva e de retenção, assim como os valores de mobilidade reduzida de cada composto permitirá facilitar a identificação dos diferentes picos, podendo associá-los mais facilmente a diferentes patologias.



# Bibliografia

- [1] W. Vautz and J. I. Baumbach. Exemplar application of multi-capillary column ion mobility spectrometry for biological and medical purpose. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry*, 11(1-4):35–41, June 2008.
- [2] C Patel. Sensitive Analysis of Breath Gases for Bloodless Blood Tests. *gases and TECHNOLOGY*, 2002.
- [3] Bogus Buszewski, M Keşy, and Tomasz Ligor. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomedical*, 566:553–566, 2007.
- [4] J J B N Van Berkel, J W Dallinga, G M Möller, R W L Godschalk, E Moonen, E F M Wouters, and F J Van Schooten. Development of accurate classification method based on the analysis of volatile organic compounds from human exhaled air. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 861(1):101–7, January 2008.
- [5] Chuji Wang and Peeyush Sahay. Breath analysis using laser spectroscopic techniques: breath biomarkers, spectral fingerprints, and detection limits. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 9(10):8230–62, January 2009.
- [6] David Smith and Patrik Spanel. The challenge of breath analysis for clinical diagnosis and therapeutic monitoring. *The Analyst*, 132(5):390–6, May 2007.
- [7] Sónia Trigueirão. 800 mil sofrem de doença renal, March 2011.
- [8] Deloitte and Administração Central do Sistema de Saúde (ACSS). Estudo de custeio de cuidados de diálise em centros de elevada diferenciação em Nefrologia. Technical report, 2010.
- [9] Sector Convencionado da Saúde. Relatório de Acompanhamento de Actividade - Hemodiálise 2010. Technical report, ACSS, Unidade Operacional - Financiamento e Contratualização, 2010.

- [10] Rod Seeley, Trent Stephens, and Philip Tate. *Anatomy & Physiology*. McGraw-Hill Companies, Inc., 6th edition, 2003.
- [11] Walter F Boron and Emile L Boulpaep. *Medical physiology: a cellular and molecular approach*. Elsevier Saunders, 2009.
- [12] AC Guyton and JE Hall. *Textbook of medical physiology*. Elsevier Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 11th edition, 2006.
- [13] Kim Barret, Susan Barman, Scott Boitano, and Heddwen Brooks. *Ganong's Review of Medical Physiology*. The McGraw-Hill Companies, 23 rd edition, 2010.
- [14] Wenqing Cao and Yixiang Duan. Current Status of Methods and Techniques for Breath Analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 37(1):3–13, April 2007.
- [15] Wolfram Miekisch, Jochen K Schubert, and Gabriele F E Noeldge-Schomburg. Diagnostic potential of breath analysis—focus on volatile organic compounds. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 347(1-2):25–39, September 2004.
- [16] Antony Manolls. The Diagnostic Potential of Breath Analysis. 29(1):5–15, 1983.
- [17] Ana V Guamán, Alba Carreras, Daniel Calvo, Idoya Agudo, Daniel Navajas, Antonio Pardo, Santiago Marco, and Ramon Farré. Rapid detection of sepsis in rats through volatile organic compounds in breath. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 881-882:76–82, January 2012.
- [18] Wolfgang Vautz, Jürgen Nolte, Rita Fobbe, and Jörg Ingo Baumbach. Breath analysis-performance and potential of ion mobility spectrometry. *Journal of breath research*, 3(3):036004, October 2009.
- [19] L R Narasimhan, W Goodman, and C K Patel. Correlation of breath ammonia with blood urea nitrogen and creatinine during hemodialysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8):4617–21, April 2001.
- [20] Katherine T Moorhead, Jonathan V Hill, J Geoffrey Chase, Christopher E Hann, Jennifer M Scotter, Malina K Storer, and Zoltan H Endre. Modelling acute renal failure using blood and breath biomarkers in rats. *Computer methods and programs in biomedicine*, 101(2):173–82, February 2011.
- [21] G Rolla, M Bruno, L Bommarito, E Heffler, N Ferrero, M Petrarulo, C Bagnis, M Bugiani, and G Guida. Breath analysis in patients with end-stage renal disease: effect of haemodialysis. *European journal of clinical investigation*, 38(10):728–33, October 2008.
- [22] Z H Endre, J W Pickering, M K Storer, W-P Hu, K T Moorhead, R Allardyce, D O McGregor, and J M Scotter. Breath ammonia and trimethylamine allow real-time monitoring of haemodialysis efficacy. *Physiological measurement*, 32(1):115–30, January 2011.

- [23] S Davies, P Spanel, and D Smith. Quantitative analysis of ammonia on the breath of patients in end-stage renal failure. *Kidney international*, 52(1):223–8, July 1997.
- [24] P Spanel, Simon Davies, and David Smith. Quantification of ammonia in human breath by the selected ion flow tube analytical method using H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> and O<sub>2</sub><sup>+</sup> precursor ions. *Rapid communications in mass ...*, 766:763–766, 1998.
- [25] Alquam Mashir and Raed a. Dweik. Exhaled breath analysis: The new interface between medicine and engineering. *Advanced Powder Technology*, 20(5):420–425, September 2009.
- [26] Marcus a Bain, Randall Faull, Gianfranco Fornasini, Robert W Milne, and Allan M Evans. Accumulation of trimethylamine and trimethylamine-N-oxide in end-stage renal disease patients undergoing haemodialysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 21(5):1300–4, May 2006.
- [27] V Ruzsanyi and J I Baumbach. ANALYSIS OF HUMAN BREATH USING IMS Test gases. pages 2004–2006, 2004.
- [28] V Ruzsanyi, S Sielemann, and J I Baumbach. Determination of VOCs in human breath using IMS. *Applied Spectroscopy*, 5:45–48, 2002.
- [29] Wenqing Cao and Yixiang Duan. Breath analysis: potential for clinical diagnosis and exposure assessment. *Clinical chemistry*, 52(5):800–11, May 2006.
- [30] T.H. Risby and S.F. Solga. Current status of clinical breath analysis. *Applied Physics B*, 85(2-3):421–426, May 2006.
- [31] M Phillips, J Herrera, S Krishnan, M Zain, J Greenberg, and R N Cataneo. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 729(1-2):75–88, July 1999.
- [32] Valentina Vassilenko. Non invasive biomonitoring of human health: Technical developments in breath analysis. Porto, 2010.
- [33] K.-H. Kim, Shamin Ara Jahan, and Ehsanul Kabir. A review of breath analysis for diagnosis of human health, March 2012.
- [34] Jack Dummer, Malina Storer, Maureen Swanney, Murray McEwan, Amy Scott-Thomas, Shrawan Bhandari, Stephen Chambers, Raed Dweik, and Michael Epton. Analysis of biogenic volatile organic compounds in human health and disease. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(7):960–967, July 2011.
- [35] B Hames and N Hooper. *Biochemistry*. 2nd edition, 2000.
- [36] Donald Voet and Judith Voet. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 1995.

- [37] Ann M Diskin, Patrik Spänell, and David Smith. Time variation of ammonia, acetone, isoprene and ethanol in breath: a quantitative SIFT-MS study over 30 days. *Physiological measurement*, 24(1):107–19, February 2003.
- [38] Claire Turner, Patrik Spänell, and David Smith. A longitudinal study of ammonia, acetone and propanol in the exhaled breath of 30 subjects using selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS. *Physiological measurement*, 27(4):321–37, April 2006.
- [39] Thomas Devlin. *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. Wiley-Liss, 5th edition, 2002.
- [40] Nikolaos Pagonas, Wolfgang Vautz, Luzia Seifert, Rafael Slodzinski, Joachim Jankowski, Walter Zidek, and Timm H Westhoff. Volatile organic compounds in uremia. *PloS one*, 7(9):e46258, January 2012.
- [41] Gerald E Miller. *Artificial Organs*, volume 1. January 2006.
- [42] Joseph Bronzino. *The Biomedical Engineering Handbook - Volume I*. CRC Press LLC, 2nd edition, 2000.
- [43] Lauralee Sherwood. *Human Physiology: From Cells to Systems*, volume 7th edition. Brooks/Cole, 2004.
- [44] Gabinete de Registo. Relatório Anual. Technical report, Sociedade Portuguesa de Nefrologia, 2011.
- [45] Carla Mendes. Preferência por hemodiálise custa mais 87 milhões de euros por ano, February 2012.
- [46] Joanna Rudnicka, Paweł Mochalski, Agapios Agapiou, Milt Statheropoulos, Anton Amann, and Bogusław Buszewski. Application of ion mobility spectrometry for the detection of human urine. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(5):2031–8, December 2010.
- [47] J Stach. Ion mobility spectrometry-basic elements and applications. *Int J Ion Mobility Spectrom*, pages 1–21, 2002.
- [48] Melanie Jünger, Bertram Bödeker, and Jörg Ingo Baumbach. Peak assignment in multi-capillary column-ion mobility spectrometry using comparative studies with gas chromatography-mass spectrometry for VOC analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(1):471–82, January 2010.
- [49] G Eiceman and Z Karpas. *Ion Mobility Spectrometry*. CRC Press, 2nd edition, 2005.
- [50] JI Baumbach and M Westhoff. Ion mobility spectrometry to detect lung cancer and airway infections. *Spectroscopy*, 18(6), 2006.



- [51] Thorsten Perl, Bertram Bodeker, Melanie Jünger, Jürgen Nolte, and Wolfgang Vautz. Alignment of retention time obtained from multicapillary column gas chromatography used for VOC analysis with ion mobility spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(6):2385–94, July 2010.
- [52] Helena Ferreira. *Caracterização de sacos Tedlar ® e Flex Film de recolha de ar exalado*. PhD thesis, FCT-UNL, 2011.
- [53] S Holopainen, M Nousiainen, J Puton, M Sillanpää, U Bardi, and a Tolstogousov. Evaporation of ionic liquids at atmospheric pressure: study by ion mobility spectrometry. *Talanta*, 83(3):907–15, January 2011.
- [54] J I Baumbach. Process analysis using ion mobility spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 384(5):1059–70, March 2006.
- [55] Vera Ruzsanyi, Jörg Ingo Baumbach, Stefanie Sielemann, P. Litterst, M. Westhoff, and Lutz Freitag. Detection of human metabolites using multi-capillary columns coupled to ion mobility spectrometers. *Journal of Chromatography A*, 1084(1-2):145–151, August 2005.
- [56] NMT – Tecnologia Inovação e Consultoria SA. Relatório interno da NMT. Technical report, NMT – Tecnologia, Inovação e Consultoria, SA, 2012.





# Anexo A



Caparica, \_\_\_ de Outubro de 2012

## Consentimento Informado

Vimos por este meio solicitar a sua colaboração no desenvolvimento do projecto de Dissertação de Mestrado intitulado “**Estudo dos Biomarcadores associados a doenças renais**”, conduzido na Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, e na empresa NMT – Tecnologia, Inovação e Consultoria, Lda., sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Valentina Vassilenko.

Este projecto tem como principal objectivo a verificação das possíveis alterações dos compostos orgânicos voláteis (VOCs) presentes no ar exalado de pacientes com doenças renais. Para tal será utilizado o aparelho BreathSpec<sup>®</sup>.

Os procedimentos de recolha utilizados são **não-invasivos, indolores e rápidos** e não implicam qualquer esforço por parte do colaborador. Basta apenas soprar através de um filtro. Em nenhum momento o colaborador é colocado em risco físico ou emocional.

A sua colaboração no projecto é importante, não tendo quaisquer prejuízos ou gastos com a sua participação. Os dados recolhidos não serão divulgados, e a sua utilização é limitada ao âmbito deste estudo.

Agradecemos desde já a sua colaboração.

O aluno, \_\_\_\_\_.

A orientadora, \_\_\_\_\_  
(Valentina Vassilenko)

---

Eu, abaixo assinado, depois de ler e ter esclarecido todas as minhas dúvidas consinto que me sejam efectuados os procedimentos mencionados acima.

Assinado, \_\_\_\_\_





## Anexo B

### Folha de Registos – Paciente

Registo nº:

Idade: \_\_\_\_\_ anos

Sexo: Feminino  Masculino

Tensão arterial: \_\_\_\_/\_\_\_\_

Peso: - início da sessão \_\_\_\_  
- final da sessão \_\_\_\_

Diabetes: Sim  Não  Hipertensão: Sim  Não

**Sobre o tratamento**

Causa da IRC: \_\_\_\_\_

Início da Diálise: \_\_\_\_\_

Nº de sessões semanais: \_\_\_\_

Duração da sessão (h): \_\_\_\_

**Níveis**

Hemoglobina: \_\_\_\_ Fósforo: \_\_\_\_

Creatinina: \_\_\_\_ Potássio: \_\_\_\_

Ureia: \_\_\_\_\_





# Anexo C

## Folha de Registos – Paciente

Registo nº:

Idade: \_\_\_\_ anos

Sexo: Feminino  Masculino

Sofre de hipertensão arterial? Sim  Não

Sofre doenças coronárias/cardiovasculares? Sim  Não

Tem diabetes? Sim  Não

Tem colesterol? Sim  Não

Toma medicamentos? Sim  Não  Quais ou para quê? \_\_\_\_\_

### Medidas

Altura: \_\_\_\_ cm

Peso: \_\_\_\_ kg

Tensão arterial inicial: \_\_\_\_/\_\_\_\_

Frequência cardíaca inicial: \_\_\_\_







## Anexo D

### Grupo A

**Tabela D.1:** Informações relativas aos pacientes em hemodiálise, do Grupo A

Paciente	Causa da IRC	Data de início de diálise	Nº de sessões por semana	Duração das sessões (h)
1	Diabetes	24-02-2011	3	4
2	Diabetes	07-11-2011	3	4
3	Diabetes	18-11-2009	3	4
4	Hipertensão	30-07-1995	3	4
5	-	-	-	-

Diabetes	Hipertensão	Hemoglobina (g/dL)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	Fósforo (mg/dL)	Potássio (mEq/L)
S	S	11,8	5,9	134	4,4	4,2
S	S	8,8	8,6	128	4,4	5
S	S	11,2	10	199	6,5	4,7
N	S	11,5	5,7	138	5,9	5
-	-	-	-	-	-	-

**Grupo B****Tabela D.2:** Informações relativas aos pacientes em hemodiálise, do Grupo B

Paciente	Causa de IRC	Data de início de diálise	Nº de sessões por semana	Duração das sessões (h)
1	Doença Renal Poliquística	09-05-2011	3	4
2	Rim de Mieloma	23-02-2010	3	4
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	Desconhecida	15-01-2004	3	4
6	Diabetes	09-08-2011	3	4

Diabetes	Hipertensão	Hemoglobina (g/dL)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	Fósforo (mg/dL)	Potássio (mEq/L)
N	S	11,6	11,4	149	4,8	5,3
N	N	10,4	8,8	140	4,6	4,8
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
N	S	13,2	8,1	149	4,9	4,9
S	S	11,4	9,1	155	7,4	6,7

**Grupo C****Tabela D.3:** Informações relativas aos pacientes em hemodiálise, do Grupo C

Paciente	Causa de IRC	Data de início de diálise	Nº de sessões por semana	Duração das sessões (h)
1	Diabetes	26-01-2009	3	4
2	Pielonefrite crónica obstrutiva	28-12-2009	3	4
3	Hipertensão	11-05-1994	5	3
4	Diabetes	01-10-2001	3	4
5	Desconhecida	21-08-2012	3	4

---

<b>Diabetes</b>	<b>Hipertensão</b>	<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	<b>Creatinina (mg/dL)</b>	<b>Ureia (mg/dL)</b>	<b>Fósforo (mg/dL)</b>	<b>Potássio (mEq/L)</b>
S	S	10,4	10,9	106	4,1	5,3
N	N	9,6	6,6	123	3,2	5,1
N	S	10,8	4,5	63	4,4	4,2
S	S	12,1	8,8	98	5,5	5,5
N	S	9,5	8,9	-	4,3	4,7

---