



Bruno Miguel Bandarra das Neves

Licenciado em Engenharia Biomédica

**Desenvolvimento das técnicas de
análise de espectros 3D de MCC-IMS**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Professora Doutora Valentina Borissovna
Vassilenko, Professora auxiliar na Faculdade de Ciências
e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
Co-orientador: Professor Doutor André Damas Mora,
Professor auxiliar na Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Professor Doutor Mário António Basto Forjaz Secca
Arguente: Professor Doutor Pedro Manuel Cardoso Vieira
Vogais: Professor Doutora Valentina Borissovna Vassilenko
Professor Doutor André Damas Mora



Bruno Miguel Bandarra das Neves

Licenciado em Engenharia Biomédica

Desenvolvimento das técnicas de análise de espectros 3D de MCC-IMS

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Professora Doutora Valentina Borissovna
Vassilenko

Co-orientador: Professor Doutor André Damas Mora

Júri:

Presidente: Professor Doutor Mário António Basto Forjaz Secca

Arguente: Professor Doutor Pedro Manuel Cardoso Vieira

Vogais: Professora Doutora Valentina Borissovna Vassilenko

Professor Doutor André Damas Mora



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março de 2013

Desenvolvimento das técnicas de análise de espectros 3D de MCC-IMS

Copyright © Bruno Miguel Bandarra das Neves, 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.

Dedicatória e Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais José e Paula, por todo o apoio moral que me deram ao longo destes anos de estudo, para além da excelente educação que me facultaram.

Gostaria de agradecer aos meus avós que têm muita paciência comigo, ajudam-me imenso a relaxar e a ter os pés bem assentes na terra.

Gostaria de agradecer à professora Valentina Vassilenko por ser uma orientadora flexível, pedagoga, simpática e cativante, que me orientou sempre da melhor maneira.

Ao professor André Mora e professor José Manuel Fonseca por colaborarem de afincada dedicação, com gosto e sempre bem-dispostos.

À Helena Ferreira que tem sido mais que uma colega, uma amiga que está sempre alegre e disponível para ajudar. E a todos os colaboradores do NMT S.A. pela recepção e boa disposição no dia-a-dia.

Ao Miguel Cardoso por ser o meu braço direito. Aos meus amigos por me apoiarem e incentivarem constantemente.

Resumo

Recentemente, a técnica de Espectrometria de Mobilidade Iónica associada a uma coluna multicapilar (MCC-IMS) tem sido aplicada à análise do ar exalado dos seres humanos. O ar que é expelido na respiração contém compostos orgânicos voláteis (VOCs) que possuem informação importante relativa ao estado metabólico do sujeito. Existem inúmeras vantagens na utilização desta tecnologia relativamente às técnicas de rastreio através do sangue, designadamente o facto de ser um processo não doloroso, não invasivo e a recolha de amostras não necessita de ser efectuada por pessoal médico especializado. Esta técnica está a ser desenvolvida com progressos no diagnóstico precoce do cancro do pulmão (entre outros) ou da doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), e também para controlo da medicação ou na fase terapêutica. Esta técnica é utilizada para detetar analitos em matrizes voláteis através da sua mobilidade iónica e combina alta sensibilidade através de um limite de detecção da ordem dos baixos ppb_v [ng/L], com baixos custos de manutenção.

O principal objectivo do trabalho desenvolvido nesta dissertação foi a projecção e implementação de uma interface gráfica que permita a detecção automática dos picos presentes nos espectros 3D de MCC-IMS. Para esta finalidade foi implementado um algoritmo que permite obter a informação acerca da posição e intensidade dos máximos de cada pico. A identificação automática de compostos relativos a cada pico detectado foi igualmente implementada através da ligação à base de dados existente, passível de ser aumentada no decorrer das medições experimentais. Além disso, foi desenvolvida uma ferramenta que permite eliminar influências da matriz, seja do ar ambiente, do sistema ou outro, por meio da subtracção dos espectros de *background* aos espectros experimentais.

A interface desenvolvida foi testada para diferentes medições experimentais de aquisição dos espectros de ar exalado com a tecnologia de MCC-IMS e os resultados obtidos foram apresentados como comunicação científica de painel na Conferência iMed 4.0 em 2012 na FCM-UNL e na Conferência Internacional Breath Analysis Summit, na Alemanha em Junho de 2013.

Palavras-Chave: ar exalado, compostos orgânicos voláteis, diagnóstico, detecção, algoritmo, MCC-IMS.

Abstract

Recently, Ion Mobility Spectrometry combined with a Multi-Capillary Column has been applied to breath analysis in humans since it contains volatile organic compounds that may carry important information related to the metabolic state of the individual. There are many advantages in using this technology rather than conventional technical analysis (blood and urine) such as being a painless non-invasive procedure and data collection not requiring specific training in breath analysis techniques. Breath studies with MCC-IMS have shown positive results in cases of lung cancer or chronic obstructive pulmonary disease (COPD), medication control or in the therapeutic phase, among others. MCC-IMS detects analytes in volatile matrixes regarding ionic mobility and combines high sensitivity ($\text{ppb}_v[\text{ng/L}]$) and relatively low technical expenditure.

The main goal of this dissertation is to project and implement a graphic interface in order to automatically detect peaks present in 3D MCC-IMS spectra. For this purpose, an algorithm was implemented in order to acquire information about the position and intensity of the peaks. Automatic identification of the compounds relative to each peak was implemented through a connection to a created database, with the possibility to expand during the research. A tool that removes the blank, air or other influences by subtracting background from experimental spectra was developed as well.

The developed interface was tested with different experimental measurements of exhaled air spectra acquired by MCC-IMS technology and the results were presented at iMed 4.0 Conference in 2012 at FCM-UNL and the International Conference Breath Analysis Summit, in Germany, in June 2013.

Keywords: exhaled breath, VOC, diagnosis, detection, algorithm, MCC-IMS.

Índice de matérias

.....	i
Dedicatória e Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract	ix
Índice de matérias.....	xi
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas	xvii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xix
1. Introdução.....	1
2 Princípios de funcionamento do MCC-IMS	5
2.1 Estado da arte do IMS	5
2.2 Espectrometria de Mobilidade Iónica (IMS)	6
2.2.1 Formação Iónica	9
2.2.1.1 Formação de Iões Reactivos.....	9
2.2.1.2 Formação de Produtos Iónicos.....	10
2.3 Coluna Multicapilar	12
2.4 Funcionamento do MCC-IMS	13
3 Desenvolvimento da interface gráfica	17
3.1 Análise de espectros	17
3.2 Fluxograma.....	19
3.3 Processo	20
3.4 Passos da utilização da interface.....	22
3.5 Função de detecção automática dos picos	31
3.5.1 Algoritmo do GPL.....	31
4 Resultados de teste da interface gráfica.....	35
4.1 Recolha de amostras	35
4.2 Gráficos	35
4.2.1 Análise do ar exalado após fumar	36
4.2.2 Análise do ar exalado após fumar um cigarro electrónico e cigarro convencional	39
4.2.3 Análise do ar exalado na detecção de VOCs relacionados com a doença renal crónica.....	45

4.2.4	Detecção de VOCs num indivíduo com asma	47
4.2.5	Eficiência da interface gráfica desenvolvida.....	49
5	Conclusões e Perspectivas futuras.....	51
	Bibliografia	53
	Anexos.....	55

Índice de figuras

Figura 2.1 - Representação do funcionamento do IMS. a) Entrada das moléculas da amostra na região de ionização e formação dos iões-produto através da ligação com os iões reactivos. b) os iões passam para a região de deriva colidindo com as moléculas do gás de deriva. c) e d) os iões são separados quanto ao tamanho e carga, atingindo o detector em tempos diferentes e permitindo a obtendo-se o sinal que vai dar origem ao espectro de mobilidade. Imagem adaptada de [27].....	7
.....	7
Figura 2.2 - Representação da diminuição do RIP com a existência de VOCs no estado de monómero ou dímero. Retirada de [9].....	11
Figura 2.3 - Corte transversal da coluna multicapilar e vista externa em comparação com uma lapiseira. [26].....	12
Figura 2.4 - Esquema de funcionamento interno do MCC-IMS [29].....	13
Figura 2.5 - Representação de um espectro 3D de ar exalado de um indivíduo após fumar um cigarro convencional, fornecido pelo NMT.	14
Figura 3.1 - Esquema de operações efectuadas para obter o espectro resultante	18
Figura 3.2 - Imagem representante do fluxograma desenvolvido.....	19
Figura 3.3 - Representação da abertura de ficheiros na interface desenvolvida	22
Figura 3.4 - Representação da mensagem após a gravação de ficheiros bem-sucedida na interface desenvolvida	23
Figura 3.5 - Representação da abertura de ficheiros na interface desenvolvida	23
Figura 3.7 - Escala do tempo de retenção no eixo vertical, escalas do tempo de deriva e $1/K_0$ no eixo vertical, e a posição assinalada	24
Figura 3.6 - Representação da janela de escolha dos marcadores a detectar, na interface desenvolvida	24
Figura 3.8 - Representação gráfica do espectro na interface desenvolvida	25
Figura 3.9 - Espectros obtidos a partir do ar exalado após fumar um cigarro convencional, antes e depois da subtracção do background	25
Figura 3.10 - Representação da <i>Scrollbar</i> com o filtro de limiar.....	26
Figura 3.11 - Representação das ferramentas gráficas e informação acerca dos espectros	26
Figura 3.12 – Nomes do espectros a ser visualizados	27
Figura 3.13 - Representação das escalas de cor disponíveis na interface gráfica desenvolvida a) Escala pré-definida, b) escala linear e c) escala exponencial (Intensidade máxima de escala alterada para 1.2V).....	28
Figura 3.14 - Representação experimental da utilização da lupa na interface gráfica desenvolvida. Análise ao ar exalado após a execução de exercício físico.	29

Figura 3.15 - Menu de análise ao espectro da interface gráfica desenvolvida.....	29
Figura 3.16 - Janela de resultados do diagnóstico da existência de VOCs.....	30
Figura 3.17- Subtração do espectro de ar exalado ao espectro do ar contido no sistema do IMS, num indivíduo saudável; visualizado na interface gráfica desenvolvida. Aplicado um filtro de limiar de 50mV. Escala máxima de 1.6V.....	32
Figura 3.18 - Adaptado da análise do espectro resultante através do software Ad3ri utilizado para a detecção de drusas nos olhos. O eixo das abcissas corresponde aos pixéis correspondentes ao espectro começando no pixel 1000 e as ordenadas correspondem à intensidade.	32
Figura 3.19 - Esquerda: Lista de picos detectados correspondente ao espectro de ar exalado visualizado anteriormente. Direita: Lista de picos detectados correspondente a um espectro de ar exalado semelhante.....	33
Figura 3.20 - Detecção de picos aplicada à subtração do espectro de ar exalado ao espectro do ar do sistema do IMS num indivíduo saudável.	33
Figura 4.1 - Espectro de background (ar da sala) obtido na interface gráfica desenvolvida	36
Figura 4.2 - Espectro de ar exalado após fumar um cigarro convencional visualizado na interface gráfica desenvolvida	37
Figura 4.3 - Espectro de ar exalado após fumar um cigarro convencional visualizado na interface gráfica desenvolvida	37
Figura 4.4 - Subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro convencional ao espectro do ar da sala, visualizado na interface gráfica desenvolvida	38
Figura 4.5 - Exemplo da detecção de máximos pelo algoritmo utilizado	39
Figura 4.6 - Espectro de ar exalado de um indivíduo saudável em jejum, visualizado na interface gráfica desenvolvida. Os VOCs presentes são: água, isopreno, acetona (da esquerda para a direita).....	39
Figura 4.7 - Subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro electrónico ao espectro do ar exalado antes de fumar, visualizado na interface gráfica desenvolvida. Aplicado um filtro de limiar de 50mV. Áreas de presenças dos VOCs (da esquerda para a direita): água, isopreno, acetona, nicotina	40
Figura 4.8 - Subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro convencional ao espectro do ar exalado antes de fumar, visualizado na interface gráfica desenvolvida. Áreas de presenças dos VOCs (da esquerda para a direita): isopreno, acetona, nicotina.....	41
Figura 4.9 - Lista de VOCs detectados, presentes na base de dados, à esquerda corresponde ao espectro resultante da subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro electrónico; direita corresponde ao espectro resultante da subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro convencional	41
Figura 4.10 - Detecção de picos aplicada à subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro electrónico	42

Figura 4.11 - Detecção de picos aplicada à subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro electrónico	42
Figura 4.12 - Subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro electrónico ao espectro do ar exalado antes de fumar, visualizado na interface gráfica desenvolvida. Aplicado um filtro de limiar de 50mV. Escala máxima de 2.0V	43
Figura 4.13 - Detecção de picos aplicada à subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro electrónico	43
Figura 4.14 - Subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro convencional ao espectro do ar exalado antes de fumar, visualizado na interface gráfica desenvolvida. Aplicado um filtro de limiar de 50mV. Escala máxima de 2.0V.....	43
Figura 4.15 - Lista correspondente aos VOCs detectados mostrando as posições dos picos desconhecidos, visualizado na interface gráfica desenvolvida.....	44
Figura 4.16- Detecção de picos aplicada à subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro convencional	44
Figura 4.17 - Subtração do espectro de ar exalado ao espectro do ar da sala, num indivíduo com doença renal crónica; visualizado na interface gráfica desenvolvida. Aplicado um filtro de limiar de 50mV. Escala máxima de 1.1V.....	45
Figura 4.18 - Lista correspondente aos VOCs detectados num indivíduo com doença renal crónica, mostrando as posições dos picos desconhecidos, visualizado na interface gráfica desenvolvida.....	45
Figura 4.19 - Detecção de picos aplicada à subtração do espectro de ar exalado ao espectro do ar da sala num indivíduo com doença renal crónica.	46
Figura 4.20 - Subtração do espectro de ar exalado ao espectro do ar da sala, num indivíduo com asma e a tomar medicação; visualizado na interface gráfica desenvolvida. Aplicado um filtro de limiar de 50mV. Escala máxima de 1.1V	47
Figura 4.21 - Lista correspondente aos VOCs detectados num indivíduo com asma e a tomar medicação; mostrando as posições dos picos desconhecidos, visualizado na interface gráfica desenvolvida.	47
Figura 4.22 - Subtração do espectro de ar exalado ao espectro do ar da sala, no mesmo indivíduo com asma, sem consumo de medicação; visualizado na interface gráfica desenvolvida. Aplicado um filtro de limiar de 50mV. Escala máxima de 1.8V.....	48
Figura 4.23 - Lista correspondente aos VOCs detectados no mesmo indivíduo com asma, sem consumo de medicação; mostrando as posições dos picos desconhecidos, visualizado na interface gráfica desenvolvida.....	48

Índice de tabelas

Tabela 2.1 - Especificações Técnicas do BreathSpec®	15
---	----

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

API – Ionização a pressão atmosférica

Blank – Matriz do Sistema

Background – Matriz do ar ambiente ou de referência

C# – Linguagem de programação C Sharp

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crónica

G.A.S. – G.A.S. Gesellschaft für analytische Sensorsysteme mbH

IMS – Espectrometria de Mobilidade Iónica

K – Mobilidade Iónica

K_0 – Mobilidade Iónica Reduzida

MCC – Coluna Multicapilar

P – Pressão do gás no tubo de IMS

P_0 – Pressão de 760 Torr

ppb_v – Partes por bilião em volume

ppt_v – Partes por trilião em volume

RIP – Pico de Iões Reactivos

T – Temperatura ambiente do IMS

T_0 – Temperatura padrão de 273.15K

T1 – Temperatura no tubo de deriva

T2 – Temperatura na coluna multicapilar

T3 – Temperatura à entrada da válvula

T4 – Temperatura no loop

T5 – Temperatura à saída da válvula antes da entrada da coluna multicapilar

T6 – Temperatura na entrada do ar de amostra

VOC – Composto orgânico volátil

1. Introdução

O desenvolvimento desta tese deu-se através da colaboração da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Lisboa e o NMT S.A., com a supervisão e orientação da Professora Doutora Valentina Vassilenko e co-orientação do Professor Doutor André Damas Mora.

O tema desta dissertação está intrinsecamente relacionado com o desenvolvimento de novos métodos de análise e diagnóstico de matrizes complexas de diversas amostras de materiais biológicos, com as diversas aplicações em clínica médica, saúde ambiental e em técnicas analíticas em geral. Neste sentido, surge a necessidade de desenvolver algoritmos avançados para a identificação automática dos picos de espectros de espectrometria de Mobilidade Iónica associada a uma coluna multicapilar (MCC-IMS).

Recentemente, a técnica de MCC-IMS tem sido aplicada à análise do ar exalado dos seres humanos, pois este contém compostos que contêm informação relativa ao estado metabólico do sujeito, ou seja, à sua saúde [1]. Existem inúmeras vantagens na utilização desta tecnologia em relação às técnicas de diagnóstico tradicional como a análise de sangue e urina, designadamente o facto de ser um processo não doloroso, não invasivo, a recolha de amostras não necessita de pessoal médico especializado e constitui uma matriz de análise menos complexa. Existem vários estudos no desenvolvimento desta técnica para o diagnóstico precoce do cancro do pulmão ou da doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), para controlo da medicação ou na fase terapêutica [2; 3; 4; 5; 6].

A Espectrometria de Mobilidade Iónica (IMS) é uma técnica emergente devido à sua alta sensibilidade e baixo custo, com a vantagem de não ser necessário pré-tratamento da amostra. Estas vantagens em relação a outras técnicas de espectrometria levantaram grandes expectativas em relação a este dispositivo, sendo um foco de atenção por parte dos investigadores científicos [1;7;28]. Esta técnica é utilizada para detetar analitos em gases através da sua mobilidade iónica e combina alta sensibilidade através de um limite de deteção com intervalos entre ng-pg por litro e ppb_v-ppt_v. Para além da sua elevada sensibilidade tem baixo custo de análise através de uma aquisição de dados de alta velocidade [8].

Esta dissertação foi desenvolvida com o objectivo de criar uma ferramenta de obtenção automática, rápida e precisa da posição e intensidade dos picos nos espectros 3D de MCC-IMS, com possibilidade de identificação dos picos característicos de certos compostos orgânicos, ou picos padrão associados a doenças revelando-se muito importante para o desenvolvimento de

novos métodos de diagnóstico, sendo também um assunto novo do ponto de vista científico, uma vez que a técnica analítica é muito recente.

No âmbito do estudo inovador previamente executado por parte do NMT S.A., no que diz respeito à análise do ar exalado, foi melhorado o programa de processamento das amostras através da optimização de várias características de funcionamento do MCC-IMS: o fluxo de sucção da bomba, o tempo até à abertura da válvula, o tempo de abertura da válvula; o fluxo de arraste e o fluxo de deriva [1; 9; 10]. Embora o objectivo principal desta dissertação esteja relacionado com o desenvolvimento de uma interface gráfica, foi feita a aprendizagem prática do funcionamento do único MCC-IMS (BreathSpec®) existente em Portugal.

A ferramenta existente é disponibilizada pela G.A.S. Gesellschaft für analytische Sensorsysteme mbH, nomeadamente o software LAV versão 1.5.19, e possui um leque alargado de características para aquisição e visualização de espectros; porém a visualização no zoom não é a mais adequada. Um ponto importante deste software é a inaptidão de subtrair o *blank*, que perturba a visualização dos compostos orgânicos voláteis (VOCs) e a análise correcta destes. Os espectros têm pequenos picos que são difíceis de reconhecer visualmente no LAV devido à representação exaustiva de cores no espectro. Outra limitação do software LAV deve-se à incapacidade de detecção e localização dos VOCs automaticamente, sendo preciso recorrer à selecção manual das áreas relativas aos picos visualizados graficamente no espectro para obter uma análise estatística dessa área.

Na construção da interface gráfica foi tido em consideração a visualização dos espectros no que diz respeito às escalas de cor escolhidas, de modo a tornar o espectro mais perceptível à existência de VOCs. Outra característica é a possibilidade de subtrair o *blank* e o background do ar ambiente da sala onde o dispositivo se encontra, eliminando eventuais contaminações e falsos-positivos. A principal funcionalidade da interface desenvolvida concerne à detecção automática e diagnóstico qualitativo dos VOCs existentes. A detecção dos picos é feita através de uma adaptação do software GPL baseado no algoritmo desenvolvido pelo Professor Doutor André Mora. O algoritmo percorre o espectro recolhendo informação da posição e intensidade dos pontos máximos detectados. Este algoritmo funciona através de fusão de áreas do gráfico com o mesmo gradiente diferenciando as áreas dos diferentes picos e diagnosticando a existência de vários VOCs existentes na base de dados ou a obtenção de uma lista de todos os VOCs presentes no espectro. Este diagnóstico qualitativo baseia-se na existência de um VOC numa área rectangular do espectro, catalogado *a priori* na base de dados.

No entanto a interface gráfica desenvolvida tem algumas limitações, pois embora complementemente o software LAV não pode ser utilizado de forma independente na obtenção dos espectros. A aquisição dos espectros continua a feita do mesmo modo, ou seja, através do software LAV. A dependência do software desenvolvido visa também a conversão dos espectros do formato “*.MEA” para o formato “*.CSV” para serem passíveis de leitura. Devido ao facto da técnica de MCC-IMS ser relativamente recente a biblioteca de compostos identificados é reduzida limitando a identificação dos VOCs existentes nestes espectros. A criação desta estrutura faz parte de um processo moroso e exaustivo que visa o registo e catalogação de informações de intensidade e localização dos compostos no seu estado puro.

Considerando a utilização deste dispositivo para fins médicos foi tida em conta a preocupação de tornar a interface simples, fácil de usar e de agradável visualização de modo a ser utilizada sem a necessidade de técnicos especializados. Na medicina do futuro, é uma técnica que pode substituir as análises ao sangue e à urina, num aparelho móvel *bedside*, de modo tornar o diagnóstico imediato. É neste contexto que urge o desenvolvimento e implementação deste projeto, para colmatar as atuais necessidades, de forma a disponibilizar uma ferramenta com capacidade para diagnosticar automaticamente os espectros em 3D.

Esta dissertação está dividida em seis capítulos, abordando o tema da tese a diferentes níveis. O capítulo 2 aborda a história e princípios físicos do MCC-IMS, passando pela formação dos iões que permitem a análise dos compostos voláteis presentes no ar exalado, por fim descrevendo os componentes e o funcionamento do MCC-IMS. O capítulo 3 trata o método experimental utilizado para a aquisição de espectros de ar exalado e o método de tratamento das amostras. O capítulo 4 aborda o desenvolvimento experimental da interface gráfica de análise 3D do ar exalado, abordando o funcionamento do algoritmo utilizado e o funcionamento da interface desenvolvida. No capítulo 5 reportam-se os resultados obtidos e a discussão da eficiência da interface gráfica. No último capítulo são enumeradas as conclusões e perspectivas para optimização futura.

Os resultados obtidos durante a execução deste trabalho foram comunicados em forma de poster na conferência iMed 4.0 em 2012 [11] e foi feita a submissão de dois artigos para a conferência Breath Analysis Summit 2013, com base no trabalho efectuado.

2 Princípios de funcionamento do MCC-IMS

A espectrometria de mobilidade iónica aborda a caracterização de substâncias químicas em gases com base na velocidade dos iões quando submetidos a um campo eléctrico. Ao ligar a coluna multicapilar a selectividade do dispositivo aumenta significativamente, sendo vantajoso para amostras com humidade. O MCC-IMS é capaz de detectar VOCs sob condições de pressão e temperatura ambiente, revelando-se silencioso no seu funcionamento. Outro factor importante é a fiabilidade por parte das fontes radioactivas, pois não precisam de uma fonte de electricidade externa, nem requerem manutenção. Esta técnica permite a realização de análises *on-site* em tempo real com um largo espectro de detecção com limites que rondam os baixos ppb_v[ng/L]. O MCC-IMS pode ser comparado com outros instrumentos utilizados para análise do ar exalado com limites de detecção semelhantes, apresentando como vantagem relativa a qualquer outro dispositivo o facto de ser portátil e de não necessitar de vácuo. A portabilidade deste dispositivo não só está relacionada com o facto de ser transportável num carrinho, como o baixo custo energético permite a utilização de baterias na sua utilização. É um instrumento funcional e simples, de fácil manuseamento e não necessita de formação académica específica para a sua utilização.

2.1 Estado da arte do IMS

A descoberta do fenómeno de ionização gasosa deu-se no fim dos anos 90 do século XIX e partiu da observação do fenómeno de descargas eléctricas em gases, a partir da qual Rutherford experimentou irradiar o ar ambiente com Raios X [12], cerca de dois anos depois destes terem sido descobertos por Roentgen [13; 14]. Verificou-se que os Raios X dividiriam as moléculas presentes no ar, e que na presença de um campo eléctrico estas não se voltariam a recombinar [15]. A capacidade do ar se ionizar à temperatura ambiente levantou questões acerca da estrutura da matéria, da constituição dos iões formados e da sua mobilidade, verificando-se que esta última era afetada pela temperatura, pressão e pureza do gás [16]. Por outro lado, Lattey explorou a variação da velocidade dos iões negativos consoante os níveis de humidade no gás [17; 18]. Estes dados permitiram a Langevin construir a teoria da interação ião-molécula e do efeito das forças atrativas na colisão das mesmas formando assim uma base teórica para a mobilidade iónica de gases [19; 20; 21]. Outro desenvolvimento ocorreu em 1929, na utilização de uma grelha electrónica para injeção pulsada de iões, por Cravath e por Van de Graaff, posteriormente expandido por Bradbury utilizando duas grelhas electrónicas

ligadas a uma fonte de tensão alternada de alta frequência. Nesta época consolidou-se o conhecimento acerca da influência do campo eléctrico e da pressão na mobilidade iónica dos gases.

O desenvolvimento desta tecnologia voltou a ser notável a partir de 1948, quando Lovelock relata a potencialidade de um simples detector iónico ao detectar vestígios de poluentes orgânicos industriais na atmosfera. Os estudos de Lovelock permitiram a construção de um dispositivo para detectar impurezas contidas no vento e poluentes no ar ambiente, mais tarde distribuído com o nome de Detector de captura electrónica (ECD). Os poluentes detectados eram principalmente halocarbonatos através da alteração da corrente provocada pelo fluxo do ar e proporcional à força do vento. A associação deste dispositivo a um tubo de deriva conceptualizado por Martin Cohen *et all* vai dar origem ao IMS. Karasek inicia as experiências com o IMS, denominado na altura por Cromatógrafo de plasma Beta-VI demonstrando a detecção de um largo espectro de compostos orgânicos e limites de detecção muito baixos para estes compostos sem a necessidade de pré-tratamento.

Esta tecnologia foi direccionada para fins militares com o objectivo de detetar agentes tóxicos e explosivos, dado que os compostos tóxicos exibem grande afinidade protónica enquanto os explosivos trocam facilmente electrões com iões negativos. Ao longo da sua evolução estes dispositivos passaram de volumosos equipamentos de laboratório a dispositivos compactos e portáteis pesando a primeira versão portátil apenas 1.6Kg, com um consumo reduzido de energia, contribuindo para a sua utilização em cenários de guerra pelos militares dos E.U.A., e anos mais tarde utilizado em aeroportos e estabelecimentos de segurança para permitir a deteção de estupefacientes [8; 21].

2.2 Espectrometria de Mobilidade Iónica (IMS)

A Espectrometria de Mobilidade Iónica (IMS) é baseada no processo de ionização de átomos em condições de pressão atmosférica e temperatura do ar ambiente, sendo que os iões formados ao passarem por um tubo de deriva contra um fluxo de gás e sujeitos a um fraco campo eléctrico sofrem um processo de separação em função do tamanho, forma e massa, formando o espectro característico. O princípio de formação de um espectro de IMS está ilustrado na Figura 2.1.

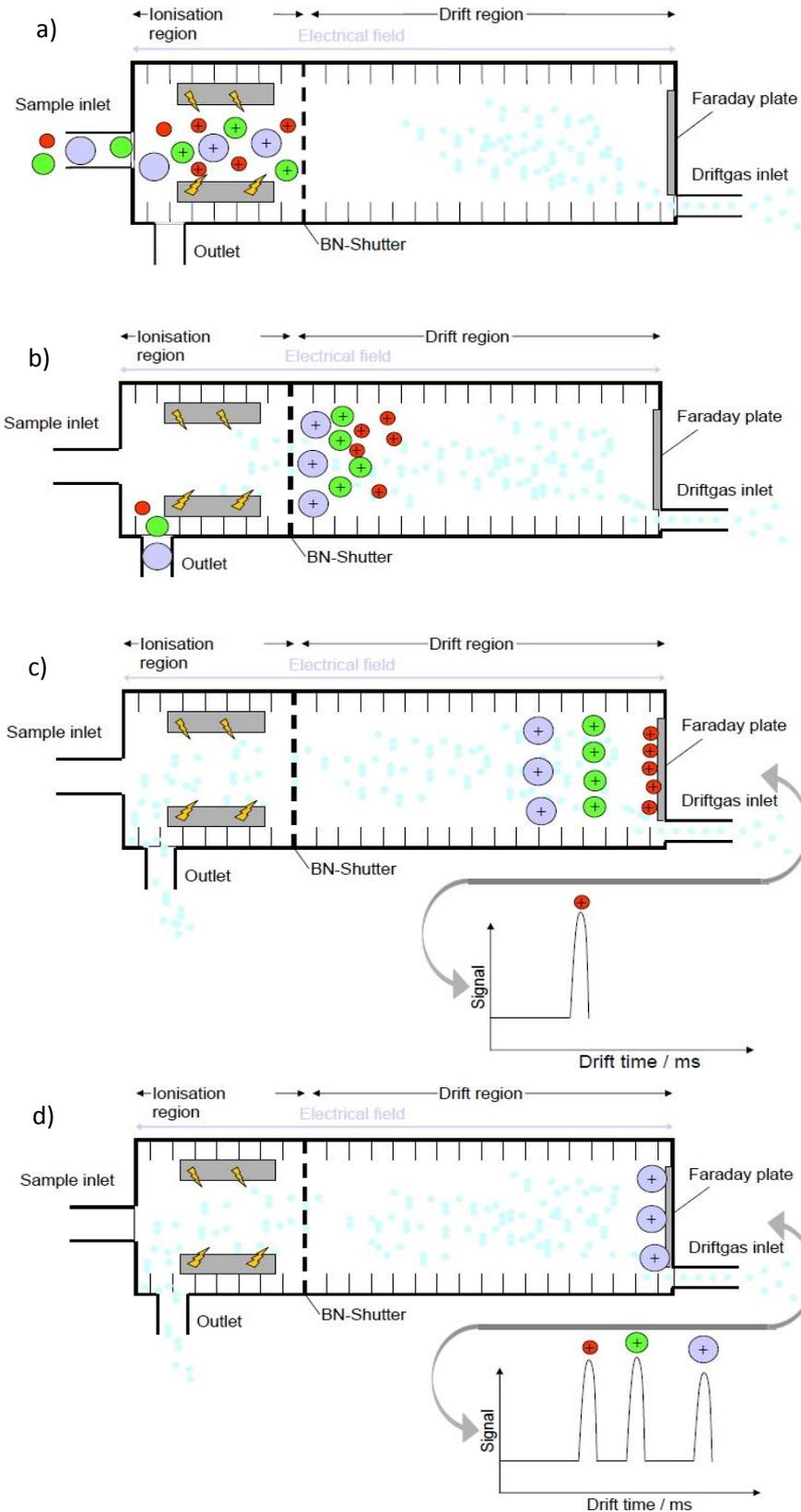


Figura 2.1 - Representação do funcionamento do IMS. a) Entrada das moléculas da amostra na região de ionização e formação dos iões-produto através da ligação com os iões reactivos. b) os iões passam para a região de deriva colidindo com as moléculas do gás de deriva. c) e d) os iões são separados quanto ao tamanho e carga, atingindo o detector em tempos diferentes e permitindo a obtendo-se o sinal que vai dar origem ao espectro de mobilidade. Imagem adaptada de [27]

O Espectrómetro de Mobilidade Iónica é constituído principalmente pelo tubo de deriva, que consiste numa câmara de ionização e uma zona de deriva em que se encontra o detector. O tubo de deriva contém os anéis de metal separados por isoladores e as duas regiões separadas por uma grelha de abertura. O gás inerte presente na atmosfera do IMS é ionizado pela fonte de ionização de radiação β . Os iões formados reagem com as moléculas de água presentes resultando na formação de iões reactivos positivos ($H^+(H_2O)_n$) ou negativos ($O_2^-(H_2O)_n$). A amostra é conduzida até à câmara de ionização em conjunto com o gás inerte interagindo de modo a formar o ião-produto. A abertura intermitente da grelha de Bradbury-Nielsen durante cerca de 100 μ s, permite a passagem de uma nuvem de iões para a região de deriva. Estes iões chocam com as moléculas do gás de arraste que se dirigem no sentido oposto, desacelerando e separando-os consoante o tamanho e a forma [2]. Os iões percorrem a região de deriva até ao detector de Faraday, e ao entrar em contacto com os iões ocorre um aumento da corrente eléctrica na ordem dos pA, gerando um sinal eléctrico. A variação deste sinal dá origem ao espectro de mobilidade iónica 20 milissegundos após o início da experiência [22].

A velocidade de deriva, medida em V/cm, é proporcional ao campo eléctrico E e ao coeficiente de mobilidade iónica K (em $cm^2V^{-1}s^{-1}$):

$$v_d = K * E \quad (2.1)$$

A mobilidade iónica é calculada na equação (2.3) tendo em conta o comprimento do tubo de deriva l_d , a tensão do campo E e o tempo de deriva dos iões t_{dc} , a menos um factor de correcção representado pela equação (2.2). O factor de correcção está relacionado com o dispositivo específico utilizado.

$$t_{dc} = t_d - 0.5 * \Delta t \quad (2.2)$$

$$K = \frac{l_d}{t_{dc}} * E \quad (2.3)$$

Para o estudo destes espectros em diferentes ambientes é utilizado o conceito de mobilidade iónica reduzida, valor independente da pressão e temperatura, em que P se refere à pressão ambiente em Torr e T à temperatura do IMS, em Kelvin, que se calcula através da mobilidade iónica K , como mostra a equação (2.4).

$$K_0 = K * \frac{P}{P_0} * \frac{T_0}{T} \quad (2.4)$$

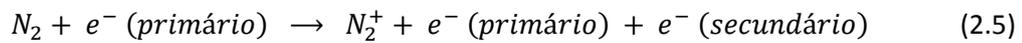
P_0 corresponde à pressão de uma atmosfera (760 Torr) e T_0 corresponde à temperatura de 273.15 Kelvin [22; 23].

2.2.1 Formação Iónica

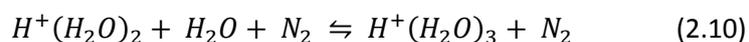
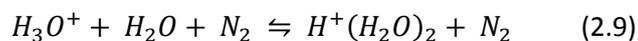
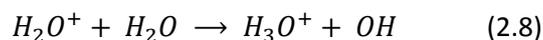
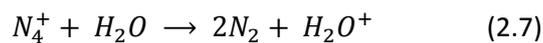
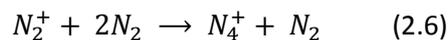
A formação de iões reactivos dá-se em condições de pressão atmosférica ambiente, ou seja em condições API (atmospheric pressure ionization), devido à existência de um campo eléctrico que impede a neutralização das cargas. O processo de ionização requer uma fonte de ionização de radiação β , neste caso específico o Trítio (^3H) de 8.1mCi, sendo a convencionalmente utilizada de 10 mCi Níquel (^{63}Ni) [22; 23]

2.2.1.1 Formação de Iões Reactivos

Quando o gás inerte (N_2) que circula no tubo do IMS é bombardeado com electrões primários originários do decaimento do Trítio dá-se a ionização do azoto resultando N_2^+ . A equação 2.5 apresentada de seguida explica a reacção de ionização:

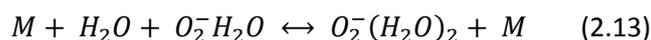
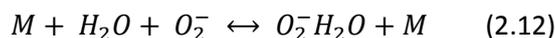
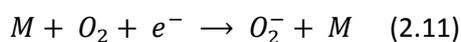


Apesar do electrão primário ter perdido alguma energia após a primeira colisão, este ainda possui elevada energia realizando novas colisões com outras moléculas de azoto. O processo de ionização ocorre de forma semelhante com o electrão secundário e a formação de iões N_2^+ também se pode dar através de dissociação. A formação de espécies iónicas estáveis do tipo $H^+(H_2O)_n$ é obtida através da seguinte cadeia de reacções:



As reacções reversíveis (2.9 e 2.10) dependem da concentração de vapor de água presente. A formação de compostos azotados como $NH_4^+(H_2O)_n$ e $NO^+(H_2O)_2$, presentes em *ppm* são originados por impurezas da fonte de ionização ou da região reactiva por isso as equações correspondentes são omitidas. As espécies iónicas $H^+(H_2O)_n$ são responsáveis pelo pico de iões reactivos (RIP) no modo positivo do IMS.

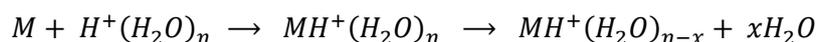
A formação de aniões segue um processo diferente da formação de iões reactivos positivos. A existência de um grande número de electrões livres de baixa energia, favorece a sua captação por moléculas neutras, realizando um processo de captura electrónica ressonante. As equações abaixo descritas descrevem o processo de formação dos aniões:



sendo M uma molécula neutra, como H_2O ou O_2 .

2.2.1.2 Formação de Produtos Iónicos

A carga dos produtos iónicos formados depende da sua afinidade protónica formando iões positivos quando a afinidade protónica é alta. A formação de iões positivos é considerada *soft ionization* porque permite ionizar as moléculas sem lhes fornecer muita energia, prevenindo a quebra das suas ligações. Este tipo de ionização é fundamental para que os compostos não se degradem. Como a afinidade protónica da água é baixa (7.22 eV), a molécula orgânica AB vai ser ionizada pelos iões reactivos positivos da água, originando as reacções:



Para cada tempo de retenção, o aumento do ião-produto resulta na diminuição da intensidade do RIP (figura 2.2). Quando a concentração do monómero protonado é elevada pode formar-se um dímero, cuja reacção pode ser definida por:

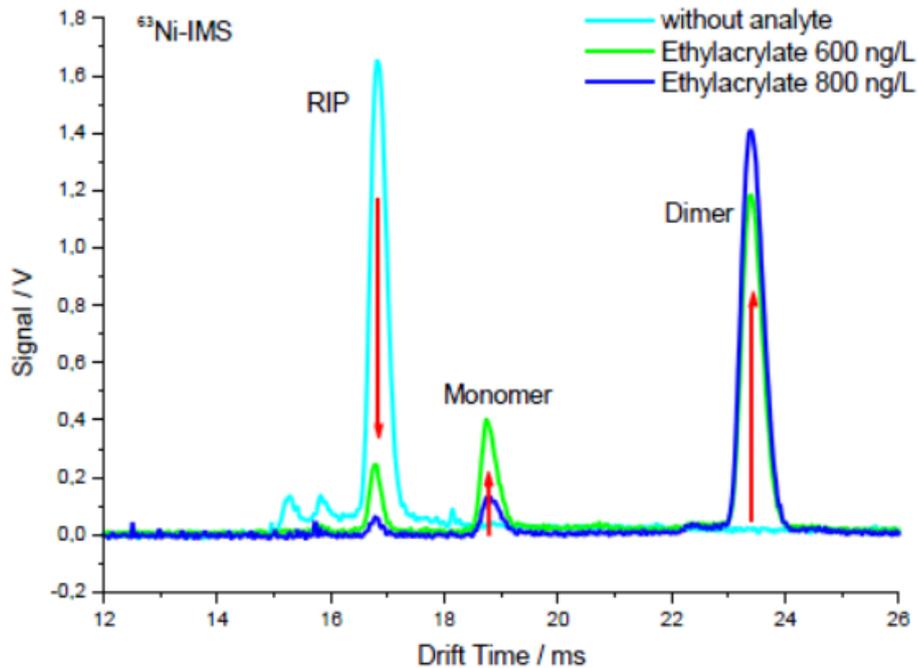
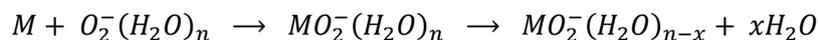


Figura 2.2 - Representação da diminuição do RIP com a existência de VOCs no estado de monómero ou dímero. Retirada de [9]

As reacções que dão origem a produtos iónicos negativos podem ser formadas através da transferência de um electrão, através da ligação com outra moléculas ou através da fragmentação da própria molécula. Neste último caso a energia dos electrões é tão alta que provoca a quebra das ligações da molécula ionizando-a. Deste modo, é perdida alguma informação no espectro de mobilidade iónica. As reacções que dão origem aos produtos iónicos negativos são:



Estas ligações podem manter-se até ao tubo de deriva ou sofrer alterações formando M^- .

2.3 Coluna Multicapilar

A Coluna Multicapilar permite a separação eficaz dos iões com grande nível de seletividade e sensibilidade, mesmo em matrizes químicas complexas [2]. O acoplamento deste dispositivo é vantajoso dado que o IMS não tem uma selectividade muito elevada. O tempo de análise no MCC-IMS deve-se maioritariamente à passagem dos analitos pela coluna multicapilar e é denominado por tempo de retenção. Uma das vantagens da MCC é fazer com que os analitos entrem na região de ionização em tempos diferentes evitando assim transferências de carga entre iões, reduzindo o número de interações que provocam a formação de aglomerados na região de ionização do IMS. Outro ponto fundamental é a redução da influência da humidade existente principalmente no ar exalado. A separação das moléculas de água é importante em amostras de ar exalado, pois o pico da humidade fica logo no início do espectro, não influenciando assim os picos com retenção mais longa. Caso a humidade entrasse na câmara de ionização ao mesmo tempo que os VOCs formar-se-iam aglomerados de água com produto iónico, impossibilitando a identificação dos iões existentes. [24; 6].

A coluna multicapilar é constituída por 1000 capilares que se dispõem paralelamente ao longo do comprimento total da coluna, com capilares de diâmetro interno com cerca de 40 μm e uma espessura de 200nm. A coluna em si possui um comprimento de 20 cm e um diâmetro total de 3mm.

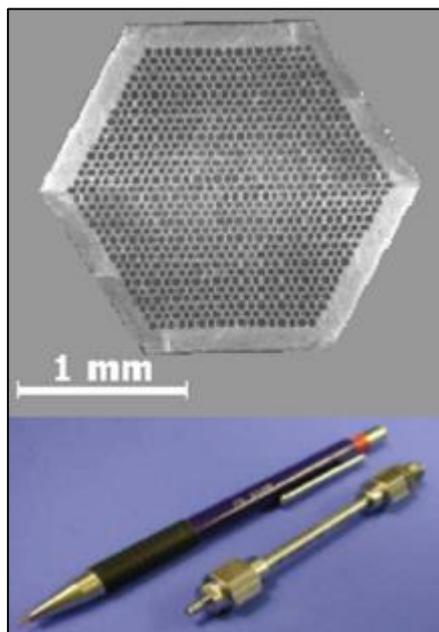


Figura 2.3 - Corte transversal da coluna multicapilar e vista externa em comparação com uma lapiseira. [26]

2.4 Funcionamento do MCC-IMS

A aquisição do ar exalado é feita a partir do BreathSpec®, que é composto por um espirómetro e pelo MCC-IMS. O MCC-IMS é um dispositivo que agrega dois componentes: a coluna multicapilar e o espectrómetro de mobilidade iónica, permitindo analisar misturas de compostos extremamente complexas separando-os eficazmente. A análise do ar exalado é feita pela retenção dos compostos pela coluna multicapilar, seguida da deriva dos mesmos pelo tubo de deriva.

O aparelho é composto por um sistema de introdução de amostra, no caso do BreathSpec® é utilizado um espirómetro; o loop, a coluna multicapilar, o IMS, uma bomba de sucção, uma válvula, dois fluxómetros e sensores de temperatura. O esquema de funcionamento interno é representado na figura seguinte.

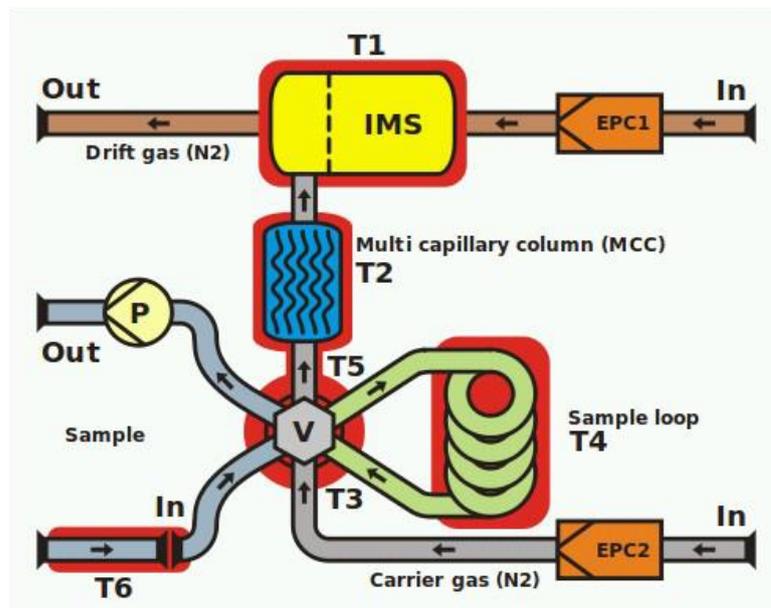


Figura 2.4 - Esquema de funcionamento interno do MCC-IMS [29].

Os EPCs representados na figura são fluxómetros, em que o **EPC1** controla o fluxo do gás de deriva e o **EPC2** o fluxo do gás de arraste. O **P** é a bomba que permite o transporte da amostra, o **V** a válvula e os sensores de temperatura estão representados por **T** mais um número. A amostra é recolhida pelo canal onde se encontra o sensor **T6** passando pelo loop juntamente com o gás de arraste (N_2), sendo transportados para a coluna multicapilar e seguidamente para a zona de ionização do IMS. Ao passar pela grelha de Bradbury-Nielsen, os iões entram na zona de deriva chocando com o gás de deriva que é transportado no sentido contrário. Tendo em conta o facto de também existir aplicado um campo eléctrico fraco

permite uma separação dos íões quanto ao seu tamanho e carga fornecendo um espectro baseado no tempo de retenção (dos compostos ao percorrerem a coluna multicapilar) e no tempo de deriva (dos analitos no interior do tubo de deriva do IMS). Os espectros de MCC-IMS fornecem informação tanto qualitativa, a partir da posição dos picos, como quantitativa, tendo em conta intensidade dos picos. Através do espectro a três dimensões dos compostos existentes no ar exalado possível identificar localização específica de VOCs no espectro, definido pelo tempo de retenção no eixo vertical, e por um tempo de deriva medido no eixo horizontal (a partir do qual se pode calcular a mobilidade reduzida para representar $1/K_0$) como é representado na figura 2.5.

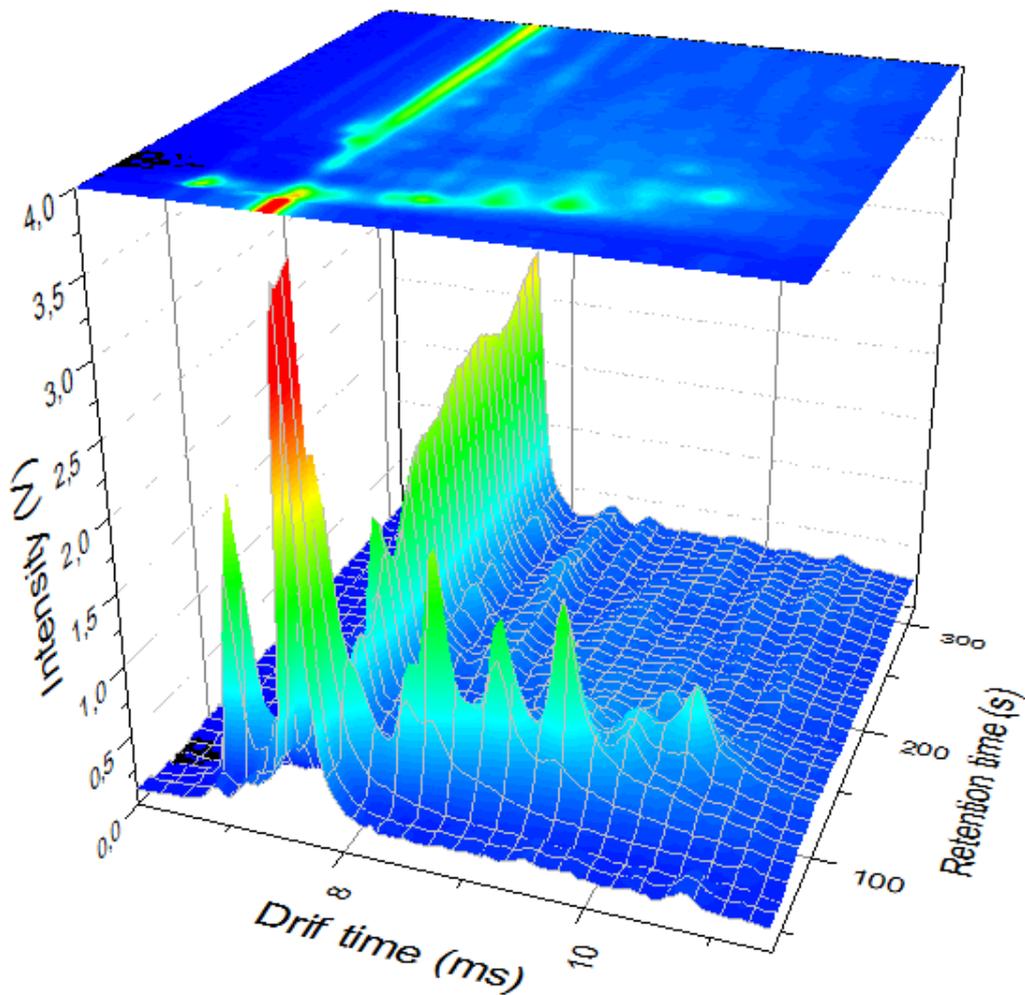


Figura 2.5 - Representação de um espectro 3D de ar exalado de um indivíduo após fumar um cigarro convencional, fornecido pelo NMT.

O tempo de análise da amostra e obtenção de um espectro é bastante curto, sendo necessário entre 3-4 minutos dependendo dos analitos. O acoplamento da coluna cromatográfica (MCC) permite uma pré-separação relativamente rápida e eficaz dos compostos utilizando o IMS como um seletor desses compostos com respostas em milissegundos, tornando-a adequada para análise de compostos orgânicos voláteis (VOCs).

O dispositivo utilizado para recolha de amostras é denominado BreathSpec®, da G.A.S, a tecnologia é baseada em MCC-IMS, com as propriedades referidas na tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Especificações Técnicas do BreathSpec®.

Princípio de Funcionamento:	IMS
Amostragem:	Directa através da boquilha, controlada por um espirómetro preciso
Método de Ionização:	Radiação β radioactiva (Trítio (3H))
Actividade:	300 MBq
Intensidade do Campo Eléctrico:	400V/cm
Dimensões:	449 x 375 x 177 mm
Peso:	15,5 Kg
Tipo de Coluna:	OV-5 Standard
Limites de Detecção:	Na ordem dos baixos ppb_v

3 Desenvolvimento da interface gráfica

Este capítulo consiste na explicação passo-a-passo do desenvolvimento do *software* de visualização e diagnóstico automático com base nos espectros de MCC-IMS. O objectivo é criar um programa que permita uma fácil observação dos picos existentes no espectro, após a subtracção do blank, e crie uma base de dados de informação sobre os picos existentes nos espectros, permitindo o diagnóstico da sua existência. Este programa tem funcionalidades que o *software* LAV que acompanha o dispositivo de MCC-IMS, não possui.

3.1 Análise de espectros

A leitura dos espectros é possível através do Software LAV 1.5.19 desenvolvida pela empresa G.A.S.. Através de um módulo de conversão de ficheiros disponibilizado pelo LAV procede-se à conversão dos ficheiros de extensão “.mea” para “.csv”, tornando possível a importação para o software MATLAB R2010b. A utilização do Matlab revela-se essencial para a obtenção de resultados que possibilitem a formulação do método experimental de modo a criar uma interface gráfica útil para a detecção de VOCs e otimizar o diagnóstico da existência de picos relativos aos biomarcadores específicos. Esta ferramenta, desenvolvida pela MathWorks, permite efectuar operações matemáticas entre matrizes facilmente, permitindo o estudo da optimização de resultados a partir das amostras da seguinte forma:

- 1 Subtracção do espectro do ar exalado em jejum ao espectro do ar exalado após fumar um cigarro convencional;
- 2 Subtracção do espectro do ar exalado em jejum ao espectro do ar exalado após fumar um cigarro electrónico;
- 3 Normalização de espectros devido às intensidades máximas do RIP diferirem de espectro para espectro;
- 4 Aplicação de vários filtros de limiar de modo a evidenciar a existência de picos.

O facto das intensidades máximas do RIP diferirem de espectro para espectro está relacionado com as condições de temperatura e humidade da sala terem influência na produção dos iões reactivos. A humidade da sala não deve ser muito baixa, caso contrário não haverão iões reactivos suficientes para se dar uma análise precisa dos VOCs nem deve exceder os 60%, segundo o fabricante.

As operações efectuadas pela interface gráfica podem ser facilmente representadas pelo esquema abaixo descrito:

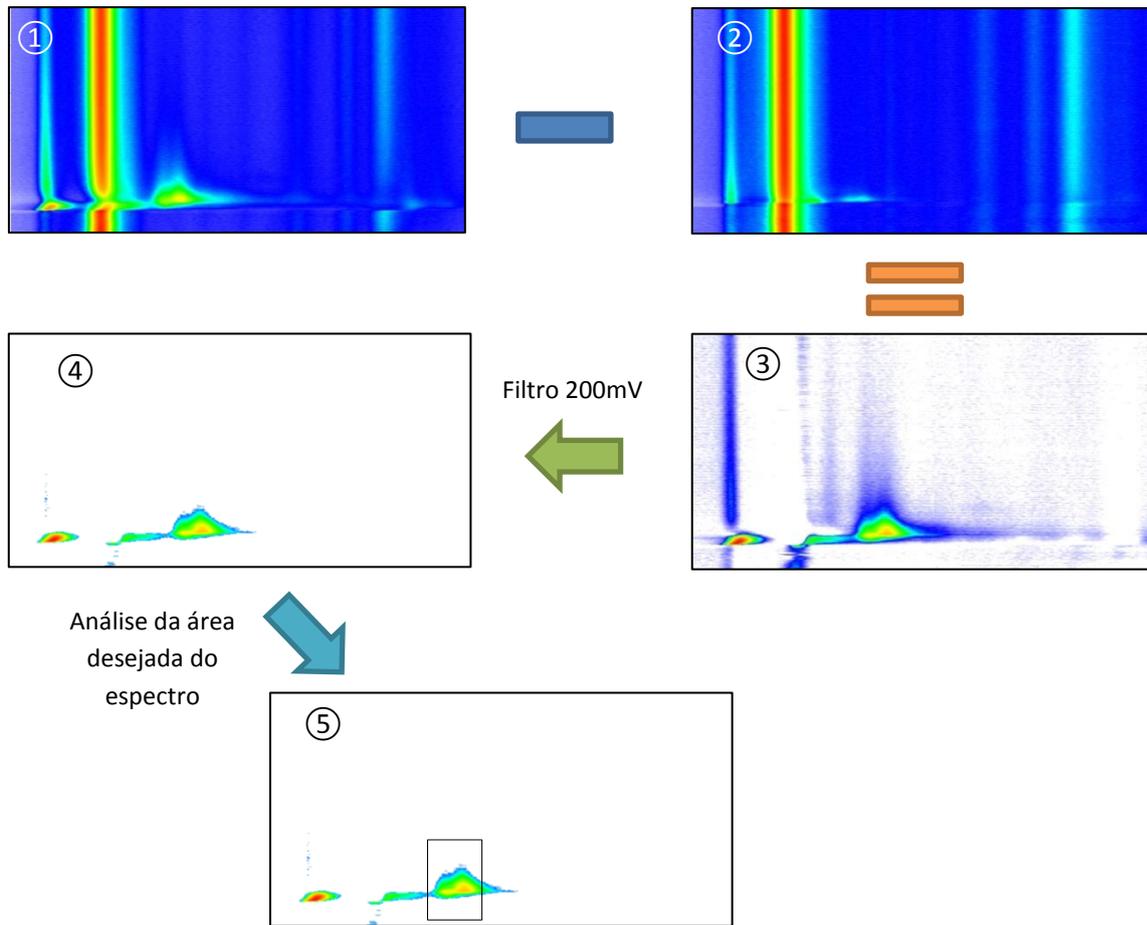


Figura 3.1 - Esquema de operações efectuadas para obter o espectro resultante

O processo de obtenção do espectro final pode ser definido por 5 fases:

- i. Obter o espectro do ar exalado (ar alveolar) do paciente;
- ii. Obter o espectro do ar ambiente da sala onde se encontra o BreathSpec;
- iii. Dá-se a subtração automática dos espectros e pode-se observar o espectro resultante, em que o RIP e o ruído do sistema foram eliminados assim como eventuais VOCs presentes no ar ambiente;
- iv. Aplica-se um filtro de limiar escolhido pelo utilizador para apagar o ruído restante;
- v. Diagnóstico da existência de picos na área pretendida em de todo o espectro;

3.2 Fluxograma

O processo de desenvolvimento da interface gráfica começa pela aprendizagem e estudo autodidacta da linguagem C# e desenvolvimento do fluxograma apresentado de seguida:

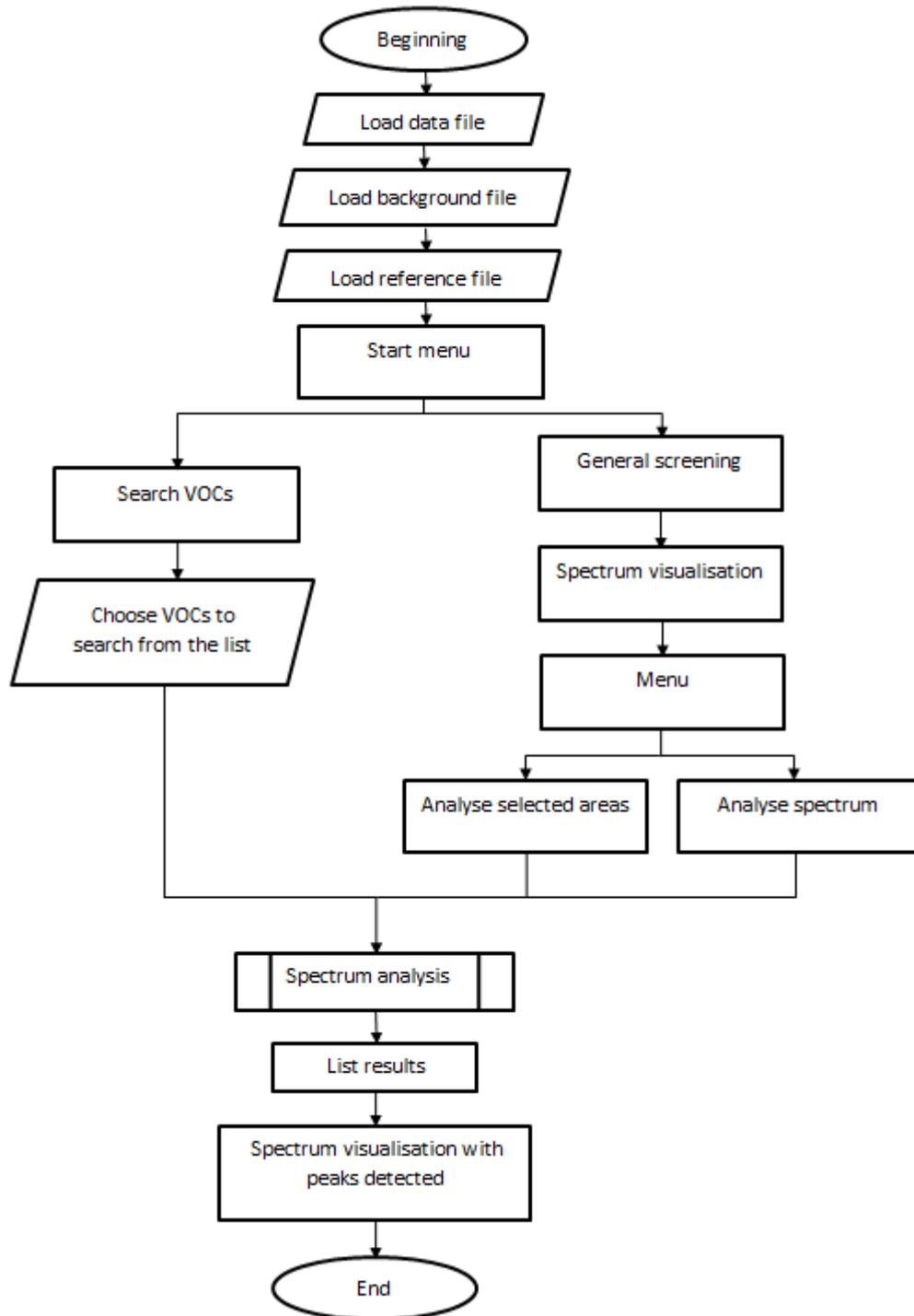


Figura 3.2 - Imagem representante do fluxograma desenvolvido

3.3 Processo

O desenvolvimento da interface gráfica em C# seguiu os seguintes passos na sua construção:

1. Desenvolvimento do esqueleto do programa, respectivas páginas e janelas;
2. Desenvolvimento da interface de carregamento de espectros;
3. Cálculo do Espectro Resultante
 - a. Subtração do espectro do ar ambiente ao espectro a analisar;
 - b. Normalização do espectro;
4. Apresentação gráfica de espectros do BreathSpec®
 - a. Conversão linear da escala de Volt para RGB através do comprimento de onda das cores;
 - b. Optimização da escala de cores de visualização para detecção dos picos com intensidade mais baixa;
 - c. Implementação do filtro de limiar com scrollbar;
 - d. Implementação da funcionalidade de arraste (*drag*) do espectro e Zoom a partir da roda do rato para melhor visibilidade e precisão;
 - e. Implementação do ajuste do espectro à janela a partir da largura ou altura;
 - f. Implementação de Escalas dinâmicas em X (Tempo de Deriva) e Y (tempo de Retenção);
 - g. Implementação de um botão permitindo desenhar uma área do espectro para analisar;
 - h. Implementação de diferentes escalas de Cor:
 - i. Escala Default;
 - ii. Escala Linear;
 - iii. Escala Exponencial.
 - i. Implementação de uma escala no eixo das abcissas que representa o $1/K_0$;
 - j. Sinalização relativa à posição do RIP;
 - k. Implementação de alteração do Zoom do espectro a partir de teclas “+” e “-” e Zoom com valor exacto dado pelo utilizador;
5. Possibilidade de gravar o espectro resultante da subtração dos espectros com ou sem aplicação do filtro de limiar;

6. Desenvolvimento do diagnóstico qualitativo da existência de biomarcadores no espectro resultante a partir do nome do biomarcador;
7. Visualização do espectro com os máximos detectados;
8. Permite a adição de novos biomarcadores à base de dados através do tempo de retenção e $1/K0$;
9. Visualização da escala de intensidades do espectro utilizada em tempo real;
10. Implementação de sistema de mensagens de erro para o utilizador;
11. Lupa de Zoom;
12. Melhoramento visual da interface do utilizador;
13. Implementação da opção que possibilita escolher o valor máximo da escala de cores para comparação visual.
14. Implementação da abertura do espectro resultante guardado.
15. Visualização de um lista de VOCs detectados;

3.4 Passos da utilização da interface

Para fazer o carregamento dos ficheiros basta carregar no botão “Open...file” (1) abrindo uma janela que permite a escolha do ficheiro, com a referência do formato de ficheiro que se pode carregar (2) e qual o botão que se carregou – “Select a Data file in CSV format” (3).

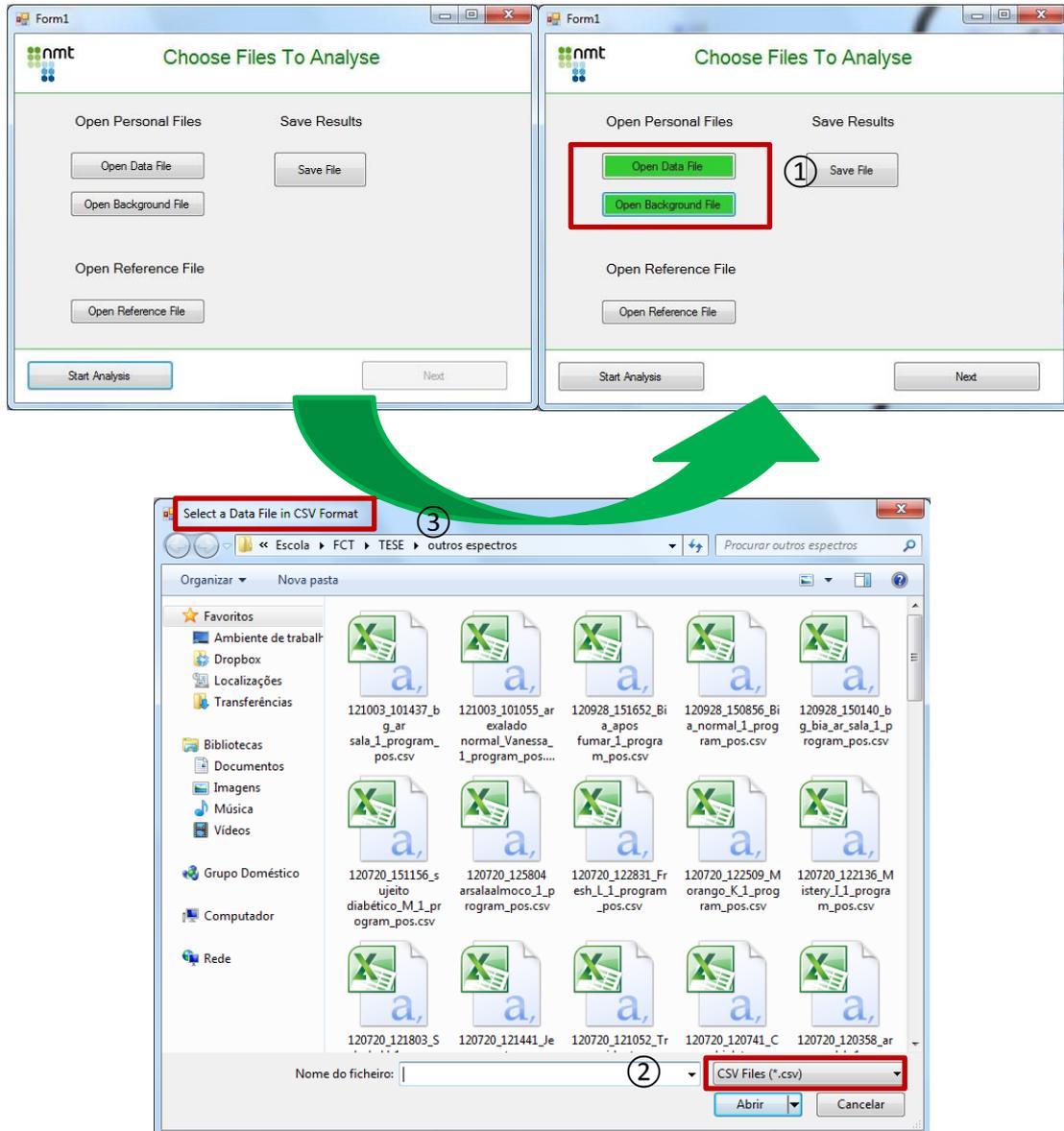


Figura 3.3 - Representação da abertura de ficheiros na interface desenvolvida

Após o carregamento dos ficheiros o botão muda de cor, ficando com o fundo verde, informando que o ficheiro foi carregado correctamente. É possível gravar o ficheiro resultante da subtracção os dois ficheiros de entrada. Esta funcionalidade é útil caso se queira visualizar este espectro noutra programa como o Origin, caso o objectivo seja utilizando grafismo 3D. Em vários pontos do programa existem caixas de mensagens que informam o utilizador do estado das acções. A forma de gravar o espectro resultante é similar à forma de abrir, é possível escolher o nome e o caminho especificado correspondente. No caso da gravação do ficheiro resultante é emitida a informação que o ficheiro foi gravado no caminho especificado de forma correcta.

A transposição de janela para janela é muito simples sendo apenas preciso carregar no botão “Next” (4). Porém, só é possível clicar neste botão quando é tomada uma decisão, neste caso a escolha de uma opção entre “Search for Biomarkers” e “General Screening”. É possível a qualquer momento no programa recomeçar voltar ao menu inicial, limpando todas as variáveis, carregando no botão “Restart Analysis” (5).

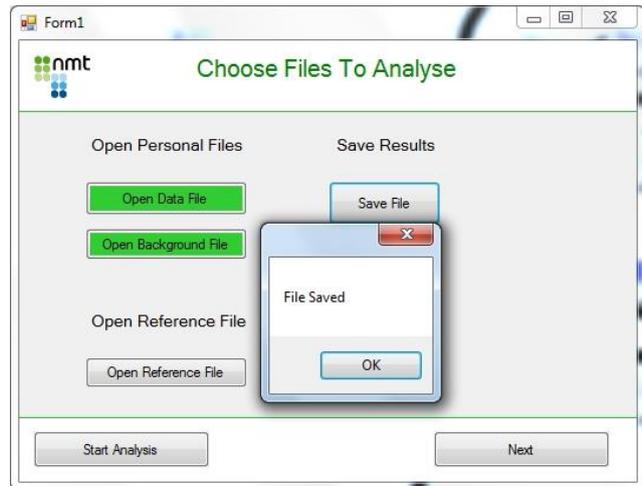


Figura 3.4 - Representação da mensagem após a gravação de ficheiros bem-sucedida na interface

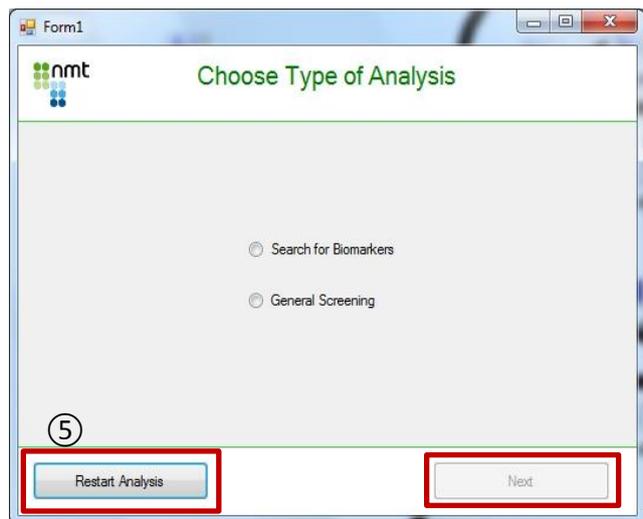


Figura 3.5 - Representação da abertura de ficheiros na interface desenvolvida

Ao escolher a primeira opção “Search for Biomarkers” obtém-se uma lista de VOCs catalogados na base de dados interna (figura 3.6). A partir desta lista é possível escolher vários biomarcadores de modo a detectar a sua existência com o algoritmo. É possível adicionar novos biomarcadores para o diagnóstico directamente através da interface de utilizador, tanto através do tempo de retenção(Tr) e 1/K₀, ou através do tempo de retenção e tempo de deriva (Td) (activando a *checkbox* em 6). Estas coordenadas permitem a determinação da posição dos picos representantes dos VOCs no espectro. No caso de existirem mais do que um pico a representar um composto (por exemplo a formação de um dímero), activando a *checkbox* “Multiple Peaks” (7) permite adicionar ao mesmo biomarcador, várias posições no espectro. Outra característica desta interface é o facto do título da janela sugerir a tarefa do utilizador na mesma (8). No caso da escolha da segunda opção “General Screening”, o espectro é representado graficamente o que implica a implementação de escalas de tempo de retenção, tempo de deriva e de intensidade. Estas são as informações essenciais referentes a um pico no espectro. No entanto, as condições de temperatura e pressão ambiente no momento da experiência influenciam a mobilidade iónica, por isso foi definido o termo de mobilidade iónica reduzida referida no capítulo 2. Tendo em conta este factor, foi implementada uma escala de 1/K₀ para universalizar a posição dos picos em qualquer experiência, representada na figura seguinte. Outra característica das escalas é a sinalização da posição do RIP como referência, que se revela útil no caso da subtracção de espectros dado que o RIP deixa de ser visível.

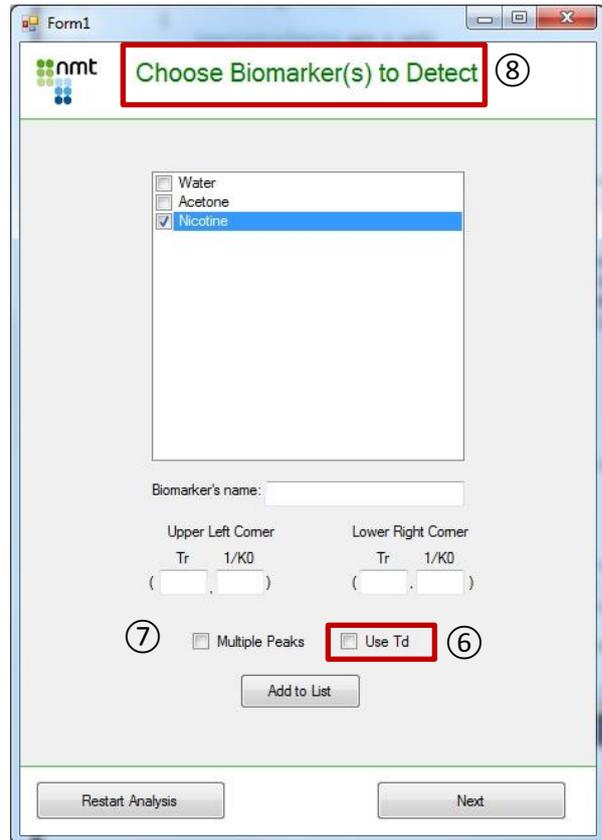


Figura 3.6 - Representação da janela de escolha dos marcadores a detectar, na interface desenvolvida

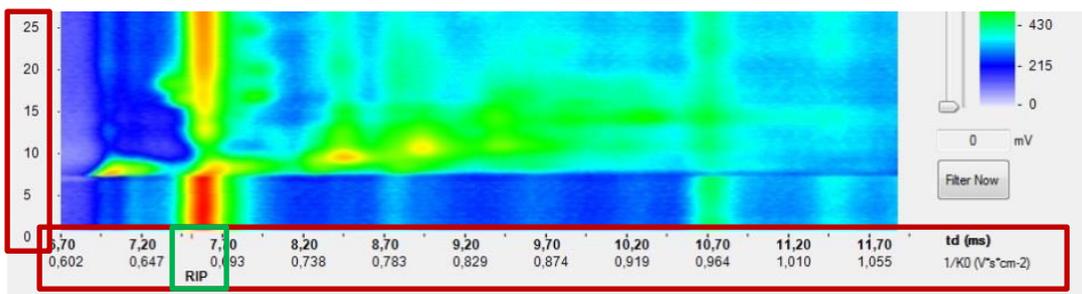


Figura 3.7 - Escala do tempo de retenção no eixo vertical, escalas do tempo de deriva e 1/K₀ no eixo horizontal, e a posição assinalada

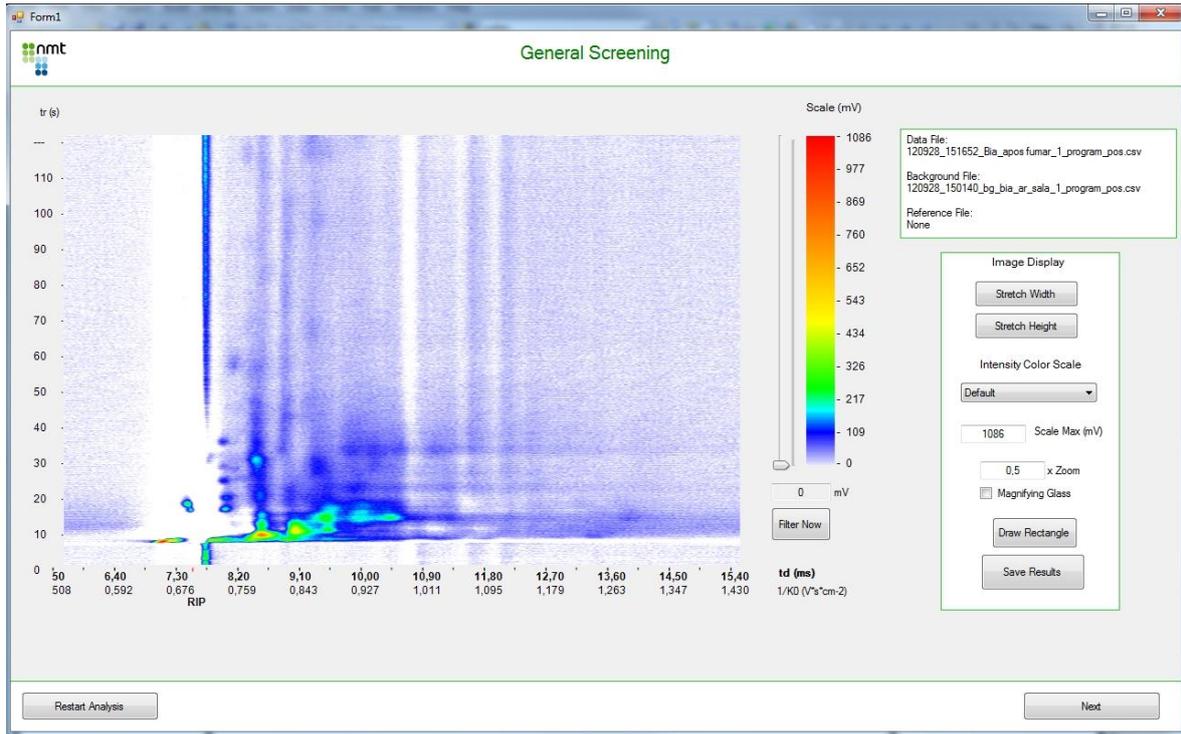


Figura 3.8 - Representação gráfica do espectro na interface desenvolvida

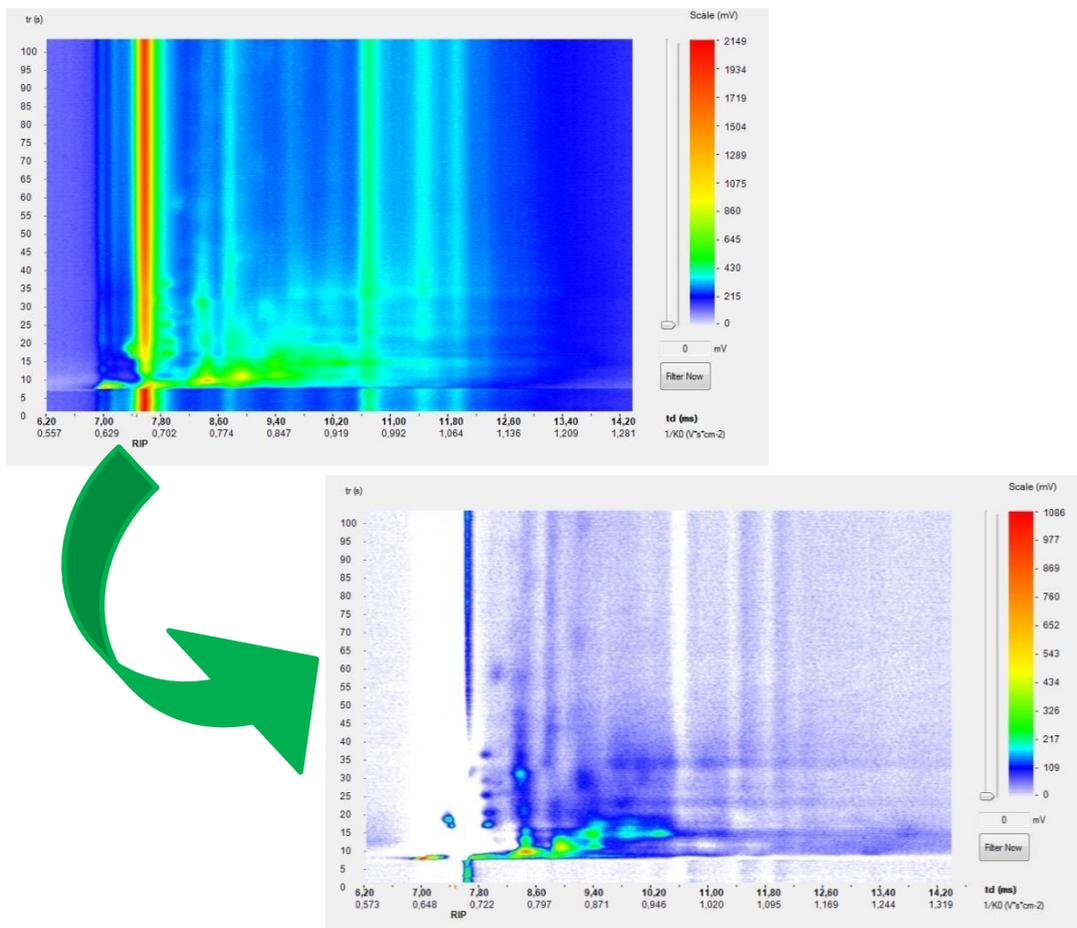


Figura 3.9 - Espectros obtidos a partir do ar exalado após fumar um cigarro convencional, antes e depois da subtração do background

Após a análise de espectros do ar ambiente é possível verificar que o sistema tem um background específico que se apresenta em todas as análises efectuadas pelo dispositivo, podendo induzir erros na análise de resultados. Por outro lado, o ar ambiente contém VOCs' para além dos existentes no organismo do paciente, portanto não devem ser contabilizados pois estes são classificados como contaminantes. Sendo assim optou-se por subtrair o espectro do ar da sala ao espectro que se pretende analisar (figura 3.9), de modo a serem eliminados os picos representantes dos VOCs' do ar ambiente e o padrão (ou *blank*) do sistema BreathSpec®. Devido à subtracção dos espectros obtém-se um espectro com uma *baseline* com valores aproximados de zero Volt, revelando valores baixos que são considerados ruído e podem ser facilmente identificados e filtrados.

Outra das características do espectro resultante é a representação dos valores negativos a branco e a possibilidade de ser aplicado um filtro de limiar. Este filtro actua de modo a suprimir qualquer valor do espectro inferior ao valor de limiar tornando o espectro mais explícito, sem ruído a perturbar a visualização do espectro. O limiar (valor mínimo) é definido em Volt e pode ser alterado através de uma simples *scrollbar*, no momento da visualização. O filtro de limiar actua também na escala de intensidades do espectro como se pode ver na figura 3.10.

Um dos passos para obter o espectro resultante é a normalização do mesmo (5.b), facilitando os cálculos para apresentação gráfica e mais importante é o facto de permitir estimar um valor para o filtro de limiar adequado para diferentes experiências eliminando o ruído eficazmente.

A representação gráfica dos espectros têm elevada importância para a identificação e percepção a olho nú dos picos existentes, caso se queira visualizar a existência de diferentes VOCs ou seleccionar um pico específico para analisar. Existem várias implementações que facilitam a visualização dos picos, como o Zoom, a lupa (8), ou o deslocamento do espectro com o rato. De modo a abranger toda a gama de intensidades dos picos nos espectros possíveis, foi implementada a opção de alteração de escala assim como a

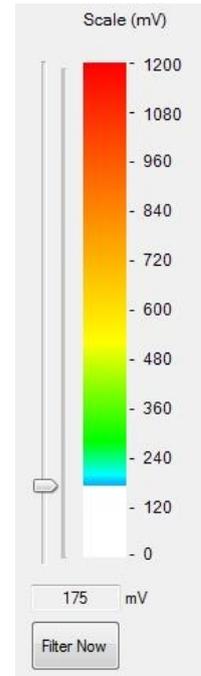


Figura 3.10 - Representação da *Scrollbar* com o filtro de limiar

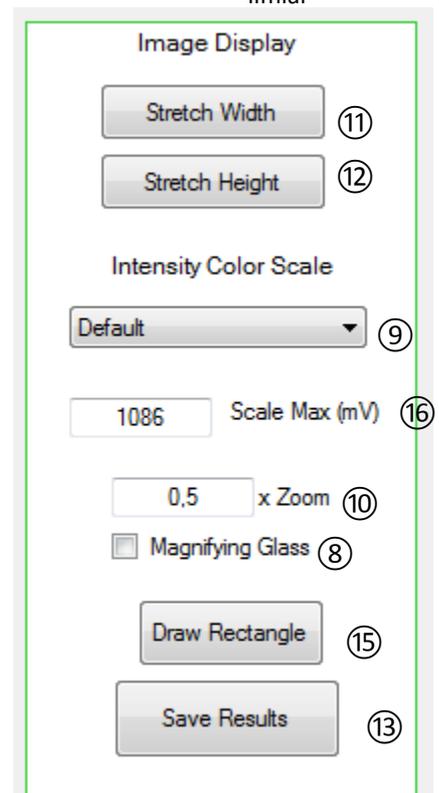


Figura 3.11 - Representação das ferramentas gráficas e informação acerca dos espectros

escolha de três escalas diferentes representadas na figura 3.13. A escala padrão é útil quando o objectivo é evidenciar os picos de intensidade máxima mais baixa, como é o caso dos espectros do ar exalado após fumar um cigarro convencional. A escala linear favorece por igual a visualização de todas as gamas de picos e a escala exponencial é favorece os picos de intensidade intermédia (9).

O zoom aplicado ao espectro possui algumas características específicas. Através da roda do rato ou das teclas “+” e “-” é possível alterar o zoom (e na caixa de texto (10)), mantendo sempre o rácio entre a altura e largura da imagem. Esta função não é possível no LAV, pois quando se aumenta o zoom demasiado a imagem é esticada no eixo dos Y’s, não mantendo o o rácio largura-altura. Com a ferramenta do zoom é possível manipular o espectro com facilidade, e no caso se queira que o espectro torne à escala pré-definida foram disponibilizados dois botões que ajustam automaticamente a largura (11) ou altura (12) do espectro à janela.

Nesta janela também é possível guardar o espectro resultante, com a vantagem de estar aplicado o filtro de limiar tornando o espectro mais fácil de analisar e reduzindo os falsos positivos na detecção de picos (13). Ao carregar o espectro resultante podemos confirmar o nome de cada ficheiro carregado (14), de modo a detetar algum engano na escolha dos ficheiros. Para diagnóstico dos picos é possível seleccionar uma área específica a analisar, clicando no botão (15) e desenhar o rectângulo no espectro.

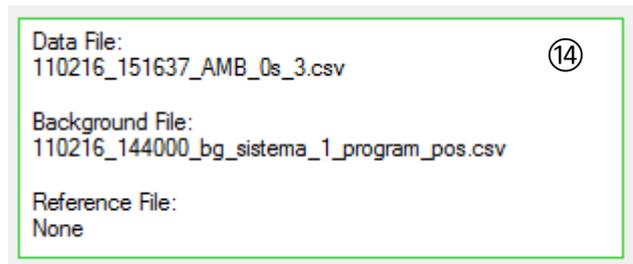


Figura 3.12 – Nomes dos espectros a ser visualizados

Outra funcionalidade extremamente útil é o ajustamento da escala a um dado máximo com fins de investigação. Quando o espectro é mostrado a escala vem ajustada à intensidade máxima do espectro resultante, mas devido à necessidade de comparação de espectros diferentes revelou-se necessário o ajustamento do máximo da escala de cores.

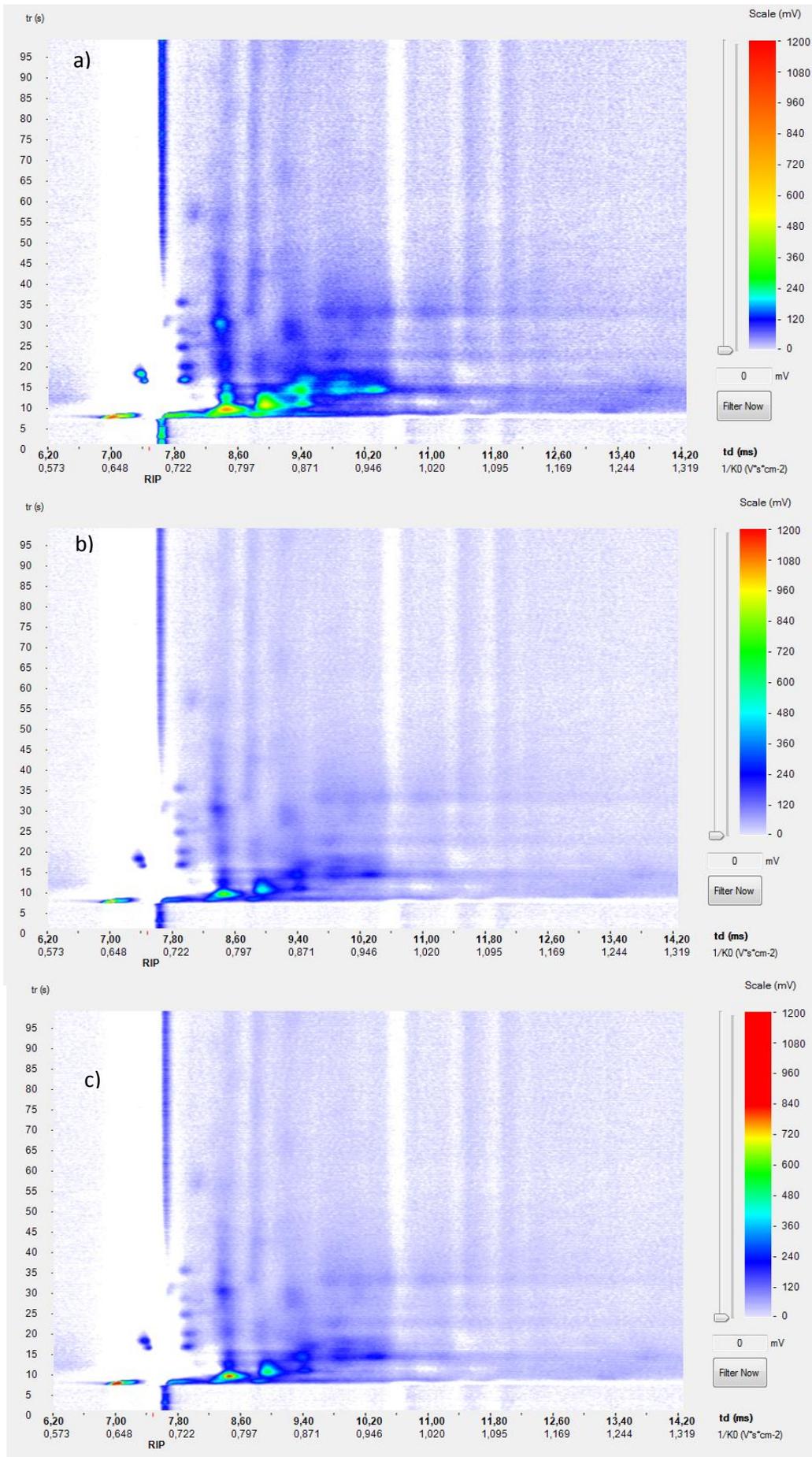


Figura 3.13 - Representação das escalas de cor disponíveis na interface gráfica desenvolvida
 a) Escala pré-definida, b) escala linear e c) escala exponencial (Intensidade máxima de escala alterada para 1.2V)

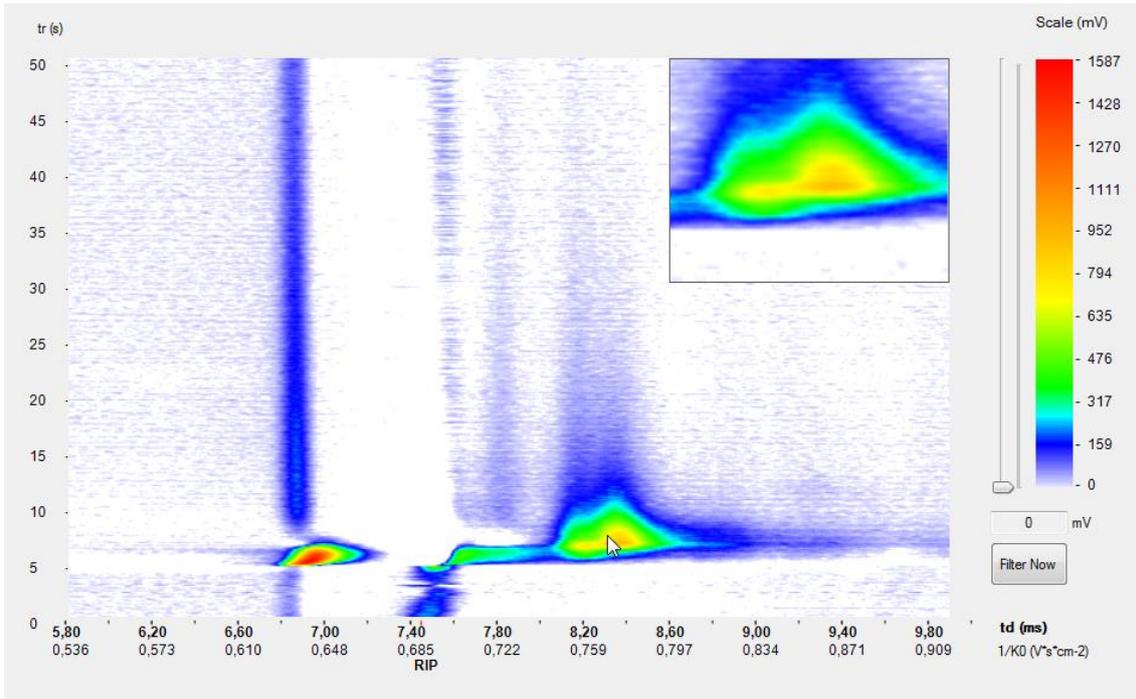


Figura 3.14 - Representação experimental da utilização da lupa na interface gráfica desenvolvida. Análise ao ar exalado após a execução de exercício físico.

Uma das funcionalidades da visualização gráfica é a utilização da lupa, permitindo ter uma visão geral do espectro e simultaneamente uma visão da forma de um determinado pico. O zoom funciona aumentando a imagem a 200% da área para onde a seta do rato aponta, como se pode verificar na figura 3.14.

No menu seguinte é possível escolher a análise a fazer ao espectro resultante, analisando apenas as áreas seleccionadas ou o espectro completo. A análise às áreas seleccionadas adequa-se quando existe uma área com picos bem definidos e contaminação da amostra, ou seja, a existência de um sinal relativamente intenso que não seja um VOC, por exemplo, uma contaminação proveniente do excesso de humidade no ar.

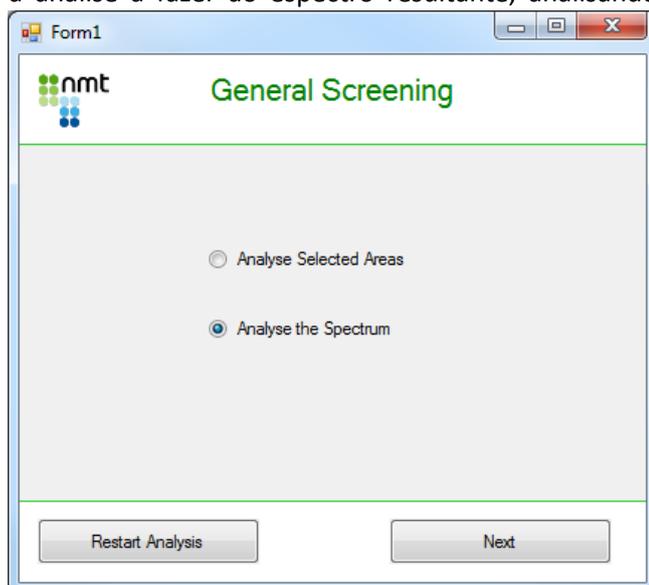


Figura 3.15 - Menu de análise ao espectro da interface gráfica desenvolvida

Selecionando a análise ao espectro completo e ao clicar no botão “DETECT” (17), o algoritmo calcula a posição e intensidade de todos os máximos existentes. Estes são comparados com os valores de posição existentes na base de dados interna, e os correspondidos são exibidos na lista visível na figura seguinte. Todas as informações dos máximos existentes são guardadas na memória, não só as corresponderam à base de dados.

Detected VOC	Intensity (V)	td (ms)	tr (s)
Water	1.03	7,006	7,308
Acetone	0.83	8,446	9,072
Nicotine	0.54	8,933	9,954

Figura 3.16 - Janela de resultados do diagnóstico da existência de VOCs.

3.5 Função de detecção automática dos picos

No ar exalado de um indivíduo saudável, geralmente são detetados três VOCs já referidos anteriormente: água, isopreno e acetona. Quando os picos da acetona e isopreno são muito intensos dá-se uma sobreposição parcial destes, como se pode observar na figura 3.17. Um dos desafios propostos na execução do diagnóstico de máximos é conseguir detectar a existência dos dois picos.

3.5.1 Algoritmo do GPL

A localização automática dos picos no espectro é permitida devido à utilização de um programa em C# denominado GPL. Esta ferramenta baseia-se no algoritmo desenvolvido pelo Professor Doutor André Mora e é devidamente incorporada na interface gráfica desenvolvida. A escolha e aplicação deste algoritmo são fundamentadas pelos resultados obtidos na detecção e quantificação de drusas nos olhos [25].

Este algoritmo detecta os percursos de gradiente máximo apontando para a intensidade máxima, marcando-a como o ponto máximo do pico. Quando dois ou mais percursos de gradiente vão ter ao mesmo ponto são reconhecidos como fazendo parte do mesmo pico. Os percursos que têm o mesmo ponto como máximo são reconhecidos como fazendo parte da mesma área de influência.

Na aplicação deste algoritmo é empregue o método de fusão (*merging*) de máximos, que pondera para cada máximo detectado a existência de um percurso até outro máximo em que o valor de intensidade não ultrapasse um valor mínimo pré-determinado. Este método consiste na fusão de áreas de influência dos picos e dos máximos detectados, sendo escolhido como pico o máximo de maior intensidade.

Devido à sobreposição dos picos por vezes não existe uma separação clara entre os dois picos, existindo apenas uma pequena “planície”, tornando mais difícil a sua determinação. Os parâmetros do algoritmo de detecção de picos utilizados durante a obtenção de resultados não foram alterados, contudo estes espectros foram utilizados como controlo de modo a ser bem sucedida esta detecção.

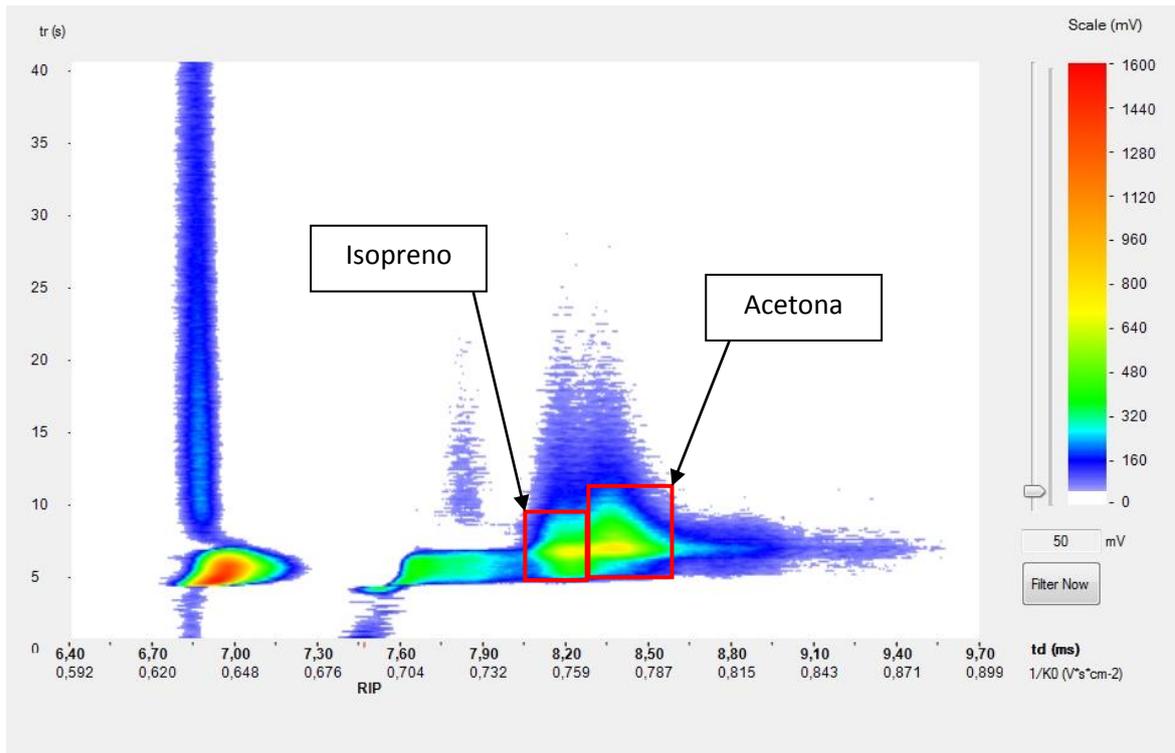


Figura 3.17- Subtração do espectro de ar exalado ao espectro do ar contido no sistema do IMS, num indivíduo saudável; visualizado na interface gráfica desenvolvida. Aplicado um filtro de limiar de 50mV. Escala máxima de 1.6V

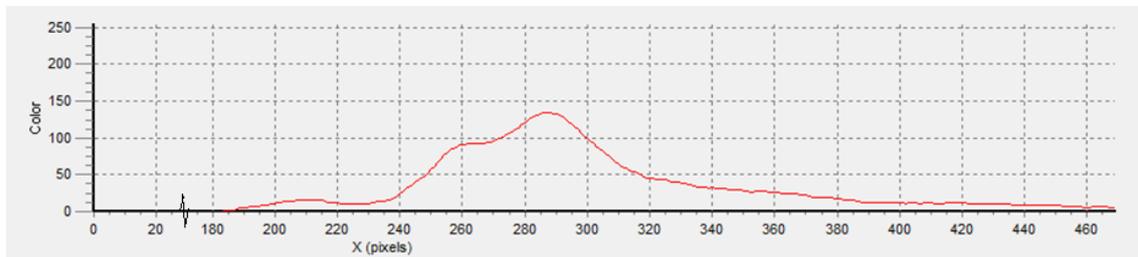


Figura 3.18 - Adaptado da análise do espectro resultante através do software Ad3ri utilizado para a detecção de drusas nos olhos. O eixo das abcissas corresponde aos pixéis correspondentes ao espectro começando no pixel 1000 e as ordenadas correspondem à intensidade.

O algoritmo detecta os picos da acetona e do isopreno na maior parte das amostras, onde o pico da acetona tem sempre maior intensidade máxima como se pode observar na figura 3.18. Os resultados são obtidos o espectro de intensidades a preto e branco, onde se pode observar os máximos detectados como pontos vermelhos. Este espectro está presente para propósito de estudo e verificação do funcionamento do algoritmo de detecção de picos.

É possível observar que a localização dos picos é semelhante, assim como a intensidade máxima. Na figura 3.19 é possível observar a detecção dos máximos correspondentes à posição da acetona e isopreno. Esta informação associada à intensidade torna possível a

quantificação destes compostos através do ajustamento de funções gaussianas aos picos correspondentes.

Detected VOC	Intensity (V)	td (ms)	tr (s)
Acetone	0,77	8,36	6,93
Isoprene	0,72	8,213	6,552

Detected VOC	Intensity (V)	td (ms)	tr (s)
Acetone	0,73	8,373	6,93
Isoprene	0,7	8,213	6,678

Figura 3.19 - Esquerda: Lista de picos detectados correspondente ao espectro de ar exalado visualizado anteriormente. Direita: Lista de picos detectados correspondente a um espectro de ar exalado semelhante.

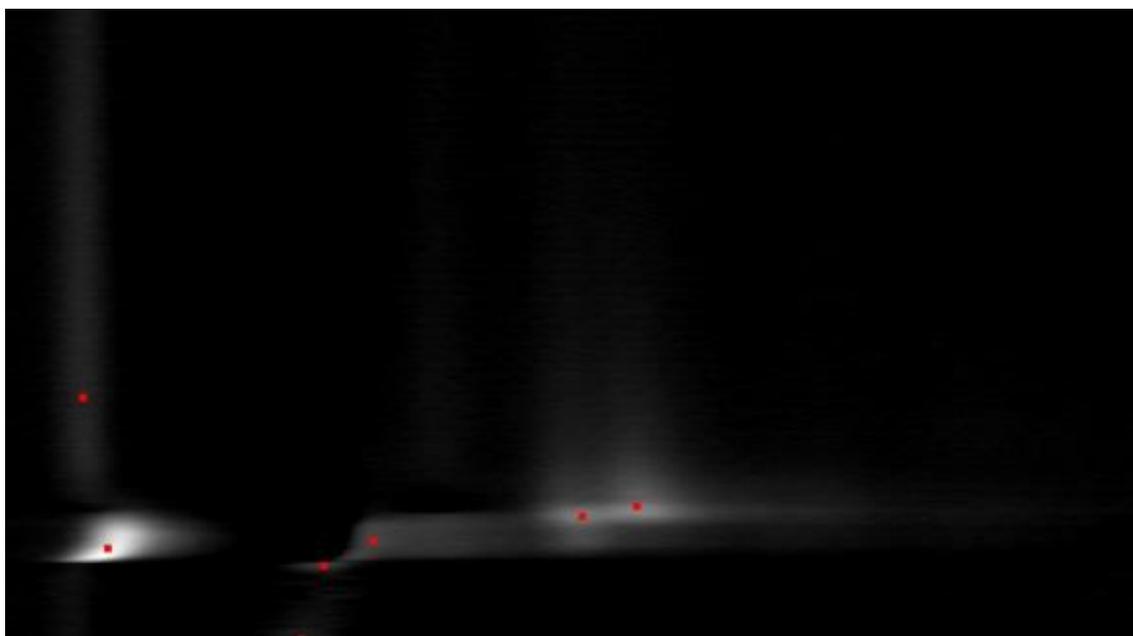


Figura 3.20 - Detecção de picos aplicada à subtração do espectro de ar exalado ao espectro do ar do sistema do IMS num indivíduo saudável.

Um problema que diz respeito ao ajustamento de parâmetros é o facto de existirem “planícies” com pequenos “vales” ou “montes”, ou seja, áreas que contenham valores próximos oscilantes; neste caso os resultados vão mostrar que existem mais pontos máximos do que realmente deveriam.

4 Resultados de teste da interface gráfica

4.1 Recolha de amostras

A recolha do ar exalado é feita por um espirómetro interligado ao MCC através do qual se exala o ar existente nos pulmões e vias respiratórias.

Os voluntários encontravam-se jejum e restrição de fumar durante duas horas anteriores à experiência. Precedendo a análise do ar exalado era pedido o preenchimento de um formulário com informações acerca do estado de saúde do voluntário. Os sujeitos e são considerados fumadores activos e encontravam-se num estado saudável no momento da análise. O procedimento tomado para a recolha de amostras segue cinco passos, por ordem de execução:

1. Análise ao ar exalado do sujeito;
2. Medição da pressão arterial;
3. Análise ao ar exalado do voluntário depois de fumar 10 *puffs* do cigarro electrónico com nicotina (11mg/g);
4. Análise ao ar exalado do voluntário depois de fumar 10 *puffs* do cigarro convencional com nicotina (8mg/g);
5. Medição da pressão arterial.

A análise do ar exalado é controlada por um espirómetro que efectua a medição do fluxo lateral de CO₂ / O₂ colectando apenas o ar alveolar. Cada análise ao ar exalado dá origem um espectro 3D do ar exalado.

4.2 Gráficos

Como já foi referido, a subtracção do blank é tida em consideração pois cria perturbação na leitura e visualização de VOC's resultando numa matriz de linhas verticais, que podem ser mal interpretadas como máximos. Através de uma imagem do ar da sala é possível ver a contribuição deste para o espectro final. Na figura 4.1, é possível observar as linhas de intensidades acima da linha de base do espectro representada a azul (cerca de 180mV).

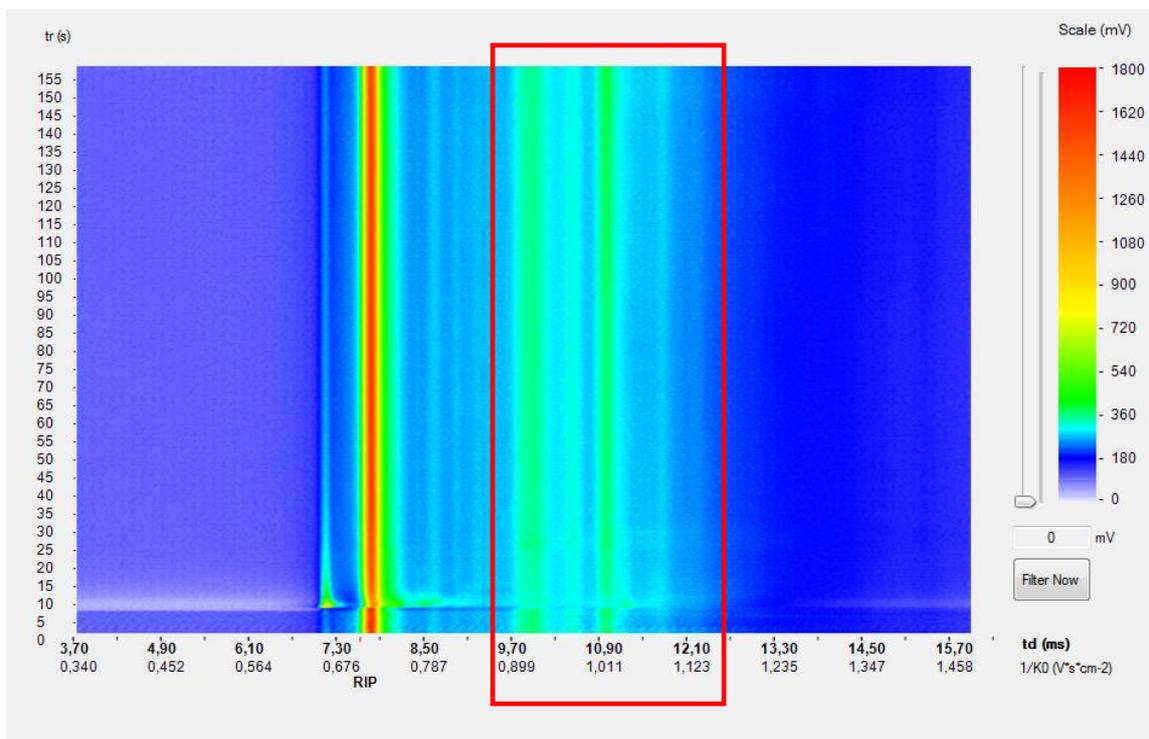


Figura 4.1 - Espectro de background (ar da sala) obtido na interface gráfica desenvolvida

4.2.1 Análise do ar exalado após fumar

Na altura da execução do procedimento experimental, pensou-se na subtração do ar do indivíduo saudável, ou seja, antes de fumar e em estado de jejum. No caso de querer detectar VOC's inerentes ao indivíduo, isto não é possível logo é decidido subtrair o espectro do ar ambiente. No caso de se querer observar todos os VOCs existentes no organismo, não se pode subtrair o ar exalado mas sim o ar da sala; assim é subtraída a matriz do sistema, e também os VOCs existentes no ar ambiente, que entram pelo nosso sistema respiratório ao serem inalados. Na figura 4.2 podemos observar um espectro do ar exalado após fumar um cigarro convencional, notando que neste existe uma matriz do sistema a contaminar o espectro; notando também que como a linha de base do espectro é diferente de zero, o algoritmo de detecção de picos não consegue calcular os máximos devido às limitações de processamento e memória disponível. Tendo em conta que os espectros são compostos por matrizes de dimensões 3000 por 1400, a selecção de uma área para analisar pode melhorar bastante o desempenho do algoritmo.

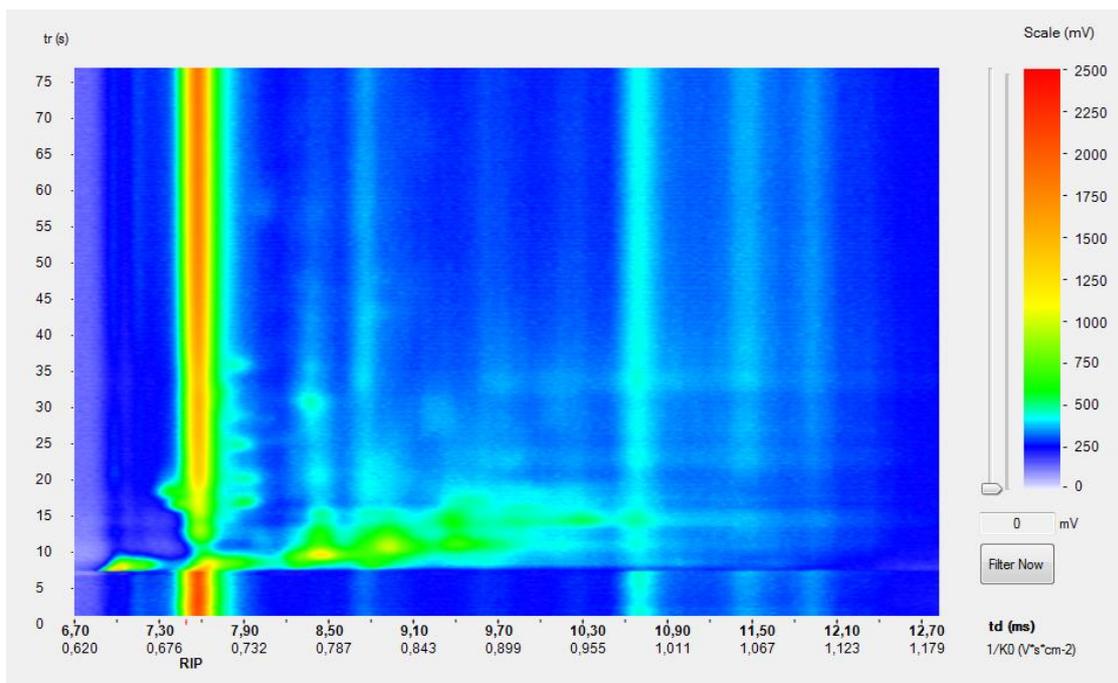


Figura 4.2 - Espectro de ar exalado após fumar um cigarro convencional visualizado na interface gráfica desenvolvida

Através da subtração do espectro do ar da sala ao espectro do ar exalado é possível observar o espectro resultante na figura 4.3. Ao contrário do espectro de ar da sala, este espectro não apresenta picos relacionados com o blank, reduzindo a probabilidade do algoritmo de detecção de máximos detectar falsos-positivos.

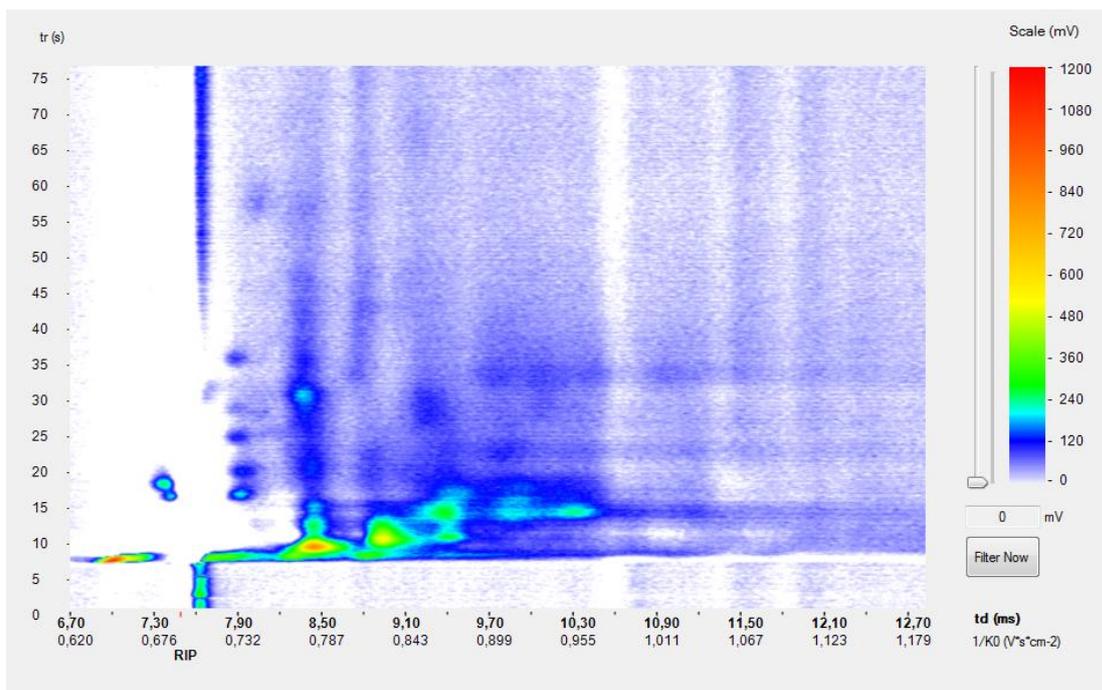


Figura 4.3 - Espectro de ar exalado após fumar um cigarro convencional visualizado na interface gráfica desenvolvida

O tempo de análise de máximos é reduzido se for aplicado um filtro de limiar, de modo a eliminar valores que não contribuem para a área dos picos que representam os VOCs. Assim, podem ser considerados ruído e a aplicação do filtro de limiar torna possível a sua supressão. Na figura 4.4 está representado o espectro resultante com um filtro de limiar de 70mV.

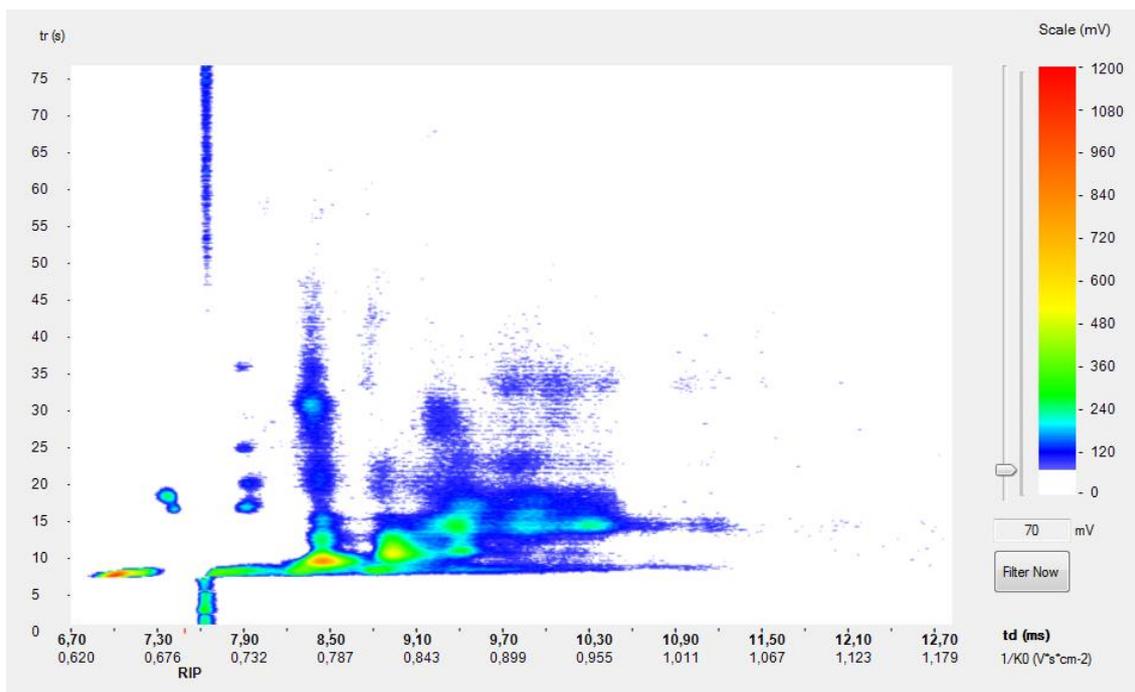


Figura 4.4 - Subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro convencional ao espectro do ar da sala, visualizado na interface gráfica desenvolvida

Para a análise dos máximos deste espectro em concreto cálculos foram relativamente rápidos, cerca de 5 segundos, sem necessidade de aplicar um filtro de limiar. Verifica-se que são detectados todos os máximos que revelam uma área circular em forma de pico. Estes picos representam VOCs presentes na composição do cigarro convencional. Contudo, a maior porção destes compostos voláteis não está identificado, portanto apenas é possível saber a quantidade de compostos existentes e a posição no espectro. A figura 4.5 representa o espectro analisado pelo algoritmo com um corte na área de interesse, com o objectivo de melhorar a visualização. Todos os espectros relativamente ao diagnóstico dos máximos estão adaptados de modo a ser visíveis as regiões de interesse.

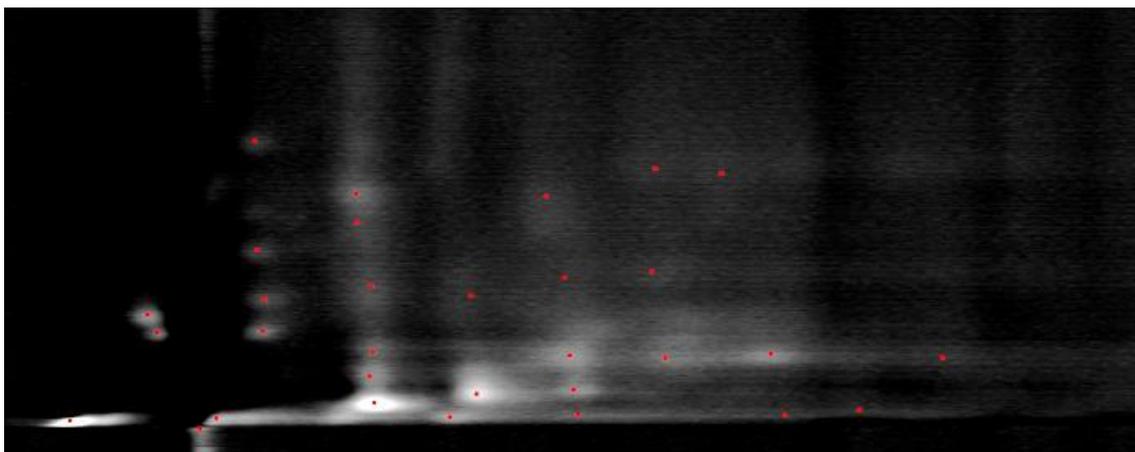


Figura 4.5 - Exemplo da detecção de máximos pelo algoritmo utilizado

4.2.2 Análise do ar exalado após fumar um cigarro electrónico e cigarro convencional

Para a análise dos compostos existentes do cigarro e cigarro electrónico foi utilizado o background do ar exalado antes de fumar. Normalmente o espectro do ar exalado de um indivíduo saudável contém três VOCs presentes: água, isopreno e acetona. A posição destes VOCs está mostrada na figura 4.6.

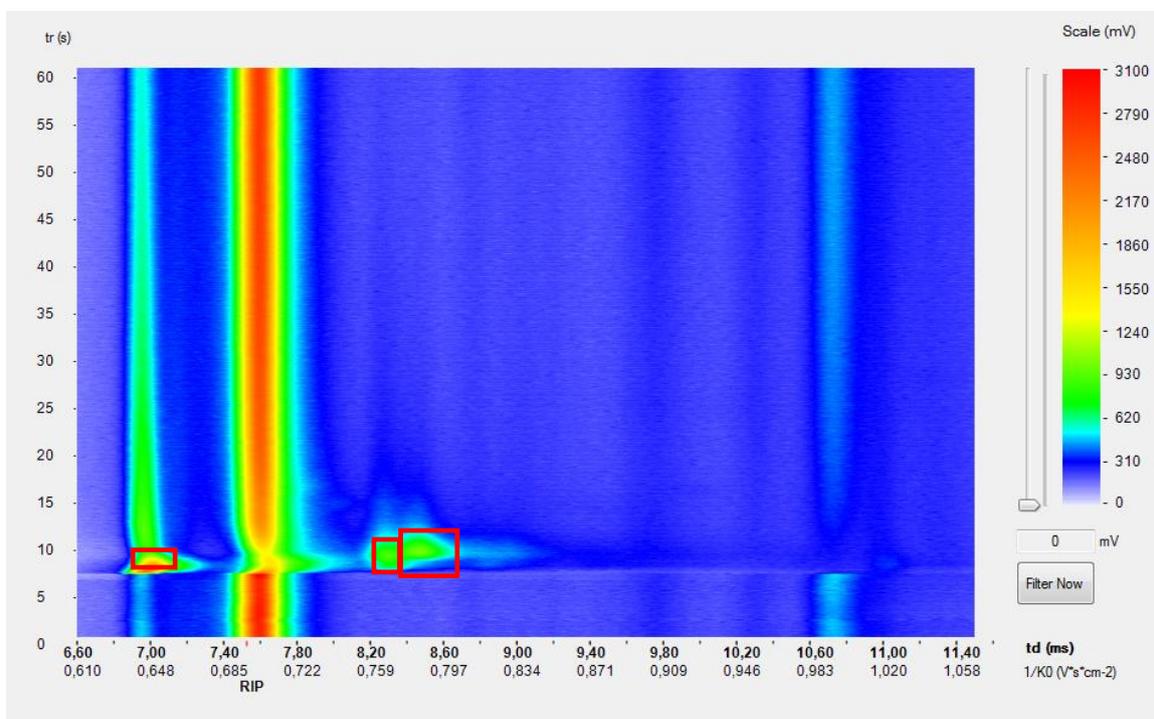


Figura 4.6 - Espectro de ar exalado de um indivíduo saudável em jejum, visualizado na interface gráfica desenvolvida. Os VOCs presentes são: água, isopreno, acetona (da esquerda para a direita)

A subtração do espectro de ar do indivíduo saudável ao espectro de ar após fumar um cigarro electrónico, dá origem a um espectro resultante, onde o isopreno e a acetona não aparecem, excepto se aumentarem de intensidade com o acto de fumar. O cigarro electrónico contém um cartucho com nicotina, porém nos resultados obtidos este VOC raramente foi visível no espectro (figura 4.7). Esta evidência pode estar relacionada com a falta de eficiência do cigarro electrónico na libertação da nicotina para o vapor inspirado. Os rectângulos assinalados no espectro representam áreas de identificação dos VOCs existentes na base de dados interna.

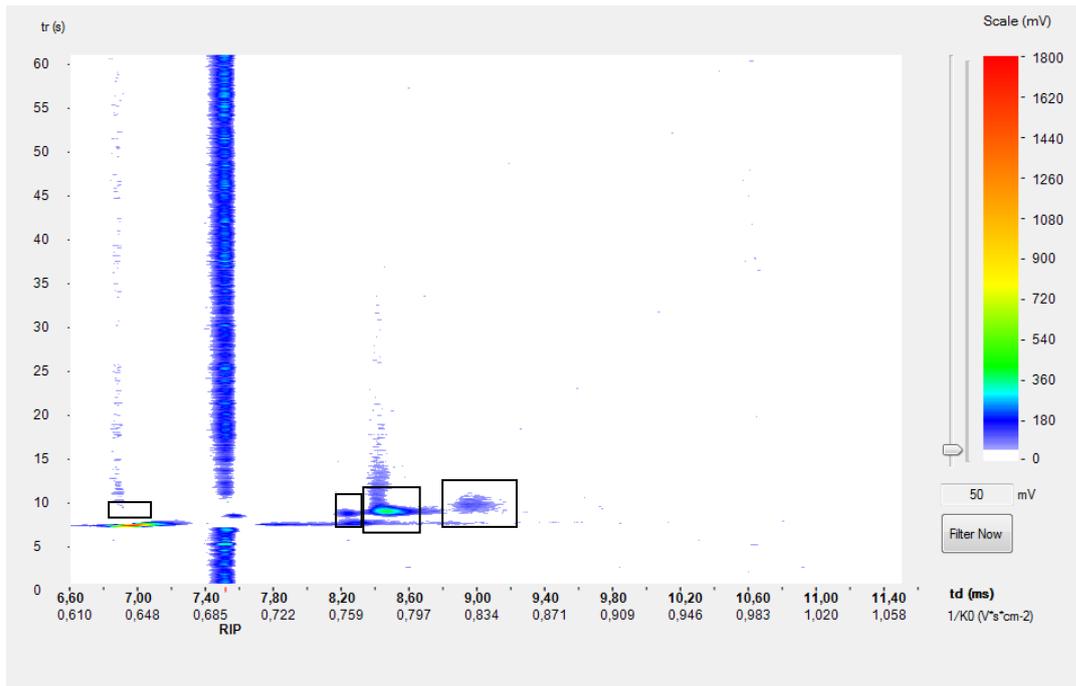


Figura 4.7 - Subtracção do espectro de ar exalado após fumar um cigarro electrónico ao espectro do ar exalado antes de fumar, visualizado na interface gráfica desenvolvida. Aplicado um filtro de limiar de 50mV. Áreas de presenças dos VOCs (da esquerda para a direita): água, isopreno, acetona, nicotina

Comparando visualmente (escala máxima igual, de 1.8V) a figura anterior com a figura 4.8, é possível observar grandes diferenças na constituição dos picos existentes no espectro.

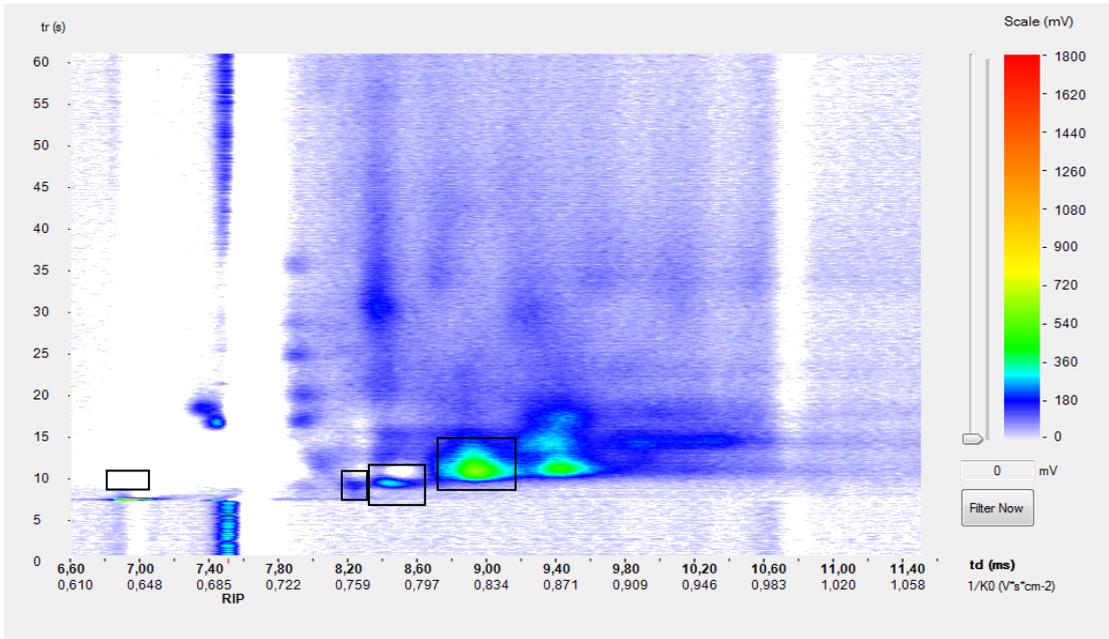


Figura 4.8 - Subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro convencional ao espectro do ar exalado antes de fumar, visualizado na interface gráfica desenvolvida. Áreas de presenças dos VOCs (da esquerda para a direita): isopreno, acetona, nicotina

Os VOCs detectados nos espectros, identificados na base de dados estão presentes na figura 4.9.

Detected VOC	Intensity (V)	td (ms)	tr (s)	Detected VOC	Intensity (V)	td (ms)	tr (s)
Isoprene	0,18	8,24	8,2	Acetone	0,3	8,433	9,072
Acetone	0,38	8,466	8,6	Nicotine	0,61	8,933	10,458
Isoprene	0,18	8,286	7,2	Isoprene	0,16	8,233	8,946

Figura 4.9 - Lista de VOCs detectados, presentes na base de dados, à esquerda corresponde ao espectro resultante da subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro electrónico; direita corresponde ao espectro resultante da subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro convencional

Embora seja possível visualizar um pico na área correspondente à nicotina na figura 4.7, o algoritmo não reconhece os valores com propriedades de um pico. As figuras seguintes correspondem à detecção dos picos em relação à subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro electrónico (figura 4.10) e à subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro convencional (figura 4.11). Na detecção de picos observa-se uma linha vertical com máximos detectados devido à subtração do RIP.



Figura 4.10 - Detecção de picos aplicada à subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro electrónico

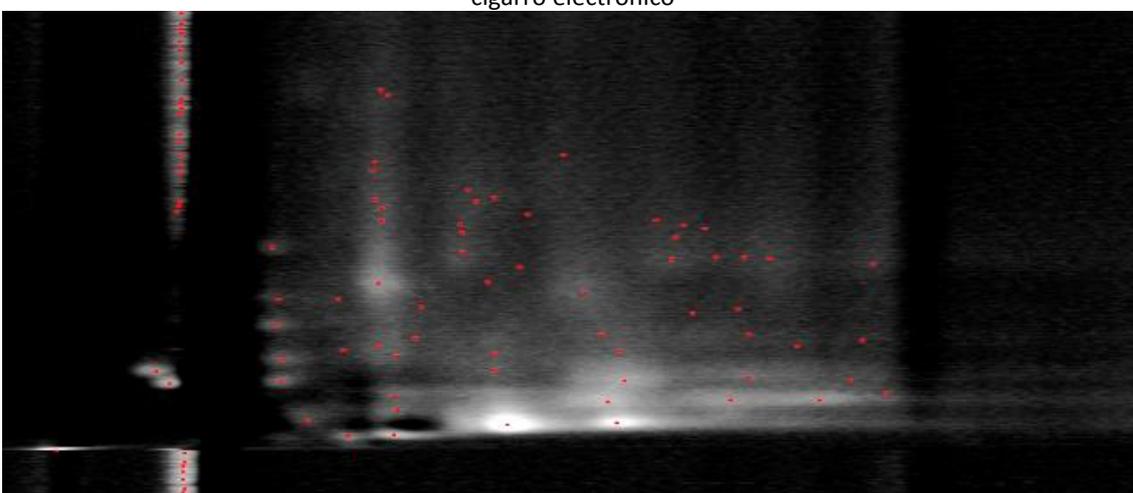


Figura 4.11 - Detecção de picos aplicada à subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro electrónico

O algoritmo não detectou a presença do pico de água pois como foi subtraído o espectro de ar exalado em estado normal, o pico de água não existe. No entanto o pico da acetona e de isopreno aumentaram depois de fumar qualquer um dos cigarros, por isso são detectados, embora com intensidades máximas relativamente baixas. O facto de o isopreno ser detectado duas vezes na figura 4.10 está poderá estar relacionado com a subtração ter dividido um pico em dois.

Outro exemplo de diagnóstico dos VOCs está presente nas figuras seguintes.

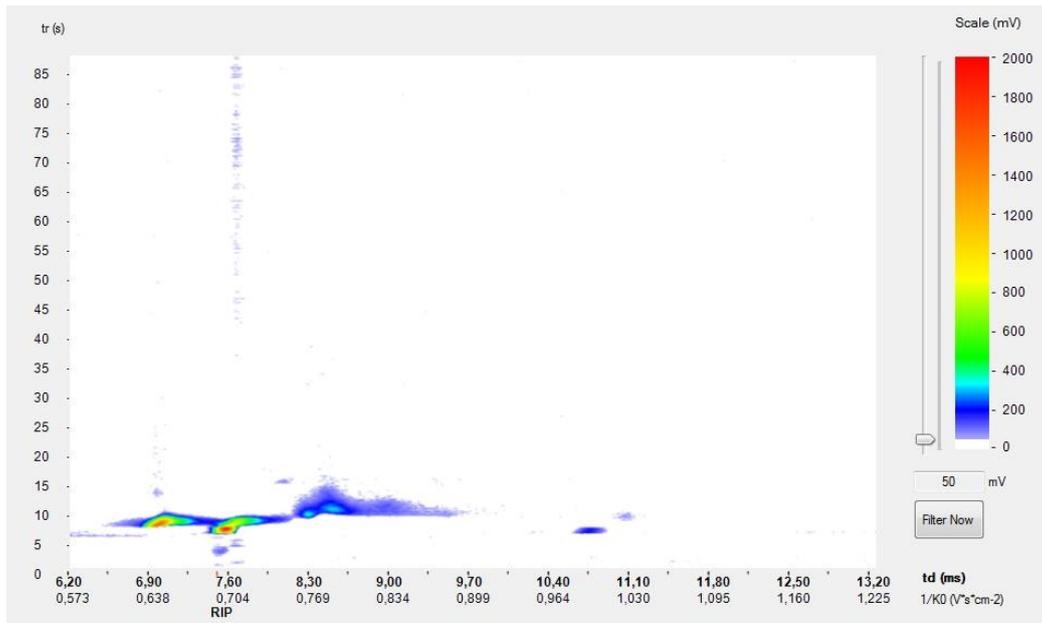


Figura 4.12 - Subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro electrónico ao espectro



Figura 4.13 - Detecção de picos aplicada à subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro electrónico

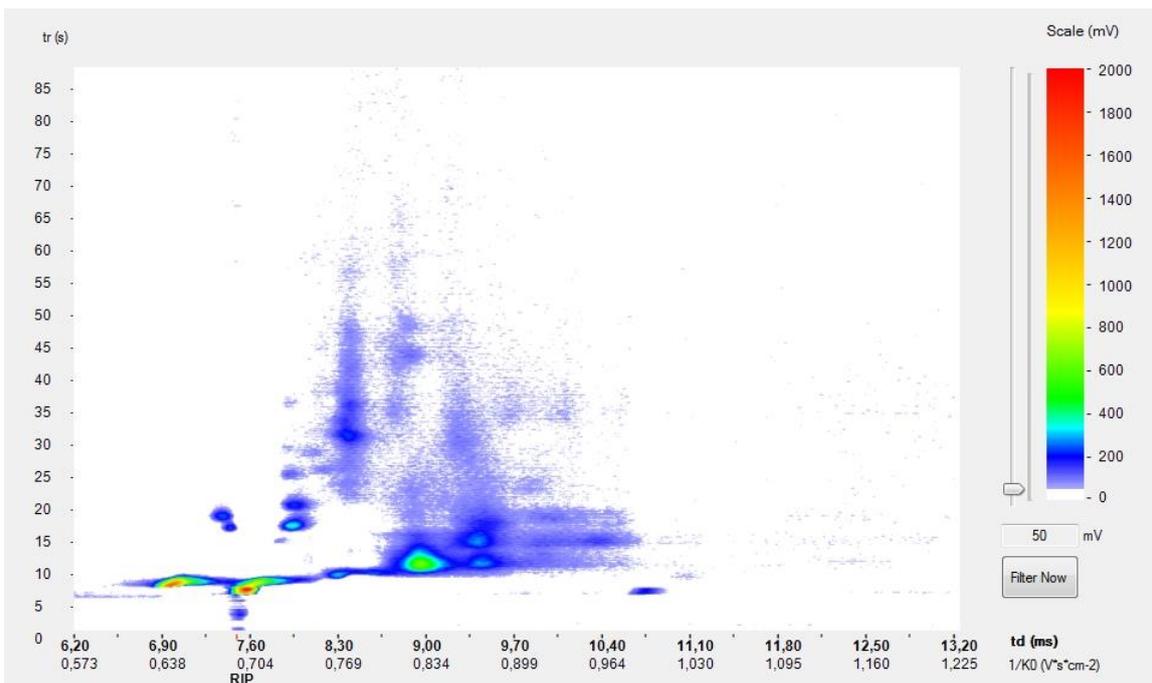


Figura 4.14 - Subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro convencional ao espectro do ar exalado antes de fumar, visualizado na interface gráfica desenvolvida. Aplicado um filtro de limiar de 50mV. Escala máxima de 2.0V

Na figura 4.15 é possível a enumeração dos máximos detectados, mesmo não associando a um VOC específico, visto que as bibliotecas são reduzidas devido à falta de informação.

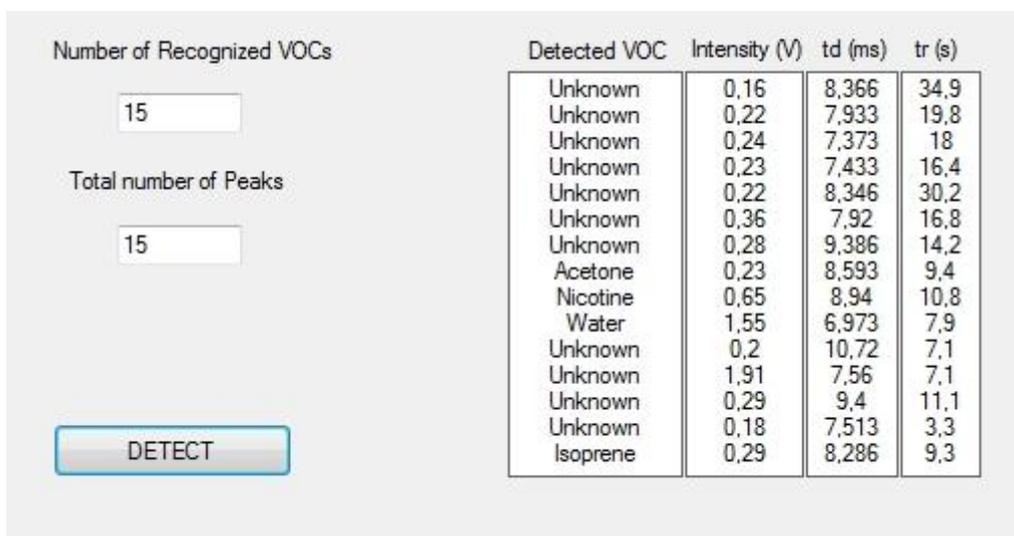


Figura 4.15 - Lista correspondente aos VOCs detectados mostrando as posições dos picos desconhecidos, visualizado na interface gráfica desenvolvida.

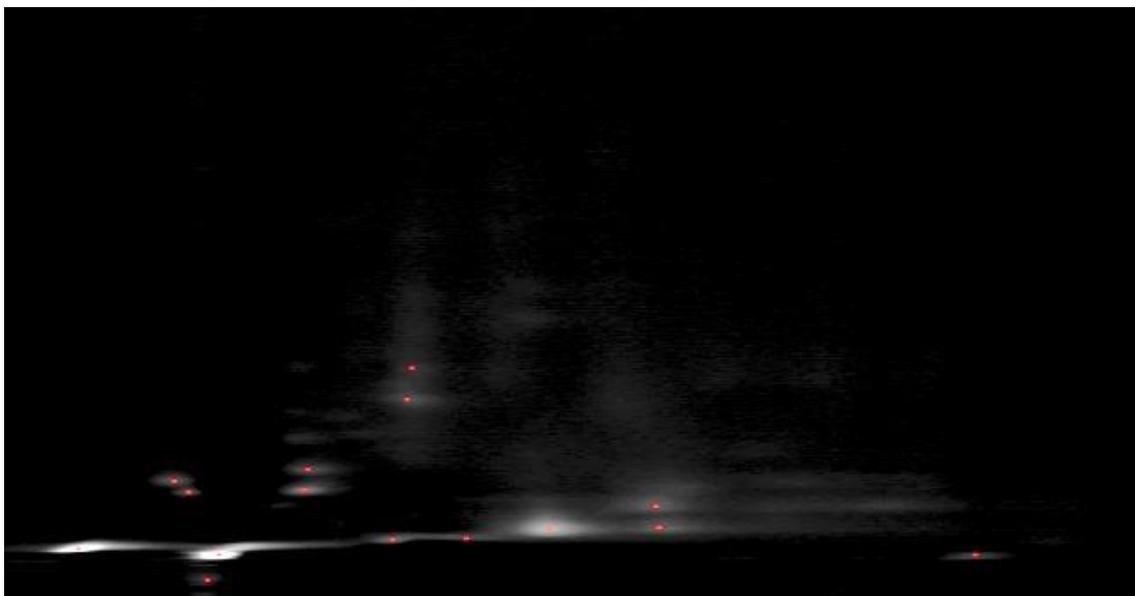


Figura 4.16- Detecção de picos aplicada à subtração do espectro de ar exalado após fumar um cigarro convencional

4.2.3 Análise do ar exalado na detecção de VOCs relacionados com a doença renal crónica

No espectro seguinte (figura 4.17) existe pico que não é comum aparecer nas amostras de ar exalado. O indivíduo em questão tem uma doença renal crónica. A primeira linha da lista na figura 4.18 corresponde ao pico incomum.

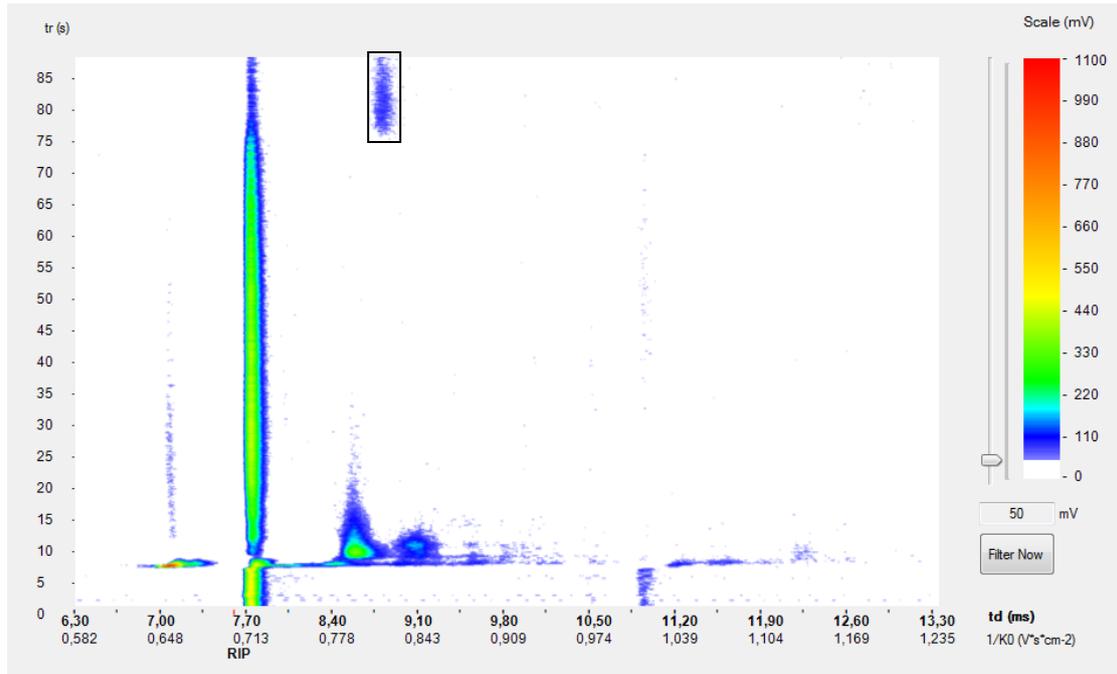


Figura 4.17 - Subtração do espectro de ar exalado ao espectro do ar da sala, num indivíduo com doença renal crónica; visualizado na interface gráfica desenvolvida. Aplicado um filtro de limiar de 50mV. Escala máxima de 1.1V

Number of Recognized VOCs		Detected VOC	Intensity (V)	td (ms)	tr (s)
<input type="text" value="12"/>		Unknown	0,09	8,806	78,9
Total number of Peaks		Nicotine	0,16	9,04	10,2
<input type="text" value="59"/>		Acetone	0,36	8,573	9,2
<input type="button" value="DETECT"/>		Unknown	0,09	11,193	7,6
		Unknown	0,08	11,493	7,8
		Water	0,96	7,066	7,2
		Unknown	0,11	8,98	7,6
		Unknown	0,09	10,9	6,6
		Unknown	0,08	10,94	5,7
		Acetone	0,22	8,413	7,4
		Unknown	0,09	9,546	7,7
		Unknown	0,08	10,92	1,9

Figura 4.18 - Lista correspondente aos VOCs detectados num indivíduo com doença renal crónica, mostrando as posições dos picos desconhecidos, visualizado na interface gráfica desenvolvida.

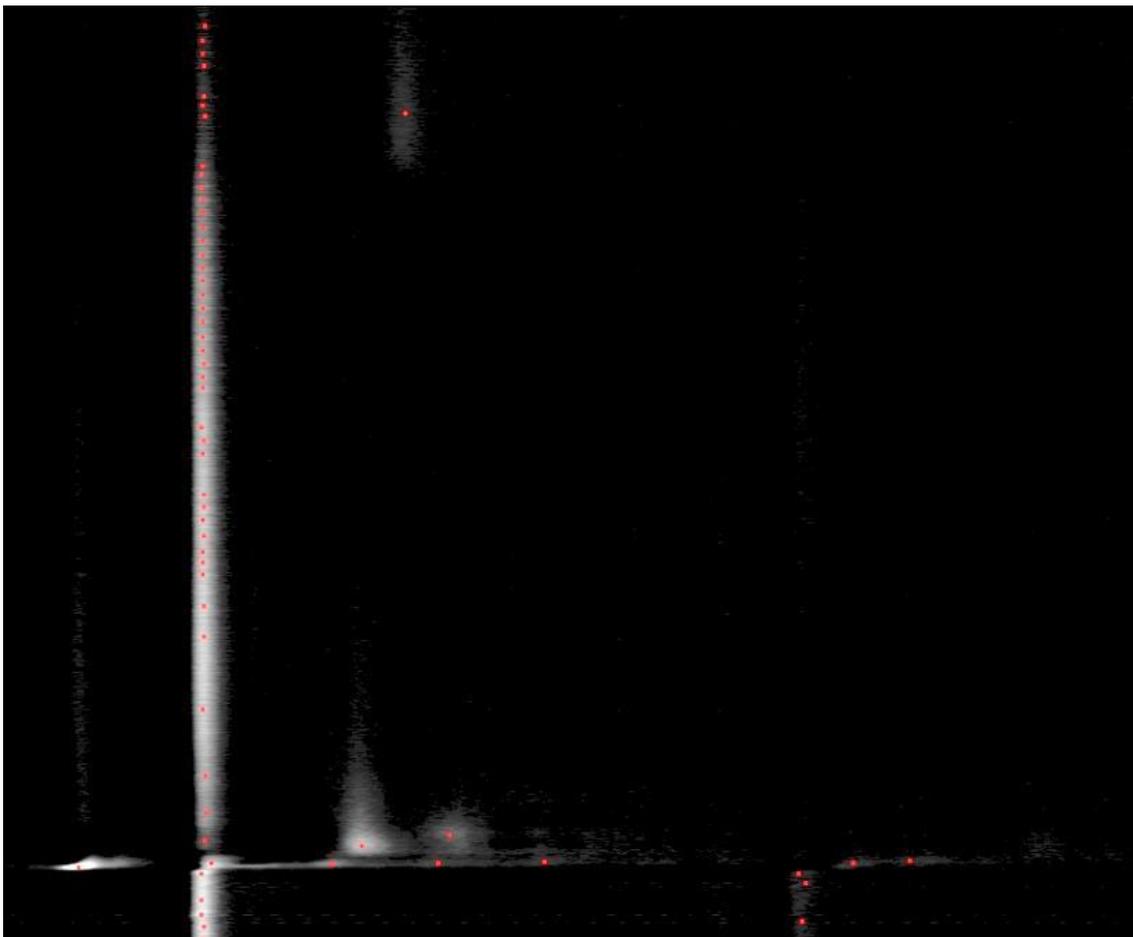


Figura 4.19 - Detecção de picos aplicada à subtração do espectro de ar exalado ao espectro do ar da sala num indivíduo com doença renal crónica.

Um dos factos observados é a presença de nicotina em três dos espectros relativos a este tema, sendo dois deles de controlo. Nenhum dos indivíduos fuma, logo é possível que o IMS estivesse contaminado e com necessidade de empregar o programa de limpeza. Após a experiência com o indivíduo de doença renal crónica, o espectro do indivíduo de controlo apareceu também com o pico incomum, apesar de não ter doenças renais. É possível, novamente, que o IMS estivesse contaminado.

4.2.4 Detecção de VOCs num indivíduo com asma

O espectro de seguida analisado diz respeito ao ar exalado de um indivíduo com asma, a tomar medicação. O espectro resultante é obtido através da subtração do ar exalado ao espectro do ar da sala. Os cinco máximos incomuns detectados presentes na figura 4.21 estão destacados a vermelho na figura 4.20.

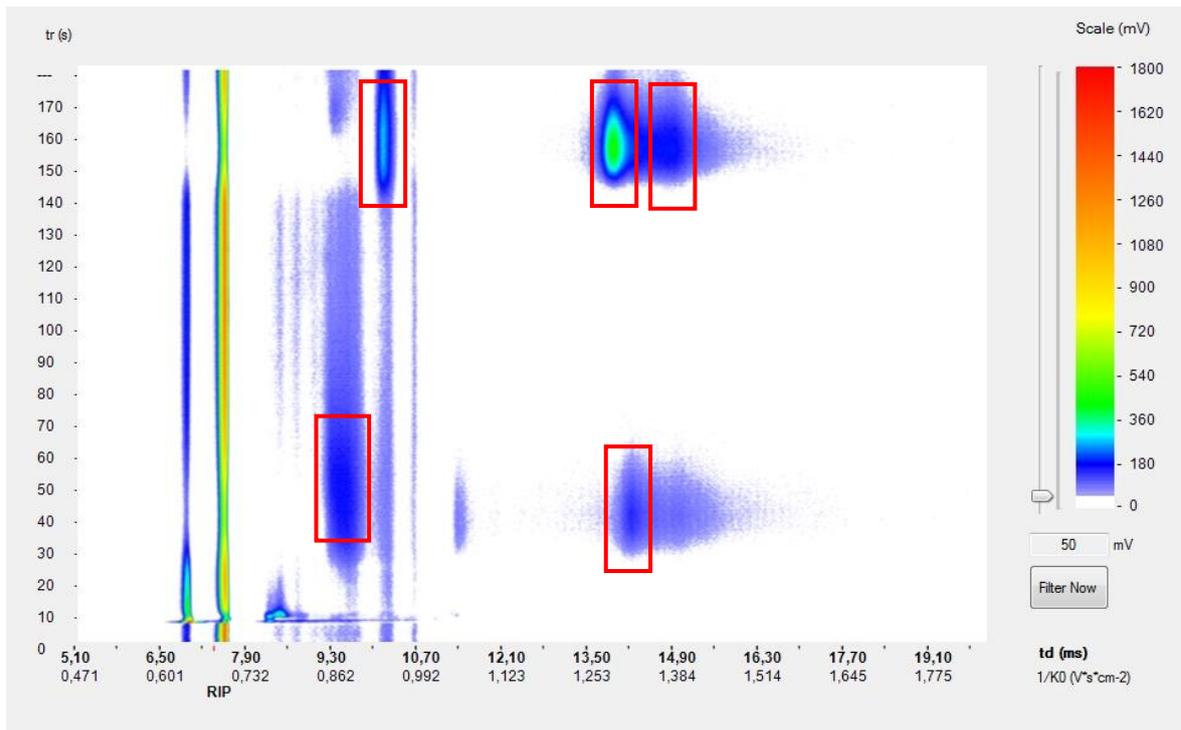


Figura 4.20 - Subtração do espectro de ar exalado ao espectro do ar da sala, num indivíduo com asma e a tomar medicação; visualizado na interface gráfica desenvolvida. Aplicado um filtro de limiar de 50mV. Escala máxima de 1.1V

Number of Recognized VOCs		Detected VOC	Intensity (V)	td (ms)	tr (s)
<input type="text" value="9"/>		Water	1,69	6,946	7,2
		Acetone	0,39	8,406	9,4
		Isoprene	0,32	8,246	8,9
		Isoprene	0,29	8,253	7,7
		Unknown	0,2	14,813	154,9
		Unknown	0,45	13,873	155,4
		Unknown	0,16	14,186	43,1
		Unknown	0,19	9,42	50,7
		Unknown	0,28	10,106	161
Total number of Peaks					
<input type="text" value="19"/>					
<input type="button" value="DETECT"/>					

Figura 4.21 - Lista correspondente aos VOCs detectados num indivíduo com asma e a tomar medicação; mostrando as posições dos picos desconhecidos, visualizado na interface gráfica desenvolvida.

A análise ao mesmo indivíduo com asma é feita um mês mais tarde, mas com este ausente de medicação e os resultados mostram a existência de um pico incomum, não coincidente com nenhum dos anteriores. Através do tempo de retenção do pico desconhecido mostrado pela figura 4.23 é possível verificar que não coincide com nenhum dos picos detectado anteriormente neste indivíduo, mas assemelha-se com um pico existente no paciente com doença renal crónica. Outra evidência da semelhança entre os espectros é o facto de também ser detectada nicotina, mesmo o indivíduo não fumando. Este resultado pode ser indicador de que estes VOC's aparecem em conjunto como parte do mesmo processo metabólico.

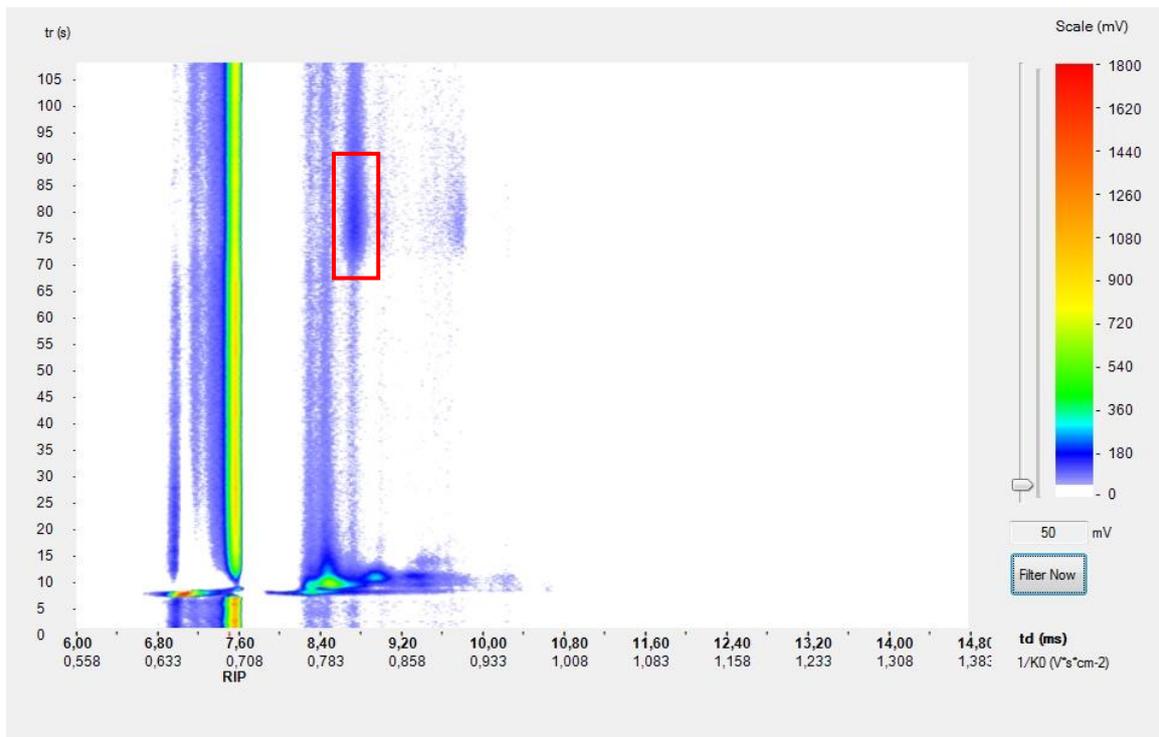


Figura 4.22 - Subtração do espectro de ar exalado ao espectro do ar da sala, no mesmo indivíduo com asma, sem consumo de medicação; visualizado na interface gráfica desenvolvida. Aplicado um filtro de limiar de 50mV. Escala máxima de 1.8V

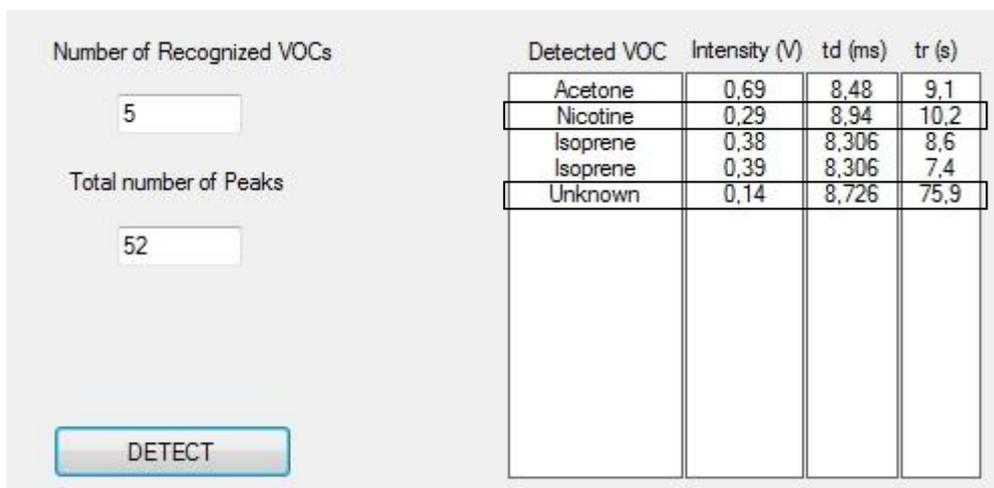


Figura 4.23 - Lista correspondente aos VOCs detectados no mesmo indivíduo com asma, sem consumo de medicação; mostrando as posições dos picos desconhecidos, visualizado na interface gráfica desenvolvida.

4.2.5 Eficiência da interface gráfica desenvolvida

Foi desenvolvida uma interface que tem por base uma dinâmica simples e de fácil de utilização. A abordagem feita ao utilizador é clara e instrutiva de modo a obter resultados de uma forma rápida e eficiente.

A visualização dos espectros é feita através de uma escala de cores construída manualmente. É uma escala que se adapta à escala de valores do espectro, sendo o valor máximo de intensidade representado a vermelho. Optou-se pelo azul como cor para intensidades mais baixas, observando que existe um gradiente de azuis tornando menos evidentes os valores que se aproximam de zero, pois não apresentam informação relevante. A utilização do branco para valores iguais ou inferiores a zero simplificam o espectro mostrando apenas os VOCs detectados no espectro. A utilização das outras cores permitem a visualização dos picos existentes, sendo disponibilizada uma ferramenta para mudar a escala de cores, alterando a percepção visual do espectro, sendo nalguns casos favorável. As escalas disponibilizadas são alteradas dinamicamente, marcando intervalos cada vez mais pequenos à medida que se aumenta o zoom, de modo a facilmente identificar a posição dos picos visualmente. A ferramenta de alteração de escala também se revela útil na medida em que se pode utilizar a mesma escala para visualizar diferentes espectros. Em muitos casos é utilizada a comparação de espectros para a exposição dos resultados em forma de posters ou artigos.

A detecção dos máximos é um processo relativamente rápido, que pode levar cerca de 2 a 5 segundos se for aplicado um filtro de limiar coerente. O ruído existente nos espectros após a subtração dificulta o processamento matemático, por isso geralmente é aplicado um filtro de 50 miliVolt. No entanto este valor deve ser definido com base na intensidade máxima do espectro e na intensidade dos picos observados visualmente. No caso de não se aplicar nenhum filtro não é possível garantir que a detecção de picos seja bem-sucedida, pois depende do *hardware* do computador utilizado e da memória disponibilizada para a aplicação. A interface gráfica pode ser considerada uma ferramenta de visualização que permite evidenciar os picos existentes, logo deve ser utilizada de modo a permitir uma coerente detecção dos máximos.

O diagnóstico dos máximos no espectro resultante pode ser considerado eficaz pois este detecta os principais picos pretendidos, contudo em alguns casos existem picos vestigiais que não são detectados. As definições de detecção de picos em vigor foram optimizadas para detectar os máximos correspondentes a VOCs nos mais diversos espectros, portanto não são

alteráveis a partir da interface do utilizador e são as mesmas para todas as análises. Existiu a preocupação de não sobre-ajustar as definições da detecção de picos, por isso o algoritmo pode ser considerado uma ferramenta útil, mas com algumas falhas. Nalguns espectros resultantes dá-se a detecção de mais de um máximo no mesmo pico ou de mais picos detectados do que os existentes. Porém, devido ao reduzido número de VOCs existentes na base de dados não ocorreram falsos-positivos. O aparecimento de uma linha de picos na área de subtração do RIP em alguns espectros não é adequado embora não apresente obstrução na detecção dos VOCs pretendidos, e pode ser ocultado na lista de VOCs detectados não sendo relevante para os resultados.

A identificação dos picos pode ser considerada parcialmente empírica pois foi baseada na experimentação do MCC-IMS e em observações feitas por outros investigadores. As áreas definidas no enquadramento dos picos também foram definidas com base em resultados experimentais. No entanto, os resultados positivos demonstram a fiabilidade do método.

5 Conclusões e Perspectivas futuras

O desenvolvimento da tecnologia leva à aplicação de novos métodos direccionados para a saúde. O facto de o MCC-IMS ter limites de detecção na ordem dos ppbv [ng/L] e permitir uma análise de baixo custo dos compostos orgânicos voláteis existentes no organismo traz novas perspectivas de diagnóstico e controlo de doenças. Os estudos feitos a partir do MCC-IMS trazem resultados positivos nas mais diversas áreas, nomeadamente na alimentar, ambiental, saúde e segurança. Dado que a matriz de análise é menos complexa comparativamente à do sangue ou urina, existe possibilidade de uma maior evolução a curto prazo e obtenção resultados viáveis medicamente num futuro próximo.

Ao longo do desenvolvimento desta dissertação foi concretizada a aprendizagem prática do funcionamento do MCC-IMS (BreathSpec®), para além da presença em seminários sobre o ar exalado e a esta tecnologia.

No geral, os objectivos pretendidos na dissertação foram cumpridos. Foi proposta a subtracção de espectros para a obtenção de um espectro resultante que facilitasse tanto a leitura visual como os cálculos dos picos representantes dos compostos orgânicos voláteis. Esta subtracção poderia apresentar um problema de desvio entre os espectros, provocando a camuflagem de alguns picos e exibição de outros. Devido ao facto de serem duas amostras diferentes utilizadas na subtracção deliberou-se que a recolha da matriz de *background* fosse recolhido no momento imediatamente anterior à análise do ar exalado ao qual se pretendia subtrair. Deste modo, pretende-se minimizar o desvio entre espectros que possam induzir em conclusões erradas. A subtracção dos espectros revelou-se um método fiável não ocultando nenhum dos picos apresentado no espectro original. A aplicação do filtro de limiar também se mostrou útil tanto a nível de apresentação visual do espectro como na rapidez de cálculo dos máximos por parte do algoritmo. Esta ferramenta permitiu acelerar a velocidade de processamento cinco vezes mais, tornando este processo fiável em termos práticos.

Os testes realizados com os diversos espectros permitem aferir eficiência na detecção dos máximos, independente da posição destes. A detecção de picos que se sobrepõem parcialmente pode ser considerada bem-sucedida e pode ser considerado um avanço relativamente à desconvolução e quantificação dos picos como por exemplo isopreno e acetona. O aumento de intensidade do pico de acetona no espectro de ar exalado pode dar-se por diversas razões, particularmente no jejum, após a prática de exercício físico ou devido à

existência da doença diabetes. A quantificação do pico de acetona prova ser relevante dado que em indivíduos com diabetes este pico revela-se mais intenso que o normal e até mais intenso que após desgaste físico.

Existem várias melhorias a efectuar apropriadas à interface gráfica desenvolvida, como a gravação e leitura de ficheiros com as posições dos máximos detectados no espectro, a criação de grelha horizontal e vertical no gráfico do espectro resultante;

Uma melhoria viável diz respeito à comparação de dois espectros graficamente lado a lado na interface gráfica e assinalar automaticamente se existem picos em comum. Outro melhoramento exequível é a possibilidade de assinalar os picos detectados directamente no espectro a cores e obter informação dos pontos seleccionando-os.

Um objectivo futuro é o desenvolvimento de uma biblioteca que permita a identificação dos compostos orgânicos voláteis presentes nos espectros de MCC-IMS. A construção de uma base de dados em cloud (on-line) permite a partilha e uniformização da informação possibilitando uma grande evolução desta técnica ao nível do diagnóstico de doenças.

Bibliografia

1. **Vassilenko, V., Bragança, A. M., Ruzsanyi, V., Sielemann, S.** *Potential and suitability of Ion Mobility Spectrometry (IMS) for breath analysis.* 6th International Conference on Technology and Medical Sciences (TMSi). pp. 317-318. October 21-23, Porto, Portugal 2010.
2. **Vautz, Wolfgang, Nolte, Jürgen, Fobbe, Rita, Baumbach, J.I.** *Breath analysis—performance and potential of ion mobility spectrometry.* J. Breath Res., 2009, Nº 3 doi:10.1088/1752-7155/3/3/036004
3. **Baumbach, J.I., Westhoff, M.** *Ion mobility spectrometry to detect lung cancer and airway infections.* Spectroscopy Europe, 2006, Vol. Vol.18 Nº6, pp. 22-27.
4. **Mazzone, Peter J.** *Analysis of Volatile Organic Compounds in the Exhaled Breath for the Diagnosis of Lung Cancer.* Journal of Thoracic Oncology, 2008, Vol. 3, Nº7.
5. **Koczulla, Rembert et al.** *MCC/IMS as potential noninvasive technique in the diagnosis of patients with COPD with and without alpha 1-antitrypsin deficiency.* Int. J. Ion Mobil. Spec. 2011 14:177–185. doi 10.1007/s12127-011-0070-0.
6. **Baumbach, J.I.** *Process analysis using ion mobility spectrometry.* Analytical and Bioanalytical Chemistry Nº384: 1059–1070, 2006. doi:10.1007/s00216-005-3397-8.
7. **Vassilenko, V.** *Non-invasive biomonitoring of human health: Technical developments in breath analysis.* Porto, Portugal. 6th International Conference on Technology and Medical Sciences (TMSi). p. 353. October 21-23, 2010.
8. *Ion Mobility Spectrometry.* **Journal of Analytical Chemistry.** 2006, Journal of Analytical Chemistry, Vols. 61, Vol.6, p. 519. ISSN 1061-9348.
9. **Ferreira, H.** *Caracterização de sacos Tedlar® flex film de recolha de ar exalado.* s.l. : FCT-UNL, 2011.
10. **Dias, F., et al.** *Prototype and graphical interface for selective exhaled air acquisition.* Spain : s.n., 2013. February 11-14, 2013.
11. **Vassilenko, V., Neves, B., Pais, J., Ferreira, Helena.** *Real-time characterization of smokers breath: electronic vs conventional cigarettes.* 2012.
12. **Rutherford, E.** *The velocity and rate of recombination of the ions of gases exposed to Röntgen radiation.* s.l. : Phil Mag., 1897. Vol. 44, pp.422–440.
13. **Röntgen, W.C.** *On a new kind of rays.* Nature 1895, Vol.53 , pp.274-276.
14. **Röntgen, W.C.** *On a new kind of rays.* Science 1896,,Vol. 3, pp.726.
15. **Thomson, J.J. ,Rutherford, G.P.** *Conduction of Electricity Through Gases.* Cambridge,U.K. : Cambridge University Press, 1928.
16. **Tyndall, A.M.** *The Mobility of Positive Ions in Gases.* Cambridge, U.K. : Cambridge Physical Tracts, Cambridge University Press,1938.
17. **Lattey, R.T.** *Effect of small traces of water vapor on the velocities of the ions produced by Röntgen rays in air.* Proceedings of the Royal Society of London 1911, Vol.84, pp.173-181. doi: 10.1098/rspa.1910.0068.

18. **Lathey, R., Tizard, H.** *On the velocities of ions in dried gases.* Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character (1905-1934). 1912-04-25. Vol.86 (588):pp. 349–357.
19. **Langevin, P.** *L'ionisation des Gaz,* Ann. de Chim. Phys. 1903, Vol. 28, pp. 289–384.
20. **Langevin, P.** *Une formule fondamentale de théorie cinétique,* Ann. de Chim. et de Phys. 1905, Vol. 5, pp. 245–288.
21. **Eiceman, G.A., Karpas., Z.** *Ion Mobility Spectrometry, Second Edition.* Ion Mobility Spectrometry, 2005. ISBN 0-203-50475-5.
22. **Stach, J., Baumbach, J.I.** *Ion Mobility Spectrometry - Basic Elements and Applications,* International Journal for Ion Mobility Spectrometry 01/2002; 5:1-21 2002.
23. **Holopainen, S. et al.** *Evaporation of ionic liquids at atmospheric pressure: Study by ion mobility.* Epub 2010, pp. 907–915, Talanta 2011. doi:10.1016/j.talanta.2010.10.062
24. **Dummer, J., et al.** *Analysis of biogenic volatile organic compounds in human health and disease.* Trends in Analytical Chemistry Vol. 30 n°7, pp. 960–967, 2011. doi:10.1016/j.trac.2011.03.011
25. **Mora, A. D., Vieira, P. M., Manivannan, A., Fonseca, J. M.** *Automated drusen detection in retinal images using analytical modelling algorithms.* Biomedical engineering online, 2011, Vol.10, Nº59. doi: 10.1186/1475-925X-10-59;
26. **Vassilenko, V.** *Apresentação Desenvolvimento instrumental e tecnológico para diagnóstico e rastreio das doenças vasculares e oncológicas,* JORTEC , FCT-UNL 2010.
27. **Vassilenko, V., et al.** *Instrumental tools for express analysis of lacrimal fluids.* Barcelona, Spain : SciTePress. Proceedings of BIODEVICES 2013 – International Conference on Biomedical Electronics and Devices, 6th International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies. February 11- 14; 2013.
28. **Alves, Ricardo.** *Estudo dos Biomarcadores associados a doenças renais.* FCT-UNL, 2012.
29. **G.A.S.** Manual Interno do MCC-IMS.

Anexos

REAL-TIME CHARACTERIZATION OF SMOKERS BREATH: ELECTRONIC VS CONVENTIONAL CIGARETTES

Valentina Vassilenko^{a,b}, Bruno Neves^a, João Pais^b, Helena Ferreira^b

^a Centre of Physics and Technological Research (CePTec), Faculty of Sciences and Technology, NOVA University of Lisbon, Campus FCT UNL, 2829-516 Caparica, Portugal

^b NMT, S.A, Edifício Madan Parque, Rua dos Inventores, 2825-182 Caparica, Portugal

vv@fct.unl.pt

Introduction

Analysis of exhaled breath, especially of Volatile Organic Compounds (VOCs), is of increasing interest in the medical field. Recently obtained results indicate that the analysis of VOCs in breath gas may become a promising non-invasive tool for medical diagnosis, therapy success monitoring, as well as to provide information of risk of exposure to hazardous substances and toxic gases. There is a special interest in the technology which allows to bring devices at bed side for direct sampling of breath without any loss or deterioration of the analites providing immediate results. [1,2]

The main goal of this work is not to compare or discuss the advantages or disadvantages of any kind of cigarettes, but rather to explore the possibility of MCC-IMS technology and to test the developed protocol for *in-situ* and *real-time* analysis of volatile endogenous metabolites



Example of an electronic cigarette

Experimental

The breath of a group of smokers was collected and analyzed by Ion Mobility Spectrometry coupled with Multi Capillary Column (MCC-IMS). The study group included 7 people, with ages between 19 and 48 and without any chronic disease. They were fasting and in smoking restriction two hours previous of the analysis.

Sample collection was done by exhalation through a mouth piece with precise spirometer.

Only end-tidal exhaled air was driven to the BreathSpec® apparatus working with MCC-IMS technology.

Analysis of breath were performed at three different situations:

- a- Normal breath;
- b- After smoking an electronic cigarette with nicotine (11mg/g);
- c- After smoking a conventional cigarette (nicotine: 8mg/g).

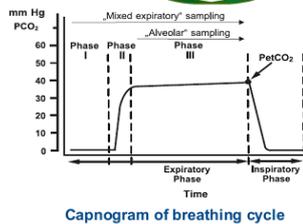
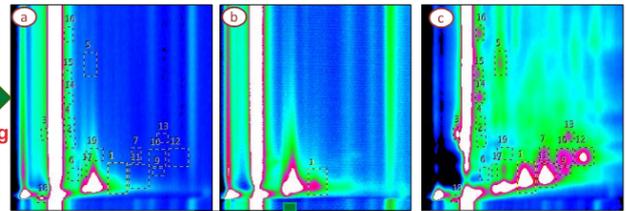


VOC's in breath



Collection of the alveolar air

Data
Processing



Capnogram of breathing cycle

MCC-IMS technology:

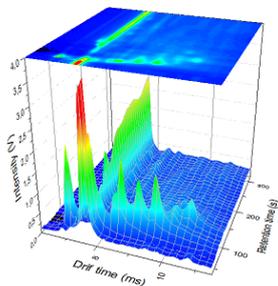
- high sensitivity (**low ppb range**) due to Ion Mobility Spectrometer (IMS);
- Compared to other methods of breath analysis, IMS offers a **tenfold higher detection rate** of VOCs;
- Coupling to a multicapillary column (MCC) as a pre-separation unit, offers the advantage of an **immediate twofold separation** of VOCs with visualisation in a 3D-chromatogram.



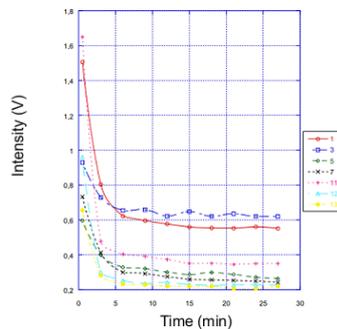
d) Single chromatogram of (b) with several existent VOC's.

- **Qualitative information** ⇒ peak position
- **Quantitative information** ⇒ peak intensity

Results



3D IMS Chromatogram of breath after smoking a conventional cigarette.



Exponential decay of nicotine (peak 1) and other VOCs after smoking a conventional cigarette

- The obtained experimental results was consistent for all seven persons at the three experimental condition.
- For normal breath only the peaks of acetone and water were observed.
- The presence of nicotine in alveolar exhaled air is visible after smoking both the conventional and e-cigarettes (image b and c, represented by marker n°1).
- After smoking the conventional cigarette it was observed 19 additional peaks of VOCs, as it is shown in image c.
- It was also possible to obtain a kinetic of VOCs by analysis of collected breath samples every three minutes till 27 minutes after smoking a conventional cigarette. The results show an exponential decay of nicotine.

Conclusions and Future Work

- Analysis of collected breath revealed significant differences after smoking the electronic and conventional cigarettes;
- Proposed protocol for measurements of endogenous VOCs provide a sensitive and stable results of human breath analysis;
- The potentialities of measuring VOC's kinetics in real-time indicate the new perspective in the future work

References

- [1] Baumbach, J.I. Ion mobility spectrometry coupled with multi-capillary columns for metabolic profiling of human breath, *J. Breath Research*, 3, 1(2009).
- [2] Flouris, A. D., & Oikonomou, D. N. Electronic cigarettes: Miracle or menace? *British Medical Journal: Clinical Research Edition*, 3 40, (2010).