



Carolina Raquel Colaço Conduto

Licenciatura em Ciências Biomédicas

Desenvolvimento do dispositivo para teste não-invasivo da infecção por bactéria *Helicobacter pylori*

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Dr.^a Valentina Vassilenko, Professora Auxiliar, FCT/UNL e NMT

Orientador: Dr. Nuno Neuparth, Professor Associado, CEDOC – NMS/UNL

Júri

Presidente Dr. Jorge de Carvalho Silva, Professor Auxiliar, FCT/UNL

Arguente Dr.^a Paula Videira, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Vogal Dr.^a Valentina Vassilenko, Professora Auxiliar, FCT/UNL e NMT



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro, 2018

Desenvolvimento do dispositivo para teste não-invasivo da infecção por bactéria *Helicobacter pylori*

Copyright © Carolina Raquel Colaço Conduto, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

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

À minha irmã, pais e avós

Agradecimentos

O projecto ambicioso, mas gratificante que se apresenta foi conseguido com bastante dedicação e empenho. Todavia, sem o grupo de pessoas que me acompanhou apoiou e incentivou não teria a mesma emoção e, por esse facto, quero deixar o meu muito obrigado a todos com um profundo respeito.

Por me ter acolhido de braços abertos neste projecto, agradeço à minha orientadora, a Professora Doutora Valentina Vassilenko. Um projecto que, desde o primeiro dia, considerou ser o ideal para a minha criatividade e resiliência.

Em segundo lugar agradeço ao meu coorientador Professor Doutor Nuno Neuparth pela disponibilidade e incentivo prestado.

Ao Dr Luís Novais pela disponibilidade em me auxiliar nos ensaios em meio hospitalar, à Dra. Zélia Reigada e ao Dr. Diogo Pais do Secretariado da Comissão Ética da NMS/UNL pela atenção dispensada de forma cuidadosa e ágil á aceitação do projecto, a todos o meu muito obrigado.

Agradeço à Doutora Ana Jorge a simpatia e o interesse demonstrado pelo projecto, ao Dr. Rui Palma e à Dra. Cristina Fonseca do serviço de Gastroenterologia pela disponibilidade em auxiliar durante a realização dos ensaios com os doentes e a toda a equipa do Secretariado da Comissão de Ética do Hospital Garcia de Horta, E.P.E.

Um agradecimento especial à coordenadora do curso de Engenharia Biomédica, a Professora Carla Quintão por quem tenho um profundo respeito e admiração. Durante todo o curso foi um verdadeiro apoio no meu percurso académico o qual nunca irei esquecer.

Um grande obrigado a todos os alunos do laboratório 215 do Ed.I. Em especial agradeço ao Paulo Santos a sua dedicação a 200% para me acompanhar durante o projecto. Foi um verdadeiro mentor, companheiro de projecto, psicólogo nos momentos de maior stress, brincalhão a toda a hora e, acima disso, posso dizer que encontrei um amigo por quem nutro um grande respeito. Ao Jorge Fernandes agradeço com grande carinho a partilha de ideias, a paciência que teve

em transmitir a sua sabedoria, em apoiar no meu trabalho minucioso e, uma vez mais, por me ouvir nos momentos de stress e incentivar com energias positivas. De igual forma agradeço à Andreia Serrano, à Anna Poplavscka e à Beatriz Rmalho, o carinho, a boa disposição, o companheirismo e as palavras de conforto que sempre tiveram. Levo amizades especiais deste belo grupo. Não deixo também de agradecer o companheirismo e a boa disposição, de todos os investigadores, em especial, à Maria Gonçalves, à Cláudia Espalha, e ao Paulo Bonifácio.

Um obrigado especial à minha irmã por ser a minha companheira de vida há 25 anos em todas as etapas e por ser o braço direito na manutenção do foco para os meus objetivos. Foi essencial o seu suporte, o seu amor, o seu incentivo e a sua crença nas minhas capacidades de superação e de resiliência.

Agradeço aos meus pais e à minha avó o carinho eterno, por terem contribuído na construção da minha personalidade e por todos os valores que me transmitiram e que me levaram a lutar sempre pelos objetivos.

Um especial obrigado à Emma Rodrigues, amiga que a vida universitária me deu. Para além do seu carinho, a sua determinação e coragem foram um estímulo para a chegada a esta meta.

À família que não se escolhe, mas que a Engenharia Biomédica me deixou agradeço incondicionalmente à Beatriz Catarino, à Mariana Monteiro, à Rita Marçal, à Ana Leonor, à Catarina Sousa, ao Paulo Teixeira, ao Miguel Batista, ao Nuno Fernandes e ao Ricardo Guerreiro a sincera e bonita amizade.

Não posso deixar de agradecer aos amigos de sempre, aqueles que me tem acompanhado há longos anos e por quem agradeço todos os dias a amizade bonita e fiel. Cada um à sua maneira e sem ordem obrigada Marta Monteiro, Filipa Gonçalves, Xavier Lopes, Eduardo, Mané, José Alexandre e Ivo

A todos os amigos do teatro ArteViva, que me viram a tornar Engenheira Biomédica, me levaram a descontraír e a ganhar inspiração um obrigado sincero.

Agradeço ainda à Farmácia Estácio pelo apoio no fornecimento da ureia e ao Filipe Silvestre do FabLab da FCT/UNL e ao Professor Bruno Soares do

Departamento de Gestão Industrial da FCT-UNL pelo excelente trabalho que desenvolveram na fabricação do protótipo HELIC QT.

Resumo

A infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é considerada uma das principais causas da ocorrência de doenças gastrointestinais. A sua detecção precoce torna-se essencial para um tratamento eficaz e em tempo útil, evitando complicações em pacientes que já apresentam gastrites, não deixando evoluir para úlceras, dispepsias e principalmente carcinomas (como o cancro gástrico, considerado o segundo mais frequente na causa de morte por cancro). [1][2][3].

Segundo Walter L. Peterson *at al* a infecção pela *H. pylori* é encontrada em 95% dos casos de úlceras duodenais e em 80% dos doentes que desenvolvem úlceras gástricas [4]. A realização de testes preventivos e de rastreio para monitorizar a probabilidade da infecção pela bactéria ganhou preponderância e relevância devido à elevada ocorrência de úlceras por esta via.

Atualmente, a detecção desta infecção é, na sua maioria, conseguida através da aplicação de testes invasivos que implicam a realização de mais do que uma biópsia no momento da endoscopia. Contudo, por oferecerem maior comodidade ao doente e por impedirem a proliferação de outras infeções em meio hospitalar, o desenvolvimento e a aplicação de testes de despiste não invasivos (como os testes rápidos da ureia, respiratórios, de antígenos nas fezes ou a serologia) são essenciais para um melhoramento da eficiência dos procedimentos clínicos.

Com o objetivo principal de caracterizar e otimizar um novo dispositivo não-invasivo e descartável de detecção da bactéria *H. pylori*, este projecto de mestrado aborda e atende às necessidades médicas supramencionadas. Primeiramente, foram

realizadas recolhas (com recurso a um protótipo desenvolvido pela NMT, S.A. e pela FCT-UNL) e análises (através da tecnologia de GC-IMS) de ar exalado esofágico e alveolar que demonstraram existir um perfil característico de metabolitos em sujeitos saudáveis, antes e depois da administração de ureia. A elevada sensibilidade do equipamento analítico (ppb_v-ppt_v), assente na tecnologia de espectrometria de mobilidade iónica (IMS), ofereceu resultados precisos, em tempo real e com um rácio de deteção 10 vezes superior aos convencionais testes respiratórios [5].

Por fim, e no seguimento do trabalho anterior, foi otimizado e aperfeiçoado o kit HELIC QT. Este teste descartável de despiste para a infeção encontra-se apto a ser testado em meio hospitalar, revelando ser um método alternativo e com elevado potencial, relativamente a todos os métodos existentes.

O próximo passo será aplicar o protocolo do kit HELIC QT num estudo em doentes de gastroenterologia para comprovar a sensibilidade e especificidade do dispositivo de rastreio.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*; infeção da *Helicobacter pylori*; teste não-invasivo; GC-IMS; ar alveolar; ar esofágico

Abstract

The *Helicobacter pylori* infection (*H. pylori*) is considered one of the main causes of the occurrence of gastrointestinal disease. Your early detection becomes essential for effective treatment and in useful time. Avoid complications in patients who already have gastritis, do not let ulcers develop, neither dyspepsia, and principally carcinomas (such as stomach cancer, the second most frequent cause of cancer death) [1][2][3].

According to what Walter L. Peterson at al say, the infection by *H. pylori* is found in 95% of cases of duodenal ulcers and in 80% of patients who develop gastric ulcers [4]. The performing of preventive and screening tests to monitoring the probability of infection by the bacteria gains preponderance and relevance.

Currently, the detection of this infection is, mostly, achieved through the application of invasive tests involving more than one biopsy at the time of endoscopy. However, because they offer greater comfort to the patient and because they prevent the proliferation of other infections in a hospital setting, the development and application of noninvasive screening tests (such as urea rapid test, breath tests, stool antigen test and serology) are essential for improving the efficiency of clinical procedures.

With the main objective of characterizing and optimizing a new non-invasive and disposable *H. pylori* detection device, this master's project addresses and meets the medical needs mentioned above. In the first stage, samples of exhaled esophageal and alveolar air were collected (through a prototype developed by

NMT, S.A. and FCT-UNL) and analyzed (through an IMS technology). There is a characteristic profile of metabolites in healthy subjects, before and after administration of urea. The highly analytical sensitivity of equipment (ppt - ppt) based on an ion mobility spectrometry (IMS) technology revealed accurate results in real time and with a ratio detection tenfold higher than conventional respiratory tests [5].

Finally, and following the previous work, the HELIC QT kit was optimized and improved. This *H. pylori* infection disposable test is found able to be tested in hospital, revealing to be an alternative method with a high potential comparatively to the other available methods.

The next step will be applying the kit HELIC QT protocol in a study of gastroenterology patients to prove the sensibility and specificity of the screening test.

Key Words: *Helicobacter pylori*; *Helicobacter pylori* infection; non-invasive test; GC-IMS; alveolar air; esophageal air

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS.....	2
1.2 ESTRUTURA DA TESE	4
2. CONCEITOS TEÓRICOS	7
2.1 <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	7
2.2 <i>HELICOBACTER PYLORI</i> E PATOLOGIAS ASSOCIADAS.....	9
2.2.1 <i>Úlcera péptica e Úlcera duodenal</i>	10
2.2.2 <i>Linfoma gástrico</i>	12
2.2.3 <i>Adenocarcinoma gástrico</i>	12
2.3 POTENCIAIS METABOLITOS LIBERTADOS PELA <i>H. PYLORI</i>	13
3. ESTADO DE ARTE	15
3.1 MÉTODOS DE DETECÇÃO INVASIVOS	15
3.1.1 <i>Endoscopia</i>	16
3.1.2 <i>Atividade da urease</i>	17
3.1.3 <i>Histologia Anatomopatológica</i>	17
3.1.4 <i>Cultura</i>	18
3.1.5 <i>Citologia</i>	18
3.1.6 <i>PCR em material recolhido na biópsia</i>	19
3.1.7 <i>Análises sanguíneas</i>	19
3.1.8 <i>Serologia (ELISA)</i>	20
3.2 MÉTODOS DE DETECÇÃO NÃO-INVASIVOS	20
3.2.1 <i>Testes da Ureia (ou teste respiratório da H. pylori)</i>	20
3.2.2 <i>Testes de antígenos nas fezes</i>	23
3.2.3 <i>Teste em biofilme dental</i>	23
3.2.4 <i>Teste de urina</i>	23

3.3	ESTRATÉGIAS DE TESTE NÃO-INVASIVAS (COMPARAÇÕES).....	24
4.	ESTUDO DO PERFIL DO AR EXALADO COM UREIA.....	27
4.1	MÉTODOS EXPERIMENTAIS DE RECOLHA E ANÁLISE DE AR EXALADO	27
4.1.1	<i>Equipamento de recolha de ar exalado.....</i>	28
4.1.2	<i>Equipamento analítico GC-IMS.....</i>	28
4.1.3	<i>Protocolo experimental para análise de amostras de ar exalado</i>	30
	Optimização da análise- Variação de fluxos EPC1 e EPC2 do GC-IMS.....	31
	Optimização da análise- Variação do tempo de abertura da válvula.....	33
	Optimização da análise- Polarização Positiva vs. Negativa no IMS	34
	Optimização da análise - Perfil metabólico do ar exalado após a ingestão de ureia.....	36
4.1.4	<i>Identificação do pico relativo à amónia nos espectros de GC-IMS.....</i>	38
4.1.5	<i>Caracterização do perfil metabólico do ar exalado após ingestão de ureia</i>	40
4.2	MÉTODOS E FERRAMENTAS PARA ANÁLISE DE DADOS DO GC-IMS.....	42
4.2.1	<i>Laboratory Analytical Viewer (LAV).....</i>	42
4.2.2	<i>VOCInspect.....</i>	43
4.3	RESULTADOS DA OPTIMIZAÇÃO PARA ANÁLISE DO AR EXALADO	44
4.3.1	<i>Optimização da análise- Variação de fluxos EPC1 e EPC2 do GC-IMS.....</i>	45
4.3.2	<i>Optimização da análise- Variação de tempos de abertura da válvula do GC-IMS</i>	49
4.3.3	<i>Optimização da análise- Polarização Positiva vs. Negativa no IMS.....</i>	49
4.3.4	<i>Espectros otimizados do perfil do Ar exalado após toma da Ureia</i>	51
4.4	CALIBRAÇÃO DO PICO DA AMÓNIA.....	55
5.	RESULTADOS DO PERFIL METABÓLICO DO AR EXALADO APÓS A INGESTÃO DE UREIA.....	59
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DO AR EXALADO ANTES E DEPOIS DA INGESTÃO DE UREIA	59
5.1.1	<i>Metabolitos detectáveis</i>	67
6.	DESENVOLVIMENTO DO TESTE RÁPIDO DE DETECÇÃO DE INFECCÃO POR H. PYLORI.....	73
6.1	DESENVOLVIMENTO DO PROTÓTIPO PARA PROFISSIONAIS DE SAÚDE (HELIC QT).....	73

6.2	DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPO DE RESULTADO DESCARTÁVEL	76
6.3	VERIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS PROTÓTIPOS DESENVOLVIDOS EM CONTEXTO HOSPITALAR	78
6.4	PROCEDIMENTO NA APLICAÇÃO DO HELIC QT	80
7.	CONCLUSÕES	85
7.1	CONCLUSÕES.....	85
7.2	TRABALHO FUTURO.....	88
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
A.	ANEXO	1
	DOCUMENTAÇÃO FORNECIDA A TODOS OS VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS	1
B.	ANEXO	7
	BULA PARA O HELIC QT	7
C.	ANEXO	9
	ESPECTROS COMPLEMENTARES À CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DO AR EXALADO.....	9
D.	ANEXO	11
	ESTATÍSTICA COMPLEMENTAR À CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DA UREIA DO CAPÍTULO	
4.5	11	
E.	ANEXO	19
	POSTER APRESENTADO NO 3 RD NOVA BIOMEDICAL ENGINEERING WORKSHOP 2018.....	19
F.	ANEXO	21
	DECISÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DA NOVA MEDICAL SCHOOL DA UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA	
	21	

Lista de Tabelas

TABELA 2.1: FATORES DE RISCO GASTROINTESTINAL QUE SUGEREM TRATAMENTO PARA ERRADICAÇÃO DA <i>H. PYLORI</i> . ADAPTADO DE [19].	11
TABELA 4.1: PROPRIEDADES DOS PROGRAMAS IMPLEMENTADOS NO GC-IMS DURANTE A OPTIMIZAÇÃO DOS FLUXOS DE DERIVA E DE RETENÇÃO	32
TABELA 4.2: CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS DE AR EXALADO RECOLHIDAS APÓS INGESTÃO DE UREIA.	34
TABELA 4.3: CARACTERÍSTICAS DAS ANÁLISES EFETUADAS ÀS TRÊS AMOSTRAS DE AR, COM POLARIZAÇÃO EM MODO NEGATIVO.....	35
TABELA 4.4: CARACTERÍSTICAS DAS ANÁLISES EFETUADAS ÀS TRÊS AMOSTRAS DE AR, COM O GC-IMS EM MODO POSITIVO.....	36
TABELA 4.5: PARÂMETROS DEFINIDOS PARA O PROGRAMA TESTER_HP.	39
TABELA 4.6: ORDEM PELA QUAL FOI REALIZADA A ANÁLISE DAS AMOSTRAS NO ESTUDO DA IDENTIFICAÇÃO DO PICO DA AMÓNIA, NO GC-IMS.	40
TABELA 4.7: CARACTERÍSTICAS DO PROGRAMA B_STRESS.	42
TABELA 4.8: TEMPOS DE RETENÇÃO E DE DERIVA, DO PICO RELATIVO À AMÓNIA, PARA TODOS OS ESPECTROS ADQUIRIDOS PELO GC-IMS.....	56
TABELA 4.9: CONCENTRAÇÃO DA AMÓNIA, EM PPB, NO HEADSPACE DOS VIALS PARA CADA DILUIÇÃO.....	57
TABELA 5.1: MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS TEMPOS DE RETENÇÃO E TEMPOS DE DERIVA RELATIVOS AO PICO DA AMÓNIA PARA A AMOSTRA N=30.	61
TABELA 5.2: TEMPOS DE DERIVA DE COMPOSTOS LIBERTADOS EM MEIO ENDÓGENO PELA <i>H. PYLORI</i>	68
TABELA 5.3: REPRESENTAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO E DA INTENSIDADE RELATIVA DE ALGUNS COMPOSTOS, AO LONGO DO TEMPO NO AR EXALADO. DESTAQUE PARA O MONÓMERO DA 2-BUTANONA.	69
TABELA 5.4: TENDÊNCIA DA PRESENÇA DE ALGUNS COMPOSTOS, AO LONGO DO TEMPO NO AR EXALADO. COM DESTAQUE NOS MONÓMEROS DA 2-BUTANONA E ACETATO DE ETILO.	70
TABELA 5.5: TENDÊNCIA DA PRESENÇA DE ALGUNS COMPOSTOS, AO LONGO DO TEMPO NO AR EXALADO. COM DESTAQUE PARA DOIS MONÓMEROS E UM DÍMERO.	71
TABELA 6.1: RESULTADO DO TESTE DE ACORDO COM AS DUAS FORMAS DE LEITURA.....	83

Lista de Figuras

FIGURA 2.1: IMAGENS MICROSCÓPICAS DA BACTÉRIA <i>H. PYLORI</i> (A) E DE UMA COLÓNIA NA SUPERFÍCIE EPITELIAL (B).[11] [12].....	7
FIGURA 2.2: INFECÇÃO PELA <i>H. PYLORI</i> NA MUCOSA ANTRAL DA CAVIDADE GÁSTRICA. IMAGEM ADAPTADA DE [47]	10
FIGURA 2.3: VOCs POTENCIALMENTE LIBERTADOS PELA <i>H. PYLORI</i> . IMAGENS ADAPTADAS DE [27],[28],[29].	14
FIGURA 3.1: IMAGEM ILUSTRATIVA DE UMA ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA. ADAPTADO DE [48].	16
FIGURA 3.2: OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DE UMA CITOLOGIA NA CAVIDADE GÁSTRICA. IMAGEM ADAPTADA DE [9]	19
FIGURA 3.3: TESTE RESPIRATÓRIO DA UREIA. IMAGEM ADAPTADA DE [36].	21
FIGURA 4.1: ESQUEMÁTICO DO EQUIPAMENTO GC-IMS	29
FIGURA 4.2: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA SEQUÊNCIA DE OPERAÇÕES.	37
FIGURA 4.3: ESQUEMA DAS DILUIÇÕES EFETUADAS A PARTIR DA SOLUÇÃO PADRÃO DE AMÓNIA.	38
FIGURA 4.4: PROGRAMA CRIADO PELA NMT, S.A. PARA ANALISAR ESPECTROS E IDENTIFICAR PICOS.	43
FIGURA 4.5: VISTA GENÉRICA DA APLICAÇÃO DA FERRAMENTA VOCINSPECT APÓS EXECUÇÃO	44
FIGURA 4.6: INFLUENCIA DA VARIAÇÃO DO FLUXO EPC2 NO TEMPO DE RETENÇÃO DOS COMPOSTOS.	46
FIGURA 4.7: ESPECTROS OBTIDOS COM A EXECUÇÃO DO PROGRAMA C_UTEST_D E COM O C_UTEST_E.	48
FIGURA 4.8: AQUISIÇÕES COM A POLARIZAÇÃO EM MODO NEGATIVO.	50
FIGURA 4.9: AQUISIÇÕES COM A POLARIZAÇÃO EM MODO POSITIVO.	50
FIGURA 4.10: ESPECTROS DE CADA VOLUNTÁRIO DO CONJUNTO AMOSTRAL N=5 APÓS TOMA DE UREIA.	52
FIGURA 4.11: GRÁFICO DO PERFIL DE METABOLITOS PRESENTES NO AR EXALADO DO CONJUNTO AMOSTRAL N=5, APÓS INGESTÃO DE UREIA.	53
FIGURA 4.12: PERFIL HOMOGÉNEO E ESTÁVEL DOS VOCs APÓS INGESTÃO DE UREIA.	53
FIGURA 4.13: VARIAÇÃO DA INTENSIDADE DOS PICOS (VOCs DO AR EXALADO) NUM INDIVÍDUO ATÉ 18 MINUTOS APÓS A INGESTÃO DA UREIA.	54
FIGURA 4.14: ESPECTRO RESULTANTE DA SOBREPOSIÇÃO DE DOIS ESPECTROS. UM ASSOCIADO À UREIA A E OUTRO À UREIA B.	55
FIGURA 4.15: ILUSTRATIVO DA CONCENTRAÇÃO DA AMÓNIA, NO ESPECTRO, AO LONGO DAS 3 DILUIÇÕES.	57
FIGURA 5.1: ESPECTROS COM OS 3 PICOS CARACTERÍSTICOS DO SUJEITO N=28 MARCADOS POR A43, A44 E A45.	60
FIGURA 5.2: ESPECTROS COM O PICO CARACTERÍSTICO DO SUJEITO N=31 MARCADO POR A46.	60

FIGURA 5.3: REPRESENTAÇÃO DAS LOCALIZAÇÕES MÉDIAS PARA O PICO DA AMÓNIA.	62
FIGURA 5.4: GRÁFICO DE TENDÊNCIA TEMPORAL PARA A AMÓNIA NO AR EXALADO DE UM SUJEITO DO GRUPO AMOSTRAL.....	63
FIGURA 5.5: GRÁFICO ESTATÍSTICO COM A REPRESENTAÇÃO DAS INTENSIDADES MÉDIAS RELATIVAS PARA O GRUPO AMOSTRAL DO GÉNERO FEMININO (N=19).	64
FIGURA 5.6: GRÁFICO ESTATÍSTICO COM A REPRESENTAÇÃO DAS INTENSIDADES MÉDIAS RELATIVAS PARA O GRUPO AMOSTRAL DO GÉNERO MASCULINO (N=11).	64
FIGURA 6.1: HELIC QT EM FORMATO 3D. A- PROTÓTIPO FINAL; B – PORMENOR DA LUPA, DA ESCALA GRADUADA E DO TESTE DESCARTÁVEL. IMAGENS OBTIDAS NO SOFTWARE <i>ONSHAPE</i>	74
FIGURA 6.2: PROTÓTIPO FINAL DAS PEÇAS IMPRESSAS EM PLA (À ESQUERDA) E KIT HELIC QT COMPLETO (À DIREITA).....	75
FIGURA 6.3: ESTRATÉGIA DE CONTACTO ENTRE O TESTE DESCARTÁVEL E A BOMBA DE SUCCÃO.....	75
FIGURA 6.4: REGRAS PARA ANÁLISE DO RESULTADO QUE ESTÃO EMBUTIDAS NA BOMBA DE SUCCÃO.....	76
FIGURA 6.5: ESBOÇO DO PROTÓTIPO DO LEITOR DESCARTÁVEL PARA A INFECÇÃO POR <i>H. PYLORI</i>	77
FIGURA 6.6: KIT HELIC QT EM FUNCIONAMENTO. A) POSTURA DO UTILIZADOR NA REALIZAÇÃO DO TESTE; B) MODO DE ACONDICIONAMENTO DO TUBO COLORIMÉTRICO.....	80
FIGURA 6.7: LEITURA DA MARCA BASAL COM OS DOIS MÉTODOS DE ANÁLISE.....	81
FIGURA 6.8: LEITURA DA MARCA APÓS TOMA DA UREIA.	82
FIGURA 6.9: MODO DE UTILIZAÇÃO DO BOCAL DESCARTÁVEL.	84
FIGURA C.1: PERFIS METABÓLICOS DO AR EXALADO APÓS INGESTÃO DE UREIA. A E DA UREIA B.	10
FIGURA D.1: GRÁFICO DE TENDÊNCIA, DO PERFIL DA AMÓNIA NO AR ALVEOLAR, PARA O GRUPO AMOSTRAL N=30.	11
FIGURA D.2: GRÁFICO DE TENDÊNCIA, DO PERFIL DA AMÓNIA NO AR ESOFÁGICO, PARA O GRUPO AMOSTRAL N=30.	12
FIGURA D.3: PERFIL DA AMÓNIA, AO LONGO DE 16 MINUTOS, PARA O GÉNERO FEMININO. O GRÁFICO REPRESENTA A TENDÊNCIA DA INTENSIDADE RELATIVA, DO COMPOSTO.	13
FIGURA D.4: PERFIL DA AMÓNIA, AO LONGO DE 16 MINUTOS, PARA O GÉNERO MASCULINO. O GRÁFICO REPRESENTA A TENDÊNCIA DA INTENSIDADE RELATIVA, DO COMPOSTO.	13
FIGURA D.5: GRÁFICOS ILUSTRATIVOS DO COMPORTAMENTO DA AMÓNIA NO AR EXALADO DA AMOSTRA DO GÉNERO FEMININO DE ACORDO COM DOIS GRUPOS ETÁRIOS.....	14
FIGURA D.6: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO COMPORTAMENTO DA AMÓNIA NO AR EXALADO DE DOIS GRUPOS ETÁRIOS DO GÉNERO MASCULINO.....	14
FIGURA D.7: PERFIL DA AMÓNIA CONSIDERANDO O JEJUM INFERIOR A 4 HORAS E O GÉNERO. O GRÁFICO DA ESQUERDA TEM UMA AMOSTRA DE N= 12 E O DA DIREITA UMA AMOSTRA DE N=7.....	15
FIGURA D.8: PERFIL DA AMÓNIA CONSIDERANDO O JEJUM INFERIOR A 4 HORAS E O GÉNERO. O GRÁFICO DA ESQUERDA TEM UMA AMOSTRA DE N= 7 E O DA DIREITA UMA AMOSTRA DE N=4.	15

FIGURA D.9: INTENSIDADE RELATIVA DO PICO DA AMÓNIA NOS 12 SUJEITOS QUE TOMAM FÁRMACOS DIARIAMENTE.	16
FIGURA D.10: GRÁFICO ILUSTRATIVO DO PERFIL DA AMÓNIA NOS SUJEITOS QUE TOMARAM FÁRMACOS NOS 15 DIAS ANTECEDENTES.....	17

Lista de Abreviaturas

CAD	Computer-aided design
<i>CagA</i>	Cytotoxin-associated gene A
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
GC	Gas Chromatography
GC-IMS	Gas Chromatography – Ion Mobility Spectrometry
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IMS	Ion Mobility Spectrometry
LAV	Laboratory Analytical Viewer
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MS	Mass Spectrometry
ml	mililitros
ms	milissegundos
mV	milivolts
NDIR	Non-Dispersive Infra-Red
pA	picoampere

PCR	Polymerase Chain Reaction
ppb	partes por bilhão
Ppt	Partes por trilião
RH	Relative Humidity
RIP	<i>reactant ion peaks</i>
SAAS	Software as a Service
TRU	Teste Rápido da Ureia
<i>VacA</i>	Vacuolating cytotoxin gene A
VOC	Volatile Organic Compounds
2D	2 dimensões
3D	3 dimensões



Introdução

Os estudos indicam que a infecção pela *Helicobacter pylori* afeta 50% da população mundial sendo considerada a principal causa da ocorrência de gastrites e de úlceras pépticas. O agravamento patológico, das doenças gastrointestinais associadas, pode levar ao aparecimento de cancro gástrico e de Linfoma [6].

A prevalência da infecção epidemiológica incide em maior percentagem nos países em vias de desenvolvimento a apresentar valores superiores a 50% nas crianças e alcançando os 90% nos adultos. Nos países desenvolvidos o risco de adquirir infecção não ultrapassa os 3% nas crianças e 1% nos adultos ao ano [7].

Os fatores associados à ocorrência e prevalência da infecção, na população, estão intimamente relacionados com condições de higiene, ambientais e económicos [7].

Atualmente, a deteção da infecção causada pela *H. pylori* é tipicamente conseguida por métodos de diagnóstico invasivos tal como a biópsia por via endoscópica alta. Contudo também existem outros métodos que apresentam bons resultados e que, na maioria das vezes são aplicados em crianças. Trata-se do teste de pesquisa de antígenos nas fezes ou ainda o teste respiratório da ureia.

As vias de tratamento para a infecção passam por utilizar terapias combinadas com antibióticos (amoxicilina, tetraciclina, metronidazol ou claritromicina), inibidores da bomba de prótons e sal de bismuto ou citrato de ranitidina bismuto [7] [8]. O objetivo é erradicar a infecção no hospedeiro.

A infecção pela *H. pylori* é considerada um problema de saúde pública pela variabilidade da prevalência e, neste sentido, é necessário investir em estratégias de controlo e de diagnóstico precoce para que exista uma intervenção médica, na evolução, eficaz.

Um passo para o controlo epidémico é a aplicação de testes de rastreio junto de doentes que sejam portadores da bactéria a abranger o agregado familiar. Esta via ganha preponderância em relação aos testes de diagnóstico que são tipicamente utilizados.

Para valorizar este procedimento preliminar, o teste de rastreio para a infecção deve ser não-invasivo, oferecendo maior comodidade ao doente, de resposta rápida; de baixo custo, amplificando a acessibilidade de utilização a países subdesenvolvidos; descartável e ainda universal a todas as faixas etárias.

Neste contexto, é pertinente desenvolver e testar um dispositivo de rastreio com as características mencionadas para ser considerado em meio clínico.

1.1 Objetivos

A prevenção da evolução de patologias gástricas para situações agravadas requer a utilização de um teste rápido para detecção do patogénico, *H. pylori*. A utilização atempada deste tipo de testes poderá ditar a regressão de lesões gástricas e, em última análise, a erradicação da bactéria. Este projecto procurou suprimir essa necessidade, para tal propôs-se o desenvolvimento de um teste rápido, não-invasivo e descartável para a detecção de infecção por *H. pylori* (que é de difícil diagnóstico, mas de fácil tratamento).

Uma vez que a utilização deste tipo de teste de diagnóstico/rastreio sugere vantagens face aos atualmente implementados, é essencial a familiarização e caracterização dos dispositivos e dos métodos diretos e indiretos, invasivos e não-invasivos clinicamente utilizados na detecção da bactéria em causa.

A metodologia do teste foi desenvolvida pela empresa de I&D de dispositivos médicos NMT, S.A. Esta detecção da infecção pela *H. pylori* é realizada através da análise do ar exalado e, como tal, necessitou de uma criteriosa fase de experimentação e de validação. Desta feita o início do projecto começou com a realização de testes experimentais, numa pequena amostra de indivíduos (5 voluntários), de forma a aferir a viabilidade do teste e ter algumas indicações da possível variabilidade do mesmo.

Após a realização destes pré-testes aumentou-se o espectro amostral para uma linha de controlo com 30 pessoas saudáveis. Este grupo contribuiu para a caracterização do perfil da ureia no ar exalado quando não existe *H. pylori* no meio gástrico.

Para a caracterização e optimização do teste foram realizadas recolhas (através de um protótipo desenvolvido pela NMT, S.A. e pela FCT-UNL) e análises (através da tecnologia de GC-IMS) de ar exalado, esofágico e alveolar, de modo a traçar um perfil de metabolitos presentes nas amostras de sujeitos, antes e depois da administração de ureia.

Com vista na aplicação de um teste rápido, descartável e não invasivo para despiste da infecção pela *H. pylori* projectou-se e elaborou-se um kit de teste HELIC QT. Este é composto por um teste colorimétrico, uma bomba de sucção, um analisador de resultado descartável e uma bula. O processo de recolha de ar implementado pelo kit de teste foi otimizado de forma a garantir a sua repetibilidade.

Após verificada toda a viabilidade do kit de teste, em laboratório, seguir-se-ia a aplicação do teste em meio hospitalar, nomeadamente em doentes do serviço de Gastroenterologia. Este teste, que pressupõe um teste colorimétrico para identificação da infecção da *H. pylori* seria testado com duas vertentes de análise de resultado: um protótipo de análise descartável (para utentes) e outro para utilização por profissionais de saúde.

Como motivação é expectável que este projecto possa contribuir para o melhoramento da eficiência de diagnóstico/detecção de infecção por *H. pylori* com a implementação de um teste com uma acção polivalente e de resposta quantitativa (apesar da sua base colorimétrica), destinado a vários utilizadores espontâneos ou extensível a todo o agregado familiar.

1.2 Estrutura da Tese

O presente documento vem organizado em 7 capítulos sendo que o presente capítulo começa com uma breve introdução que inclui um enquadramento teórico sobre a problemática da infecção pela *Helicobacter pylori* e da necessidade dum diagnóstico precoce. Para além disso, apresenta também os objetivos definidos para o projecto e que assentam na necessidade de implementar um novo método de detecção não-invasivo, descartável e rápido para a infecção. Uma patologia que é de difícil diagnóstico, mas de fácil tratamento.

O segundo capítulo contextualiza a infecção da *Helicobacter pylori* e as patologias do sistema gástrico que podem estar associadas à problemática em questão.

O terceiro capítulo apresenta um sumário teórico dos métodos de detecção invasivos e não-invasivos que existem e que são implementados, atualmente, na atividade clínica. Para além disso ainda refere alguns metabolitos produzidos pela bactéria que são detetáveis em amostras de ar.

O quarto capítulo descreve todo o estudo desenvolvido para caracterizar o perfil do ar exalado na presença de ureia. O capítulo, que se divide em três subcapítulos, começa com os métodos experimentais aplicados, onde estão descritos os equipamentos de recolha e de análise utilizados, depois projeta-se o protocolo experimental acabando na caracterização do perfil metabólico do ar exalado. Em seguida são apresentados os programas de análise de dados aplicados e por fim são descritos os resultados da optimização e da calibração do pico da Amónia.

Em seguida apresenta-se o capítulo 5 que vai descrever os resultados conseguidos após optimização do método de análise do ar exalado, mas com uma amostra de 30 voluntários.

O desenvolvimento do teste rápido para detecção da *H. pylori* vem descrito no Capítulo 6. Aqui serão apresentados protótipos desenvolvidos e criados, que passaram por diversas fases de optimização, até ficarem aptos a seguir para aplicação clínica.

O último capítulo destinado a encerrar a exposição do trabalho desenvolvido é o capítulo 7, onde constam as conclusões e sugestões para trabalho futuro.

2

Conceitos Teóricos

O presente capítulo surge no âmbito de contextualizar a problemática da infecção pela *Helicobacter pylori* dando a conhecer o microrganismo e a forma como se manifesta no hospedeiro.

2.1 *Helicobacter pylori*

A *H. pylori* foi descoberta em 1982 e é tida como a bactéria responsável pelo desenvolvimento de patologias associadas ao aparelho gastroduodenal, onde o seu hospedeiro principal é o ser humano [9][10].

São conhecidas mais de 20 estirpes da bactéria onde as que colonizam o estômago produzem urease e as que colonizam o duodeno não apresentam essa capacidade [7].

Considerada uma bactéria gram-negativa, espiralada e flagelada, Figura 2.1:a), a *H. pylori* aloja-se sob uma camada de muco da superfície epitelial da mucosa gástrica, Figura 2.1:b), tipicamente na região pré-pilórica do estômago [10].

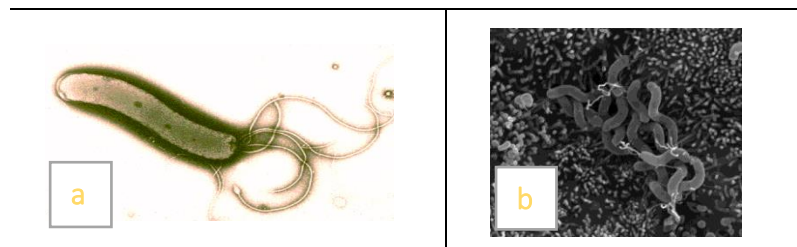
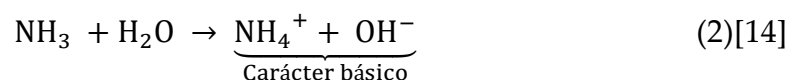


Figura 2.1: Imagens microscópicas da bactéria *H. pylori* (A) e de uma colónia na superfície epitelial (B).[11] [12].

A capacidade de sobrevivência no estômago, sob presença de ácido gástrico, deve-se à urease, produto excretado em grande quantidade pela bactéria. Esta, é uma enzima que atua sob a ureia catalisando a sua hidrólise (1), de onde resulta o amoníaco (NH_3) e o dióxido de carbono (CO_2). De entre os produtos resultantes da reacção enzimática, a amónia neutraliza o ácido e assim promove as condições favoráveis à sobrevivência da bactéria. Esta descoberta veio corroborar a ideia de que o ambiente gástrico é um meio estéril bacteriano. Quanto ao CO_2 , este, é absorvido pela corrente sanguínea [9].



No seguimento desta reacção há uma outra que acontece com amoníaco (2). Em solução aquosa, este, ioniza originando iões amónia e iões hidroxilo.



Por esta razão e, devido ao facto da urease produzir mais moles de NH_3 do que de CO_2 , o meio apresenta um carácter básico predominante. A alteração do pH do meio revela ser uma característica importante que motiva a invenção alguns testes de diagnóstico.

Para além disso, a *H. pylori* ainda apresenta características de caris virulento, o factor *cagA* (*cytotoxin-associated gene A*), que altera as junções apicais e modifica a polaridade celular, quando injectado nas células epiteliais da mucosa antral gástrica e o factor *vacA* (*vacuolating cytotoxin gene A*) que está presente em quase todas as estirpes de *H. pylori* [10][15]. O *cagA* é considerado como um gene marcador da patogenicidade por não se encontrar em todas as estirpes da bactéria e por se relacionar com as evoluções clínicas mais graves da infecção [15].

A produção de amónia revelou ser um foco de interesse para o desenvolvimento de técnicas e métodos de diagnóstico da infecção pela *H. pylori*,

atualmente, continua a ser uma característica para o progresso nas técnicas não-invasivas. Desta forma, parte integrante do conteúdo deste documento revela investigação desenvolvida para compreender a presença da amónia e interação da ureia no organismo humano.

2.2 *Helicobacter pylori* e patologias associadas

Com mais de metade da população mundial infetada, a *H. pylori* pode ser transmitida via oral-oral, fecal-oral e predominantemente ocorre na infância através do núcleo familiar [10]. Contudo, a infecção não implica que ocorra patologia. Esta deve-se a forma como o microrganismo se manifesta, ou seja, se apenas parasitar o organismo como comensal então não há sintomas, por outro lado, se o comportamento for patogénico já se encontram várias patologias associadas [10].

Dos estudos que vem sendo realizados, considera-se que apenas 10-20% dos portadores desenvolvem doença infecciosa. A mais comum é a gastrite multifocal, uma inflamação da mucosa gástrica que, regra geral, é o princípio de evolução para uma atrofia da mucosa gástrica ou para estados mais complexos. Esta doença corresponde ao fenótipo com maior prevalência [10][16].

Num estado inicial da infecção é frequente sentir um aumento da acidez no estômago, no entanto, esta tende a diminuir e manter-se em níveis de pH mais básicos resultante da atividade da bactéria a longo prazo.

No diagnóstico da infecção está implícito a detecção de ocorrência de infiltrado inflamatório na mucosa antral e/ou na mucosa do corpo bem como da presença da *H. pylori*. A estas constatações podem estar associadas metaplasias intestinais e a atrofia glandular, ou seja, lesões secundárias [16].

Fisiopatologicamente, a gastrite atrófica multifocal, Figura 2.2, não revela consequências predominantes, a não ser casos que evoluam para um carcinoma gástrico, o que acontece em apenas 1% dos indivíduos infetados [16][17].

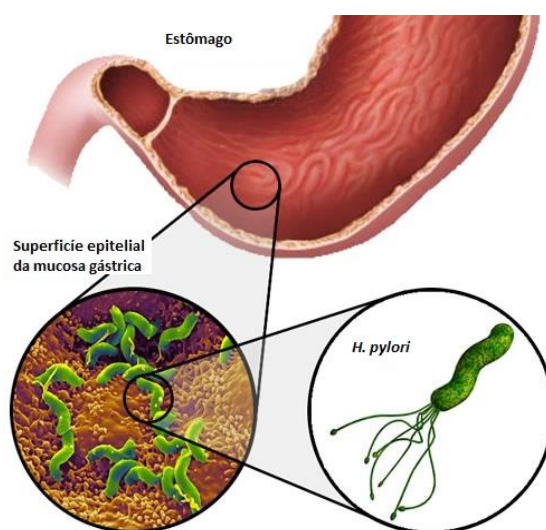


Figura 2.2: Infecção pela *H. pylori* na mucosa antral da cavidade gástrica. Imagem adaptada de [47]

Das patologias agravadas, associadas a outros fenótipos, pode ocorrer a úlcera péptica, a úlcera duodenal, o adenocarcinoma gástrico, tal como foi referido, e o linfoma MALT gástrico [10].

A neoplasia gástrica é considerada a quarta mais frequente no mundo, sendo responsável por 10% das mortes por cancro [17].

2.2.1 Úlcera péptica e Úlcera duodenal

A úlcera péptica tem associada diversos fatores de risco e, por conseguinte, é considerada uma doença de natureza, extremamente, heterogénea [18]. Fatores como o tabaco, a idade, o género, consumos de álcool e de cafeína, o stress, fármacos anti-inflamatórios e a dieta vão influenciar grandemente a predisposição para desenvolver uma úlcera péptica. No entanto também os fatores genéticos e a existência de uma infecção pela *H. pylori* tem um papel preponderante na etiologia da patologia [18].

Por outro lado, a úlcera duodenal, que apresenta características semelhantes, apenas tem associada a *H. pylori* resultante de uma gastrite. Todos os outros fatores acima referidos, não revelam grande influência na ocorrência da lesão.

A úlcera péptica ou gástrica, designa-se por uma lesão na mucosa do estômago, e úlcera duodenal quando a ocorrência é no duodeno (primeira porção do intestino delgado) [19][20]. Esta patologia tem cura e o tratamento, mais comum, é a antibioterapia [9].

Geralmente, a maioria os doentes que apresentam úlcera duodenal segregam mais ácido, mas, esta reacção metabólica não é isolada. A presença da *H. pylori* contribui para o aumento da secreção de ácido gástrico. A bactéria estimula a produção de gastrina na mucosa antral. Esta última é uma hormona peptídica que promove a produção de ácido gástrico no estômago e que leva à ocorrência da hiperacidez.

Uma vez que, na maioria dos doentes este aumento é verificado, então numa infecção crónica da *H. pylori*, S. Wagner *et. al* consideram que a acidez gástrica não é alterada. A infecção pela bactéria é, portanto, considerada um fator patogénico da doença, sendo que, a prevalência da infecção aumenta com a idade [19].

Em vista disso, a erradicação da *H. pylori* torna-se categórica na redução significativa de situações clínicas de úlceras duodenais. A Tabela 2.1 lista os fatores de risco considerados pela Sociedade Portuguesa de Gastroenterologia que levam ao aconselhamento do tratamento para a erradicação da *H. pylori* [19].

Tabela 2.1: Fatores de risco gastrointestinal que sugerem tratamento para erradicação da *H. pylori*. Adaptado de [19].

Fatores de risco gastrointestinal
➤ Idade > 60 anos
➤ Histórico de úlcera péptica ou complicações associadas
➤ Patologia associada ou grave

De acordo com a literatura, 10%-56% dos doentes são assintomáticos. O despiste para a infeção é realizado quando existe histórico familiar de cancros gástricos, sendo realizados, na maioria dos casos, os testes e o tratamento. Outro grupo de doentes que carecem da necessidade de realização de testes são os que desenvolveram úlceras e que apresentam a doença dispéptica. A prevalência está entre 30%-100% e 34%-82%, respetivamente, para a úlcera e para a doença dispéptica [21].

2.2.2 *Linfoma gástrico*

As condições inflamatórias criadas pela *H. pylori* podem ser de tal ordem que levam a situações crónicas e agravadas, que promovem o desenvolvimento de um linfoma. O estímulo de um antigénio persistente é hábil de favorecer o desenvolvimento de células degeneradas que se organizam e formam um tecido linfoide [22].

O MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) é um linfoma extranodal do tecido linfoide que surge na mucosa gástrica [9][22]. Se não for detetado a tempo, o linfoma pode progredir e estender-se para outros órgãos linfoides circulantes, nomeadamente, até à medula óssea [22].

As manifestações clínicas ou são inexistentes ou ocorrem como sintomas dispépticos, sensação de ardor e dor abdominal ou epigástrica [22].

A erradicação da bactéria *H. pylori* torna-se essencial e é considerada, pela Sociedade Portuguesa de Gastroenterologia, como a primeira linha de tratamento para a regressão do tumor MALT preservando assim outras estruturas adjacentes e promovendo a recuperação do trato gastrointestinal [22][23].

2.2.3 *Adenocarcinoma gástrico*

No seguimento das patologias agravadas e associadas à infeção pela *H. pylori*, o adenocarcinoma gástrico pode surgir no seguimento de um prévio

linfoma gástrico do tipo MALT [22]. O adenocarcinoma gástrico resulta de uma infecção crónica da *H. pylori*, ou seja, de uma gastrite atrófica autoimune [24].

Sintomatologicamente e tal como todos os tumores gástricos, não apresenta sinais em estados iniciais pelo que se torna de difícil identificação. Geralmente, a identificação do tumor é feita num estado avançado onde o espectro de tratamentos disponíveis já é reduzido [25].

A infecção pela *H. pylori* aumenta consideravelmente a probabilidade de desenvolver esta patologia e, tendo isso em vista, a bactéria foi classificada como agente carcinogénico do tipo 1 [4][23].

2.3 Potenciais metabolitos libertados pela *H. pylori*

Todos os seres vivos libertam, através de reações metabólicas, VOCs (*volatile organic compounds*) e, tal como é esperado, a *H. pylori* também os produz. No entanto, os estudos existentes no que respeita ao perfil dos VOCs, passíveis de se encontrar quando a *H. pylori* se encontra alojada no estômago, ainda são limitados, não obstante, já existem algumas sugestões para certos compostos.

Segundo um estudo realizado por A. Ulanowska et al foram detetadas 48 substâncias voláteis no espaço aéreo de uma suspensão feita apenas com *H. pylori* [26]. É ainda referido que compostos derivados da metionina podem ser característicos de uma infecção pela *H. pylori*. Contudo, apenas o isobutano, a 2-butanona e o acetado de etilo podem ser emitidos pela bactéria no interior do organismo por se tratarem de compostos endógenos, Figura 2.3 [26].

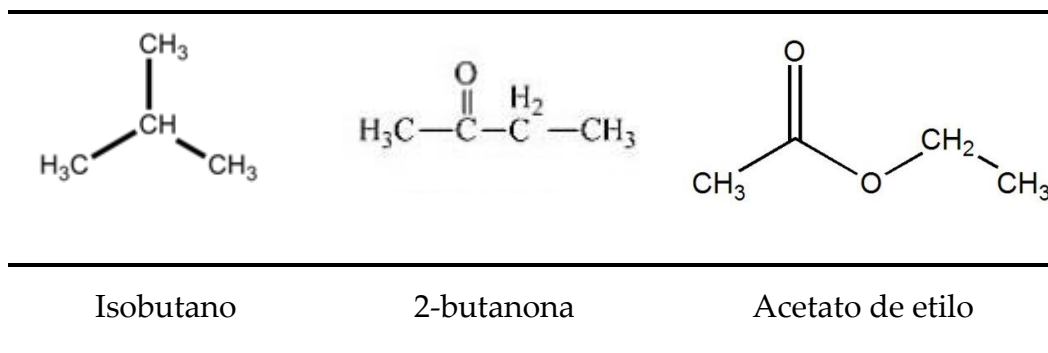


Figura 2.3: VOCs potencialmente libertados pela *H. pylori*. Imagens adaptadas de [27],[28],[29].

Esta informações são um ponto de partida para o estudo da caracterização dos VOCs que se sucede. No entanto, não é espectável encontrar a presença destes compostos nos espectros uma vez que o grupo amostral é saudável e sem indícios de estar na presença da *H. pylori*.

3

Estado de Arte

Desde que a comunidade científica começou a investigar estratégias e mecanismos de detecção da *H. pylori*, questões como a eficácia, o custo, a fiabilidade, a situação clínica do paciente, a população, a incidência da infecção, as probabilidades de infecção, a utilização de inibidores da bomba de prótons e o uso de fármacos antibióticos são tidas em conta no momento da escolha do método a aplicar [30].

Desta forma, encontram-se atualmente à disposição métodos de detecção invasivos (3.1) e métodos de detecção não-invasivos (3.2), sendo que estes últimos têm revelado um elevado potencial para aplicação clínica.

3.1 Métodos de detecção Invasivos

Os testes invasivos foram os primeiros a ser considerados, pela classe médica, como primeira abordagem no diagnóstico da *H. pylori*. [9] A detecção da infecção com recurso a culturas e demonstrações microscópicas requerem métodos invasivos [30].

Para evitar falsos negativos é essencial que em qualquer destes procedimentos os doentes não tenham tomado qualquer inibidor de bomba de prótons duas semanas antes [23].

3.1.1 Endoscopia

A endoscopia digestiva alta, Figura 3.1, é dos exames invasivos mais utilizados em gastroenterologia. Esta, permite aceder ao interior do estômago, com recurso a uma fibra ótica, para se proceder à realização da biópsia. No entanto, pode não ser o exame mais preciso pois as características endoscópicas da *H. pylori* revelam-se pouco específicas de acordo com os parâmetros tecnológicos. Estruturas como o Edema e o Eritema são detetáveis [9].

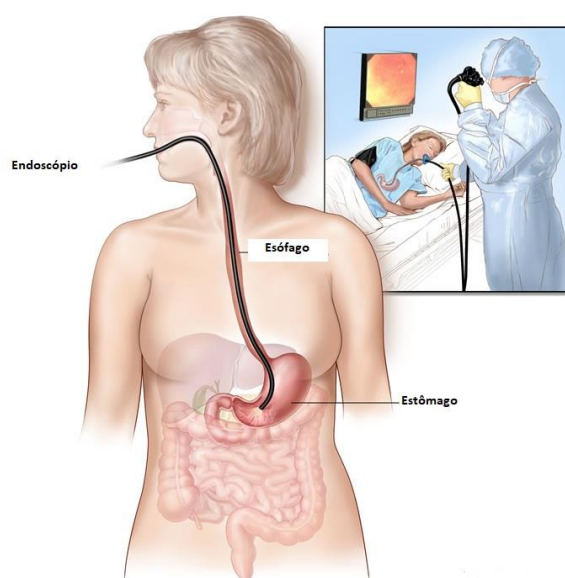


Figura 3.1: Imagem ilustrativa de uma endoscopia digestiva alta. Adaptado de [48].

Na realização de uma biópsia, são colhidas cinco porções da mucosa antral com recurso a *forceps* esterilizados, de acordo com o sistema de Sydney. É feita uma análise citobacteriológica, após incubação das amostras inoculadas, que é considerada positiva para a *H. pylori* quando estão presentes *Gram* negativa, citocromo oxidase positiva, catalase positiva e urease positiva [19][15].

Para além do procedimento descrito, a endoscopia é também o método utilizado para monitorizar o pH intragástrico. Protocolarmente, este exame realiza-se durante três dias e em regime ambulatorio. Eléctrodos de vidro, ligados a um

gravador portátil, são colocados no corpo gástrico e recolhem os dados durante 24 horas. Posteriormente, são tratados num programa computacional que, a partir de intervalos de tempo definidos, devolve uma média de valores.

O pH intragástrico indica valores baixos quando associado à patologia da úlcera duodenal e relativamente à gastrite, ambos em presença da *H. pylori*. Estas evidências são mais taxativas durante o período noturno e nas refeições [19]. No entanto é de ressaltar que o pH ácido está acentuado no estado inicial da infecção, tendencialmente e ao longo do tempo este tende a aumentar para pH's básicos.

3.1.2 Atividade da urease

Teste indireto e rápido tendo por base a realização de uma biópsia da mucosa gástrica por endoscopia gastrointestinal. As amostras são incubadas numa solução com ureia e, na presença da bactéria, identificam-se produtos resultantes da atividade enzimática da urease, ou seja, o dióxido de carbono e o amoníaco [31][32][23].

Os resultados são considerados positivos para a presença da bactéria quando ocorre uma alteração colorimétrica nas 24 horas consecutivas [32]. Esta alteração está diretamente relacionada com a alteração do pH. Quanto maior for a atividade da urease maior será a alteração do pH e, conseqüentemente, maior a certeza na presença da *H. pylori* [13].

No entanto a sensibilidade pode ser variável e a probabilidade de encontrar falsos positivos pode aumentar com o facto de ter ocorrido terapêutica prévia contra a bactéria ou ainda existirem outras bactérias produtoras da urease [7].

3.1.3 Histologia Anatomopatológica

Num teste histológico é detetada a presença da bactéria na mucosa ou na superfície das células epiteliais em análise microscópica [30]. Os resultados obtidos são colorimétricos onde o patogénico fica destacado com uma cor após

realização de uma biópsia e posterior adição de um composto para o tingir (tipicamente hematoxilina-eosina) [31][32].

Este teste é distinguido pela Sociedade Portuguesa de Gastroenterologia como o que apresenta melhores resultados diagnósticos de entre os invasivos. Tal como o teste rápido da urease, ambos são indicados para procedimento sempre que a situação clínica o justifique [23].

3.1.4 Cultura

Este é considerado um dos testes mais completos e de boa sensibilidade analítica quando as amostras são compostas por espécies bacterianas recolhidas durante uma endoscopia [9][31].

É de extrema importância assegurar que nas duas semanas antes da realização da biópsia o doente não tenha ingerido antibióticos ou fármacos anti-secretores, em especial bombas inibidoras de prótons. A falta deste compromisso pode comprometer os resultados pois vai interferir com o nicho bacteriano [9].

A cultura é realizada num meio com condições microaeróbicas e uma temperatura ideal para que a *H. pylori* fique conservada até à análise microscópica [9][19].

3.1.5 Citologia

Técnica analítica realizada a partir de raspagens executadas durante a endoscopia. As amostras recolhidas são colocadas em lâminas para posterior observação microscópica [9].

Tal como o método de cultura, este também permite visualizar e identificar células inflamadas bem como a *H. pylori*. A Figura 3.2 ilustra o resultado de uma citologia após coloração com acridina laranja (corante orgânico tipicamente utilizado) onde são perceptíveis células inflamadas bem como a *H. pylori* de estrutura filamentosa [9].

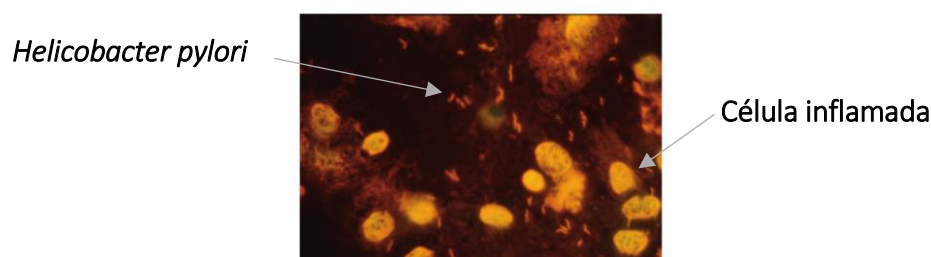


Figura 3.2: Observação microscópica de uma citologia na cavidade gástrica. Imagem adaptada de [9]

3.1.6 PCR em material recolhido na biópsia

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de análise aplicada na pesquisa da bactéria onde é possível quantificar e detetar os genes patogénicos característicos e ainda os marcadores de virulência (*cagA*). Para além disso também as mutações associadas a resistências antimicrobianas podem ser identificadas [9].

Na prática a amostra de tecido é degradada por forma a libertar a bactéria e consecutivamente libertar o seu DNA. Este DNA será amplificado a fim de obter uma quantidade suficiente de genes que por complementaridade se averigua a presença de um genoma de *H. pylori* [9][33].

3.1.7 Análises sanguíneas

A recolha de sangue para a detecção da *H. pylori* pode ocorrer no momento da endoscopia bem como através de uma simples picada no dedo.

O sangue é recolhido e separado o soro para identificação de anticorpos IgG dos genes marcadores da bactéria [15].

A *H. pylori* pode reagir com o sangue quando existem úlceras ou hemorragias, assim este teste é uma alternativa viável para um diagnóstico rápido, mas de menor precisão, comparativamente ao teste respiratório não-invasivo [9].

3.1.8 Serologia (ELISA)

A pesquisa de antígenos é um bom método de despiste da infecção pela *H. pylori* quando a situação clínica implica a existência de antibioterapia ou de terapêutica anti-secretora [23]. Com recurso à tecnologia ELISA, deteta e quantifica anticorpos IgG da *H. pylori* [30].

Baseado num imuno-ensaio, este é um biossensor que vai imobilizar uma enzima para detetar os anticorpos IgG, bio marcadores específicos da doença, através de uma amostra de sangue. Ao contrário da biópsia, esta técnica avalia a presença da *H. pylori* mesmo que a sua distribuição pela mucosa gástrica seja aleatória [30].

A performance do teste pode estar condicionada à resposta do anticorpo (IgG ou IgA), à idade, ao género, ao estado de saúde e à etnia [34].

As considerações que se retiram destes testes são ponderadas tendo em vista as descobertas histológicas em biópsias endoscópicas, ou seja, a serologia pode ser considerada um teste analítico complementar. A combinação com este método aumenta a eficácia de um diagnóstico [30].

3.2 Métodos de detecção Não-Invasivos

3.2.1 Testes da Ureia (ou teste respiratório da *H. pylori*)

Comparativamente a outras bactérias produtoras de urease passíveis de se encontradas em ambiente gástrico (*streptococci* e *staphylococci*), a *H. pylori* apresenta uma elevada atividade enzimática e a sua enzima é a que apresenta a mais alta atividade específica ($36 \pm 28 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) [9].

Por tal razão, a administração de ureia para despiste da presença da *H. pylori* num período de detecção inferior a 2 horas torna-se extremamente pertinente uma vez que a sua atividade enzimática vai ser superior às de outras bactérias presentes na mucosa.[9].

Adequado na avaliação após término da terapêutica para erradicação, o teste da Ureia apresenta elevada sensibilidade sendo utiliza ureia marcada com ^{13}C não-radioativo [9] [23]. Se a *H. pylori* estiver presente no estômago a reação enzimática promove a produção de elevados níveis de ^{13}C na exalação [35][23].

A ureia marcada é hidrolisada pela urease do parasita e é produzida grande quantidade de CO_2 detetável no ar exalado, pela presença do ^{13}C . Se não existir infecção o isótopo marcado é excretado na urina e não ocorrem alterações [9].

A execução do teste da urease é composta por dois momentos, o primeiro em que é inicialmente realizada a recolha de uma exalação para criar uma linha de base e, posteriormente, a ureia é administrada para iniciar o segundo momento do teste.

Para a criação da linha de base, é administrada, via oral, uma solução de sumo de laranja ou de ácido cítrico. Este procedimento promove o rápido fecho do esfíncter duodenal e assim reter o conteúdo estomacal. Em seguida, o paciente, é convidado a soprar para o interior de um tubo de vidro ou de um saco, através de um bocal tal como é ilustrado na Figura 3.3. O conteúdo do ar exalado recolhido providencia assim a base de comparação [20].



Figura 3.3: Teste respiratório da ureia. Imagem adaptada de [36].

Após esta fase, o paciente deve ingerir, aproximadamente, 100ml de uma solução contendo ureia marcada com ^{13}C não - radioativo. Após 30 minutos

repete-se o procedimento de exalação e faz-se a recolha para um segundo tubo/saco, Figura 3.3 [20].

A análise das amostras recolhidas é feita com recurso à espectrometria de massa *MS* (*mass spectrometry*) ou por espectroscopia infravermelha não dispersiva *NDIR* (*non-dispersive infra-red*) [37]

Os resultados provem da medição de rácios $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ que são utilizados para determinar a velocidade e a eficiência dos processos metabólicos [37].

Se a concentração de ^{13}C for de 3,5 partes por 1000 superior à *baseline* então, o teste é considerado positivo para a *H. pylori*. Quanto mais alto for o nível de ^{13}C maior será a extensão da infecção, pelo que, valores entre 30-40 partes por mil são valores considerados como indicadores da presença da infecção pela *H. pylori* [35].

A sensibilidade dos kits de diagnóstico é de 96% e a especificidade ascende aos 100% não sendo necessárias preparações prévias, tal como separar do meio aquoso ou isolar do CO_2 [35][38] Contudo, os resultados não são imediatos, só após uma análise laboratorial, que pode levar 24 horas, é que estes são conhecidos [20].

Apesar de ser um teste com boa resposta, importa referir que, existe uma margem para falsos positivos, devido à presença de outras bactérias produtoras de urease na cavidade oral (*Staphylococcus spp+*, *Streptococcus spp+*, etc.) [9]. Os resultados podem também ficar comprometidos com a ingestão de antibióticos (quatro semanas antes da realização do teste) e de inibidores da bomba de prótons e seus derivados ativos (duas semanas antes) [20]. A realização do teste respiratório da *H. pylori* restringe a ingestão de líquidos ou sólidos uma hora antes do procedimento [20].

3.2.2 Testes de antígenos nas fezes

É considerado um teste de comoda utilização uma vez que se utilizam amostras de fezes para ser detetada a presença de antígenos da *H. pylori*. O teste realiza-se numa microplaca que apresenta uns poços onde a amostra é colocada. Estes poços foram previamente cobertos com anticorpos (tipicamente monoclonais) específicos para a *H. pylori* [34][23].

Apesar de ser um teste não-invasivo bastante apelativo e eficaz não pode ser aplicado a doentes medicados com antibióticos, fármacos anti-secretores e que apresentem sangramento de úlceras [34].

3.2.3 Teste em biofilme dental

Considerando que por via oral pode ocorrer transmissão da bactéria *H. pylori*, foi criado um teste que analisa o biofilme dental e a saliva. Este teste utiliza o método PCR, supra citado, com a finalidade de encontrar relação entre índices orais e o patogénico [31].

3.2.4 Teste de urina

A análise da urina é passível de identificar a infecção da *H. pylori* quando é administrada ureia ao doente [31].

Tal como já foi explicado, da hidrolise pela urease resulta amoníaco e dióxido de carbono onde o primeiro é absorvido no sangue e excretado na urina [31].

A propriedade mensurável é a taxa de excreção da urina que é diretamente proporcional à magnitude da infecção pela *H. pylori* [31].

A vantagem deste método, para além de ser não-invasivo permite monitorizar a evolução terapêutica em doentes identificados pela infecção [31].

3.3 Estratégias de teste não-invasivas (comparações)

Baseado nos testes de diagnóstico da *H. pylori* foi desenvolvido um modelo económico, para a estrutura dos cuidados primários, com estratégias de testes não-invasivos. Este, teve por base situações clínicas onde, à partida seria de prever a realização de testes e de tratamentos. Assim sendo, numa primeira análise, é importante diferenciar grupos de prevalência da doença. Considerando baixa prevalência 30%, intermédia, 60% e alta prevalência 90% [21].

O modelo de análise de decisão foi concebido com recurso a uma análise Bayesiana e, utilizando um software de análise de decisão (v 3.5 TreeAge Software, Boston, MA, USA) para comparar os custos associados a um correto diagnóstico quando são aplicadas as estratégias de testes [21].

Os testes diagnóstico que serviram para realizar combinações e avaliar probabilidades de eficácias são: os marcadores de carbono no teste respiratório da ureia, a serologia (ELISA), a histologia, análise a uma gota de sangue com picada no dedo, o teste de antigénios em fezes e TRU. De entre os que estão enumerados, cinco estratégias contemplam testes unitários, vinte carecem de uma confirmação adicional e onze estratégias indicaram a necessidade de três testes combinados. Contudo a histologia foi considerada a análise utilizada em 4 estratégias para confirmar os resultados de TRU negativos [21].

As estratégias que utilizaram testes de confirmação, para resultados negativos, foram consideradas viáveis em situações de pacientes que revelaram alta probabilidade de apresentar *H. pylori*, no pré-teste. Por outro lado, os testes de confirmação para resultados positivos podem ser aplicados quando o paciente revelou, num pré-teste, probabilidade baixa, associada à infecção pela bactéria [21].

Nos países desenvolvidos, onde a prevalência de infecção pela *H. pylori* é baixa, devem ser consideradas as probabilidades de infecção encontradas nos pré-testes, aquando da utilização de testes não-invasivos, numa primeira instância de cuidados primários. Testes que detetem a infecção ativa, como o teste

respiratório e a detecção do antígeno das fezes, tem primazia sobre a serologia por apresentarem elevados níveis de eficácia [21].

Quando a prevalência de infecção pela *H. pylori* é alta continuam a ser preferenciais os testes de antígeno nas fezes e o teste da ureia devido aos seus benefícios. No entanto, é de ressaltar que a serologia, apesar da baixa precisão, pode ser competitivo, uma vez que é um teste de baixo custo [21].

4

Estudo do Perfil do Ar Exalado com Ureia

Neste capítulo serão apresentados os procedimentos experimentais e resultados dos processos de otimização da análise de amostras de ar exalado, averiguando a influência da variação dos fluxos EPC1 e EPC2, o tempo total de abertura da válvula, o tipo de polarização do IMS e o perfil metabólico da amostra após a ingestão de ureia. Serão também apresentados os resultados obtidos da identificação do pico relativo à amónia nos espectros de GC-IMS.

4.1 Métodos Experimentais de Recolha e Análise de Ar Exalado

As tarefas executadas no laboratório basearam-se em recolhas e análises de amostras de ar exalado. As amostras foram adquiridas com recurso a um protótipo desenvolvido pela NMT, S.A. para a recolha seletiva (isto é, que permite a seleção da fonte respiratória da amostra a recolher) e automática de ar exalado. Este dispositivo está patenteado pela empresa NMT, S.A. em parceria com a FCT-UNL [39].

Por outro lado, a aquisição de dados foi conseguida com a tecnologia analítica de base iónica, o GC-IMS. Esta tecnologia analítica permite a detecção e quantificação, rápida, de compostos orgânicos voláteis, com alta sensibilidade e grande precisão (ppb – ppt). A sua portabilidade e rápida capacidade de analisar amostras e produzir espectros tridimensionais, à temperatura ambiente e pressão atmosférica e sem utilização de reagentes químicos, tornam esta técnica uma promissora aquisição para a medicina não-invasiva e em trabalhos de investigação [40].

4.1.1 Equipamento de recolha de ar exalado

A otimização da recolha de ar exalado tem sido uma premissa constante nas investigações em parceria com a NMT, S. A. Foi com o mais recente protótipo de recolha de ar exalado que se realizaram todos os testes, com aquisições de amostras, que serão detalhados neste capítulo.

O protótipo desenvolvido pela NMT, S.A. em parceria com a FCT-UNL apresenta uma tecnologia inovadora que permite, seletivamente recolher, (de acordo com a fonte respiratória, *i.e.* ar da cavidade bucal, esofágico ou alveolar) uma porção de ar exalado. Vários parâmetros correspondentes às características do voluntário (idade, género e condição fisiológica) foram definidos no software do sistema de forma a tornar mais personalizada a aquisição. Por todos estes motivos, o instrumento apresenta uma grande versatilidade e um enorme potencial para o futuro da medicina.

A utilização deste protótipo implica a sua conexão a um dispositivo computadorizado (computador, tablet, etc.). O software deste dispositivo permite ao operador introduzir todos os parâmetros da aquisição e as características do utilizador. Adicionalmente, é sugerido também, ao utilizador, um ritmo de respiração a seguir.

A recolha de amostras de ar exalado com este protótipo é realizada para que a análise possa ocorrer em tempo-real (*online*) ou posteriormente (*offline*).

4.1.2 Equipamento analítico GC-IMS

O equipamento analítico escolhido para detetar compostos orgânicos voláteis (VOCs), em amostras de ar, que apresente alta sensibilidade e o realize de forma rápida foi o GC-IMS. Uma tecnologia de detecção e quantificação de VOCs em fase gasosa, que utiliza um processo de ionização a ocorrer à pressão atmosférica e que garante alta precisão analítica [41]. Os princípios de separação dos compostos ionizados estão assentes numa difusão resultante da aplicação do

campo elétrico que confere baixa velocidade de deriva aos iões pesados e volumosos e rapidez de deriva aos iões pequenos e leves.

A combinação entre o GC (*Gas Chromatography*) e o IMS (*Ion Mobility Spectrometry*) garantem que uma pequena amostra gasosa tenha uma seletividade analítica otimizada e facilitada. Os principais parâmetros analíticos são o tempo de retenção na coluna de GC, o tempo de separação dos compostos ionizados no tubo de deriva do IMS e ainda a quantidade de compostos que reagem e que chegam à placa de Faraday (detector) permitindo a quantificação do sinal através da sua intensidade [41].

A Figura 4.1 mostra de forma esquemática o funcionamento do GC-IMS. A amostra é injetada, elui pela coluna de GC para uma pré-separação e entra na camara de ionização. A fonte radioativa de trítio promove a formação de iões nos compostos do analito. Estes entram na zona de deriva e chegam à placa de Faraday a um tempo específico que está relacionado com a interação com o campo elétrico aplicado e com o gás de deriva circulante [5],[42].

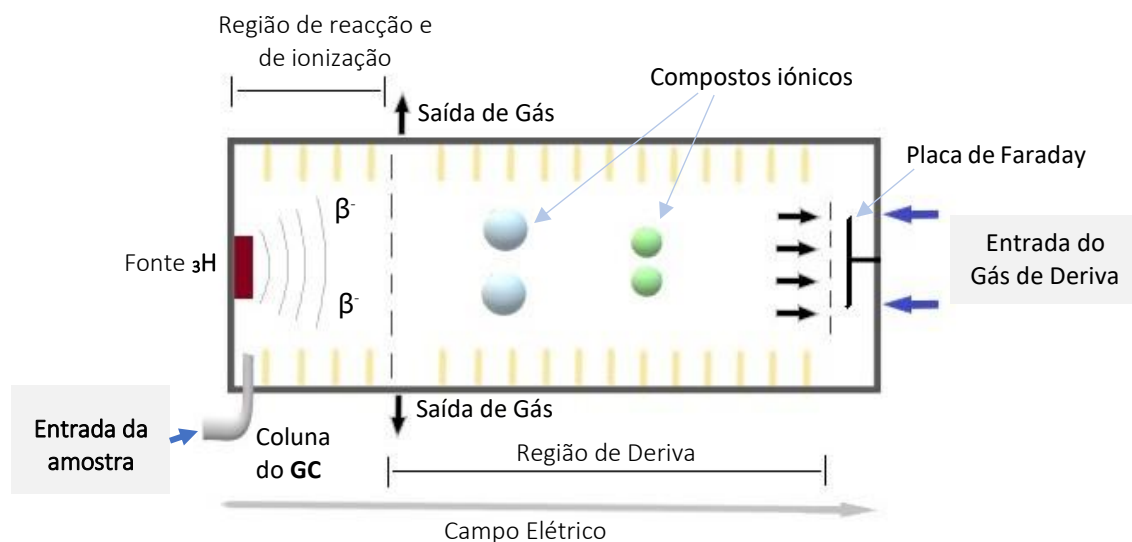


Figura 4.1: Esquemático do equipamento GC-IMS

Os sinais visualizados no espectro são a tradução do comportamento dos compostos em tempo de deriva (ms) e em intensidade (pA). Estas variáveis estão

relacionadas com a massa e a dimensão do composto, a sua concentração na amostra e o tempo a que atinge a placa de Faraday [43].

4.1.3 *Protocolo experimental para análise de amostras de ar exalado*

Numa primeira fase, foram realizados pequenos testes preliminares que visaram suportar e testar o procedimento protocolar a ser utilizado para a caracterização do perfil metabólico do ar exalado após a ingestão da ureia em sujeitos saudáveis. O plano para a aquisição de espectros necessitou de uma optimização prévia de acordo com os VOC que se pretendiam identificar.

Assim, foram criados vários programas de análise no aparelho analítico GC-IMS onde se manipularam diferentes parâmetros (tempos, fluxos, volumes e polarização) de forma a aumentar a capacidade de separação dos compostos presentes nas amostras e, por conseguinte, melhorar a análise dos resultados.

Cada programa apresenta uma sequência de ações que deve ser criteriosamente ajustada, isto é, a abertura e fecho de válvulas, o tempo de injeção da amostra, o início e fim da aquisição espectral, o volume do *loop* (após entrada da amostra), o controlo das temperaturas de todos os componentes do sistema e o controlo do fluxo de deriva na câmara de ionização do IMS e do fluxo de arraste, na coluna cromatográfica. Apesar das amostras não necessitarem de tratamento prévio, todos os parâmetros enumerados influenciam a separação de VOCs nos espectros e, com isso, a qualidade da análise.

Partindo de um programa de referência para análise de amostras de ar exalado, as variáveis testadas durante a optimização do programa de análise foram: os volumes de injeção de amostra no *loop*, os tempos de abertura e fecho da válvula e ainda o modo de polarização no espectrómetro de mobilidade iónica (IMS).

Nesta etapa de optimização de protocolos foi utilizada ureia proveniente de diferentes fornecedores de forma a averiguar a variabilidade das amostras de ar

exalado com ingestão de ureias distintas. Realizou-se também uma análise do perfil de VOCs da amónia através de diluições sucessivas e injeção direta no equipamento analítico.

Durante todos os testes de optimização com análise de amostras de ar (ambiente e exalado) no equipamento analítico GC-IMS, os dados foram gravados num dispositivo USB e analisados com recurso ao software LAV.

Optimização da análise– *Variação de fluxos EPC1 e EPC2 do GC-IMS*

Alterações no do fluxo de deriva são pouco significativas no tempo de deriva dos VOCs, em amostras de ar exalado, no entanto, ao ser combinado com diferentes fluxos de arraste identificam-se alteações visíveis na intensidade e forma do *reactant ion peaks*, RIP, e dos compostos a analisar [44].

O RIP corresponde a um marco presente em todos os espectros e funciona como referência para os restantes compostos. Cada composto tem um tempo de deriva característico e o RIP permite normalizar esse valor mantendo o padrão característico dos compostos.

Cinco programas com diferentes fluxos de arraste (EPC2) na coluna de cromatográfica foram criados mantendo o fluxo de deriva (EPC1) e o tempo de análise/corrida das amostras (3 minutos). Para os primeiros três programas, C_UTEST_A, B e C, na Tabela 4.1, foram selecionados fluxos de arraste (EPC2) fixos de 25 ml/min, 50 ml/min e 75 ml/min, respetivamente. Por outro lado, para os últimos dois programas, C_UTEST_D e E, foram definidos fluxos de arraste personalizados. Durante a execução do programa, C_UTEST_D o fluxo EPC2 variou dos 25 aos 50 ml/min (durante o primeiro minuto de execução), dos 50 aos 75 ml/min (no segundo minuto) e dos 75 aos 100 ml/min (no último minuto de execução). Por sua vez, o C_UTEST_E teve os seus fluxos de arraste a variar dos 5 aos 75 ml/min (no primeiro minuto) e dos 75 aos 100 ml/min (nos 2 minutos restantes).

Tabela 4.1: Propriedades dos programas implementados no GC-IMS durante a otimização dos fluxos de deriva e de retenção

Programa		Características			
C_UTEST_A		EPC1: 150 ml/min EPC2: 50 ml/min Tempo total: 3 minutos Tempo de abertura da válvula: 10s			
C_UTEST_B		EPC1: 150 ml/min EPC2: 75 ml/min Tempo total: 3 minutos Tempo de abertura da válvula: 10 s			
C_UTEST_C		EPC1: 150 ml/min EPC2: 25 ml/min Tempo total: 3 minutos Tempo de abertura da válvula: 10 s			
C_UTEST_D					
Tempo de abertura da válvula: 10 s					
EPC1: 150 ml/min					
EPC2:	25 ml/min	50 ml/min	75 ml/min	100 ml/min	
Tempo:	0 min	1 min	2 min	3 min	
C_UTEST_E					
Tempo de abertura da válvula: 10 s					
EPC1: 150 mL/min					
EPC2:	5 ml/min	75 ml/min		100 ml/min	
Tempo:	0 min	1 min		3 min	

Todos os programas foram testados, sequencialmente, do programa C_UTEST_A até ao C_UTEST_E, com amostras de ar exalado de um voluntário do género masculino, com 28 anos e saudável.

De forma a poder efetuar uma análise comparativa, cada programa foi executado duas vezes: uma com a análise direta de uma amostra de ar ambiente e outra após a recolha de ar exalado. Um volume de $4,00 \pm 0,05$ ml foi recolhido e imediatamente injetado no GC-IMS com o início do programa.

Optimização da análise– *Variação do tempo de abertura da válvula*

Nos programas criados anteriormente o tempo total de abertura da válvula foi de 10 segundos. Para testar a influência deste parâmetro foi criado um programa semelhante ao C_UTEST_E, o CC_CALIB. Este, apresenta todos os parâmetros iguais exceto o tempo de abertura da válvula que foi alterado para 12 segundos. O programa desenvolvido foi testado em amostras de ar exalado de um voluntário jovem com 28 anos e do género masculino.

A alteração do tempo de abertura da válvula tem como objetivo verificar a influência do volume de amostra inserido para a coluna cromatográfica do GC-IMS na qualidade dos espectros obtidos. Nos programas testados garantiu-se sempre que todo o volume de amostra que é introduzido passa pela coluna.

Definindo o ar purificado como gás de deriva e uma polarização negativa no espectrómetro de mobilidade iónica (IMS), selecionou-se o programa de análise CC_CALIB. No teste para este programa de análise iniciaram-se os ensaios com o procedimento de ingestão de ureia. Assim, e garantindo que o voluntário apresentava um jejum de não menos de 3 horas realizaram-se as seguintes ações:

- Preparação do GC-IMS e do protótipo de recolha de ar exalado;
- Pesagem de $0,5000 \pm 0,0001$ g de ureia;
- Dissolução da ureia pesada num copo de água;
- Ingestão da solução de ureia;
- Cronometrar a partir do fim da ingestão de ureia;
- Enxaguar a boca com um pouco de água;
- Recolher $5,00 \pm 0,05$ ml de ar exalado com o protótipo de recolha automático;

- Desacoplar a seringa com a amostra do protótipo de recolha e acoplá-la à entrada de amostra do GC-IMS;
- Executar o programa de análise selecionado.

Em cada ensaio foram, sequencialmente, recolhidas 5 amostras de ar exalado após a ingestão de ureia pelo voluntário. Com uma duração de aproximadamente 25 minutos, as características do ensaio encontram-se descritas em detalhe na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Características das amostras de ar exalado recolhidas após ingestão de ureia.

Amostra	ID	Tempo após ureia (min)	Volume (ml)
1	Exhaled_Air_1	1:26	5,00 ± 0,05 ml
2	Exhaled_Air_2	6:15	5,00 ± 0,05 ml
3	Exhaled_Air_3	12:35	5,00 ± 0,05 ml
4	Exhaled_Air_4	18:33	5,00 ± 0,05 ml
5	Exhaled_Air_5	24:26	5,00 ± 0,05 ml

Optimização da análise– Polarização Positiva vs. Negativa no IMS

O equipamento analítico possibilita a análise de amostras através de uma polarização positiva (iões positivos) ou negativa (iões negativos) do IMS. A escolha do tipo de polarização depende de amostra para amostra. Assim, foi necessário testar ambos os modos para averiguar a existência de diferenças significativas na aquisição dos espectros e definir o tipo de polarização mais adequado para analisar amostras de ar exalado.

Depois de selecionado o programa C_UTEST_E no aparelho analítico GC-IMS variou-se o tipo de polarização do IMS em amostras de um voluntário do género masculino com 26 anos.

Durante este teste foram recolhidas 3 amostras: ar ambiente do laboratório (com e sem seringa) e ar exalado do sujeito. A amostra de ar ambiente sem

seringa foi recolhida diretamente pelo GC-IMS no momento de execução do programa de análise no GC-IMS.

As amostras de ar ambiente e exalado foram recolhidas através do protótipo da NMT, S.A. Em ambos os casos um volume de $5,00 \pm 0,05$ ml foi recolhido e introduzido no GC-IMS iniciando o programa de análise C_UTEST_E. A recolha de ar ambiente através do protótipo de recolha automático permitiu identificar os materiais que compõem o instrumento e que podem influenciar a composição do ar exalado.

As tabelas 4.3 e 4.4 descrevem a ordem pela qual as amostras foram recolhidas e analisadas (de 1 a 3), bem como as características da análise para os dois tipos de polaridade definidos no IMS.

Tabela 4.3: Características das análises efetuadas às três amostras de ar, com polarização em modo negativo.

Polarização Negativa			
Amostra	1	2	3
ID	Room_Air	Room_Air_Syringe	Exhaled_Air
Tipo de ar	Ar ambiente	Ar ambiente	Ar Exalado
Programa GC-IMS	C_UTEST_E	C_UTEST_E	C_UTEST_E
Tempo de corrida do programa	3 min	3 min	3 min
Operador	Carolina Conduto	Carolina Conduto	Carolina Conduto
T (°C)	$28,5 \pm 0,1$	$28,5 \pm 0,1$	$28,6 \pm 0,1$
RH (%)	$51,0 \pm 0,1$	$51,9 \pm 0,1$	$51,8 \pm 0,1$

Tabela 4.4: Características das análises efetuadas às três amostras de ar, com o GC-IMS em modo positivo.

Polarização Positiva			
Amostra	1	2	3
ID	Room_Air	Room_Air_Syringe	Exhaled_Air
Tipo de ar	Ar ambiente	Ar ambiente	Ar Exalado
Programa GC-IMS	C_UTEST_E	C_UTEST_E	C_UTEST_E
Tempo de corrida do programa	3 min	3 min	3 min
Operador	Carolina Conduto	Carolina Conduto	Carolina Conduto
T (°C)	23,8 ± 0,1	23,8 ± 0,1	24,0 ± 0,1
RH (%)	59,9 ± 0,1	60,0 ± 0,1	59,6 ± 0,1

Optimização da análise – Perfil metabólico do ar exalado após a ingestão de ureia

De forma a prever o perfil de metabolitos libertados no ar exalado, aquando da administração de uma solução de ureia, tornou-se pertinente utilizar uma pequena amostra de sujeitos saudáveis.

Adicionalmente também se avaliou a influência da ingestão de ureia de diferentes fornecedores na variabilidade das amostras de ar exalado. Sob as mesmas condições analisaram-se amostras de ar exalado após a ingestão ureia proveniente do kit HELIC ABS e proveniente da Farmácia Estácio.

Cinco sujeitos saudáveis de ambos os sexos (sem patologias gástricas ou hepáticas) e com idades compreendidas entre os 24 e os 29 anos foram recrutados para duas sessões de recolha de ar exalado realizadas em dias distintos (uma sessão com recolha de ar esofágico e outra com recolha de ar alveolar). Foi ainda requerido um jejum de 3 horas a todos os participantes e, para os do género

feminino, a confirmação de não gravidez, devido à acção prejudicial da ureia durante a gravidez.

As amostras de ar ambiente e exalado foram recolhidas e analisadas no GC-IMS a funcionar no modo de polarização positivo com o programa C_UTEST_E.

Uma amostra de ar ambiente do laboratório foi analisada em cada sessão, apenas com indicação ao programa para executar a análise. Também uma amostra de $5,00 \pm 0,05$ ml de ar ambiente foi recolhida através do dispositivo de recolha automático. O conteúdo da amostra foi transferido para o GC-IMS no momento da análise.

A primeira amostra de ar exalado recolhida em cada sessão ocorreu antes da ingestão de ureia e após o sujeito enxaguar a boca com água. Um volume de $3,00 \pm 0,05$ ml de ar exalado foi recolhido e analisado.

Em seguida foi executado o mesmo procedimento mencionado na parte “Optimização da análise – Variação de tempo de abertura da válvula do GC-IMS” da subsecção 4.1.3. De realçar que durante estes testes seis amostras de ar exalado com um volume de $4,00 \pm 0,05$ ml foram sequencialmente recolhidas com um intervalo de aproximadamente 4 minutos entre elas. O esquema da Figura 4.2, representa sucintamente a sequência de operações realizadas nos ensaios com os dois tipos de ureias.

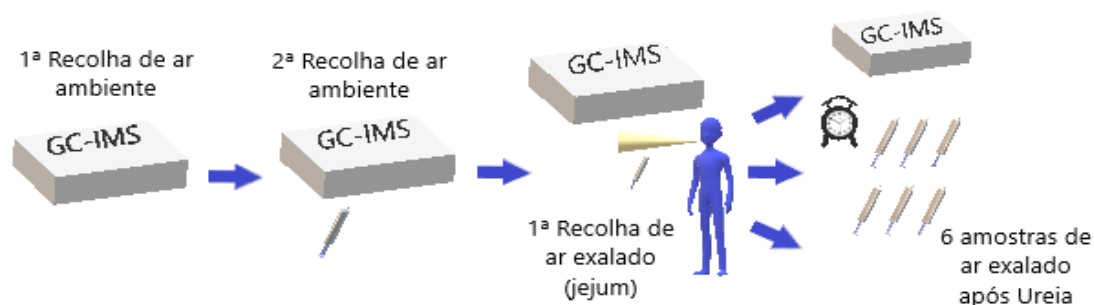


Figura 4.2: Esquema representativo da sequência de operações.

4.1.4 Identificação do pico relativo à amónia nos espectros de GC-IMS

A amónia é o VOC que se prevê ser o mais significativo na análise do ar exalado em indivíduos com *H. pylori*. Tal como foi explicado no Capítulo 2, a presença do ser unicelular no organismo Humano promove uma reacção enzimática onde se liberta amónia e CO₂ quando é administrada ureia. Assim, tornou-se evidente a necessidade de identificar e quantificar a amónia nos espectros obtidos no GC-IMS.

A quantificação de qualquer VOC é possível através da análise espectral no LAV (*Laboratory Analytical Viewer*). Para qualquer pico, correlacionar a altura e a área permite definir a concentração no analito [42]. Por este motivo e para se identificar e quantificar o pico relativo da amónia foi realizado um ensaio experimental com base em diluições sucessivas de uma solução concentrada de amónia.

Uma solução base, Am0, com ar ambiente e $1,00 \pm 0,05$ µl de solução concentrada de amónia foi preparada num vial de 40 ml. Depois do equilíbrio atmosférico do ar no interior do vial estar assegurado (com um tempo de espera aproximado de 20 minutos) extraiu-se $1,00 \pm 0,05$ ml de *headspace* desta preparação para um segundo vial. O procedimento descrito foi reproduzido 4 vezes para completar uma sequência de 3 diluições, Am1, Am2, Am3, tal como ilustra a Figura 4.3.



Figura 4.3: Esquema das diluições efetuadas a partir da solução padrão de amónia.

Neste procedimento foi utilizado o programa de análise TESTER_HP, cujas características constam na Tabela 4.5, de forma a caracterizar as amostras

diluídas. Os parâmetros do programa não se assemelham aos dos programas anteriormente criados para analisar amostras de ar exalado. No entanto, a associação entre resultados foi possível devido à manutenção da forma do pico de intensidade e do respetivo tempo de deriva, variando apenas o tempo de retenção devido à mudança do valor do fluxo de arraste (EPC2).

Tabela 4.5: Parâmetros definidos para o programa TESTER_HP.

<i>Programa</i>	<i>TESTER_HP</i>
<i>Tempo de recolha</i>	10 s
<i>Tempo a que Abriu a Válvula</i>	10 s
<i>Tempo a que Fechou a Válvula</i>	14 s
<i>Tempo de Corrida do Programa</i>	5 min
<i>Fluxo de Deriva</i>	150 ml/min
<i>Fluxo de Arraste</i>	10 ml/min
	25 ml/min
	40 ml/min
	Até aos 1:30 min de aquisição
	Até aos 3:00 min de aquisição
	Até aos 5:00 min de aquisição

A análise das amostras no GC-IMS, com uma polarização positiva no IMS teve início com duas análises consecutivas ao ar ambiente do laboratório sem (isto é, diretamente do GC-IMS) e com seringa, ROOM_AIR e ROOM_AIR_S, respetivamente.

Finalizados os 20 minutos de repouso do vial Am3, e após as análises ao ar ambiente foi recolhido um volume de $1,00 \pm 0,05$ ml e introduzido no equipamento analítico. As três diluições são analisadas da mais diluída para a mais concentrada evitando assim contaminação no aparelho. Entre estas foram também realizadas análises ao ar ambiente do laboratório. A sequência das diluições encontra-se descrita na Tabela 4.6 com a temperatura média ambiente e a humidade relativa a rondar os $26,35 \pm 0,05$ °C e os $66,65 \pm 0,05$ %, respetivamente.

Tabela 4.6: Ordem pela qual foi realizada a análise das amostras no estudo da identificação do pico da amónia, no GC-IMS.

Amostra	ID	Volume (ml)
1	ROOM_AIR	1,00 ± 0,05
2	ROOM_AIR_S	1,00 ± 0,05
3	Am3	1,00 ± 0,05
4	ROOM_AIR	1,00 ± 0,05
5	Am2	1,00 ± 0,05
6	ROOM_AIR	1,00 ± 0,05
7	Am1	1,00 ± 0,05
8	ROOM_AIR	1,00 ± 0,05

4.1.5 Caracterização do perfil metabólico do ar exalado após ingestão de ureia

Realizou-se um estudo piloto, com 31 voluntários saudáveis (19 mulheres e 12 homens), de forma a caracterizar o perfil de metabolitos presentes no ar exalado, quando administrada ureia adquirida num laboratório farmacêutico (Farmácia Estácio - Lisboa).

Os requisitos de índole pessoal para o grupo de controlo, abrangeram um grupo de jovens numa faixa etária aproximadamente constante (20 a 35 anos), saudáveis, sem problemas de estômago associados à infecção da *H. pylori* nem outros condicionantes patológicos (com especial atenção para doenças gástricas, hepáticas, pulmonares e cardíacas). A ingestão de qualquer tipo de medicação antibiótica ou de inibidores da bomba de prótons até um mês antes da realização dos testes foi também controlada [34]. Estes químicos podem extinguir as bactérias ou alterar o ambiente gástrico ou o pH do meio, influenciando os resultados das análises [45].

De realçar que foi considerado fator de exclusão todos os participantes do género feminino que apresentassem indícios de gravidez. Apesar da ureia utilizada ser não-radioativa, no caso de existirem vestígios ainda é desconhecido o

efeito que pequenas quantidades de radioatividade influenciam na gestação de um feto [45].

Adicionalmente, e para manter o rigor e fiabilidade do estudo, foi solicitado jejum nunca inferior a 3 horas, a não ingestão de álcool e de leguminosas antes da realização do teste. A última refeição antes do teste deve excluir carne, peixe e cogumelos, a lavagem dos dentes 3 horas antes da realização do teste e não utilizar produtos de higiene com odor ou perfume.

O estudo a realizado foi aprovado pela Faculdade de Ciências e Tecnologia em parceria com a Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa sob consentimento e aprovação de todos os participantes. Assim, e antes de iniciar o teste, foi fornecido a cada voluntário o “Consentimento Informado, Esclarecido e Livre de Participação em Estudo de Investigação” em conjunto com o breve questionário de Histórico Clínico que se encontra no **Anexo A**.

Com duração aproximada de 30 minutos, cada sessão incluiu:

- recolha de $6,60 \pm 0,05$ ml de ar ambiente do laboratório, diretamente pelo GC-IMS (sem injeção do conteúdo com seringa);
- recolha de $7,00 \pm 0,05$ ml de ar ambiente através do protótipo automático (para uma seringa descartável).

Após análise das amostras, o restante procedimento foi idêntico ao mencionado na parte “Optimização da análise – Variação de tempo de abertura da válvula do GC-IMS” da subsecção 4.1.3.

Durante este estudo amostras de ar exalado com um volume de $7,00 \pm 0,05$ ml foram recolhidas antes e após a administração de ureia (5 amostras consecutivamente recolhidas durante aproximadamente 17 minutos).

Todas as amostras foram analisadas no GC-IMS, utilizando o programa de análise, B_STRESS, Tabela 4.7 (construído com base no C_UTEST_D e no C_UTEST_E mencionados durante a “Optimização da análise”), onde cada aquisição tem duração de 3 minutos.

Tabela 4.7: Características do programa B_STRESS.

Programa	Características
B_STRESS	Tempo a que abre a válvula: 10 s Tempo a que fecha a válvula: 14 s Fluxo de Deriva (EPC1): 150 ml/min Fluxo de Arraste (EPC2): 100 ml/min Tempo de corrida do programa: 3 min

4.2 Métodos e Ferramentas para Análise de Dados do GC-IMS

Os dados experimentais foram analisados com recurso a duas ferramentas de software, compatíveis com os ficheiros do GC-IMS. O LAV (*Laboratory Analytical Viewer*) e o VOCInspect auxiliam na caracterização de VOCs e vão permitir a identificação de padrões no ar exalado dos voluntários saudáveis.

4.2.1 *Laboratory Analytical Viewer (LAV)*

Como havia sido referido anteriormente, o programa de software que serviu como instrumento de análise dos espectros adquiridos de todas as amostras de ar foi o LAV. Este software apresenta uma grande variedade de funcionalidades com *PlugIns*, que permitem estudar diversas características nos espectros.

Para que a análise pormenorizada de cada pico seja efetuada foi necessário defini-los em “*area sets*” (áreas que delimitam os picos dos espectros). Com as “*Area Set*” definidas, a opção *LAV_plugin_Gallery* permitiu exportar para todos os espectros ficheiros em formato de Excel com as intensidades relativas de todas as *areaset*s definidas.

Uma outra forma de analisar os espectros é tendo por base a comparação de todo o espectro. O *LAV_plugin_Reporter* coloca, lado-a-lado, todos os espectros selecionados pelo utilizador facilitando a identificação de VOCs idênticos de acordo com as coordenadas axiais. Adicionalmente, o LAV permite ainda a perceção da semelhança e diferença entre espectros através de uma ferramenta,

“Comparison Green/Red/Blue” que atribui uma cor (verde, vermelho ou azul) aos espectros a comparar, sobrepondo-os.

4.2.2 VOCInspect

Com os mesmos objetivos analíticos, da funcionalidade descrita em 4.2.1, foi ainda utilizado um programa desenvolvido pela NMT, S.A., o **VOCInspect**.

Este programa permite detetar picos através da subtração de espectros, ou seja, o espectro que se pretende analisar sofre a subtração por um espectro definido pelo utilizador.

A Figura 4.4 ilustra a forma como são escolhidos os espectros. Os botões “Open Data File”, “Open Background File” e “Open Reference File” possibilitam a seleção dos espectros em estudo.

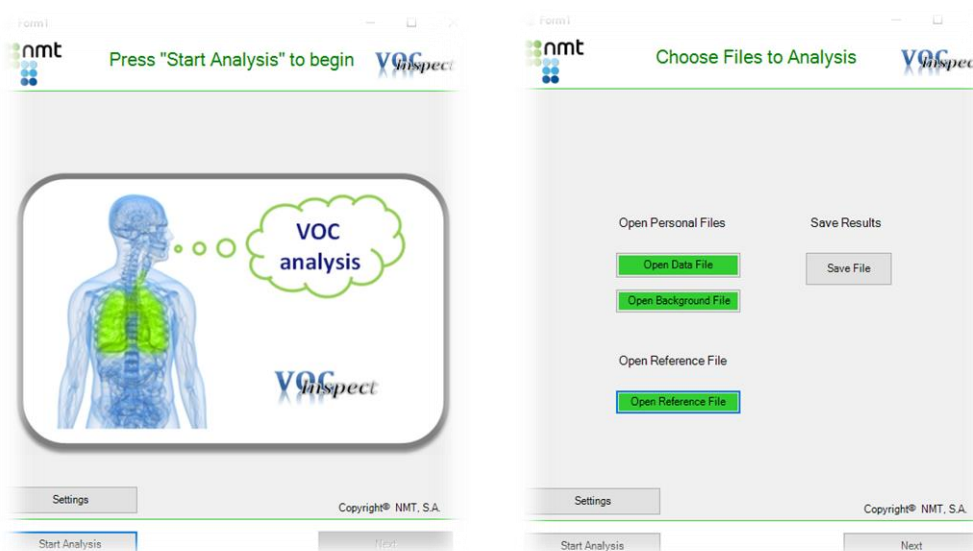


Figura 4.4: Programa criado pela NMT, S.A. para analisar espectros e identificar picos.

A utilização do **VOCInspect** implica a exportação de um ficheiro Excel, de extensão “.csv”, através do LAV, com os dados dos espectros pretendidos. O resultado que se espera da aplicação desta ferramenta é encontrar evidenciados picos diferentes ou intensidades alteradas.

A Figura 4.5 ilustra o programa em utilização após seleção dos espectros. Um corresponde ao espectro escolhido como referência (espectro da esquerda na Figura 4.5) e o outro corresponde ao espectro resultante da subtração (espectro da direita na Figura 4.5).

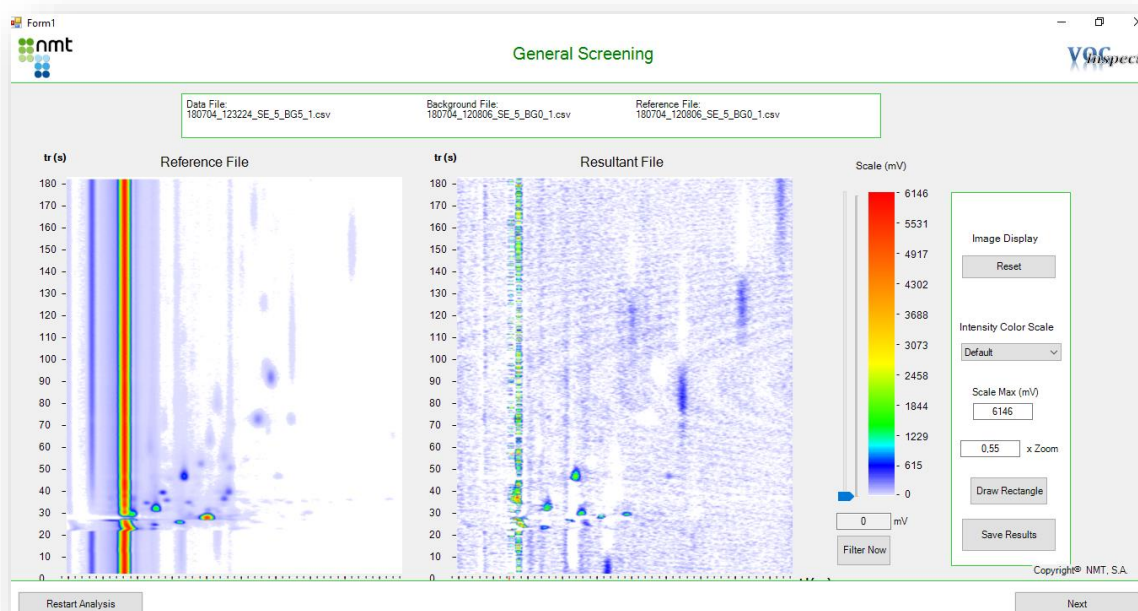


Figura 4.5: Vista genérica da aplicação da ferramenta VOCInspect após execução

4.3 Resultados da Optimização para Análise do Ar Exalado

Todos os espectros apresentam os seus picos representados a 3 dimensões onde no eixo das abcissas é tipicamente representado o tempo de deriva relativo (ao RIP), t_{dr} , no eixo das ordenadas apresenta-se tempo de retenção e, no eixo dos z representa-se intensidade do sinal em Volts.

Os tempos de retenção e de deriva são dos parâmetros mais significativos quando se analisam espectros desta categoria. A junção destes dois parâmetros permite a identificação do composto a partir da posição do seu pico no espectro.

Uma vez que a posição do RIP altera com diferentes valores de temperatura e humidade, tornou-se necessária a obtenção do tempo de deriva relativo, um

valor adimensional. Este valor permite estabelecer que cada posição de um pico específico mantenha o mesmo valor de tempo de deriva entre quaisquer medições/análises. O RIP que surge em todos os espectros vai apresentar um valor em milissegundos e qualquer pico presente no gráfico vai ter o seu tempo de deriva calculado de acordo com este [44].

O tempo de deriva real é obtido da seguinte forma:

$$t_{dVOC} = t_{dr} \times t_{dRIP} \quad (3)$$

onde t_{dVOC} corresponde ao tempo de deriva do VOC e t_{dRIP} corresponde ao tempo de deriva do RIP, ambos em milissegundos. Todos os tempos de deriva apresentados na discussão de resultados tem a aplicação da fórmula (3).

4.3.1 *Optimização da análise– Variação de fluxos EPC1 e EPC2 do GC-IMS*

A variação dos fluxos de arraste altera o tempo com que os compostos chegam ao detetor de Faraday, ou seja, altera o tempo que os compostos levam a percorrer a coluna do GC influenciando assim a separação dos compostos e a qualidade dos espectros obtidos. Assim sendo, se o valor de EPC2 aumentar então a velocidade do gás de arraste vai ser maior e, por sua vez os tempos de retenção de todos os compostos vão ser menores. Seguindo a mesma analogia se o valor de EPC2 diminuir, a velocidade diminui e por consequência, os compostos tem tempos de retenção mais elevados.

Da análise dos espectros foi possível identificar com clareza a influência da variação dos fluxos de arraste na separação dos VOCs que compõem o ar exalado. Comparando os espectros obtidos na Figura 4.6, com a aplicação dos programas de análise C_ UTEST. Com valores para EPC2 de 25 ml/min, 50 ml/min e 75 ml/min é claramente verificado o aumento dos tempos de retenção quando o fluxo é mais lento e a diminuição dos tempos quando o fluxo é mais rápido.

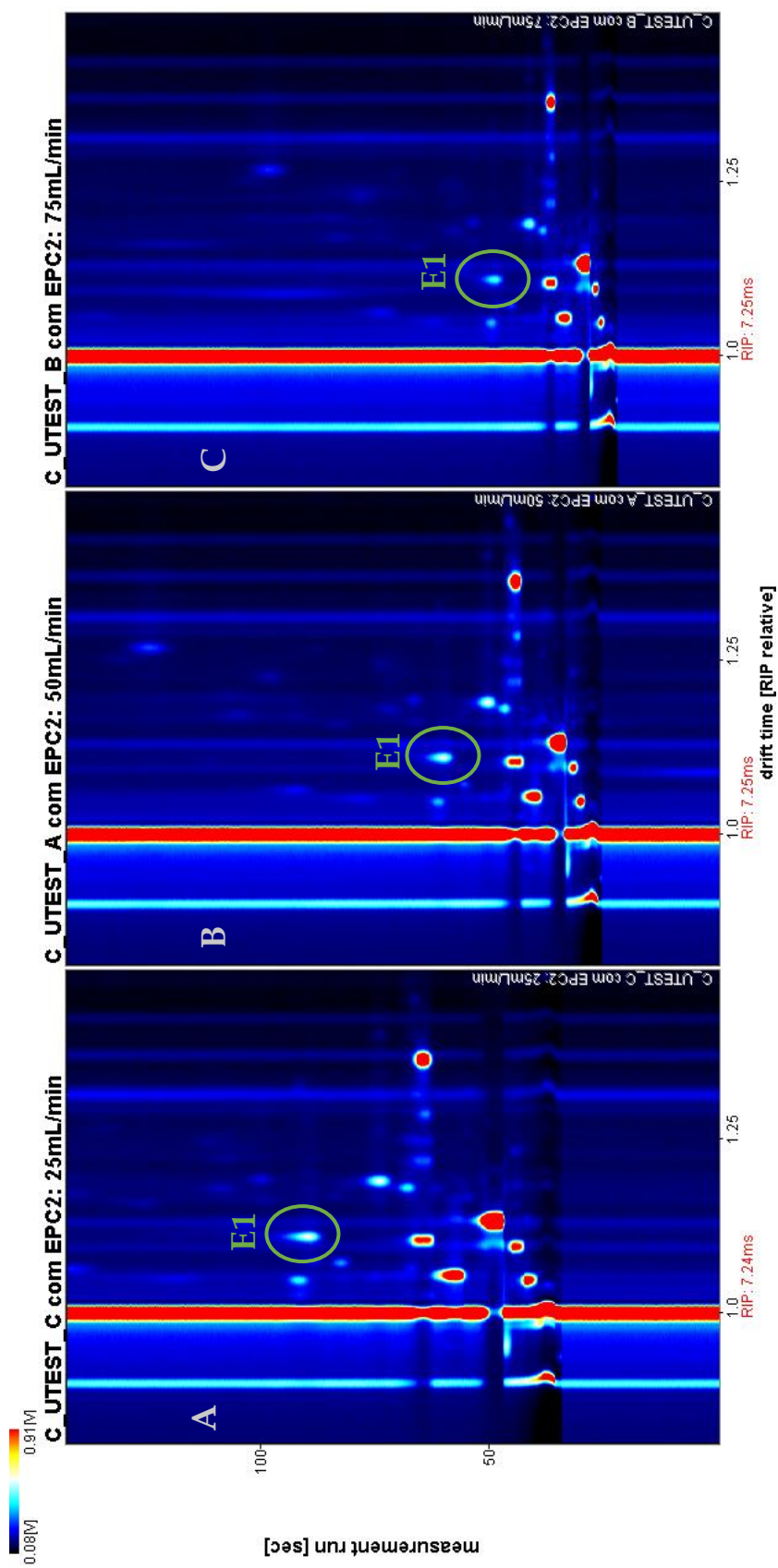


Figura 4.6: Influencia da variaçao do Fluxo EPC2 no tempo de retençao dos compostos.

Se tomarmos como exemplo o pico E1, que se encontra identificado em todos os espectros da Figura 4.6, é evidente a variação do tempo de retenção de acordo com a variação do fluxo de arraste. Quando o fluxo de arraste é de 25 ml/min o tempo de retenção é de 89,880s, Figura 4.6-A, quando é de 50 ml/min o tempo de retenção é de 60,060s, Figura 4.6 – B, e quando o fluxo no GC é de 75 ml/min o tempo de retenção já cai para 48,720s, Figura 4.6 - C. Em contrapartida, o tempo de deriva do composto já se mantém nos 8,03 ms em todos os espectros, como era espectável uma vez que os fluxos EPC1 foram mantidos constantes.

Para além desta diferença também se verifica que a área dos picos fica diminuída quando os fluxos são mais rápidos. Este facto deve-se ao arraste que a variação do fluxo promove. Quanto mais baixo for o fluxo de arraste mais tempo leva o composto a atravessar a camara, tornando esta área maior. Acrescenta-se ainda que, compostos mais volumosos também apresentam maior área.

Numa outra perspetiva de variação dos fluxos, em que se projetaram patamares de fluxos EPC2, para averiguar o comportamento dos compostos, dois programas de análise foram testados (C_UTEST_D e E). Como referenciado na Tabela 4.1, o programa de análise C_UTEST_D apresenta 3 patamares de fluxos de arraste (de 25 ml/min até 100 ml/min com incrementos de 25 ml/min em cada minuto de execução do programa), enquanto o programa de análise C_UTEST_E, com 2 patamares de fluxos EPC2, inicia num valor de fluxo mais baixo, a 5 ml/min, terminando nos mesmos 100 ml/min (com um incremento acentuado durante o primeiro minuto da análise: dos 5 ml/min para os 75 ml/min).

A comparação entre os espectros resultantes destes dois programas encontra-se ilustrada na Figura 4.7.

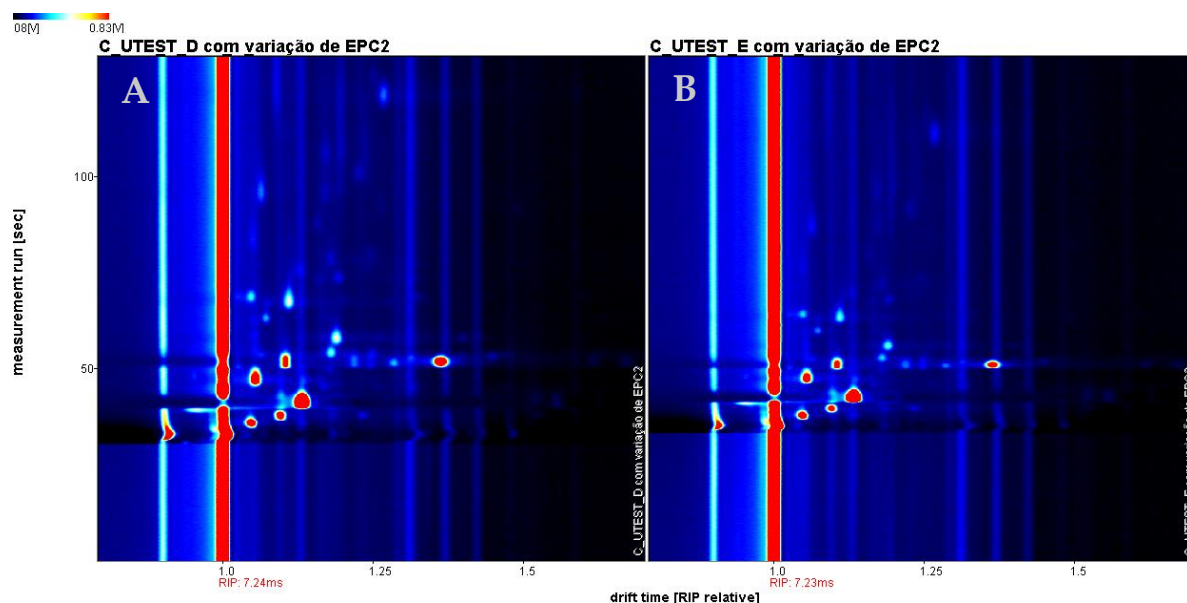


Figura 4.7: Espectros obtidos com a execução do programa C_UTEST_D e com o C_UTEST_E.

Pela análise comparativa dos espectros verifica-se que é pouco relevante fazer uma personalização do programa de análise com variação dos fluxos de arraste ao longo do tempo de execução do programa de análise.

De facto, o programa C_UTEST_D garante espectros com uma discriminação mais clara dos VOCs que compõem a amostra, mas o C_UTEST_E também oferece uma análise com uma ótima separação.

Ambos os programas apresentam a qualidade desejada, mas se o objetivo for analisar em concreto algum VOC conhecido torna-se pertinente personalizar o programa de análise fazendo variar os fluxos EPC1 e EPC2. Se os sinais aparecerem muito abaixo no espectro, devemos diminuir EPC2 por forma a aumentar a discriminação entre compostos. Se os sinais estiverem demasiado espaçados e com tempos de retenção muito elevados (superior a 200 s) então devemos aumentar o valor de EPC2 para reduzir esses tempos.

4.3.2 *Optimização da análise– Variação de tempos de abertura da válvula do GC-IMS*

O resultado da aplicação dos programas projetados e descritos, no subcapítulo 4.1.3, “*Optimização da análise – Variação de tempo de abertura da válvula do GC-IMS*”, a amostras de ar do mesmo sujeito, sugerem que ambos os programas permitem identificar o mesmo conjunto de VOCs.

Uma análise com ar purificado (como gás de arraste e deriva) e com 12 s de abertura de válvula revela menos ruído de fundo e melhor definição dos picos a nível de intensidade, comparativamente à análise com Nitrogénio e com 10 s de abertura de válvula.

No geral, todos os compostos chegam mais cedo à placa de Faraday quando se utiliza ar purificado, mas tem um tempo de arraste inferior quando se utiliza Nitrogénio. Quanto à variação do tempo de abertura da válvula não são encontradas diferenças significativas nos espectros. Contudo, deve garantir-se que todo o volume de amostra introduzido passa pela coluna cromatográfica.

4.3.3 *Optimização da análise– Polarização Positiva vs. Negativa no IMS*

A escolha do modo de polarização no IMS é de grande importância pois define o tipo de ionização que ocorre na amostra. A escolha vai determinar a quantidade de iões formados como também a eficiência da ionização que se traduz num mapa topográfico qualitativo.

Os compostos orgânicos voláteis do ar exalado apresentam baixa afinidade protónica às moléculas de água. Por este facto, quando a polarização está em modo positivo os clusters de água vão ionizar a grande maioria dos compostos que compõem a amostra formando assim produtos iónicos de carga positiva. Por outro lado, se a polarização for negativa existe uma membrana à entrada do sistema com alta capacidade de retenção das moléculas de água para promover a formação de iões negativos [43].

A polarização é um dos parâmetros que tem influência nos espectros de mobilidade iônica dos compostos orgânicos. As Figuras 4.8 e 4.9 ilustram a variabilidade gráfica encontrada quando a polarização está em modo negativo ou em modo positivo, respectivamente, utilizando o mesmo programa de aquisição no GC-IMS.

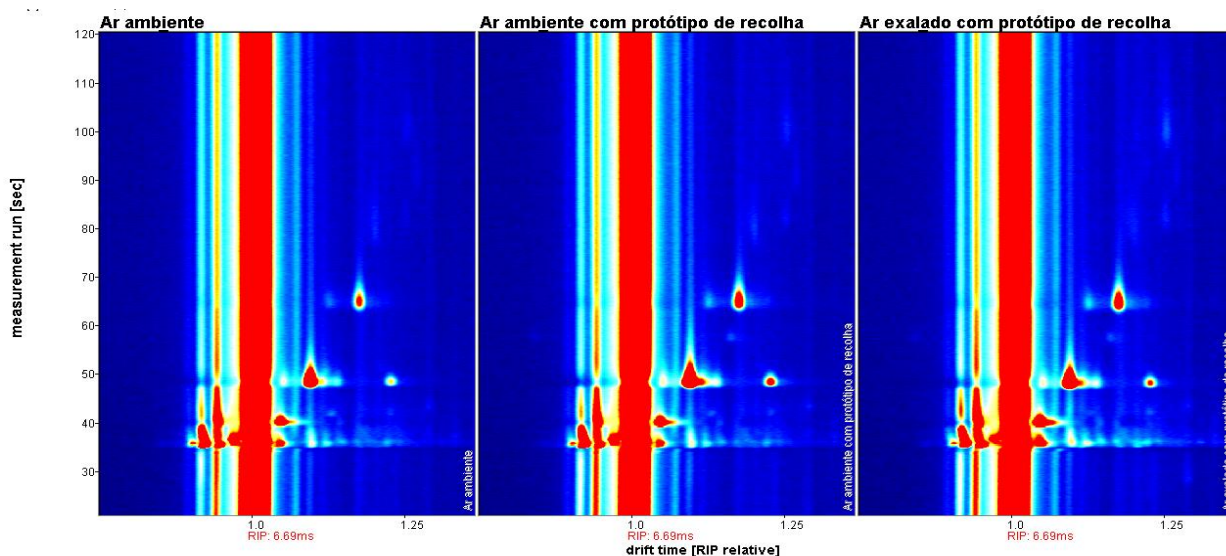


Figura 4.8: Aquisições com a polarização em modo negativo.

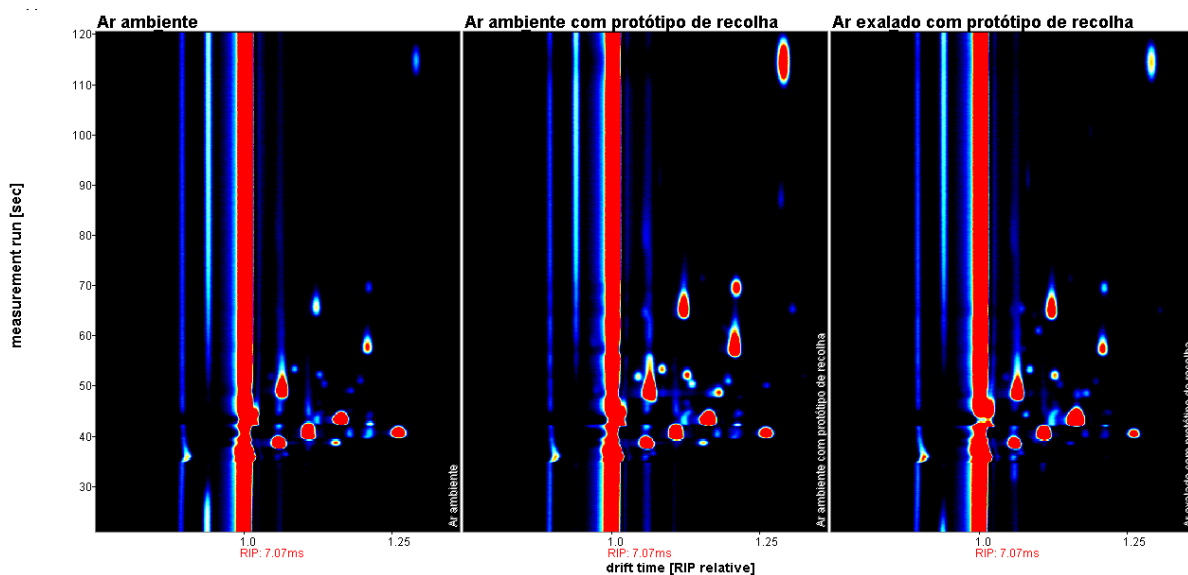


Figura 4.9: Aquisições com a polarização em modo positivo.

Tal como se verificou nos espectros das Figuras 4.8 é notório que os picos de intensidade detetados no modo de polarização negativo são exatamente os mesmos independentemente da amostra em estudo, ou seja, os picos detetados nas duas amostras de ar ambiente são iguais aos do ar exalado. Assim sendo, o modo de polarização negativo não fornece qualquer informação relevante para este estudo.

Por sua vez, no modo de polarização positivo (Figura 4.9) há alteração dos picos de intensidade/compostos de acordo com a amostra a ser analisada, seja ar ambiente (com ou sem seringa) ou amostras de ar exalado.

4.3.4 Espectros otimizados do perfil do Ar exalado após toma da Ureia

A Figura 4.10 mostra o perfil encontrado em cada um dos 5 sujeitos, passado 1 minuto após toma da ureia. Destaca-se um padrão comum em todos os espectros, no entanto, é de salientar a presença de alguns VOCs característicos (destacados a verde) em parte da amostra.

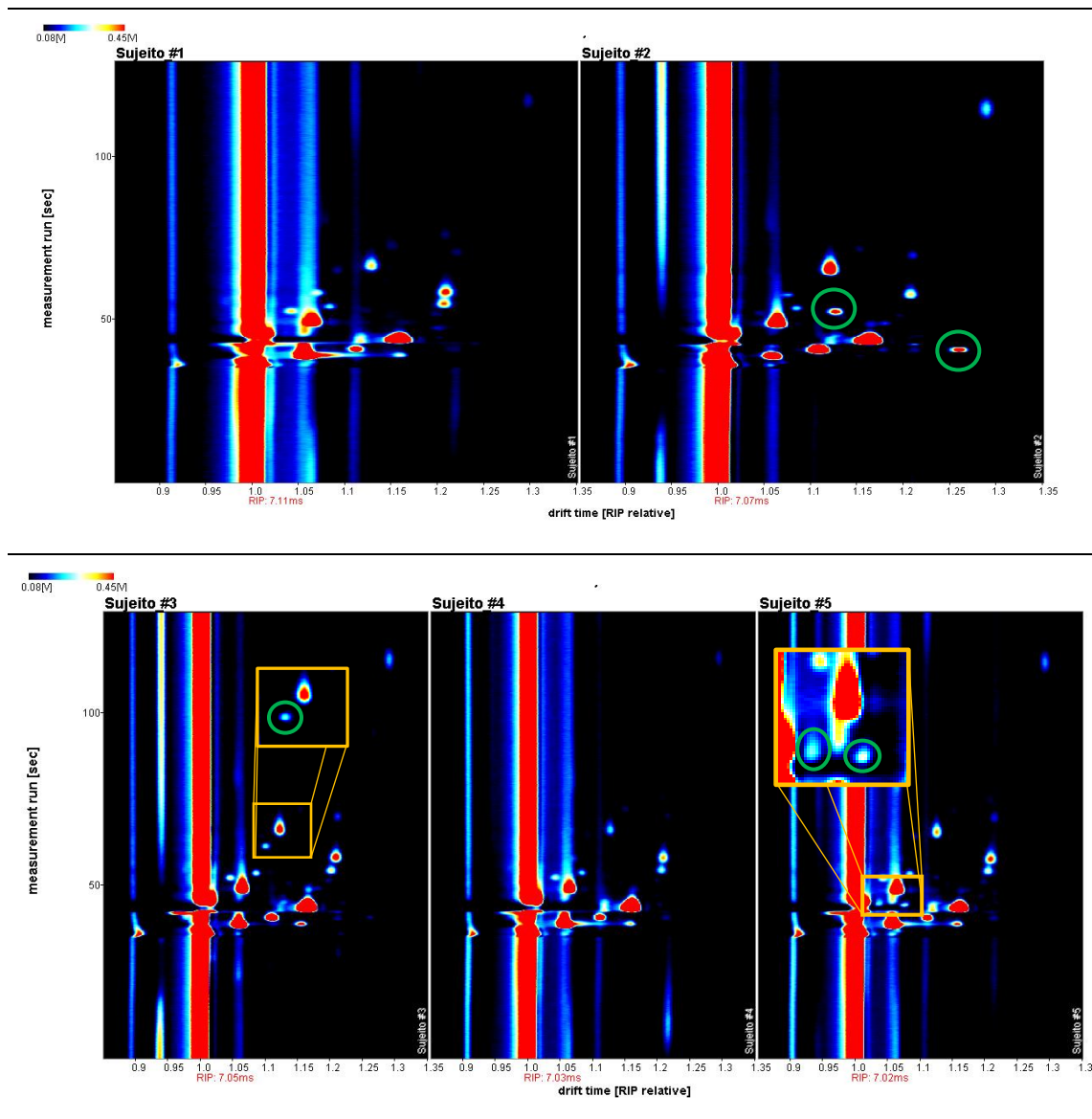


Figura 4.10: Espectros de cada voluntário do conjunto amostral N=5 após toma de ureia.

Dos resultados anteriores extrapolou-se para o gráfico ilustrado na Figura 4.11, o perfil típico de VOCs que compõem o ar exalado de sujeitos saudáveis após tomarem uma solução de ureia.

Os pontos verdes correspondem ao valor médio obtido para cada um dos compostos e produzem um padrão do perfil típico encontrado em todos os sujeitos. Os pontos vermelhos ilustram os compostos característicos, de forma individual, de alguns sujeitos do grupo amostral N=5. Tal pode ser justificado com base no metabolismo individual, estilo de vida e hábitos alimentares destes sujeitos.

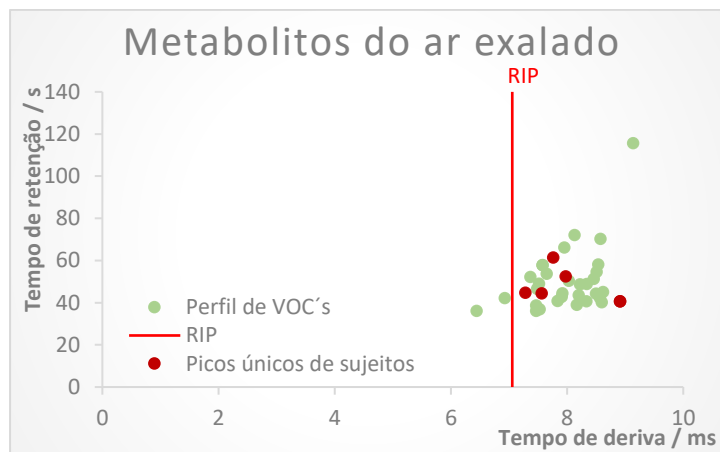


Figura 4.11: Gráfico do perfil de metabolitos presentes no ar exalado do conjunto amostral n=5, após ingestão de ureia

O estudo deste perfil teve em conta medições do ar exalado ao longo do tempo (até aproximadamente 25 minutos após a ingestão de ureia). Em toda a amostra, N=5, verificou-se que não ocorreram alterações significativas, não tendo surgido novos picos (compostos) associados à ureia. As intensidades mantiveram-se constantes com tendência para diminuir ao longo do tempo em todos os picos. A sequência de espectros que se segue na Figura 4.12 exemplifica o que pode ser observado, ao longo do tempo e após toma da ureia, nos restantes perfis do conjunto amostral.

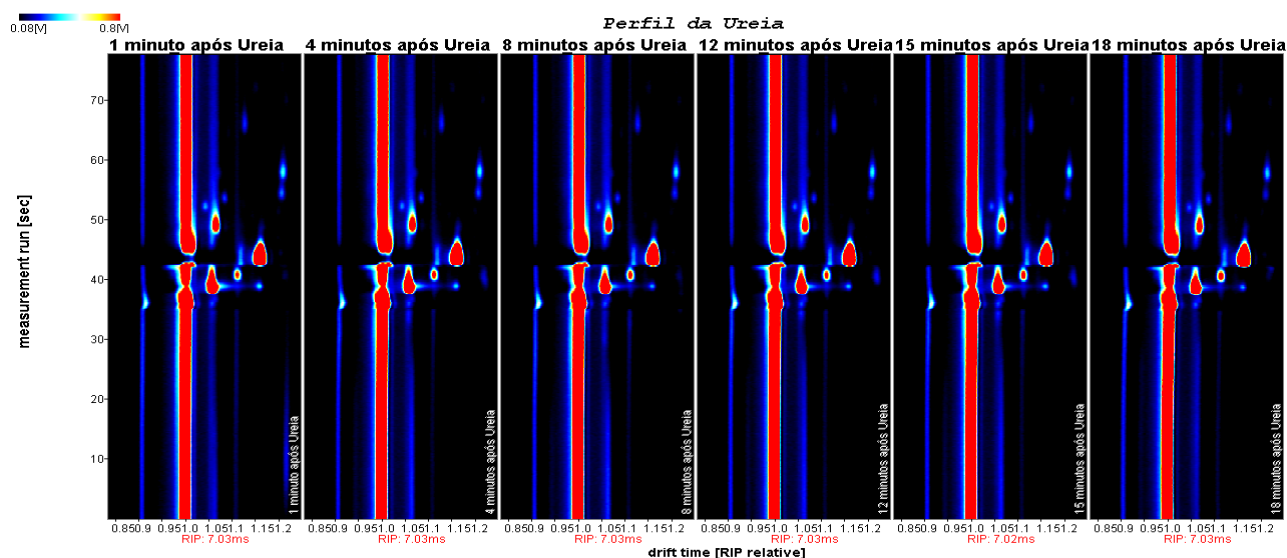


Figura 4.12: Perfil homogêneo e estável dos VOCs após ingestão de ureia.

Este é o perfil que se espera encontrar no estudo da Caracterização do perfil metabólico do ar exalado após a toma de ureia, da secção 4.5, para uma amostra de N=30 voluntários. Na Figura 4.13 é possível analisar em pormenor (para um dos voluntários) a variação de intensidade/concentração de cada VOC ao longo do tempo e após a toma da ureia. Estes resultados conferem confiança na suposição de que o sujeito é saudável e que não está na presença da *H. pylori*.

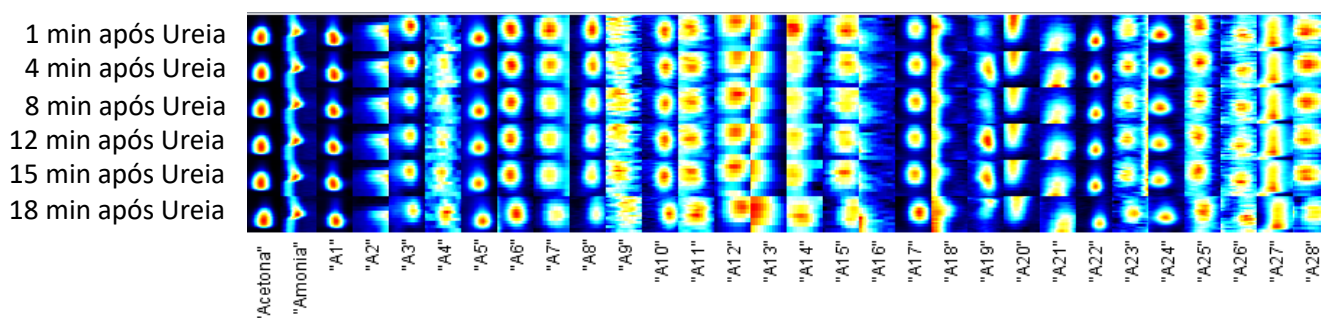


Figura 4.13: Variação da intensidade dos picos (VOCs do ar exalado) num indivíduo até 18 minutos após a ingestão da ureia.

Segundo o estudo de Ulanowska et al., 2011 o isobutano, a 2-butanona e o acetato de etilo são compostos produzidos pelo metabolismo da bactéria e que são passíveis de existir no ambiente gástrico de humanos quando este é parasitado. Se a presença destes compostos for notada ou se as suas concentrações estiverem aumentadas então há fortes indícios da presença de *H. pylori* [26].

Uma vez que, inicialmente, era desconhecido o efeito da toma ureia no ar exalado, tornou-se importante averiguar se o perfil de compostos do ar exalado variava com a ureia ingerida.

Os resultados mostrados anteriormente tiveram sempre como interveniente um tipo de ureia a qual foi denominada como Ureia A.

A comparação do efeito da ingestão de duas ureias provenientes de diferentes fornecedores, Ureia A e Ureia B encontra-se ilustrada na Figura 4.14. Com a utilização da ferramenta "Comparison Green/Red/Blue" foi possível verificar que não existem diferenças no ar exalado do mesmo sujeito quando são administradas ureias com origens distintas. O amarelo, que resulta da combinação entre

verde e vermelho confirma a semelhança entre ureias. Não existem diferenças mensuráveis logo não se verifica variabilidade entre a Ureia A e a Ureia B.

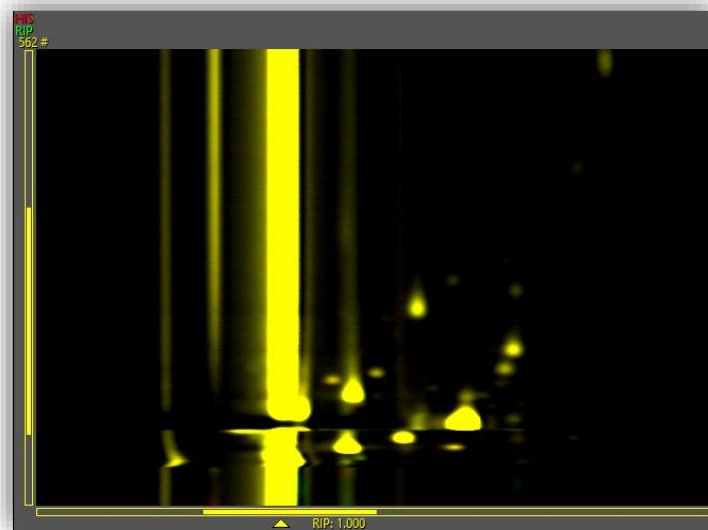


Figura 4.14: Espectro resultante da sobreposição de dois espectros. Um associado à Ureia A e outro à Ureia B.

Para completar esta análise, no Anexo C está ilustrada a evolução ao longo do tempo do ar exalado após a ingestão de ambas as ureias, recorrendo ao LAV_plugin_reporter. Os espectros encontram-se na Figura C.1 e confirmam a análise supramencionada e ilustrada na Figura 4.14.

4.4 Calibração do pico da amónia

Com recurso ao programa LAV e às suas ferramentas, nomeadamente o LAV_plugin_reporter obtiveram-se os tempos de retenção e os tempos de deriva da amónia. O registo desses valores para cada amostra analisada encontra-se na Tabela 4.8.

O ambiente laboratorial do ensaio teve uma temperatura média e uma humidade relativa de $25,98 \pm 0,14$ °C e de $64,95 \pm 1,10\%$, respetivamente.

Tabela 4.8: Tempos de retenção e de deriva, do pico relativo à amónia, para todos os espectros adquiridos pelo GC-IMS.

ID	t_d (Tempo de Deriva)	t_r (Tempo de retenção)	Tempo (h:m)
ROOM_AIR_S	6,557 ms	64,05 s	10:46
Am3	6,557 ms	63,84 s	11:02
ROOM_AIR	6,546 ms	63,63 s	11:07
Am2	6,557 ms	63,84 s	11:13
ROOM_AIR	6,557 ms	63,84s	11:19
Am1	6,557 ms	63,84 s	11:25
ROOM_AIR	6,557 ms	64,05 s	11:31

Com a utilização do programa TESTER_HP no LAV, o tempo de deriva médio, para a amónia, é de $6,555 \pm 0,003$ ms e o tempo de retenção $63,84 \pm 0,103$ s. Todos os valores aqui apresentados são resultados conseguidos através de testes com substâncias puras analisadas no equipamento GC-IMS.

Numa perspetiva qualitativa estudou-se a evolução da concentração do composto de acordo com a escala cromática que caracteriza o programa LAV. Esta escala representa a intensidade em Volts e está associada à concentração do composto sendo que, consoante a cor no espectro (mais quente – vermelho - ou mais fria – azul/preto) maior ou menor (respetivamente) é concentração do composto na amostra.

A Figura 4.15 oferece a visão comparativa dos espectros obtidos da análise das 3 diluições realizadas (Am1, Am2 e Am3). Uma vez que a amostra Am3 é a mais diluída e a amostra Am1 a mais concentrada, era expectável uma menor intensidade do pico da amónia para Am3 (esquerda) e maior intensidade para Am1 (direita) último espectro.

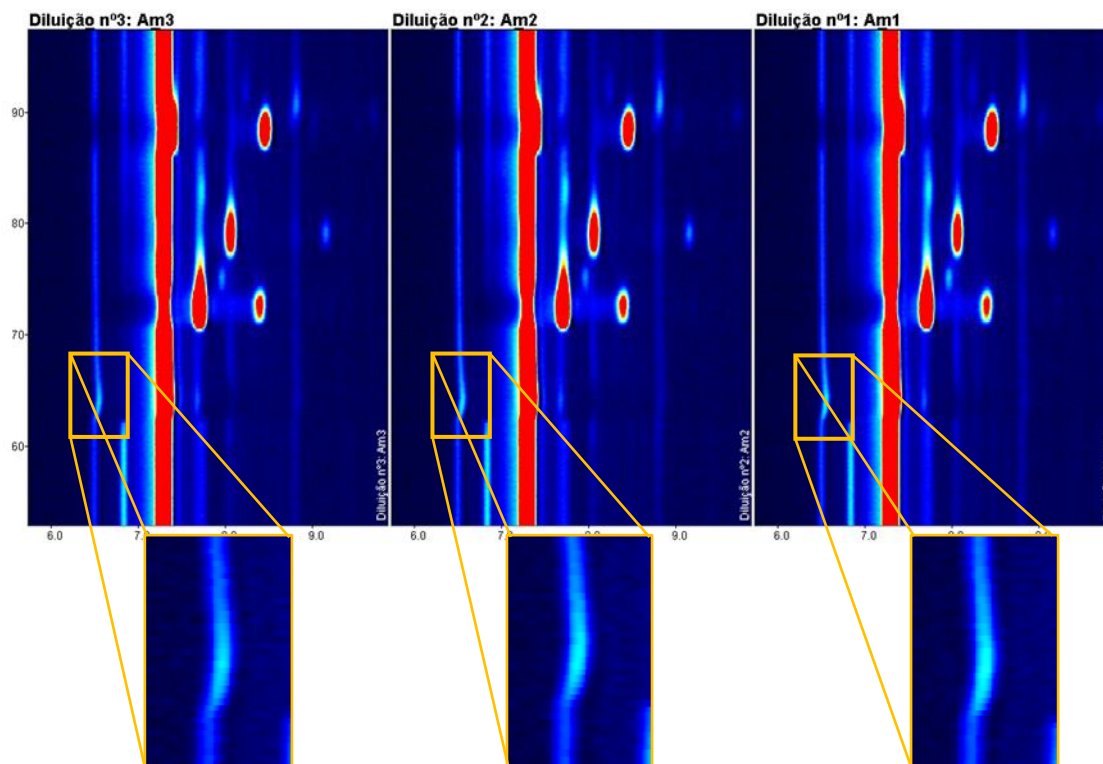


Figura 4.15: Ilustrativo da concentração da amónia, no espectro, ao longo das 3 diluições.

Da análise da Figura 4.15 é confirmado o aumento de intensidade dos picos com o aumento da concentração da amónia na amostra. Através das funcionalidades do LAV obteve-se o valor aproximado das intensidades: 234, 216 e 211 mV, para as amostras Am1, Am2 e Am3, respetivamente.

A Tabela 4.9 regista os valores das concentrações do composto para cada uma das diluições a partir da solução mãe.

Tabela 4.9: Concentração da amónia, em ppb, no *headspace* dos vials para cada diluição.

Amostra	[] ppb (µg/L)
Solução mãe	389000
Am1	19500
Am2	974
Am3	48

As concentrações apresentadas são um resultado teórico do que é suposto encontrar em cada um dos vials diluídos a partir da solução mãe preparada com 1µl de solução concentrada de amónia.

Relacionando os valores das intensidades encontradas nos espectros com os valores teóricos da concentração verifica-se uma coerência nas diluições realizadas.

Para as três diluições Am1, Am2 e Am3 foi possível obter um resultado quantitativo, no entanto a solução mãe não teve um resultado mensurável uma vez que a concentração do analito em Am0 excedeu o limite de detecção do GC-IMS saturando-o, ou seja, apesar da sua detecção ser possível a sua quantificação não o é.

Com estes resultados foi possível identificar nos ensaios um valor mínimo de 211 mV. Ressalve-se, no entanto, que este não é o limite mínimo de detecção para o composto, essa quantificação é feita com mais diluições as quais não fazem parte do objetivo principal do projecto.

Resultados do Perfil Metabólico do Ar Exalado após a ingestão de Ureia

Neste capítulo serão apresentados e analisados os resultados experimentais obtidos da caracterização do perfil metabólico do ar exalado antes e após ingestão de ureia numa amostra de 30 jovens voluntários.

5.1 Caracterização do perfil metabólico do ar exalado antes e depois da ingestão de ureia

No estudo piloto de 31 voluntários saudáveis, 1 foi excluído por falha na execução do protótipo de recolha automática. Para fins estatísticos o estudo ficou assim com uma amostra válida de $N = 30$ participantes.

Depois de serem marcadas as “Areas Set” dos espectros no LAV, chegou-se à conclusão de que duas delas deveriam ser excluídas por se tratar apenas de ruído (sinal inferior a 0,1 V). Assim, foi identificado um conjunto de 44 picos nos espectros adquiridos, de todas as amostras. Estes constituem um perfil genérico de VOCs característicos do ar exalado para sujeitos com as características definidas no estudo.

De entre os picos contabilizados apenas 19 são comuns a todos sendo que, os restantes variam de indivíduo para indivíduo.

É de referir também que dois dos picos marcados (A7 e A12) não surgem nos espectros de dois sujeitos (os sujeitos identificados com $N=17$ e $N=25$).

Paralelamente, existem também picos característicos de certos indivíduos, como é o caso dos 3 picos (A43, A44 e A45) que surgiram apenas em um sujeito (N = 28), Figura 5.1, e de um pico (A46) noutro sujeito (N = 31), Figura 5.2.

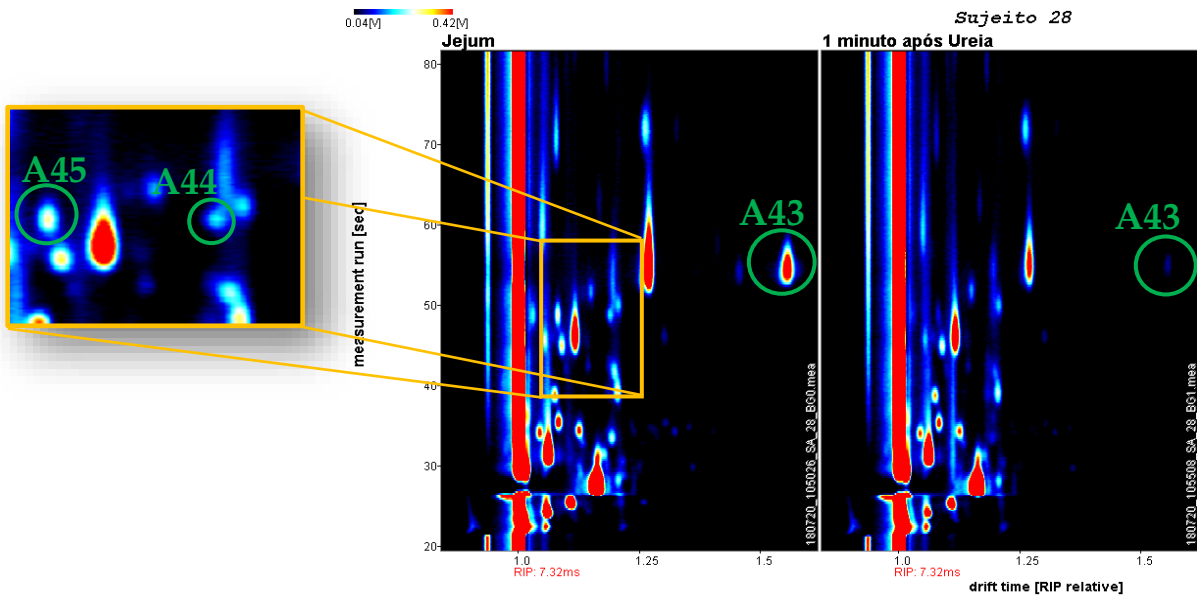


Figura 5.1: Espectros com os 3 picos característicos do sujeito N=28 marcados por A43, A44 e A45.

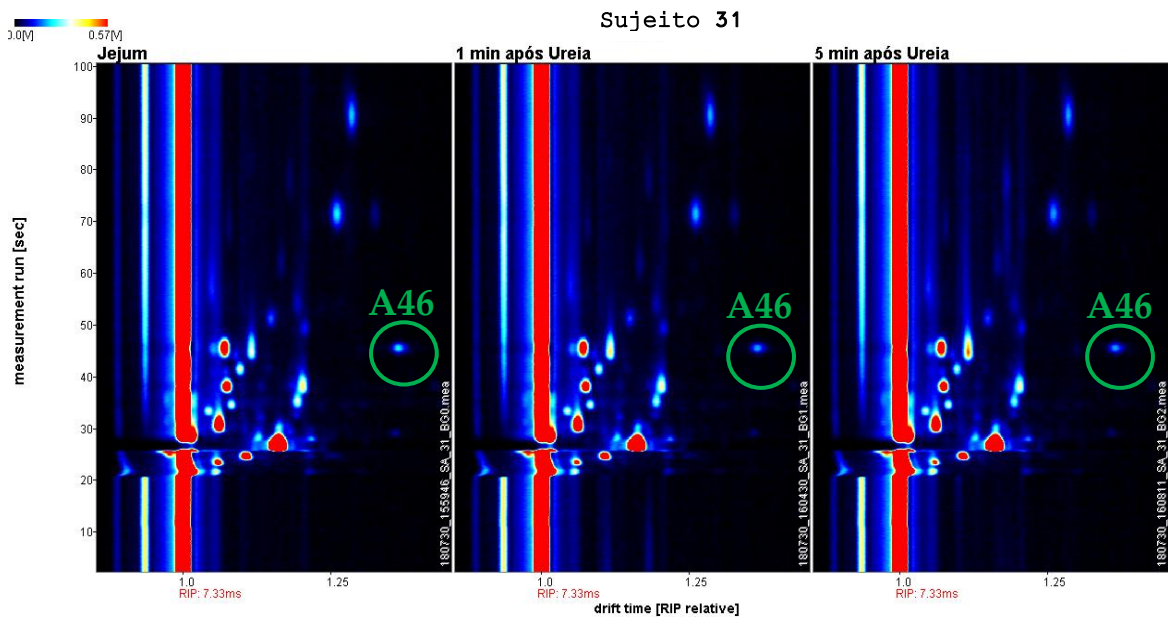


Figura 5.2: Espectros com o pico característico do sujeito N=31 marcado por A46.

A existência de picos individualizados em alguns dos sujeitos apenas infere que metabolismos diferentes podem apresentar VOCs característicos no ar exalado, mas que em nada se relacionam com a presença da *H. pylori*. Esta conclusão resulta da presença destes picos em todas as amostras recolhidas destes sujeitos, antes e após ingestão da ureia.

Considerando todo o grupo de voluntários (N = 30) e com recurso às ferramentas disponibilizadas no Excel® realizou-se um estudo detalhado ponderando diversas variáveis de forma a encontrar um padrão entre grupos de indivíduos. O pico estatisticamente tratado foi o referente à amónia devido à importância referida anteriormente no Capítulo 2.

Ao analisar os espectros no LAV foram identificados e registados todos os tempos de retenção, em segundos, e os tempos de deriva, em milissegundos, do pico da amónia em cada amostra de ar. Através do cálculo da média e do desvio padrão foi possível construir o mapa com a localização do pico da amónia.

A Tabela 5.1 apresenta os valores médios e os desvios padrão obtidos para os tempos de deriva e de retenção das amostras de ar alveolar e de ar esofágico. Estes vão corresponder às coordenadas do pico da amónia que se encontra representado no mapa da Figura 5.3.

Tabela 5.1: Médias e desvios padrão dos tempos de retenção e tempos de deriva relativos ao pico da amónia para a amostra N=30.

Amónia	Tempo de Retenção (s)	Tempo de Deriva (ms)	Tempo de retenção (s)	Tempo de Deriva (ms)
	\bar{x}	\bar{x}	s	s
Ar Alveolar	21,825	6,621	0,126	0,0070
Ar Esofágico	21,844	6,621	0,147	0,0095

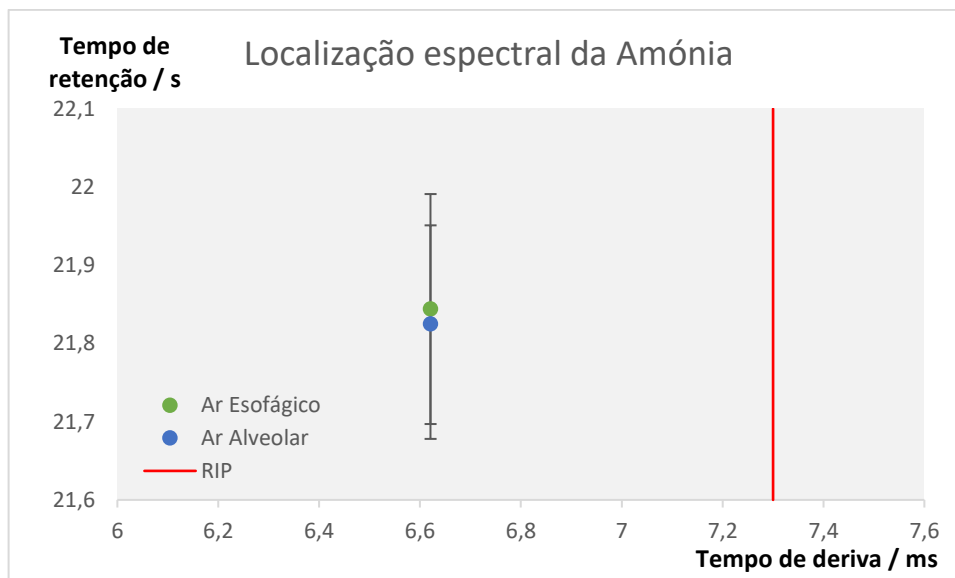


Figura 5.3: Representação das localizações médias para o pico da Amónia.

É de notar que a localização do pico da amónia apresenta uma ligeira variação, não significativa, para os 2 tipos de ar recolhidos (alveolar e esofágico). Quando o ar analisado é alveolar (representado a azul) o tempo de retenção (t_r) é de $21,825 \pm 0,126$ s e quando é esofágico (representado a verde) encontra-se um t_r médio de $21,844 \pm 0,147$ s. No entanto, os desvios padrão para ambos garantem que existe uma gama onde o composto pode estar representado e dessa forma a discrepância perde relevância.

Uma vez que é o tempo de deriva que caracteriza cada composto e que este permite, numa primeira instância, identificá-lo para além da sua forma característica, tornou-se essencial provar este valor não variava para o pico da amónia. O cálculo da média e do desvio padrão verificou que o tempo de deriva (t_d) para ambos os tipos de ar exalado é de $6,621 \pm 0,008$ ms. Um desvio padrão desta grandeza prova que se trata do mesmo composto.

Da análise efetuada também se constata que o composto surge em todas as amostras de ar exalado. Segundo o estudo de Kearney et al a amónia está presente na mistura complexa de VOCs do ar exalado humano em concentrações muito baixas. Tipicamente ronda os 100 – 2000 ppb [46].

Ao observar os resultados obtidos com as diferentes origens do ar exalado verificou-se que o perfil de metabolitos é tendencialmente estável em ambos os casos o que garante não só uma maior fiabilidade nos resultados como também a repetibilidade do protocolo aplicado. A maior estabilidade verificou-se nas amostras de ar esofágico, quer a nível de tendência do perfil ao longo do tempo, quer a nível de desvio padrão dos valores.

O gráfico da Figura 5.4 mostra a evolução metabólica da amónia nas duas porções de ar de um sujeito do grupo amostral. Encontra-se uma tendência para a estabilidade ou para uma diminuição na concentração do composto.

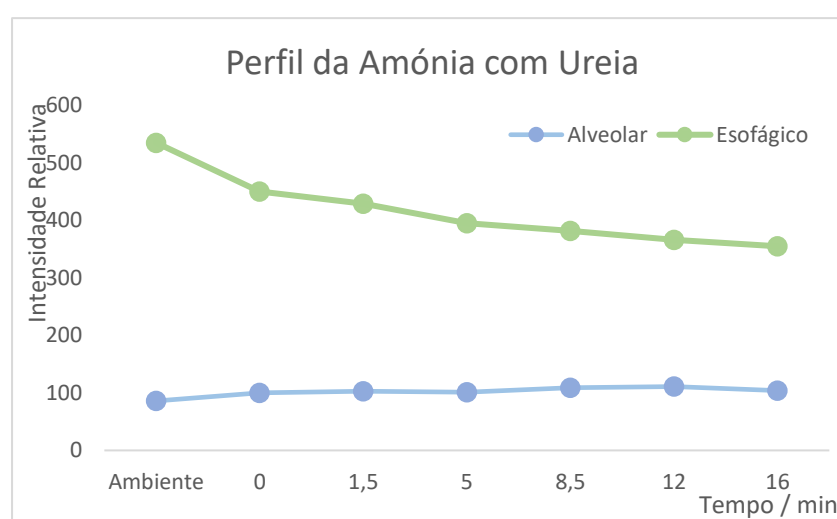


Figura 5.4: Gráfico de tendência temporal para a amónia no ar exalado de um sujeito do grupo amostral.

Os resultados não revelaram tendências crescentes para a amónia o que pressupõe não existirem reações metabólicas que estimulem o aumento da concentração do composto concluindo que os indivíduos da amostra são realmente saudáveis.

No entanto, como o objetivo é analisar o ar proveniente do estômago toda a estatística descrita será aplicada aos dados conseguidos a partir de amostras de ar esofágico.

Os gráficos da Figura 5.5 e 5.6 confirmam a manutenção da estabilidade do composto após ingestão da ureia e durante os 16 minutos de monitorização. O

primeiro corresponde à intensidade do pico da amónia no grupo amostral feminino (N=19) e o segundo corresponde à resposta metabólica deste mesmo pico no grupo amostral masculino (N=11).

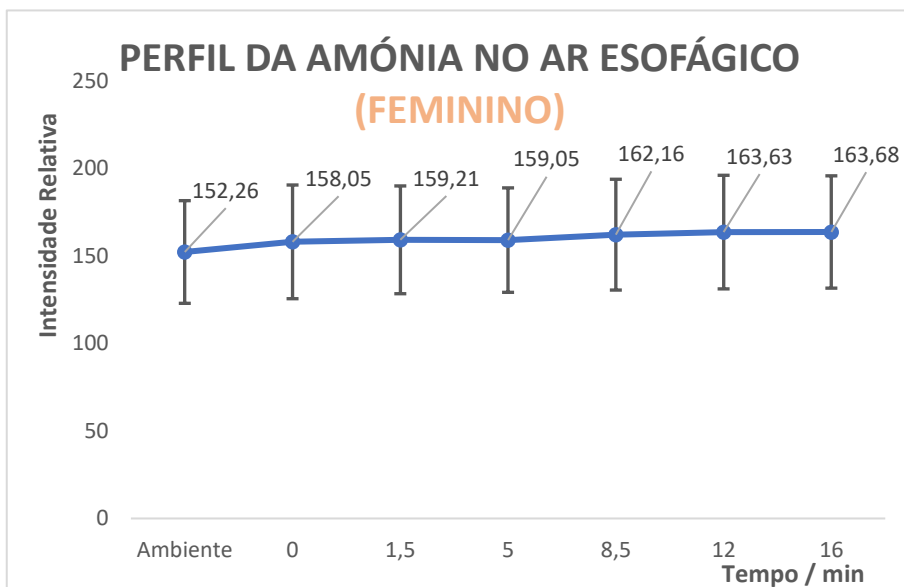


Figura 5.5: Gráfico estatístico com a representação das intensidades médias relativas para o grupo amostral do género feminino (N=19).

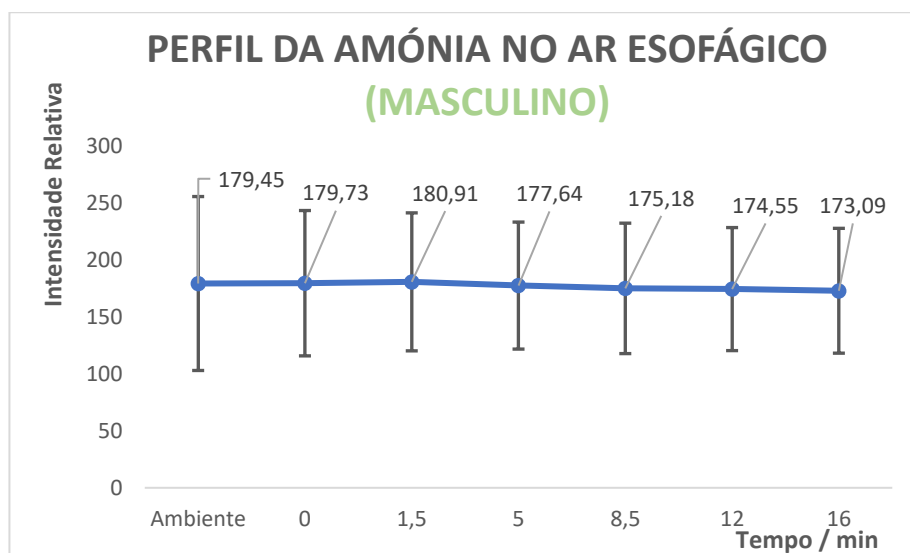


Figura 5.6: Gráfico estatístico com a representação das intensidades médias relativas para o grupo amostral do género masculino (N=11).

Num computo geral, o pico da amónia ao longo do tempo mantém-se estável para ambos os géneros. Considerando que a intensidade relativa dos picos é proporcional à concentração do composto, em seguida averiguar-se-ão as diferenças que se destacam.

Para o género feminino consegue-se distinguir um ligeiro aumento de 5,789 unidades da intensidade relativa do pico da amónia no ar exalado (correspondente ao jejum) quando comparado com o ar ambiente. Após toma da ureia este valor mantém-se praticamente constante num valor médio de $160,96 \pm 31,55$ unidades.

Quanto ao género masculino, a diferença do ar exalado em jejum para o ar ambiente tem o valor mínimo de 0,273 unidades, o que é praticamente insignificante em termos estatísticos. Após toma da ureia obteve-se um valor médio de $176,85 \pm 57,73$ unidades.

Em suma, verifica-se que o género feminino apresenta uma menor intensidade relativa (ou concentração) deste composto quando comparado com o género masculino, mas, em contrapartida, o maior desvio padrão apresentado ocorre no género masculino o que sugere uma maior variabilidade da concentração de amónia.

Para suportar os resultados dos gráficos das Figuras 5.5 e 5.6 encontram-se, no **Anexo D**, vários gráficos que estão na base dos resultados aqui apresentados. Para além destes, ainda foram elaborados outros gráficos de tendência, presentes no **Anexo D**, que agrupam diversas características dos sujeitos: o tipo de medicação permanente, a toma de métodos anticoncecionais (no caso das mulheres), as horas de jejum e ainda o intervalo de idades. Estas características foram objeto de análise para averiguar se existe alguma tendência.

No género feminino encontra-se uma tendência para a intensidade relativa da amónia estar entre as 101 e as 217 unidades. No género masculino como o conjunto amostral é reduzido (11 sujeitos), não existe uma tendência que se

destaque em particular. Com todo o espectro amostral os valores dispersam-se entre as 91 e as 240 unidades ao longo dos 16 minutos após toma da ureia.

Quando se analisam os dados, para ambos os géneros, em separado e de acordo com dois grupos etários, é possível identificar uma tendência estatística no conjunto feminino e nada, em concreto, para o conjunto masculino. No conjunto amostral [20:23] anos a amónia tem intensidades relativas a variar entre as 113 e as 211 unidades. Já dos [24:28] anos o género feminino apresentou valores a variar entre as 121 e as 217 unidades.

Para o género masculino não se identifica nenhuma tendência, no entanto para o grupo etário [22:25] a intensidade relativa pode variar entre as 91 e as 240 unidades e para o grupo etário dos [26:35] varia entre as 91 e as 206 unidades.

A influência do tempo de jejum parece ser relevante no que respeita à concentração da amónia no ar exalado. Verifica-se que os sujeitos que apresentaram tempos de jejum inferiores a 4h tem tendência a ter maior concentração de amónia no ar exalado alcançando valores até 217 unidades de intensidade relativa. Para jejum superior a 4 horas a intensidade relativa da amónia baixa, alcançando no máximo as 203 unidades.

A medicação permanente não mostrou interferir na tendência estável da amónia a nível de concentração, após toma de ureia. O perfil ao longo do tempo é tendencialmente linear em todos os sujeitos exceto num elemento que mostra um perfil crescente. Neste grupo amostral a amónia surge com valores que variam entre 132 e 253 unidades.

Dos sujeitos saudáveis, 7 tinham tomado medicação há menos de 15 dias, contudo a tendência da concentração da amónia no ar exalado não mostrou apresentar um padrão característico. No geral todos apresentam estabilidade do composto ao longo dos 16 minutos exceto três deles. Estes últimos referiram tomar suplementos alimentares (Complexo L-5 HTP) e probióticos, o que revelou, após a toma da ureia, aumentos e diminuições de intensidade imprevisíveis.

O tempo estipulado para a monitorização foi de, aproximadamente, 16 minutos, no entanto, a partir dos gráficos de intensidade relativa traçados ao longo do tempo constatou-se que a partir dos 13 minutos se verifica uma estabilidade deste valor que tende para o nível basal (valor registado antes da ingestão da ureia).

Parte dos resultados obtidos neste estudo deram origem a um poster que foi apresentado no 3rd Nova Biomedical Engineering Workshop 2018 da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. O facto de se encontrar um perfil estável de metabolitos após a toma da ureia e de não se verificarem alterações quando comparado com o estado de jejum, em todo o grupo amostral, levou à produção do poster com o título “*Device Development for Non-Invasive Test of Bacterial Helicobacter Pylori’s infection*”. O poster encontra-se no **Anexo E**.

5.1.1 *Metabolitos detectáveis*

O estudo de A. Ulanowska et al sugeriu que o acetato de etilo, o isobutano e a 2-butanona encontram-se associados à presença de *H. pylori*, quando encontrados em ambiente gástrico [26].

A 2-butanona (cetona) e o acetato de etilo (éster) são os únicos compostos que foram pesquisados nos espectros, uma vez que são os únicos que tem as localizações topográficas conhecidas e definidas. O isobutano não foi localizado nos espectros por não serem conhecidos os tempos de deriva.

A Tabela 5.2 mostra a localização do monómero e do dímero de ambos os compostos. Todos os valores aqui apresentados são resultados conseguidos através de testes com substâncias puras analisadas no equipamento GC-IMS.

Tabela 5.2: Tempos de deriva de compostos libertados em meio endógeno pela *H. pylori*.

Localização dos compostos nos espectros produzidos pelo GC-IMS		
		t_{deriva} (*posição do RIP ms)
2-butanona	Monómero	1,084
	Dímero	1,301
acetato de etilo	Monómero	1,121
	Dímero	1,398

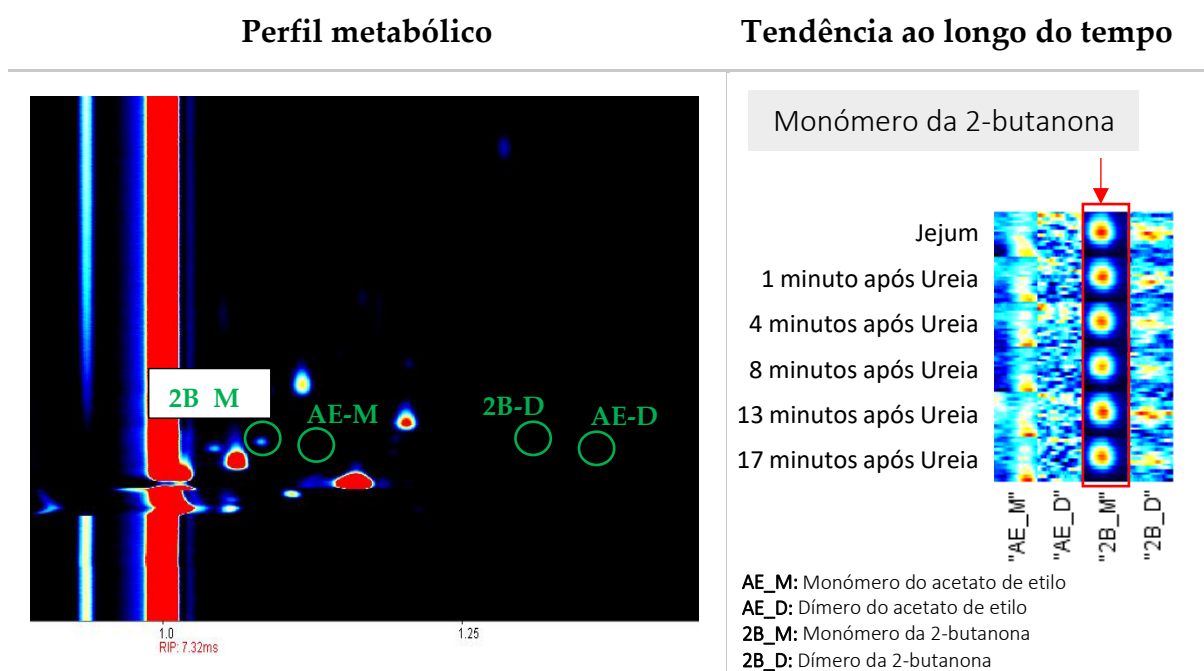
Uma vez que o pico de intensidade relativo ao monómero da 2-butanona foi detetado em todas as amostras do ar exalado antes da ingestão de ureia (em 100% do conjunto amostral) conclui-se que este composto é característico do ar exalado. Por outro lado, alguns sujeitos (40% do conjunto amostral) revelaram no seu perfil basal (antes da ingestão de ureia) de compostos do ar exalado, a presença do pico de intensidade associado ao monómero do acetato de etilo. Este composto apesar de não fazer parte do perfil metabólico humano pode ter sido detetado devido à sua presença no ar ambiente do local, aos hábitos alimentares, ao estilo de vida e à variabilidade intrínseca a cada indivíduo.

Relativamente aos dímeros destes dois compostos, verificou-se a presença relativa ao pico da 2-butanona em 2 sujeitos (7% do conjunto amostral). Em nenhum espectro foi detectado o pico de intensidade relativo ao dímero do acetato de etilo.

Após análise de todos os espectros das amostras de ar esofágico, de todos os voluntários, não foram detetadas variações significativas destes compostos após a administração de ureia.

A Tabela 5.3 apresenta um dos espectros onde surge o pico de intensidade relativo ao monómero da 2-butanona e ainda a evolução temporal deste pico, após ingestão da ureia. Os outros compostos não estão presentes na amostra.

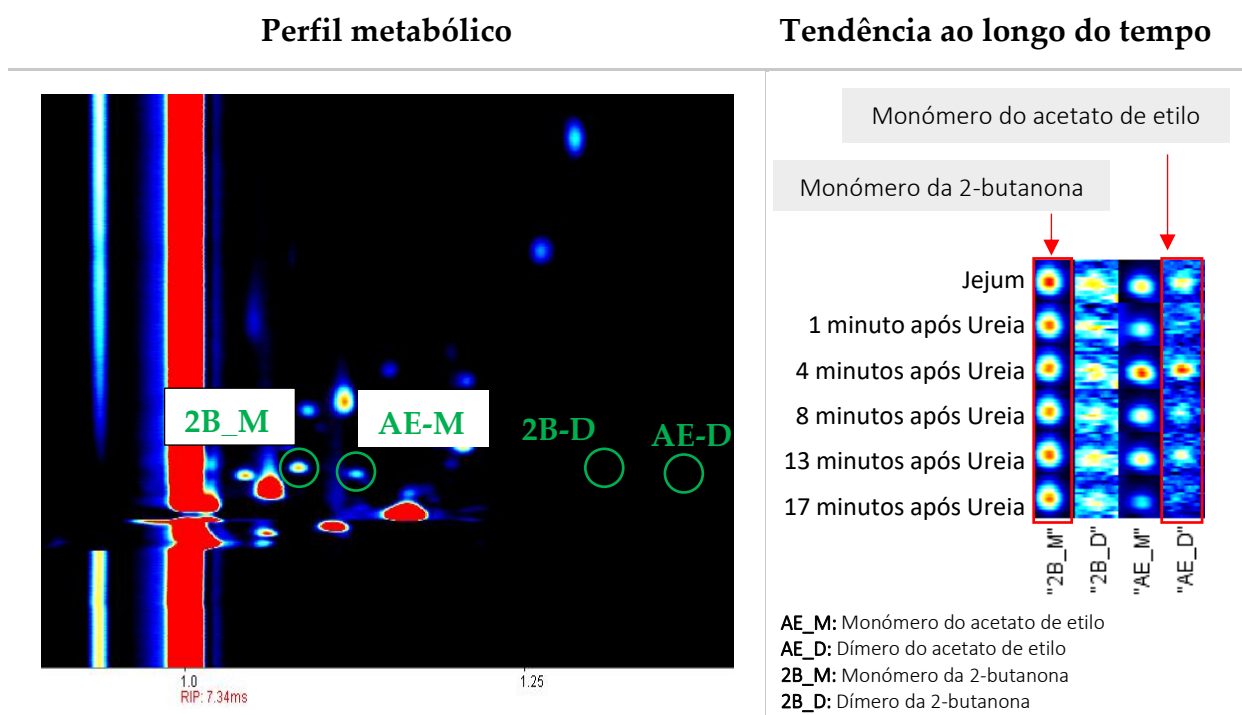
Tabela 5.3: Representação do perfil metabólico e da intensidade relativa de alguns compostos, ao longo do tempo no ar exalado. Destaque para o monómero da 2-butanona.



O espectro representado na Figura 5.3 representa o perfil metabólico mais encontrado nas amostras de ar exalado dos sujeitos saudáveis. A análise desta figura permite concluir que a 2-butanona é um composto típico no ar exalado e com uma concentração estável ao longo do tempo.

A Tabela 5.4 apresenta um espectro onde surgem os picos de intensidade relativos aos monómeros da 2-butanona e do acetato de etilo. Está também ilustrada a evolução temporal da intensidade destes picos, após ingestão da ureia.

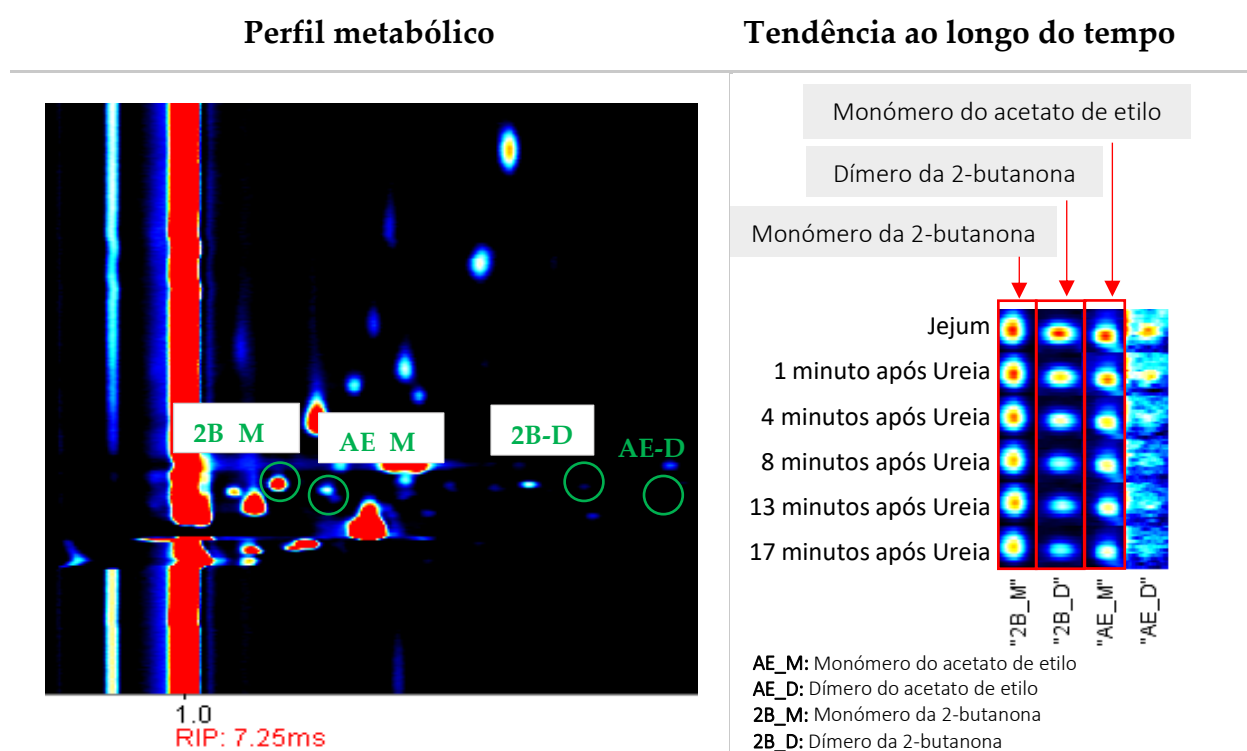
Tabela 5.4: Tendência da presença de alguns compostos, ao longo do tempo no ar exalado. Com destaque nos monómeros da 2-butanona e acetato de etilo.



A presença do acetato de etilo num pequeno grupo dos indivíduos saudáveis não é influenciada pela administração de ureia. O perfil do composto manteve-se estável ao longo do tempo.

A Tabela 5.5 apresenta um dos espectros, de um dos 2 sujeitos, que revelou no seu perfil metabólico a presença dos monómeros da 2-butanona e do acetato de etilo e ainda do dímero da 2-butanona. Está também ilustrada a evolução temporal dos picos de intensidade relativos a estes compostos, após ingestão da ureia, onde se revela estabilidade. O dímero do acetato de etilo não está presente na amostra.

Tabela 5.5: Tendência da presença de alguns compostos, ao longo do tempo no ar exalado. Com destaque para dois monómeros e um dímero.



A presença do dímero da 2-butanona apenas revela que o composto está em quantidade suficiente para que na separação dê origem às duas formas. Esta identificação não é significativa para sejam considerados excluídos da estatística do grupo de saudáveis.

O perfil metabólico do ar exalado, apresentado ao longo deste documento, não se encontra associado à presença da *H. pylori* porque a concentração da amônia se manteve estável, tal como foi explicado anteriormente. No entanto fica a incerteza por não estar medicamente comprovado que os dois sujeitos não apresentam infecção pela bactéria. A condição de saudável foi atribuída de acordo com o questionário realizado.

Apesar de não estar totalmente comprovado que estes compostos surgem, com concentrações aumentadas, no ar exalado de doentes que apresentam a

infecção da *H. pylori* é uma resposta positiva e de grande interesse não serem detetadas alterações significativas no grupo de indivíduos saudáveis.

A dimensão da amostra envolvida neste estudo trouxe respostas significativas que perspetivam outros caminhos na investigação dos metabolitos de um ar saudável ou de um ar que apresente indicativos da infecção. Para aumentar o rigor dos resultados seria interessante aumentar o número de voluntários, conhecendo à partida se realmente apresentam ou não infecção pela bactéria em estudo.

Desenvolvimento do Teste Rápido de Detecção de Infecção por *H. pylori*

No âmbito do projecto e após concluídas as análises ao ar exalado de sujeitos saudáveis a quem foi administrada uma solução de ureia, tornou-se imperativo o desenvolvimento e optimização de um teste rápido, descartável e não invasivo, para detecção da infecção por *H. pylori*, em meio hospitalar.

6.1 Desenvolvimento do protótipo para profissionais de saúde (HELIC QT)

O HELIC QT é um kit de detecção da infecção pela *H. pylori* que inclui um teste descartável e uma bomba de sucção para aspirar o ar, que vai sendo exalado durante os ciclos respiratórios, na realização do teste. O teste descartável é constituído por uma palhinha transparente, de aproximadamente 114 mm, contendo, no seu interior, um biomarcador de cor alaranjada cujo princípio físico é desconhecido. Por outro lado, a bomba de sucção constituiu um protótipo, desenvolvido pela NMT, S.A. em conjunto com a aluna de Mestrado que redige o presente documento.

Assim, para este efeito, foi criado e desenvolvido um kit, com perspectivas comerciais, que visam a utilização num âmbito familiar e por profissionais de saúde.

A construção da bomba de sucção começou com a elaboração de um esquemático eletrónico interno, em seguida, projectou-se um modelo composto por outros componentes auxiliares como um temporizador digital, uma escala graduada acoplada a uma lupa, para facilitar a leitura do resultado, e ainda uma zona destinada à legenda. O design do protótipo foi também idealizado de forma a valorizar e rentabilizar o funcionamento do mesmo, adicionando características como uma boa ventilação dos componentes, portabilidade e conforto no manuseamento.

Após a validação de um esboço, à escala real, iniciou-se a modelação 3D do protótipo com recurso a um software CAD (*computer-aided design*) de livre utilização para modelação de sólidos, o *Onshape*. Com a finalização do modelo 3D do protótipo, a caixa para acomodar todos os componentes (base e tampa) e um suporte para o tubo colorimétrico foram impressos em ácido poliláctico (PLA) no FabLab e no Departamento de Mecânica, ambos na FCT-UNL.

As imagens virtuais do projecto final, HELIC QT, encontram-se ilustradas na Figura 6.1, enquanto as imagens dos objetos impressos e o kit HELIC QT completo são apresentadas na Figura 6.2.

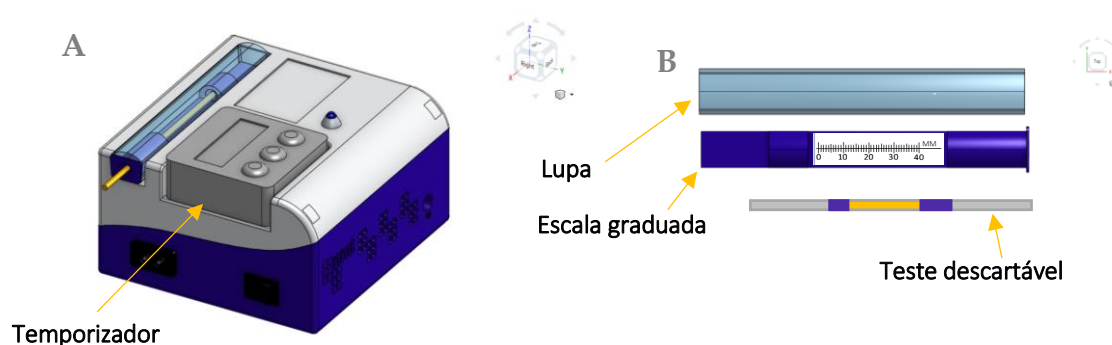


Figura 6.1: HELIC QT em formato 3D. A- Protótipo final; B – Pormenor da lupa, da escala graduada e do teste descartável. Imagens obtidas no software *OnShape*



Figura 6.2: Protótipo final das peças impressas em PLA (à esquerda) e kit HELIC QT completo (à direita).

Com o protótipo HELIC QT finalizado adicionou-se ao kit um tubo de silicone de dimensões 2 mm x 4 mm x 800 mm para realizar o contacto com o tubo colorimétrico. O tubo em questão terá de garantir uma boa aderência, maleabilidade de encaixe para facilitar a manipulação, boa capacidade resistiva ao desgaste e um comprimento adequado, de forma a minimizar perdas de massa no escoamento interno que podem ocorrer devido à rugosidade do material, a cotovelos no tubo e aos pontos de conexão. A Figura 6.3 ilustra o modo de conexão aplicado no contacto entre o teste e o protótipo desenvolvido.

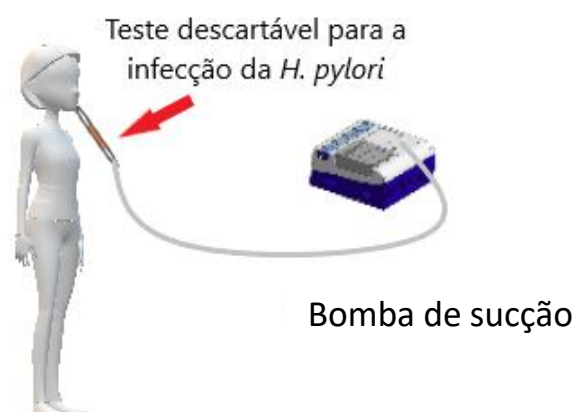


Figura 6.3: Estratégia de contacto entre o teste descartável e a bomba de sucção.

Durante a realização do teste de despiste para a infecção por *H. pylori* a lupa incorporada no kit pode ser utilizada para analisar e identificar o comprimento das marcas arroxeadas que surgem no tubo de medição.

No final do teste faz-se a leitura do resultado seguindo as indicações que estão descritas no informativo junto ao temporizador. A Figura 6.4 mostra o descritivo que pode ser encontrado na bomba de sucção.

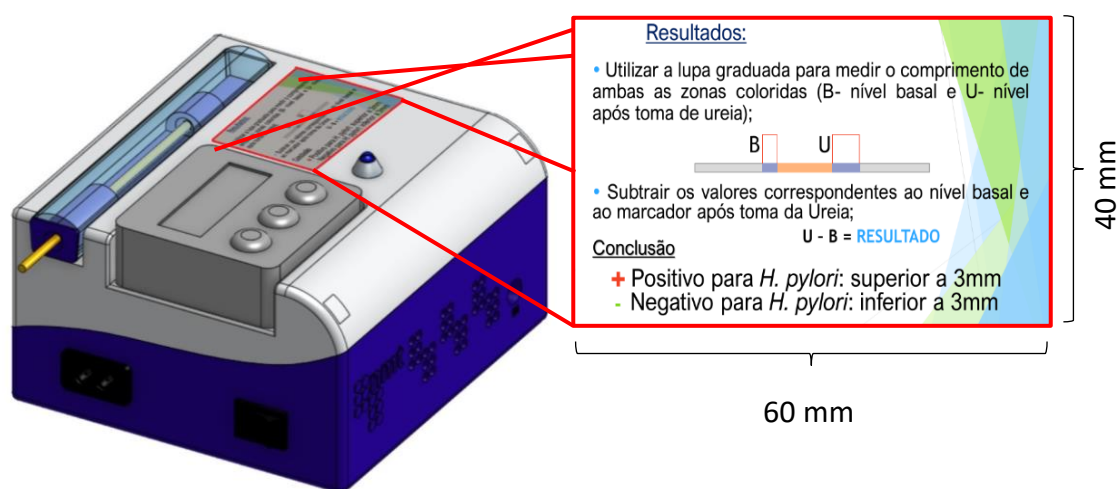


Figura 6.4: Regras para análise do resultado que estão embutidas na bomba de sucção.

Este informativo permite facilitar a realização do teste e a leitura do resultado. Em conjunto com a bula descritiva do procedimento é esperada uma dinâmica mais intuitiva na aplicação do teste.

A utilização deste sistema está direcionada para um clínico, no entanto, poderá também estar disponível para utilização no agregado familiar.

6.2 Desenvolvimento de protótipo de resultado descartável

Com o objetivo de desenvolver um kit económico para uso familiar foi ainda desenvolvido um protótipo de um leitor de resultado descartável para o teste. Sem que seja necessário utilizar instrumentos de medida escalar, este kit

económico indica ao utilizador um resultado positivo (vermelho) ou negativo (verde) para a infecção por *H. pylori*.

Sendo parte integrante do kit HELIC QT, o leitor foi projetado de forma a oferecer um resultado o mais direto e imediato possível. No verso, este kit apresenta as instruções de utilização que explicam, sucintamente e por passos, a forma de manipular o modelo.

A Figura 6.5 – A, contém as instruções de utilização do protótipo manual, enquanto a, Figura 6.5 - B apresenta a vista frontal do protótipo onde é apresentado o resultado do teste.

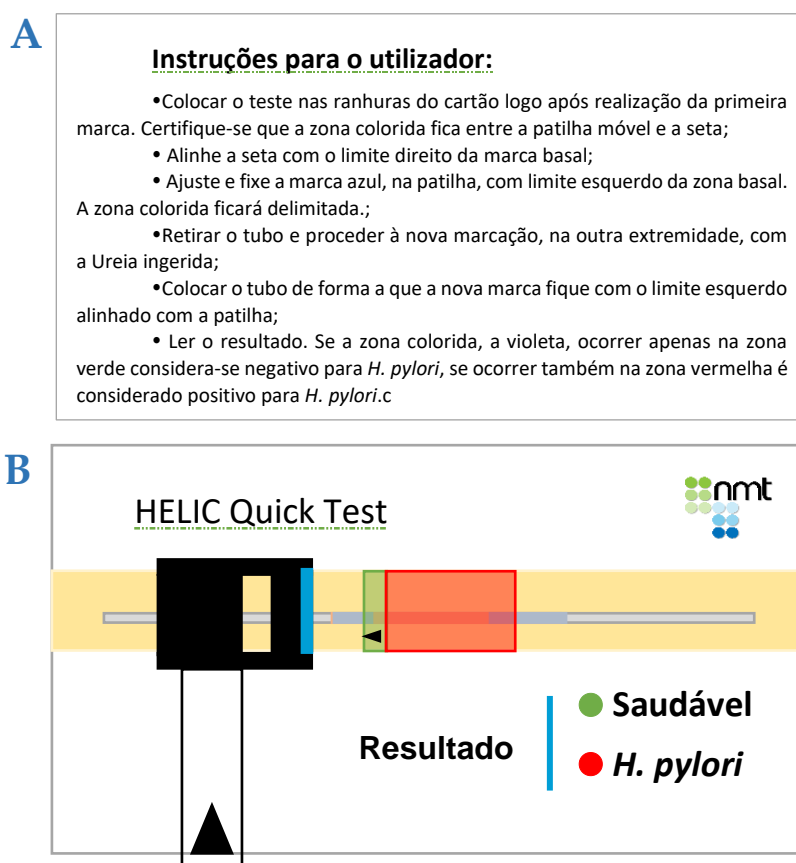


Figura 6.5: Esboço do protótipo do leitor descartável para a infecção por *H. pylori*.

Construindo em papel fortalecido e plástico recicláveis, o protótipo apresenta as dimensões 84x53 mm. Como mecanismo de medição, o protótipo desenvolvido, tem uma patilha móvel sobre uma fita e que permite delimitar os comprimentos das zonas coloridas apresentadas no tubo de medição após a realização do teste.

Para além do que foi descrito, ainda existem duas ranhuras no cartão que estão estrategicamente colocadas de forma a fixar o tubo de medição junto à fita com a patilha. A fita apresenta, decalcada, uma marca verde com 3 mm e outra vermelha com 17 mm. Estas zonas indicam se o utilizador do teste está saudável ou se apresenta a infecção pela *H. pylori*, respetivamente.

Tratando-se de um protótipo, o incremento da sua funcionalidade apenas é possível com a realização de testes de verificação e validação tanto em ensaios laboratoriais como em contexto hospitalar. Até ao momento esta é a versão aplicada nos ensaios laboratoriais de optimização do kit.

Os testes realizados durante os ensaios laboratoriais tiveram o resultado confirmado para os dois protótipos apresentados. É essencial garantir a eficácia dos dois métodos para que o passo seguinte seja validar em meio clínico.

6.3 Verificação e validação dos protótipos desenvolvidos em contexto hospitalar

Para efeitos de aprovação da realização do estudo, no decorrer do trabalho desenvolvido, foi redigida a documentação necessária pelas instituições de saúde que foram contactadas. Os documentos requeridos pelos respetivos órgãos do Comité de Ética foram submetidos no Hospital Garcia de Horta, E.P.E. (HGO) e na Nova Medical School (NMS/FCM) da Universidade Nova de Lisboa, respetivamente.

Um estudo prova-de-conceito com 15 utentes, voluntários, da unidade de Gastroenterologia do Laboratório de Fisiopatologia da NMS|FCM-UNL foi programado para desenvolver, após parecer positivo, confirmado no dia 29 de

outubro de 2018, por unanimidade, da Comissão de Ética da NMS|FCM-UNL. A decisão encontra-se no **Anexo F**. Além disso, prevê-se fazer os testes com doentes de gastroenterologia no Hospital Garcia de Horta, E.P.E. Os consentimentos informados e questionários, para aferir o estado de saúde dos voluntários e garantir que reúnem todas as condições de preparação pré-teste, mencionadas na bula do **Anexo B**, são fornecidos aos voluntários, antecipadamente.

A detecção da presença de *H. pylori* é conseguida através da utilização de um teste colorimétrico, o HELIC QT. Para além de ser um teste de rastreio à infecção por *H. pylori*, o HELIC QT permite também monitorizar a evolução ou regressão da mesma durante um tratamento.

Antes de realizar o teste cada voluntário deve seguir as indicações expressas na bula que segue junto do kit de teste. Existe uma preparação prévia a seguir para garantir o máximo de fiabilidade do teste de despiste para a presença da bactéria.

O princípio de execução do teste inclui os dois passos que se apresentam em seguida:

- **Passo 1: Registo do nível basal**

Nesta etapa o voluntário coloca o bocal na boca ao qual está acoplado o tubo de medição e, durante 6 minutos respirar a um ritmo normal. A inspiração é feita pelo nariz e a expiração exclusivamente pela boca.

O tubo de medição está ligado (através de um tubo de silicone) a uma bomba de sucção que, durante os 6 minutos do teste, aspira o ar exalado através da zona de medição do teste [17]. Finalizado o tempo de execução do teste, uma pequena porção colorida é visível, a qual será utilizada como indicador do nível basal. Mede-se o comprimento da marca colorida e regista-se o valor.

- **Passo 2: Detecção do valor da amónia**

Esta etapa inicia-se com a administração de uma solução de ureia (0,5000 ±0,0001 g dissolvidos em água) ao voluntário [17]. Este coloca a outra

extremidade do tubo de medição no bocal e, durante 6 minutos, segue o mesmo procedimento realizado no Passo 1. No final, mede-se novamente o comprimento da zona colorida e subtrai-se este valor ao anotado para o nível basal.

Se o valor da subtração for superior a 3 mm é considerado positivo para a presença da *H. pylori* e, se for inferior, considera-se que não existe infecção [17].

6.4 Procedimento na aplicação do HELIC QT

A metodologia aplicada para a realização dos testes em meio hospitalar, com doentes do departamento de Gastroenterologia, foi otimizada através de pré-testes realizados no laboratório da NMT, S.A.

O protótipo da bomba de sucção, desenvolvido para o HELIC QT, foi testado de modo a ficar apto a realizar, diariamente, no mínimo três testes. Durante três dias consecutivos e no espaço de 2h30min/dia a bomba trabalhou 36 minutos. Apenas no primeiro dia de pré-testes o protótipo apresentou falhas no seu funcionamento por saturação da bomba de sucção com a humidade. Nos restantes dias os testes ocorreram de acordo com o expectável sem nenhuma falha ou ocorrência durante o tempo de execução dos testes. A Figura 6.6 ilustra a forma de utilização do teste.

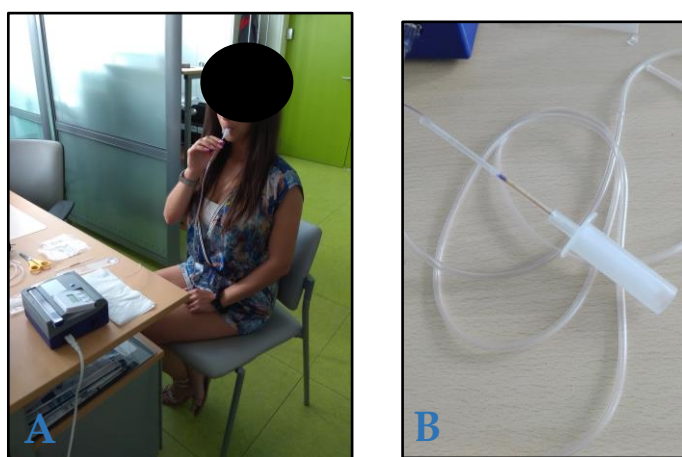


Figura 6.6: Kit HELIC QT em funcionamento. A) Postura do utilizador na realização do teste; B) Modo de acondicionamento do tubo colorimétrico.

O teste deve ser realizado conforme ilustra a imagem A da Figura 6.6. O utilizador deve estar junto a uma mesa de apoio onde terá à sua disposição todo o kit HELIC QT (o protótipo desenvolvido, o teste colorimétrico, um bocal descartável, o temporizador, o leitor descartável, um copo, a dose de ureia, água potável, uma tesoura e uma palheta misturadora).

O teste está pronto a executar assim que o tubo colorimétrico se encontra alocado ao tubo que conecta com a bomba e ainda com o bocal, tal como está representado na imagem B da Figura 6.6.

O teste começa com a marcação do indicativo basal na condição de jejum. É aconselhado que o utilizador mantenha um ritmo respiratório normal durante o funcionamento da bomba. Ao fim dos 6 minutos a zona colorida (roxa) do tubo colorimétrico é medida recorrendo aos dois métodos. A Figura 6.7 ilustra o procedimento de leitura do comprimento da marca roxa do tubo colorimétrico.

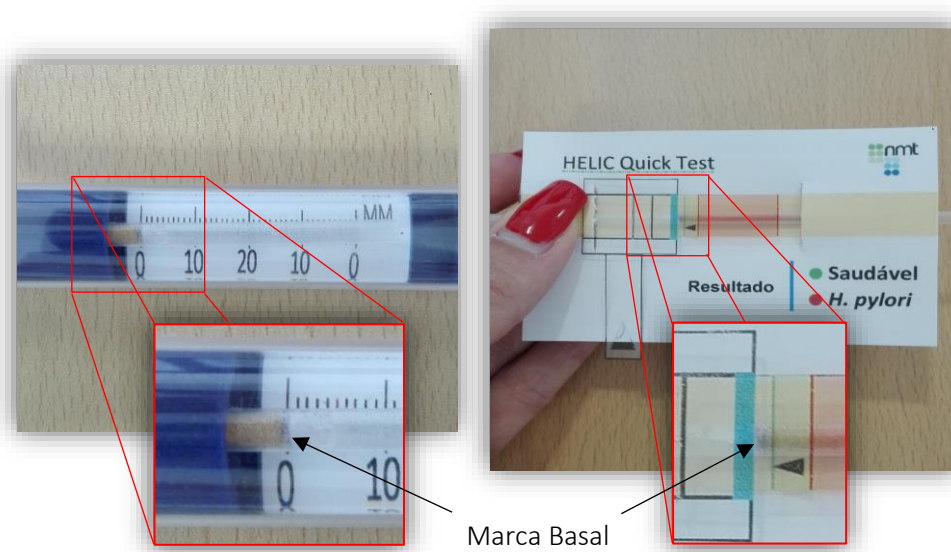


Figura 6.7: Leitura da marca basal com os dois métodos de análise.

Em seguida realiza-se a segunda parte do teste em que, após ingestão de ureia, o utilizador expira pelo bocal durante 6 minutos adicionais nas mesmas condições respiratórias do passo anterior. Ao final dos últimos 6 minutos de teste o tubo colorimétrico é novamente analisado para identificar o comprimento da

segunda marca roxa. A Figura 6.8 traduz o procedimento de leitura da segunda marca recorrendo aos dois métodos analíticos

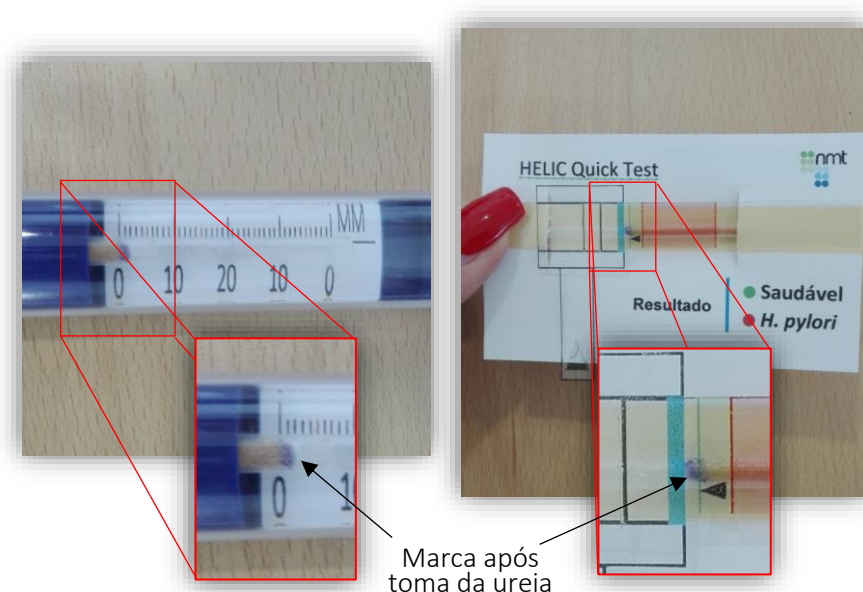


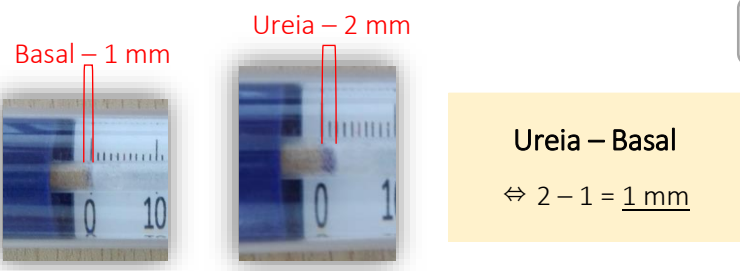
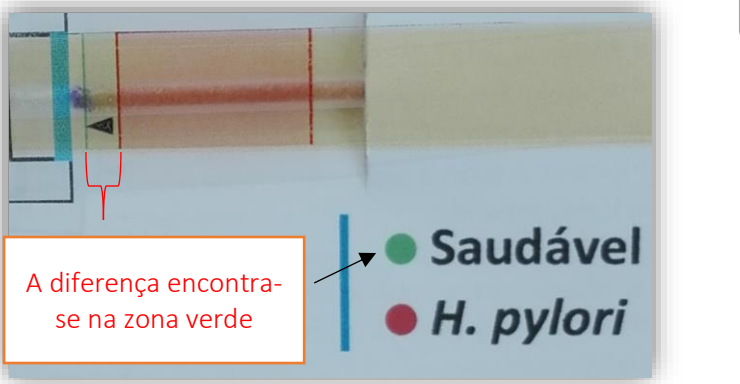
Figura 6.8: Leitura da marca após toma da ureia.

Pelo método A (identificado na Tabela 6.1) é necessário fazer a diferença entre os comprimentos das duas marcas. O resultado indica que está saudável por corresponder a um valor inferior a 3 mm. Utilizando o método B a resposta foi visual. Como a marca roxa apenas se encontra ao nível da zona verde intui-se que o sujeito está saudável ao verificar a correspondência na legenda.

Durante a realização a segunda parte do teste notou-se que a marca basal do tubo colorimétrico desapareceu parcialmente. Assim, é essencial que as duas fases de leitura e medição dos comprimentos das marcas roxas aconteçam nos momentos estipulados para que o teste apresente um resultado fidedigno.

Finalizando com a leitura do resultado o teste é identificado como negativo para a infecção da *H. pylori* no caso apresentado. Os resultados em ambos os métodos são concordantes tal como se verifica na Tabela 6.1.

Tabela 6.1: Resultado do teste de acordo com as duas formas de leitura.

Métodos de Análise	Resultado
	<div style="border: 1px solid black; border-radius: 10px; padding: 5px; display: inline-block; margin-bottom: 10px;">A</div> <div style="background-color: #d4edda; padding: 10px; text-align: center; margin-top: 10px;">SAUDÁVEL</div>
	<div style="border: 1px solid black; border-radius: 10px; padding: 5px; display: inline-block; margin-bottom: 10px;">B</div> <div style="background-color: #d4edda; padding: 10px; text-align: center; margin-top: 10px;">SAUDÁVEL</div>

Perante a análise do resultado considera-se que ambos os métodos analíticos apresentam um desempenho satisfatório. Durante a fase de ensaios esta concordância de resultado foi mantida o que perspectiva uma boa aplicação em meio clínico.

O procedimento aqui descrito foi parte integrante da sequência de pré-teste realizados em laboratório e provaram o bom funcionamento de todo o material. A autonomia da bomba de sucção foi confirmada encontrando-se apta a seguir para testes em meio hospitalar.

O procedimento descrito no subcapítulo 6.3 é adequado e minimiza ao máximo o tempo despendido para a realização do teste.

Contudo e apesar de ser considerado de fácil execução foram diagnosticadas certas barreiras que sugerem melhorias para futuros aperfeiçoamentos. A

manutenção de ritmo respiratório estável, conforme descrito anteriormente, não foi de intuição imediata, sendo necessário algum tempo até que o utilizador aprenda a respirar com o bocal. Esta dificuldade relaciona-se com o facto do bocal descartável ser pouco ergonómico complicando o aprisionamento do mesmo na cavidade oral tal como se verifica na Figura 6.9.



Figura 6.9: Modo de utilização do bocal descartável.

O passo seguinte aos ensaios laboratoriais é avaliar a eficiência do teste com um número significativo de doentes de gastroenterologia, com diagnóstico efectivo para a presença, ou não, da bactéria.

Da documentação enviada para a Comissão de Ética foi atribuído pelo Secretariado da Comissão de Ética da Nova Medical School da Universidade Nova de Lisboa o número 72/2018/CEFCM ao processo. Com a aprovação mencionada no capítulo 6.3 o objetivo é validar o HELIC QT calculando a sua especificidade e sensibilidade.



Conclusões

7.1 Conclusões

Todo o trabalho desenvolvido para otimizar a aquisição de espectros para as amostras de ar exalado no GC-IMS obteve as seguintes conclusões:

Altos fluxos de retenção promovem uma eluição mais rápida dos VOCs, mas baixos fluxos de retenção vão aumentar os tempos de retenção dos compostos. Pelo que as aquisições das amostras de ar exalado apresentam melhor discriminação entre VOCs quando o fluxo de retenção e o fluxo de deriva são, respectivamente, 100 ml/min e 150 ml/min.

O tempo de abertura da válvula pouco afeta a clareza dos resultados, o essencial é garantir que toda a amostra injetada na entrada passa para o sistema e é analisada. Por outro lado, os resultados foram muito mais satisfatórios quando é utilizado o ar purificado como gás de arraste e de deriva. Os espectros apresentam menos ruído de fundo e os picos conferem uma definição mais clara.

A polarização em modo positivo mostrou ser a mais indicada para analisar os compostos orgânicos voláteis das amostras de ar exalado. Desta forma a amostra fica preservada e o rendimento da análise é máximo, enquanto que em modo negativo a amostra pode sofrer alguma degradação devido ao processo que é aplicado.

Os primeiros ensaios experimentais para o conjunto amostral de 5 voluntários, onde foi utilizada ureia, revelou que o ar exalado apresenta um perfil característico de VOCs e que pode ser variável de indivíduo para indivíduo. Contudo,

a ureia que foi ingerida não revelou, nos espectros, indicativos da sua presença durante os 16 minutos de monitorização. Estes testes experimentais confirmaram a neutralidade do composto químico no metabolismo saudável não revelando alterações, comparativamente, à linha basal e comprovam a viabilidade do protocolo. Para além disso também certificou que não existe variabilidade do perfil quando a ureia tem origens laboratoriais distintas.

Os ensaios para a calibração do pico da amónia mostraram que o GC-IMS consegue detetar, com valores claros e mensuráveis, amostras que apresentem uma concentração do composto na ordem dos 48 ppb. A amostra da solução mãe foi detectada mas não foi quantificada revelando que a concentração de 389000 ppb ultrapassou os limites de detecção e de sensibilidade da máquina. A partir de valores superiores a este já não é possível obter o valor preciso.

Apesar de não ser parte integrante do projecto, encontrar os limites de detecção para a amónia, a amostra de mais alta concentração que foi detetada e quantificada correspondeu a 19500 ppb.

Relacionando as intensidades dos espectros com os valores teóricos estimados para a concentração verifica-se uma coerência nas diluições realizadas. A amostra Am1 corresponde à segunda mais concentrada, após a solução mãe, a Am2 à terceira e a Am3 corresponde à mais diluída.

O estudo que permitiu observar o efeito metabólico após ingestão da ureia, numa amostra de 30 sujeitos saudáveis, revelou que não existem alterações significativas. Os 18 minutos que se seguiram, após ingestão da ureia, não revelaram em nenhum elemento amostral a ocorrência de novos VOCs nem aumentos de intensidade que induzam a aumentos de concentração de compostos.

É com boa certeza que se pode afirmar que o perfil metabólico de todo o conjunto amostral é considerado saudável confirmando a ausência da *H. pylori*. Também o despiste para a presença dos compostos de acetato de etilo e 2-butanona foi positivo. Não foram encontrados em espectro algum do grupo amostral, características que evidenciem relação com a presença da *H. pylori*. Apesar de

ainda não ser confirmado pela comunidade científica, estes, são compostos endógenos hipoteticamente associados à presença da bactéria em meio gástrico.

O estudo ainda permitiu verificar que o perfil de metabolitos é variável e característico de indivíduo para indivíduo. Variáveis como o género, o período de jejum, o estilo de vida, os hábitos alimentares, o consumo de álcool ou de tabaco e ainda as patologias são fatores que promovem a variabilidade no perfil de VOCs. Perante esta afirmação é espectável encontrar diversidade em mapas topográficos tal como aconteceu em certos elementos do grupo amostral.

A caracterização do perfil da ureia revelou que este é considerado um composto estável no organismo humano não apresentando influências metabólicas mensuráveis num sujeito saudável.

O GC-IMS revelou ser um meio analítico promissor para discriminar o padrão de VOCs que compõem o ar exalado. A sua eficácia, precisão, rapidez e comodidade conferem-lhe características apelativas que se traduzem numa sugestão não-invasiva para detetar patologias, nomeadamente a infecção pela *H. pylori*.

O teste descartável e não-invasivo para o despiste da infecção pela *H. pylori*, HELIC QT, encontra-se operacional e apto a ser testado em meio hospitalar.

O protocolo de utilização foi revisto e adaptado para ser utilizado por profissionais de saúde bem como pelo agregado familiar, autonomamente. A bomba de sucção projetada e construída pelo grupo de investigação, foi testada quanto à robustez e fiabilidade do seu funcionamento. Está também preparada para realizar a contagem do tempo e para analisar o resultado do teste através da legenda explicativa.

A sugestão de um leitor de resultado foi pensada para oferecer um resultado mais intuitivo ao utilizador. Após diversas tentativas chegou-se a um protótipo aperfeiçoado e pronto a ser testado.

Todos os trabalhos desenvolvidos na elaboração do kit HELIC QT foram de encontro à garantia da viabilidade aplicativa junto dos profissionais de saúde e dos doentes. O kit está apto a iniciar o estudo da prova-de-conceito em serviços

de Gastroenterologia para validar a especificidade e a sensibilidade do método analítico. Este passo abrirá o espectro à comercialização para centros hospitalares e para núcleos familiares devido às suas características.

7.2 Trabalho futuro

O trabalho desenvolvido no âmbito do projecto que visa contribuir para otimizar o diagnóstico de uma infecção pela *H. pylori* por metodologias não-invasivas suscitou interesse para aprofundar a temática por diferentes vias.

Começando por sugerir uma calibração adequada da amónia, no GC-IMS, é conveniente e essencial que se encontre o limite máximo de detecção para o composto. Este passo ganha relevância na medida em que contribui para padronizar os níveis saudáveis do composto no ar exalado.

Os resultados obtidos enfatizaram a importância que tem vindo a ser demonstrada no que respeita à utilização do GC-IMS para analisar o ar exalado. A possibilidade de obter um perfil metabólico que permita detetar infeções apenas com amostras de ar é um passo promissor nos diagnósticos e terapêuticas. No entanto, como o sucesso para a aplicabilidade desta técnica de diagnóstico passa por ter uma biblioteca de biomarcadores para infeções sugere-se o estudo da atividade da *H. pylori* em ambiente gástrico (real ou simulado) com e sem presença da ureia para identificar um perfil de VOCs.

Face à necessidade de comparação do perfil metabólico dos indivíduos saudáveis com um grupo amostral que apresente a infecção, recomenda-se a aplicação do teste de recolhas de ar exalado com administração de ureia em doentes. Deverão apresentar as mesmas características do grupo de controlo, para além de apresentar a infecção por *H. pylori*.

Uma sugestão para aumentar a sensibilidade do teste com o dispositivo automático de recolha de ar é aumentar a concentração da ureia administrada. É importante conhecer a influência desta variável no ar exalado de saudáveis e de

doentes que apresentem infecção por *H. pylori*. O perfil de VOCs deve ser definido.

No que respeita ao material utilizado na recolha de ar, seria sugestivo e pertinente utilizar seringas de vidro, que impeçam ou minimizem a contaminação que ocorre no ar exalado recolhido. As típicas seringas cirúrgicas e estéreis são, tipicamente, em latex, um material que revelou diversos VOCs nos espectros.

Quanto ao kit HELIC QT, de futuro, o bocal descartável deverá ser redesenhado para um formato mais ergonómico e que tenha em conta uma fixação que não cause desconforto nos dentes.

Para que o teste seja transversal a todas as idades a utilização do teste descartável em crianças deve ser acompanhada por um estímulo que as oriente para o ritmo respiratório desejado. Assim sugere-se o desenvolvimento de uma aplicação com um boneco interativo que as estimule a seguir o ritmo respiratório por mimetização. A título de exemplo seria uma criança a encher um balão com ar e a esvaziá-lo de forma sistemática ou ainda a sentir o aroma de um ramo de flores.

Após os ensaios em laboratório sugere-se a realização de um estudo com a utilização do kit HELIC QT num grupo amostral significativo, em meio hospitalar. O objetivo é apurar o nível de sensibilidade e de especificidade do dispositivo analítico.

Para averiguar a competitividade do método de despiste para a infecção seria pertinente comparar os resultados com outros métodos utilizados na prática clínica, tal como, o teste respiratório da ureia ou o de identificação de antigénios nas fezes.

Estas sugestões vêm de encontro às questões que foram surgindo no decorrer do projecto.

O futuro da investigação científica está de “mãos dadas” com a obtenção de uma prática clínica preventiva da doença que minimize ao máximo a intervenção invasiva. A Engenharia Biomédica trabalha com vista na reabilitação com qualidade de vida e na prevenção.



Referências Bibliográficas

- [1] J. Danesh, "Helicobacter pylori infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies," *Aliment Pharmacol Ther*, vol. 13, pp. 851–856, 1999.
- [2] G. D. Eslick, L. L. Lim, J. E. Byles, H. H. Xia, and N. J. Talley, "Association of Helicobacter pylori infection with gastric carcinoma: a meta-analysis," *Am J Gastroenterol*, vol. 94, no. 9, pp. 2373–2379, 1999.
- [3] Y. C. Lee, J. M. Liou, C. Y. Wu, and J. T. Lin, "Review: Eradication of Helicobacter pylori to prevent gastroduodenal diseases: Hitting more than one bird with the same stone," *Therap. Adv. Gastroenterol.*, vol. 1, no. 2, pp. 111–120, 2008.
- [4] N. Kim, "Helicobacter pylori," vol. 160, p. 556, 2016.
- [5] M. Westhoff, P. Litterst, L. Freitag, W. Urfer, S. Bader, and J. I. Baumbach, "Ion mobility spectrometry for the detection of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer: Results of a pilot study," *Thorax*, vol. 64, no. 9, pp. 744–748, 2009.
- [6] F. Khadangi, M. Yassi, and M. A. Kerachian, "Review: Diagnostic accuracy of PCR-based detection tests for Helicobacter Pylori in stool samples," *Helicobacter*, vol. 22, no. 6, pp. 1–9, 2017.
- [7] F. Belmiro Rosa, "A INFECÇÃO POR Helicobacter pylori EM POPULAÇÕES DE ANGOLA," p. 172, 2015.
- [8] J. Cabrita *et al.*, "Features and trends in Helicobacter pylori antibiotic resistance in Lisbon area, Portugal (1990-1999)," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 46, no. 6, pp. 1029–1031, 2000.
- [9] F. Mégraud and P. Lehours, "Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 20, no. 2, pp. 280–322, 2007.
- [10] A. Miguel, "Linfoma MALT gástrico e infecção por Helicobacter pylori," pp. 1–41, 2009.
- [11] "Helicobacter pylori." [Online]. Available: <http://www.austincc.edu/microbio/2704t/hp1>. [Accessed: 31-Jan-2018].
- [12] "Treating an infection to prevent a cancer: H. pylori and stomach cancer | Scope Blog." [Online]. Available: <http://scopeblog.stanford.edu/2014/09/25/treating-an-infection-to-prevent-a-cancer-h-pylori-and-stomach-cancer/>. [Accessed: 31-Jan-2018].
- [13] W. Lonsdale, D. K. Maurya, M. Wajrak, C. Y. Tay, B. J. Marshall, and K. Alameh, "Rapid measurement of urease activity using a potentiometric RuO₂pH sensor for detection of Helicobacter pylori," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 242, pp. 1305–1308, 2017.

- [14] V. V. de Almeida *et al.*, "Catalisando a Hidrólise da Ureia em Urina," *Química Nov. na Esc.*, vol. 28, pp. 42–46, 2008.
- [15] T. Saber *et al.*, "Association of Helicobacter pylori cagA gene with gastric cancer and peptic ulcer in Saudi patients," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 7, pp. 1146–1153, 2015.
- [16] A. J. A. Barbosa, "Trata-se de atrofia da mucosa gástrica do antro ou de atrofia da mucosa gástrica do corpo? Uma pequena dúvida que pode ser benéfica para o paciente," vol. 47, pp. 586–588, 2011.
- [17] NMT, "Researching technology for an innovative future." p. 2, 2016.
- [18] H. M. Malaty, D. Y. Graham, I. Isaksson, L. Engstrand, and N. L. Pedersen, "Are genetic influences on peptic ulcer dependent or independent of genetic influences for Helicobacter pylori infection?," *Arch. Intern. Med.*, vol. 160, no. 1, pp. 105–109, 2000.
- [19] S. Wagner, U. Gladziwa, K. Haruma, M. Varrentrapp, and M. Gebel, "Effect of Helicobacter-Pylori Infection on 24-Hour Intra-gastric Acidity in Patients with Gastritis and Duodenal-Ulcer," *Gut*, vol. 33, no. 8, pp. 1024–1028, 1992.
- [20] A. Berger, "Helicobacter pylori breath tests," *Bmj*, vol. 324, no. 7348, p. 1263, 2002.
- [21] N. Vakil, "Review article: the cost of diagnosing Helicobacter pylori infection," *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 15 Suppl 1, pp. 10–15, 2001.
- [22] R. del P. L. P and R. E. A. P, "Tejido linfóide y linfomas gástricos Lymphoid tissue and gastric lymphomas," *Rev. Colomb. Gastroenterol.*, pp. 409–422, 2010.
- [23] Sociedade Portuguesa de Gastrenterologia, "Helicobacter pylori: Normas de Orientação Clínica." SPG nº1, p. 2, 2007.
- [24] B. N. Parsons *et al.*, "Comparison of the human gastric microbiota in hypochlorhydric states arising as a result of," pp. 1–19, 2017.
- [25] R. Ivanac Janković, D. Sklebar, M. Klobučić, I. Sklebar, and D. Vrabec-Matković, "Lumboischialgia as the first sign of stomach cancer.," *Med. Glas. (Zenica)*, vol. 9, no. 1, pp. 128–30, 2012.
- [26] A. Ulanowska, T. Kowalkowski, K. Hryniewicz, M. Jackowski, and B. Buszewski, "Determination of volatile organic compounds in human breath for Helicobacter pylori detection by SPME-GC/MS," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 25, no. 3, pp. 391–397, 2011.
- [27] "Lección 6. Isomería Constitucional | Quiral." [Online]. Available: <http://www.quiral.es/blog/aula/aprende-sobre-isomeria-molecular/leccion-6-isomeria-constitucional/>. [Accessed: 31-Jan-2018].
- [28] "Resolvido 19-96E Os espectros 1 H-RMN de (a) 2-butanona e | PasseiDireto.com." [Online]. Available: <https://www.passeidireto.com/exercicios-resolvidos/principios-de-quimica-questionando-a-vida-moderna-e-o-meio-ambiente-5-ed-2011-9788540700383/capitulo-19/problema-96E>. [Accessed: 31-Jan-2018].
- [29] Ercros, "Acetato de Etilo," Ercros, 2012. [Online]. Available: http://www.ercros.es/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=753&Itemid=647. [Accessed: 31-Jan-2018].
- [30] S. Iqbal, S. Fatima, A. Raheem, and A. H. Khan, "Agreement between serology and histology for detection of helicobacter pylori infection," *J. Coll. Physicians Surg. Pakistan*,

- vol. 23, no. 11, pp. 784–786, 2013.
- [31] L. Gomes and A. Lago, “Análise E Revisão De Métodos Para Diagnóstico Do Helicobacter Pylori,” *Rev. Acadêmica Oswaldo Cruz*, no. 2, p. 7, 2014.
- [32] H. Woo, H. Youn, J. Jun, G. Ko, and S. Baik, “Association between Gastric pH and,” vol. 18, no. 4, pp. 246–252, 2015.
- [33] S. Adriane and B. De Moura, “Identificação De Helicobacter Pylori Na Saliva E Biofilme Dental,” *Int. J. Dent.*, vol. 3, no. 2, pp. 349–352, 2004.
- [34] S. D. Biranjia-Hurdoyal and S. P. Seetulsingh-Goorah, “Performances of four Helicobacter pylori serological detection kits using stool antigen test as gold standard,” *PLoS One*, vol. 11, no. 10, pp. 11–13, 2016.
- [35] D. Y. Graham, “Helicobacter pylori infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model,” *Gastroenterology*, vol. 113, no. 6, pp. 1983–1991, 1997.
- [36] “Pytest 14C-Urea Breath Test Kits by Halyard Health,” *Health Products Express*, 2018. [Online]. Available: <https://www.healthproductsexpress.com/Kimberly-Clark-Corporation-BAA60462H-PYtest-14C-Urea-Breath-Test-Kits.html>. [Accessed: 31-Jan-2018].
- [37] K. AB, *IRIS the first choice for quantitative metabolic function tests*. Bremen, 2012.
- [38] Wagner Analysen Technik GmbH, “IRIS® – the reliable instrument for breath test analysis,” no. 8040, pp. 110-03, 2012.
- [39] S. Paulo and V. Valentina, “System for Controlled and Selective Sampling of Exhaled Air and Corresponding Operating Procedure,” WO/2018/047058, 2017.
- [40] W. Vautz, J. Nolte, R. Fobbe, and J. I. Baumbach, “Breath analysis—performance and potential of ion mobility spectrometry,” *J. Breath Res.*, vol. 3, no. 3, p. 036004, 2009.
- [41] R. Rodríguez-Maecker, E. Vyhmeister, S. Meisen, A. Rosales Martinez, A. Kuklya, and U. Telgheder, “Identification of terpenes and essential oils by means of static headspace gas chromatography-ion mobility spectrometry,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, no. 28, pp. 6595–6603, 2017.
- [42] G.A.S. Gesellschaft für analytische Sensorsysteme mbH, “GC-IMS User Manual,” pp. 1–96, 2016.
- [43] J. Stach and J. I. Baumbach, “Ion Mobility Spectrometry - Basic Elements and Applications,” vol. 5, no. 1, pp. 1–21, 2002.
- [44] C. J. Denawaka, I. A. Fowlis, and J. R. Dean, “Evaluation and application of static headspace-multicapillary column-gas chromatography-ion mobility spectrometry for complex sample analysis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1338, pp. 136–148, 2014.
- [45] B. Mulayim, N. Y. Celik, and F. F. Yanik, “Helicobacter pylori infection detected by 14C-urea breath test is associated with iron deficiency anemia in pregnant women,” *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, vol. 34, no. 6, pp. 980–5, 2008.
- [46] D. J. Kearney, T. Hubbard, and D. Putnam, “Breath ammonia measurement in Helicobacter pylori infection,” *Dig. Dis. Sci.*, vol. 47, no. 11, pp. 2523–2530, 2002.
- [47] “How to cure Helicobacter pylori infection with triple or quadruple therapy | Waitall.”

Referências Bibliográficas

- [Online]. Available: <http://www.waitall.com/node/40>. [Accessed: 31-Jan-2018].
- [48] "Nobel Surgery Centre | Gastroscopy." [Online]. Available: <http://www.nobel-surgery.com/patient-info/gastroscopy/>. [Accessed: 31-Jan-2018].



Anexo

Documentação fornecida a todos os voluntários Saudáveis



Consentimento Informado, Esclarecido e Livre para a Participação em Estudo de In- vestigação

(de acordo com a Norma nº 015/2013, de Direção Geral de Saúde)

Estudo: “Perfil da Ureia no Ar Exalado de Diferentes Origens Respiratórias (Alveolar e Esofágico)”

No âmbito dos projectos de Mestrado em Engenharia Biomédica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL), pela mestrande Carolina Conduto, e de Doutoramento em Engenharia Biomédica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL), pelo doutorando Paulo da Costa Santos, através da pareceria entre a FCT-UNL e a NMT, S.A. (empresa *spin-off* da FCT-UNL), coloca-se à consideração de V/ Exa. a possibilidade de participação num estudo intitulado “*Perfil da Ureia no Ar Exalado de Diferentes Origens Respiratórias (Alveolar e Esofágico)*”.

A utilização de um teste rápido e não-invasivo para a recolha de diferentes porções do ar exalado de acordo com a sua origem respiratória apresenta-se como um passo determinante no método de detecção da infecção pela bactéria *Helicobacter Pylori*, como forma de prevenir a evolução de patologias gástricas para situações agravadas. Desta forma espera-se a repetibilidade de um teste destinado a vários utilizadores que garanta uma resposta universal para todo o agregado familiar.

O presente estudo apresenta dois objetivos: **auferir a viabilidade, variabilidade e reprodutibilidade de um teste rápido e não-invasivo de recolha de ar exalado proveniente de diferentes origens respiratórias** e ainda **criar um perfil de metabolitos presentes em amostras de ar esofágico e alveolar, recolhido dos participantes, antes e depois da administração de ureia tópica**, com o uso de uma tecnologia inovadora de recolha de ar exalado. Nesta conformidade, será utilizado **um método não-invasivo de recolha de ar exalado humano** (através do *BreathCollect* - um dispositivo de recolha seletiva e automática de ar exalado) **para posteriormente analisar estas amostras biológicas com recurso a técnicas analíticas.**

Neste estudo é requerida a presença dos voluntários em duas sessões experimentais (1 e 2). Dentro de cada sessão, os participantes seguirão exatamente o mesmo procedimento sendo que apenas varia a porção de ar recolhido pelo *BreathCollect* (na 1ª sessão será recolhido **ar alveolar** e na 2ª sessão **ar esofágico**). Como forma de comparação e validação de resultados irão também ser efetuadas recolhas do ar ambiente do local onde é realizado o estudo.

Em cada sessão o voluntário responde, em **3 minutos**, a um breve **questionário** e durante, aproximadamente, **40 minutos decorre a recolha e análise de amostras de ar.**

Os voluntários ao abrigo deste estudo devem corresponder obrigatoriamente a requisitos de índole pessoal necessários para a boa execução do mesmo. Tais requisitos incluem a necessidade de o participante ser **saudável** (com especial atenção a doenças gástricas, hepáticas, pulmonares e cardíacas), **não fumador** e com **uma idade variável entre os 20 e os 35 anos**. Adicionalmente, considera-se **fator de exclusão** deste estudo, a presença de **voluntárias com indícios de gravidez.**

Adicionalmente, **pede-se aos voluntários que cumpram um conjunto de pré-condições necessárias** de forma a manter e elevar os níveis de repetibilidade e fiabilidade do estudo. Estas pré-condições incluem:

- Jejum de 3 a 5 horas antes das medições (é permitido beber água pura);
- Não ingestão de álcool e leguminosas (ervilhas, feijão, lentilhas, soja, etc) na última refeição “grande” (jantar ou almoço) antes da realização do teste;
- A última refeição antes do teste deve ser ligeira evitando carne, peixe e cogumelos;
- Lavagem dos dentes realizada 3 horas antes da realização do teste e imediatamente após a última refeição;
- Não usar produtos de higiene com odor ou perfume antes das medições.

Nestes termos, é garantido o anonimato assim como a confidencialidade dos resultados obtidos nos exames e procedimentos que serão realizados por estudantes universitários, os quais se comprometem a assegurar o devido sigilo. Os resultados deste estudo poderão, mais tarde, ser apresentados, no entanto nunca serão identificados os participantes.

A participação é livre, voluntária e sem custos sendo que ao participante é facultada a possibilidade de desistir ou interromper em qualquer fase do estudo sem qualquer efeito negativo.

Anexo A.

Eu

(Nome) _____

_____, declaro ter lido e compreendido este documento bem como as informações verbais que me foram fornecidas. Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar a disponibilização de dados que de forma voluntária forneço, confiando em que apenas serão utilizados para a investigação referidas e nas garantias de confidencialidade e anonimato que me são dadas.

Assinatura

do

Participante:

Data: __/__/__

Assinatura

do

Investigador

Responsável:

Nota: O Termo de Consentimento informado é um documento no qual a sua opção em consentir (autorizar) é manifestada.

Investigadores: Carolina Conduto | Paulo Santos

Contactos: c.conduto@campus.fct.unl.pt | ph.santos@campus.fct.unl.pt

<u>Informações Gerais e Histórico Clínico</u>	Data: Assinatura:
--	------------------------------------

Nome:

Idade:

Peso (Kg):

Altura (m):

1. Por favor, indique, com uma cruz, as doenças que já teve ou que ainda tem:

- Doenças coronárias (incluindo pressão sanguínea). . . .
- Doenças pulmonares
- Doenças hepáticas
- Diabetes
- Doenças neurodegenerativas
- Cancro
- Refluxo gastro-esofágico
- Cáries dentárias.
- Outras

: _____

2. Toma algum tipo de medicação permanentemente?

Não

Sim Qual: _____

3. É fumador?

Não

Sim

4. Foi fumador regular no passado ou durante um longo período de tempo?

Não

Sim

Informações para a 1ª Sessão:

1. Nos últimos 15 dias tomou algum tipo de medicação?

Antibióticos

Anexo A.

Bomba iónica de protões

Outros Qual: _____

2. Consumiu álcool nos últimos 3 dias?

Não

Sim

3. Há quanto tempo foi a sua última refeição? (o consumo de água não conta para a questão)

R: _____ horas

4. Qual a composição da sua última refeição?

R: _____

5. Quanto tempo dormiu na noite anterior? R: _____ horas

6. Qual a última vez que procedeu à higiene dentária? R: _____ horas

7. **(No caso de ser do sexo feminino)** Há alguma possibilidade de estar grávida?

SIM (É impossível a realização do teste nesta condição!)

NÃO

Comentários (Informações pertinentes):

Informações para a 2ª Sessão:

1. Nos últimos 15 dias tomou algum tipo de medicação?

Antibióticos

Bomba iónica de protões

Outros Qual: _____

2. Consumiu álcool nos últimos 3 dias?

Não

Sim

3. Há quanto tempo foi a sua última refeição? (o consumo de água não conta para a questão)

R: _____ horas

4. Qual a composição da sua última refeição?

R: _____

5. Quanto tempo dormiu na noite anterior? R: _____ horas

Anexo A.

6. Qual a última vez que procedeu à higiene dentária? R: _____ horas

7. **(No caso de ser do sexo feminino)** Há alguma possibilidade de estar grávida?

SIM (É impossível a realização do teste nesta condição!)

NÃO

Comentários (Informações pertinentes):

(Preencher apenas pelo responsável do estudo)

Assinatura: _____

Desenvolvimento do dispositivo para teste não-invasivo da infecção por bactéria *H. pylori* | Tese de Mestrado em Engenharia Biomédica


Desenvolvimento de validação de um protótipo para aquisição seletiva em tempo-real de ar exalado | Tese de Doutoramento em Engenharia Biomédica



Anexo

Bula para o HELIC QT

Primeira Página




HELIC QuickTest

Para que serve o HELIC QT?


O HELICB QT é um teste descartável e não-invasivo para despiste da infecção pela bactéria *H. pylori*. Esta infecção pode ser a causa de dores abdominais, gastrites e úlceras gástricas.

O teste dura 15 minutos, é de fácil utilização, de resultado imediato e pode ser realizado a partir dos 4 anos de idade.

 **Antes de realizar o teste leia atentamente o folheto.**

I - Requisitos antes do teste:

- O teste deve ser realizado de estômago vazio, com um jejum nunca inferior a 3 horas. É recomendado que a última refeição seja ligeira evitando alimentos como carne, peixe e cogumelos.
- O teste não pode ser realizado se: tomou antibióticos há menos de 4 semanas ; tomou anti-secretores, anti-inflamatórios, inibidores de bomba de prótons ou analgésicos há menos de 2 semanas.
- Não ingerir álcool 3 dias antes da realização do teste;
- Não ingerir leguminosas (soja, lentilhas, feijão, ervilhas,...) 3 dias antes da realização do teste;
- Não mascar pastilhas no dia da realização do teste;
- Não consumir tabaco 3 horas antes da realização do teste; É recomendada a lavagem dos dentes e o enxaguamento da cavidade oral depois de fumar;
- É necessário lavar os dentes e enxaguar a cavidade oral antes de realizar o teste.



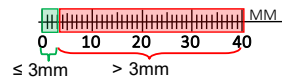
Segunda Página



II - Faça o teste:

1. Seccionar ambas as extremidades do tubo de teste e acoplar uma das extremidades ao bocal e a outra ao tubo de contacto com a bomba de sucção HELIC QT;
2. Enxaguar a cavidade oral com água, sem engolir;
3. Colocar a porção larga do bocal descartável ,acoplado ao tubo de teste, na boca;
4. Aprisionar o bocal com os dentes mantendo os lábios semi-abertos para que a respiração não seja forçada. Caso ocorra acumulação de saliva durante o teste é aconselhado retirar o bocal e engolir o excesso;
5. Ligar a bomba de sucção HELIC QT e, durante 6 minutos , inalar pelo nariz e exalar pela boca para fazer a marca basal;
6. Decorrido o tempo, desligar a bomba e medir o comprimento da marca roxa que surgiu no tubo. Registrar o valor;
7. Inverter o tubo de medição. Conectar a extremidade já marcada com o tubo que contacta com a bomba e a outra com o bocal;
8. Providenciar uma solução diluída de Ureia para ingerir. Enxaguar de imediato a cavidade oral;
9. Colocar novamente o bocal na boca e seguir os passos 4., 5. e 6.
10. Do resultado da subtração entre os dois comprimentos obtém-se um valor que corresponderá ao resultado do teste.

III - Resultado:



● Saudável

● *H. pylori*



Anexo

Espectros complementares à caracterização do perfil do ar exalado

A comparação qualitativa entre a resposta à Ureia A e à Ureia B no metabolismo humano infere que não existem diferenças. Os resultados obtidos estão representados na Figura C.1 onde se verifica a evolução do perfil metabólico ao longo dos 18 minutos após ingestão de ambas as Ureias.

Todas as amostras foram recolhidas do mesmo sujeito para excluir a variabilidade subjacente.

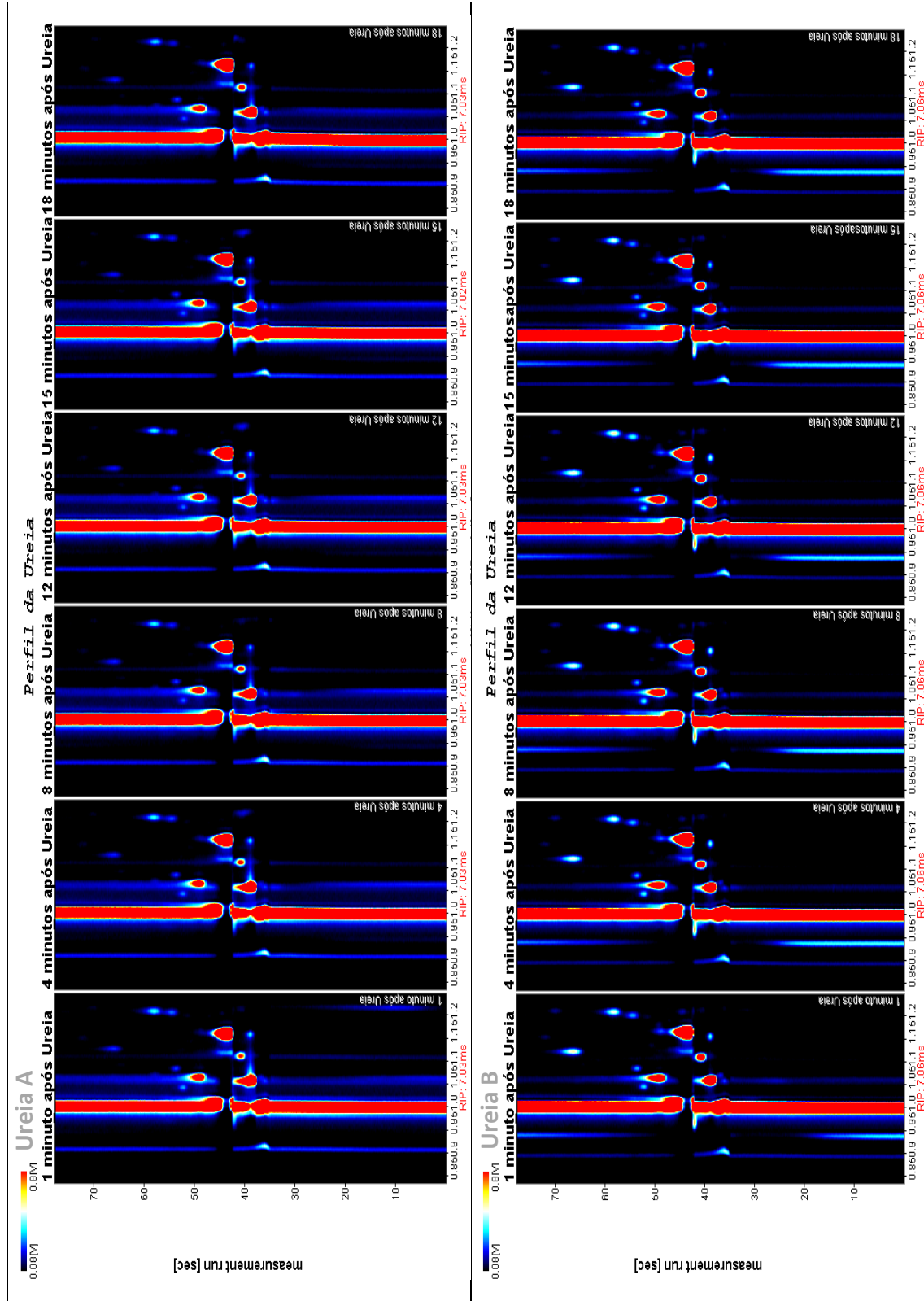


Figura C.1: Perfis metabólicos do ar exalado após ingestão de Ureia. A e da Ureia B.



Anexo

Estadística complementar à caracterização do perfil da Ureia do Capítulo 4.5

A Figura D.1 ilustra o gráfico com a representação do perfil da amónia após toma da ureia de cada elemento do grupo amostral N=30. As amostras de ar exalado correspondem à porção alveolar.

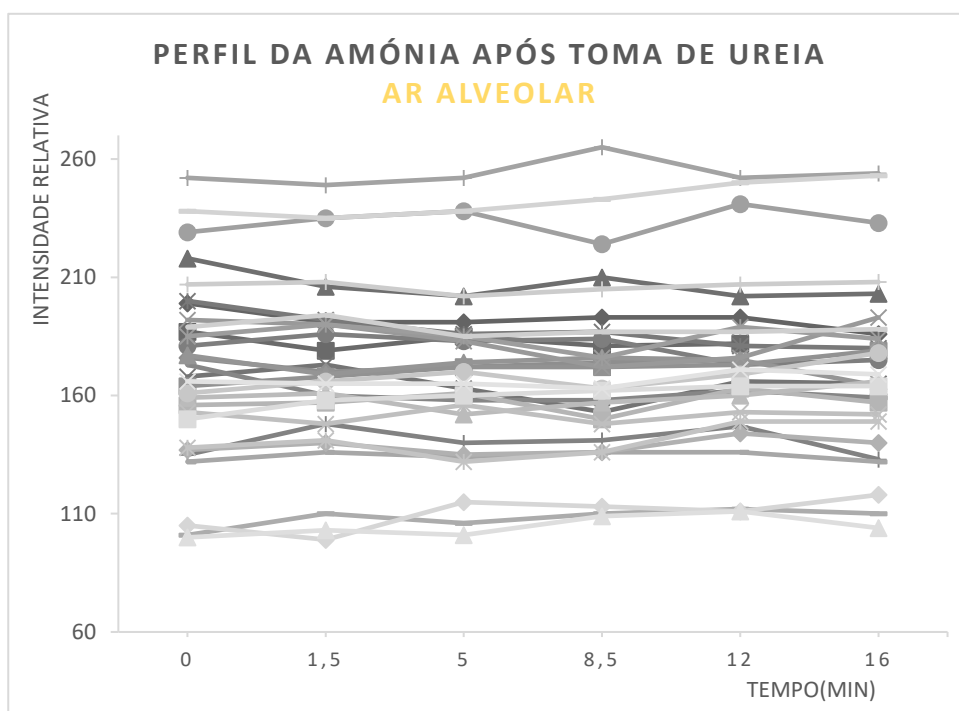


Figura D.1: Gráfico de tendência, do perfil da amónia no ar alveolar, para o grupo amostral N=30.

A Figura D.2 ilustra o gráfico com a representação do perfil da amónia após toma da ureia de cada elemento do grupo amostral N=30. As amostras de ar exalado corresponderam à porção esofágica.

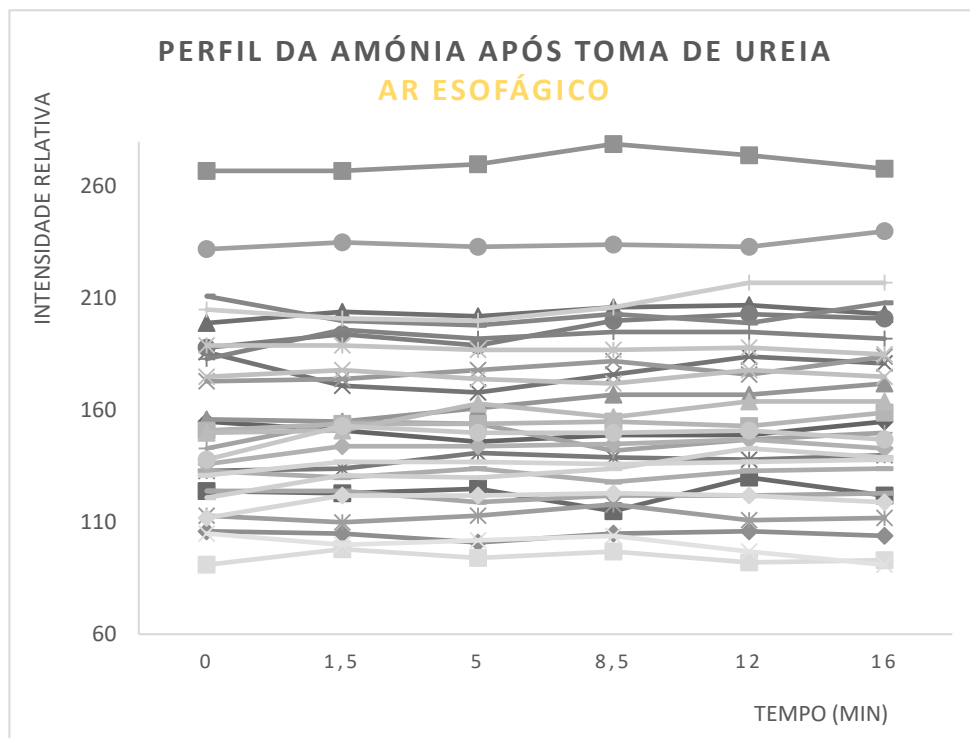


Figura D.2: Gráfico de tendência, do perfil da amónia no ar esofágico, para o grupo amostral N=30.

De todo o ar expirado, a porção de ar que demonstra interesse para o projecto é a correspondente ao **esofágico** tal como está justificado no capítulo 4.5. Desta forma, todos os gráficos que se seguem no anexo correspondem às sessões de recolha de ar esofágico realizadas com o grupo amostral N=30.

Para aferir tendências do perfil da amónia o grupo amostral foi organizado em diversos grupos com características específicas.

Género Feminino vs Masculino

De entre o grupo amostral de saudáveis N=30 encontramos 19 sujeitos do género feminino e 11 do género masculino. As tendências do perfil da amónia para ambos os grupos estão ilustradas nos gráficos das Figuras D.3 e D.4.

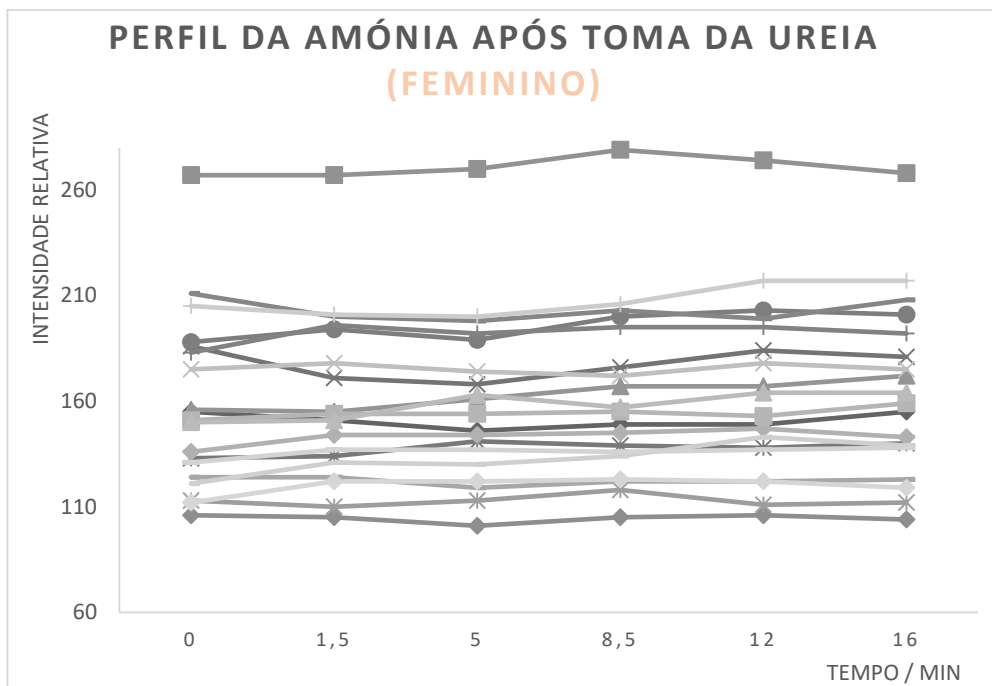


Figura D.3: Perfil da amónia, ao longo de 16 minutos, para o género feminino. O gráfico representa a tendência da intensidade relativa, do composto.

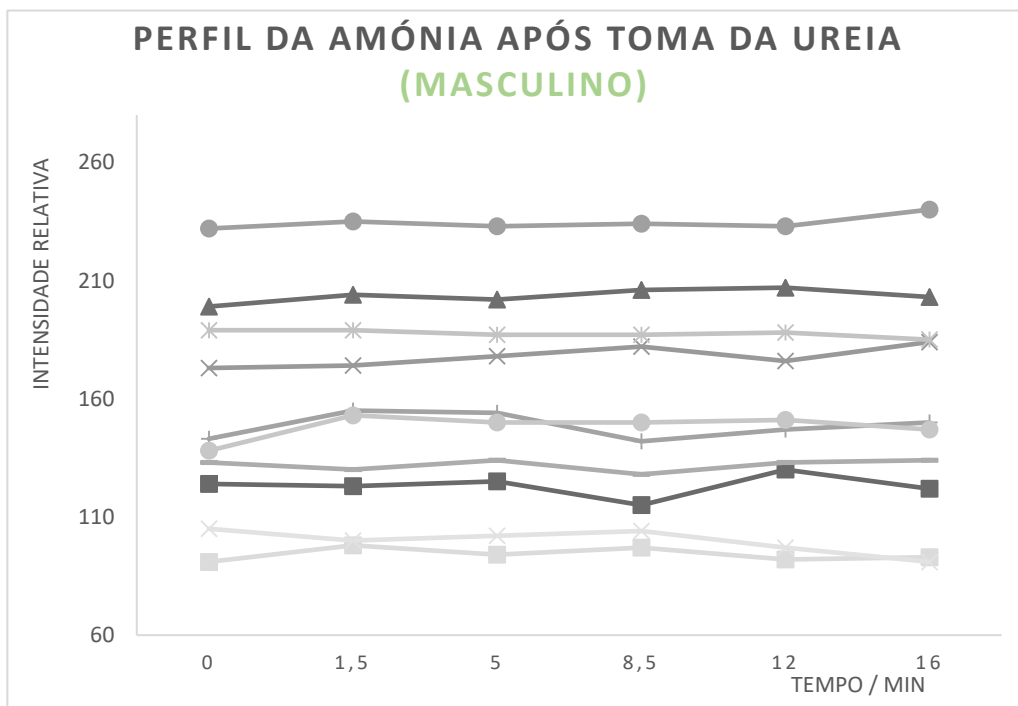


Figura D.4: Perfil da amónia, ao longo de 16 minutos, para o género masculino. O gráfico representa a tendência da intensidade relativa, do composto.

Idade

O espectro de idades do grupo amostral está entre os 21 e os 34 anos pelo que foi pertinente averiguar o comportamento da amónia de acordo com agrupamentos etários. A Figura D.5 ilustra dois gráficos de tendência para o género feminino. Um grupo vai dos [20:23] anos e o outro dos [24:28]. A Figura D.6 ilustra os gráficos de tendência para o género masculino onde os grupos etários são [22:25] e [26:35] anos.

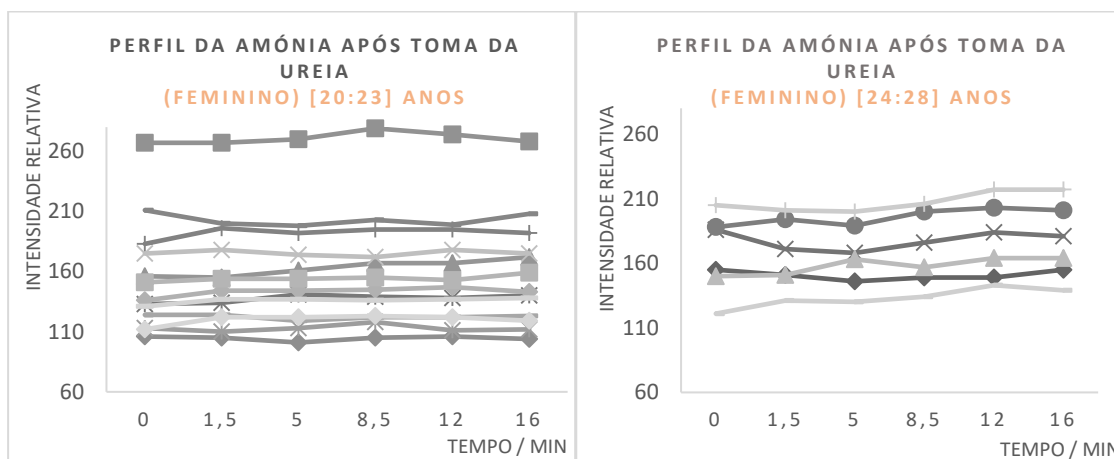


Figura D.5: Gráficos ilustrativos do comportamento da amónia no ar exalado da amostra do género feminino de acordo com dois grupos etários.

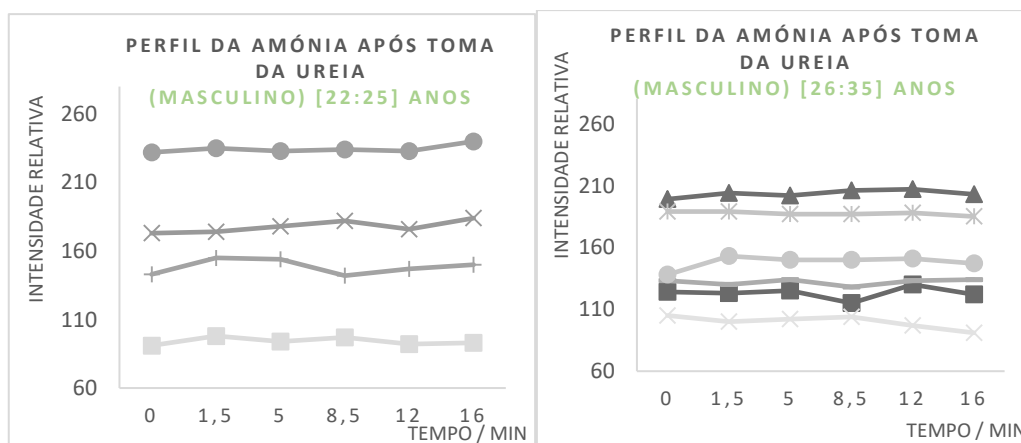


Figura D.6: Representação gráfica do comportamento da amónia no ar exalado de dois grupos etários do género masculino.

Tempo de jejum

Para analisar a influência do número de horas de jejum na concentração da amônia no ar exalado foi realizada uma estatística de tendência ao longo dos 16 minutos para dois grupos distintos. Os dados foram agrupados de acordo com o género e ainda pelo jejum ser inferior a um período de 4 horas ou superior a 4 horas. As figuras D.7 e D.8 ilustram os gráficos que demonstram o perfil da amônia num jejum inferior a 4 horas e superior a 4 horas, respetivamente.

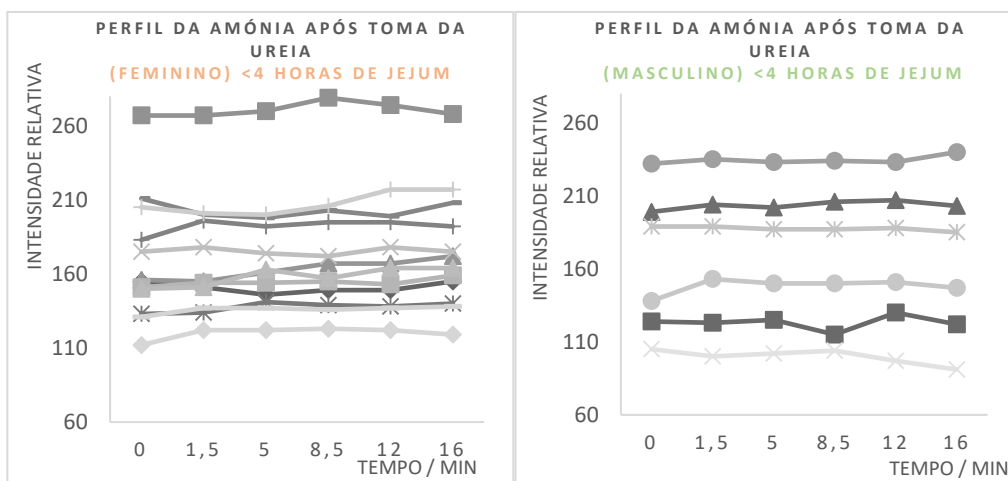


Figura D.7: Perfil da amónia considerando o jejum inferior a 4 horas e o género. O gráfico da esquerda tem uma amostra de N= 12 e o da direita uma amostra de N=7.

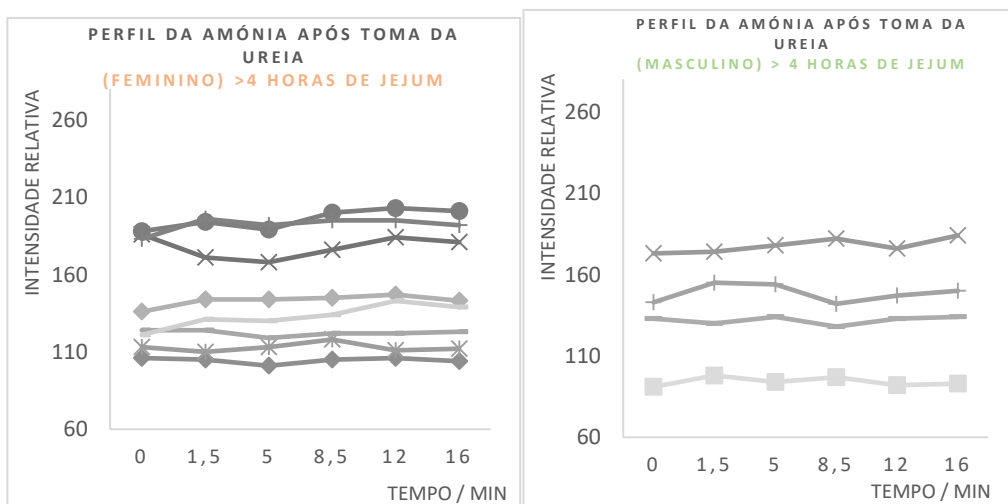


Figura D.8: Perfil da amónia considerando o jejum inferior a 4 horas e o género. O gráfico da esquerda tem uma amostra de N= 7 e o da direita uma amostra de N=4.

Medicação permanente

A presença de fármacos de forma continuada pode ser um fator justificativo de alterações no perfil de VOCs, em elementos do grupo de saudáveis. A Figura D.9 ilustra o gráfico de tendência da amónia para os 12 sujeitos que tem uma toma diária de químicos, sendo que neste caso corresponde à toma de anticoncepcionais.

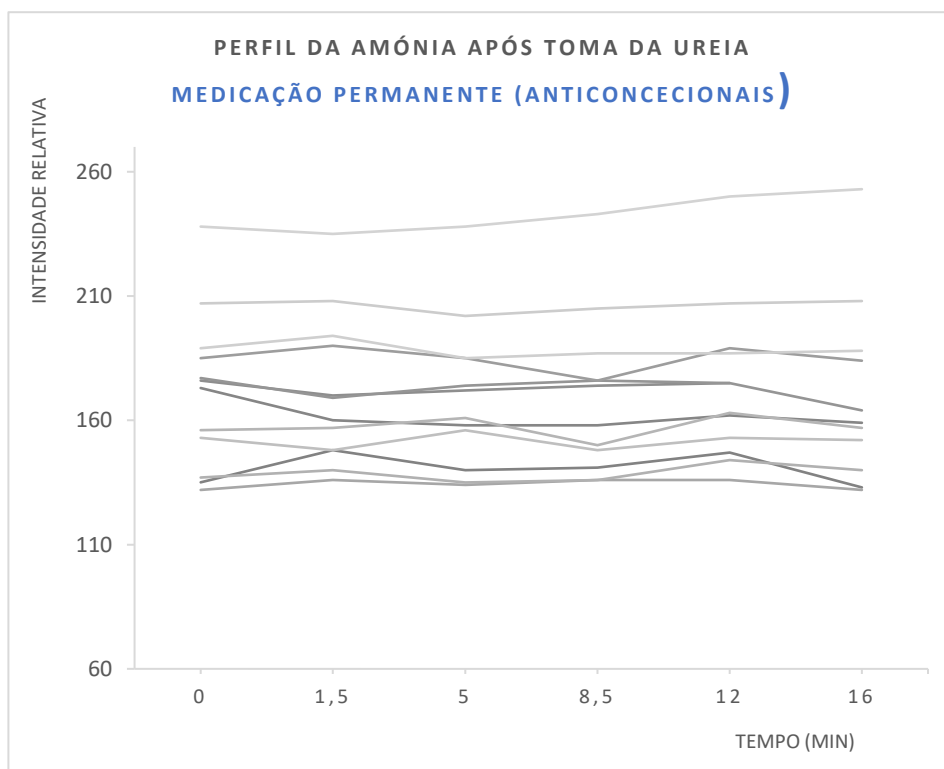


Figura D.9: Intensidade relativa do pico da amónia nos 12 sujeitos que tomam fármacos diariamente.

Medicação ocasional

A introdução de químicos no metabolismo pode afetar a concentração dos compostos que constituem o perfil de VOCs de um indivíduo saudável, mas de forma temporária. A Figura D.10 ilustra o comportamento da amônia, após toma da ureia, em 7 sujeitos que relataram terem tomado fármacos em menos de 15 dias.

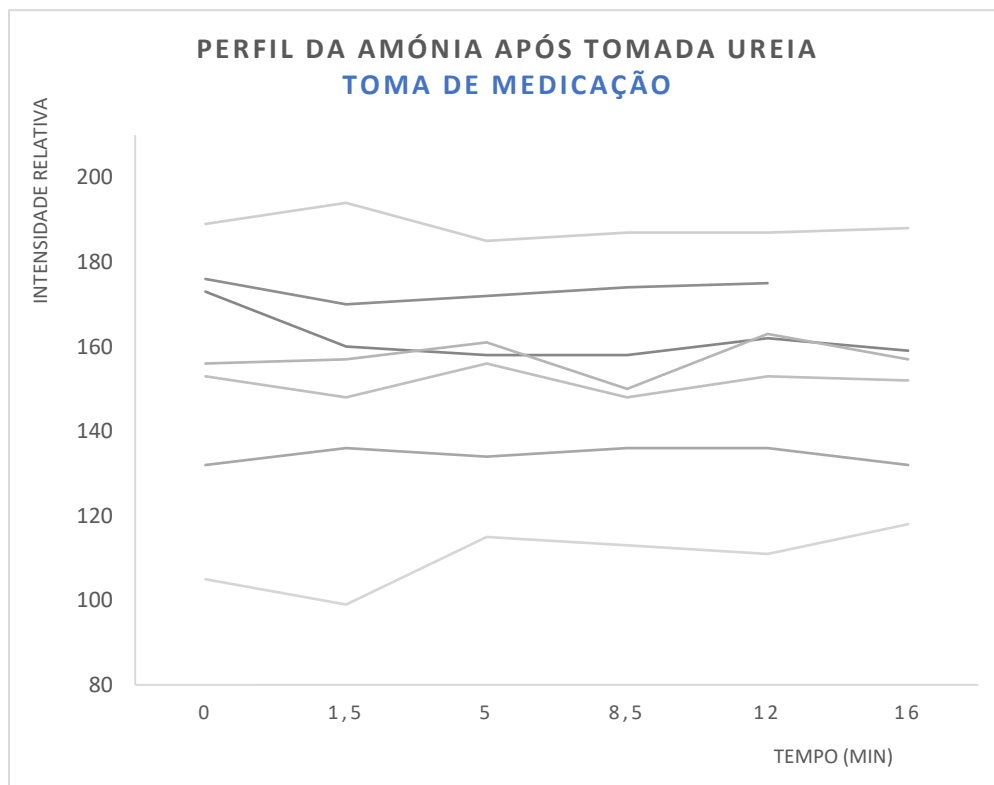


Figura D.10: Gráfico ilustrativo do perfil da amônia nos sujeitos que tomaram fármacos nos 15 dias antecedentes.

Poster apresentado no 3rd Nova Biomedical Engineering Workshop 2018

Device Development for Non-Invasive Test of Bacterial *Helicobacter Pylori*'s Infection

Paulo Santos^{1,2}, Carolina Conduto¹, Paulo Bonifácio^{1,2}, Nuno Neuparth³ and Valentina Vassilenko^{1,2}

¹ LIBPhys-UNL - Laboratório de Instrumentação, Engenharia Biomédica e Física da Radiação, Departamento de Física, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal
² NMT, S.A. - Edifício Madari Parque, Rua dos Inventores, 2825-182 Caparica, Portugal
³ NOVA Medical School, Faculdade de Ciências da Universidade Nova de Lisboa, Campo Mártires da Pátria 130, 1169-056 Lisboa
 ps.santos@campus.fct.unl.pt

Introduction: Infection by *Helicobacter Pylori*

Recent non-invasive breath tests used for detection of *Helicobacter Pylori*'s infection have become crucial part on the diagnostic process of diseases including chronic gastritis, duodenal and/or gastric ulcer and gastric cancer. Offering greater comfort to the patient and preventing proliferation of other infections in a hospital setting, development and application of non-invasive breath screening tests provide quickness, high sensitivity and specificity with significant cost savings over invasive endoscopy, therefore improving efficiency of clinical procedures.

Diseases Associated and Related Symptoms:

Related Symptoms:

- Bloating
- Nausea
- Passing Gas
- Belching
- Gnawing Pain
- Bad Breath
- Loss of Appetite
- Vomiting
- Burning

VOC (Volatile Organic Compound) Profiling After Non-radioactive Urea Ingestion

To optimize and validate the non-invasive, disposable test for *H. pylori* detection the necessity to profile urea in the exhaled air from healthy volunteers arose. Test conditions included: 3 hours of fasting and a restricted diet. Two distinct-sourced types of urea were used through the tests.

Esophageal exhaled air was sampled resorting to an advanced automatic breath sampling prototype^{1,2} developed by NMT, S.A. Subjects rinse their mouths³ and exhaled air was sampled. Urea was then administered and 6 samples were collected within 20 minutes. Sample analysis was performed by an Ion Mobility Spectrometer with a Gas Chromatographic Column (GC-IMS).

Analytical Results:

- NO new intensity peaks were detected in exhaled air after urea ingestion;
- NO new intensity peaks were found between distinct-sourced urea types.
- After 15 minutes of urea ingestion, NO significant differences were visible;
- The main difference between GC-IMS spectra from the samples before and after was the peaks' intensity, this for the same subject;
- Differences between subjects include only individual characteristic VOCs;

Device Characterization and Optimization

NMT, S.A.'s device detects *H. pylori* infection non-invasively through its metabolites in exhaled air. When present in gastric environment, *H. pylori* produces a large amount of urease:

$$NH_4CONH_2 + H_2O \xrightarrow{urease} 2NH_3 + CO_2$$

which degrades urea to ammonia

$$NH_3 + H_2O \rightleftharpoons NH_4^+ + OH^-$$

Correlating directly NH_4^+ with ammonia.

HELIC ABT from NMT detects ammonia concentration in exhaled air before and after nonradioactive ¹²C urea ingestion through a colorimetric test

Easily disposable and quick, with high sensitivity and significant cost savings over most used *H. pylori* infection screening tests, optimization tests are need for this device. Those will be carried out *in-situ* as a proof-of-concept. This in gastroenterology services of hospitals and/or clinics under the guidance of specialized doctors.

Conclusions

- Despite the need to increase test population, preliminary tests contributed to the characterization urea's VOC metabolites independently of urea sources.
- Urea-based breath tests should NOT extend over 15 minutes after urea ingestion (since urea ingestion metabolites in exhaled air do not vary after this period);
- The characterization and optimization of the devices¹ and protocol will enable the comparison between healthy subjects and Hospital patients, a crucial step to implement this non-invasive test for detection of *H. pylori* infection.

Acknowledgements

Grant from P2AE0EFSU00902016 - LIBPhys-UNL, and all volunteers participating in the tests. This work is co-funded by NMT, S.A. and National Funds through FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia - in the scope of the project PTDC/BD/14450/2016.

References

[1] P. Santos, F. Vasconcelos, F. Gil and V. Vassilenko, "Implementation of Machine Learning for Breath Collection", 10th Proc. Int. Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies, BiomedTech pages 550-553, 2017.
 [2] V. Vassilenko and P. Santos, "Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL) and NMT S.A.: "System for Controlled and Selective Sampling of Exhaled Air and Corresponding Operating Procedure", W02018647008, 2017, Sep. 05.



Anexo

Decisão da Comissão de Ética da Nova Medical School da Universidade Nova de Lisboa



Decisão final sobre o projecto "Desenvolvimento do dispositivo para teste não invasivo da infeção por bactéria *Helicobacter Pylori*"

A Comissão de Ética da NMS|FCM-UNL (CEFCM) decidiu, por unanimidade, aprovar o projecto de investigação intitulado "Desenvolvimento do dispositivo para teste não invasivo da infeção por bactéria *Helicobacter Pylori*" (nº72/2018/CEFCM), submetido por Prof. Doutora Valentina Vassilenko.

Lisboa, 29 de Outubro de 2018

O Presidente da Comissão de Ética,

(Prof. Doutor Diogo Pais)

TO WHOM IT MAY CONCERN

The Ethics Research Committee NMS|FCM-UNL (CEFCM) has unanimously approved the Project entitled "Desenvolvimento do dispositivo para teste não invasivo da infeção por bactéria *Helicobacter Pylori*" (nr.72/2018/CEFCM), submitted by Valentina Vassilenko, MD, PhD.

Lisbon, October 29th, 2018

The Chairman of the Ethics Research Committee,

(Diogo Pais, MD, PhD)