



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”

Rafael Gobbis Soeiro Emiliano

# Aplicação de isótopos estáveis na Medicina

Botucatu

2014



Rafael Gobbis Soeiro Emiliano

# Aplicação de isótopos estáveis na Medicina

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa

Botucatu

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU -  
UNESP BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE –

CRB 8/5651

Emiliano, Rafael Gobbis Soeiro.

Aplicação de isótopos estáveis na medicina / Rafael Gobbis Soeiro Emiliano.  
- Botucatu, 2014

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Universidade  
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vladimir Eliodoro Costa

Capes: 10504001

1. Espectrometria de massa. 2. Isótopos estáveis. 3. Física medica.  
4. Helicobacter pylori.

Palavras-chave: Espectrometria de massa; Física médica; Isótopos estáveis.

# Índice

	página
Resumo	6
Abstract	7
1. Introdução	8
2. Fundamentação Teórica	9
3. Aplicação de Isótopos Estáveis na Saúde	13
4. Referências Bibliográficas	14

## RESUMO

O uso de isótopos estáveis tem aumentado nos últimos anos, especialmente através de pesquisas realizadas nas principais universidades do país. As aplicações na área da Saúde permitem estudar, por exemplo, os processos envolvendo síntese e degradação protéica, gasto energético, composição corporal, cinética de vitaminas, absorção de minerais e diagnóstico de algumas patologias relacionadas à presença de *Helicobacter Pylori*.

Palavras-chave: espectrometria de massas; isótopos estáveis; física médica.

## ABSTRACT

The use of mass spectrometry for identification of stable isotopes in Brazil is being improved, specially through research conducted at main universities in the country. Some applications in health allow to studying, for example, processes involving synthesis and protein degradation, energy expenditure, body composition, kinetics of vitamins, mineral absorption and diagnose diseases related to Helicobacter Pylori.

Key-words: mass spectrometers; stable isotopes; medical physics.

# 1. Introdução

A utilização da espectrometria de massas para identificação de isótopos estáveis é destacada nas áreas científicas que resultam dos avanços na Física e Química realizados na primeira metade do século XX. A aplicação dos isótopos estáveis se expandiu para Geoquímica, Hidrologia, Petrologia e Oceanografia. Recentemente, novas áreas foram agraciadas com o uso da técnica, como as Ciências Atmosféricas e Planetárias, Microbiologia, Agronomia, Fisiologia Vegetal, Ecologia, Zootecnia, Ciência Forense, Ciências do Solo, Arqueologia, Antropologia e o foco deste trabalho, a Medicina. [CRISS 1999].

A ampla utilização dos isótopos estáveis, em oposição à utilização dos isótopos radioativos, foi retardada pelo fato de requerer um processo laboratorial muitas vezes tedioso e demorado para sua determinação. Apesar de eles serem conhecidos há várias décadas, apenas atualmente, com o advento de novas técnicas laboratoriais de separação e determinação, o seu uso tem sido amplamente difundido [MARCHINI, 1997]. Um fator essencial para esta expansão é a evolução do espectrômetro de massa. A melhora na capacidade analítica e de seus periféricos resultou em um maior número de análises com alto nível de precisão em um menor intervalo de tempo [WOLF e CHINKES, 1992].

O objetivo deste trabalho é apresentar o funcionamento de um espectrômetro de massas e a aplicação da espectrometria de massas para identificação isótopos estáveis na Medicina, especificamente para o teste respiratório utilizando  $^{13}\text{C}$  para diagnóstico da presença de *Helicobacter Pylori*.



## 2. Fundamentação Teórica

O final do século XIX e começo do século XX foram muito produtivos no que diz respeito às descobertas que envolveram a estrutura atômica da matéria. No início do século XIX surge o modelo de Dalton, em que o átomo é imaginado como uma bolinha indivisível e maciça. Em 1875, William Crookes fez experiências com descargas elétricas em gases, a pressões baixíssimas, e descobriu os chamados raios catódicos, que levaram à descoberta dos elétrons. Já em 1895, Wilhelm Konrad Roentgen introduziu modificações na ampola de Crookes e conseguiu produzir os raios-X (assim chamados porque eram de natureza desconhecida), verificando também que os raios-X tornavam fluorescentes ou fosforescentes certas substâncias [FELTRE 2000].

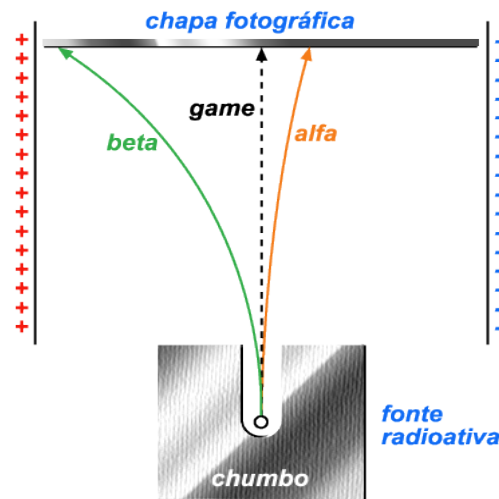
A propósito, lembramos aqui que tanto as substâncias fluorescentes como as fosforescentes emitem luz ao receberem energia- em forma, por exemplo, de radiações eletromagnéticas (luz, raios-X, etc). Cessando o fornecimento de energia, as fluorescentes param imediatamente de emitir luz, enquanto as fosforescentes continuam emitindo luz por mais algum tempo, durante segundos ou até mesmo alguns dias.

Em 1896, Henri Antoine Becquerel procurou estudar o caminho inverso àquele observado por Roentgen, isto é, se as substâncias fluorescentes ou fosforescentes seriam também capazes de emitir, por si próprias, os raios-X. Ao usar o sulfato duplo de potássio e urânio,  $K_2(UO_2)(SO_4)_2$ , Becquerel verificou que, ainda que permanecesse no escuro por muitos dias (e, portanto, sem receber energia externa), essa substância conseguia emitir radiações que impressionavam chapas fotográficas mesmo quando envolvidas em papel preto. Sem dúvida, alguma emissão desconhecida estava saindo daquele sulfato, atravessando o papel e chegando até a chapa fotográfica. Essas emissões foram chamadas inicialmente de raios de Becquerel e, posteriormente, de emissões radioativas ou radioatividade.

Pouco tempo depois, em 1897, o casal Marie Curie e Pierre Curie verificou que todos os sais de urânio apresentavam a propriedade de

impressionar chapas fotográficas; conclui-se, então, que o responsável pelas emissões era o próprio urânio.

Quando submetemos as emissões radioativas naturais ( por exemplo, do polônio ou do rádio) a um campo elétrico, notamos sua subdivisão em três tipos bem distintos. Esse fato foi verificado por Rutherford, em 1898, e pode ser constatado conforme figura 1:



**Figura 1:** Experimento de Rutherford (FONTE: <http://efisica.if.usp.br/moderna/radioatividade/tipos/>)

O material radioativo é colocado em um furo feito no bloco de chumbo; o chumbo detém as emissões radioativas que, por sua natureza, saem em todas as direções. Quando o feixe radioativo passa entre as duas placas fortemente eletrizadas, ele se subdivide em três partes, como pode ser constatado por meio da chapa fotográfica colocada em sua trajetória:

- a emissão que sofre um pequeno desvio para o lado da placa negativa é denominada emissão alfa ( $\alpha$ ).
- a emissão que sofre um desvio maior para o lado da placa positiva é denominada emissão beta ( $\beta$ ).
- a emissão que não sofre desvio é denominada emissão gama ( $\gamma$ ).

Cada átomo é formado por um núcleo e uma eletrosfera. No núcleo estão os prótons e nêutrons e na eletrosfera os elétrons. As cargas elétricas e

as massas reais dessas partículas são extremamente pequenas e estão representadas na tabela 1.

**Tabela 1:** Propriedades das principais partículas elementares do átomo.

Cada partícula subatômica possui uma carga elétrica associada.

<i>Nome</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Massa (g)</i>	<i>Massa (u.m.a)</i>	<i>Carga</i>
próton	P+	$1,673 \cdot 10^{24}$	1	+1
nêutron	n <sup>o</sup>	$1,675 \cdot 10^{24}$	1	0
elétron	e <sup>-</sup>	$9,109 \cdot 10^{28}$	0,0005	-1

FONTE: <http://www.mundoeducacao.com/quimica/as-tres-maiores-particulas-subatomicas.htm>

Outros conceitos importantes são o número atômico (Z), número de massa (A).

Número atômico (Z) é o número de prótons existentes no núcleo do átomo.

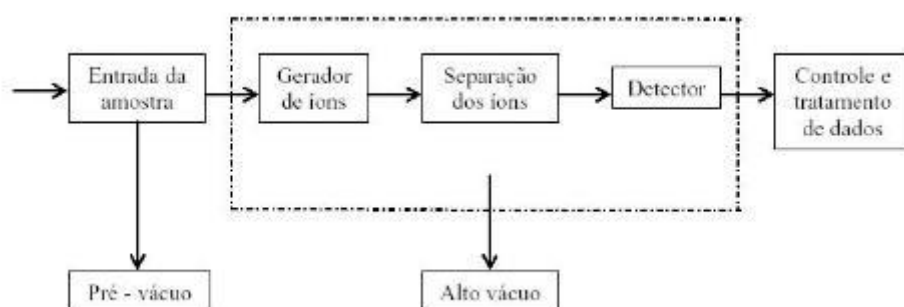
Número de massa (A) é a soma do número de prótons (Z) com o número de nêutrons (N):  $A=Z + N$  [ATKINS 2001].

O espectrômetro de massa para determinação da razão isotópica de elementos leves (IRMS) é um instrumento que separa íons, positivos ou negativos, produzidos a partir de átomos ou moléculas, de acordo com a razão massa/carga (m/q).

O espectrômetro é constituído de sistema de entrada da amostra, fonte de ionização, analisador magnético e detector dos isótopos [DUCATTI,2008].

No sistema de entrada da amostra, os isótopos dos elementos a serem analisados (C, H, O, N, S) são introduzidos na forma gasosa (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>), seja através do vaporizador diretamente acoplado ao espectrômetro (on-line) ou através do vaporizador separado do espectrômetro (off-line) [DUCATTI,2008]. A amostra gasosa, após passar pelo sistema de entrada, é

introduzida no gerador de íons, em que será ionizada por um feixe de elétrons de alta energia emitido por um filamento metálico (método mais comum) e logo após acelerada em direção ao separador de íons. A amostra gasosa ionizada flui através do separador de íons, que pode ser do tipo setor magnético, tempo de voo, ion trap ou quadrupolo magnético, onde os íons serão separados pela sua proporção isotópica. Estes íons então serão coletados e detectados através dos copos de Faraday ou de detectores multiplicadores.



FONTE: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAenocAG/espectrometria-massas>

Os resultados obtidos através do espectrômetro de massas podem ser expressos em termos da abundância isotópica natural (amostras enriquecidas) com precisão da ordem de 0,1% ou em termos de enriquecimentos isotópicos relativos, expressos em delta per mil ( $\delta\%$ ) (amostras com abundâncias isotópicas naturais), com precisão da ordem de 0,2‰ ou menos. Nos modernos equipamentos estes resultados podem ser obtidos simultaneamente [DUCATTI, 2007].

A abundância isotópica natural é a concentração de qualquer dos isótopos de um elemento nas ocorrências naturais. Podemos citar como exemplo a abundância isotópica natural do elemento hidrogênio, onde temos  $H^1 = 99,985\%$  e  $H^2 (D) = 0,015\%$ . No caso do elemento carbono, temos  $C^{12} = 98,89\%$  e  $C^{13} = 1,11\%$ .

A razão isotópica absoluta (R) é a razão entre as concentrações de dois isótopos estáveis de um determinado elemento químico. A razão isotópica absoluta dos padrões internacionais para os elementos químicos leves está demonstrada na tabela 2.

**Tabela 2:** Razão isotópica absoluta dos padrões internacionais

Vienna standard mean ocean water;(SMOW)
$^2\text{H}/^1\text{H} = 0,00015576$
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O} = 0,00200520$
$^{17}\text{O}/^{16}\text{O} = 0,0003730$
Peedee Belemnite; (PDB)
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0,0112372$
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O} = 0,0020671$
$^{17}\text{O}/^{16}\text{O} = 0,0003790$
Nitrogênio Atmosférico; ( $\text{N}_2$ atm)
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = 0,0036765$
Cañon Diablo Meteorite Troilite; (CDT)
$^{34}\text{S}/^{32}\text{S} = 0,0450045$
$^{33}\text{S}/^{32}\text{S} = 0,0081000$

FONTE: [PRESTON 1992]

A determinação da abundância isotópica natural ou da razão isotópica limita-se a poucos estudos isotópicos. O maior interesse e volume das análises referem-se a determinações das diferenças das abundâncias isotópicas da amostra, comparativamente ao padrão, ou seja, a mensuração do enriquecimento isotópico relativo. Esta medida é calculada através da Equação 1.

$$\delta\text{‰ } X^A (\text{amostra, padrão}) = [(r_{\text{amostra}} / r_{\text{padrão}}) - 1] * 1000 \quad (1)$$

Onde,

$\delta\text{‰ } X^A$  (amostra, padrão) = enriquecimento isotópico relativo referente ao elemento químico X, da amostra versus o padrão, expresso em per mil (‰);

r = razão do isótopo pesado sobre o isótopo leve ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ;  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ,  $^2\text{H}/^1\text{H}$ , etc.) da amostra e do padrão, respectivamente.

### **3. Aplicação dos isótopos estáveis para diagnóstico de Helicobacter Pylori**

Os testes respiratórios não-invasivos com  $C^{13}$  indicam alterações significativas no metabolismo devido a uma doença específica ou a falta de uma enzima específica. As vantagens marcantes do teste respiratório com  $^{13}C$  é o fato deste ser não-invasivo, não radioativo, seguro, simples e eficaz. A simplicidade e a não-invasividade do teste respiratório com  $^{13}C$  o torna bastante viável em um ambiente clínico. Os testes de respiração também podem ser utilizado para monitorar a gravidade da doença durante o tratamento ou para testar o controle da terapia e a eficácia de medicamentos. [BRADEN 2009].

O  $^{13}C$  é um isótopo estável que ocorre naturalmente em cerca de 1,11% de todos os átomos de carbono. Ele pode ser usado para marcar um substrato especificamente projetado que sofre os processos metabólicos de interesse. O volume do substrato pode ser medido por monitorização da decomposição unidirecional do dióxido de carbono marcado. Amostras de ar expirado são coletados e analisados em intervalos de tempo determinados. O aparecimento de Dióxido de  $^{13}C$  na respiração reflete o tempo da etapa da ingestão de substrato, transporte gastrointestinal, degradação enzimática no lúmen gastrointestinal ou metabolização pós-absorvente, até o final da expiração  $^{13}CO_2$  produzido. Testes respiratórios baseiam-se na hipótese que o processo de interesse acontece em uma etapa limitada de tempo enquanto todos os outros processos metabólicos não são variáveis ou insignificamente rápido [BRADEN 2009].

A escolha do substrato marcado com  $^{13}C$  determina se o teste respiratório com  $^{13}C$  investiga o transporte, a digestão, a absorção, os processos de oxidação ou de atividades enzimáticas. Hoje em dia, uma grande variedade de substratos de teste estão disponíveis para diferentes fins de diagnóstico (Tabela 3).

**Tabela 3:** Substratos marcados com  $^{13}\text{C}$  para testes respiratórios com  $^{13}\text{C}$ .

<b>Indicação</b>	<b>Importância Clínica</b>	<b>Alternativa de Diagnóstico</b>
Infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	Alta	Teste de antígeno fecal, histologia, teste da urease e cultura
Esvaziamento gástrico (fase sólida)	Alta	Cintilografia
Esvaziamento gástrico (fase líquida)	Moderada	Cintilografia (ultrasom)
Função hepática	Moderada	Pontuações clínicas (Child-Pugh), MEGX-teste, a capacidade de eliminação Galactose
Função pancreática exócrina	Baixa	Secretina pancreozimina teste, análise de gordura nas fezes, elastase fecal
Absorção	Muito Baixa	Gordura nas fezes
Tempo de trânsito orocecal	Baixa	Lactulose ea inulina teste respiratório de hidrogênio, a cintilografia
Assimilação de carboidratos	Muito Baixa	Hidrogênio testes respiratórios, medição da atividade enzimática na biópsia duodenal
Supercrescimento bacteriano	Baixa	Glicose hidrogênio no ar expirado teste de cultura microbiológica, a partir de aspirado jejunal

FONTE: [BRADEN 2009]

O isótopo estável  $^{13}\text{C}$  difere por apenas um nêutron do naturalmente mais abundante átomo  $^{12}\text{C}$ . A alta resolução dos espectrômetros de massa de razão isotópica (IRMS) permite a medição desta pequena diferença de massa entre  $^{13}\text{CO}_2$  e  $^{12}\text{CO}_2$ .

A proporção isotópica ( $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ ) medida em amostras de respiração é expressa em valor de  $\delta$  em relação ao enriquecimento de  $^{13}\text{C}$  em um material



padrão. O enriquecimento de  $^{13}\text{C}$  em amostras de respiração devem sempre ser relacionado com o enriquecimento de uma referência antes da ingestão marcador (delta sobre o valor da referência) como a ocorrência natural de  $^{13}\text{CO}_2$  na respiração varia e depende da dieta. Todas as aplicações de marcadores nos testes respiratórios com  $^{13}\text{C}$  resultam em apenas um ligeiro aumento da concentração de  $^{13}\text{C}$  presente fisiologicamente no corpo humano [BRADEN 2009].

O teste mais comum hoje em dia usando a técnica de isótopos estáveis é o teste respiratório da ureia marcada com  $^{13}\text{C}$  para detectar a infecção pelo *Helicobacter pylori*. O teste explora a atividade da urease bacteriana que hidrolisa a ureia marcada com  $^{13}\text{C}$  ingerida em dióxido de carbono marcado com  $\text{C}^{13}$  e amoníaco. Um aumento de  $^{13}\text{CO}_2$  no ar depois de beber uma solução de ensaio contendo a ureia marcada com  $^{13}\text{C}$  indica infecção gástrica *Helicobacter pylori*.

O diagnóstico não-invasivo para detecção de infecção por *Helicobacter pylori* é a maior vantagem deste teste respiratório com ureia e explica a sua alta aceitação em pacientes. O teste respiratório com ureia é recomendado para estratégias de diagnóstico e tratamentos em pacientes com idade inferior a 45 anos. O teste de respiração é também adequado para controle após terapia de erradicação e em estudos epidemiológicos ou farmacológicos [BRADEN 2009].

## 4. Referências Bibliográficas

[ATKINS 2001] ATKINS, P. Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente. [S.1.]: Bookman, 2001.

[CRISS 1999] CRISS, R. Principles of stable isotope distribution. New York: Oxford University Press., p. 254, 1999.

[DUCATTI 2008] DUCATTI, C. Isótopos estáveis ambientais em zootecnia. Ago 2008.

[PRESTON 1992] PRESTON, T. The measurement of stable isotope natural abundance variations. p. 1091-1097, Dez 1992.

[MARCHINI 1997] MARCHINI, J. Utilização da espectrometria de massa para o estudo do metabolismo protéico e aminoacídico, em medicina. Medicina, Ribeirão Preto, v. 30, p. 494-507, Out/Dez 1997.

[WOLFE e CHINKES 1992] WOLFE, R. R.; CHINKES, D. L. Isotope tracers in metabolic research: Principles and practices of kinetic analysis. [S.1.: s.n.], 1992.

[BRADEN 2009] BRADEN, B. Methods and functions: Breath tests. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, v. 23, p. 337-352, 2009.

<http://efisica.if.usp.br/moderna/radioatividade/tipos/>

<http://www.mundoeducacao.com/quimica/as-tres-maiores-particulas-subatomicas.htm>

<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAenocAG/espectrometria-massas>