

Final

**Avaliação de Nova Estratégia Extrativa, Baseada em NTDs,
Combinada com Dados de Análise Cromatográfica
e Quimiométrica para a Detecção de Biomarcadores
de Diferentes Tipos de Cancro**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Priscilla Felício Porto Figueira
MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

julho | 2016

M
G Ava
D-R

T/M
544
FIG Ava
+ PD-R

UNIVERSIDADE DA MADEIRA
BIBLIOTECA

**Avaliação de Nova Estratégia Extrativa, Baseada em NTDs,
Combinada com Dados de Análise Cromatográfica
e Quimiométrica para a Detecção de Biomarcadores
de Diferentes Tipos de Cancro**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Priscilla Felício Porto Figueira

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTADOR

José de Sousa Câmara

CO-ORIENTADOR

Jorge Augusto Machado Pereira



**Avaliação de nova estratégia extrativa, baseada em NTDs,
combinada com dados de análise cromatográfica e
quimiométrica para a deteção de biomarcadores de diferentes
tipos de cancro**

Tese submetida à UNIVERSIDADE DA MADEIRA

Com vista à obtenção do grau de mestre em Bioquímica Aplicada

2015 / 2016

Priscilla Felicio Porto Figueira

Orientação: Professor Doutor José de Sousa Câmara

Co-orientação: Doutor Jorge Augusto Machado Pereira

FUNCHAL - PORTUGAL

**“First, think. Second, believe.
Third, dream. And finally, dare.”**

Walt Disney

AGRADECIMENTOS

A elaboração e conclusão desta dissertação não seriam possíveis sem o apoio de diversas personalidades individuais e coletivas que contribuíram em termos académicos, profissionais e pessoais para que este projeto fosse bem-sucedido. Deste modo, gostaria de deixar aqui a minha profunda gratidão a essas pessoas pois, de forma indireta ou direta, foram a chave para a concretização desta etapa.

Um agradecimento especial ao meu orientador Professor Doutor José de Sousa Câmara, pela oportunidade, apoio e disponibilidade. Obrigada pelo incentivo, pela paciência e por acreditar na minha capacidade para o desenvolvimento dos diversos trabalhos decorrentes nestes últimos anos. No mesmo sentido, gostaria de agradecer também ao meu coorientador Doutor Jorge Pereira, pela disponibilidade, apoio e paciência. Obrigada por todas as críticas e por me ajudares a evoluir, como investigadora e como pessoa.

Não poderia deixar de mencionar e agradecer a colaboração dada pelo Centro Hospitalar do Funchal (CHF) Dr. Nélio Mendonça, e em particular pelo Doutor Fernando Aveiro, pela disponibilidade e cooperação na cedência das amostras imprescindíveis para este trabalho. Do mesmo modo, gostaria também de agradecer à Liga Portuguesa Contra o Cancro – delegação da Madeira (LPCC-Madeira), e em particular ao seu presidente Dr. Ricardo Sousa, pelo valioso apoio e suporte na recolha de amostras. No mesmo sentido, quero também agradecer a todos os voluntários que se disponibilizaram a ajudar neste projeto através da doação das amostras.

Em termos institucionais gostaria de agradecer ao Centro de Química da Madeira (CQM), por proporcionar todas as condições para a realização desta dissertação e à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projeto estratégico do CQM (UID/QUI/00674/2013) e do projeto New Indigo (New-INDIGO/0003/2012) ao qual esta dissertação faz parte. Quero também manifestar a minha profunda gratidão a todos os parceiros do projeto New Indigo, e em particular aos investigadores Doutor Mieskisch, Doutora Fuchs e Doutor Bergman por todo o apoio e formação para o desenvolvimento da metodologia analítica aplicada.

Não poderia deixar de agradecer a todos os amigos que de uma forma direta ou indireta contribuíram para que esta etapa fosse alcançada. Um obrigada especial à Ana Freitas e a Catarina Cruz, por todo o apoio, entusiasmo, amizade e incentivo não apenas durante a dissertação, mas também durante os outros anos do nosso percurso académico.

Por fim, gostaria também de agradecer à minha família pelo apoio incondicional durante este percurso. Quero aqui deixar o meu profundo e especial agradecimento ao meu esposo José Figueira e ao meu filho Cristiano. Obrigada pela compreensão das minhas ausências, pelo suporte nas horas difíceis, por todo o carinho e amor de sempre. Obrigada por serem o meu alicerce e o meu porto seguro.

TRABALHOS CIENTÍFICOS

A realização deste projeto foi uma excelente oportunidade para ampliar o meu conhecimento, acesso e análise de informação científica, nomeadamente no planeamento, execução e finalização de trabalhos de investigação. Do mesmo modo, permitiu-me adquirir competências de organização e de comunicação imprescindíveis em ciência. Para além disso, contribuiu de forma significativa para a melhoria do meu conhecimento em metabolómica, bem como as minhas habilidades em química analítica, nomeadamente em técnicas extrativas e cromatográficas.

Durante o 2º Ciclo em Bioquímica Aplicada tive a oportunidade de participar e desenvolver outros projetos de investigação para além do projeto principal da minha dissertação. No global, estes trabalhos resultaram em diversas publicações científicas em revistas internacionais, bem como na participação em conferências nacionais e internacionais, através da realização de diferentes comunicações orais e posters.

ARTIGOS SUBMETIDOS

1. **P. Porto-Figueira**, J. Pereira, J.S. Câmara, "Exploring a new strategy, based on NTDs combined with chromatographic and chemometric data analysis for the detection of biomarkers from different types of cancer" *European Journal of Cancer*. (IF: 6,163)
2. **P. Porto-Figueira**, J. Pereira, J.S. Câmara, "Exploring the potential of a new analytical approach, NTDs/GC-MS, for establishment the volatometric pattern of urine samples", *Analytical Chemistry*. (IF: 5,886)

ARTIGOS PUBLICADOS

1. J. Pereira, **P. Porto-Figueira**, *et al.*, "Breath analysis as a potential and non-invasive frontier in disease diagnosis: An overview." *Metabolites* 5.1 (2015)

COMUNICAÇÕES ORAIS

1. **P. Porto-Figueira**, J. Pereira, J.S. Câmara, “Exploring the potential of a new analytical approach NTDs/GC-MS for establishment the volatomic pattern of urine samples”, 2º Encontro Indo-Europeu em biomarcadores VOC para deteção de doenças, Rostock, Alemanha, Julho 2016.
2. **P. Porto-Figueira**, J. Pereira, J.S. Câmara, “Exploring the ability of a new extraction technique, NTDs, towards isolation of volatile metabolites from urine”, Encontro New Indigo, Pune, Índia, Junho 2016.
3. **P. Porto-Figueira**, J. Pereira, J.S. Câmara, “Exploring the potential of a new analytical approach NTDs/GC-MS for establishment the volatomic pattern of urine samples”, 40th International Symposium of Capillary Chromatography and 13th GC x GC Symposium, Riva del Garda, Itália, Maio 2016.

RESUMO

A elevada incidência e mortalidade mundiais associadas ao cancro justificam o desenvolvimento e implementação de estratégias eficazes e não-invasivas conducentes a um diagnóstico precoce.

Neste contexto, pretendeu-se avaliar a *performance* de uma metodologia inovadora, a microextração por “needle trap” (NTME), na extração de metabolitos voláteis (VOMs) da urina de pacientes oncológicos com diferentes tipos de cancro - cólon, pulmão e mama, e de indivíduos saudáveis, com a finalidade de identificar um conjunto de VOMs potenciais biomarcadores dos diferentes tipos de cancro em estudo. De modo a maximizar a eficiência da extração dos VOMs, foram otimizados diferentes parâmetros experimentais, nomeadamente a natureza do sorvente, a temperatura, o tempo de equilíbrio, o volume de *headspace*, a força iónica, o pH do meio e o volume e a agitação da amostra. Usando como sorvente o DVB/Car1000/CarX, os melhores resultados foram obtidos com 4 mL de urina acidificada (pH= 2), 20% NaCl, 40 mL de *headspace* e 40 min de equilíbrio a 50 °C. Foi ainda avaliada a estabilidade dos VOMs no sorvente até 72 h após a extração.

Nos quatro grupos em estudo foram identificados, por GC-MS, 259 VOMs pertencentes a diversas famílias químicas, nomeadamente cetonas, compostos sulfurados, furânicos e terpénicos. A matriz de dados obtida para cada grupo em estudo foi submetida a análise discriminante, usando o método dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA), que resultou em clusters distintos diferenciadores de cada grupo. A aplicabilidade do modelo foi avaliada através do método de classificação SIMCA (modelagem suave e independente de analogias de classe), com elevadas taxas de classificação, sensibilidade e especificidade.

Este foi o primeiro estudo usando NTME para o estabelecimento do padrão volatômico da urina. Os resultados obtidos revelam-se muito promissores originando perfis voláteis de maior expressividade, mais completos e abrangentes, que os obtidos usando metodologias de referência.

Palavras-chave: Cancro; Urina; VOMs; Biomarcadores; NTME; MVSA; GC-qMS

ABSTRACT

The worldwide high incidence and mortality associated with cancer justify the development and implementation of effective and non-invasive strategies leading to early diagnosis.

In this study, we aimed to evaluate the efficiency of an innovative methodology, Needle Trap MicroExtraction (NTME), in the isolation of volatile organic metabolites (VOMs) from urine samples of different groups of oncologic patients - colon, lung and breast cancer, and healthy individuals, for the purpose of identifying a set of VOMs potential biomarkers for target cancer. In this context, in order to improve the extraction efficiency of NTME, several experimental parameters were optimized, namely nature of the sorbent, temperature, equilibration time, volume of headspace, ionic strength, pH of the sample, sample volume and agitation. Using as a sorbent DVB / Car1000 / CarX, the best results were obtained with 4 ml of acidified urine (pH=2), 20% NaCl, 40 mL headspace and 40 min equilibration at 50 ° C. The stability of the VOMs in the sorbent was also evaluated up to 72 hours upon extraction.

In the four studied groups, 259 VOMs belonging to different chemical families, including ketones, sulfur, furan and terpene compounds, were identified by GC-MS. The data matrix obtained for each studied group was subjected to discriminant analysis using the method of partial least squares (PLS-DA), which resulted in different clusters for each group. The applicability of the method was verified in the high classification rates, sensitivity and specificity obtained using the SIMCA (Soft Independent Modeling and class similarities).

As far as we are aware this is the first time NTME is used to characterize the volatile composition of urine samples and the results are very promising because broader and more complete volatile profiles were obtained for all groups studied when compared with reference methodologies.

Keywords: Cancer; Urine; VOMs; Biomarkers; NTME; MVSA; GC – qMS

Índice

AGRADECIMENTOS	3
TRABALHOS CIENTÍFICOS	5
ARTIGOS SUBMETIDOS	5
ARTIGOS PUBLICADOS	5
COMUNICAÇÕES ORAIS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS	16
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO TEÓRICA	19
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. OBJETIVOS	22
1.2. A CÉLULA	22
1.2.1. O ciclo celular	23
1.2.2. Regulação do ciclo celular	25
1.3. O CANCRO	27
1.3.1. Carcinogénese	28
1.3.1.1. Iniciação	29
1.3.1.2. Promoção	30
1.3.1.3. Transformação	31
1.3.1.4. Progressão	31
1.3.2. Fatores que influenciam a carcinogénese	32
1.4. METODOLOGIAS DE DIAGNÓSTICO	33
1.5. METABOLÓMICA E OS BIOMARCADORES	35
1.5.1. Vias de Síntese de Biomarcadores	37
1.5.1.1. Peroxidação Lipídica	38
1.5.1.2. Danos oxidativos no DNA	39

1.5.1.3. Oxidação de Proteínas	40
1.6. METODOLOGIAS ANALÍTICAS	42
1.6.1. Microextração por “needle trap” – NTME.....	44
1.6.1.1. NTDs - Constituição e Fundamentos teóricos	46
1.6.2. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS)	50
1.6.3. Análise Estatística.....	55
CAPÍTULO II. PARTE EXPERIMENTAL	59
2.1. MATERIAL E REAGENTES.....	61
2.2. AMOSTRAGEM	61
2.3. METODOLOGIA EXTRATIVA – NTME	62
2.3.1. Procedimento para a extração dos VOMs da urina por NTME.....	63
2.4. CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR GC-MS	64
2.5. ANÁLISE MULTIVARIADA.....	65
CAPÍTULO III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS NTDs PARA A EXTRAÇÃO DE VOMs.....	69
3.1.1. Avaliação do Tipo de sorvente	69
3.1.2. Avaliação do pH da amostra.....	70
3.1.3. Avaliação da Temperatura de Extração	72
3.1.4. Avaliação da Força Iónica	73
3.1.5. Avaliação do Volume de headspace da amostragem	75
3.1.6. Avaliação do Tempo de equilíbrio	77
3.1.7. Avaliação da Agitação da amostra.....	78
3.1.8. Avaliação do Volume de amostra.....	79
3.1.9. Avaliação da Estabilidade dos VOMs durante o armazenamento	81
3.2. IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES VOLÁTEIS DO CANCRO DO CÓLON, PULMÃO E MAMA	83
3.2.1. Perfil volatômico urinário do Grupo de Controlo	88
3.2.2. Perfil volatômico urinário de pacientes com cancro do Cólon.....	90
3.2.3. Perfil volatômico urinário de pacientes com cancro do Pulmão	93
3.2.4. Perfil volatômico urinário de pacientes com cancro da Mama.....	95
3.3. ANÁLISE MULTIVARIADA APLICADA ÀS AMOSTRAS DE URINA.....	97

3.3.1 Análise Multivariada aplicada às amostras de urinas de pacientes com Cancro do Cólon	97
3.3.2. Análise Multivariada aplicada às amostras de urinas de pacientes com Cancro do Pulmão	101
3.3.3. Análise Multivariada aplicada às amostras de urinas de pacientes com Cancro da Mama	103
3.3.4. Integração das diferentes matrizes de metabolitos obtidos para cada um dos grupos oncológicos em estudo	106
CAPÍTULO IV. CONCLUSÃO	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXOS	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do ciclo celular	24
Figura 2. Mecanismo de controlo do avanço do ciclo celular: fosforilação da proteína Rb pelo complexo Cdk-ciclina	26
Figura 3. Fatores de estímulo e bloqueio do ciclo celular	27
Figura 4. Representação das etapas da carcinogénese: iniciação, promoção, conversão maligna e progressão tumoral.....	29
Figura 5. Exemplos de metodologias de diagnóstico do cancro mais comuns.	33
Figura 6. Etapas da Peroxidação Lipídica	38
Figura 7. Etapas da oxidação das proteínas.....	41
Figura 8. Fluxograma genérico para a análise de biomarcadores.....	42
Figura 9. Representação gráfica das diferentes microextrações em agulha	44
Figura 10. Agulha NTD e respetivo dispositivo.....	45
Figura 11. Classificação das agulhas NTDs	46
Figura 12. Principais componentes de um GC-MS	51
Figura 13. Tipos de coluna capilar.....	53
Figura 14. Exemplo de uma NTD e respetivo material para extração.....	63
Figura 15. Avaliação da influência da natureza do sorvente na eficiência de extração dos metabolitos voláteis presentes na urina.....	70
Figura 16. Avaliação da influência do pH da urina na eficiência de extração dos metabolitos voláteis	71
Figura 17. Avaliação do comportamento de alguns metabolitos voláteis presentes na urina em função do pH.....	71
Figura 18. Avaliação da influência da temperatura na eficiência de extração dos metabolitos voláteis presentes na urina.....	72
Figura 19. Evolução de alguns metabolitos presentes na urina em função da variação da temperatura	73
Figura 20. Avaliação da influência da força iónica na eficiência de extração dos metabolitos voláteis presentes na urina.....	74
Figura 21. Avaliação do comportamento de alguns metabolitos extraídos da urina em função da força iónica do meio	75

Figura 22. Avaliação da influência do volume de <i>headspace</i> da amostra na eficiência de extração dos metabolitos voláteis presentes na urina.....	76
Figura 23. Avaliação da influência do volume de <i>headspace</i> na eficiência de extração de alguns metabolitos.....	76
Figura 24. Avaliação da influência do tempo de equilíbrio na eficiência de extração de metabolitos voláteis presentes na urina.....	77
Figura 25. Avaliação da influência do tempo de equilíbrio na eficiência de extração de alguns metabolitos presentes na urina.....	78
Figura 26. Avaliação da influência da agitação na eficiência de extração dos metabolitos voláteis presentes na urina.....	78
Figura 27. Avaliação da influência da agitação na eficiência de extração de alguns metabolitos da urina.....	79
Figura 28. Avaliação da influência do volume de amostra na eficiência de extração de alguns metabolitos voláteis presentes na urina.....	79
Figura 29. Avaliação do volume de amostra na eficiência de extração de alguns metabolitos presentes na urina.....	80
Figura 30. Avaliação da estabilidade dos VOMs após extração em função do tempo	81
Figura 31. Avaliação da estabilidade de alguns metabolitos em função do tempo de armazenamento após extração	82
Figura 32. Cromatogramas típicos do perfil volatômico da urina de um indivíduo com cancro do cólon (CC), pulmão (LC) e mama (BC) e do grupo de controlo (CTL).	84
Figura 33. Distribuição das diferentes famílias químicas obtidas para os diferentes grupos em estudo: CTL – grupo de controlo, CC – cancro do cólon, LC – cancro do pulmão e BC – cancro da mama.	85
Figura 34. Áreas relativas dos metabolitos maioritários identificados no grupo de controlo.	90
Figura 35. Áreas relativas médias dos metabolitos maioritários identificados no grupo dos pacientes com cancro do cólon	92
Figura 36. Áreas relativas dos metabolitos maioritários identificados no grupo de pacientes com cancro do pulmão	94
Figura 37. Gráfico relativo as áreas médias dos metabolitos maioritários identificados no grupo de pacientes com cancro da mama	96

Figura 38. (A) Scores PLS-DA LV1 x LV2 e (B) Pesos das componentes LV1 e LV2 utilizando um subconjunto de 23 metabolitos obtidos após a análise do perfil volátil da urina de pacientes com cancro do cólon (CC) e de indivíduos saudáveis (CTL).	98
Figura 39. Curvas ROC construídas para alguns dos metabolitos com poder discriminatório entre o grupo de controlo e o grupo de pacientes com cancro do cólon.....	100
Figura 40. (A) Scores PLS-DA LV1 x LV2 e (B) Pesos das componentes LV1 e LV2 utilizando um subconjunto de 16 metabolitos obtidos após a análise do perfil volátil da urina de pacientes com cancro do pulmão (LC) e de indivíduos saudáveis (CTL).	101
Figura 41. Curvas ROC construídas para alguns dos metabolitos com poder discriminatório entre o grupo de controlo e o grupo de pacientes com cancro do pulmão.....	103
Figura 42. (A) Scores PLS-DA LV1 x LV2 e (B) Pesos das componentes LV1 e LV2 utilizando um subconjunto de 24 metabolitos obtidos após a análise do perfil volátil da urina de pacientes com cancro da mama (BC) e de indivíduos saudáveis (CTL).	104
Figura 43. Curvas ROC construídas para alguns dos metabolitos com poder discriminatório entre o grupo de controlo e o grupo de pacientes com cancro do pulmão.....	105
Figura 44. (A) Gráfico de scores PLS-DA LV1 x LV2 e (B) Gráfico de pesos das componentes LV1 e LV2 utilizando um subconjunto de 42 metabolitos obtidos após a análise do perfil volátil da urina de pacientes com cancro do cólon (CC), pulmão (LC) e mama (BC) e de indivíduos saudáveis (CTL).	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados referentes aos grupos em estudo de acordo com o tipo cancro, género, faixa etária do indivíduo e hábitos tabágicos.....	66
Tabela 2. Gradiente de temperaturas utilizado nas análises por GC-MS.....	68
Tabela 3. Parâmetros otimizados para a extração de metabolitos voláteis da urina por NTME	84
Tabela 4. Número de amostras analisadas, número de metabolitos voláteis identificados e número de metabolitos identificados com frequência de ocorrência $\geq 90\%$ nas amostras de urina dos diferentes grupos em estudo..	87
Tabela 5. Distribuição das diferentes famílias químicas para o grupo de controlo, expressas em termos de áreas totais, áreas relativas e número de metabolitos identificados.....	93
Tabela 6. Distribuição das diferentes famílias químicas para o grupo do cancro do cólon, expressas em termos de áreas totais, áreas relativas e número de metabolitos identificados.	95
Tabela 7. Distribuição das diferentes famílias químicas para o grupo do cancro do pulmão, expressas em termos de áreas totais, áreas relativas e número de metabolitos identificados.	97
Tabela 8. Distribuição das diferentes famílias químicas para o grupo do cancro da mama, expressas em termos de áreas totais, áreas relativas e número de metabolitos identificados.	99

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Português
5-OHmU	5-Hidroximetiluracil
8-OHdG	8-Hidroxi-2'-deoxiguanosina
8OH-Gua	8-Hidroxi-guanina
ANNs	Redes neuronais artificiais
AntOX	Antioxidante
AR	Área relativa
ATP	Adenosina trifosfato
BRCA 1	Gene Suscetível ao Cancro da Mama Tipo 1
BRCA 2	Gene Suscetível ao Cancro da Mama Tipo 2
CAR	Carboxeno
Car1000	Carboxeno 1000
CarX	Carbopack X
CC	Cancro do cólon
Cdk	Quinase ciclina dependente
CHF	Centro hospitalar do funchal
CI	Ionização química
CKI	Inibidor de quinase ciclina dependente
CTL	Controlo
CT	Tomografia computadorizada
CTC	Colonoscopia virtual
CV	Coefficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DM	Mamografia digital
DVB	Divinilbenzeno
EI	Ionização por impacto eletrónico
FAB	Ionização por Bombardeamento de Átomos
GC	Cromatografia gasosa
GC-MS	Cromatografia gasosa combinada à espectrometria de massas
HNE	4-Hidroxi-2-nonenal

INCAT	Microextração em fase sólida em tubo capilar
INE	Instituto Nacional de Estatística
L·	Radical lípido
LC-MS	Cromatografia líquida combinada à espectrometria de massas
LDA	Análise discriminante linear
LH	Lípido
LOO·	Radical peróxido lípido
LOOH	“ <i>novo</i> ” lípido
LPCC	Liga Portuguesa contra o cancro
LV 1	Variável Latente 1
LV 2	Variável Latente 2
M	Mitose
MALDI	Ionização por Dessorção da Matriz por Laser
MRI	Imagem por ressonância magnética
MS	Espectrometria de massa
MVSA	Análise Estatística Multivariada
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
NMR	Ressonância magnética nuclear
NTD	Agulha “ <i>needle trap</i> ”
NTME	Microextração por recurso à “ <i>needle trap</i> ”
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	Análise de Componentes Principais
PDMS	Polidimetilsiloxano
PET	Tomografia por emissão de positrões
PLOT	Coluna tubular aberta de camada porosa
PLS	Mínimos Quadrados Parciais
PLS-DA	Análise Discriminante Por Mínimos Quadrados Parciais
PNR	Produto não reativo
PTFE	Politetrafluoretileno
RAM	Região Autónoma da Madeira
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico

RNS	Espécie Reativa de Azoto
ROC	Características operacionais do recetor
ROS	Espécie Reativa de Oxigénio
SCOT	Coluna tubular aberta revestida com suporte
SDME	Microextração de gota única
SIMCA	Modelagem suave e independente de analogias de classe
SPDE	Extração dinâmica em fase sólida
SPE	Extração em Fase Sólida
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
SPME	Microextração em Fase Sólida
Tg	Timina glicol
TOF	Tempo de voo
UV	Ultravioleta
VOCs	Compostos orgânicos voláteis
VOMs	Metabolitos orgânicos voláteis
WCOT	Coluna tubular aberta de parede recoberta

CAPÍTULO I.

INTRODUÇÃO TEÓRICA

1. INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, a cada quatro segundos morre uma pessoa vítima de cancro. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) [1], o cancro é a segunda causa de morte de doenças não contagiosas a nível mundial, sendo responsável por metade das cerca de 17,5 milhões de mortes em 2012 [1]. Para além disso, o aumento desta patologia é alarmante e todos os anos surgem cerca de 3 milhões de novos casos [1]. Na Europa, o cancro representa a segunda causa de morte (cerca de 20% dos óbitos totais), logo a seguir às doenças cardiovasculares. Segundo o Eurostat [2], em 2012, os cancros das vias respiratórias (incluindo pulmões), cólon, mama, estômago e próstata encabeçaram o *top 5* dos cancros mais mortíferos em território europeu, contabilizando mais de 511 mil mortes [2].

A tendência em Portugal não é diferente e segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE), em 2013, cerca de 24,3 % das mortes foram provocadas pelo cancro [3]. Uma vez mais, os cancros das vias respiratórias, com mais ênfase no pulmão, cólon e mama, são os que apresentam uma maior taxa de mortalidade, contabilizando cerca de 33,6 % do total de mortes por cancro. Na Região Autónoma da Madeira (RAM), o cancro é já a principal causa de morte, sendo responsável por quase 20 % dos óbitos (534 mortes), um terço dos quais afetando as vias respiratórias, cólon e mama [3].

De acordo com a OMS [1], o diagnóstico precoce reduz consideravelmente a mortalidade devida ao cancro ao permitir um tratamento adequado no início da doença, altura em que esta patologia, como veremos na *Secção 1.2*, ainda está circunscrita a um dado tecido. No entanto, a grande maioria dos métodos convencionais de diagnóstico tem um elevado custo, sendo igualmente muito invasivos, o que causa desconforto físico e mental ao doente (*Secção 1.3*). Por essa razão, a procura por metodologias não invasivas, menos dispendiosas e mais “amigas” do paciente torna-se essencial para o diagnóstico precoce, essencial para melhorar as taxas de sobrevivência e uma melhoria da qualidade de vida. A utilização de biomarcadores pode constituir uma ferramenta essencial para este diagnóstico precoce do cancro, bem como acompanhamento da doença ao longo do seu desenvolvimento/tratamento (*Secção 1.4*). Contudo, é importante referir que os estudos associados à análise de biomarcadores voláteis do cancro são relativamente recentes, e por isso ainda persistem muitos desafios importantes. É o caso da metodologia mais indicada para análise deste tipo de compostos (*Secção 1.5*). Devido à baixa concentração de muitos dos compostos voláteis que compõem os nossos biofluidos (plasma, urina, saliva, etc.), é necessária a utilização de técnicas extrativas e analíticas muito eficientes para que se possam identificar os metabolitos produzidos em

limites analíticos apropriados. Por outro lado, a complexidade de certas amostras biológicas, como a urina, e a concentração em que os metabolitos se encontram requer o uso de técnicas de extrativas antes da análise para reduzir o nível de interferentes e assim produzir resultados mais fiáveis e reprodutíveis. Particularmente na análise de voláteis, metodologias como a microextração em fase sólida (SPME) associada à cromatografia gasosa com deteção por espectroscopia de massa (GC-MS) oferecem ao investigador uma elevada estabilidade e reprodutibilidade na análise em amostras biológicas [4-6].

1.1. OBJETIVOS

O principal objetivo deste projeto consistiu na avaliação do potencial de uma nova metodologia extrativa, a microextração por “*needle trap*” (NTME) combinada com a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e com a análise multivariada para o estabelecimento do perfil metabolómico da urina de pacientes oncológicos e de indivíduos saudáveis com a finalidade de identificar um conjunto de metabolitos voláteis potenciais biomarcadores dos diferentes tipos de cancro alvo de estudo - cólon, pulmão e mama. Procedeu-se à otimização dos parâmetros experimentais com influência na extração por NTME.

1.2. A CÉLULA

A célula é considerada a estrutura básica fundamental de todos os organismos vivos. Em sistemas mais complexos, como o ser humano, estas unidades básicas também chamadas de células eucarióticas, fornecem a estrutura para todos os tecidos e conseqüentemente todos os órgãos do corpo. As células eucarióticas animais são constituídas por diferentes organelos com funções específicas, com destaque para o núcleo perfeitamente individualizado pela membrana nuclear e que funciona como um centro de comandos, de onde são enviadas as instruções para todo o funcionamento celular. Além disso, o núcleo encerra em si praticamente toda a informação genética (excetuando a que está contida no DNA mitocondrial, mas que é específica para o funcionamento destes organelos), sendo por isso um dos organelos mais importantes da estrutura celular [7, 8].

As células eucarióticas apresentam ainda uma característica importante que assenta na limitação da sua proliferação. Deste modo, após um número limitado de gerações, estas células cessam o seu crescimento devido a uma inibição por contato. Este fenómeno consiste num sistema de comunicação específico entre células, que quando entram em contato com outras células desencadeiam uma cascata de sinalização que impede a célula de continuar a se proliferar [7, 8]. O ser humano é constituído por milhões de células eucarióticas cujo tamanho, diversidade e funções variam de acordo com a sua localização e necessidade. O seu desenvolvimento implica um mecanismo coordenado das células ao longo de várias etapas importantes que ocorrem durante o seu ciclo de vida, nomeadamente o crescimento, replicação do DNA presente no núcleo e divisão celular, originando células filhas [7, 8]. Este mecanismo coordenado denomina-se ciclo celular.

1.2.1. O CICLO CELULAR

Todas as células têm, um ciclo de vida definido onde “nascem”, amadurecem, dividem-se, desempenham funções próprias e finalmente, quando já não são precisas, morrem de forma programada (apoptose). Em termos bioquímicos, estas etapas são extremamente reguladas e reúnem um conjunto de vias de sinalização específicas que permitem a sua realização [7, 8]. Define-se como ciclo celular o mecanismo coordenado e regulado de várias etapas, onde uma célula se replica, originando células filhas. Tal como mostra a Figura 1, este processo de divisão celular é constituído por duas fases distintas, a interfase e a mitose [7-9].

A interfase (Figura 1) é caracterizada por uma elevada atividade celular e consiste basicamente na preparação da célula para a sua divisão. Esta fase celular possui três subfases distintas: G1, S e G2. Na subfase G1 (também conhecida como pós-mitótico), ocorre o crescimento celular, havendo a síntese de variadas moléculas como enzimas e RNA. Em equilíbrio com a fase G1 pode ainda existir uma subfase adicional denominada G0, na qual as células podem entrar em quiescência, ou seja, interrompem a sua divisão celular até que as condições favoráveis ao crescimento voltem a ocorrer. Por sua vez, na subfase S (também conhecida como fase de síntese), ocorre a duplicação do DNA cromossómico. Por fim, na subfase G2 (também conhecida como pré-mitótico), verifica-se a síntese de outras moléculas fundamentais para as fases seguintes da divisão celular, como é o caso dos centríolos [7, 9].

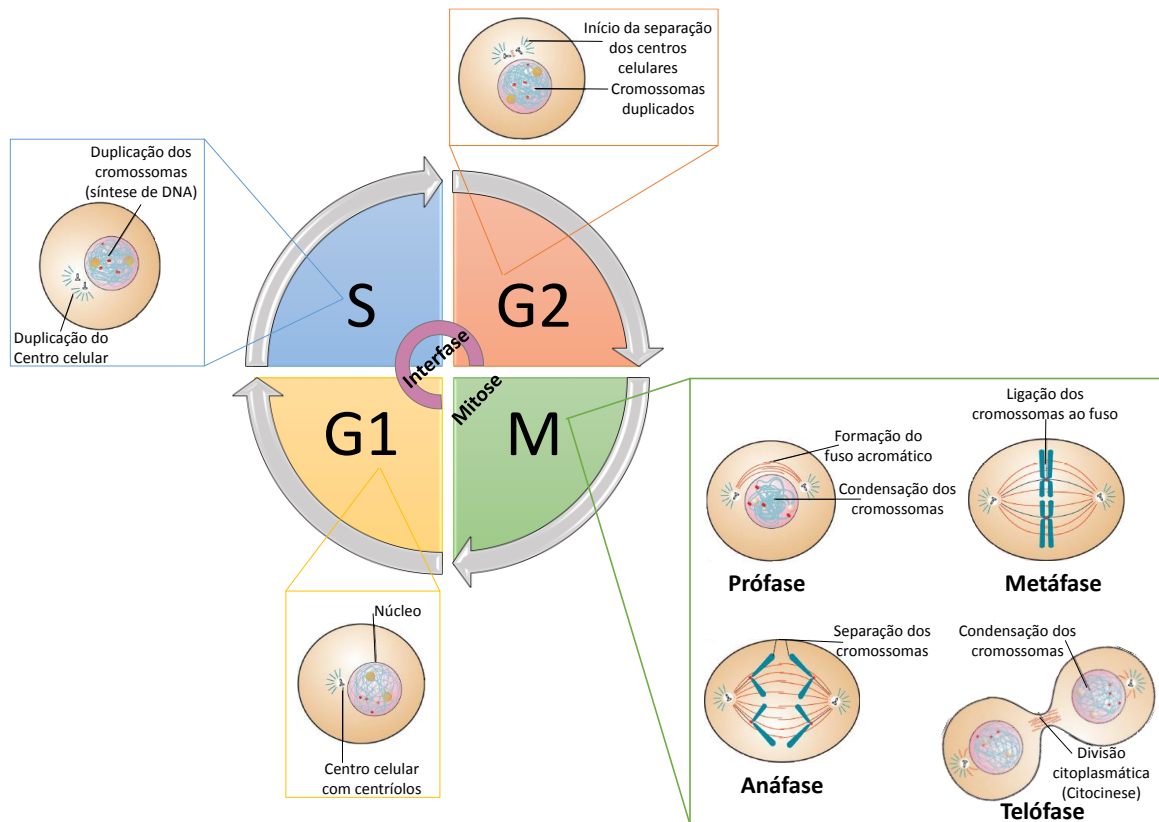


Figura 1. Representação do ciclo celular.

Na mitose (M) (Figura 1), ocorre a divisão celular propriamente dita, sendo subdividida em cinco etapas: prófase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese. Deste modo, em prófase existe uma preparação da divisão, ocorrendo o encurtamento da cromatina através do seu enrolamento progressivo. O fuso acromático é formado e dá-se o afastamento dos centríolos para os polos que culmina na quebra do invólucro nuclear. Na metáfase, etapa importante na mitose, os cromossomas são alinhados no plano equatorial e o fuso acromático está completamente formado, estando nesta etapa, a célula preparada para a divisão do seu conteúdo. Na anáfase os cromossomas migram em direção aos polos da célula devido à clivagem dos centrómeros e o encurtamento das fibras do fuso acromático. Por fim, a telófase é caracterizada pela formação da membrana nuclear à volta dos cromossomas em cada polo celular e descondensação progressiva dos cromossomas, sendo dissolvido o fuso acromático. Adjacente ao processo mitótico está a etapa de citocinese que consiste sobretudo na separação e individualização das duas células formadas. Este acontecimento possui características próprias dependendo do tipo de célula eucariótica (animal ou vegetal). Relativamente à célula animal ocorre um estrangulamento do citoplasma devido à existência de filamentos formados na zona equatorial da célula, que puxam a membrana plasmática. Por outro lado, e apenas

a título de curiosidade, na célula vegetal, devido à existência da parede celular o processo de citocinese ocorre de forma distinta. Neste caso, existe a formação de uma nova parede celular na zona equatorial por ação de diversos organelos como o complexo de Golgi [7, 8]. A Figura 1 resume todo o mecanismo do ciclo celular, destacando cada uma das subfases.

É importante realçar a elevada regulação de cada uma das etapas referidas no ciclo celular. Uma célula normal tem obrigatoriamente o número de ciclos celulares definidos. Por outro lado, a integridade da sua informação genética deve ser mantida para o prosseguimento do ciclo. Danos no DNA, ou a sua não disposição adequada durante a replicação de uma célula são fatores que devem ser reparados de forma a minimizar a existência de anomalias celulares, muitas das quais constituem um ponto de partida para doenças como o cancro [8].

1.2.2. REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR

Para uma manutenção adequada da integridade da formação de uma nova célula, o ciclo celular é, em todas as suas etapas, altamente controlado pela atividade de proteínas da família quinase ciclina dependente (Cdks) [8-11]. No entanto, a existência das Cdks não é suficiente para impor uma regulação apropriada ao ciclo. Tal como o próprio nome indica, as Cdks são dependentes da associação com uma segunda proteína, a ciclina cuja concentração no organismo varia ao longo das fases do ciclo o que determina a sua ligação com as Cdk (Figura 2) [8, 10]. Assim, ao longo de todo o ciclo celular existem pontos de controlo específicos (também conhecidos como “*checkpoints*”), onde são verificados diversos aspetos, como a replicação correta do DNA, a existência de danos no material genético, ou ainda a distribuição equilibrada dos cromossomas em metáfase. Estes “*checkpoints*” são referidos por muitos autores como “barreiras fisiológicas” que impedem a continuação do ciclo celular em caso de não se verificarem as condições adequadas para uma correta replicação celular [8-10].

Segundo Ward [10], “*A divisão celular normal é positivamente regulada ou estimulada através de vias sinalizadoras*”. Estas vias de sinalização são compostas por uma cascata de reações que resultam da resposta a estímulos intra e/ou extracelulares. Com especial interesse nas transições entre as diversas subfases da interfase e a mitose, os complexos Cdk/ciclina desempenham um papel fundamental na progressão do ciclo celular. Uma vez formado, este complexo fosforila um conjunto de moléculas chave que permitem a continuação do ciclo celular, como é o caso da proteína Rb

(*retinoblastoma*) (Figura 2) [8-10]. Esta proteína apresenta-se desfosforilada na sua forma nativa e na interfase do ciclo celular, particularmente em G1 e G0, ligando-se ao fator de transcrição E2F e inibindo a sua ação no crescimento celular e replicação do DNA em G1 e S. A fosforilação da Rb pelo complexo Cdk/ciclina permite a libertação do fator de transcrição E2F, promovendo assim a transcrição de genes indispensáveis às fases G1 e S e permitindo a evolução do ciclo celular. A Figura 2 mostra o mecanismo associado a atuação da Cdk/ciclina na proteína Rb.

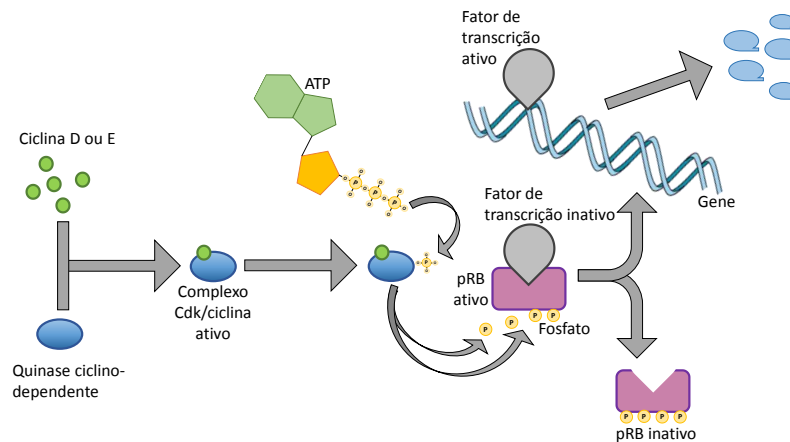


Figura 2. Mecanismo de controlo do avanço do ciclo celular: fosforilação da proteína Rb pelo complexo Cdk-ciclina. Adaptado de [14].

No ciclo celular existe um segundo tipo de regulação, que possui uma ação de supervisão em cada uma das etapas do ciclo. Através do mecanismo de feedback negativo, pela produção de inibidores de Cdk (CKI), é efetuada a verificação da integridade do DNA, sendo avaliados eventuais danos e replicações incorretas que podem dar origem a células anormais [8-10]. O mecanismo mais importante neste tipo de regulação é o efetuado pelo fator de transcrição p53 (Figura 3), uma proteína conhecida como “o guardião do genoma” [8]. Na presença de danos no DNA, a p53 impede a continuação do ciclo celular, dando tempo à célula para desencadear processos de reparação. Por outro lado, na impossibilidade de reparação do DNA, a p53 induz a morte programada da célula (apoptose) [8, 10].

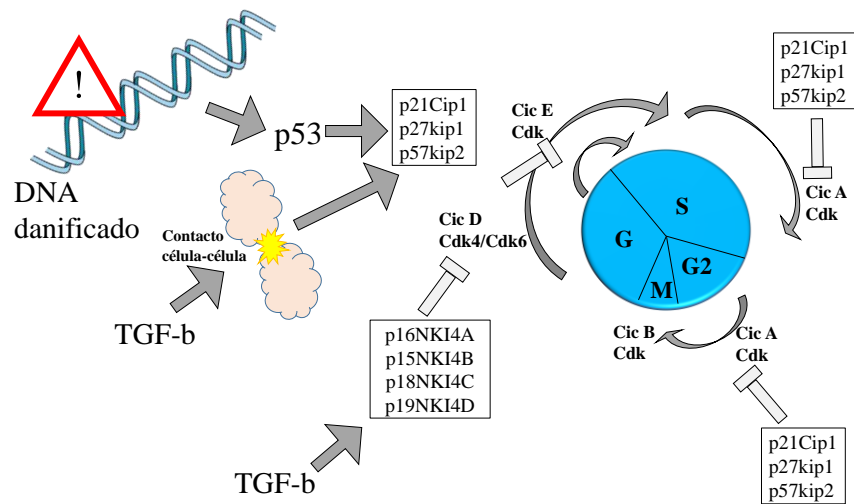


Figura 3. Fatores de estímulo e bloqueio do ciclo celular. Adaptado de [14].

Existem ainda outros tipos de regulação específicos da subfase S da Interfase, nomeadamente no que se refere a fatores de crescimento [8]. Porém, dada a complexidade da cascata de sinalizações e consequente reações envolvidas e por não ser o objeto central deste trabalho este tópico não será desenvolvido. Por fim, uma vez que as proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular são codificadas por diferentes genes, mutações nestes genes poderão alterar o funcionamento normal do sistema regulador, resultando num ciclo celular anómalo. Como consequência, podem ser produzidas células que possuem características distintas, e que em casos extremos podem levar ao aparecimento do cancro. Desta forma, é importante destacar algumas noções relativas à formação de tumores associados à modificações na maquinaria de regulação [8, 10].

1.3. O CANCRO

O cancro envolve um funcionamento anómalo da regulação do ciclo celular. Neste contexto, e uma vez que a informação necessária para a produção de proteínas importantes na regulação do ciclo celular está inscrita em genes, é importante distinguir dois tipos específicos: os protooncogenes e os genes supressores de tumores. Os primeiros potenciam a divisão celular e são responsáveis, por exemplo, pela presença/ausência de Cdk's e ciclinas e pela indução da apoptose pela expressão da família Bcl-2, ao longo do ciclo celular. Determinadas alterações na estrutura genética dos protooncogenes através de mutações específicas, levam à sua conversão em oncogenes. Estes

acabam por promover a desregulação por sobreexpressão do ciclo celular, resultando no aumento do crescimento da população celular [8-10]. No sentido oposto, certos genes codificam proteínas que atuam como protetores ou retardantes do ciclo celular, sendo denominados genes supressores de tumores. Um exemplo importante desta classe é o gene que codifica a p53. Alterações neste tipo de genes, por perda de função ou mutações, resultam na não expressão da proteína codificada, e tem como consequência a não monitorização dos danos existentes no DNA. Deste modo, a célula não produz os inibidores indispensáveis para o controlo do mecanismo do seu ciclo celular, podendo culminar em efeitos semelhantes aos causados pelos oncogenes. Estima-se que cerca de 50% da formação de tumores sejam resultantes da perda ou anomalia no gene que codifica a proteína p53 [8-10].

A compreensão do aparecimento dos oncogenes, bem como a inativação dos genes supressores de tumor, permite-nos identificar a formação de um cancro, nomeadamente as suas etapas iniciais de desenvolvimento e os fatores de estímulo associados. Em termos gerais é comum confundir a formação de um tumor com o cancro. Na realidade, é preciso classificar o tumor consoante as propriedades das células presentes. Deste modo, um tumor benigno é caracterizado pelo facto de o aspeto e a estrutura das células que o constituem serem semelhantes às células originais. Neste tipo de tumor existe uma mutação na estrutura génica dos oncogenes, mas as células continuam a crescer lentamente à semelhança das células do tecido normal e não provocam metástases [8, 12-14].

Por outro lado, caracteriza-se como tumor ou neoplasia maligna, vulgarmente conhecido como cancro, um conjunto de células que se dividem irregularmente e que são resistentes à apoptose tornando-se “imortais”. A alteração genética neste tipo de tumor é drástica e as células crescem sem controlo definido. Outra característica importante é a agressividade deste tipo de células, a sua autossustentabilidade em termos de vasos sanguíneos e a capacidade que possuem de se infiltrarem noutros tecidos e órgãos produzindo metástases [8, 12-14].

1.3.1. CARCINOGENESE

A formação do cancro, ou carcinogénese, é considerada um evento com várias etapas funcionais que, regra geral, podem levar muitos anos. De facto, como defendeu Ward [10], *“existem diversos mecanismos que estão envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula*

potencialmente maligna” sendo na sua maioria anomalias no ciclo celular associadas à imortalização das células que conferem características próprias às células cancerígenas. No mesmo sentido, Franco *et al.* [15], considera a oncogênese um processo de múltiplas fases, que envolve alterações e/ou modificações na atividade dos genes associados a diversos processos celulares. Deste modo, podemos diferenciar quatro etapas distintas no mecanismo de carcinogênese: a Iniciação, a Promoção, a Transformação e a Progressão [16-18]. A Figura 4 mostra-nos estas etapas, bem como os processos principais associados a cada uma [17].

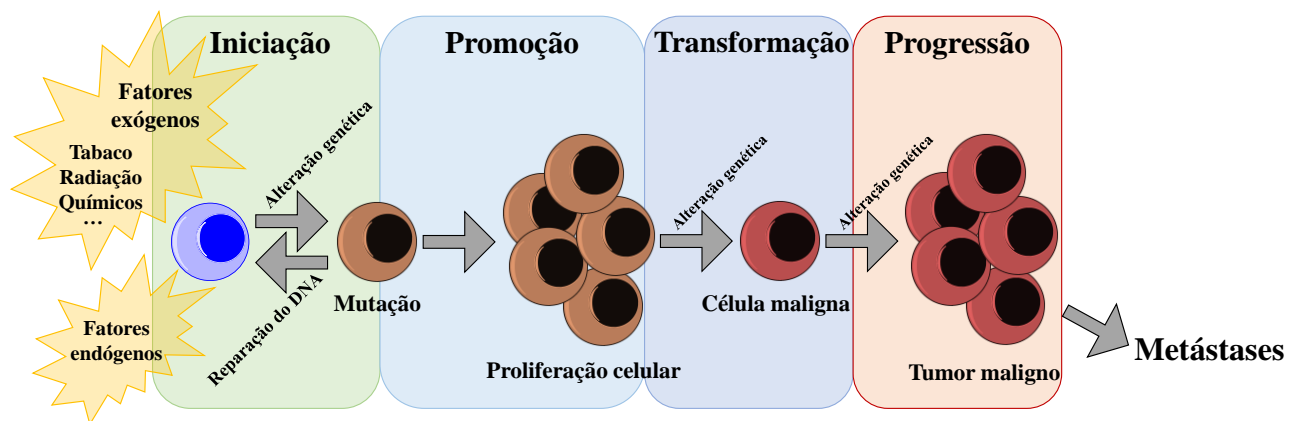


Figura 4. Representação das etapas da carcinogênese: iniciação, promoção, conversão maligna e progressão tumoral.

1.3.1.1. INICIAÇÃO

Após a exposição a fatores carcinogénicos, a célula sofre mutações irreversíveis em determinados genes do seu DNA, levando a uma predisposição para uma evolução neoplásica maligna. No entanto, é importante referir que, apesar de mutadas e da existência de uma predisposição, ainda não estamos perante um cenário de cancro, pois nesta fase ainda é possível a célula desencadear os mecanismos de regulação enzimática necessários para evitar a continuidade do dano. Por outro lado, e devido à velocidade de proliferação celular, o tempo de ação para reverter os efeitos causados por mutações pode ser relativamente curto, o que dificulta este processo [14, 17].

Na etapa da Iniciação, as células podem permanecer latentes durante um longo período de tempo, dependendo da ação do fator de indução carcinogénica e ainda do estado da maquinaria de reparação do indivíduo. Se, por sua vez, a proliferação for suficientemente rápida para que não seja

possível uma completa reparação dos danos existentes, dá-se a passagem da informação genética anómala para as células filhas através do processo de mitose normal das células. Desta forma, estas células ganham a sua imortalidade, ou seja, resistência à apoptose, avançando para a etapa seguinte da carcinogénese [14, 17].

Podemos assim aferir que a Iniciação é um processo aditivo, onde o aumento de fatores indutores tem como consequência o aumento da incidência e a multiplicidade de cancro resultando na diminuição do período de latência. Por outro lado, nem todas as células expostas a fatores carcinogénicos são iniciadas no processo de carcinogénese. Para que isso ocorra é necessário que exista um conjunto de mutações nos genes que produzem os intervenientes que regulam os danos existentes no ciclo celular [14, 17]. Em termos clínicos, apesar de existirem células cujo DNA se encontra geneticamente alterado, ainda não é possível detetar a presença de cancro pelos métodos convencionais [14].

1.3.1.2. PROMOÇÃO

Nesta etapa, as células modificadas geneticamente na fase de iniciação sofrem a ação de agentes que potenciam o crescimento da população celular, os chamados oncopromotores. Esta etapa é caracterizada sobretudo pelo aumento do crescimento celular das células anómalas que ultrapassaram a primeira etapa [18, 19].

Em contraste com a etapa da iniciação, a promoção é mais lenta pois necessita de uma exposição contínua aos oncopromotores, impedindo que a célula possa desencadear processos regulatórios adequados, como a apoptose [14, 17], e reverter o processo carcinogénico. A reversibilidade possibilitada por uma exposição ao oncopromotor é assim uma característica importante na etapa da promoção. Os oncopromotores por seu turno podem ser agentes químicos, processos inflamatórios, hormonas e fatores de crescimento em concentrações elevadas, entre outros e apesar de potenciarem o crescimento celular das células anómalas, não interagem diretamente com o DNA, o que mais uma vez explica a reversibilidade desta fase [14, 17]. Estes agentes podem atuar de acordo com a sua especificidade para um tecido ou órgão, apresentando seletividade, ou ainda serem genéricos atuando em diferentes alvos simultaneamente. Em todos os casos a sua ação apenas é válida se em concentrações adequadas e, claro, se apresentar suscetibilidade para o alvo. Assim, nem todas as células expostas aos oncopromotores participam na promoção. Apenas aquelas que são

estimuladas e seguem a sua divisão e conseqüentemente aumentam a sua população, sobrevivendo à apoptose, contribuem para a instabilidade das células normais, levando às etapas seguintes da carcinogénese e, concomitantemente ao aparecimento de cancro [14, 17].

1.3.1.3. TRANSFORMAÇÃO

Esta etapa caracteriza-se pela transformação das células anómalas em cancro [17] resultante da acumulação de alterações ocorridas nas fases anteriores. Apesar de ser necessária uma menor exposição ao oncopromotor, nesta etapa ainda se pode verificar a reversibilidade da transformação se se interromper tal exposição, seguindo os mesmos princípios descritos anteriormente. Intimamente ligada à etapa de promoção, a transformação será tanto mais eficaz, quanto maior for a expansão de uma população de células iniciadas e que progridam até esta fase [17]. Por isso, muitos investigadores definem a etapa de transformação como uma subfase da etapa de progressão [14]. No entanto, dado o carácter reversível, ainda que apenas válido quando interrompida a cadeia de interações com oncopromotores e a capacidade do organismo desencadear os processos de regulação, atualmente a transformação é encarada como uma etapa diferenciada da progressão [17].

1.3.1.4. PROGRESSÃO

A última etapa da carcinogénese caracteriza-se pela multiplicação descontrolada e irreversível de células cancerígenas. Por outro lado, a proliferação celular deixa de necessitar de estímulos, como fatores carcinogénicos ou oncopromotores, passando a ser independente. Esta independência resulta na irreversibilidade típica desta etapa [14, 17].

É na progressão que as células cancerígenas adquirem a sua agressividade característica podendo invadir células vizinhas e causar metástases. Alterações morfológicas da célula, bem como a modificação as suas características bioquímicas e genéticas também ocorrem durante a progressão. Por fim, vale a pena realçar que, a propriedade de formação de vasos sanguíneos (angiogénese) característica do cancro é essencial para a sobrevivência destas células. De facto, a célula passa a ser autossuficiente em termos de oxigénio e determinados nutrientes, o que permite o seu crescimento e impossibilita a ação dos mecanismos de regulação [14, 17]. Em termos clínicos, nesta

etapa o cancro já se encontra formado, sendo possível a sua deteção pelas metodologias de diagnósticos convencionais.

1.3.2. FATORES QUE INFLUENCIAM A CARCINOGENESE

De um modo geral, define-se como agente carcinogénico qualquer substância, composto ou fator ambiental que possui a capacidade de iniciar o desenvolvimento do processo de carcinogénese em qualquer órgão ou tecido [14]. A ação de um agente carcinogénico pode ser amplificada ou diminuída de acordo com determinadas condições de exposição, tais como a concentração e o tempo de exposição do agente e/ou a predisposição genética de um dado organismo.

Segundo Oliveira *et al.* [14], os fatores responsáveis pelo desenvolvimento do cancro podem ser endógenos ou exógenos. Os primeiros incluem principalmente a propensão genética a mutações, o balanço endócrino e o estado de saúde do indivíduo, nomeadamente a existência de inflamações agudas e danos no sistema imunitário, além da idade do indivíduo. Por outro lado, os fatores exógenos incluem os iniciadores provenientes do meio ambiente e do estilo de vida do indivíduo em exposição. Hábitos nutricionais, como a ingestão de álcool, drogas e medicamentos sem prescrição, são alguns dos fatores exógenos mais importantes. Ainda nesta classe destacam-se a exposição a agentes físicos, químicos e biológicos (como radiação UV, solventes orgânicos e bactérias, respetivamente) que, de acordo com a sua intensidade, poderão ter uma ação mais acentuada na iniciação do cancro. O tabagismo é ainda outro grande fator que está diretamente associado ao aparecimento do cancro [14].

Alguns autores fazem uma segunda classificação, tendo em consideração a natureza e o mecanismo de atuação do fator carcinogénico. Assim, os fatores carcinogénicos podem ser classificados como físicos, químicos e biológicos. Noutra nível, considerando o seu mecanismo de ação, os fatores carcinogénicos pode ser genotóxicos, se causarem mutações no DNA, ou não genotóxicos, se pelo contrário, não atuarem diretamente no DNA [14]. Em todos os casos a ação de um fator carcinogénico implica uma cascata de sinalização e conseqüente reações até conseguir a promoção da iniciação do cancro.

1.4. METODOLOGIAS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico do cancro pode envolver diversos procedimentos, mas que na sua grande maioria, são invasivas e agressivas para o indivíduo (Figura 5). Estes métodos de diagnóstico podem ser agrupados em cinco categorias distintas, concretamente, triagem em termos de historial clínico, exames físicos, exames clínicos e exames imagiológicos [19].

A etapa inicial envolve a triagem, na qual é reunido e analisado todo o historial clínico do paciente, o que é fundamental para se conseguir caracterizar os potenciais tipos de cancro, nomeadamente os de maior probabilidade hereditária. Depois passa-se à parte clínica do diagnóstico. Os exames físicos, nomeadamente o exame de toque, é tradicionalmente aceite como um dos exames de rastreio, particularmente no cancro da mama (Figura 5) e do cólon, onde é possível a deteção de massas ou quistos anómalos. A grande desvantagem do exame de toque é a sua baixa sensibilidade, uma vez que é preciso um crescimento populacional celular relativamente elevado para poder ser detetado [19, 20]. Do mesmo modo, nem todos os tipos de cancro são passíveis de serem rastreados pelo exame de toque, como por exemplo o cancro do pulmão.



Figura 5. Exemplos de metodologias de diagnóstico do cancro mais comuns.

Os exames laboratoriais revelam-se uma mais-valia no auxílio ao diagnóstico do cancro. A alteração na concentração de certos metabolitos presentes nos fluídos biológicos como o sangue e a urina, podem ser uma ferramenta complementar de diagnóstico, na definição do estadio do tumor e

da sua extensão. Do mesmo modo podem ser uma ajuda preciosa na monitorização do tratamento e a eventual recorrência do cancro após tratamento [19]. Nesta categoria de exames também estão inseridos os marcadores tumorais cuja presença e concentração podem ser indicativos da presença de tumor (mutações específicas em genes herdados como os BRCA1 e BRCA2, por exemplo, tem um papel muito relevante no desenvolvimento do cancro dos ovários e da mama). No entanto, no presente, não existem marcadores suficientemente específicos e sensíveis para os diferentes tipos de cancro. Deste modo, os exames laboratoriais apesar de fornecerem “pistas” extremamente úteis, não podem ser usados como meios únicos de diagnóstico. Este facto prende-se sobretudo pela elevada taxa de falsos positivos e negativos que estes testes podem gerar [19].

Em contraste, os exames imagiológicos (Figura 5) possuem uma elevada sensibilidade em termos de deteção ao criarem imagens do interior do corpo através de diferentes tecnologias, como a ecografia, o raio-X, a tomografia axial computadorizada (CT) e a imagem por ressonância magnética (MRI) [19, 20]. Especificamente no cancro da mama e do cólon, podemos citar ainda a mamografia digital (DM) e a colonoscopia virtual (CTC). Mais recentemente, a tomografia por emissão de positrões (PET) e a tomografia computadorizada por emissão de fotão único (SPECT) são outras alternativas disponíveis no leque de possibilidades do diagnóstico [19, 20]. Podemos ainda considerar, como ferramentas de diagnóstico, a biopsia e a citologia aspirativa. Estas duas técnicas são consideradas as mais invasivas, devido à necessidade de remoção de uma pequena parte do tecido/células afetados para posterior avaliação por patologistas que determinam a natureza e as características do tumor [19].

A aplicação integrada de métodos convencionais de diagnóstico permite a identificação mais precisa de um dado tumor, bem como das suas características associadas [19-21]. No entanto, estas metodologias apresentam um conjunto de desvantagens que limitam a sua utilização. Os exames imagiológicos só são úteis e eficazes quando já temos uma massa consideráveis de células cancerígenas, pelo que não são particularmente adequados para um diagnóstico precoce. Além disso, a incidência de radiação e/ou a utilização de pequenas doses de material radiativo pode promover, por si só a carcinogénese. Do mesmo modo, a remoção de tecido/células afetadas pode criar ainda mais instabilidade, potenciando o aumento tumoral. O desconforto físico e psicológico gerado na realização destes exames, o elevado custo associado e a necessidade de pessoal médico especializado, são ainda outras desvantagens importantes. Por esse motivo, existe uma necessidade evidente de metodologias de diagnóstico do cancro menos invasivas e dispendiosas, que sejam ao mesmo tempo eficazes e sensíveis.

1.5. METABOLÓMICA E OS BIOMARCADORES

A metabolómica é uma área da ciência que tem por objetivo identificar, analisar e quantificar um conjunto de metabolitos originados de um dado organismo em resposta a um dado estímulo [22]. O estudo do metaboloma (conjunto de metabolitos) permite aferir interligações entre um gene e um dado perfil metabólico proporcionando inúmeras oportunidades para a descoberta de novos marcadores tumorais. É importante referir que, apesar das oportunidades, a grande diversidade de metabolitos produzidos por um dado organismo durante os seus processos biológicos normais impõe à partida um grande desafio: a identificação dos metabolitos associados especificamente a uma dada patologia, como por exemplo o cancro [22]. Por outro lado, a concentração, tipicamente baixa, de um dado metabolito exige técnicas extrativas e analíticas reproduzíveis e altamente sensíveis com limites de deteção e quantificação muito baixos. Neste sentido, muitos centros de investigação dedicam-se ao estudo da metabolómica, com o objetivo de correlacionar metabolitos a diferentes patologias, identificando assim potenciais biomarcadores. Estes são definidos como qualquer substância derivada de um dado metabolismo que pode ser rastreável num tecido ou em diferentes fluidos biológicos produzidos pelo organismo, podendo ser utilizado como indicador da ocorrência, desenvolvimento e/ou tratamento de uma dada patologia [22]. Como características fundamentais, um biomarcador deve ser seletivo e específico para uma dada patologia. Além disso, a sua estrutura deve ser estável e passível de quantificação mesmo em baixas concentrações e se possível, permitir uma rastreabilidade da doença em termos de desenvolvimento, permitindo distinguir se, por exemplo, o cancro se encontra no estadio inicial, na fase progressão ou de regressão [22].

De acordo com Zwart *et al.* [23] e La Baer *et al.* [24], os biomarcadores podem ser classificados em três categorias distintas: biomarcadores de efeito, de suscetibilidade e de exposição. Os biomarcadores de efeito correspondem a moléculas que poderão funcionar como indicador de um componente endógeno do sistema biológico, uma medida da capacidade funcional ou estado alterado do sistema, identificado como patologia [23, 24]. Os biomarcadores de suscetibilidade correspondem a indicadores de saúde de um individuo sensível à exposição de compostos exógenos ao seu organismo. Por fim, os biomarcadores de exposição permitem identificar substâncias exógenas ao organismo sendo produto da interação entre compostos xenobióticos e componentes endógenos relacionados com a exposição [23, 24].

Devido ao seu potencial carácter específico para determinada doença, a utilização de biomarcadores pode constituir uma mais-valia para a deteção precoce de cancro, para avaliar a

evolução ao longo do seu desenvolvimento, efeito da terapêutica e a deteção de eventual recorrência. A grande vantagem da utilização dos biomarcadores como meio de diagnóstico para o cancro prende-se sobretudo com a obtenção de amostras. Assim, os biomarcadores podem ser tipicamente encontrados em amostras biológicas como a urina, a saliva e o ar exalado, tornando o procedimento de amostragem e o tipo de diagnóstico não invasivo, menos agressivo para os pacientes e muito mais prático, rápido e económico [23, 24].

De facto, amostras como a urina são ricas em compostos voláteis, tendo sido utilizadas ao longo da história como meio de diagnóstico. O seu potencial foi evidenciado inicialmente por Hipócrates e Galen que relacionaram o odor apresentado pela urina com a presença de diabetes e problemas renais [25]. No entanto, sabe-se atualmente que a composição urinária é fortemente influenciada por fatores exógenos, como por exemplo os hábitos alimentares e o estilo de vida. De um modo geral através do *screening* do perfil metabolómico urinário específico de uma dada patologia, é possível estabelecer relações acerca do seu metabolismo considerando os marcadores endógenos identificados. Neste sentido, os metabolitos orgânicos voláteis (VOMs) identificados em diferentes fluídos biológicos, constituem um conjunto de compostos com potencial para serem usados como biomarcadores na deteção de diferentes patologias, incluindo diferentes tipos de cancro. Neste contexto, tem aumentado exponencialmente o número de trabalhos/publicações que indicam que o perfil volatômico de pacientes oncológicos difere de indivíduos saudáveis. Em 2011 e 2012, Silva *et al.* [4, 5] evidenciaram o potencial de diferentes VOMs presentes na urina na diferenciação de diferentes tipos de cancro, entre os quais o cólon [5] e mama [4]. Matsumura *et al.* [26] também estabeleceram diferenças entre o perfil urinário de ratos modelo com cancro do pulmão e o de ratos sem a patologia (controlo).

Por fim, no que se refere ao estudo de biomarcadores, convém realçar os desafios que ainda surgem relativamente à sua análise. Em particular, o conhecimento das vias metabólicas específicas que levam à produção de um determinado metabolito é fundamental para a sua definição como biomarcador. Porém, atualmente ainda não é possível atribuir uma origem única a todos os VOMs identificados pois, para além de nem todas as vias metabólicas estarem completamente caracterizadas, existem muitos compostos de origem exógena, que contribuem igualmente para o perfil volátil urinário. Os hábitos tabágicos e a adoção de estilos de vida pouco saudáveis (consumo de álcool, sedentarismo, atividade física regular) são apenas alguns exemplos de potenciais fatores que podem contribuir para a variação do perfil urinário. O historial clínico do indivíduo, os mecanismos heterogéneos das diferentes patologias oncológicas e ainda a resposta de um dado

paciente aos tratamentos em curso, são outras questões que se levantam neste campo pois tornam o conhecimento do metabolismo humano muito mais complexo e, portanto, mais difícil de alcançar de forma satisfatória no que diz respeito à caracterização de biomarcadores voláteis.

No entanto, apesar destas dificuldades, para muitos investigadores a definição de um conjunto de metabolitos capazes de identificar uma dada patologia é considerada uma abordagem promissora na área do diagnóstico. Tendo por base o princípio da regulação celular e o *stress* produzido pelas células malignas, as alterações do genoma que resultam na expressão anómala de proteínas e outras moléculas podem gerar o aumento ou decréscimo de certos VOMs que, utilizando a metodologia adequada, poderão ser identificados e quantificados.

1.5.1. VIAS DE SÍNTESE DE BIOMARCADORES

O metabolismo aeróbico leva à produção de diversas espécies reativas de oxigénio (ROS), que incluem o singlete de oxigénio ($^1\text{O}_2$), o ião superóxido ($^{\cdot}\text{O}_2^-$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidróxido ($^{\cdot}\text{OH}$), e ainda espécies reativas de nitrogénio (RNS). A maioria das células pode produzir $^{\cdot}\text{O}_2^-$, H_2O_2 e óxido nítrico (NO), de modo regular, visando a manutenção da homeostasia a nível celular [27-31]. De facto, os papéis multifuncionais dos ROS e RNS levam ao estabelecimento de um controlo fisiológico, que compreende inúmeras classes de agentes redutores e enzimas [27-29].

De acordo Sies [32], o desequilíbrio entre pro-oxidantes e antioxidantes em favor dos pro-oxidantes (*stress* oxidativo), pode causar dano celular. Quando em equilíbrio, a geração de pro-oxidantes, sob a forma de ROS e RNS, está sob controlo através de vários níveis de defesas antioxidantes [27, 30, 33]. O equilíbrio pode ser ligeiramente desviado em favor dos oxidantes, resultando num dano oxidativo contínuo de baixo nível no corpo humano como é o caso do envelhecimento [33, 34]. No entanto, em concentrações muito elevadas, os ROS e RNS são danosos para os organismos, conduzindo a doenças como o cancro, inflamação cardiovascular e doenças degenerativas, através de diferentes mecanismos, como peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, danos nos ácidos nucleicos, inibição de enzimas ou ativação ou desativação da morte celular programada [29-31]. Em última análise, o equilíbrio entre a produção de ROS e RNS e defesas antioxidantes determina o grau de *stress* oxidativo [28, 30].

1.5.1.1. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Uma das ações mais direta dos radicais livres presentes nos sistemas biológicos é o ataque aos ácidos gordos polinsaturados, tipicamente presentes na membrana celular. Este processo, que pode desencadear uma cascata de eventos bioquímicos, é também conhecido como peroxidação lipídica (PL) [27, 35] e está associado ao aparecimento de diferentes patologias, entre as quais o cancro. A PL afeta o normal funcionamento celular, uma vez que leva a deterioração da membrana celular. Como consequência verificamos o aumento da sua permeabilidade, diminuição da sua fluidez e, em casos extremos, a sua rutura, levando à perda do conteúdo intracelular. A PL possui dois mecanismos distintos: oxidação não enzimática mediada por radicais livres e a oxidação enzimática [35].

A PL não enzimática envolve três etapas distintas [35, 36]: iniciação, progressão e terminação (Figura 6). A iniciação ocorre quando o lípido (LH) é atacado por um radical OH^\bullet , levando à formação de um radical lípido (L^\bullet).

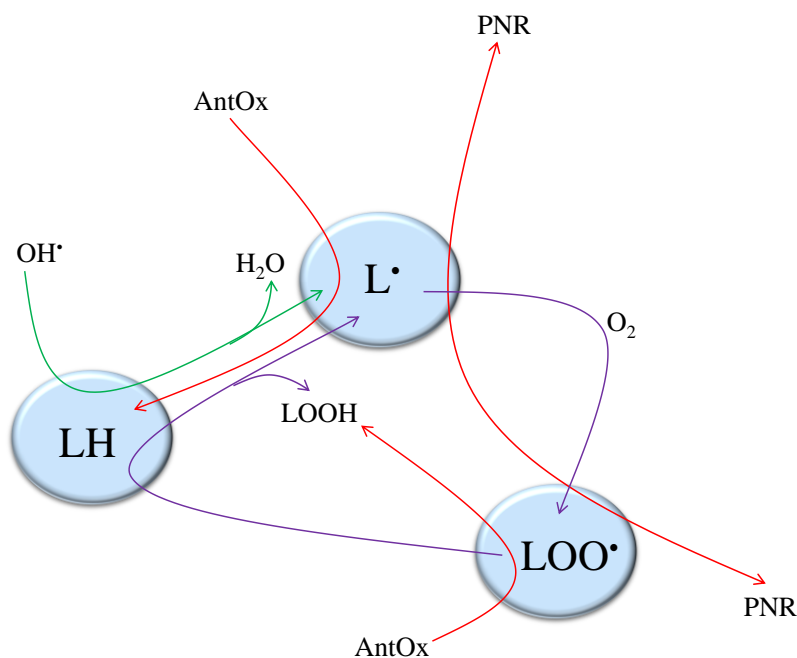


Figura 6. Etapas da Peroxidação Lipídica. A Linha a verde corresponde a etapa de Iniciação; a linha roxa corresponde à Propagação e a linha vermelha à Terminação.

A propagação dá-se pela reação do L^\bullet formado com outro LH ou O_2 , levando a formação de novos radicais (LOO^\bullet - radical peróxido lipídico) que por sua vez podem reagir com novo LH,

formando um “*novo*” lípido (LOOH) e mais um L[•]. Este ciclo irá repetir-se enquanto houver radicais e moléculas de lípidos [35, 36]. A terminação corresponde ao interromper do ciclo da propagação. Tal pode ocorrer quando os radicais reagem entre si formando produtos não reativos (PNR), ou por ação de um antioxidante (AntOx) sobre um radical, levando à recuperação dos lípidos e à formação de radicais antioxidantes menos reativos [35, 36].

A ação da PL resulta na formação hidroperóxidos que, devido ao seu caráter instável, geralmente se decompõem facilmente, transformando-se em metabolitos como isoprostanos e dienos conjugados. Outros produtos de decomposição incluem aldeídos e hidrocarbonetos de cadeia curta (como o pentano) [35, 36].

É importante referir que a mesma cadeia de acontecimentos referidos anteriormente pode desenvolver-se sem a ação direta de radicais livres, sendo desencadeada no centro ativo de enzimas como a lipoxigenase. Nesta reação dá-se a formação de peróxidos lipídicos que evoluem de igual forma aos acontecimentos descritos para os radicais livres. A este tipo de PL dá-se o nome de PL enzimática [35].

1.5.1.2. DANOS OXIDATIVOS NO DNA

O *stress* oxidativo pode causar danos ao DNA. Esses danos podem ser através de oxidação direta ou por interferência dos mecanismos de regulação. Os radicais livres podem induzir alterações nas bases do DNA, alterando a integridade do genoma [37]. Os produtos das reações de oxidação do DNA pelo *stress* oxidativo podem funcionar como biomarcadores, sendo uma grande parte, derivados de bases e açúcares provenientes do DNA [37].

São conhecidos uma vasta gama de produtos de oxidação do DNA, dos quais destacam-se a 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) e a 8-hidroxi-guanina (8-OHGua) [15]. De facto, a 8-OHdG tem sido correlacionada com a carcinogénese uma vez que diferentes trabalhos de investigação revelaram que a concentração deste metabolito aumenta com o estadio do cancro [15, 38, 39]. Outros metabolitos presentes na urina são também importantes indicadores do dano oxidativo do DNA, como a timina glicol (Tg) e o 5-hidroximetiluracil (5-OHmU) [40].

Segundo Franco *et al.* [15], o dano oxidativo no DNA pode desencadear a iniciação de um tumor, através da ação de subprodutos como a 8-OHdG, embora se reconheça que esta molécula não é a única responsável pelo seu desenvolvimento. Existe assim ainda um longo caminho pela frente

para se estabelecerem as relações concretas entre a ação do dano oxidativo no DNA e o desenvolvimento de cancro.

1.5.1.3. OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS

Durante o decorrer da vida de um indivíduo, a exposição às ROS e RNS é inevitável. Por consequência, o organismo enfrenta todos os dias o desafio da manutenção do *stress* oxidativo em níveis aceitáveis, impedindo que ocorram efeitos nefastos (dano oxidativo) que perturbem o seu normal funcionamento. Apesar disso, e à semelhança do DNA e dos lípidos, também as proteínas podem sofrer alterações drásticas resultantes do dano oxidativo [41-44]. Estas alterações tipicamente oxidações, são provocadas por modificações covalentes na estrutura da proteína que, em casos extremos, podem resultar na fragmentação proteica. A ação das ROS e RNS diretamente ou por ação de algum metabolito resultante da reação destas espécies quando em excesso (por exemplo os subprodutos da PL) podem ser o fator iniciador desta cadeia de reações [41-44]. Agentes exógenos como a radiação ionizante, o tabaco, metais pesados, entre outros, são também considerados promotores da oxidação das proteínas. É importante referir que a maioria das proteínas oxidadas, ao contrário do que acontece frequentemente como o DNA, não são reparadas [41]. Deste modo, a degradação proteolítica torna-se um mecanismo fundamental para que estes produtos sejam removidos. Uma deficiência neste processo de degradação pode levar ao aumento do conteúdo de proteínas oxidadas no interior da célula, o que se torna mais frequente e proporcional com o avanço da idade. No limite, uma acumulação acentuada perturba a função celular, resultando na perda da integridade estrutural e catalítica ou ainda na interrupção de vias reguladoras [41-44].

Segundo Stadtman [43], a oxidação de proteínas podem envolver diferentes processos como a clivagem da cadeia polipeptídica (Figura 7), a modificação dos aminoácidos das cadeias laterais e ainda a conversão da proteína em derivados altamente sensíveis à degradação proteolítica. Verificamos através da análise da Figura 7 que a clivagem da cadeia proteica dá-se por ataque inicial de um ROS que forma um radical proteico que é altamente instável. A partir deste ponto uma cascata de reações é possível até a formação dos subprodutos finais, como cetonas ou aldeídos [41-44]. Do mesmo modo, as cadeias laterais das proteínas podem ser suscetíveis ao ataque de ROS e RNS. Este ataque pode ser efetuado a qualquer aminoácido presente, levando a conversão de diferentes subprodutos que podem ainda reagir entre si formando novos metabolitos. A oxidação de outros

resíduos como a lisina, arginina e prolina podem ter um impacto ainda maior no organismo, uma vez que conduz à formação de derivados de carbonilo, Estes derivados podem ainda ser formados por consequência de reações secundárias de algumas cadeias laterais de aminoácido com os produtos da PL, como por exemplo o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) [41-44].

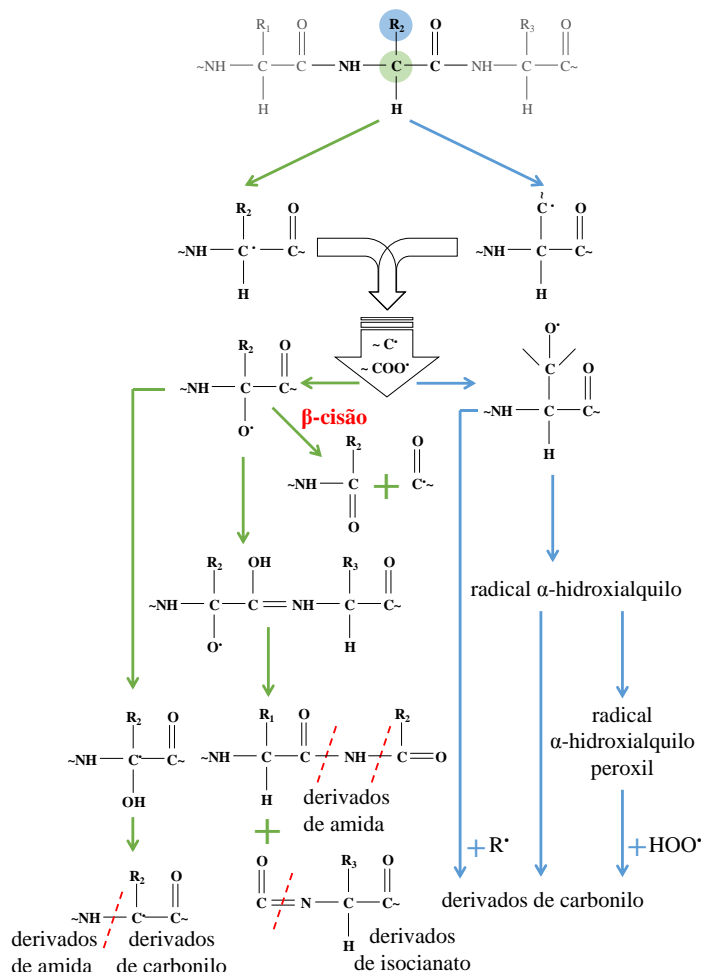


Figura 7. Etapas da oxidação das proteínas.

É ainda importante referir que dada à complexidade dos mecanismos inerentes a oxidação de proteínas, e uma vez que os mesmos não são o tema central desta dissertação, não foram apresentados detalhes sobre a sua formação. Assim, dada a sua importância no organismo, alterações na estrutura das proteínas podem originar a perda da sua funcionalidade, o que em casos extremos pode resultar no aparecimento das mais variadas doenças. Verifica-se que a oxidação de proteínas, sobretudo pela acumulação de derivados de carbonilo, já foi associada a diversas doenças envolvendo danos oxidativos, entre as quais diabetes, distrofia muscular e Alzheimer [41]. Deste

modo, a avaliação do mecanismo que leva à oxidação das proteínas, nomeadamente nos fatores que o influenciam, da sua correlação com outros mecanismos que produzam dano oxidativo, pode ser uma ferramenta fundamental no auxílio à determinação de biomarcadores relacionados com as mais variadas doenças. Este facto deve-se sobretudo à relativa estabilidade dos subprodutos produzidos (como é o caso de alguns derivados carbonilos) [41, 45]. Do mesmo modo, devido à sua especificidade em termos de funções, as proteínas quando oxidadas podem modificar o normal funcionamento do organismo originando outros subprodutos únicos e passíveis de serem mensurados [46].

1.6. METODOLOGIAS ANALÍTICAS

A elevada sensibilidade exigida na deteção dos biomarcadores com potencial aplicação no diagnóstico do cancro, implica que sejam utilizadas metodologias analíticas de elevada resolução e sensibilidade. O processo de análise envolve um fluxo contínuo de etapas (Figura 8) que visam garantir a integridade das amostras culminando num estudo bastante detalhado e compreensivo dos metabolitos presentes. O resultado desta análise deve refletir o metabolismo do individuo e como tal, deve estar isento de contaminações exógenas ao mesmo.

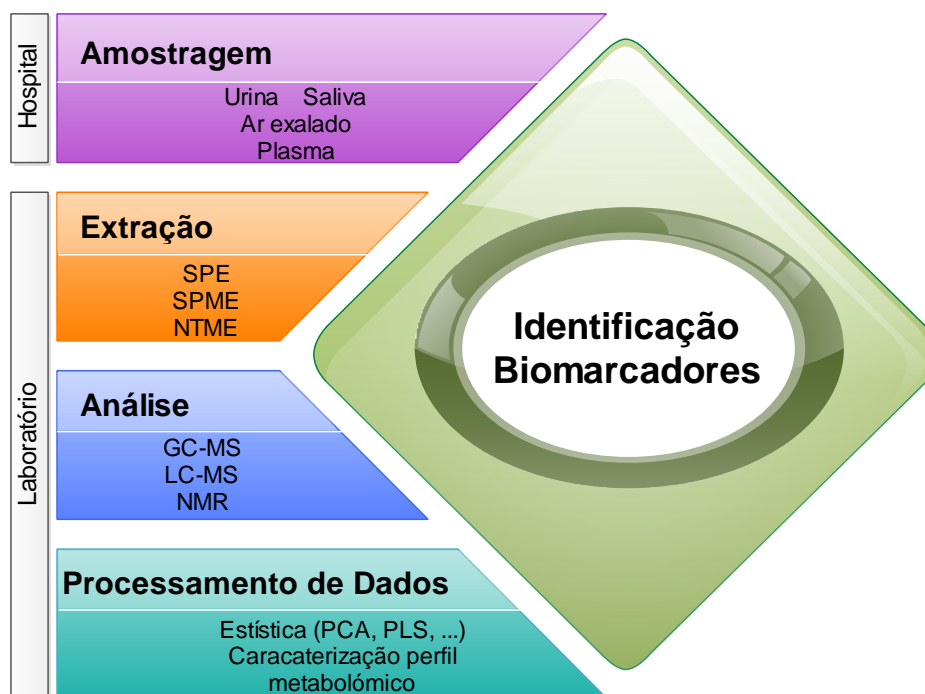


Figura 8. Fluxograma genérico para a análise de biomarcadores.

Devida à baixa concentração de certos metabolitos, a etapa de extração é crucial para a definição do perfil volatômico de um indivíduo [47]. Segundo Queiroz *et al.* [47] em matrizes biológicas e de acordo com a sua complexidade, torna-se necessário um processo extrativo que tem por finalidade não só extrair os compostos de interesse da matriz (evitando ao máximo a presença de interferentes) mas também concentrá-los de forma a serem facilmente identificados e quantificados.

Nos últimos anos, muitos investigadores têm direcionado esforços na simplificação das técnicas extrativas tradicionais [48]. Esta simplificação tem sido sobretudo associada à miniaturização destes métodos extrativos, mantendo os mesmos princípios teóricos, mas permitindo uma redução significativa do volume de amostra, de solventes e do tempo necessário para o procedimento, para além da diminuição do custo de análise e ainda dos níveis de resíduos associados [48-50]. Neste sentido foram propostas, ao longo dos últimos anos, diversas formas de microextração para a obtenção do perfil volátil de matrizes muito diferenciadas [51-56] destacando-se as configurações em agulha que usam uma agulha como suporte para o sorvente. Estes dispositivos têm vindo a ganhar particular atenção por parte dos investigadores, sobretudo devido à sua capacidade de automatização, parcial ou total, que é considerada por muitos como uma vantagem crucial, particularmente quando o número de amostras é significativo [48, 52, 57, 58]. Do mesmo modo, os dispositivos em agulha permitem a unificação de etapas, como a amostragem, extração/pré-concentração e introdução da amostra no dispositivo analítico, o que resulta numa redução do tempo de extração, bem como dos erros experimentais associados às diferentes etapas, quando elaboradas em separado [48, 57].

Segundo a revisão de Lord *et al.* [48], existem cinco tipos de sistemas de microextração em agulha (Figura 9): a microextração em fase sólida (SPME), muito popular e utilizada nas mais diversas áreas [59-62] (Figura 2 - I); a microextração em fase sólida em tubo capilar (INCAT), que difere da anterior na utilização de parte de uma coluna capilar dentro da agulha como material adsorvente [54, 63, 64] (Figura 2 - II); a extração dinâmica em fase sólida (SPDE) sendo as agulhas cobertas internamente por um determinado material extrativo [65-67] (Figura 2 - III); a microextração em gota única (SDME) [68-70] (Figura 2 - IV), e finalmente a técnica extrativa deste trabalho, a microextração por “*needle trap*” (NTME) [48, 71, 72] (Figura 2 - V).

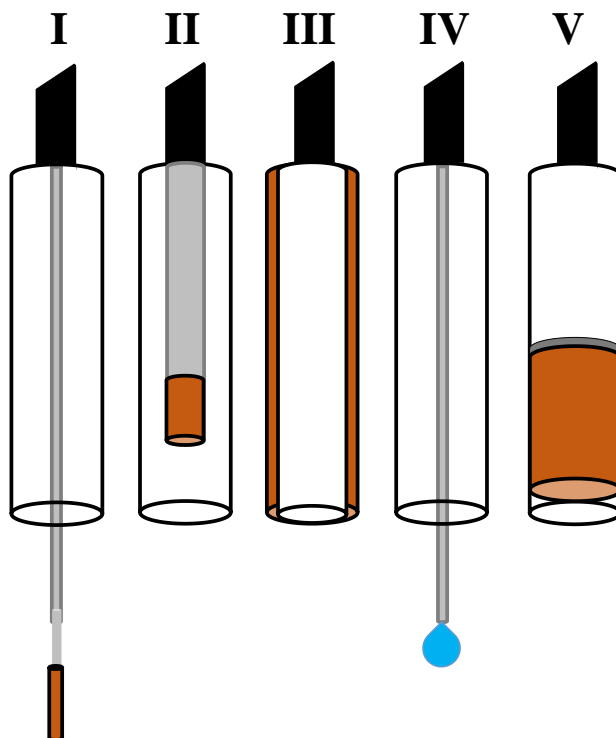


Figura 9. Representação gráfica das diferentes microextrações em agulha: **I** – SPME, **II** – INCAT, **III** – SPDE, **IV** – SDME e **V** – NTME (adaptado de [48])

A seleção da melhor técnica de extração está fortemente associada à natureza dos compostos de interesse, bem como ao tipo e complexidade da amostra, aos custos associados e ao tipo de equipamento disponível em cada unidade de investigação. Deste modo, nos subcapítulos seguintes focar-se-á apenas a metodologia de interesse neste projeto, a NTME.

1.6.1. MICROEXTRAÇÃO POR “NEEDLE TRAP” – NTME

A NTME constitui uma alternativa inovadora aos formatos mais comuns dos métodos extrativos existentes para compostos voláteis. As agulhas desta técnica, também conhecidas por NTDs (dos inglês “*Needle Trap Device*”) foram criadas em resposta à necessidade de um sistema extrativo mais robusto, mas que pudesse manter as vantagens já oferecidas por técnicas como a SPME [48]. Inicialmente descrita por Raschdorf em 1978 [73] para a extração de compostos orgânicos voláteis (VOCs), a constituição das agulhas NTD era relativamente simples com um enchimento constituído apenas por um tipo de sorvente (TENAX) o que limitava bastante a sua

aplicação. Qin *et al.* já em 1997 [74] determinaram, de forma semelhante à descrita por Raschdorf, VOCs como o metanol, etanol, acetona e pentano, em amostras de ar exalado e ainda na atmosfera de zonas industriais e urbanas. No estudo referido foram utilizadas agulhas mais elaboradas, cuja constituição incluía uma combinação de sílica gel e carvão. No entanto, as agulhas propostas por Qin *et al.* [74] tinham como enorme desvantagem a necessidade de um adaptador para a sua introdução no injetor do cromatógrafo de fase gasosa devido ao enorme tamanho das agulhas, para além das especificações com o gás de arraste, limitando a sua ação.

As NTDs voltaram novamente a despertar interesse, em 2001, após a introdução de modificações na constituição e formato das agulhas feitas por Pawliszyn [75], que culminou numa aplicação bem-sucedida das mesmas em análises de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, em aerossóis e partículas em suspensão no ar [75]. Em 2005, Wang *et al.* [76] mostraram a aplicabilidade das NTDs na deteção de VOCs como o benzeno e o tolueno. No entanto, neste trabalho ficou patente a necessidade de avaliação de diversos parâmetros relacionados com as agulhas nomeadamente o tipo de enchimento, modo de dessorção no cromatógrafo e ainda o ponto de rutura. Do mesmo modo, Eom *et al.* em 2008 [77], utilizando a mesma classe de compostos, evidenciaram as vantagens associadas às NTDs, nomeadamente a robustez, a reutilização e ainda a capacidade de armazenamento das agulhas após as extrações, sem afetar de forma significativa a recuperação dos compostos extraídos. Mais recentemente Trefz *et al.* [71] e Mieth *et al.* [57] mostraram que a conjugação de diferentes sorventes numa mesma agulha melhora a performance extrativa ao permitir diferentes possibilidades de afinidade, consoante a natureza dos sorventes. No referido trabalho, estes investigadores utilizaram agulhas semelhantes à da Figura 10 para extração de VOMs do ar exalado [71].

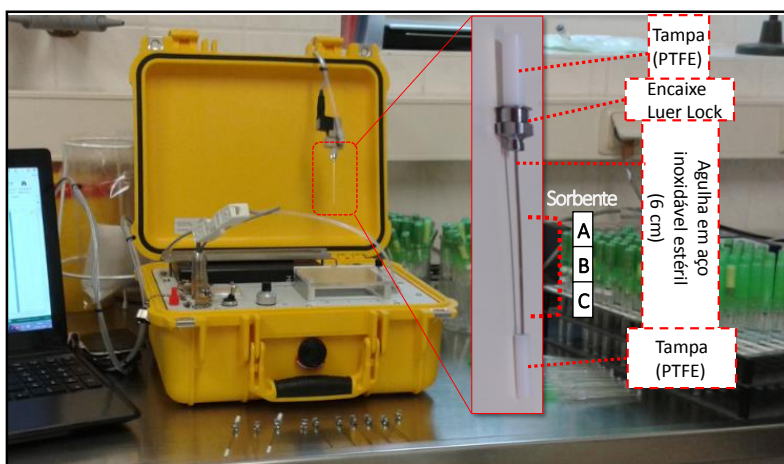


Figura 10. Agulha NTD e respetivo dispositivo.

1.6.1.1. NTDs - CONSTITUIÇÃO E FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Desde a sua origem, as NTDs foram desenvolvidas com diferentes constituições, formas e tamanhos. De um modo geral, um dispositivo NTD (Figura 10) consiste numa agulha que contém um determinado sorvente ou uma conjugação de diferentes tipos.

De acordo com Warren e Pawliszyn [78], as NTDs podem ser divididas de acordo com o seu *design* e ainda o número de sorventes diferentes que apresenta. Deste modo, tendo em conta o número de sorventes, estas agulhas podem ser de camada única (apenas um tipo de sorvente) ou multicamadas (combinação de diferentes sorventes), tal como demonstra a Figura 11.

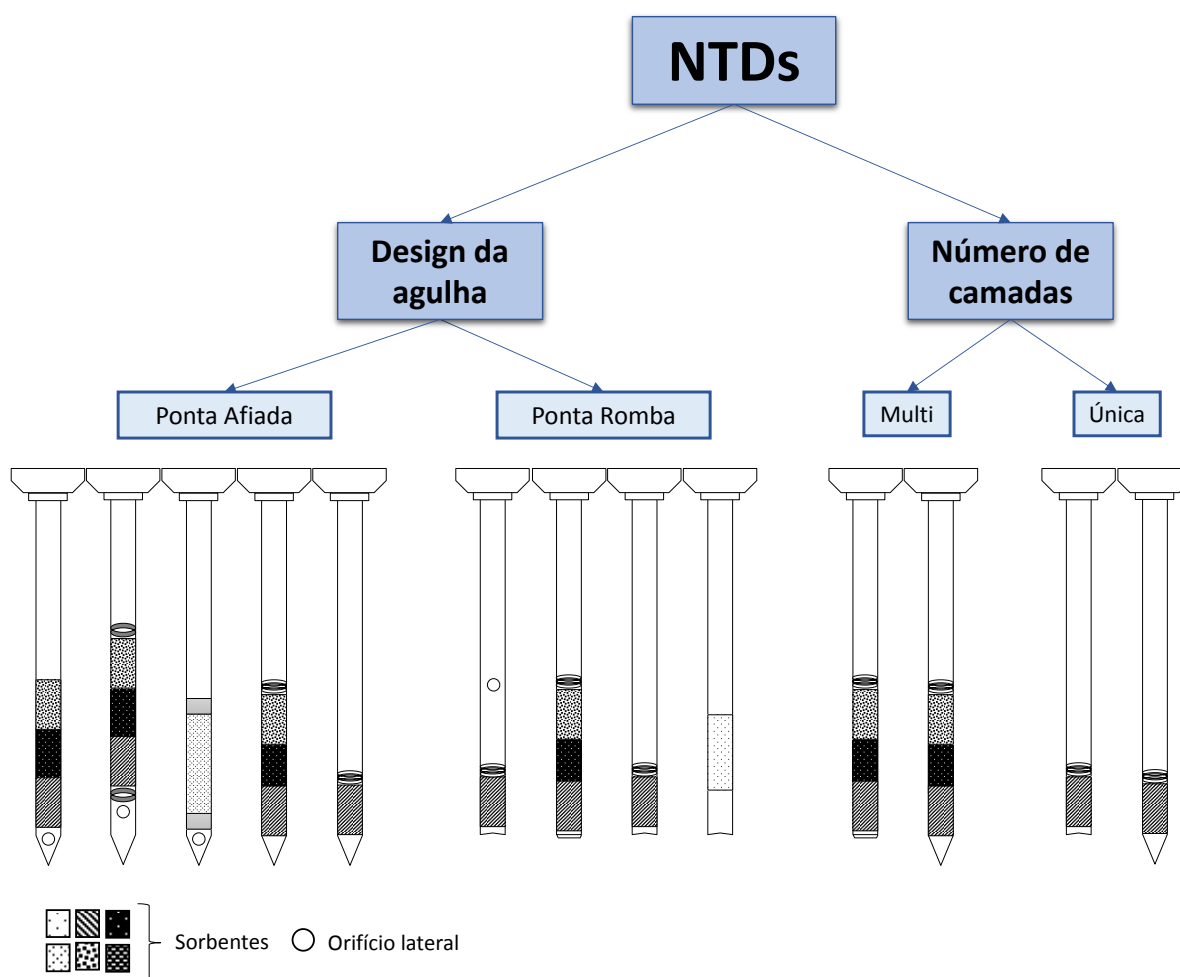


Figura 11. Classificação das agulhas NTDs relativamente ao seu design e número de camadas de sorvente.

As agulhas de camada única são de constituição mais simples, tipicamente feitas de materiais como o divinilbenzeno (DVB), polidimetilsiloxano (PDMS) ou carboxeno (CAR) e já foram

descritas em trabalhos para a extração de VOCs contaminantes como o benzeno, o tolueno, entre outros [77, 78]. No entanto, para amostras mais complexas como o ar exalado, a simplicidade destas agulhas, limitam a sua aplicabilidade [57, 71]. Relativamente às NTDs multicamadas (Figura 11), estas combinam diferentes propriedades de adsorção/absorção, de acordo com o tipo de material escolhido [57, 71, 78]. As camadas são definidas de acordo com a força do sorvente, aumentando o espectro de VOCs identificados [78]. A escolha do tipo de sorvente da agulha vai depender sobretudo do tipo de matiz e da natureza dos analitos alvo. Por outro lado, as NTDs podem diferenciar-se tendo por base o *design* da agulha (Figura 11). Neste caso existem diversas configurações possíveis, sendo as mais usuais as agulhas de ponta romba [75-77] e ponta afiada [71, 76, 79]. Inseridas nestas categorias temos ainda a presença [71, 77-79] ou ausência [75, 76, 78] de um orifício lateral que pode estar situado abaixo ou acima da (s) camada (s) de sorvente (s).

De um modo geral as NTDs combinam a ideia de uma extração ativa com os princípios definidos pela SPME. Por outras palavras, estas agulhas, ao contrário das de SPME (que são baseadas no equilíbrio entre fases), são utilizadas num modo de extração exaustivo, ou seja, se aumentarmos o volume de extração aumentaremos também a quantidade de analito extraído [77]. Assim, em teoria, os analitos podem ser continuamente extraídos pelo sorvente da agulha até que se atinja a sua saturação (ponto de rotura) [48, 77]. A Equação 1 mostra a relação descrita anteriormente:

$$n = CoV \quad \text{(Equação 1)}$$

onde n = massa do composto extraída pela agulha NTD, Co = concentração do analito presente na amostra e V = volume de amostragem [77].

É importante referir que a linearidade deste método extrativo depende de diversos fatores nomeadamente a natureza, a quantidade e a porosidade do sorvente no interior da agulha, do volume de amostragem, da difusão dos analitos e ainda da presença de interferentes, como moléculas de água [48, 77]. Assim, o carácter exaustivo das NTDs é perdido quando o sorvente da agulha atinge o seu ponto de rotura, isto é, quando fica completamente saturado pelos analitos, deixando de existir linearidade entre a quantidade de analito extraído e volume de amostragem utilizado [48]. Tendo em consideração potenciais interferentes, ou variações que fogem a um modelo teórico, podemos determinar o ponto de rotura de forma experimental. Em termos práticos, o ponto de rotura é determinado através da construção da curva de calibração para um dado composto. Ou seja, sendo

a extração em modo ativo um processo linear, a resposta da extração será diretamente proporcional ao volume de amostra extraído. Deste modo, o ponto de rotura é definido experimentalmente quando o desvio à linearidade for superior a 10% [77].

Outros dois parâmetros de particular interesse na extração por NTME são o modo e a temperatura de dessorção dos compostos adsorvidos/absorvidos no sorvente da agulha. A definição desta etapa é crucial para que os analitos de interesse sejam dessorvidos e migrem da agulha em direção à coluna do equipamento de análise de forma eficaz e assim permitir uma correta identificação e quantificação [71, 77]. Um processo de dessorção ineficaz resulta em efeitos de memória (*carry over*) por parte da agulha, o que compromete não só a análise em questão (que possuirá uma resposta inferior à esperada) mas todas as análises posteriores que poderão ser afetadas com a presença de compostos das extrações anteriores. Do mesmo modo, e especialmente para analitos em proporções residuais, uma dessorção ineficaz poderá impedir a identificação do composto, resultando num perfil volátil menos completo, podendo ter consequências negativas na determinação de potenciais biomarcadores para o diagnóstico de uma dada patologia. Por outro lado, uma temperatura de dessorção incompatível com as propriedades do sorvente da agulha, pode limitar o tempo de vida útil da agulha, bem como ser uma potencial fonte de interferentes [71, 77].

Podemos classificar o modo de dessorção em duas categorias: dessorção assistida por ar, gás inerte ou vapor de água e ainda dessorção por expansão térmica. Relativamente a dessorção assistida, a utilização de ar puro para auxiliar a migração dos compostos de extraídos do interior da agulha para a coluna cromatográfica foi uma das primeiras abordagens associadas às NTDs [75]. No entanto, a presença de um forte efeito *carry over*, para além de potenciais contaminantes provenientes do ar, como por exemplo oxigénio, que acabavam por limitar o tempo de vida útil dos equipamentos de análise [48, 80] figuram como as principais desvantagens deste modo. Outra abordagem muito popular para a dessorção dos analitos em agulhas consiste na utilização de um gás inerte, tipicamente o gás de arraste do equipamento de análise, em vez do ar puro. Desta forma reduz-se o efeito *carry over* e a presença de oxigénio no interior do equipamento [48, 76]. Přikryl *et al.* [64] utilizaram ainda a assistência de vapor de água para a dessorção dos compostos retidos em sorvente. No entanto, esta última abordagem apresenta, para além das desvantagens já descritas anteriormente, a potencial introdução de moléculas de água no interior do equipamento, facto que poderá ser crítico para o seu tempo de vida e dos seus componentes como é o caso do injetor e da coluna cromatográfica. Em qualquer um dos modos de dessorção assistida, a metodologia, apesar de fácil, adiciona mais um passo ao processo extrativo, potenciando a introdução de erros e

contaminações. Do mesmo modo, e em particular para a introdução de ar puro ou gás inerte, é ainda necessário um adaptador que, dependendo da configuração da agulha, pode variar desde uma simples seringa até um controlador de fluxo mais complexo.

O modo de dessorção por expansão térmica é, pelas desvantagens já descritas anteriormente para os modos que requerem assistência, a forma mais simples e eficaz de promover a dessorção dos analitos retidos no sorvente da NTD [48, 80]. Neste modo, a agulha é introduzida na porta do injetor que se encontra a uma temperatura elevada (tipicamente acima do 250 °C) e os analitos são transferidos do sorvente para o injetor devido ao fluxo de dessorção produzido pelo ar no interior da agulha que é aquecido durante a injeção [80]. Assim, para que a dessorção e consequente transferência dos analitos seja eficiente e completa, o controlo da temperatura e tempo de dessorção são fundamentais. Por outras palavras, quando uma NTD é introduzida no injetor, devido à elevada temperatura, o ar do interior da agulha rapidamente se expande gerando um fluxo de ar em direção à coluna cromatográfica, promovendo a transferência dos analitos extraídos [80]. A este respeito, trabalhos efetuados por Eom e Pawliszyn [80] e Trefz *et al.* [71] mostraram que as temperaturas e o tempo de dessorção devem ser otimizados tendo em consideração o tipo de compostos alvo, as propriedades dos sorventes da NTD e ainda a configuração do equipamento de análise, nomeadamente a resistência da coluna cromatográfica. No entanto, é importante referir que, devido à rápida expansão do ar, os trabalhos efetuados demonstraram que não existem diferenças significativas após 1,5 minutos de dessorção a uma temperatura média de 250 °C [71, 80]. Do mesmo modo a temperatura de dessorção foi referida numa gama entre os 200 e os 300 °C consoante as especificidades do trabalho [71, 80]. Em ambos os trabalhos não foram verificados valores significativos de *carry over*, o que suporta a eficácia desta abordagem.

Por se tratar de uma técnica inovadora e que permite num curto espaço de tempo a extração de compostos voláteis, as NTDs têm adquirido popularidade no mundo da investigação. Desta forma, este método tem vindo a conquistar uma enorme importância no que concerne à extração de uma ampla variedade de analitos provenientes de diferentes matrizes com composição diferenciada.

1.6.2. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (GC-MS)

Na análise de compostos voláteis, técnicas de análise como a cromatografia são cruciais para uma correta separação e identificação do perfil de uma dada amostra [81]. A Cromatografia Gasosa (GC) é definida pela natureza da fase móvel ser um gás inerte, tipicamente azoto, hélio ou hidrogénio, cuja natureza varia de acordo com as necessidades de análise. Podemos subdividir a cromatografia gasosa em gás-sólido, quando a fase estacionária é constituída por um sólido e onde a adsorção é o tipo de equilíbrio existente entre fases e em gás-líquido onde a fase estacionária é um líquido e o tipo de equilíbrio existente reside na partição entre o gás e o líquido da fase estacionária. Em qualquer um dos casos, o suporte físico utilizado consiste numa coluna cujo enchimento, tamanho, diâmetro interno e polaridade depende do tipo de compostos a serem analisados [81, 82].

Sendo uma das técnicas mais populares em química analítica, a GC revela-se uma poderosa ferramenta de análise, qualitativa e quantitativa, de amostras biológicas de diferentes graus de complexidade, quando associada à espectrometria de massas (MS) [83]. Deste modo, o GC-MS resulta na combinação perfeita entre a separação dos constituintes de uma dada amostra efetuada pelo GC e a identificação dos compostos separados por recurso ao espectro de massas de cada composto [81, 83]. Relativamente simples, esta técnica consiste na vaporização dos componentes de uma dada mistura, sendo estes injetados na câmara de injeção, transportados para a coluna cromatográfica e separados de acordo com a sua interação na fase estacionária. Como principais desvantagens podemos referir a sua limitação a amostras voláteis, de peso molecular relativamente baixo e termicamente estáveis [81].

Um equipamento típico de GC-MS (Figura 12) é constituído por uma unidade de controlo de gás, uma unidade GC constituída por um sistema de injeção (injetor) de amostra, coluna de separação, forno de colunas, e por um espectrómetro de massa (MS) composto por uma câmara de ionização, pela fonte, analisador e multiplicador de iões e detetor, indispensável para a identificação dos componentes em análise [81, 82].

A unidade de controlo de gás, tal como o próprio nome indica, controla o fluxo e a pressão do gás de arraste até a sua entrada no equipamento. De acordo com a especificidade do detetor e a necessidade de resolução da análise, é possível a utilização de diferentes gases de arraste, como o hélio, azoto ou hidrogénio. Independentemente da escolha, o gás de arraste deve ser quimicamente inerte e o mais puro possível de forma a evitar contaminantes como oxigénio e água, cuja presença

pode limitar a durabilidade dos restantes componentes do equipamento [81, 83-85]. Após o regulador de fluxo, pode ainda existir filtros com diferentes afinidades, que têm por objetivo reter potenciais contaminantes (água, oxigénio, hidrocarbonetos, entre outros) [81, 84].

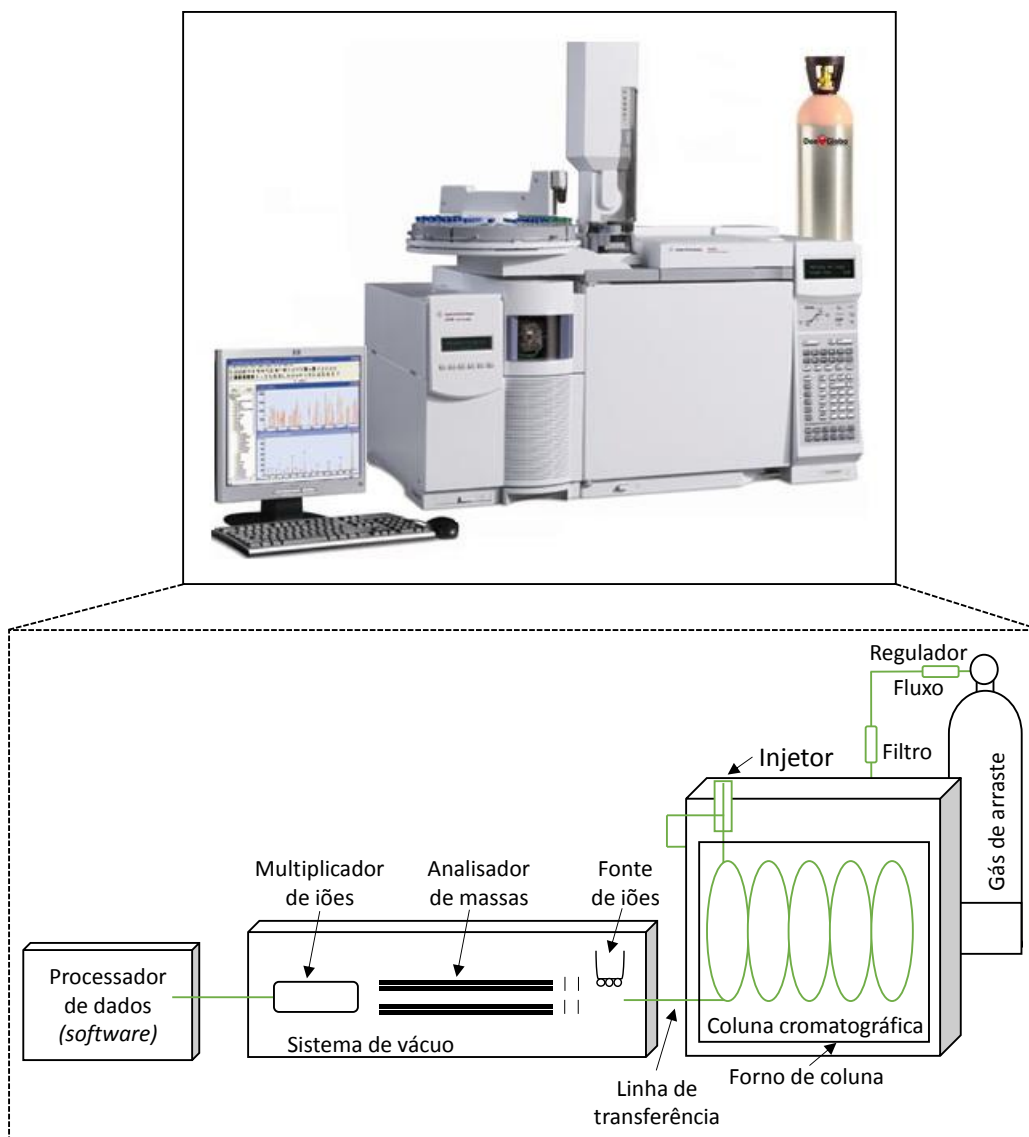


Figura 12. Principais componentes de um GC-MS (adaptado de [38]).

A introdução da amostra é efetuada no injetor da unidade cromatográfica, podendo existir três modos distintos: *splitless*, *split*, e ainda a conjugação de ambos, *split/splitless*. No modo de injeção *splitless*, toda a amostra migra para a coluna cromatográfica, o que é particularmente útil em análises de amostras menos complexas, ou cujos componentes se encontram em níveis residuais. No

entanto, quando os compostos se encontram em concentração elevada (especialmente quando são introduzidos em fase líquida) o modo *splitless* pode apresentar grandes desvantagens, como a saturação e sobrecarga da coluna, sendo por isso conveniente a utilização do modo *split*, no qual uma porção da amostra injetada é descartada antes da sua entrada na coluna cromatográfica. Esta divisão é feita de acordo com uma razão amostra/gás de arraste previamente definida. Por fim, para amostras complexas e que apresentam um misto de compostos com uma vasta gama de concentrações o modo *split/splitless* é uma alternativa viável para introdução da amostra na coluna, uma vez que conjuga as vantagens dos dois métodos já descritos [81, 83, 84]. Sendo a introdução da amostra uma etapa importante para o sucesso da análise, uma vez que a amostra deve migrar íntegra para a coluna cromatográfica [81], a temperatura do injetor deve ser suficientemente elevada para que todos os constituintes da amostra sejam vaporizados de forma instantânea e sem degradação do mesmo. O volume de amostra é ainda outro fator a ser definido e está diretamente relacionado ao estado físico da amostra (líquido ou gás) e o tipo de coluna [81, 84].

A separação dos componentes da amostra, a separação dos seus componentes é efetuada na coluna cromatográfica. Esta separação é sobretudo influenciada pelas propriedades da fase estacionária, nomeadamente a sua constituição, o seu comprimento e diâmetro, bem como a temperatura a que é submetida e o tipo de gás de arraste utilizado [81]. Assim, colunas de GC podem ser de dois tipos distintos: empacotadas e capilares. As colunas empacotadas são constituídas por um enchimento denso, cujo material depende da fase estacionária ser líquida ou sólida. Estas colunas apresentam como grande desvantagem um elevado tempo de análise e fraca eficiência de separação para amostras mais complexas. Por essa razão, as colunas empacotadas estão a cair em desuso, sendo cada vez mais usadas as colunas capilares [81]. Por sua vez, as colunas capilares (WCOT, SCOT e PLOT – Figura 13) são finos tubos abertos (diâmetro interno entre 0,1 e 0,53 mm) feitos de material inerte, cujas paredes internas são recobertas por um filme (geralmente 0,1 a 5 μm) de fase estacionária. [81]. Sendo as colunas de GC consideradas como, o coração da etapa de separação, devem ser avaliadas e escolhidas consoante a necessidade do investigador, nomeadamente no que se refere ao poder de separação, a capacidade de carga e ainda a seletividade ao tipo de compostos alvos.

A escolha da fase estacionária, de acordo com o tipo de coluna, é outro parâmetro a se ter em consideração na separação e conseqüente definição de um perfil volátil [81, 84]. No que toca a fase estacionária, esta deve apresentar-se inerte face aos potenciais compostos em análise, isto é, não deve reagir com os analitos presentes. Do mesmo modo, deve ter uma baixa volatilidade e

elevada estabilidade térmica. [81, 84]. As colunas cromatográficas estão inseridas num forno próprio na unidade de GC, que permite total controlo na definição de um gradiente de temperaturas, potenciando o poder de separação dos compostos presentes em amostra [81, 84]. A definição do gradiente de temperatura está dependente para além dos compostos em estudo, das capacidades físicas da coluna, sendo tipicamente definidos entre os 40 e os 325 °C.

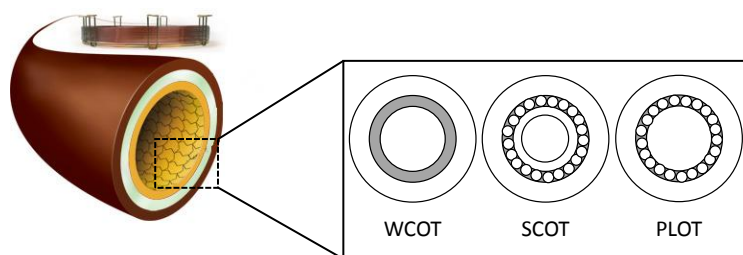


Figura 13. Tipos de coluna capilar: **WCOT** – tubular aberta de parede recoberta; **SCOT** – tubular aberta revestida com suporte; **PLOT** – tubular aberta de camada porosa.

Uma vez eluídos das colunas, os compostos são transferidos para o MS através da linha de transferência até à câmara de ionização [81]. Diferentes processos de ionização podem ser definidos, sendo tipicamente os mais usados, a ionização química (CI) e a ionização por impacto eletrónico (EI) [81, 84]. A CI consiste na produção de iões por reação (ionização) da molécula do composto de interesse com um dado gás reacional. Este processo é particularmente útil na análise de compostos de baixo peso molecular e termicamente estáveis, nomeadamente na determinação da sua massa molecular, uma vez que produz menor fragmentação quando comparada com a EI [81]. Por outro lado, o EI é o processo de ionização mais utilizado pelos utilizadores de GC-MS. Possui uma ampla biblioteca de padrões de fragmentação, sendo à semelhança do CI tipicamente usado para compostos de baixo peso molecular e termicamente estáveis. Neste processo, os compostos em análise são bombardeados por um feixe de eletrões, tipicamente a 70 eV, resultando em colisões suficientemente energéticas para promover a ionização dos compostos e originando um padrão de fragmentação específico para cada composto [81]. Embora seja a técnica mais utilizada, a EI apresenta algumas desvantagens, como por exemplo a fragmentação extensiva devida à elevada energia utilizada, bem como a sua limitação a compostos de baixo peso molecular [81].

Em análises de compostos com peso molecular mais elevado e termicamente instáveis, outros processos como a ionização por desorção da matriz por laser (MALDI) e ainda a ionização

por bombardeamento de átomos a alta velocidade (FAB) são mais indicados. De um modo geral, no MALDI a amostra é dissolvida numa determinada matriz e a mistura resultante é depositada sobre uma sonda laser que é introduzida no MS e faz-se incidir sobre a sua superfície um feixe de laser pulsado, tipicamente formado por N_2 , resultando na ionização das moléculas [81]. No FAB, por sua vez, a amostra é inicialmente dissolvida tipicamente em glicerol, sendo colocada sob uma superfície metálica situada na extremidade de uma sonda que a ser introduzida no MS. O líquido presente é então bombardeado por átomos com elevada energia cinética (como o Árgon), lançando moléculas para fora da superfície onde passam para a fase gasosa, sendo nesta altura, ionizadas [81].

A etapa seguinte à ionização consiste na análise dos fragmentos iónicos produzidos. Esta análise é essencial para a determinação da estrutura dos compostos presentes na amostra e consequentemente da sua identidade. Deste modo, os analisadores de massas separam os fragmentos iónicos segundo a sua razão massa/carga (m/z) permitindo a produção de padrões de fragmentação [81, 84]. A escolha do analisador vai estar sobretudo dependente dos limites de deteção requeridos na análise, do intervalo de massas, da velocidade de varrimento e da resolução pretendida. Assim, podemos dividir os analisadores de massas em duas categorias distintas: os analisadores pulsados e os contínuos. Nos analisadores pulsados são coletados espectros de massas inteiros a partir de um pulso de iões [81], como por exemplo, os analisadores tempo de voo (*TOF*) que medem o tempo que os fragmentos iónicos com diferentes massas necessitam para se mover entre a fonte de iões e o detetor [81]. Por outro lado, os analisadores contínuos transmitem um fragmento iónico simples de razão m/z ao detetor. Nesta categoria incluem-se os analisadores como o de campo magnético e o quadrupólo. Os analisadores de campo magnéticos simplesmente separam os diferentes iões de acordo com o momento e carga do ião, cuja trajetória até o detetor é feita de forma circular, por ação de um campo magnético que promove a sua aceleração [81]. O analisador quadrupólo é constituído por quatro eléctrodos paralelos (tipicamente de polaridade oposta) localizados entre a fonte de iões e o detetor. Os iões são separados a medida que atravessam o quadrupólo, de acordo com as respetivas razões m/z e apenas um ião de razão m/z atinge o detetor de cada vez [81, 84].

A última etapa no MS consiste na deteção dos fragmentos iónicos formados, que são registados em forma de espectros através de *software* específico que permite a sua posterior leitura e comparação. Deste modo, a deteção dos iões pode ser feita por meio da multiplicação de eletrões ou através de copos de Faraday [81]. Devido o baixo tempo de vida útil dos detetores multiplicador de iões, os copos de Faraday são mais comumente utilizados. Estes detetores possuem uma elevada amplificação e recolha eficiente dos iões, associado a um tempo de resposta rápido. Do mesmo

modo, é passível de ser utilizado com respostas idênticas, numa ampla gama de massas e com uma razão sinal/ruído relativamente baixa. Após a obtenção de espectros de massas para cada composto separado, e recorrendo às mais variadas bibliotecas de espectros é possível confirmar a identidade atribuída aos analitos em estudo [81].

Por se tratar de uma técnica robusta e com diferentes possibilidades de conjugação consoante a necessidade de análise, o GC-MS é considerada uma técnica analítica dominante no que toca a separação e identificação de compostos desconhecidos. Permite ainda a quantificação e elucidação de diferentes estruturas químicas das mais variadas classes de compostos voláteis presentes numa vasta gama de amostras, desde a área alimentar, farmacêutica, controlo de qualidade entre outros. Em particular na área da metabolómica, o GC-MS tem mostrado ser uma ferramenta eficaz na determinação do padrão volatômico, sendo sobretudo associado a vantagens como elevada sensibilidade, reprodutibilidade, robustez e baixo custo de análise [81].

1.6.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O principal objetivo da determinação do perfil volátil de uma dada amostra biológica é sobretudo a identificação de um conjunto de VOMs que a uma dada concentração e relação mostram um nível de significância elevado, sendo passível a sua utilização em diagnósticos não invasivos de doenças como o cancro. No entanto, para a determinação deste conjunto de VOMs é necessário recorrer a diferentes ferramentas estatísticas que permitam a visualização da diferenciação entre pacientes e grupo de controlo. A definição de uma ferramenta estatística adequada é um desafio para todos os investigadores, uma vez que a escolha menos acertada pode levar a situações extremas como falsos positivos e negativos em termos de diagnóstico [86]. Assim, é preciso ter-se em consideração um conjunto de fatores antes da escolha da ferramenta ideal, nomeadamente a complexidade e o tamanho da amostragem em estudo, o número de VOMs e ainda a variabilidade contida em cada conjunto de amostra [86-88]. Uma vez ultrapassadas as questões anteriores, para a análise estatística é ainda preciso recorrer a uma normalização dos dados obtidos em cada grupo de estudo, para que não haja uma simplificação dos resultados e sejam evitados erros associados aos dados brutos [88].

Tradicionalmente, inúmeros investigadores utilizam como principal ferramenta estatística o *p-value* de forma a identificar VOMs cuja variação seja significativa [88, 89]. No entanto, esta

abordagem é extremamente limitada e apresenta como enorme desvantagem a definição de um nível de significância que quando estipulado de forma incorreta resulta no aparecimento de inúmeros falsos positivos e negativos [88, 89]. Por essa razão, investigadores em todo mundo têm vindo a adotar a análise multivariada (MVSA) para a determinação de um conjunto de VOMs passíveis de serem considerados biomarcadores de diferentes patologias [87, 88]. A MVSA pode ser dividida em duas categorias distintas: a análise não supervisionada, tipicamente efetuada após a normalização dos dados obtidos; e a análise supervisionada, onde é possível ser feita uma caracterização mais completa da relação entre as variáveis (VOMs) e os casos (amostra) [88, 90].

A análise dos componentes principais (PCA) é o método mais comum utilizado, na análise não supervisionada. Esta abordagem reduz o número de fatores associados mostrando agrupamentos de acordo com a separação entre grupos [87, 88]. No entanto, apresenta como desvantagem o fato de não mostrar que variáveis são diretamente responsáveis pela formação destes agrupamentos. Assim, e apesar de possível a visualização da separação entre grupos, técnicas não supervisionadas, como o PCA, não permitem a criação de uma modelo de classificação das diferentes variáveis [87, 88]. Por essa razão, os métodos supervisionados tornam-se mais vantajosos, permitindo aos investigadores estabelecerem ligações importantes entre a amostra e as variáveis [88]. De acordo com a complexidade da amostra e o objetivo final da análise, é possível a utilização de métodos lineares, como a análise de discriminante linear (LDA), cujo objetivo é determinar uma função linear baseada na matriz de compostos (VOMs) obtidos e tentar estabelecer diferenças entre os grupos em estudo [88]. Esta abordagem é considerada relativamente rápida e simples, sendo tipicamente usada após a análise por PCA, para a classificação das variáveis. Diversos são os métodos LDA para a análise de compostos biológicos, como a análise discriminante dos quadrados mínimos parciais (PLS-DA). Devido a sua capacidade de distinção entre grupos, identificando quais os compostos são responsáveis por cada separação, o PLS-DA é uma ferramenta extremamente útil na compreensão dos metabolitos que são responsáveis pela separação entre o grupo de controlo e os pacientes em estudo. No entanto, é importante referir que para o sucesso deste método, o PLS-DA deve ser otimizado *à priori*, sendo o seu modelo linear treinado para que a sua precisão seja elevada e o erro presente seja avaliado [88, 90-92].

Por outro lado, os metabolitos podem não responder linearmente a um dado modelo matemático [88, 93]. Este fato pode limitar a ação de métodos lineares anteriormente descritos. De forma a ultrapassar esta característica, é proposta outra abordagem supervisionada, denominada de análise não linear. Esta abordagem é relativamente recente e requer um conjunto de otimizações

para a definição do modelo estatístico, sendo o método mais mediático as redes neurais artificiais (ANNs). Diferentes investigadores referem esta metodologia como extremamente robusta e com um elevado poder preditivo, uma vez que envolve um enorme conjunto de métodos estatísticos, sendo assim muito flexível em termos de análise [88, 93, 94].

Os resultados obtidos através dos diferentes modelos estatísticos, são submetidos a uma etapa final de validação, para que a robustez do método seja comprovada [88, 91, 92, 95]. Esta etapa é considerada por muitos como uma etapa obrigatória para o sucesso da análise estatística, onde são avaliados os erros associados ao modelo desenvolvido, bem como a sua sensibilidade e especificidade, que resultam na taxa de classificação do modelo [88, 92, 95]. Por outras palavras, é feita a avaliação de um dado modelo criado a partir de um conjunto de dados relativamente à sua aplicabilidade em amostras gerais. Nesta etapa, à semelhança da determinação do modelo estatístico mais adequado, as metodologias propostas são diversas, destacando-se como por exemplo a validação cruzada e o método SIMCA (modelagem suave e independente de analogias de classe). De acordo com o carácter exaustivo imputado à validação os dados podem ser divididos em conjuntos aleatórios de aprendizagem e teste. Desde modo o modelo é desenvolvido no conjunto de aprendizagem e o potencial de erro no conjunto teste [88, 92, 95]. Podemos deste modo aferir que a análise estatística é uma ferramenta poderosa para a determinação de potenciais biomarcadores, independentemente do tipo de compostos tidos como variáveis, bem como as amostras em estudo. Para uma avaliação correta dos dados obtidos, a escolha da abordagem mais adequada é crucial e extremamente importante, pois disso dependerá o sucesso de todo o processo de análise a obtenção de um perfil metabólico capaz de diagnosticar a presença de uma dada doença.

CAPÍTULO II.

PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MATERIAL E REAGENTES

Para a elaboração deste projeto foram utilizadas diferentes agulhas “*needle trap*” (NTDs) (60 mm × 0.41 mm i.d., 0.72 mm o.d) constituídas por: (i) Divinilbenzeno / Carboxeno 1000 / Carbopack X (DVB / Car1000 / CarX), (ii) Polidimentililoxano / Carboxeno 1000 / Carbopack X (PDMS / Car1000 / Car X), (iii) Polidimentililoxano / Carboxeno 1000 (Car1000 / PDMS) e (iv) Divinilbenzeno / Carboxeno 1000 / Polidimentililoxano (DVB / Car1000 / PDMS), obtidas da PAS Technology (Magdala, Alemanha). Para a extração foram utilizados tubos de 8 e 20 mL, septos de PTFE e respetivas tampas adquiridos à Supelco (Bellefonte, E.U.A.), placa de aquecimento (Thermo Scientific, Waltham, MA, E.U.A.), seringas descartáveis de 1 mL e suporte universal, requisitados à VWR (Lisboa, Portugal). Como reagentes foram utilizados ácido clorídrico (HCl) 37% e cloreto de sódio (NaCl) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.).

As amostras foram recolhidas em frascos coletores de urina, estéreis e descartáveis, também fornecidos pela VWR e as respetivas alíquotas foram armazenadas a -80 °C em tubos de 8 mL fornecidos pela Supelco. Para referência relativamente ao tempo de retenção, foram utilizados padrões individuais com níveis de pureza superior a 98.5 % fornecidos pela Sigma-Aldrich. Por fim, para a determinação dos índices de *Kovats*, foi utilizada uma mistura contendo um conjunto de n-alcenos - C₈-C₂₀ - em hexano, também adquirida à Sigma-Aldrich.

2.2. AMOSTRAGEM

Foram definidos diferentes grupos de estudo, nomeadamente o **grupo de controlo**, composto por 30 indivíduos saudáveis e sem qualquer patologia associada, e o **grupo oncológico** composto por pacientes com cancro do cólon (N=30), cancro do pulmão (N=17) e cancro da mama (N=30). As amostras de urina (primeira urina da manhã) dos indivíduos do grupo oncológico foram colhidas na Unidade de Hemato-Oncologia do Hospital Dr. Nélio Mendonça durante o ano de 2015. A recolha das amostras do grupo de controlo foi efetuada no Serviço de Sangue e Medicina Transfusional do referido hospital do mesmo ano. Os participantes foram instruídos a recolher, no frasco coletor estéril e descartável que lhes foi fornecido, a urina correspondente à primeira emissão da manhã após a rejeição do primeiro jato urinário. Após a recolha, cada amostra foi homogeneizada individualmente, alíquotada e armazenada à temperatura de -80 °C até análise.

A Tabela 1 resume os dados relativos à amostragem utilizada neste estudo. A constituição dos grupos foi feita de forma aleatória e voluntária. Todos os participantes foram devidamente informados dos objetivos deste estudo e consentiram a recolha das amostras referidas através da assinatura do consentimento informado (Anexo 1). A participação no estudo do Serviço de Hematologia do Hospital Dr. Nélio Mendonça e a recolha das amostras foi aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde do mesmo hospital.

Tabela 1. Dados referentes aos grupos em estudo de acordo com o tipo cancro, género, faixa etária do indivíduo e hábitos tabágicos.

Tipo de Amostra	Grupo de Estudo	Número de amostras			Idade (anos)	Fumador
		Masculino	Feminino	Total		
Urina	Controlo	14	16	30	18-78	6
	Cancro do cólon	16	14	30	45-83	4
	Cancro do pulmão	11	6	17	46-80	0*
	Cancro da mama	0	30	30	38-83	5

*Todos os 17 sujeitos são ex-fumadores.

2.3. METODOLOGIA EXTRATIVA – NTME

A extração dos metabolitos voláteis da urina dos indivíduos dos diferentes grupos foi realizada recorrendo a uma técnica extrativa inovadora para este tipo de amostra biológica, a NTME (Figura 14).

Por forma a maximizar a eficiência de extração foram otimizados diferentes parâmetros experimentais, com influência no processo extrativo, tendo em conta as características da urina e ainda trabalhos anteriores publicados com outras técnicas ou amostras biológicas [5, 72]. Deste modo, foram otimizados (i) o tipo de sorvente - (DVB/Car1000/CarX, PDMS, Car1000/PDMS e DVB/Car1000/PDMS), (ii) o pH da amostra (ácido, básico e neutro), (iii) a temperatura de extração (dos 30 aos 60 °C), (iv) a força iónica (entre 0-30 % de NaCl, m/v) (v) volume de *headspace* da amostra (dos 10 aos 50 mL), (vi) o tempo de equilíbrio (5-60 min), (vii) a agitação da amostra (800 rpm) e (viii) o volume de amostra usado (2-8 mL).

As melhores condições experimentais foram definidas por recurso a um **procedimento univariado**, onde os diferentes parâmetros já descritos foram avaliados individualmente. Neste

procedimento, todas as condições experimentais foram mantidas constantes, exceto a que se encontrava em estudo.

É importante referir que para a otimização do processo extrativo foi utilizada uma amostra real de urina de um indivíduo do grupo de controlo.



Figura 14. Exemplo de uma NTD e respetivo material para extração.

Neste projeto foi ainda avaliada a estabilidade dos compostos extraídos pelas NTDs ao fim de 2, 4, 6, 12, 24, 48 e 72 horas de extração. Todas as extrações foram efetuadas em duplicado.

2.3.1. PROCEDIMENTO PARA A EXTRAÇÃO DOS VOMs DA URINA POR NTME

Para a extração dos VOMs das amostras de urina adaptou-se o método descrito por Mieth *et al.* [57] para o ar exalado. Deste modo, após prévia otimização, utilizaram-se alíquotas de 4 mL de amostra em tubos de 20 mL aos quais foram adicionados 500 μL de ácido clorídrico (HCl) 5 mol/dm^3 para acidificar a amostra ($\text{pH}= 2$). Com o objetivo de promover o efeito *salting-out* e facilitar a passagem dos VOMs da amostra para o *headspace*, adicionou-se ainda 20 % de NaCl (m/v). De seguida, selaram-se os tubos, deixando-os em equilíbrio durante 40 min a uma temperatura de 50 ± 1 °C. De seguida, introduziu-se uma agulha NTD previamente conectada a uma seringa descartável de 1 mL (Figura 14) no *headspace* do tubo, e de forma bidirecional, fez-se passar 30 mL da fase de vapor presente no tubo a uma velocidade média de 10 ± 2 mL min^{-1} , utilizando para esse efeito a seringa (Figura 14) acoplada à agulha. Após a passagem do referido volume, retirou-se a agulha do tubo e da seringa, selando ambas as extremidades com tampas PTFE. Por fim, a agulha foi colocada

no injetor do cromatógrafo de fase gasosa a uma temperatura de 250 °C, durante 30 segundos, para a dessorção térmica dos VOMs.

É importante referir que antes da primeira extração do dia procedeu-se à ativação e condicionamento dos sorventes, colocando as agulhas num condicionador a 250 °C, sob fluxo constante de hélio (Pureza 5.0, *Air Liquid*, Portugal) a uma pressão constante de 1 bar, durante 30 min.

2.4. CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR GC-MS

Após a dessorção dos VOMs, estes são arrastados pelo gás de arraste (He) até a coluna cromatográfica para a sua separação, identificação e análise por GC-MS (cromatógrafo Agilent 6890N com detetor quadrupolo Agilent 5975, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.UA.) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida – BP20 (60 m de comprimento × 0.25 mm de diâmetro interno × 0.25µm de espessura de filme, SGE, Dortmund, Alemanha). As injeções foram efetuadas em modo “*splitless*”, sob fluxo constante de hélio de 1 mL/min durante toda a corrida. O tempo total de corrida foi de 104,4 min, tendo sido usado o seguinte gradiente de temperatura que consta na Tabela 2.

Tabela 2. Gradiente de temperaturas utilizado nas análises por GC-MS.

Gradiente (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
Início	45	2
0,7	60	1
1	110	1
3	150	1
15	220	10

O espectrómetro de massas operou em modo de ionização por impacto de eletrões (EI), com uma energia de ionização constante de 70 eV. A aquisição dos dados foi realizada em modo de varrimento (gama de massas m/z 35 – 300; seis varrimentos por segundo). Os cromatogramas e os respetivos espectros obtidos foram armazenados e analisados através do programa *Enhanced ChemStation* para GC-MS (Agilent).

Os VOMs foram identificados por comparação do espectro de massas obtido para cada composto com os espectros de massa da base de dados do “*National Institute of Standards and Technology*” (NIST) MS 05 (Gaithersburg, MD, E.U.A.). É importante referir que nesta comparação se definiu um grau de similaridade maior ou igual a 75% para a identificação dos compostos. Sempre que possível, efetuou-se a comparação dos espectros dos picos obtidos nas amostras com o respetivo padrão puro analisado nas mesmas condições. A identificação dos VOMs incluiu ainda a determinação do Índice de *Kovats* experimental de cada composto, usando para tal uma série de *n*-alcanos de C₈-C₂₀. Uma vez mais, os valores obtidos foram comparados, quando possível, com os valores reportados na literatura [96, 97], para os mesmos compostos e em colunas com características similares à usada neste trabalho. As áreas dos picos obtidos, expressas em unidades arbitrárias (a.u.), foram usadas para estimar o teor relativo de cada VOM identificado.

Para fins semi-quantitativos, cada amostra foi injetada em duplicado, e as áreas dos picos cromatográficos foram determinadas utilizando fragmentos iónicos de quantificação específicos para cada composto, nomeadamente o ião base do pico (*m/z* com 100% de intensidade) e ainda outros fragmentos iónicos característicos para cada molécula ou família química.

2.5. ANÁLISE MULTIVARIADA

Com o objetivo de determinar as potenciais diferenças entre os grupos de estudo (oncológicos e controlo) foi aplicada a análise estatística multivariada, nomeadamente o PLS-DA, utilizando o programa *Unscrambler X 10.4 2016* (CAMO, Oslo, Noruega). A principal função do PLS-DA foi reduzir a dimensão da matriz de dados, por eliminação das variáveis redundantes. Esta redução permitirá determinar o conjunto de voláteis, que melhor definem a separação dos diferentes conjuntos, os grupos de estudo. Para isso, procedeu-se inicialmente à normalização das variáveis de forma a obter-se uma distribuição homogénea.

A aplicabilidade do modelo foi avaliada através do método de classificação SIMCA. Este método permitiu identificar modelos individuais para os grupos obtidos pela análise em PLS-DA e desta forma prever, para novas amostras o grupo a que pertencerá. Assim, foi realizado inicialmente um PLS-DA (de acordo com a estrutura de dados disponível) a todo o conjunto de dados, a fim de identificar os grupos de observações. Em seguida, foram criados modelos individuais para cada grupo. Por fim, um set de amostras independentes às utilizadas para a determinação dos modelos,

foram introduzidas e classificadas tendo em consideração cada um dos modelos previamente estabelecidos em PLS-DA. Para este modelo de classificação, as amostras analisadas foram divididas em dois grupos: o grupo de validação, contendo cerca de 60% dos casos e o grupo de aplicação, contendo 40% do total de amostras analisadas.

CAPÍTULO III.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS *NTDS* PARA A EXTRAÇÃO DE VOMS

Num processo analítico a etapa de otimização é fundamental para a seleção/definição dos parâmetros experimentais que tem influência na eficiência do processo extrativo. Este passo permitirá ao investigador melhorar a eficiência do método, tendo em conta a natureza de amostra e a finalidade da extração. O tipo de otimização permitirá ao investigador delinear o procedimento a seguir, bem como o número de ensaios e tempo necessários para a determinação das melhores variáveis. Neste trabalho foram considerados e avaliados oito parâmetros experimentais, alguns relacionados diretamente com a matriz (volume de amostra, pH do meio, força iónica (% NaCl) e temperatura), e outros mais relacionados à metodologia extrativa, nomeadamente o tipo de sorvente, o volume do *headspace*, o tempo de equilíbrio e a agitação. A otimização foi efetuada tendo em consideração trabalhos anteriores envolvendo a extração de metabolitos voláteis presentes em matrizes biológicas [5, 71, 72, 98].

Muito utilizada por diversos investigadores, e reportada em diversos trabalhos científicos [5, 59, 99], a otimização univariável (também conhecida por unifatorial) é uma abordagem muito usada na otimização de um processo extrativo, na qual os parâmetros experimentais em estudo são otimizados sequencialmente, um de cada vez, tomando como independente as relações entre parâmetros. No entanto, quando não estruturada, a otimização univariável pode apresentar algumas desvantagens, como o número elevado de análises e ainda a não interação entre o parâmetros extrativos a serem otimizados [100, 101].

3.1.1. AVALIAÇÃO DO TIPO DE SORVENTE

A seleção do sorvente mais adequado para os analitos alvo é de primordial importância para uma extração eficiente. Neste contexto avaliou-se a eficiência de extração de diferentes sorventes, Car1000/PDMS, PDMS/CarX/Car1000, DVB/Car1000/PDMS, e DVB/Car1000/CarX, disponíveis comercialmente. A Figura 15 mostra os resultados obtidos para os diferentes sorventes ensaiados. Assim, verificamos que o melhor resultado foi observado com o sorvente DVB/Car1000/CarX, quer em termos de área total, quer em número de metabolitos extraídos e identificados, significativamente superiores aos obtidos com os restantes sorventes testados (Figura 15). Este facto prende-se com a natureza diferenciada dos sorventes utilizados conferindo-lhe capacidade extrativa para uma larga

gama de compostos voláteis. Estes resultados são concordantes com os obtidos por outros investigadores, como Trefz *et al.* [71] que mostraram a existência de uma boa resposta desta combinação de sorventes para a extração de VOMs do ar exalado.

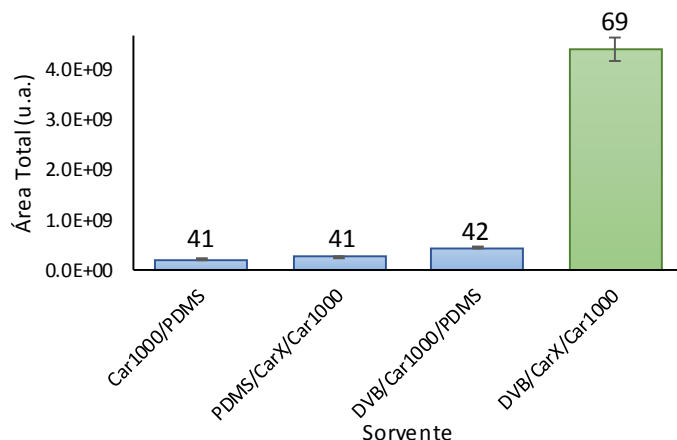


Figura 15. Avaliação da influência da natureza do sorvente na eficiência de extração dos metabolitos voláteis presentes na urina (o número de metabolitos extraídos encontra-se indicados no topo de cada barra).

3.1.2. AVALIAÇÃO DO pH DA AMOSTRA

Relativamente ao pH, estudos anteriores mostraram que os metabolitos voláteis presentes na urina possuem na sua maioria um carácter ácido [4, 5, 102]. Deste modo, a eficiência da extração será tanto maior se os metabolitos estiverem na sua forma protonada. Por outro lado, diversos compostos do metabolismo são eliminados através da urina em formas conjugadas, muitas caracterizadas pela sua baixa volatilidade e ainda pela natureza hidrofílica [98, 103]. Em 2012, Rocha *et al.* [102] demonstraram que o número de metabolitos voláteis, presentes na urina, bem como a respetiva área associada, é mais elevado em meio ácido. No presente trabalho verificamos que acidificação da urina corresponde a um aumento da eficiência de extração dos metabolitos voláteis quer em termos de número de compostos quer em termos de área total obtida (Figura 16).

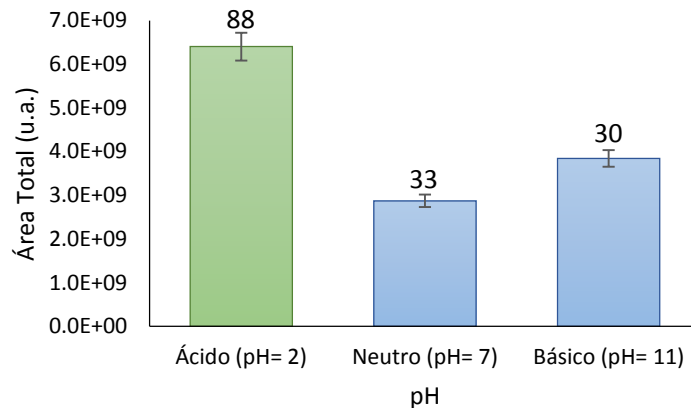


Figura 16. Avaliação da influência do pH da urina na eficiência de extração dos metabolitos voláteis (o número de metabolitos extraídos encontra-se indicados no topo de cada barra).

Este facto está de acordo com resultados anteriormente descritos [98, 102], devendo-se sobretudo à natureza dos compostos presentes nesta amostra biológica que, estando na forma protonada, difundem mais facilmente da amostra para o *headspace* da mesma. É importante referir que todos os metabolitos identificados na amostra básica (pH =11) e neutra (pH= 7) foram encontrados na amostra de urina acidificada (pH= 2), mas com maior resposta nesta última. A Figura 17 mostra a variação de alguns metabolitos em função do pH da urina. Verificamos que à exceção da acetona, todos os outros metabolitos pertencentes a diferentes famílias químicas (hidrocarbonetos, cetonas, compostos sulfurados) aumentam a sua resposta em meio ácido.

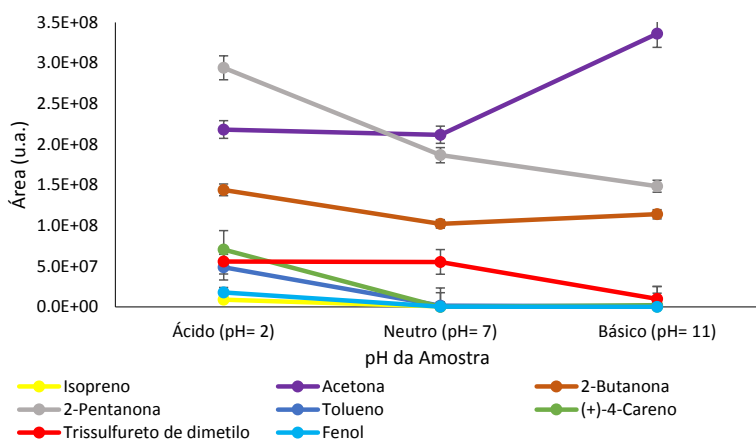


Figura 17. Avaliação do comportamento de alguns metabolitos voláteis presentes na urina em função do pH.

Considerando os resultados obtidos para as diferentes condições de pH da amostra decidiu-se realizar as extrações, nos ensaios subsequentes, com a urina acidificada a pH= 2.

3.1.3. AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO

A temperatura à qual se realiza a extração dos VOMs é outro parâmetro importante para maximizar a eficiência de extração. De acordo com Pawliszyn [104], o aumento da temperatura facilita a transferência de massa dos compostos presentes na amostra líquida para a fase de vapor do *headspace*. Do mesmo modo, o aumento da temperatura pode reduzir o tempo de extração, uma vez que o equilíbrio entre fases é atingido mais rapidamente devido o aumento do coeficiente de difusão e à diminuição da constante de distribuição [104, 105]. Por outro lado, temperaturas elevadas podem resultar na degradação térmica e/ou isomerização dos metabolitos presentes na amostra [5, 98, 105], pelo que a seleção da temperatura ideal deve refletir um compromisso entre todas estas condições.

Ao analisarmos os resultados obtidos (Figura 18), verificamos um aumento significativo do número de compostos extraídos e da área total obtida quando a temperatura da amostra aumenta dos 40 °C para os 50 °C mantendo-se estes valores para um aumento da temperatura dos 50 para os 60 °C. Dos 30 para os 40 °C o aumento da área total e do número de compostos extraídos é muito pouco significativo.

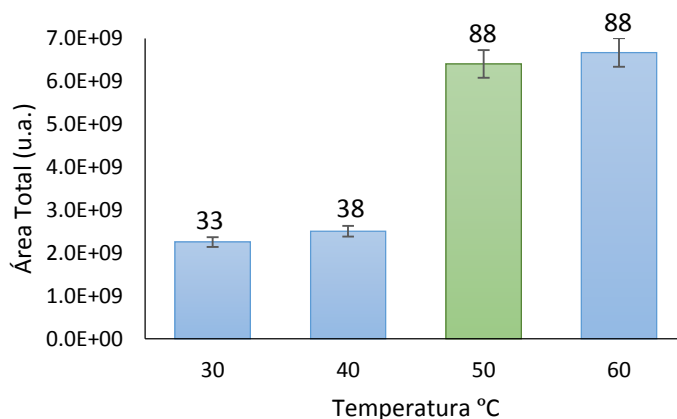


Figura 18. Avaliação da influência da temperatura na eficiência de extração dos metabolitos voláteis presentes na urina (o número de metabolitos extraídos encontra-se indicados no topo de cada barra).

Assim podemos aferir que, temperaturas abaixo dos 50 °C são suficientes para que todos os metabolitos voláteis presentes na amostra líquida migrem para a fase de vapor do *headspace*. Verificamos ainda que o número de metabolitos identificados por aumento da temperatura dos 50 para os 60 °C é idêntico, diferenciando-se apenas pela área total obtida, cuja diferença está dentro do erro analítico (< 15 %).

A Figura 19 mostra o comportamento de alguns metabolitos voláteis de diferentes famílias químicas em função da variação da temperatura da amostra. Verificamos que de facto as variações, em termos de área, entre os 30-40 °C e entre os 50-60 °C não são significativas, uma vez que são inferiores ao erro analítico, contrariamente ao aumento significativo verificado dos 40 para os 50 °C.

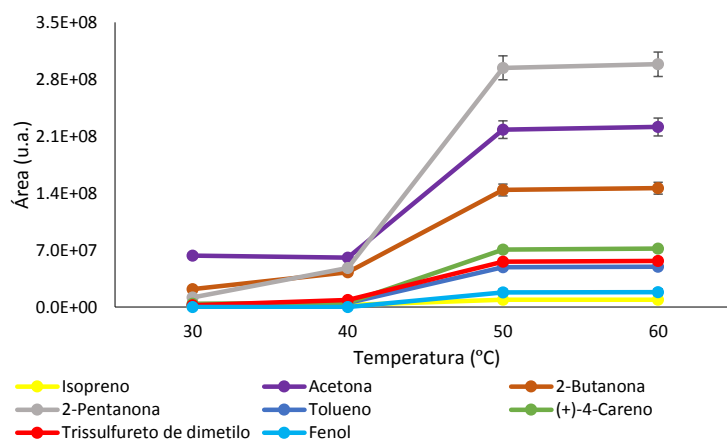


Figura 19. Evolução de alguns metabolitos presentes na urina em função da variação da temperatura.

Tendo em conta trabalhos anteriores na extração de voláteis presentes em urina [4, 5] e o facto de poder ocorrer degradação térmica e isomerização de alguns metabolitos quando a amostra é sujeita a temperaturas muito elevadas, nomeadamente os de maior labilidade térmica, optou-se por utilizar uma temperatura de 50 °C nos ensaios futuros.

3.1.4. AVALIAÇÃO DA FORÇA IÓNICA

A adição de sal (NaCl) à urina permite que haja um aumento da força iónica do meio, ou seja, a presença de sal potencia o efeito “*salting out*” durante o processo extrativo [98, 104]. Deste modo as moléculas de água presentes na amostra rodeiam os iões (Na⁺ e Cl⁻) do sal (NaCl), formando

esferas de hidratação. Como resultado, a quantidade de água disponível como solvente para os metabolitos de interesse é menor potenciando o aumento da difusão destes para a fase de vapor [104]. Por outro lado, o excesso de sal pode resultar num efeito contrário ao anteriormente descrito. Este fenómeno ocorre devido a interações electroestáticas entre os metabolitos de interesse e os iões do sal adicionado à amostra, que se tornam significativas pelo excesso de sal [104].

De facto, ao analisarmos os resultados obtidos, verificamos que a presença de sal na amostra contribui para o aumento do número de compostos extraídos/identificados e para o aumento da área total obtida, sendo o melhor resultado obtido com 20% de NaCl (m/v) (Figura 20). Para concentrações superiores (30% de NaCl; m/v) existe um ligeiro decréscimo da área total obtida, o que pode ser devido às interações electroestáticas entre os metabolitos descritas anteriormente.

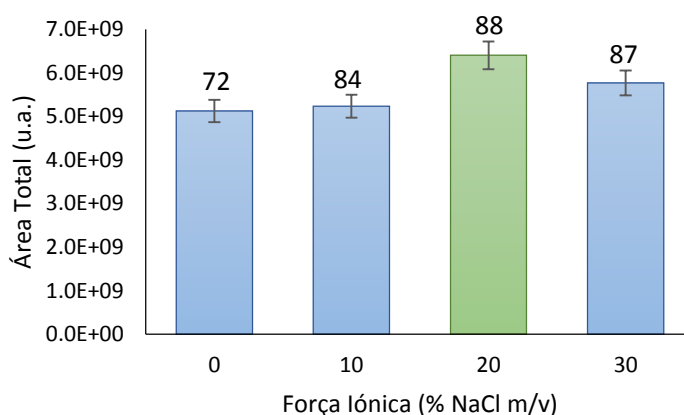


Figura 20. Avaliação da influência da força iónica na eficiência de extração dos metabolitos voláteis presentes na urina (o número de metabolitos extraídos encontra-se indicados no topo de cada barra)

A análise de alguns metabolitos representativos, porém, mostra-nos que nem todos os metabolitos diminuem a sua resposta com o aumento da força iónica, nomeadamente o trissulfureto de dimetilo e o isopreno. Para estes compostos a melhor eficiência de extração é conseguida com 30% de NaCl (m/v). Por outro lado, enquanto que metabolitos como o tolueno e o (+)-4-careno não alteram significativamente a sua resposta, entre 20 e 30% de NaCl (m/v), a acetona e a 2-butanona tem claramente uma melhor resposta a 20% NaCl. Atendendo aos resultados obtidos cumulativamente na Figura 20 e 21, escolheu-se usar 20% NaCl nos ensaios posteriores.

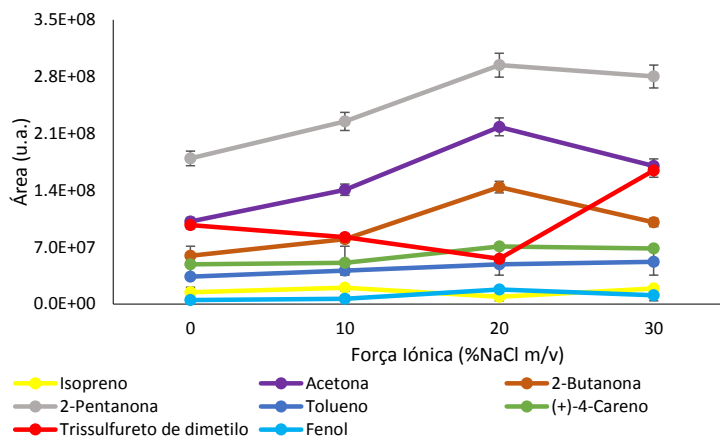


Figura 21. Avaliação do comportamento de alguns metabolitos extraídos da urina em função da força iônica do meio.

3.1.5. AVALIAÇÃO DO VOLUME DE *HEADSPACE* DA AMOSTRAGEM

Sendo a NTME uma técnica exaustiva, o volume de *headspace* da amostra que se faz passar pela fase adsorvente da agulha é proporcional à resposta obtida. Deste modo, ao aumentarmos o volume de *headspace* da amostra, aumentaremos a resposta correspondente. Na avaliação deste parâmetro deve ter-se em consideração o tempo de equilíbrio, o fluxo de amostragem, e ainda o ponto de rotura do sorvente. Para análises de ar exalado este parâmetro já foi avaliado por Trefz *et al.* [72], que demonstraram que a resposta extrativa de um sorvente NTD é tanto maior quanto maior o volume de *headspace* de amostra utilizado de acordo com o metabolito tido como modelo, nomeadamente o isopreno, o pentano, o tolueno e o pentanal.

Do mesmo modo, estes autores demonstraram que usando agulhas com três sorventes diferentes (as mesmas utilizadas neste trabalho) não se atingia o ponto de rotura do sorvente na extração de metabolitos voláteis do ar exalado, mantendo-se a resposta linear até um volume de 60 mL [72]. No presente estudo, a análise dos resultados obtidos mostra alguma similaridade com os resultados obtidos por Trefz *et al.* [72] para o ar exalado. Verifica-se um aumento significativo no número e na área total dos metabolitos extraídos entre os 10 e 30 mL de *headspace* (Figura 22). Entre os 30 e os 40 mL, ocorre um ligeiro aumento em termos de área total e número de metabolitos identificados, enquanto que com 50 mL de *headspace* verifica-se uma diminuição da área total dos metabolitos extraídos mantendo-se praticamente constante o número de metabolitos identificados

(diminuição de 2 compostos). Este facto deve-se sobretudo a uma possível diluição devido ao número de passagens da fase de vapor pelo dispositivo NTD + seringa.

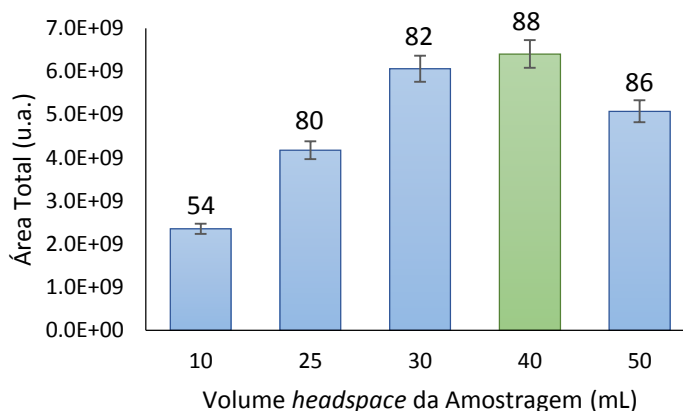


Figura 22. Avaliação da influência do volume de *headspace* da amostra na eficiência de extração dos metabolitos voláteis presentes na urina (o número de metabolitos extraídos encontra-se indicados no topo de cada barra).

Em consonância com as áreas totais (Figura 22), a análise detalhada de alguns metabolitos mostra que a resposta obtida (Figura 23) aumenta com o aumento do volume de *headspace* nomeadamente até aos 40 mL. A acetona, porém, possui um comportamento distinto dos restantes metabolitos pois a resposta obtida decresce para volumes de *headspace* entre 25 mL e 40 mL, voltando a aumentar ligeiramente entre 40 e 50 mL. Este fenómeno irregular poderá resultar da extrema volatilidade da acetona, afetando a eficiência de adsorção deste composto no sorvente.

Tendo por base os resultados obtidos e por forma a minimizar o tempo de extração e aumentar o tempo de vida dos sorventes, seleccionou-se 40 mL como volume de *headspace* a usar nos ensaios subsequentes.

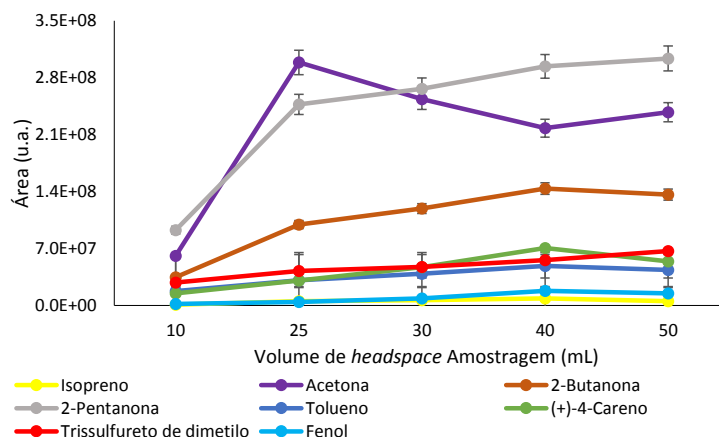


Figura 23. Avaliação da influência do volume de *headspace* na eficiência de extração de alguns metabolitos.

3.1.6. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE EQUILÍBRIO

O tempo de equilíbrio da amostra, a uma determinada temperatura, facilita a difusão eficaz dos metabolitos para a fase de vapor (que compõe o *headspace*), permitindo que se atinja o equilíbrio mais rapidamente. A extração da fase de vapor durante este tempo de equilíbrio permite inferir a presença e concentração relativa de um dado composto na amostra em estudo. A análise dos resultados obtidos mostra uma resposta quase constante da área total e do número de metabolitos a partir dos 40 min de equilíbrio (Figura 24).

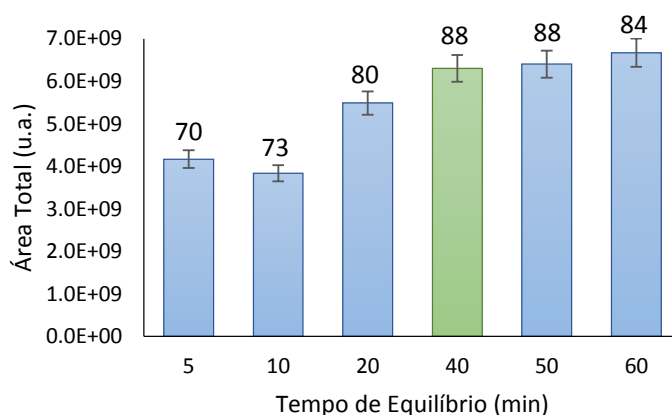


Figura 24. Avaliação da influência do tempo de equilíbrio na eficiência de extração de metabolitos voláteis presentes na urina (o número de metabolitos extraídos encontra-se indicados no topo de cada barra).

Apesar de aos 60 min de equilíbrio a resposta em termos de área total aumentar ligeiramente, o número de compostos diminui de 88 para 84. Este facto pode estar relacionado com potenciais degradações dos metabolitos presentes na amostra, resultantes do tempo prolongado sob aquecimento e agitação.

Numa análise mais detalhada (Figura 25), verificamos um comportamento irregular nas respostas dos VOMs selecionados. Assim, alguns metabolitos como o (+)-4-careno e o trissulfureto de dimetilo, apresentam um aumento de área até aos 60 min de equilíbrio, sendo este aumento muito pequeno para o tolueno, fenol e isopreno para os mesmos tempos de equilíbrio. Outros metabolitos como a acetona e a 2-butanona registam um aumento da área total até aos 40 min de equilíbrio e uma diminuição a partir deste período. Por fim, a 2-pentanona apresenta flutuações consideráveis, atingindo um valor máximo aos 30 min de equilíbrio.

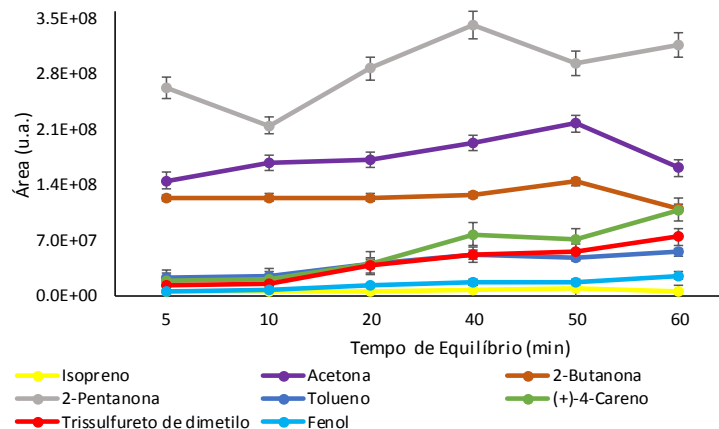


Figura 25. Avaliação da influência do tempo de equilíbrio na eficiência de extração de alguns metabolitos presentes na urina.

3.1.7. AVALIAÇÃO DA AGITAÇÃO DA AMOSTRA

A agitação constante contribui para que os metabolitos presentes na amostra e na fase de vapor atinjam mais rapidamente o equilíbrio [104], pois uma agitação eficaz facilita, para além da homogeneização da amostra, a transferência de massa dos metabolitos da amostra para a fase de vapor [58]. Com base nos resultados obtidos, verificamos que uma agitação constante a 800 rpm contribui para uma melhoria significativa na eficiência de extração expressa no aumento do número de metabolitos extraídos e no aumento da sua área total. (Figura 26).

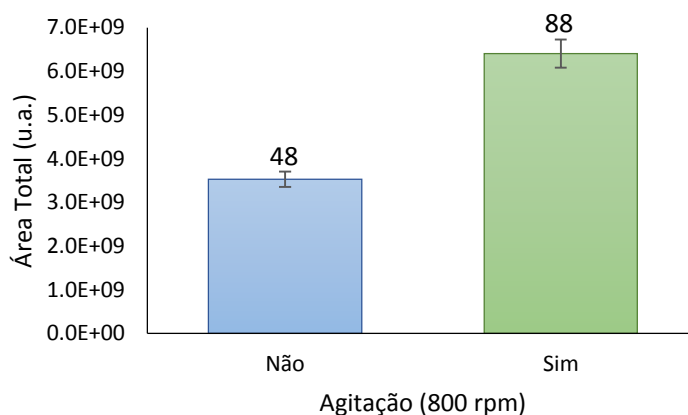


Figura 26. Avaliação da influência da agitação na eficiência de extração dos metabolitos voláteis presentes na urina (o número de metabolitos extraídos encontra-se indicados no topo de cada barra).

A análise de alguns metabolitos específicos mostra que a agitação permite a obtenção de áreas totais maiores para todos os exemplos considerados (Figura 27).

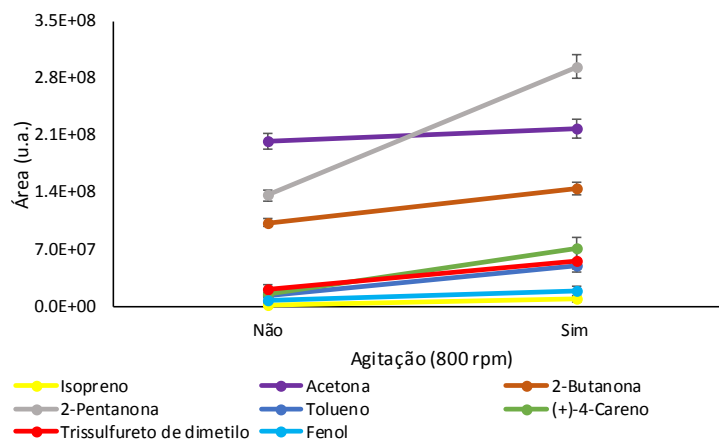


Figura 27. Avaliação da influência da agitação na eficiência de extração de alguns metabolitos da urina.

3.1.8. AVALIAÇÃO DO VOLUME DE AMOSTRA

A avaliação do volume de amostra (2, 4 e 8 mL) revela um aumento pouco significativo das áreas totais em função do volume de amostra, enquanto o número de VOMs se mantém constante entre 4 e 8 mL (Figura 28)

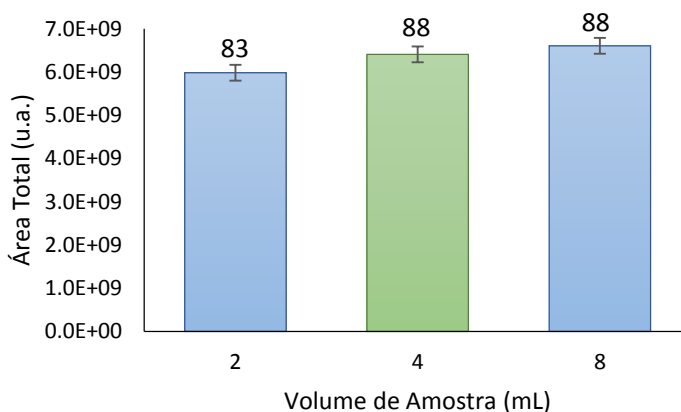


Figura 28. Avaliação da influência do volume de amostra na eficiência de extração de alguns metabolitos voláteis presentes na urina (o número de metabolitos extraídos encontra-se indicados no topo de cada barra).

Um pouco à semelhança do que se verificou com a otimização do tempo de equilíbrio, a análise da influência do volume de amostra na eficiência de extração de alguns VOMs específicos mostra variações bastante heterogêneas. Observa-se assim (Figura 29) que alguns metabolitos, como o isopreno, fenol e tolueno, aumentam ligeiramente a sua resposta com o aumento do volume da amostra, sendo esta evolução mais acentuada para o trissulfureto de dimetilo e 2-pentanona. Com comportamentos exatamente opostos temos a 2-butanona e o (+)-4-careno com diminuições pouco acentuadas de 4 para 8 mL de amostra, sendo esta diminuição muito pronunciada para a acetona.

Tendo em conta o comportamento destes metabolitos e a influência do volume de amostra no perfil volátil da urina, e de modo a reduzir o volume de resíduo a ser descartado após cada extração, optou-se por utilizar 4 mL de amostra nos ensaios subsequentes.

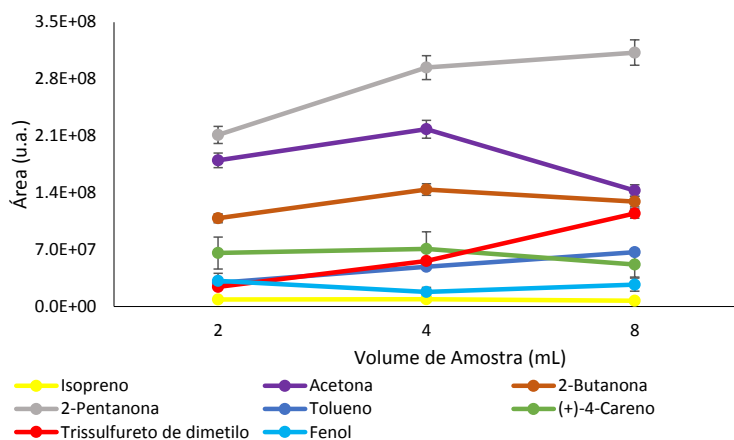


Figura 29. Avaliação do volume de amostra na eficiência de extração de alguns metabolitos presentes na urina

A Tabela 3 sumariza as melhores condições extrativas obtidas para a extração de VOMs de urina usando como técnica extrativa a NTME.

Tabela 3. Parâmetros otimizados para a extração de metabolitos voláteis da urina por NTME.

Parâmetros otimizados NTME	
Sorvente	DVB/Car1000/CarX
pH	2
Tempo de Equilíbrio	40 min
Temperatura	50 °C
Volume de <i>headspace</i>	40 mL
Força iónica (% NaCl; m/v)	20 % (m/v)
Agitação	800 rpm
Volume da Amostra	4 mL

3.1.9. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS VOMS DURANTE O ARMAZENAMENTO

A estabilidade dos metabolitos extraídos no sorvente em função do tempo de armazenamento (0-72 h) foi avaliada. Este parâmetro é particularmente útil quando necessitamos de recolher amostras fora do laboratório ou mesmo fora da RAM, avaliando a possibilidade de proceder à amostragem *in situ* com envio das NTDs para posterior análise. Neste estudo a avaliação da estabilidade dos VOMs no sorvente foi efetuada utilizando amostras de urina de um indivíduo saudável. Dos resultados obtidos (Figura 30), verificamos que durante as primeiras 12 horas não existem diferenças em termos de áreas totais permanecendo praticamente constantes. Após 24 horas, a estabilidade dos metabolitos, avaliada em termos de áreas totais obtidas, decresce ligeiramente, verificando-se uma diminuição da área total de 10 % relativamente ao período inicial (0 horas, extrair e analisar logo de seguida). O decréscimo após 48 e 72 horas de extração é de cerca de 15,0 % relativamente ao período inicial. A diminuição em 15 % da área total obtida ao fim de 72 horas de extração revela uma estabilidade elevada indicador de que a análise dos VOMs pode ser realizada até 3 dias após a sua extração.

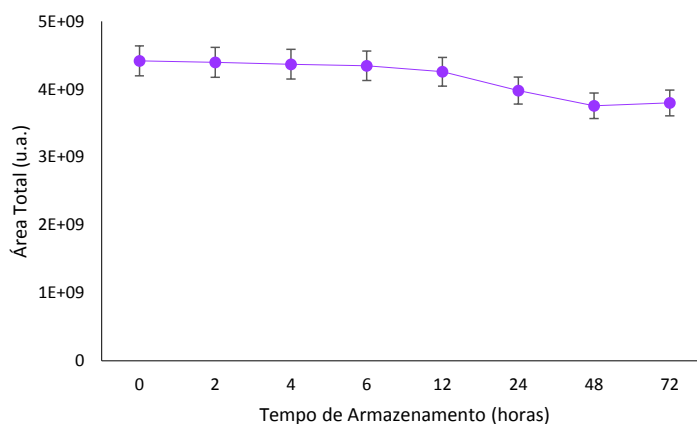


Figura 30. Avaliação da estabilidade dos VOMs após extração em função do tempo. (Nota: Para todas as extrações foram identificados o mesmo número de metabolitos).

De modo a verificar o comportamento de metabolitos individuais, foram selecionados, à semelhança das otimizações anteriores, um conjunto de metabolitos para averiguar o tempo que os mesmos se mantêm estáveis nas NTDs após extração. A Figura 31 resume os resultados obtidos, mostrando a elevada estabilidade dos metabolitos selecionados no sorvente durante o período considerado, uma vez que as áreas totais obtidas se mantêm praticamente constante ao longo das 72

h de armazenamento. Verifica-se um decréscimo nas áreas obtidas para o dissulfureto de dimetilo, e um decréscimo pouco significativo para o trissulfureto de dimetilo e 2-butanona (Figura 31). Os resultados obtidos garantem a estabilidade dos compostos extraídos mesmo após 72 h de extração, o que é extremamente vantajoso quando estamos a lidar com amostras que tem de ser colhidas em ambiente hospitalar e transportadas para o laboratório para serem analisadas.

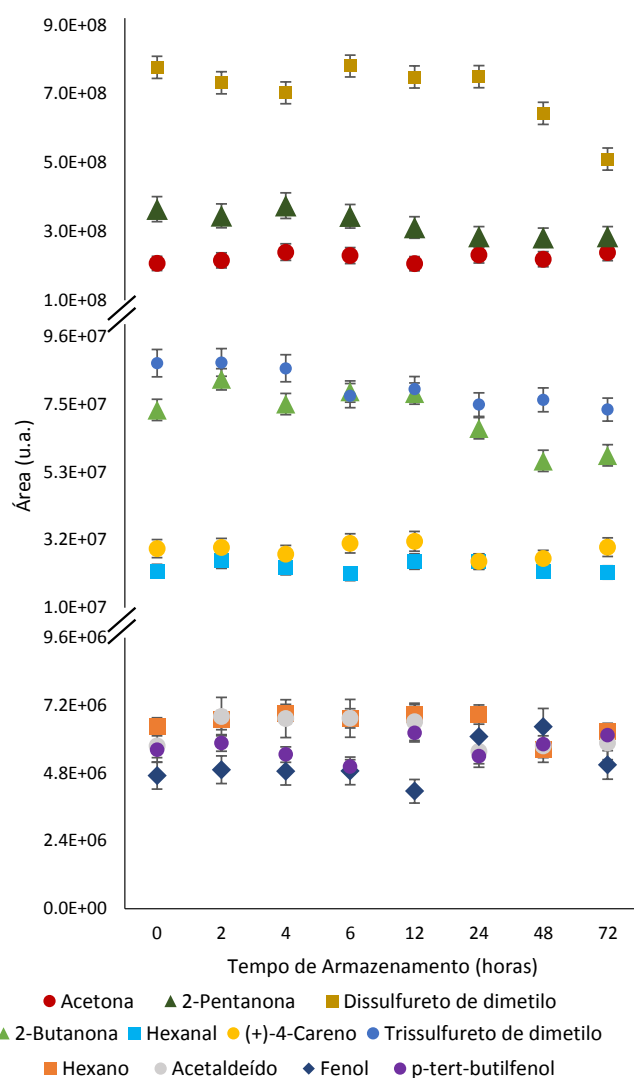


Figura 31. Avaliação da estabilidade de alguns metabolitos em função do tempo de armazenamento após extração.

3.2. IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES VOLÁTEIS DO CANCRO DO CÓLON, PULMÃO E MAMA

O perfil volatômico da urina de pacientes com cancro do cólon, cancro do pulmão e cancro da mama, e dos indivíduos do grupo de controlo foi estabelecido por recurso à NTME, usando os parâmetros otimizados, seguida de cromatografia de alta resolução, GC-MS.

Desta forma, os metabolitos voláteis de 30 amostras de urina de indivíduos saudáveis (sem qualquer tipo de cancro - controlo) e 77 amostras de urina de pacientes oncológicos (30 com cancro do cólon, 17 com cancro do pulmão e 30 com cancro da mama) foram extraídos e analisados por NTME/GC-MS, de acordo com o descrito na secção Experimental. A Figura 32 mostra os cromatogramas típicos do perfil volátil da urina de indivíduos de cada um dos grupos em estudo. A análise dos cromatogramas obtidos permitiu a identificação de 259 compostos na composição volátil das urinas dos indivíduos dos diferentes grupos oncológicos e do grupo de controlo. A Tabela 4 resume o número de metabolitos identificados para cada um dos grupos, bem como os metabolitos com frequência de ocorrência superior a 90% (Anexo II). Como se pode verificar, o número de VOMs em cada um dos grupos com uma frequência de ocorrência superior a 90% é consideravelmente inferior ao número de VOMs identificados pois resulta da variabilidade entre indivíduos decorrente de diversos fatores, como o estilo de vida ou os hábitos alimentares, entre outros [4, 5].

Tabela 4. Número de amostras analisadas, número de metabolitos voláteis identificados e número de metabolitos identificados com frequência de ocorrência $\geq 90\%$ nas amostras de urina dos diferentes grupos em estudo.

Tipo de Cancro	Nº Amostras Analisadas	VOMs Identificados	VOMs identificados (FO ^a $\geq 90\%$)
Controlo	30	237	80
Cancro do cólon	30	248	91
Cancro do pulmão	17	231	87
Cancro da mama	30	255	132

^aFO: Frequência de Ocorrência

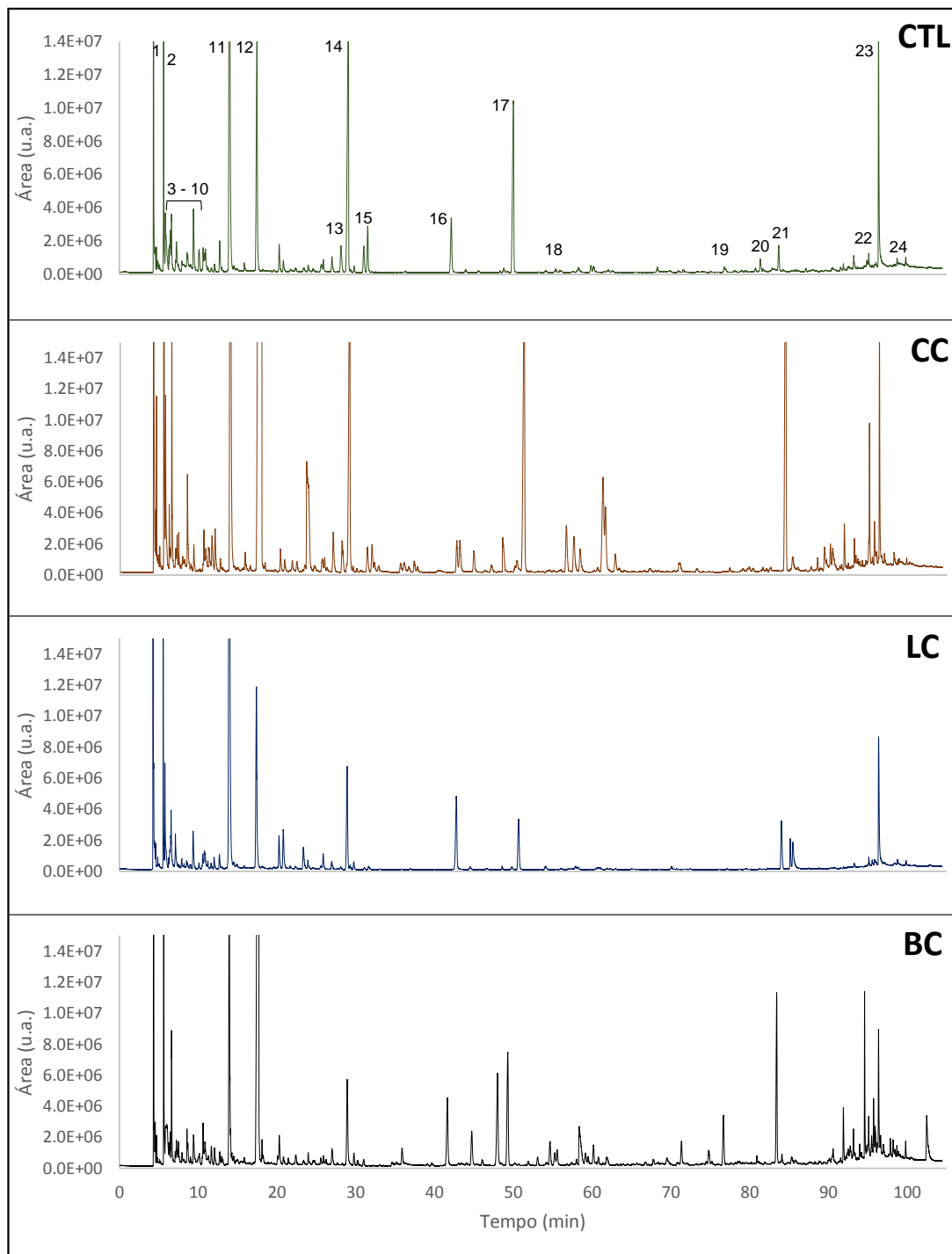


Figura 32. Cromatogramas típicos do perfil volatômico da urina de um indivíduo com cancro do cólon (CC), pulmão (LC) e mama (BC) e do grupo de controlo (CTL). Os números representam os metabolitos identificados (> 1% área relativa média em pelo menos um grupo de estudo. 1- furano, 2- acetona, 3- 2,2,5,5-Tetramiltetrahidrofurano, 4- 2-metilfurano, 5- acetato de etila, 6- 2-butanona, 7- 2-propanol, 8- etanol, 9- 2-pentanona, 10- 2,4-dimetil-3-pentanona, 11- dissulfureto de dimetilo, 12- 4-heptanona, 13- 2-etil-1,3-dimetilbenzeno, 14- *o*-cimeno, 15- dissulfureto de metil 2-propenil, 16- trissulfureto de dimetilo, 17- *p*-cimeneno, 18- dureno, 19- mentol, 20- 1,2-Dihidro-1,5,8-trimetilnaftaleno, 21- dehidro-ar-ioneno, 22- fenol, 23- 4-metilfenol, 24- 4-etilfenol.

Os metabolitos identificados pertencem a diferentes famílias químicas, nomeadamente ácidos orgânicos, álcoois, aldeídos, cetonas, compostos benzénicos, fenólicos, furânicos naftalénicos, sulfurados e terpénicos (onde de incluem monoterpenos, sesquiterpenos e terpenóides), hidrocarbonetos (onde se incluem os alcanos, alcenos e alcinos) e ésteres. Um número limitado de metabolitos pertencentes a outras famílias químicas que não as descritas foram agrupadas na categoria “Outros”. A Figura 33 mostra a distribuição das diferentes famílias químicas identificadas pelos diferentes grupos em estudo.

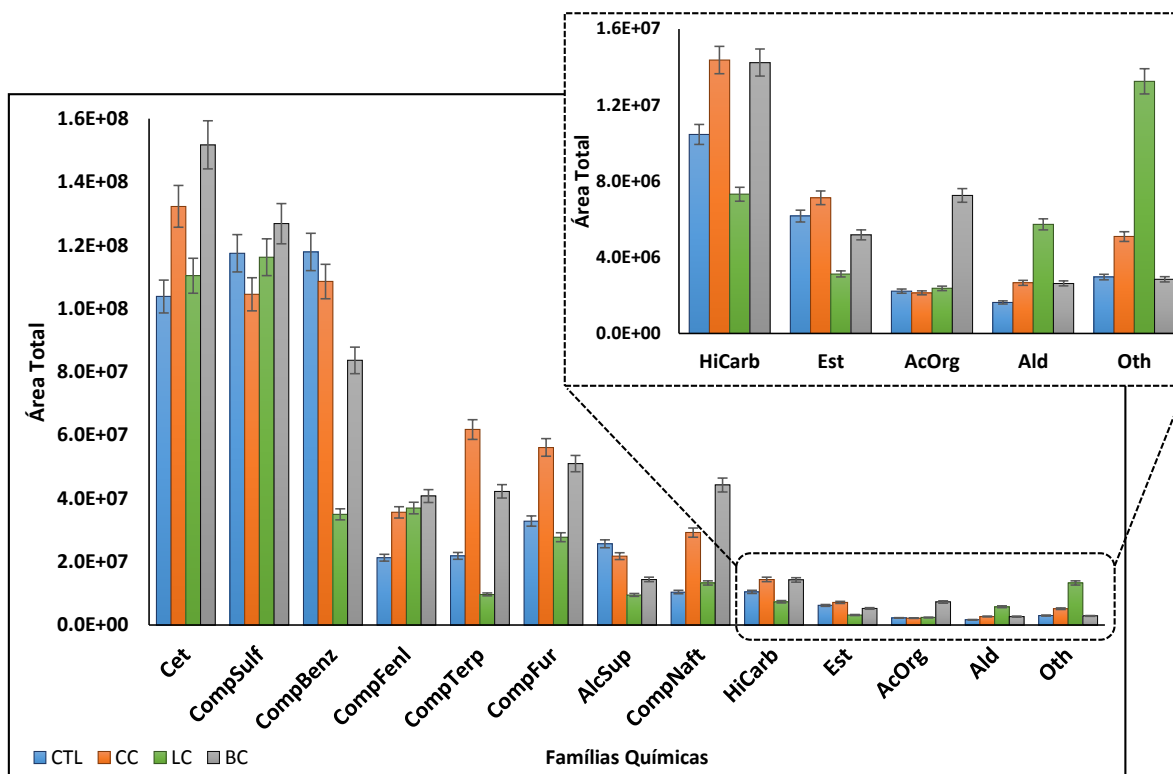


Figura 33. Distribuição das diferentes famílias químicas obtidas para os diferentes grupos em estudo: **CTL** – grupo de controlo, **CC** – cancro do cólon, **LC** – cancro do pulmão e **BC** – cancro da mama. Famílias químicas: **Cet** – Cetonas; **CompSulf** – Compostos sulfurados; **CompBenz** – Compostos benzénicos; **CompFenl** – Compostos fenólicos; **CompTerp** – Compostos terpénicos; **CompFur** – Compostos furânicos; **AlcSup** – Álcoois; **CompNaft** – Compostos naftalénicos; **HiCarb** – Hidrocarbonetos; **Est** – Ésteres; **AcOrg** – Ácidos orgânicos; **Ald** – Aldeídos; **Oth** – Outros.

A análise pormenorizada de cada um dos grupos alvo de estudo mostra-nos, à primeira vista, a existência de diferenças relativamente a expressão em termos de áreas para as diferentes famílias químicas. Este facto prende-se sobretudo com os fenómenos metabólicos que ocorrem nas células normais e cancerígenas que podem contribuir para um aumento ou diminuição de certos metabolitos, para além da interferência dos fatores externos que contribuem para a adição de compostos exógenos ao perfil volátil endógeno dos indivíduos [4, 5]. Deste modo, é preciso estabelecer uma relação entre

os metabolitos identificados e a sua potencial origem endógena. Na atualidade e apesar do elevado número de investigadores que desenvolvem trabalhos na área da volatômica, não é possível associar uma origem a todos os metabolitos voláteis, pois para muitos casos ela ainda não é conhecida e para outros casos, o mesmo metabolito pode ser obtido de diferentes formas, incluindo contaminação do exterior, tornando muito difícil elucidar a sua via metabólica de forma completa [5, 106, 107].

Uma das famílias químicas maioritárias identificadas foram as cetonas com 40 metabolitos identificados que contabilizam em média cerca de 24,7% para a área total da fração volátil da urina. Segundo dados da literatura, esta família química é descrita como uma das mais abundantes no perfil volatômico da urina [5, 108], sendo identificadas como o produto de diferentes vias metabólicas, nomeadamente do metabolismo de carboidratos e de processos de oxidação de lípidos [109].

Os compostos sulfurados são uma outra família química identificada com grande expressão no perfil volatômico da urina (Figura 33) tendo sido identificados 21 metabolitos sendo responsáveis por cerca de 23,5% da área total da fração volátil. De acordo com a literatura, esta família química possui, à semelhança das cetonas, uma elevada expressão no perfil volatômico da urina, sendo a maioria dos seus metabolitos formados pelo metabolismo incompleto da metionina e cisteína através da via de transaminação [110-112]. Na prática, durante a transaminação a metionina e a cisteína são transformadas em metanotiol que por sua vez é facilmente oxidado. Esta oxidação do metanotiol dá então origem a metabolitos voláteis como o o sulfureto de dimetilo, o dissulfureto de dimetilo e o trissulfureto de dimetilo [110-112]. Por outro lado, estes mesmos metabolitos podem ainda ser produzidos por bactérias gram-negativas [113].

Os álcoois identificados (19 metabolitos), correspondem a por cerca de 3,5% da área total. Estes metabolitos podem ter origens diferenciadas, entre as quais a redução do ácido gordo respetivo no trato gastrointestinal [114] a via do piruvato, do citrato ou a glicólise [115]. Do mesmo modo, o metabolismo de microrganismos, como as bactérias, pode também ser uma fonte destes metabolitos [116], o que torna a definição da sua origem uma tarefa ainda mais difícil.

Os compostos benzénicos, fenólicos, furânicos e terpénicos podem ser facilmente encontrados em diferentes fontes exógenas como por exemplo os alimentos [59, 117-119]. Por outro lado, muitos metabolitos pertencentes a estas famílias químicas estão descritos como endógenos sendo produzidos em diferentes processos metabólicos do nosso organismo [120]. Relativamente aos compostos benzénicos verificamos que apresentaram, uma expressão média de cerca de 16,7% da área total da fração volátil da urina com 35 metabolitos identificados. É importante referir que os compostos benzénicos são, muitas vezes, relacionados como provenientes de fontes de

contaminação ambiental, como a poluição do ar e ambiente [108, 121]. Estes compostos são igualmente descritos como constituintes naturais de diferentes tipos de mel (revisto em Cuevas-Glory *et al.* [122]). Relativamente aos compostos fenólicos, estes apresentaram uma média de cerca de 6,8 % das áreas totais, com 12 metabolitos identificados. Hanai *et al.* [123] realizaram um estudo com linhas celulares do cancro do pulmão e urina de ratos portadores da mesma patologia, e conseguiram identificar em ambas as amostras a presença de compostos fenólicos, entre os quais o fenol. Por sua vez, os compostos furânicos foram responsáveis por uma média de cerca de 8,1% das áreas totais e 19 metabolitos identificados. Finalmente, os compostos terpênicos representam em média 6,2 % das áreas totais, com 40 metabolitos identificados.

Segundo Silva *et al.* [4], ainda não foi caracterizada nenhuma via metabólica que possa explicar claramente a origem dos compostos naftalénicos na urina. Alguns investigadores indicam uma relação potencial com o metabolismo dos esteroides, enquanto outros trabalhos mostram que estes compostos podem ser provenientes do ambiente em que o indivíduo está inserido [124]. Neste trabalho a expressão média dos compostos naftalénicos rondou os 4,5% da área total da fração volátil, com 11 metabolitos identificados.

Por sua vez, os hidrocarbonetos são metabolitos de grande interesse em termos de diagnóstico, dado que estão intimamente relacionados com o *stress* oxidativo [125, 126], (Capítulo D). Os alcanos e outros hidrocarbonetos metilados são tipicamente resultado da peroxidação lipídica de ácidos gordos polinsaturados encontrados sobretudo, nas membranas celulares. Metabolitos como o etano e o pentano são indicadores da etapa final da peroxidação lipídica sendo reconhecidos como marcadores desta reação [125]. Por outro lado, hidrocarbonetos insaturados (tipicamente alcenos), são muitas vezes relacionados com a via do ácido mevalónico da síntese do colesterol. Um exemplo típico desta classe de compostos é o isopreno [125-128]. Neste trabalho, os hidrocarbonetos foram responsáveis por uma média de 2,2 % da área total obtida, tendo sido identificados 35 metabolitos nesta família química.

À semelhança dos hidrocarbonetos, os aldeídos também devem ser tidos em atenção uma vez que podem possuir diversas funções importantes no organismo desde a sinalização e proliferação celular, regulação genética, sendo ainda em alguns casos intermediários citotóxicos [125, 129]. A sua produção no organismo é resultado de diferentes processos metabólicos, sendo a conversão de álcoois a sua principal fonte [130]. Outra fonte já reconhecida para a produção destes metabolitos é a redução de hidroperóxido pelo citocromo P450 como um produto secundário da peroxidação lipídica [129, 130]. Neste estudo verificamos que a expressão dos aldeídos, em termos globais é

reduzida, com uma média de 0,7% da área total entre todos os grupos em estudo, com 9 metabolitos identificados.

É ainda importante referir que para além das famílias químicas descritas anteriormente, foram ainda identificados com uma menor expressão os ésteres, com uma média de 1,1% da área total e 3 metabolitos identificados, e os ácidos orgânicos com uma média de 0,7% da área total e 4 metabolitos identificados. Na Figura 33 é possível verificar as variações entre os diferentes grupos em estudo relativamente às famílias químicas identificadas.

De um modo geral, a análise do perfil volatômico da urina revelou-nos um conjunto de desafios, sendo o primeiro deles a necessidade da percepção e identificação da origem dos metabolitos. Tal é imprescindível para que se possa proceder à diferenciação dos compostos tipicamente produzidos pelo organismo daqueles que são absorvidos através da alimentação ou por contaminação ambiental. Porém, como já referido, tal discriminação nem sempre é possível por ausência de dados metabólicos.

Neste trabalho, observamos que a maior variação entre grupos ocorre em termos das áreas totais de cada uma das famílias químicas, uma vez que o número de VOMs identificados em cada uma apresenta uma variação comparativamente menor. Assim, para uma análise melhor e mais eficaz, abordaremos de seguida, os perfis volatômicos de cada um dos grupos de estudo com mais detalhe.

3.2.1. PERFIL VOLATÓMICO URINÁRIO DO GRUPO DE CONTROLO

A análise da composição volátil das urinas dos indivíduos do grupo de controlo mostra uma preponderância de compostos sulfurados, benzénicos e cetonas (17, 33 e 39 metabolitos identificados, respectivamente), os quais perfazem quase dois terços dessa composição (Tabela 5), seguindo-se os compostos furânicos (6,9 %; 18 metabolitos identificados) os álcoois (5,4 %; 16 metabolitos identificados), os terpenos (4,6 %; 38 metabolitos identificados) e os compostos fenólicos (4,5 %; 12 metabolitos identificados).

Tabela 5. Distribuição das diferentes famílias químicas para o grupo de controlo, expressas em termos de áreas totais, áreas relativas e número de metabolitos identificados.

Famílias Químicas	Grupo de Controlo		
	Área Total (u.a. × 10 ⁶)	Área Relativa (%)	Nº VOMs
Ácidos orgânicos	2,2	0,5	4
Álcoois	25,6	5,4	16
Aldeídos	1,6	0,3	8
Cetonas	103,8	21,9	39
Compostos benzénicos	117,9	24,8	33
Compostos fenólicos	21,2	4,5	12
Compostos furânicos	32,8	6,9	18
Compostos naftalénicos	10,4	2,2	10
Compostos sulfurados	117,5	24,8	17
Compostos terpénicos	21,8	4,6	38
Ésteres	6,2	1,3	3
Hidrocarbonetos	10,5	2,2	32
Outros	3,0	0,6	7
Total	474,6	100	237

Em termos de compostos maioritários, o dissulfureto de dimetilo, com 21,2 % da área total dos metabolitos identificados, é o mais abundante, seguindo-se várias cetonas (acetona: 7,8 %, 4-heptanona: 6,4 %, 2-pentanona: 3,6 % e 2-butanona: 1,1 %), os compostos terpénicos *o*-cimeno (6,0%), *p*-cimeneno (4,0 %), o composto benzénico 2-etil-1,3-dimetilbenzeno (3,7 %) e os álcoois etanol (2,4 %) e 2-propanol (1,9 %) (Figura 34).

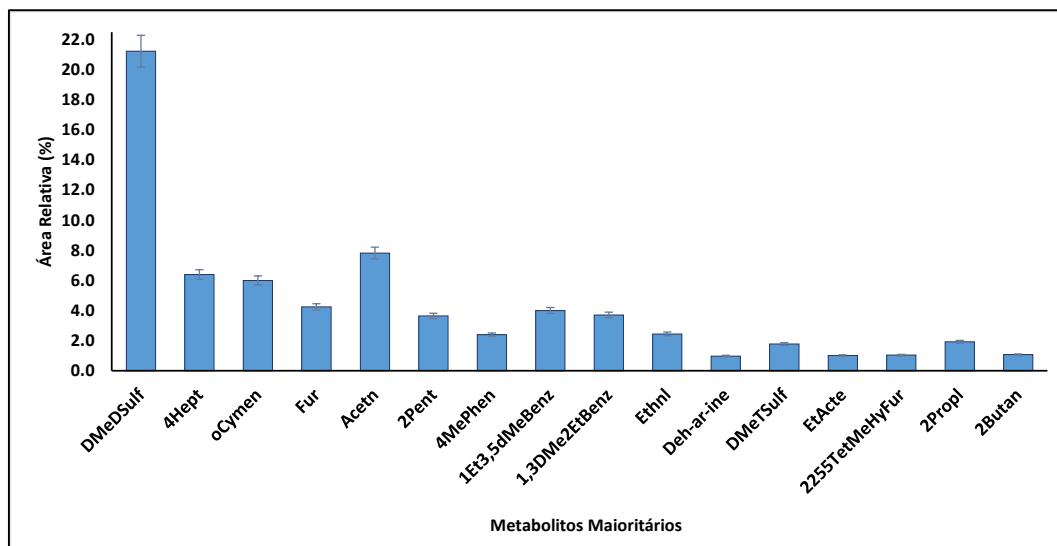


Figura 34. Áreas relativas dos metabolitos maioritários identificados no grupo de controlo. **DMeDsulf** – dissulfureto de dimetilo; **4Hept** – 4-heptanona; **oCymen** – *o*-cimeno; **Fur** – furano; **Acetn** – acetona; **2Pent** – 2-pentanona; **4MePhen** – 4-metilfenol; **1Et3,5dMeBenz** – *p*-cimeneno; **1,3DMe2EtBenz** – 2-etil-1,3-dimetilbenzeno; **Ethnl** – etanol; **Deh-ar-ine** – dehidro-ar-ioneno; **DMeTSulf** – trissulfureto de dimetilo; **EtActe** – acetato de etila; **2255TetMeHyFur** – 2,2,5,5-tetrametiltetrahidrofurano; **2Propyl** – 2-propanol; **2Butan** – 2-butanona.

3.2.2. PERFIL VOLATÓMICO URINÁRIO DE PACIENTES COM CANCRO DO CÓLON

A análise da composição volátil obtida para a urina de pacientes com cancro do cólon, revelou essencialmente cetonas (22,8 % da área total obtida e 37 metabolitos identificados), compostos benzénicos (cerca de 18,7 % e 35 metabolitos), sulfurados (18,0 % e 21 metabolitos), furânicos (cerca de 9,7 % e 18 metabolitos), terpênicos (10,6 % e 39 metabolitos), fenólicos (6,1 % e 12 metabolitos) e naftalénicos (5,0 %, e 11 metabolitos) como as principais famílias químicas (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição das diferentes famílias químicas para o grupo do cancro do cólon, expressas em termos de áreas totais, áreas relativas e número de metabolitos identificados.

Famílias Químicas	Cancro do cólon		
	Área Total (u.a. × 10 ⁶)	Área Relativa (%)	Nº VOMs
Ácidos orgânicos	2,1	0,4	3
Álcoois	21,8	3,7	16
Aldeídos	2,7	0,5	9
Cetonas	132,3	22,8	37
Compostos benzénicos	108,5	18,7	35
Compostos fenólicos	35,6	6,1	12
Compostos furânicos	56,1	9,7	18
Compostos naftalénicos	29,2	5,0	11
Compostos sulfurados	104,5	18,0	21
Compostos terpénicos	61,8	10,6	39
Ésteres	7,1	1,2	3
Hidrocarbonetos	14,4	2,5	34
Outros	5,1	0,9	9
Total	581,1	100	247

Para a composição volátil descrita na Tabela 6 contribuíram em maior extensão cerca de 15 VOMs, considerados de maioritários por terem uma expressão superior a 1% (Figura 35). Destes, o metabolito com maior expressão foi o dissulfureto de dimetilo (15,2% do total das áreas obtidas). Este resultado é concordante com os obtidos por Silva *et al.* [5] onde, à semelhança deste estudo, o dissulfureto de dimetilo também foi o metabolito maioritário. Os compostos terpénicos *o*-cimeno, *p*-cimeneno e o mentol, normalmente derivados da dieta alimentar (vegetais, cereais e frutas) [131-134], também apresentam elevada expressão, com cerca de 10,1% das áreas totais (Figura 35). No entanto, o mentol foi identificado apenas em 43,3 % dos indivíduos, o que elimina a sua eventual utilização como biomarcador. Seriam necessárias analisar um número de amostras muito superior para perceber se esta variação do mentol se mantém. Entre os voláteis maioritários foram ainda identificadas várias cetonas (acetona, 2-butanona, 2-pentanona e 4-heptanona), previamente

associadas com várias doenças, incluindo cancro [5, 31, 109, 123, 135-144]. A sua origem não é, no entanto, consensual. A acetona, por exemplo, pode resultar do metabolismo da glucose ou da oxidação de ácidos gordos [125, 126], mas também ser proveniente da dieta ou de contaminação ambiental [125]. A 2-butanona e a 2-pentanona podem provir de uma variedade de plantas, fungos e bactérias que tem a capacidade de as produzir [145-149] ou simplesmente de contaminação industrial uma vez que estas cetonas, assim como a 4-heptanona, entram na composição de colas, solventes e materiais plásticos, alguns dos quais usados em ambiente hospitalar [150, 151].

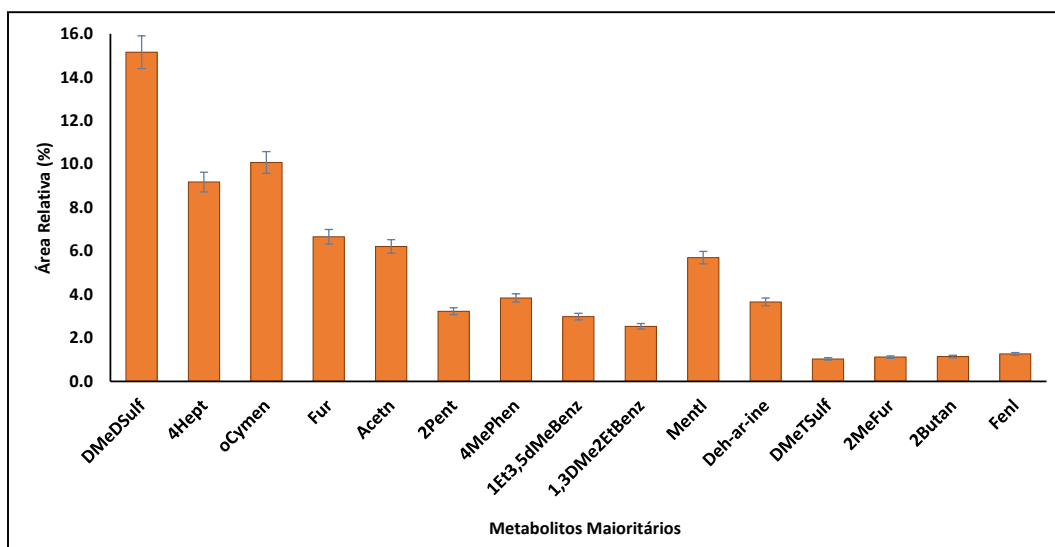


Figura 35. Áreas relativas médias dos metabolitos maioritários identificados no grupo dos pacientes com cancro do cólon. **DMeDSulf** – dissulfureto de dimetilo; **4Hept** – 4-heptanona; **oCymen** – *o*-cimeneno; **Fur** – furano; **Acetn** – acetona; **2Pent** – 2-pentanona; **4MePhen** – 4-metilfenol; **1Et3,5dMeBenz** – *p*-cimeneno; **1,3DMe2EtBenz** – 2-etil-1,3-dimetilbenzeno; **Mentl** – mentol; **Deh-ar-ine** – dehidro-ar-ioneno; **DMeTSulf** – trissulfureto de dimetilo; **2MeFur** – 2-metilfurano; **2Butan** – 2-butanona; **Fenl** – fenol.

O perfil volátil das amostras de urina proveniente de pacientes com cancro do cólon incluem ainda como metabolitos maioritários de destaque o 4-metilfenol, o fenol, o furano e o 2-metilfurano, previamente identificados em linhas celulares do cancro do pulmão e em urina de ratos com a mesma patologia [123], assim como noutras formas de cancro, entre as quais cólon, pulmão e mama [4, 5, 128]. Finalmente de destacar a presença assinalável dos compostos benzénicos nomeadamente o 3,5-dimetilestireno e o 2-etil-1,3-dimetilbenzeno, embora a sua origem continue indeterminada.

Os álcoois e os hidrocarbonetos presentes no perfil volatómico da urina de pacientes com cancro do cólon apresentam uma expressividade baixa com 3,7 e 2,5 % da área total e 16 e 34 metabolitos identificados, respetivamente. Os aldeídos, ácidos orgânicos e ésteres constituem as três

famílias químicas com menor expressão em termos de áreas totais e número de compostos identificados, contabilizando, respectivamente, 0,5 %, (9 metabolitos identificados), 0,4 % (3 metabolitos identificados) e 1,2 % (3 metabolitos identificados) da área total da fração volátil da urina.

3.2.3. PERFIL VOLATÓMICO URINÁRIO DE PACIENTES COM CANCRO DO PULMÃO

O perfil volátil das amostras de urina de pacientes com cancro do pulmão inclui principalmente compostos sulfurados (29,8% da área total obtida e 19 metabolitos identificados), cetonas (28,3% da área total obtida e 35 metabolitos identificados), compostos fenólicos (9,5 % e 12 metabolitos), benzénicos (9,0 % e 32 metabolitos) e furanos (7,1 %, 17 metabolitos identificados) (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição das diferentes famílias químicas para o grupo do cancro do pulmão, expressas em termos de áreas totais, áreas relativas e número de metabolitos identificados.

Famílias Químicas	Cancro do pulmão		
	Área Total (u.a. × 10 ⁶)	Área Relativa (%)	Nº VOMs
Ácidos orgânicos	2,4	0,6	4
Álcoois	9,5	2,4	16
Aldeídos	5,7	1,5	8
Cetonas	110,4	28,3	35
Compostos benzénicos	34,9	9,0	32
Compostos fenólicos	36,9	9,5	12
Compostos furânicos	27,7	7,1	17
Compostos naftalénicos	13,3	3,4	9
Compostos sulfurados	116,2	29,8	19
Compostos terpénicos	9,6	2,5	34
Ésteres	3,1	0,8	3
Hidrocarbonetos	7,3	1,9	31
Outros	13,2	3,4	10
Total	390,4	100	230

Em termos de metabolitos maioritários, e à semelhança do que ocorreu no cancro do cólon e controlo, o metabolito com maior expressão no cancro do pulmão foi novamente o dissulfureto de dimetilo, sendo responsável por cerca de 25,1% da área total dos VOMs identificados, seguido por várias cetonas (4-heptanona (12,9 %), acetona (6,6 %), 2-pentanona (3,7 %), 2-butanona (1,2 %) e 2,4-dimetil-3-pentanona (1,2 %)), pelo furano (4,9 %), por compostos fenólicos 4-etilfenol (4,2%) e 4-metilfenol (3,9%) e ainda pelo 1,2-dihidro-1,5,8-trimetilnaftaleno, com uma expressão de 2,7% (Figura 36).

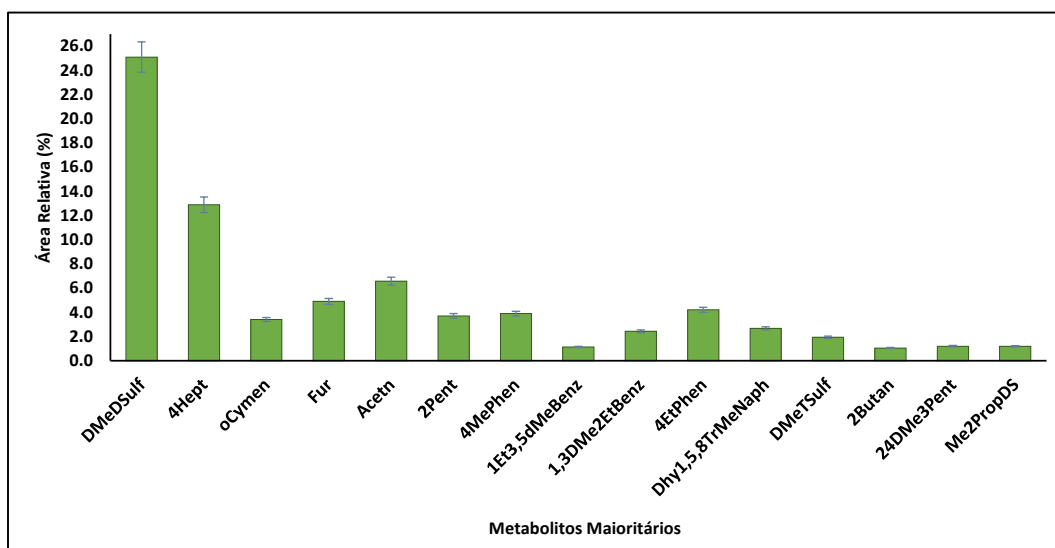


Figura 36. Áreas relativas dos metabolitos maioritários identificados no grupo de pacientes com cancro do pulmão. **DMeD**sulf – dissulfureto de dimetilo; **4Hept** – 4-heptanona; **oCymen** – *o*-cimeno; **Fur** – furano; **Acetn** – acetona; **2Pent** – 2-pentanona; **4MePhen** – 4-metilfenol; **1Et3,5dMeBenz** – *p*-cimeneno3,5-dimetilestireno; **1,3DMe2EtBenz** – 2-etil-1,3-dimetilbenzeno; **4EtPhen** – 4-etilfenol; **Dhv1,5,8TrMeNaph** – 1,2-dihidro-1,5,8-trimetilnaftaleno; **DMeTSulf** – trissulfureto de dimetilo; **2Butan** – 2-butanona; **24DMe3Pent** – 2,4-dimetil-3-pentanona; **Me2PropDS** – dissulfureto de metil 2-propenil.

As famílias químicas menos representativas, em termos de área total foram os álcoois e os hidrocarbonetos, com 2,4 e 1,9% da área total e 16 e 31 metabolitos identificados; os aldeídos com 1,5% da área total e 8 compostos identificados; os ácidos orgânicos com 0,6% e 4 metabolitos e os ésteres com 0,8% e 3 metabolitos identificados.

3.2.4. PERFIL VOLATÓMICO URINÁRIO DE PACIENTES COM CANCRO DA MAMA

A análise da composição volátil obtida para a urina de pacientes com cancro da mama revelou a presença maioritária de cetonas (25,9 % da área total obtida e 40 metabolitos identificados), compostos sulfurados (21,6 % e 20 metabolitos), compostos benzénicos (14,2 % e 35 metabolitos), furanos (8,7 % e 19 metabolitos identificados), compostos naftalénicos (7,5 % e 10 metabolitos), terpénicos (7,2 % e 38 metabolitos) e fenólicos (6,9% e 12 metabolitos identificados), tal como indica a Tabela 8.

Tabela 8. Distribuição das diferentes famílias químicas para o grupo do cancro da mama, expressas em termos de áreas totais, áreas relativas e número de metabolitos identificados.

Famílias Químicas	Cancro da mama		
	Área Total (u.a. × 10 ⁶)	Área Relativa (%)	Nº VOMs
Ácidos orgânicos	7,3	1,2	4
Álcoois	14,4	2,5	19
Aldeídos	2,6	0,4	9
Cetonas	151,7	25,9	40
Compostos benzénicos	83,6	14,2	35
Compostos fenólicos	40,8	6,9	12
Compostos furânicos	51,0	8,7	19
Compostos naftalénicos	44,2	7,5	10
Compostos sulfurados	126,8	21,6	20
Compostos terpénicos	42,2	7,2	38
Ésteres	5,2	0,9	3
Hidrocarbonetos	14,2	2,4	35
Outros	2,9	0,5	11
Total	586,9	100	255

Em termos de metabolitos maioritários, o metabolito com maior expressão no cancro da mama foi novamente o dissulfureto de dimetilo, sendo responsável por 18,2% da área total dos VOMs identificados, seguido por várias cetonas (4-heptanona (11,6 %), acetona (5,1 %), 2-pentanona (3,9 %) e 2-butanona (1,1 %)), pelo furano (6,4 %), pelos fenóis 4-metilfenol (4,8%) e

fenol (1,1 %), pelo composto terpénico *p*-cimeneno(2,5 %), pelos compostos benzénicos como o 2-etil-1,3-dimetilbenzeno (1,5%) e o dureno (1,1 %) e ainda pelos compostos naftalénicos dehidro-ar-ioneno e 1,2-dihidro-1,5,8-trimetilnaftaleno, com uma expressão de 5,2 % e 1,0 %, respetivamente (Figura 37).

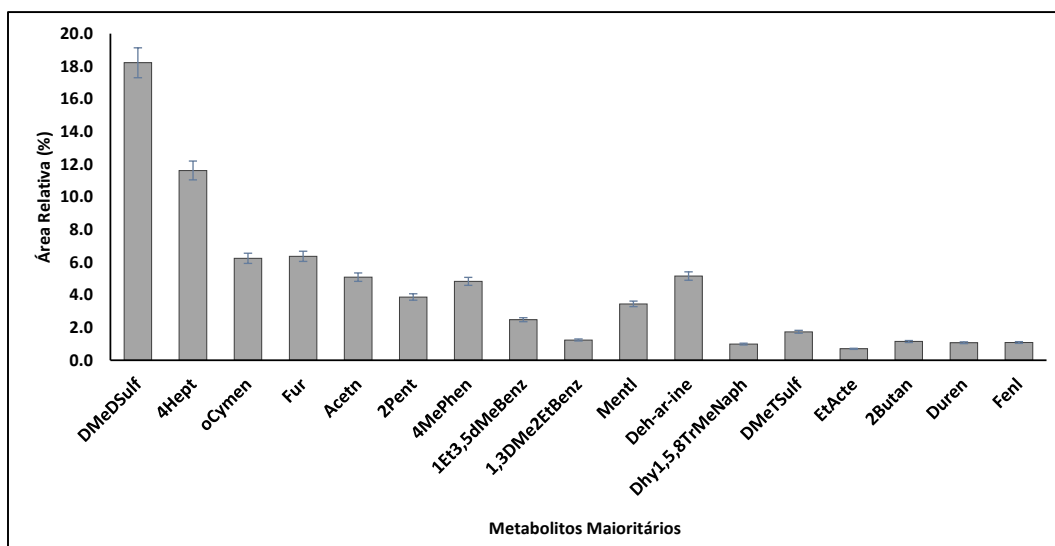


Figura 37. Gráfico relativo as áreas médias dos metabolitos maioritários identificados no grupo de pacientes com cancro da mama. **DMeDsulf** – dissulfureto de dimetilo; **4Hept** – 4-heptanona; **oCymen** – *o*-cimeneno; **Fur** – furano; **Acetn** – acetona; **2Pent** – 2-pentanona; **4MePhen** – 4-metilfenol; **1Et3,5dMeBenz** – *p*-cimeneno; **1,3DMe2EtBenz** – 2-etil-1,3-dimetilbenzeno; **Mentl** – mentol; **Deh-ar-ine** – dehidro-ar-ioneno; **Dhy1,5,8TrMeNaph** – 1,2-dihidro-1,5,8-trimetilnaftaleno; **DMeTSulf** – trissulfureto de dimetilo; **EtActe** – acetato de etila; **2Butan** – 2-butanona; **Duren** – dureno; **Fenl** – fenol.

À semelhança dos grupos oncológicos anteriores, as famílias químicas menos abundantes, em termos de área total foram os álcoois e os hidrocarbonetos, com 2,5 e 2,4 % da área total e 19 e 35 metabolitos identificados, respetivamente; os aldeídos com 0,4 % da área total e 9 compostos identificados; os ácidos orgânicos com 1,2 % e 4 metabolitos e os ésteres com 0,9 % da área total e 3 metabolitos identificados.

3.3. ANÁLISE MULTIVARIADA APLICADA ÀS AMOSTRAS DE URINA

Os compostos maioritários identificados nas amostras de urina fornecem-nos um padrão relativamente às famílias químicas mais expressivas do perfil volatômico. No entanto, para uma interpretação completa deste perfil e, conseqüentemente, para a diferenciação dos grupos em estudo, a análise dos compostos cuja frequência seja elevada deve ser efetuada. Deste modo, com o objetivo principal de avaliar as diferenças entre os diferentes grupos oncológicos e o grupo de controlo, aplicaram-se diferentes modelos estatísticos às matrizes de dados obtidos. Esta análise multivariada dividiu-se, em duas partes: análise discriminante usando PLS-DA e a classificação dos modelos obtidos através de uma análise supervisionada, neste caso recorrendo ao SIMCA. Para além dos passos descritos anteriormente na parte experimental (*Secção 2.5*), para esta etapa apenas foram considerados os metabolitos com frequência igual ou superior a 90%.

3.3.1 ANÁLISE MULTIVARIADA APLICADA ÀS AMOSTRAS DE URINAS DE PACIENTES COM CANCRO DO CÓLON

Após a obtenção da matriz de dados relativos aos metabolitos encontrados nas amostras de urina dos pacientes com o cancro do cólon e após a normalização das variáveis, aplicou-se a PLS-DA. Os resultados obtidos estão representados na Figura 38. Verifica-se que variável latente 1 (LV1) é a componente responsável pela separação entre o grupo de controlo, que é fortemente caracterizado por valores negativos de LV1, e o grupo dos pacientes com o cancro do cólon, caracterizado por valores positivos de LV1.

A análise pormenorizada mostra-nos que a separação entre grupos é caracterizada por um conjunto de 22 metabolitos discriminados na Figura 38B, tendo alguns destes já sido relacionados anteriormente com patologias oncológicas por outros investigadores. Compostos como o *o*-guaiacol e o 2-metilfurano, por exemplo, estão descritos na base de dados do metaboloma [120] como endógenos, tendo sido identificados em indivíduos com cancro do cólon [5] e ainda em indivíduos com infeções bacterianas [114] e doenças hepáticas [152]. Por sua vez, apesar de não estar diretamente relacionado com o cancro do cólon, o 2-pentilfurano também já foi associado a diversas infeções bacterianas [114, 153, 154] e à colite ulcerosa [114], uma doença inflamatória crónica do intestino grosso, que resulta em úlceras na camada interna do cólon. O isopreno e o furano são outros exemplos de metabolitos tidos como endógenos, de acordo com a base de dados do metaboloma

humano [120]. O isopreno tem uma via metabólica perfeitamente caracterizada, estando relacionado diretamente com o *stress* oxidativo. Este metabolito já foi descrito com variações significativas no cancro do pulmão [128, 155], sendo usado em diversos sensores como um potencial biomarcador desta patologia (revisto por Queralto *et al.* [156]).

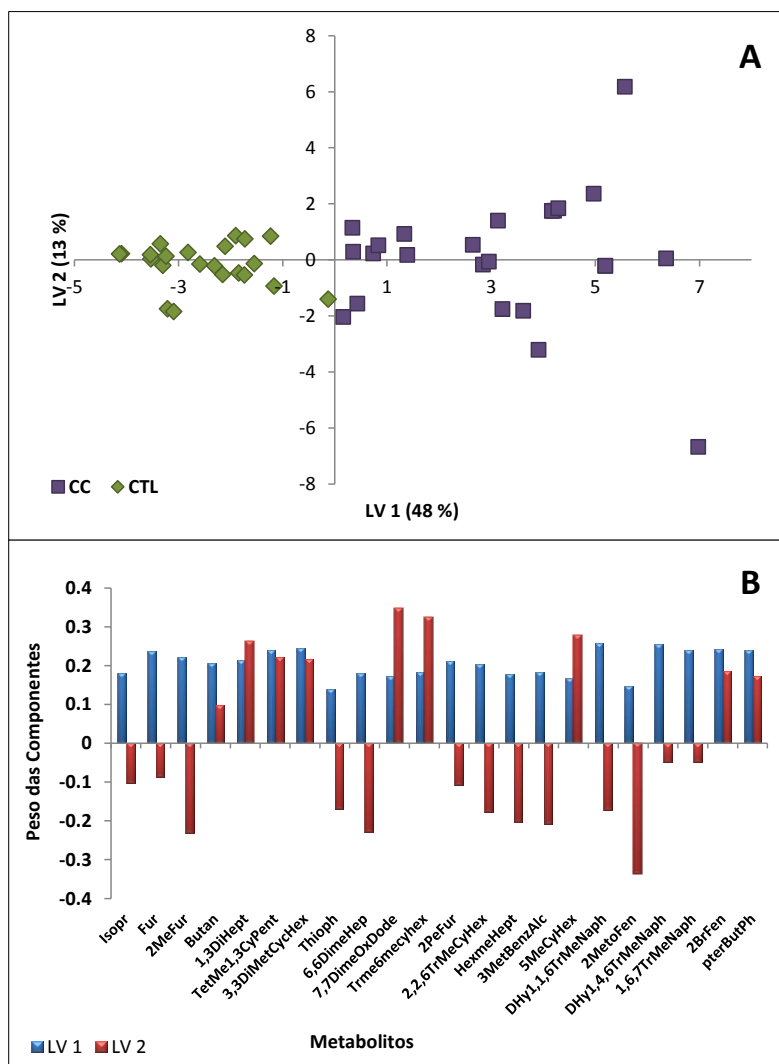


Figura 38. (A) Scores PLS-DA LV1 x LV2 e (B) Pesos das componentes LV1 e LV2 utilizando um subconjunto de 23 metabolitos: **Isopr-** Isopreno; **Fur-** furano; **2MeFur-** 2-metilfurano; **Butan-** butanal; **1,DiHept-**1,6-dimetilhepta-1,3,5-trieno; **TetMe1,3CyPent-** 1,2,5,5-tetrametil-1,3-ciclopentadieno; **3,3DiMetCyHex-** 3,3-dimetil-6-metileneciclohexeno; **Thioph-** tiofeno; **6,6DimeHep-** 6,6-dimetilhepta-2,4-dieno; **7,7DimeOxDode-**7,7-dimetil-9-oxatriciclo[6.2.2.0(1,6)]dodecan-10-ona; **Trme6mecyhex-** 1,5,5-trimetil-6-metileno-ciclohexeno; **2PeFur-** 2-pentilfurano; **2,2,6TrMeCyHex-** 2,2,6-trimetilciclohexanona; **HexmeHept-** 1,2,5,5,6,7-hexametilbicyclo[4.1.0]hept-2-en-4-ona; **OctAc-** ácido octanóico; **3MetBenzAlc-** 3-metoxibenzil álcool; **5MeCyHex-** 3-isopropenil-5-metilciclohexeno; **DHy1,1,6TrMeNaph-** 1,2-dihidro-1,1,6-trimetilnaftaleno; **2MetoFen-** o-guaiacol; **DHy1,4,6TrMeNaph-** 1,2-dihidro-1,1,6-trimetilnaftaleno; **1,6,7TrMeNaph-** 1,6,7-trimetilnaphthalene; **2BrFen-** 2-bromo-fenol; **pterButPh-** p-tert-butilfenol, obtidos após a análise do perfil volátil da urina de pacientes com cancro do cólon (CC) e de indivíduos saudáveis (CTL).

Por sua vez, o furano já foi referido por Silva *et al.* [4, 5] em indivíduos com patologia do cólon, leucemia e mama e ainda por Ulanowska *et al.* [128] em indivíduos com cancro do pulmão. Adicionalmente, Fuchs *et al.* [157] mostraram que aldeídos como o butanal apresentam diferenças estatisticamente significativas em indivíduos com patologia do pulmão comparativamente aos indivíduos do grupo de controlo. Poli *et al.* [158] e Buszewski *et al.* [159] também reforçaram o potencial deste e outros aldeídos, como metabolitos discriminatórios do cancro do pulmão. Sendo os aldeídos tipicamente originados pelo *stress* oxidativo, nomeadamente na peroxidação lipídica, verificamos que o butanal pode ter um potencial poder discriminatório no cancro do cólon.

Apesar de se ter referido a origem de alguns dos compostos mais significativos, a grande maioria ainda carece de uma avaliação mais detalhada para o estabelecimento da relação com o cancro do cólon.

De modo a avaliar a especificidade e a sensibilidade dos metabolitos identificados como diferenciadores entre o grupo de controlo e o grupo de pacientes com cancro do pulmão procedeu-se ao estabelecimento de curvas ROC, que segundo Penhoet *et al.* [160], permitem descrever a capacidade discriminante de uma variável (metabolito) tendo em conta um dado valor de *cut off*. Na análise dos diferentes grupos em estudo é impossível atribuir a um único metabolito o poder discriminante de um dado grupo oncológico. Tal verifica-se porque o mesmo metabolito pode ser responsável pela discriminação de mais do que um tipo de cancro. Deste modo, é preciso avaliar um conjunto de metabolitos com elevado poder discriminatório e que possam revelar uma tendência única para cada grupo em estudo. Verifica-se através dos dados obtidos que a maioria dos metabolitos descritos possui um poder discriminatório bastante aceitável (Figura 39). Este facto mostra-nos que o modelo definido evidencia uma elevada tendência em termos de diferenciação do grupo de pacientes com cancro do cólon.

Através da análise supervisionada SIMCA, avaliou-se o poder preditivo do modelo PLS-DA construído. A grande vantagem desta metodologia reside na capacidade para avaliar a classificação de um conjunto independente de dados a partir dos modelos criados previamente. A análise SIMCA permite ainda verificar o poder discriminatório das variáveis, aumentando a capacidade de diferenciação do modelo estatístico. Outra vantagem prende-se com o número de casos necessários para estabelecer o modelo a partir de um conjunto de treino, uma vez que nesta metodologia é possível estabelecer um modelo com elevado poder discriminatório mesmo com poucas amostras por grupo de estudo. Este aspeto é particularmente importante na definição de um perfil volátil,

especialmente no caso da urina, onde cada caso (indivíduo) gera um número bastante elevado de variáveis (metabólitos).

A aplicação da SIMCA mostra-nos que todas as amostras independentes (não usadas na construção do modelo) do cancro do cólon foram corretamente classificadas recorrendo ao modelo estatístico criado. No entanto, nas amostras independentes do grupo de controlo 8,3 % foram classificadas como oncológicas, originando falsos positivos. Assim, verificou-se que a taxa de classificação do PLS-DA foi de 95,8% e o modelo construído apresenta 91,7% de especificidade e 100% de sensibilidade. Estes dados suportam a tendência já evidenciada pelas curvas ROC individuais (Figura 39), sugerindo uma boa discriminação dos modelos estatísticos criados.

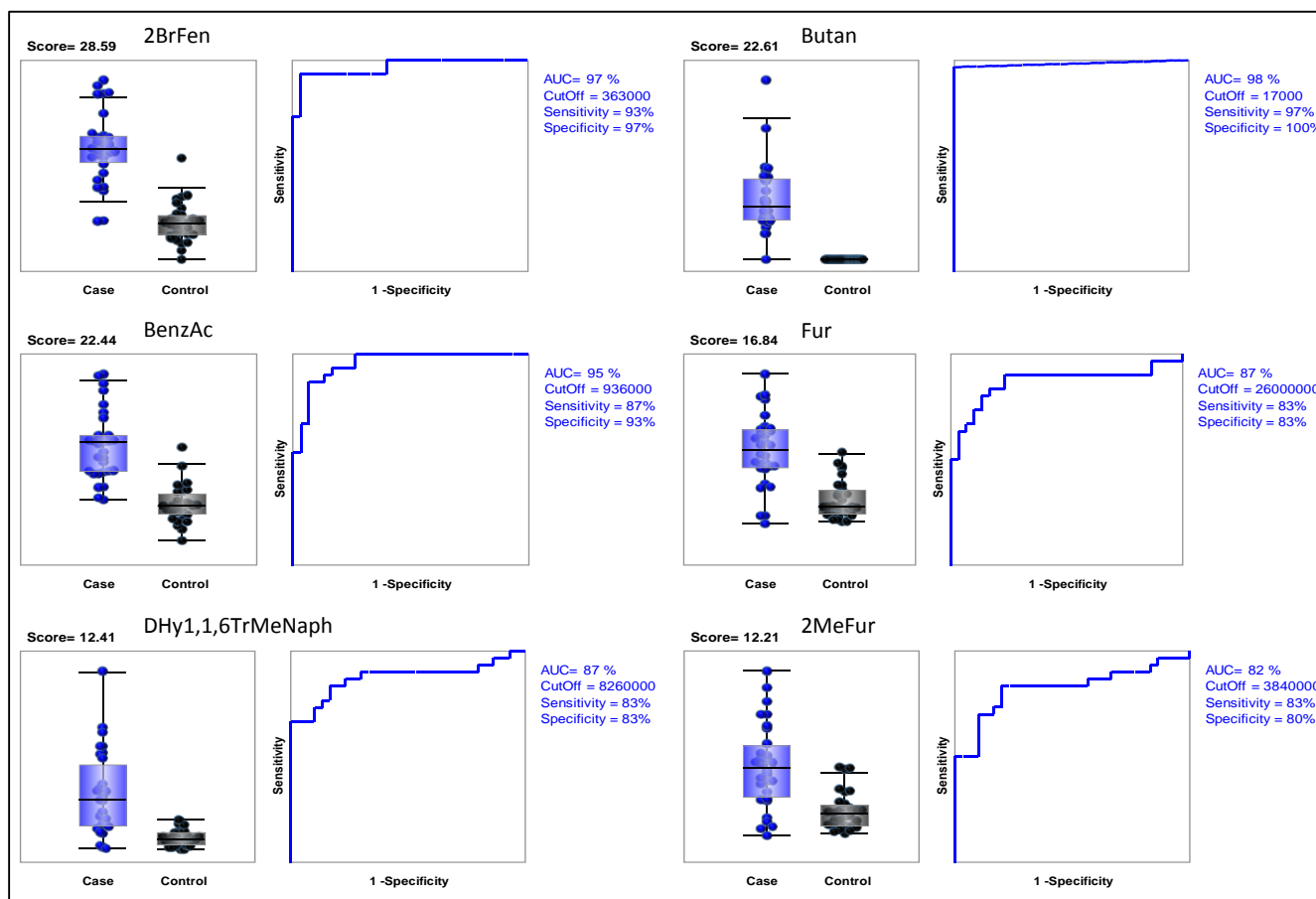


Figura 39. Curvas ROC construídas para alguns dos metabólitos com poder discriminatório entre o grupo de controlo e o grupo de pacientes com cancro do cólon: **Fur**- furano; **2MeFur**- 2-metilfurano; **Butan**- butanal; **Dhy1,1,6TrMeNaph**- 1,2-dihidro-1,1,6-trimetilnaftaleno; **2BrFen**- 2-bromo-fenol. **Case**: grupo de indivíduos com cancro do cólon; **Control**: grupo de indivíduos do grupo de controlo.

3.3.2. ANÁLISE MULTIVARIADA APLICADA ÀS AMOSTRAS DE URINAS DE PACIENTES COM CANCRO DO PULMÃO

À semelhança do subcapítulo anterior, a matriz de dados relativos aos metabolitos encontrados nas amostras de urina dos pacientes com o cancro do pulmão foi processada por PLS-DA e os resultados obtidos pela comparação com o grupo de controlo podem ser analisados na Figura 40A. Deste modo verifica-se que a componente LV1 é a responsável pela separação entre o grupo de controlo e o grupo dos pacientes com o cancro do pulmão. A separação entre os dois grupos é caracterizada por um conjunto de 16 metabolitos expressos na Figura 40B.

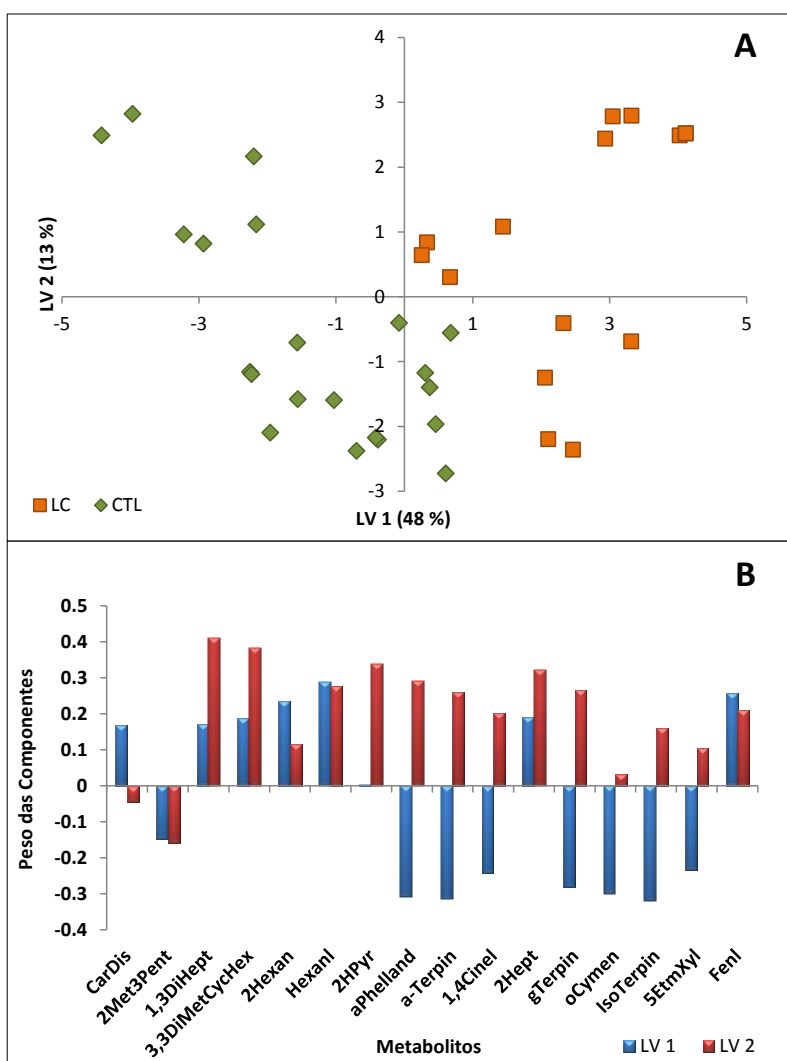


Figura 40. (A) Scores PLS-DA LV1 x LV2 e (B) Pesos das componentes LV1 e LV2 utilizando um subconjunto de 16 metabolitos: **CarDis**- dissulfureto de carbono; **2Met3Pent**- 2metil-3-pentanol; **1,3DiHept**- 1,6-dimetilhepta-1,3,5-trieno; **3,3DiMetCyHex**- 3,3-dimetil-6-metilenciclohexeno; **2Hexan**- 2-hexanona; **Hexanal**- hexanal; **2HPyr**- 2,2,6-trimetil-6-viniltetrahidropirano; **aPhelland**- α -felandreno; **a-Terpin**- α -terpineno; **1,4Cinel**- 1,4-cineol; **2Hept**- 2-heptanona; **gTerpin**- y-terpineno; **oCymen**- o-cimeno; **IsoTerpin**- Isoterpinoleno; **5EtmXyl**- 5-etil-m-xileno; **Fenl**- fenol, obtidos após a análise do perfil volátil da urina de pacientes com cancro do pulmão (LC) e de indivíduos saudáveis (CTL).

Verifica-se que o hexanal possui uma variação significativa (aumentando a sua resposta) para discriminação deste cancro tendo já sido referenciado por Deng *et al.* [161], como estando intimamente relacionado com o cancro do pulmão. Por sua vez Fuchs *et al.* [157] e Poli *et al.* [158] também mostraram que o hexanal, em conjunto com outros aldeídos possui diferenças significativas em indivíduos com patologia do pulmão, reforçando o potencial deste metabolito como biomarcador. O dissulfureto de carbono também foi associado a indivíduos com cancro do pulmão no estudo efetuado por Rudnicka *et al.* [162]. Neste trabalho, os investigadores mostraram que embora este metabolito esteja presente no perfil volátil de indivíduos saudáveis e fumadores, ele possui elevada significância no cancro do pulmão, uma vez que aumenta consideravelmente a sua resposta [162]. De forma semelhante, Buszewski *et al.* [109] correlacionou o dissulfureto de carbono ao perfil volátil de tecido normal e com cancro do estômago. A 2-hexanona e a 2-heptanona também foram associadas com o cancro do pulmão. Estes compostos foram identificados por Hanai *et al.* [123] em urina de ratos com cancro do pulmão e ainda em culturas de linhas celulares da mesma patologia, com uma elevada expressão face ao respetivo grupo de controlo.

A análise das curvas ROC (Figura 41) construídas para o conjunto de metabolitos descritos mostra-nos o elevado poder discriminatório para os pacientes com cancro do pulmão, uma vez que mostram bons níveis de sensibilidade e especificidade. Deste modo, verificamos que muitos dos metabolitos mais significativos para a separação entre os grupos estudados neste trabalho já foram previamente associados a diferentes formas de cancro, e ajudam a consolidar a hipótese do diagnóstico de cancro usando metabolitos voláteis presentes na urina. Além disso, estes resultados mostram o potencial extrativo da técnica NTME descrita neste projeto. De modo a avaliar o poder preditivo do modelo estatístico, efetuou-se a análise supervisionada SIMCA. Para a comparação efetuada entre o grupo de controlo e os pacientes com cancro do pulmão, os resultados obtidos mostram que 6,7 % das amostras independentes do cancro do pulmão foram incorretamente classificadas recorrendo ao modelo estatístico criado, originando falsos negativos. Relativamente às amostras independentes do grupo de controlo, 8,3% foram classificadas como oncológicas, originando falsos positivos. Deste modo, o modelo PLS-DA construído apresenta uma taxa de classificação de 92,5%, com uma especificidade de 91,7% e sensibilidade de 93,3%.

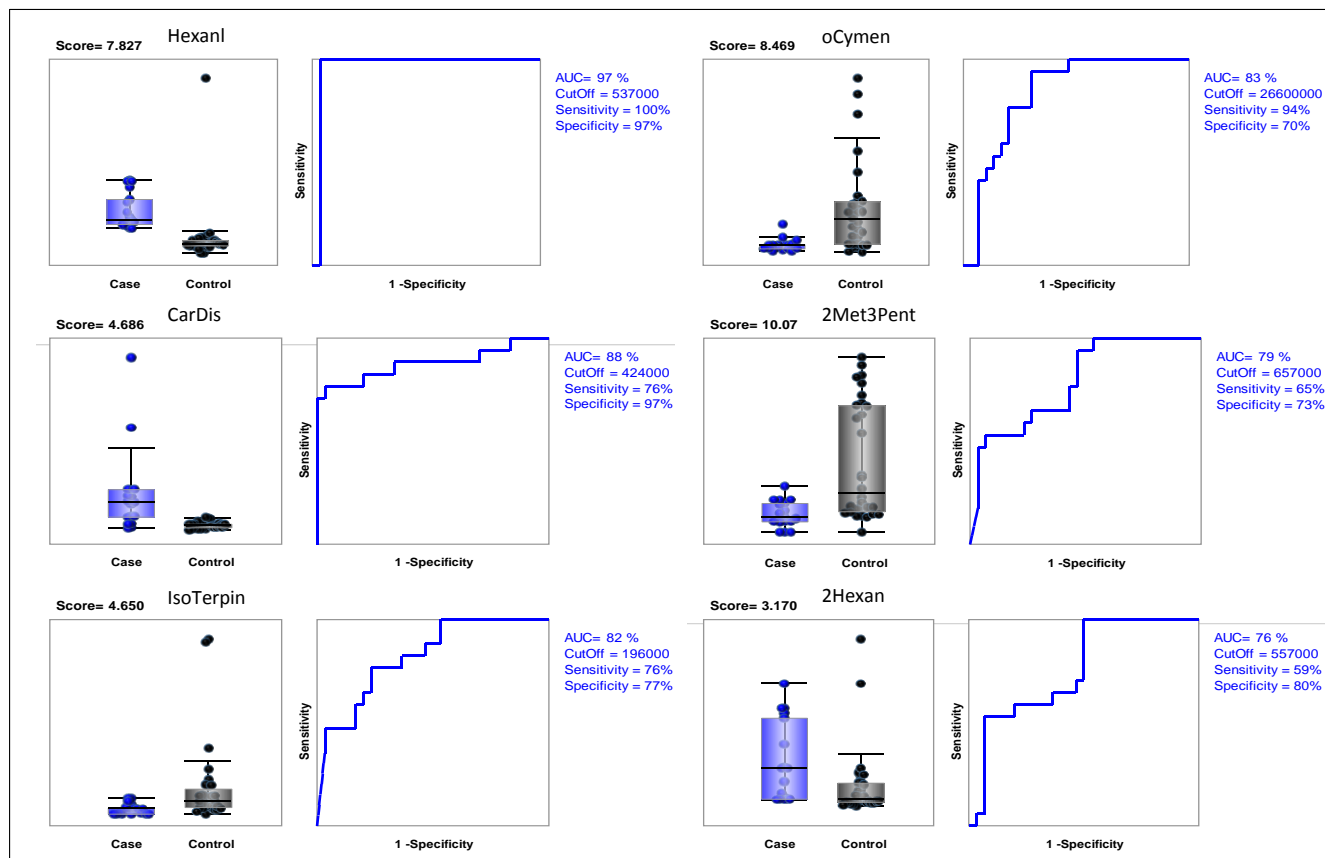


Figura 41. Curvas ROC construídas para alguns dos metabolitos com poder discriminatório entre o grupo de controlo e o grupo de pacientes com cancro do pulmão: **Hexanl**- hexanal; **oCymen**- *o*-cimeno; **CarDis**- dissulfureto de carbono; **2Me3Pent**- 2-metil-3-pentanol; **IsoTerpin**- isoterpinoleno; **2Hexan**- 2-hexanona. **Case**: grupo de indivíduos com cancro do pulmão; **Control**: grupo de indivíduos do grupo de controlo.

3.3.3. ANÁLISE MULTIVARIADA APLICADA ÀS AMOSTRAS DE URINAS DE PACIENTES COM CANCRO DA MAMA

A matriz de dados dos metabolitos identificados nas amostras de urina dos pacientes com o cancro da mama foi processada por PLS-DA. Os resultados obtidos podem ser analisados na Figura 42A. Deste modo, verifica-se que a componente LV1 é a responsável pela separação entre o grupo de controlo, que é fortemente caracterizado por valores negativos de LV1, e o grupo dos pacientes com o cancro da mama, caracterizado por valores positivos de LV1. A Figura 42B mostra-nos que a separação entre grupos é caracterizada por um conjunto de 24 metabolitos que possuem um elevado poder discriminatório para os pacientes com cancro da mama, como comprovam as curvas ROC construídas (Figura 43).

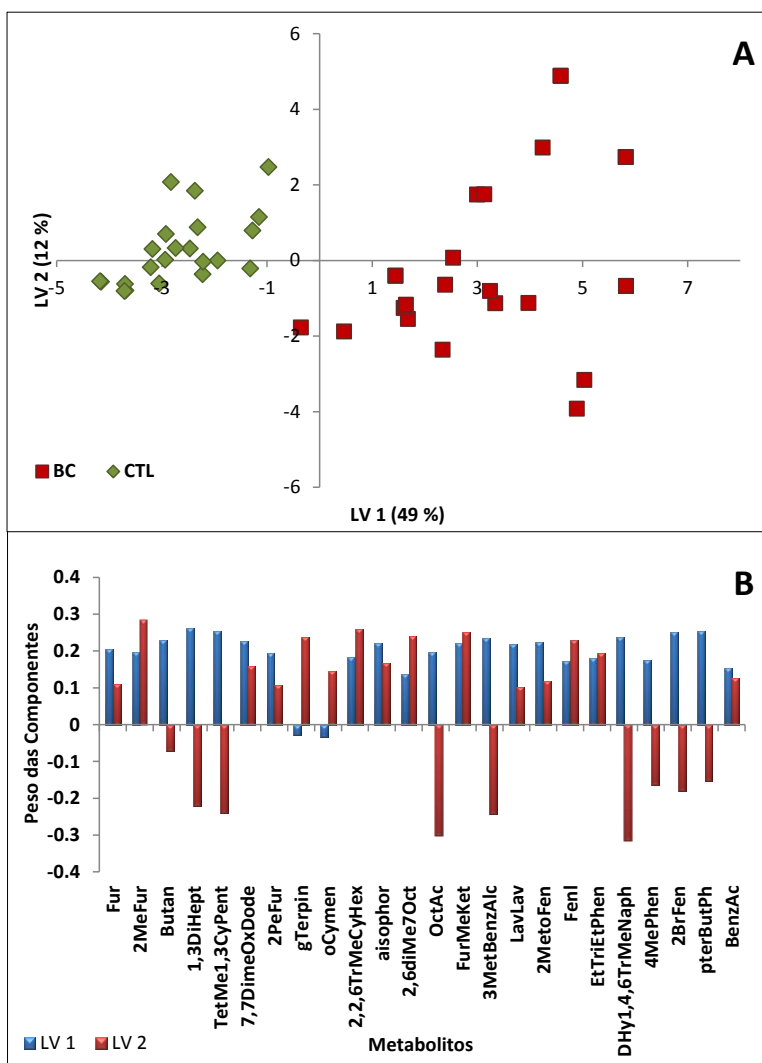


Figura 42. (A) Scores PLS-DA LV1 x LV2 e (B) Pesos das componentes LV1 e LV2 utilizando um subconjunto de 24 metabolitos: **Fur**- furano; **2MeFur**- 2-metilfurano; **Butan**- butanal; **1,3DiHept**- 1,6-dimetilhepta-1,3,5-triene; **TetMe1,3CyPent**- 1,2,5,5-tetrametil-1,3-ciclopentadieno; **7,7DimeOxDode**- 7,7-dimetil-9-oxatriciclo[6.2.2.0(1,6)]dodecan-10-ona; **2PeFur**- 2-pentilfurano; **gTerpin**- y-terpineno; **oCymen**- o-cimeno; **2,2,6TrMeCyHex**- 2,2,6-trimetilciclohexanona; **aisophor**- α -isoforona; **2,6diMe7Oct**- 2,6-dimetil-7-octen-2-ol; **OctAc**- ácido octanóico; **FurMeKet**- 2-acetilfurano; **3MetBenzAlc**- 3-metoxibenzil álcool; **LavLav**- 4-metil-4-vinilbutirolactona; **2MetoFen**- o-guaiacol; **FenI**- fenol; **EtTriEtPhen**- 1-(2,4,5-trietilfenil)etanona; **DHy1,4,6TrMeNaph**- 1,2-Dihidro-1,1,6-trimetilnaftaleno; **4MePhen**- 4-metilfenol; **2BrFen**- 2-bromo-fenol; **pterButPh**- *p-tert*-butilfenol; **BenzAc**- ácido benzoico, obtidos após a análise do perfil volátil da urina de pacientes com cancro da mama (BC) e de indivíduos saudáveis (CTL).

Verifica-se que à semelhança do obtido por Silva *et al.* [4], foram associados ao cancro da mama metabolitos como o 2-metilfurano, o furano, o fenol e ainda o ácido octanóico, que se apresentam com áreas significativamente maiores nos indivíduos com cancro da mama face ao grupo de controlo. Outros compostos, como o *o*-guaiacol, o *p-tert*-butilfenol, 2,2,6-trimetil-ciclohexanona, 2,6-dimetil-7-octen-2-ol, também foram descritos pelos mesmos autores em amostras de indivíduos

com cancro da mama, embora sem qualquer alusão à sua capacidade discriminatória. Na globalidade, estes resultados reforçam a tendência já evidenciada de que os metabolitos descritos apresentam um contributo importante para a definição do perfil volátil desta patologia.

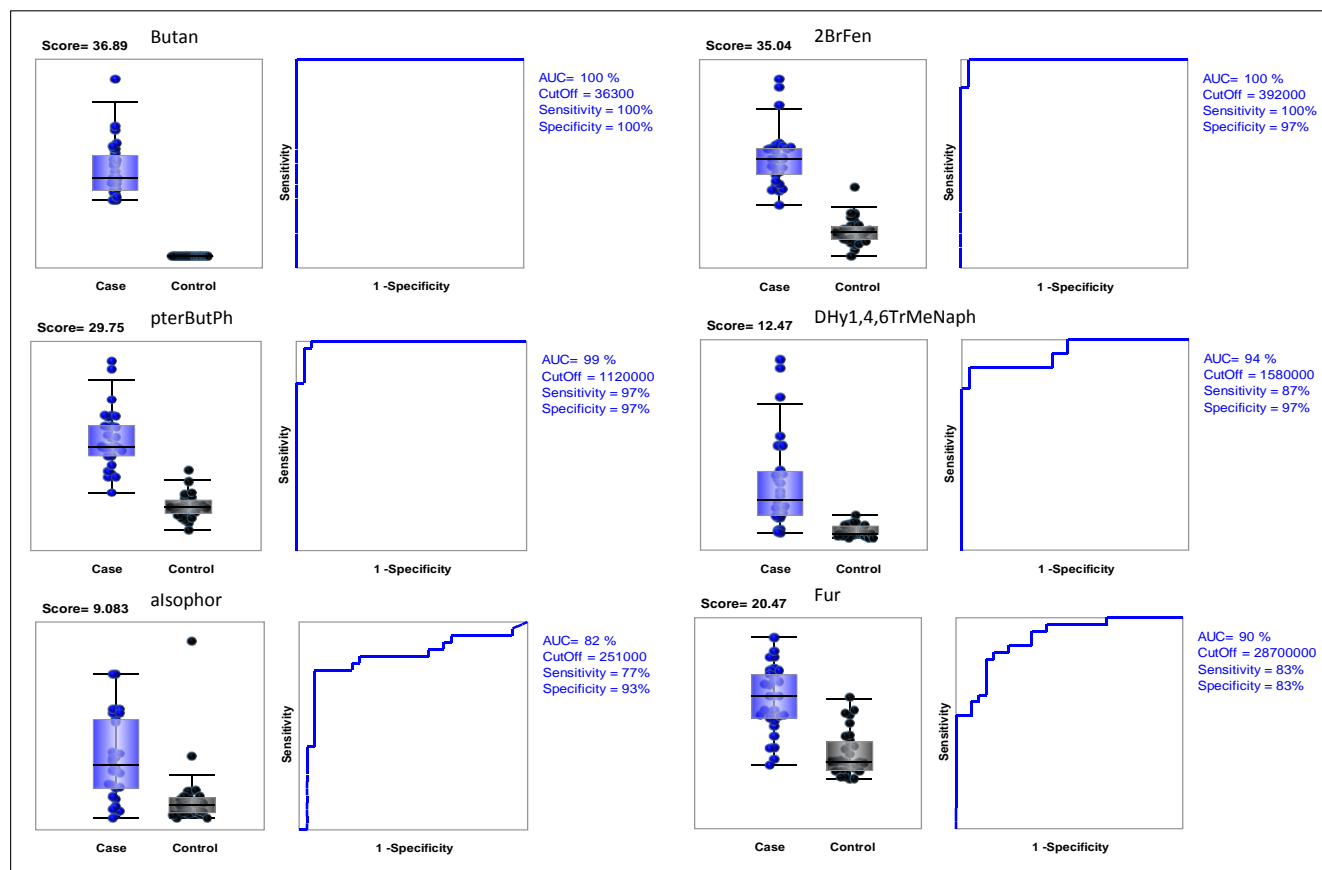


Figura 43. Curvas ROC construídas para alguns dos metabolitos com poder discriminatório entre o grupo de controlo e o grupo de pacientes com cancro do pulmão: **Butan**- butanal; **2BrFen**- 2-bromofenol; **pterButPh**- *p-tert*-butilfenol; **Dhy1,4,6TrMeNaph**- 1,2-dihidro-1,1,6-trimetilnftaleno; **alsophor**- α -isoforona; **Fur**- furano. **Case**: grupo de indivíduos com cancro da mama; **Control**: grupo de indivíduos do grupo de controlo.

Tal como acontece no perfil volátil dos cancros do cólon e do pulmão, a grande maioria dos compostos identificados carece de informações sobre sua origem metabólica e relação com patologias oncológicas. Muitos dos metabolitos já descritos na literatura possuem uma origem mista, endógena e exógena, o que origina dúvidas quanto ao seu potencial como biomarcador. Devido ao tempo limitado para a realização deste trabalho e ao número elevado de metabolitos identificados (259), não foi possível fazer uma avaliação exaustiva da origem e relações dos metabolitos identificados. Estas questões serão abordadas em trabalhos futuros.

Por fim, o poder preditivo do modelo estatístico foi avaliado pela análise supervisionada SIMCA. Para a comparação efetuada entre o grupo de controlo e os pacientes com cancro da mama, os resultados obtidos mostram que 100 % das amostras independentes do cancro da mama foram corretamente classificadas recorrendo ao modelo estatístico criado. Relativamente às amostras independentes do grupo de controlo 8,3% foram classificadas como oncológica, originando falsos positivos. Verifica-se que à semelhança dos grupos anteriores, a taxa de classificação do modelo PLS-DA foi elevada (95,8%), apresentando uma especificidade de 91,7% e uma sensibilidade de 100%.

3.3.4. INTEGRAÇÃO DAS DIFERENTES MATRIZES DE METABOLITOS OBTIDOS PARA CADA UM DOS GRUPOS ONCOLÓGICOS EM ESTUDO

A última parte da análise estatística consistiu na tentativa de integração dos diferentes modelos criados para as diferentes patologias em estudo. Para tal, usando os metabolitos com maior poder discriminatório obtidos para cada tipo de cancro, construiu-se uma matriz de dados com 10 indivíduos selecionados aleatoriamente em cada grupo. De seguida, a matriz foi analisada por PLS-DA. Os resultados obtidos mostram que cada grupo em estudo é claramente separado pelas duas componentes presentes (Figura 44A).

Além disso, a componente LV1 separa sobretudo os grupos do cancro do cólon e mama dos grupos de controlo e cancro pulmão, sendo essencialmente representado pelos metabolitos com um peso na componente próximo ou superior a 0,2 (Figura 44B). Por sua vez, a componente LV2 separa os grupos do cancro do pulmão e controlo dos grupos do cancro cólon e mama, sendo os metabolitos 2-hexanona; hexanal, 6,6-dimetilhepta-2,4-dieno, 2-heptanona, 2-pentilfurano e 4-metil-4-vinilbutirolactona essenciais nesta discriminação.

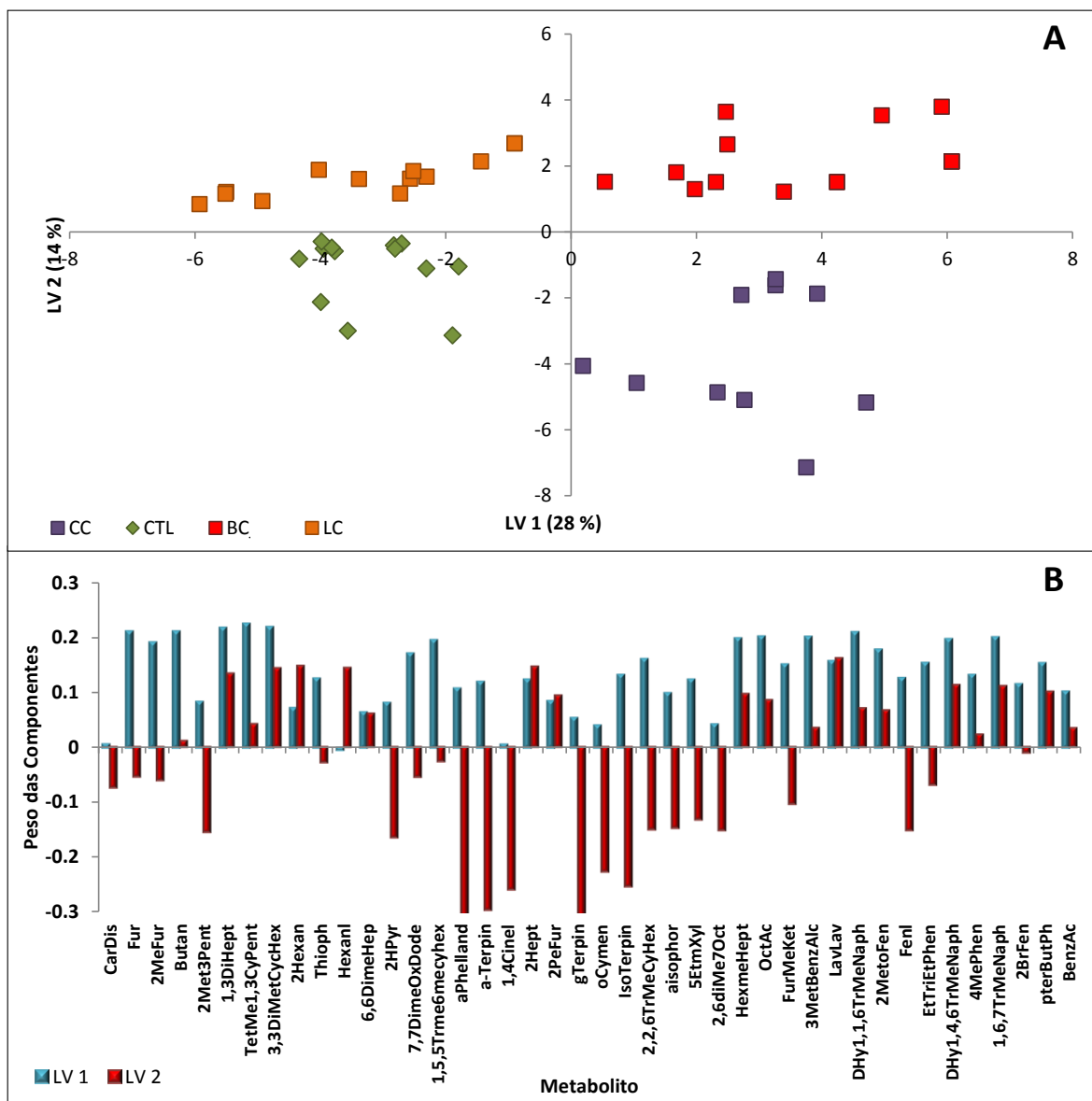


Figura 44. (A) Gráfico de scores PLS-DA LV1 x LV2 e (B) Gráfico de pesos das componentes LV1 e LV2 utilizando um subconjunto de 42 metabolitos: **CarDis**- dissulfureto de carbono; **Fur**- furano; **2MeFur**- 2-metilfurano; **Butan**- butanal; **2Met3Pent**- 2-metil-3-pentanol; **1,3DiHept**- 1,6-dimetilhepta-1,3,5-triene; **TetMe1,3CyPent**- 1,2,5,5-tetrametil-1,3-ciclopentadieno; **3,3DiMetCyHex**- 3,3-dimetil-6-metilenciclohexeno; **2Hexan**- 2-hexanona; **Thioph**- tiofeno; **Hexanl**- hexanal; **6,6DimeHep**- 6,6-dimetilhepta-2,4-dieno; **2HPyr**- 2,2,6-trimetil-6-viniltetrahidropirano; **7,7DimeOxDode**- 7,7-dimetil-9-oxatriciclo[6.2.2.0(1,6)]dodecan-10-ona; **1,5,5Trme6mecyhex**- 1,5,5-trimetil-6-metileno-ciclohexeno; **aPhelland**- α -felandreno; **a-Terpin**- α -terpineno; **1,4Cinel**- 1,4-cineol; **2Hept**- 2-heptanona; **2PeFur**- 2-pentilfurano; **gTerpin**- γ -terpineno; **oCymen**- *o*-cimeno; **IsoTerpin**- Isoterpinoleno; **2,2,6TrMeCyHex**- 2,2,6-trimetilciclohexanona; **aisophor**- α -isoforona; **5EtmXyl**- 5-etil-m-xileno; **2,6diMe7Oct**- 2,6-dimetil-7-octen-2-ol; **HexmeHept**- 1,2,5,5,6,7-hexametilbicyclo[4.1.0]hept-2-en-4-ona; **OctAc**- ácido octanóico; **FurMeKet**- 2-acetilfurano; **3MetBenzAlc**- 3-metoxibenzil álcool; **LAvLav**- 4-metil-4-vinilbutirolactona; **Dhy1,1,6TrMeNaph**- 1,2-dihidro-1,1,6-trimetilnaftaleno; 2MetoFen- *o*-guaiacol; **Fenl**- fenol; **EtTriEtPhen**- 1-(2,4,5-trietilfenil)etanona; **Dhy1,4,6TrMeNaph**- 1,2-dihidro-1,1,6-trimetilnaftaleno; **4MePhen**- 4-metilfenol; **1,6,7TrMeNaph**- 1,6,7-trimetylhnaphthalene; **2BrFen**- 2-bromo-fenol; **pterButPh**- *tert*-butilfenol; **BenzAc**- ácido benzoico, obtidos após a análise do perfil volátil da urina de pacientes com cancro do cólon (CC), pulmão (LC) e mama (BC) e de indivíduos saudáveis (CTL).

Tendo em conta o número limitado de amostras, não foi possível classificar o modelo estatístico integrado. Este facto resulta sobretudo da necessidade de amostras independentes para se poder fazer tal classificação e que permitam uma avaliação sem enviesamentos. No entanto, a separação dos diferentes grupos de estudo no modelo integrado, reforça os resultados já obtidos individualmente para cada patologia e ainda os obtidos previamente por Silva *et al.* [5], usando SPME.

Deste modo, podemos aferir que os objetivos de discriminação dos diferentes grupos em estudo foram alcançados com sucesso e simultaneamente, mostrou-se o potencial extrativo da NTME. É importante ainda referir que os resultados obtidos mostram apenas uma tendência a ser explorada em trabalhos futuros pois o número de amostras em cada um dos grupos tem de ser ampliado para melhorar o poder preditivo e fiabilidade dos modelos estatísticos desenvolvidos. Do mesmo modo, ainda é necessária uma validação com um novo conjunto de amostras independentes de modo a reavaliar o poder preditivo do modelo estatístico desenvolvido e do conjunto de metabolitos selecionados que lhe serve de base. Por fim, a necessidade de validação cruzada com outras amostras biológicas e ainda a caracterização da origem de muitos metabolitos identificados são outros objetivos importantes na definição de um modelo passível de ser usado em diagnóstico.

CAPÍTULO IV.

CONCLUSÃO

Após a realização deste projeto, podemos aferir que todos os objetivos propostos inicialmente foram atingidos com sucesso. Foi estabelecido o perfil volatômico de amostras de urina de diferentes indivíduos saudáveis e indivíduos com diferentes tipos de cancro, nomeadamente cólon, pulmão e mama, a partir de uma metodologia inovadora a NTME associada à análise cromatográfica (GC-MS) e análise estatística multivariada (MVSA), com o intuito de definir um conjunto de metabolitos capazes de diferenciar os referidos grupos, mostrando uma potencial ferramenta de diagnóstico para o futuro. No cumprimento desta tarefa foram avaliados e otimizados diferentes parâmetros chave, tendo em conta a natureza da amostra e dos metabolitos voláteis presentes na urina. Deste modo, os melhores resultados foram alcançados utilizando uma agulha DVB/Car1000/CarX, 4 mL de urina pH= 2, 20% NaCl (m/v), 40 mL de *headspace* e 40 min de extração a 50 ± 1 °C. As referidas condições foram posteriormente aplicadas a 107 amostras de urina (30 amostras de indivíduos de cada um dos grupos de controlo, cancro do cólon e mama, e 17 amostras de indivíduos com cancro do pulmão). Para cada amostra foram realizados ensaios em duplicado e em triplicado quando necessário.

Foi possível a identificação de 259 metabolitos nos 4 grupos em estudo, pertencentes a diferentes famílias químicas incluindo, ácidos orgânicos, álcoois superiores, aldeídos, cetonas, compostos furânicos, sulfurados, terpênicos (onde se incluem monoterpenos, sesquiterpenos e terpenóides), benzênicos, naftalênicos e fenólicos, hidrocarbonetos (onde se incluem os alcanos, alcenos e alcinos) e ésteres. As três famílias químicas maioritárias em termos de áreas totais foram as cetonas, os compostos sulfurados e os compostos benzênicos. As cetonas contabilizaram em média cerca de 24,7% de área total e 40 metabolitos identificados (cancro do pulmão: 35 cetonas, 28,3% da área total; cancro da mama: 40 cetonas, 25,9%; cancro do cólon: 37 cetonas, 22,8%; grupo de controlo: 39 cetonas 21,9%). A segunda família identificada com maior expressão no perfil volatômico da urina foi a dos compostos sulfurados, representando cerca de 23,5% da área total dos compostos identificados (cancro do pulmão: 29,8% da área total e 19 metabolitos identificados; cancro do cólon: 18,8% da área total e 21 metabolitos; cancro da mama: 21,6% da área total com 20 metabolitos; grupo de controlo: 24,8% da área total e 17 metabolitos identificados). Por fim, os compostos benzênicos apresentaram, em termos de áreas totais, uma expressão de cerca de 16,9% das áreas totais dos compostos identificados (controlo: 24,8% da área total, com 33 metabolitos; cancro do pulmão: 8,9% da área total e 33 metabolitos); cancro do cólon: 8,7% da área total e 35 metabolitos; cancro da mama: 14,2% da área total e 35 metabolitos).

A aplicação da análise estatística mostrou, através dos resultados obtidos pelo método PLS-DA, uma boa separação entre os indivíduos do grupo de controlo e de cada um dos diferentes grupos de pacientes oncológicos. Através deste método foi possível eliminar as variáveis redundantes e identificar os metabolitos com potencial discriminatório para cada grupo oncológico. Verificamos que as curvas ROC efetuadas para os metabolitos com maior poder discriminatório entre grupos mostram elevada sensibilidade e especificidade, o que nos dá uma tendência do potencial dos VOMs para a diferenciação de grupos oncológicos. Deste modo, observamos que um conjunto de 22 metabolitos identificados permitem diferenciar o cancro do cólon (Figura 38B) dos outros estudados neste trabalho. Para o grupo do cancro do pulmão um conjunto de 16 metabolitos (Figura 40B) foram definidos para a diferenciação deste grupo, enquanto que para grupo do cancro da mama 24 foram os metabolitos (Figura 42B) que se mostraram mais significativos para sua discriminação. Por fim, a matriz integrada dos 42 metabolitos (Figura 44B) definidos previamente a partir da diferenciação individual de cada grupo mostrou potencial para diferenciar os três grupos oncológicos e o controlo.

Através do método de classificação SIMCA foi ainda possível averiguar a robustez dos resultados obtidos por PLS-DA. Verificamos que todos os modelos definidos possuem uma elevada taxa de classificação (> 90%), sendo este mais um indicador do potencial deste estudo na diferenciação de pacientes oncológicos. No entanto, para trabalhos futuros, o número de amostras para cada um dos grupos deve ser largamente ampliado. Do mesmo modo a determinação da fonte do metabolito deve ser feita, de modo a serem excluídos metabolitos que sejam produto de alguma fonte de contaminação, como por exemplo do ambiente ou dieta alimentar. Uma nova validação dos dados deve ainda ser efetuada com um grupo de amostras independentes e outro de amostras desconhecidas.

Os resultados obtidos neste projeto suportam a tendência já demonstrada em trabalhos anteriores sobre o potencial dos VOMs como potenciais biomarcadores de diferentes grupos oncológicos. No entanto, ainda temos um longo caminho pela frente de intensa investigação, de modo a que a seja estabelecida uma estreita correlação destes metabolitos e os processos bioquímicos inerentes ao metabolismo do organismo humano, em especial na identificação das diferenças nas células cancerígenas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva: WHO 2015.
2. Eurostat Statistics Explained. Cancer statistics - specific cancers 2015. Disponível em: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Cancer_statistics_-_specific_cancers#Further_Eurostat_information. Acedido em: 16-05-2015
3. Instituto Nacional de Estatística INE. Estatísticas da saúde 2013. Lisboa: INE; 2015.
4. Silva CL, Passos M, Camara JS. Solid phase microextraction, mass spectrometry and metabolomic approaches for detection of potential urinary cancer biomarkers-a powerful strategy for breast cancer diagnosis. *Talanta*. 2012;89:360-368.
5. Silva CL, Passos M, Camara JS. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. *Br J Cancer*. 2011;105(12):1894-1904.
6. Wang Y, Hu Y, Wang D, Yu K, Wang L, Zou Y, Zhao C, Zhang X, Wang P, Ying K. The analysis of volatile organic compounds biomarkers for lung cancer in exhaled breath, tissues and cell lines. *Cancer Biomark*. 2012;11(4):129-137.
7. Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*: Worth Publishers New York; 2000.
8. Devlin TM. *Textbook of biochemistry: with clinical correlations*. 7 ed: John Wiley & Sons; 2006.
9. Collins K, Jacks T, Pavletich NP. The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):2776-2778.
10. Ward LS. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002;46(4):351-360.
11. Almeida VD, Leitão A, Reina LdCB, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nova*. 2005;28(1):118-129.
12. Warshawsky D, Landolph Jr JR. *Molecular carcinogenesis and the molecular biology of human cancer*. Nova Iorque: CRC Press; 2005.
13. Nasca PC, Pastides H. *Fundamentals of cancer epidemiology*. Gaithersburg: Aspen Publishers; 2001.
14. Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz P, Luis F, Lopes C. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc*. 2007;79(4):593-616.

15. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2008;266(1):6-11.
16. Vineis P, Schatzkin A, Potter JD. Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis.* 2010;31(10):1703-1709.
17. Weston A, Harris CC. Multistage Carcinogenesis. In: Kufe DW PR, Weichselbaum RR, et al., editor. *Holland-Frei Cancer Medicine.* 6 ed. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13982/>. Acedido a 04-10-2015.
18. Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI. Reactive oxygen species (ROS)-induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 2011;711(1-2):167-173.
19. National Cancer Institute. Cancer Diagnosis 2015. Disponível em: <http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis>. Acedido em: 16-05-2015
20. Nover AB, Jagtap S, Anjum W, Yegingil H, Shih WY, Shih W-H, Brooks AD. Modern breast cancer detection: a technological review. *J Biomed Imaging.* 2009;2009:1-14.
21. Henschke CI, Yankelevitz DF, Libby DM, Pasmantier MW, Smith JP, Miettinen OS. Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. *N Engl J Med.* 2006;355(17):1763-1771.
22. Yin P, Xu G. Metabolomics for tumor marker discovery and identification based on chromatography–mass spectrometry. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013;13(4):339-348.
23. de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biol Med.* 1999;26(1):202-226.
24. LaBaer J. So, you want to look for biomarkers (introduction to the special biomarkers issue). *J Proteome Res.* 2005;4(4):1053-1059.
25. Bradley M. *Smell and the ancient senses.* Nova Iorque: Routledge; 2014.
26. Matsumura K, Opiekun M, Oka H, Vachani A, Albelda SM, Yamazaki K, Beauchamp GK. Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer: a proof of principle study using odor signatures in mouse models of lung cancer. *PLoS One.* 2010;5(1):e8819.
27. Devasagayam T, Tilak J, Bolor K, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele R. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India.* 2004;52:794-784.
28. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000;408(6809):239-247.

29. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot.* 2012;2012:1-26.
30. Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84(4):1381-1478.
31. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol.* 2008;4(5):278-286.
32. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82(2):291-295.
33. Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994;102(Suppl 10):5-12.
34. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontology.* 1956;11(3):298-300.
35. Gutteridge J. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995;41(12):1819-1828.
36. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993;57(5):715S-724S.
37. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 2006;52(4):601-623.
38. Gackowski D, Kowalewski J, Siomek A, Olinski R. Oxidative DNA damage and antioxidant vitamin level: comparison among lung cancer patients, healthy smokers and nonsmokers. *Int J Cancer.* 2005;114(1):153-156.
39. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 2011;711(1-2):193-201.
40. Mateos R, Bravo L. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *J Sep Sci.* 2007;30(2):175-191.
41. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899(1):191-208.
42. Dean R, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997;324(1):1-18.
43. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res.* 2006;40(12):1250-1258.
44. Headlam HA, Davies MJ. Beta-scission of side-chain alkoxy radicals on peptides and proteins results in the loss of side-chains as aldehydes and ketones. *Free Radical Biol Med.* 2002;32(11):1171-1184.

45. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997;272(33):20313-20316.
46. Shacter E. Quantification and Significance of Protein Oxidation in Biological Samples. *Drug Metab Rev.* 2000;32(3-4):307-326.
47. Queiroz SC, Collins CH, Jardim I. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quim Nova.* 2001;24(1):68-76.
48. Lord HL, Zhan W, Pawliszyn J. Fundamentals and applications of needle trap devices: a critical review. *Anal Chim Acta.* 2010;677(1):3-18.
49. Płotka-Wasyłka J, Szczepańska N, de la Guardia M, Namieśnik J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. *Trends Anal Chem.* 2015;73:19-38.
50. Ocaña-González JA, Fernández-Torres R, Bello-López MÁ, Ramos-Payán M. New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review. *Anal Chim Acta.* 2016;905:8-23.
51. Musshoff F, Lachenmeier DW, Kroener L, Madea B. Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples. *J Chromatogr A.* 2002;958(1):231-238.
52. Vallecillos L, Borrull F, Sanchez JM, Pocurull E. Sorbent-packed needle microextraction trap for synthetic musks determination in wastewater samples. *Talanta.* 2015;132:548-556.
53. Tang S, Lee HK. Syringe needle-based sampling coupled with liquid-phase extraction for determination of the three-dimensional distribution of l-ascorbic acid in apples. *Food Chem.* 2016;199:533-540.
54. McComb ME, Oleschuk RD, Giller E, Gesser HD. Microextraction of volatile organic compounds using the inside needle capillary adsorption trap (INCAT) device. *Talanta.* 1997;44(11):2137-2143.
55. Dong G, Zhu Y, Tian H, Li F, Xin S, Qin Y. Solid phase microextraction and determination of dichromate in aqueous solution based on pine needle powder-modified carbon paste electrode by potentiometry. *Res Chem Intermed.* 2013;41(2):1191-1201.
56. Matysik S, Matysik F-M. Microextraction by packed sorbent coupled with gas chromatography—mass spectrometry: application to the determination of metabolites of monoterpenes in small volumes of human urine. *Microchim Acta.* 2009;166(1-2):109-114.

- 57.** Mieth M, Kischkel S, Schubert JK, Hein D, Miekisch W. Multibed needle trap devices for on site sampling and preconcentration of volatile breath biomarkers. *Anal Chem.* 2009;81(14):5851-5857.
- 58.** Zhan W, Pawliszyn J. Investigation and optimization of particle dimensions for needle trap device as an exhaustive active sampler. *J Chromatogr A.* 2012;1260:54-60.
- 59.** Porto-Figueira P, Freitas A, Cruz CJ, Figueira J, Câmara JS. Profiling of passion fruit volatiles: An effective tool to discriminate between species and varieties. *Food Res Int.* 2015;77:408-418.
- 60.** Bajtarevic A, Ager C, Pienz M, Klieber M, Schwarz K, Ligor M, Ligor T, Filipiak W, Denz H, Fiegl M, Hilbe W, Weiss W, Lukas P, Jamnig H, Hackl M, Haidenberger A, Buszewski B, Miekisch W, Schubert J, Amann A. Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath. *BMC Cancer.* 2009;9:348.
- 61.** Carasek E, Pawliszyn J. Screening of tropical fruit volatile compounds using solid-phase microextraction (SPME) fibers and internally cooled SPME fiber. *J Agric Food Chem.* 2006;54(23):8688-8696.
- 62.** Cozzolino R, De Magistris L, Saggese P, Stocchero M, Martignetti A, Di Stasio M, Malorni A, Marotta R, Boscaino F, Malorni L. Use of solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for determination of urinary volatile organic compounds in autistic children compared with healthy controls. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(19):4649-4662.
- 63.** Tölgyessy P, Hrivňák J, Král'ovičová E, Barloková D. Improved on-column injection system and large volume needle trap device used in water headspace analysis. *Chromatographia.* 2010;71(9-10):953-955.
- 64.** Přikryl P, Kubinec R, Jurdáková H, Ševčík J, Ostrovský I, Soják L, Berezkin V. Comparison of needle concentrator with SPME for GC determination of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in aqueous samples. *Chromatographia.* 2006;64(1-2):65-70.
- 65.** Lipinski J. Automated solid phase dynamic extraction—Extraction of organics using a wall coated syringe needle. *Fresenius' J Anal Chem.* 2001;369(1):57-62.
- 66.** Jochmann MA, Kmiecik MP, Schmidt TC. Solid-phase dynamic extraction for the enrichment of polar volatile organic compounds from water. *J Chromatogr A.* 2006;1115(1-2):208-216.

67. Bicchi C, Cordero C, Liberto E, Rubiolo P, Sgorbini B. Automated headspace solid-phase dynamic extraction to analyse the volatile fraction of food matrices. *J Chromatogr A*. 2004;1024(1-2):217-226.
68. Chatzimitakos T, Binellas C, Maidatsi K, Stalikas C. Magnetic ionic liquid in stirring-assisted drop-breakup microextraction: Proof-of-concept extraction of phenolic endocrine disrupters and acidic pharmaceuticals. *Anal Chim Acta*. 2016;910:53-59.
69. Dong L, Shen X, Deng C. Development of gas chromatography–mass spectrometry following headspace single-drop microextraction and simultaneous derivatization for fast determination of the diabetes biomarker, acetone in human blood samples. *Anal Chim Acta*. 2006;569(1-2):91-96.
70. Liang P, Liu R, Cao J. Single drop microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry for determination of lead in biological samples. *Microchim Acta*. 2007;160(1-2):135-139.
71. Trefz P, Kischkel S, Hein D, James ES, Schubert JK, Miekisch W. Needle trap microextraction for VOC analysis: effects of packing materials and desorption parameters. *J Chromatogr A*. 2012;1219:29-38.
72. Trefz P, Rosner L, Hein D, Schubert JK, Miekisch W. Evaluation of needle trap microextraction and automatic alveolar sampling for point-of-care breath analysis. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(10):3105-3115.
73. Raschdorf F. Short-term measurements of toxic substances at work site. *Chimia*. 1978;32(12):478-483.
74. Qin T, Xu X, Polák T, Pacáková V, Štulík K, Jech L. A simple method for the trace determination of methanol, ethanol, acetone and pentane in human breath and in the ambient air by preconcentration on solid sorbents followed by gas chromatography. *Talanta*. 1997;44(9):1683-1690.
75. Koziel JA, Odziemkowski M, Pawliszyn J. Sampling and analysis of airborne particulate matter and aerosols using in-needle trap and SPME fiber devices. *Anal Chem*. 2001;73(1):47-54.
76. Wang A, Fang F, Pawliszyn J. Sampling and determination of volatile organic compounds with needle trap devices. *J Chromatogr A*. 2005;1072(1):127-135.
77. Eom I-Y, Tugulea A-M, Pawliszyn J. Development and application of needle trap devices. *J Chromatogr A*. 2008;1196:3-9.

- 78.** Warren JM, Pawliszyn J. Development and evaluation of needle trap device geometry and packing methods for automated and manual analysis. *J Chromatogr A*. 2011;1218(50):8982-8988.
- 79.** Lou DW, Lee X, Pawliszyn J. Extraction of formic and acetic acids from aqueous solution by dynamic headspace-needle trap extraction temperature and pH optimization. *J Chromatogr A*. 2008;1201(2):228-234.
- 80.** Eom IY, Pawliszyn J. Simple sample transfer technique by internally expanded desorptive flow for needle trap devices. *J Sep Sci*. 2008;31(12):2283-2287.
- 81.** Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Fundamentals of analytical chemistry*. 9 ed. Belmont: Brooks/Cole, Cengage Learning; 2004.
- 82.** Food Agriculture Organization of the United Nations FAO. *Combined compendium of food additive specifications: analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in food additive specifications*: FAO; 2005.
- 83.** Niessen WM. *Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Basileia: Marcel Dekker; 2001.
- 84.** Hübschmann H-J. *Handbook of GC-MS: Fundamentals and Applications*. 3 ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2015.
- 85.** Fidelis CHdV. Considerações acerca do uso de hidrogênio como gás de arraste para cromatografia gasosa. *Scientia Chromatographica*. 2011;3(4):291-299.
- 86.** Miekisch W, Herbig J, Schubert JK. Data interpretation in breath biomarker research: pitfalls and directions. *J Breath Res*. 2012;6(3):036007.
- 87.** Kettaneh N, Berglund A, Wold S. PCA and PLS with very large data sets. *Comput Stat Data Anal*. 2005;48(1):69-85.
- 88.** Smolinska A, Hauschild AC, Fijten RR, Dallinga JW, Baumbach J, van Schooten FJ. Current breathomics-a review on data pre-processing techniques and machine learning in metabolomics breath analysis. *J Breath Res*. 2014;8(2):027105.
- 89.** Malley JD, Dasgupta A, Moore JH. The limits of p-values for biological data mining. *BioData Min*. 2013;6(10):1-2.
- 90.** Ballabio D, Consonni V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Anal Methods*. 2013;5(16):3790.
- 91.** Bijlsma S, Bobeldijk I, Verheij ER, Ramaker R, Kochhar S, Macdonald IA, Van Ommen B, Smilde AK. Large-scale human metabolomics studies: a strategy for data (pre-) processing and validation. *Anal Chem*. 2006;78(2):567-574.

92. Westerhuis JA, Hoefsloot HCJ, Smit S, Vis DJ, Smilde AK, van Velzen EJJ, van Duijnhoven JPM, van Dorsten FA. Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics*. 2008;4(1):81-89.
93. Al-Shayea QK. Artificial neural networks in medical diagnosis. *IJCSI*. 2011;8(2):150-154.
94. Amato F, López A, Peña-Méndez EM, Vañhara P, Hampl A, Havel J. Artificial neural networks in medical diagnosis. *J Appl Biomed*. 2013;11(2):47-58.
95. Marco S. The need for external validation in machine olfaction: emphasis on health-related applications. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(16):3941-3956.
96. El-Sayed A. The pherobase: database of insect pheromones and semiochemicals 2015. Disponível em: <http://www.pherobase.com> Acedido em: 29-02-2016-
97. Stein SE. Retention indices in NIST Chemistry WebBook, NIST standard reference database number 69. Gaithersburg MD, 20899: National Institute of Standards and Technology. Disponível em: <http://webbook.nist.gov>. Acedido em 29-02-2016.
98. Monteiro M, Carvalho M, Henrique R, Jeronimo C, Moreira N, de Lourdes Bastos M, de Pinho PG. Analysis of volatile human urinary metabolome by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry for biomarker discovery: application in a pilot study to discriminate patients with renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2014;50(11):1993-2002.
99. Perestrelo R, Barros AS, Rocha SM, Camara JS. Optimisation of solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry based methodology to establish the global volatile signature in pulp and skin of *Vitis vinifera* L. grape varieties. *Talanta*. 2011;85(3):1483-1493.
100. Leardi R. Experimental design in chemistry: A tutorial. *Anal Chim Acta*. 2009;652(1-2):161-172.
101. Hibbert DB. Experimental design in chromatography: a tutorial review. *J Chromatogr B*. 2012;910:2-13.
102. Rocha SM, Caldeira M, Carrola J, Santos M, Cruz N, Duarte IF. Exploring the human urine metabolomic potentialities by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2012;1252:155-163.
103. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap*. 2010;154(2):103-116.
104. Pawliszyn J. Handbook of solid phase microextraction: Elsevier; 2011.
105. Wercinski SA. Solid phase microextraction: a practical guide. Nova Iorque: CRC Press; 1999.

- 106.** Schmidt K, Podmore I. Current challenges in volatile organic compounds analysis as potential biomarkers of cancer. *J Biomarkers*. 2015;2015:1-16.
- 107.** Pleil JD, Stiegel MA, Risby TH. Clinical breath analysis: discriminating between human endogenous compounds and exogenous (environmental) chemical confounders. *J Breath Res*. 2013;7(1):017107.
- 108.** de Lacy Costello B, Amann A, Al-Kateb H, Flynn C, Filipiak W, Khalid T, Osborne D, Ratcliffe N. A review of the volatiles from the healthy human body. *J Breath Res*. 2014;8(1):014001.
- 109.** Buszewski B, Ulanowska A, Ligor T, Jackowski M, Klodzinska E, Szeliga J. Identification of volatile organic compounds secreted from cancer tissues and bacterial cultures. *J Chromatogr B*. 2008;868(1-2):88-94.
- 110.** Blom HJ, Boers G, Van Den Elzen J, Gahl WA, Tangerman A. Transamination of methionine in humans. *Clin Sci*. 1989;76(1):43-49.
- 111.** Scislawski PW, Pickard K. The regulation of transaminative flux of methionine in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 1994;314(2):412-416.
- 112.** Tangerman A. Measurement and biological significance of the volatile sulfur compounds hydrogen sulfide, methanethiol and dimethyl sulfide in various biological matrices. *J Chromatogr B*. 2009;877(28):3366-3377.
- 113.** Schöller C, Molin S, Wilkins K. Volatile metabolites from some gram-negative bacteria. *Chemosphere*. 1997;35(7):1487-1495.
- 114.** Garner CE, Smith S, de Lacy Costello B, White P, Spencer R, Probert CS, Ratcliffe NM. Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. *The FASEB Journal*. 2007;21(8):1675-1688.
- 115.** Michal G, Schomburg D. *Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology*. Nova Iorque: Wiley; 1999.
- 116.** Filipiak W, Sponring A, Baur MM, Filipiak A, Ager C, Wiesenhofer H, Nagl M, Troppmair J, Amann A. Molecular analysis of volatile metabolites released specifically by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol*. 2012;12(113):1-16.
- 117.** Hasnip S, Crews C, Castle L. Some factors affecting the formation of furan in heated foods. *Food Addit Contam*. 2006;23(3):219-227.
- 118.** Figueira J, Câmara H, Pereira J, Câmara JS. Evaluation of volatile metabolites as markers in *Lycopersicon esculentum* L. cultivars discrimination by multivariate analysis of headspace solid phase microextraction and mass spectrometry data. *Food Chem*. 2014;145:653-663.

- 119.** Wegener J-W, López-Sánchez P. Furan levels in fruit and vegetables juices, nutrition drinks and bakery products. *Anal Chim Acta*. 2010;672(1):55-60.
- 120.** Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, Djoumbou Y, Mandal R, Aziat F, Dong E, Bouatra S, Sinelnikov I, Arndt D, Xia J, Liu P, Yallou F, Bjorn Dahl T, Perez-Pineiro R, Eisner R, Allen F, Neveu V, Greiner R, Scalbert A. HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D801-807.
- 121.** Fabietti F, Ambruzzi A, Delise M, Sprechini M. Monitoring of the benzene and toluene contents in human milk. *Environ Int*. 2004;30(3):397-401.
- 122.** Cuevas-Glory LF, Pino JA, Santiago LS, Sauri-Duch E. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chem*. 2007;103(3):1032-1043.
- 123.** Hanai Y, Shimono K, Oka H, Baba Y, Yamazaki K, Beauchamp GK. Analysis of volatile organic compounds released from human lung cancer cells and from the urine of tumor-bearing mice. *Cancer Cell Int*. 2012;12(7):1-13.
- 124.** Preuss R, Angerer J, Drexler H. Naphthalene - an environmental and occupational toxicant. *Int Arch Occup Environ Health*. 2003;76(8):556-576.
- 125.** Pereira J, Porto-Figueira P, Cavaco C, Taunk K, Rapole S, Dhakne R, Nagarajaram H, Câmara JS. Breath analysis as a potential and non-invasive frontier in disease diagnosis: An overview. *Metabolites*. 2015;5(1):3-55.
- 126.** Miekisch W, Schubert JK, Noeldge-Schomburg GF. Diagnostic potential of breath analysis - focus on volatile organic compounds. *Clin Chim Acta*. 2004;347(1-2):25-39.
- 127.** Hakim M, Broza YY, Barash O, Peled N, Phillips M, Amann A, Haick H. Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways. *Chem Rev*. 2012;112(11):5949-5966.
- 128.** Ulanowska A, Kowalkowski T, Trawińska E, Buszewski B. The application of statistical methods using VOCs to identify patients with lung cancer. *J Breath Res*. 2011;5(4):046008
- 129.** Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2008;4(6):697-720.
- 130.** O'Brien PJ, Siraki AG, Shangari N. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Crit Rev Toxicol*. 2005;35(7):609-662.
- 131.** Toloza AC, Zygadlo J, Mougabure Cueto G, Biurrun F, Zerba E, Picollo MI. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant

Pediculus humanus capitis (Anoplura: *Pediculidae*) from Argentina. *J Med Entomol*. 2006;43(5):889-895.

132. Luís Â, Duarte A, Gominho J, Domingues F, Duarte AP. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Ind Crops Prod*. 2016;79:274-282.

133. Msaada K, Hosni K, Taarit MB, Chahed T, Kchouk ME, Marzouk B. Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. *Food Chem*. 2007;102(4):1131-1134.

134. Gonçalves JL, Figueira JA, Rodrigues FP, Ornelas LP, Branco RN, Silva CL, Câmara JS. A powerful methodological approach combining headspace solid phase microextraction, mass spectrometry and multivariate analysis for profiling the volatile metabolomic pattern of beer starting raw materials. *Food Chem*. 2014;160:266-280.

135. Filipiak W, Sponring A, Mikoviny T, Ager C, Schubert J, Miekisch W, Amann A, Troppmair J. Release of volatile organic compounds (VOCs) from the lung cancer cell line CALU-1 in vitro. *Cancer Cell Int*. 2008;8(17).

136. Amal H, Shi DY, Ionescu R, Zhang W, Hua QL, Pan YY, Tao L, Liu H, Haick H. Assessment of ovarian cancer conditions from exhaled breath. *Int J Cancer*. 2015;136(6):E614-E622.

137. Morisco F, Aprea E, Lembo V, Fogliano V, Vitaglione P, Mazzone G, Cappellin L, Gasperi F, Masone S, De Palma GD, Marmo R, Caporaso N, Biasioli F. Rapid "breath-print" of liver cirrhosis by proton transfer reaction time-of-flight mass spectrometry. A pilot study. *PLoS One*. 2013;8(4):e59658.

138. Kischkel S, Miekisch W, Sawacki A, Straker EM, Trefz P, Amann A, Schubert JK. Breath biomarkers for lung cancer detection and assessment of smoking related effects-confounding variables, influence of normalization and statistical algorithms. *Clin Chim Acta*. 2010;411(21-22):1637-1644.

139. Fu XA, Li M, Knipp RJ, Nantz MH, Bousamra M. Noninvasive detection of lung cancer using exhaled breath. *Cancer Med*. 2014;3(1):174-181.

140. Bos LD, Sterk PJ, Schultz MJ. Volatile metabolites of pathogens: a systematic review. *PLoS Pathog*. 2013;9(5):e1003311.

141. Agapiou A, Amann A, Mochalski P, Statheropoulos M, Thomas C. Trace detection of endogenous human volatile organic compounds for search, rescue and emergency applications. *Trends Anal Chem*. 2015;66:158-175.

- 142.** Sponring A, Filipiak W, Mikoviny T, Ager C, Schubert J, Miekisch W, Amann A, Troppmair J. Release of volatile organic compounds from the lung cancer cell line NCI-H2087 in vitro. *Anticancer Res.* 2009;29(1):419-426.
- 143.** Sponring A, Filipiak W, Ager C, Schubert J, Miekisch W, Amann A, Troppmair J. Analysis of volatile organic compounds (VOCs) in the headspace of NCI-H1666 lung cancer cells. *Cancer Biomark.* 2010;7(3):153-161.
- 144.** Hanai Y, Shimono K, Matsumura K, Vachani A, Albelda S, Yamazaki K, Beauchamp GK, Oka H. Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 2012;76(4):679-684.
- 145.** Min K, Kim S, Yum T, Kim Y, Sang B-I, Um Y. Conversion of levulinic acid to 2-butanone by acetoacetate decarboxylase from *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(12):5627-5634.
- 146.** Oomah BD, Razafindrainibe M, Drover JC. Headspace volatile components of Canadian grown low-tannin faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes. *J Sci Food Agric.* 2014;94(3):473-481.
- 147.** Yoneda H, Tantillo DJ, Atsumi S. Biological Production of 2-Butanone in *Escherichia coli*. *ChemSusChem.* 2014;7(1):92-95.
- 148.** Farag MA, Ryu C-M, Sumner LW, Paré PW. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry.* 2006;67(20):2262-2268.
- 149.** Zhu J, Bean HD, Kuo Y-M, Hill JE. Fast detection of volatile organic compounds from bacterial cultures by secondary electrospray ionization-mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48(12):4426-4431.
- 150.** Ullmann F, Elvers B. *Encyclopedia of industrial chemistry.* Berlin: VCH; 1991.
- 151.** Walker V, Mills GA. Urine 4-heptanone: a β -oxidation product of 2-ethylhexanoic acid from plasticisers. *Clin Chim Acta.* 2001;306(1):51-61.
- 152.** Raman M, Ahmed I, Gillevet PM, Probert CS, Ratcliffe NM, Smith S, Greenwood R, Sikaroodi M, Lam V, Crotty P. Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11(7):868-875.
- 153.** Chambers ST, Syhre M, Murdoch DR, McCartin F, Epton MJ. Detection of 2-pentylfuran in the breath of patients with *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 2009;47(5):468-476.

- 154.** Chambers ST, Scott-Thomas A, Epton M. Developments in novel breath tests for bacterial and fungal pulmonary infection. *Current opinion in pulmonary disease*. 2012;18(3):228-232.
- 155.** Poli D, Carbognani P, Corradi M, Goldoni M, Acampa O, Balbi B, Bianchi L, Rusca M, Mutti A. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study. *Respir Res*. 2005;6:71.
- 156.** Queralto N, Berliner AN, Goldsmith B, Martino R, Rhodes P, Lim SH. Detecting cancer by breath volatile organic compound analysis: a review of array-based sensors. *J Breath Res*. 2014;8(2):027112.
- 157.** Fuchs P, Loeseke C, Schubert JK, Miekisch W. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. *Int J Cancer*. 2010;126(11):2663-2670.
- 158.** Poli D, Goldoni M, Corradi M, Acampa O, Carbognani P, Internullo E, Casalini A, Mutti A. Determination of aldehydes in exhaled breath of patients with lung cancer by means of on-fiber-derivatisation SPME–GC/MS. *J Chromatogr B*. 2010;878(27):2643-2651.
- 159.** Buszewski B, Ligor T, Jezierski T, Wenda-Piesik A, Walczak M, Rudnicka J. Identification of volatile lung cancer markers by gas chromatography-mass spectrometry: comparison with discrimination by canines. *Anal Bioanal Chem*. 2012;404(1):141-146.
- 160.** Penhoet EE, Petitti DB, Joy JE. Saving women's lives: strategies for improving breast cancer detection and diagnosis. Washington: The National Academies Press; 2005.
- 161.** Deng C, Zhang X, Li N. Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2004;808(2):269-277.
- 162.** Rudnicka J, Kowalkowski T, Ligor T, Buszewski B. Determination of volatile organic compounds as biomarkers of lung cancer by SPME–GC–TOF/MS and chemometrics. *J Chromatogr B*. 2011;879(30):3360-3366.

ANEXOS

I. CONSENTIMENTO INFORMADO

<p style="text-align: center;">DETEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADORES VOLÁTEIS EM INDIVÍDUOS COM PATOLOGIAS ONCOLÓGICAS</p>

Projeto HCV - New-Indigo

Consentimento informado

Eu, _____, declaro que após a leitura do documento de informação referente à pesquisa e objetivos do projeto HCV-New Indigo, disponibilizo-me voluntariamente para participar no estudo com a cedência de amostras de urina e saliva, e autorizo o processamento e publicação anónima e confidencial dos dados/resultados obtidos.

O Investigador

O Declarante

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA



II. Tabela dos Metabolitos (> 90% Frequência de ocorrência)

Tabela Suplementar. Metabolitos identificados nos grupos de estudo após extração por NTME e análise por GC-MS.

Compostos	Cancro do cólon (N=30)					Cancro do pulmão (N=17)					Cancro da mama (N=30)					Controlo (N=30)				
	Freq ^b	AVG ^c	Min ^d	Max ^e		Freq	AVG	Min	Max		Freq	AVG	Min	Max		Freq	AVG	Min	Max	
Pentano	100	1,8E+05	5,8E+04	5,3E+05		82	1,1E+05	n.d.	2,0E+05		100	2,0E+05	4,1E+04	5,4E+05		100	6,3E+04	2,0E+04	1,6E+05	
Clorometano	100	5,5E+05	2,8E+04	5,6E+06		71	1,1E+06	n.d.	3,4E+06		100	4,7E+05	1,6E+04	3,1E+06		100	1,5E+05	6,2E+03	2,4E+06	
Hexano	100	7,1E+04	2,8E+04	2,0E+05		100	7,5E+04	1,0E+04	4,4E+05		100	5,0E+04	1,3E+04	1,5E+05		97	5,1E+04	n.d.	2,8E+05	
Éter etílico	100	8,6E+04	1,8E+04	3,0E+05		94	1,8E+04	n.d.	2,6E+04		100	4,5E+04	1,9E+04	1,7E+05		87	1,5E+04	n.d.	4,7E+04	
Isopreno	100	1,7E+06	2,1E+05	7,6E+06		100	9,4E+05	4,8E+05	3,4E+06		100	1,4E+06	3,2E+05	5,0E+06		100	8,0E+05	2,9E+05	1,7E+06	
Metanolol	100	2,4E+06	6,6E+05	8,1E+06		100	1,6E+06	1,8E+05	7,6E+06		100	2,0E+06	5,0E+05	4,2E+06		100	1,3E+06	2,8E+05	4,0E+06	
Etanal	100	8,7E+05	2,8E+04	5,0E+06		88	3,5E+06	n.d.	1,5E+07		100	5,8E+05	2,6E+05	1,2E+06		97	5,1E+05	n.d.	2,2E+06	
Dissulfureto de carbono	100	1,2E+06	1,1E+05	9,0E+06		100	1,1E+06	1,1E+05	4,9E+06		100	4,9E+05	1,0E+05	1,3E+06		100	2,0E+05	6,0E+04	4,3E+05	
2,4,4-trimetil-1-penteno	87	9,0E+04	n.d.	5,3E+05		82	3,3E+04	n.d.	9,0E+04		100	7,0E+04	1,7E+04	5,6E+05		83	3,7E+04	n.d.	2,4E+05	
Dimetilsulfureto (DMS)	97	1,8E+05	n.d.	6,7E+05		94	6,7E+04	n.d.	1,5E+05		100	1,5E+05	5,3E+04	4,5E+05		100	8,2E+04	8,9E+03	2,0E+05	
<i>trans</i> -2-Metil-1,3-pentadieno	97	4,0E+04	n.d.	3,1E+05		100	9,4E+04	7,7E+03	1,1E+06		100	3,2E+04	9,0E+03	9,3E+04		83	1,7E+04	n.d.	3,0E+04	
Furano	100	3,9E+07	1,1E+07	6,8E+07		100	1,9E+07	4,6E+05	4,3E+07		100	3,7E+07	1,6E+07	5,7E+07		100	2,0E+07	1,2E+07	3,8E+07	
Acetona	100	3,6E+07	9,7E+06	8,0E+07		100	2,6E+07	1,0E+07	3,7E+07		100	3,0E+07	1,4E+07	4,2E+07		100	3,7E+07	1,2E+07	1,4E+08	
Dióxido de enxofre	97	5,0E+05	n.d.	5,7E+06		0	n.d.	n.d.	n.d.		90	1,3E+05	1,1E+04	5,7E+05		37	9,3E+05	n.d.	2,6E+06	
2,2,4,5,5-Tetrametil-tetrahidro furano	100	1,4E+06	1,0E+05	3,6E+07		100	5,2E+05	3,0E+05	8,9E+05		100	7,8E+05	2,0E+05	4,0E+06		93	4,9E+06	n.d.	5,2E+07	
2-Metil furano	100	6,5E+06	1,1E+06	1,4E+07		100	3,2E+06	9,5E+05	5,2E+06		100	5,3E+06	1,8E+06	9,3E+06		100	3,0E+06	1,3E+06	6,5E+06	
Butanal	97	4,2E+04	n.d.	1,2E+05		41	6,2E+04	n.d.	1,1E+05		100	5,7E+04	3,6E+04	1,2E+05		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

Acetato de etilo	70	4.9E+06	n.d.	1.6E+07	59	2.6E+06	n.d.	5.1E+06	97	4.1E+06	n.d.	1.3E+07	87	4.8E+06	n.d.	1.3E+07
2-Butanona	100	6.7E+06	6.6E+05	2.0E+07	94	4.1E+06	n.d.	5.8E+06	100	6.7E+06	1.9E+06	1.5E+07	100	5.1E+06	9.4E+05	1.3E+07
2-Metil-3-pentanol	100	2.7E+06	1.7E+06	3.8E+06	82	6.4E+05	n.d.	1.3E+06	100	2.5E+06	7.6E+05	3.6E+06	97	2.1E+06	n.d.	5.0E+06
2-Metil butanal	90	5.0E+05	n.d.	2.8E+06	88	4.7E+05	n.d.	8.4E+05	97	6.8E+05	n.d.	2.7E+06	83	2.6E+05	n.d.	6.1E+05
Diclorometano	83	6.4E+05	n.d.	7.3E+06	82	7.0E+05	n.d.	2.8E+06	100	9.7E+05	7.5E+04	5.5E+06	60	7.7E+05	n.d.	3.4E+06
3-Metil-2-butanona	100	1.8E+06	4.4E+05	6.7E+06	100	8.5E+05	4.1E+05	1.7E+06	100	1.7E+06	4.1E+05	2.9E+06	90	1.6E+06	n.d.	1.0E+07
Benzeno	100	2.5E+05	2.1E+04	3.9E+06	100	6.3E+04	2.6E+04	1.8E+05	97	3.0E+05	n.d.	2.3E+06	80	3.5E+05	n.d.	3.6E+06
1,6-Dimetilhepta-1,3,5-trieno	93	5.1E+05	n.d.	1.0E+06	100	4.1E+05	1.3E+05	7.4E+05	100	8.5E+05	8.9E+04	2.0E+06	93	2.5E+05	n.d.	5.4E+05
2,5-Dimetil furano	67	9.3E+05	n.d.	1.9E+06	100	5.5E+05	1.0E+05	1.3E+06	73	7.2E+05	n.d.	1.9E+06	80	8.4E+05	n.d.	2.8E+06
2-Etil furano	63	1.2E+06	n.d.	8.0E+06	100	7.0E+05	1.4E+05	2.2E+06	50	1.1E+06	n.d.	2.8E+06	70	5.4E+05	n.d.	8.6E+05
Sulfureo de alilo	60	2.7E+05	n.d.	9.6E+05	88	9.8E+05	n.d.	3.6E+06	100	3.5E+05	9.1E+04	1.3E+06	77	5.5E+05	n.d.	1.7E+06
1,2,5,5-Tetrametil-1,3-ciclopentadieno	100	2.8E+05	2.2E+04	5.7E+05	100	2.0E+05	7.3E+04	3.6E+05	100	4.8E+05	4.8E+04	1.1E+06	100	1.5E+05	6.7E+04	3.4E+05
3-Metil-2-ciclopenteno-1-ona	87	5.0E+05	n.d.	1.9E+06	94	4.2E+05	n.d.	1.3E+06	97	3.0E+05	n.d.	1.7E+06	63	4.9E+05	n.d.	2.7E+06
2-Pentanona	100	1.9E+07	1.6E+06	5.9E+07	100	1.4E+07	4.1E+06	2.5E+07	100	2.3E+07	3.3E+06	6.1E+07	100	1.7E+07	3.3E+06	7.4E+07
2-Metil-3-pentanona	67	3.2E+05	n.d.	1.7E+06	76	2.1E+05	n.d.	7.7E+05	100	2.8E+05	4.1E+04	9.5E+05	87	6.4E+05	n.d.	2.6E+06
2,4-Dimetil-3-pentanona	100	7.1E+05	6.7E+04	3.9E+06	100	4.7E+06	1.3E+05	2.0E+07	100	1.2E+06	1.0E+05	6.2E+06	100	1.3E+06	1.1E+05	5.4E+06
3,3-Dimetil-6-metilenciclohexeno	100	2.1E+05	2.4E+04	4.3E+05	100	1.6E+05	5.7E+04	3.1E+05	100	3.6E+05	3.8E+04	1.0E+06	93	1.0E+05	n.d.	2.2E+05
3-Metil-2-pentanona	100	1.4E+06	1.5E+05	3.3E+06	100	1.2E+06	3.6E+05	2.6E+06	97	1.7E+06	n.d.	5.1E+06	100	1.1E+06	2.0E+05	5.6E+06
2-Hexanona	100	7.5E+05	4.9E+04	1.8E+06	100	9.0E+05	2.4E+05	2.3E+06	100	9.7E+05	2.8E+05	2.3E+06	100	4.9E+05	1.3E+05	3.0E+06
Tioloeno	100	4.7E+05	7.1E+04	2.3E+06	100	1.9E+05	5.1E+04	3.9E+05	100	4.5E+05	1.4E+05	8.0E+05	100	2.4E+05	7.7E+04	1.0E+06
1,3-Dimetil-1-ciclohexeno	93	2.0E+06	n.d.	5.6E+06	100	9.5E+05	1.5E+05	1.9E+06	100	1.9E+06	2.9E+05	7.7E+06	100	8.8E+05	1.5E+05	2.8E+06
Tolueno	97	4.1E+06	n.d.	3.3E+07	100	8.7E+05	2.5E+05	3.5E+06	100	2.1E+06	3.4E+05	4.5E+06	100	2.1E+06	3.6E+05	5.5E+06

3-Hexanona	100	9,1E+05	7,4E+04	2,5E+06	100	7,1E+05	1,8E+05	1,8E+06	100	9,3E+05	1,5E+05	2,5E+06	100	1,7E+06	1,3E+05	7,0E+06
2-Etil-4-metilimidazol	100	3,5E+05	3,0E+04	1,2E+06	100	1,5E+05	3,4E+04	2,8E+05	100	3,4E+05	9,1E+04	9,7E+05	100	2,4E+05	6,1E+04	7,8E+05
2-Metil-3-hexanona	100	5,5E+05	6,3E+04	2,6E+06	94	6,0E+05	n.d.	1,5E+06	100	5,4E+05	1,5E+05	1,2E+06	60	9,9E+05	n.d.	4,1E+06
Dimetildisulfureto (DMDS)	100	8,8E+07	2,3E+07	1,2E+08	100	9,8E+07	1,5E+07	1,8E+08	100	1,1E+08	5,3E+07	1,6E+08	100	1,0E+08	5,9E+07	1,6E+08
Hexanal	100	5,6E+05	1,5E+05	1,8E+06	100	9,3E+05	5,4E+05	1,6E+06	100	4,7E+05	1,2E+05	1,2E+06	93	3,6E+05	n.d.	3,8E+06
3-Etil-2-pentanona	63	3,4E+05	n.d.	8,1E+05	76	3,4E+05	n.d.	7,0E+05	93	8,2E+05	n.d.	6,2E+06	53	2,3E+05	n.d.	4,1E+05
2-Metilfenolo	90	2,7E+05	n.d.	1,4E+06	100	1,7E+05	3,1E+04	3,7E+05	100	2,7E+05	5,9E+04	7,2E+05	97	1,9E+05	n.d.	6,4E+05
trans-2-Metil-2-butenal	100	1,8E+05	4,5E+04	1,4E+06	100	1,4E+05	6,6E+04	4,1E+05	100	1,9E+05	6,4E+04	6,2E+05	83	1,2E+05	n.d.	4,2E+05
6,6-Dimetilhepta-2,4-dieno	100	1,2E+05	2,4E+04	2,5E+05	100	1,3E+05	1,8E+04	5,0E+05	97	1,1E+05	n.d.	2,2E+05	93	7,6E+04	n.d.	1,5E+05
2-Etil-5-metil furano	87	8,2E+04	n.d.	4,2E+05	94	8,3E+05	n.d.	4,3E+06	100	1,0E+05	2,1E+04	2,7E+05	73	1,2E+05	n.d.	6,6E+05
Limetol	93	3,6E+05	n.d.	1,8E+06	100	1,4E+05	2,3E+04	2,5E+05	100	2,0E+05	2,8E+04	6,4E+05	100	2,5E+05	3,8E+04	1,0E+06
7,7-Dimetil-9-oxatriciclo[6.2.2.0(1.6)]dodecan-10-ona	100	2,3E+05	6,3E+04	1,0E+06	94	1,6E+05	n.d.	2,5E+05	100	2,1E+05	7,0E+04	3,6E+05	93	1,3E+05	n.d.	2,9E+05
4-Heptanona	100	5,3E+07	1,9E+06	2,8E+08	100	5,0E+07	5,1E+06	1,8E+08	100	6,8E+07	7,6E+06	2,7E+08	100	3,0E+07	6,2E+06	6,9E+07
p-Xileno	100	2,1E+05	3,4E+04	2,0E+06	100	1,1E+05	3,4E+04	1,8E+05	100	6,5E+05	4,8E+04	3,5E+06	100	2,4E+05	4,7E+04	1,8E+06
1,5,5-Trimetil-6-metileno-ciclohexeno	100	2,8E+05	6,5E+04	1,2E+06	100	1,7E+05	3,7E+04	3,5E+05	100	2,6E+05	6,7E+04	4,7E+05	100	1,6E+05	6,0E+04	3,6E+05
Metil-etil-dissulfureto	70	4,5E+04	n.d.	1,8E+05	94	6,9E+04	n.d.	2,7E+05	100	5,5E+04	1,7E+04	1,5E+05	97	5,5E+04	n.d.	2,3E+05
Diallyl dissulfureto	57	1,2E+05	n.d.	2,4E+05	65	2,1E+05	n.d.	8,0E+05	93	2,0E+05	n.d.	5,2E+05	70	1,5E+05	n.d.	3,3E+05
α -Felandreno	73	1,5E+05	n.d.	4,6E+05	76	3,9E+04	n.d.	7,5E+04	100	7,1E+04	1,9E+04	1,7E+05	90	1,1E+05	n.d.	4,4E+05
α -Terpineno	100	3,1E+06	6,6E+04	1,4E+07	100	7,1E+05	7,9E+04	2,1E+06	100	1,5E+06	1,4E+05	3,9E+06	100	2,4E+06	1,4E+05	1,3E+07
1,4-Cineole	100	8,7E+05	5,4E+04	6,5E+06	100	4,2E+05	3,6E+04	2,5E+06	100	4,5E+05	3,9E+04	9,3E+05	100	1,2E+06	6,2E+04	4,8E+06
o-Xileno	53	2,0E+05	n.d.	1,3E+06	88	6,6E+04	n.d.	4,2E+05	97	3,7E+05	n.d.	1,7E+06	77	2,1E+05	n.d.	1,4E+06
Limoneno	70	1,0E+05	n.d.	4,5E+05	65	6,2E+04	n.d.	1,4E+05	97	6,0E+04	n.d.	1,2E+05	63	1,1E+05	n.d.	3,8E+05

2-Heptanona	100	8.5E+05	7.3E+04	2.7E+06	100	1.0E+06	1.5E+05	2.8E+06	100	1.1E+06	1.3E+05	4.9E+06	100	4.8E+05	1.3E+05	1.4E+06
Camphorquinone	77	2.8E+04	n.d.	5.1E+04	71	8.0E+04	n.d.	2.6E+05	100	3.0E+04	1.2E+04	4.9E+04	70	3.3E+04	n.d.	7.4E+04
Eucaliptol	90	3.7E+05	n.d.	3.1E+06	82	3.3E+05	n.d.	1.3E+06	100	2.1E+05	6.7E+04	3.1E+05	97	4.8E+05	n.d.	2.1E+06
3-Etiltolueno	87	2.0E+05	n.d.	4.3E+05	88	1.0E+05	n.d.	2.3E+05	100	2.5E+05	3.0E+04	5.1E+05	90	2.3E+05	n.d.	6.9E+05
2-Pentil furano	100	7.7E+05	1.2E+05	1.8E+06	100	8.7E+05	2.2E+05	2.7E+06	100	8.3E+05	1.5E+05	1.6E+06	97	5.0E+05	n.d.	1.2E+06
γ -Terpineno	100	9.3E+05	5.1E+04	4.0E+06	100	3.1E+05	3.0E+04	1.2E+06	100	5.0E+05	4.4E+04	1.3E+06	100	1.2E+06	5.6E+04	7.3E+06
1,1,3,3-Tetrametil-ciclopentano	40	1.3E+05	n.d.	2.6E+05	59	4.6E+04	n.d.	1.2E+05	97	4.0E+05	n.d.	4.3E+06	30	7.6E+04	n.d.	3.9E+05
3,4-Dimetilofeno	100	1.1E+06	4.2E+04	7.9E+06	100	3.7E+05	2.9E+04	1.1E+06	100	7.7E+05	4.6E+04	4.0E+06	100	1.2E+06	3.6E+04	7.1E+06
<i>o</i> -Cymene	100	5.9E+07	3.0E+06	3.1E+08	100	1.3E+07	3.3E+06	4.6E+07	100	3.7E+07	1.0E+06	1.3E+08	100	7.0E+07	1.6E+06	2.8E+08
Isoterpinoleno	100	1.5E+06	2.6E+04	8.5E+06	65	2.3E+05	n.d.	4.7E+05	100	6.2E+05	1.6E+04	1.9E+06	97	8.3E+05	n.d.	5.3E+06
Dissulfuro de metil-alilo	100	1.5E+06	8.4E+04	7.2E+06	100	4.6E+06	5.9E+04	1.7E+07	100	3.8E+06	4.0E+05	1.6E+07	100	2.8E+06	9.8E+04	1.2E+07
1,3-Ditiano	100	3.7E+05	1.2E+04	2.9E+06	100	6.6E+05	#DIV/0!	#DIV/0!	100	3.1E+05	2.2E+04	1.8E+06	100	8.9E+05	2.8E+04	9.3E+06
2-Etil- <i>m</i> -xileno	60	1.5E+07	n.d.	9.3E+07	100	9.5E+06	3.8E+04	4.6E+07	67	1.1E+07	n.d.	4.9E+07	83	1.8E+07	n.d.	2.5E+08
2,2,6-Trimetil-1-ciclohexanona	97	2.7E+05	n.d.	1.5E+06	100	8.9E+04	1.8E+04	2.2E+05	100	1.9E+05	2.5E+02	6.6E+05	93	9.3E+04	n.d.	2.7E+05
2,5-Dimetil-2,4-hexadieno	80	2.7E+05	n.d.	2.3E+06	88	6.1E+04	n.d.	1.5E+05	93	1.5E+05	n.d.	3.8E+05	67	1.1E+05	n.d.	6.6E+05
<i>o</i> -Ionenno	63	1.1E+05	n.d.	8.4E+05	76	5.8E+04	n.d.	1.2E+05	100	1.3E+05	2.6E+04	3.7E+05	57	6.2E+04	n.d.	2.7E+05
1,2,3-Trimetilbenzeno	100	8.7E+05	1.2E+04	2.7E+06	100	3.3E+05	7.1E+04	1.0E+06	100	1.6E+06	1.6E+05	3.5E+06	100	4.4E+05	8.7E+04	1.4E+06
2-Metoxi-5-metilofeno	97	2.2E+05	n.d.	1.3E+06	100	1.4E+05	2.0E+04	5.7E+05	100	1.4E+05	3.2E+04	2.7E+05	93	8.3E+04	n.d.	2.4E+05
1,2,3,4-Tetrametil-5-(1-metiletil)-benzeno	53	6.7E+04	n.d.	2.7E+05	65	2.9E+04	n.d.	6.9E+04	90	5.9E+04	n.d.	2.7E+05	30	2.3E+04	n.d.	3.4E+04
Dimetilrisulfuro (DMTS)	100	6.0E+06	1.6E+05	1.6E+07	100	7.5E+06	1.5E+06	1.8E+07	100	1.0E+07	1.5E+06	2.1E+07	100	8.4E+06	1.9E+06	3.6E+07
2-Metil-5-(metilil) furano	100	3.4E+06	2.3E+05	3.3E+07	100	1.1E+06	1.8E+05	3.5E+06	100	9.7E+05	1.6E+05	3.1E+06	97	6.1E+05	n.d.	1.6E+06
β -Isotorona	100	5.6E+05	2.8E+02	7.1E+06	82	8.7E+04	n.d.	2.4E+05	97	5.2E+05	n.d.	1.2E+06	93	1.8E+05	n.d.	1.5E+06

2-(2-Butenil)-1,3,5-trimetilbenzeno	83	1,1E+06	n.d.	2,1E+07	100	5,5E+05	3,0E+04	3,6E+06	100	8,7E+05	9,3E+04	4,3E+06	97	5,5E+05	n.d.	7,5E+06
1-Etenil-3,5-dimetilbenzeno	100	1,7E+07	3,6E+05	9,6E+07	100	4,4E+06	3,9E+05	1,2E+07	100	1,5E+07	2,1E+05	4,5E+07	97	1,9E+07	n.d.	8,4E+07
2,3-Dihidro-1,1,5,6-tetrametil-1H-indeno	100	1,9E+06	1,0E+05	2,1E+07	82	1,2E+06	n.d.	4,0E+06	100	3,6E+06	9,3E+04	1,5E+07	100	1,1E+06	8,3E+04	7,4E+06
1,1,6,7-Tetrametilindano	97	1,3E+06	n.d.	3,3E+06	65	1,1E+06	n.d.	2,1E+06	87	2,8E+06	n.d.	1,0E+07	93	1,2E+06	n.d.	7,5E+06
Dureno	93	2,1E+06	n.d.	1,2E+07	94	6,1E+05	n.d.	3,7E+06	100	6,3E+06	7,2E+04	3,1E+07	90	1,6E+06	n.d.	1,3E+07
Dihidromircenol	93	4,2E+06	n.d.	5,3E+07	88	1,4E+05	n.d.	5,5E+05	100	1,7E+06	4,2E+04	6,0E+06	87	4,6E+05	n.d.	2,9E+06
Ácido acético	90	1,5E+06	n.d.	1,0E+07	94	1,5E+06	n.d.	4,8E+06	100	2,8E+06	2,5E+05	1,5E+07	93	1,7E+06	n.d.	7,1E+06
1,2,5,5,6,7-Hexametilbicyclo[4.1.0]hept-2-en-4-ona	100	2,0E+06	2,1E+04	8,1E+06	94	4,8E+05	n.d.	1,2E+06	100	3,1E+06	5,7E+04	8,2E+06	100	9,6E+05	1,4E+05	6,1E+06
1-(4-Metoxifenil)butano-1,3-diona	100	1,1E+06	1,9E+04	3,9E+06	100	2,7E+05	5,7E+04	6,6E+05	100	1,7E+06	2,6E+04	4,0E+06	100	5,4E+05	7,5E+04	3,4E+06
2-Etil-1-hexanol	63	3,9E+05	n.d.	8,8E+05	100	2,9E+05	3,0E+04	1,3E+06	70	6,1E+05	n.d.	3,3E+06	60	1,9E+05	n.d.	5,5E+05
2-Acetilfurano	87	1,1E+06	n.d.	4,1E+06	100	3,7E+05	8,4E+04	9,6E+05	100	1,1E+06	9,7E+04	2,8E+06	90	5,1E+05	n.d.	1,0E+06
Álcool 3-metoxibenzilo	97	1,0E+06	n.d.	4,1E+06	100	3,1E+05	2,2E+04	9,4E+05	100	1,6E+06	7,8E+04	4,3E+06	93	3,8E+05	n.d.	1,6E+06
1,2,3,4-tetrahidro-1,4,6-trimetilnaftaleno	83	2,6E+05	n.d.	3,9E+06	35	1,1E+05	n.d.	4,0E+05	90	1,5E+05	n.d.	7,2E+05	57	7,9E+04	n.d.	3,6E+05
Trisulfureto de metil-alilo	77	1,2E+05	n.d.	4,1E+05	82	1,8E+05	n.d.	3,8E+05	100	2,8E+05	3,1E+04	1,1E+06	70	1,8E+05	n.d.	4,4E+05
5-Metilfural	83	1,6E+05	n.d.	4,8E+05	100	6,5E+04	2,9E+04	1,3E+05	100	1,3E+05	2,0E+04	5,2E+05	60	9,3E+04	n.d.	3,4E+05
trans-5-Metil-3-(1-metiletenilo)-ciclohexene	90	1,4E+05	n.d.	4,4E+05	100	6,4E+04	3,2E+04	1,2E+05	87	1,4E+05	n.d.	4,7E+05	43	1,1E+05	n.d.	3,1E+05
1,1,4,5-Tetrametilindano	77	4,4E+05	n.d.	3,8E+06	100	2,1E+05	2,2E+04	1,1E+06	100	1,0E+06	5,0E+04	4,1E+06	60	3,0E+05	n.d.	1,0E+06
1,2,3,4-Tetrahidro-1,5,8-trimetilnaftaleno	80	2,8E+05	n.d.	7,7E+05	71	1,5E+05	n.d.	3,7E+05	100	5,5E+05	3,2E+04	1,9E+06	70	1,1E+05	n.d.	4,0E+05
1,1,3-Trimetilindano	87	3,5E+05	n.d.	2,1E+06	100	1,3E+05	1,0E+04	5,1E+05	97	4,4E+05	n.d.	1,2E+06	70	2,5E+05	n.d.	9,0E+05
2,2'-Etilidenobis(5-metilfurano)	83	1,6E+05	n.d.	4,7E+05	76	5,1E+04	n.d.	9,5E+04	100	1,6E+05	7,8E+03	4,7E+05	37	6,3E+04	n.d.	1,0E+05
5-Etenilidihidro-5-metil-2(3H)-furanona	80	2,5E+05	n.d.	6,1E+05	82	1,2E+05	n.d.	2,9E+05	97	3,6E+05	n.d.	9,9E+05	80	1,7E+05	n.d.	5,7E+05

4,7-Dimethylbenzofuran	80	8.5E+05	n.d.	3.9E+06	59	1.3E+05	n.d.	1.9E+05	97	8.3E+05	n.d.	2.9E+06	63	1.0E+06	n.d.	3.5E+06
Dehidro-ar-ioneno	100	2.1E+07	6.8E+05	6.8E+07	100	n.d.	1.3E+06	5.7E+07	100	3.0E+07	1.3E+06	6.5E+07	100	4.6E+06	1.1E+05	1.2E+07
1,2-Dihidro-1,5,8-trimetil-naftaleno	100	3.8E+06	6.0E+04	2.5E+07	100	1.0E+07	1.3E+06	5.7E+07	100	5.8E+06	1.4E+05	2.1E+07	100	3.0E+06	1.2E+05	1.2E+07
1-Alilo-2-metilbenzeno	87	4.9E+05	n.d.	2.5E+06	29	8.7E+04	n.d.	2.2E+05	90	2.7E+05	n.d.	1.1E+06	60	3.2E+05	n.d.	1.6E+06
Damascenone	93	4.3E+05	n.d.	4.3E+06	94	2.0E+05	n.d.	7.2E+05	97	6.8E+05	n.d.	6.4E+06	63	2.9E+05	n.d.	1.2E+06
1,1,3-Trimetil-1H-indeno	83	6.1E+05	n.d.	1.7E+06	94	2.7E+05	n.d.	5.4E+05	97	1.3E+06	n.d.	7.5E+06	77	9.1E+05	n.d.	2.8E+06
2,5,8-Trimetil-1,2-dihidronaftaleno	53	3.8E+05	n.d.	7.0E+05	94	6.2E+05	n.d.	1.9E+06	93	8.9E+05	n.d.	6.6E+06	33	1.0E+06	n.d.	2.0E+06
<i>o</i> -Guaiacol	100	1.3E+06	8.2E+03	7.4E+06	100	5.6E+05	4.7E+04	1.2E+06	100	1.7E+06	2.5E+05	5.8E+06	100	4.4E+05	5.2E+04	1.2E+06
9,10-Dehidro- isolongifoleno	53	4.0E+05	n.d.	3.5E+06	53	2.7E+05	n.d.	5.1E+05	93	4.4E+05	n.d.	1.3E+06	30	8.1E+05	n.d.	2.1E+06
1,2,5,6-Tetrahidro-6-metil-4H-pirrolol[3,2,1-ij]quinolina	80	1.2E+05	n.d.	3.0E+05	59	9.4E+04	n.d.	3.1E+05	97	1.3E+05	n.d.	4.7E+05	63	8.7E+04	n.d.	3.5E+05
<i>o</i> -Calcareno	100	1.4E+06	4.7E+04	5.4E+06	100	6.6E+05	1.2E+05	1.6E+06	100	2.0E+06	1.5E+04	6.5E+06	100	1.5E+06	7.2E+04	7.0E+06
Forone	60	1.7E+05	n.d.	5.7E+05	47	1.1E+05	n.d.	1.6E+05	90	7.8E+05	n.d.	4.0E+06	27	1.4E+05	n.d.	3.4E+05
3,3,4,5,7-Pentametil-1-indanone	87	2.2E+05	n.d.	1.1E+06	65	8.5E+04	n.d.	2.1E+05	97	2.8E+05	n.d.	1.3E+06	67	1.2E+05	n.d.	6.2E+05
7-(1,1-Dimetiletil)-3,4-dihidro-1(2H)-naftalenona	73	2.5E+05	n.d.	1.1E+06	59	8.9E+04	n.d.	2.0E+05	93	2.9E+05	n.d.	1.2E+06	53	1.5E+05	n.d.	6.3E+05
2-Bromofenol	70	4.9E+04	n.d.	8.7E+04	65	3.5E+04	n.d.	8.6E+04	100	7.7E+04	3.9E+04	2.8E+05	43	2.4E+04	n.d.	3.7E+04
Dehidro- β -ionona	77	5.6E+05	n.d.	1.2E+06	35	3.4E+05	n.d.	5.2E+05	90	7.2E+05	n.d.	2.3E+06	33	2.4E+05	n.d.	6.0E+05
Fenol	100	7.4E+06	3.3E+05	5.1E+07	100	2.1E+06	1.5E+05	5.5E+06	100	6.3E+06	7.0E+05	3.1E+07	100	1.2E+06	2.4E+05	7.0E+06
1-(2,4,5-Trifetilfenil)etanona	100	7.6E+05	4.4E+04	3.9E+06	88	2.9E+05	n.d.	8.1E+05	100	6.3E+05	1.3E+05	1.9E+06	80	3.0E+05	n.d.	1.1E+06
1,2-Dihidro-1,4,6-trimetil-naftaleno	97	2.0E+06	n.d.	4.3E+06	100	1.1E+06	2.0E+05	3.7E+06	100	4.3E+06	3.7E+05	1.4E+07	90	6.2E+05	n.d.	1.8E+06
Ácido caprílico	77	3.6E+05	n.d.	2.0E+06	12	5.9E+05	n.d.	1.1E+06	100	9.5E+05	7.9E+04	9.1E+06	3	3.9E+05	n.d.	3.9E+05
9-Metil-S-octahidrofenantraceno	93	3.1E+05	n.d.	7.8E+05	65	2.2E+05	n.d.	6.8E+05	100	5.9E+05	7.7E+04	1.1E+06	67	4.6E+05	n.d.	1.6E+06
<i>p</i> -Cresol	100	2.2E+07	2.9E+04	6.9E+07	100	1.5E+07	7.2E+04	3.1E+07	100	2.8E+07	2.4E+05	7.0E+07	100	1.1E+07	4.7E+05	3.3E+07

2-Acetil-6-metoxinaftaleno	93	2,7E+05	n.d.	1,5E+06	59	2,2E+05	n.d.	3,8E+05	100	6,7E+05	4,9E+04	2,0E+06	50	3,4E+05	n.d.	1,1E+06
1-(2,3,6-Trimetilfenil)-3-buten-2-ona	97	5,7E+05	n.d.	1,9E+06	100	3,5E+05	1,0E+05	1,4E+06	100	9,9E+05	1,5E+03	5,5E+06	80	3,2E+05	n.d.	2,0E+06
1,6,7-Trimetil-naftaleno	100	5,0E+05	8,3E+04	1,1E+06	76	4,7E+05	n.d.	1,3E+06	100	1,4E+06	2,2E+05	4,0E+06	70	2,4E+05	n.d.	6,1E+05
1,1'-Metileno-bis(4-metil-benzeno)	93	1,6E+05	n.d.	4,9E+05	100	1,1E+05	2,4E+04	2,5E+05	100	2,0E+05	4,0E+04	4,5E+05	83	1,7E+05	n.d.	7,7E+05
Carvacrol	80	1,6E+06	n.d.	1,0E+07	100	7,0E+05	6,0E+04	1,6E+06	97	3,8E+05	n.d.	1,0E+06	90	5,3E+05	n.d.	2,1E+06
2-Bromo-4-(ter-butil)fenol	100	5,9E+05	2,0E+05	9,5E+05	100	4,1E+05	1,7E+05	1,3E+06	100	7,6E+05	3,9E+05	1,4E+06	97	2,0E+05	n.d.	5,4E+05
Cadaleno	97	3,3E+05	n.d.	9,3E+05	100	2,6E+05	7,1E+04	6,7E+05	100	7,1E+05	1,1E+05	1,9E+06	97	4,8E+05	n.d.	2,2E+06
<i>p</i> -ter-Butilfenol	100	1,3E+06	6,3E+05	2,1E+06	100	1,1E+06	5,0E+05	3,6E+06	100	1,8E+06	8,3E+05	3,2E+06	100	5,8E+05	1,5E+05	1,3E+06
<i>p</i> -ter-Butilfenol	93	1,0E+05	n.d.	1,6E+05	71	8,6E+04	n.d.	2,2E+05	100	1,3E+05	3,5E+04	4,7E+05	100	1,4E+05	2,5E+04	3,4E+05
3,5-Di-ter-butilfenol	97	2,3E+05	n.d.	1,0E+06	76	1,8E+05	n.d.	6,7E+05	100	2,6E+05	6,2E+04	7,4E+05	97	1,3E+05	n.d.	3,2E+05
Ácido benzoico																

^b Frequência de ocorrência; ^c Área média; ^d Área mínima; ^e Área máxima; n.d.: não detectado.