

Vander José Berti Filho

Aplicações de isótopos estáveis na área
da saúde no Brasil.

Botucatu

2009

Vander José Berti Filho

Aplicações de isótopos estáveis na área
da saúde no Brasil.

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. Carlos Ducatti

Botucatu

2009

Resumo

O uso de isótopos estáveis no Brasil vem sendo aprimorado, principalmente através das pesquisas realizadas nas principais universidades do país. As aplicações na área da Saúde permite estudar, por exemplo, os processos envolvendo síntese e degradação protéica, gasto energético, composição corporal, cinética de vitaminas, absorção de minerais e diagnosticar patologias relacionadas ao *Helicobacter pylori*. A grande motivação é incentivar o aumento das aplicações na área de saúde no poucos centros que possuem espectrômetros de massa no Brasil, já que a técnica é inócua ao ser humano, ou seja, não possui restrições de uso, como ocorre com os isótopos radioativos.

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

Abstract

The use of stable isotopes in Brazil is being improved, mainly 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*. The big motivation is to encourage the growth of investments in health in the few centers that have mass spectrometers in Brazil, as the technique is harmless to humans, in other words, no has problems to use it like when you use radioactive isotopes.

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

Índice

	Página
Resumo	2
Abstract	3
1 Introdução	5
2 Fundamentação Teórica	7
2.1 Física e Química Geral	7
2.2 Espectrômetro de Massa	9
2.3 Método de preparo de amostra e do padrão	11
2.4 Linguagem Analítica	13
2.5 Turnover	15
3 Aplicações de Isótopos Estáveis	16
4 Referências Bibliográficas	18

1 Introdução

A utilização 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 Hidrologia, Cosmoquímica, Geoquímica, Petrologia e Oceanografia. Recentemente, novas áreas foram agraciadas com uso da técnica, como as Ciências Atmosféricas e Planetárias, Microbiologia, Agronomia, Fisiologia Vegetal, Ecologia, Zootecnia, Ciências Forense, Ciências do Solo, Arqueologia, Antropologia e o foco deste trabalho, a Medicina [CRISS 1999], [FAURE e MENSING 2005].

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 [MARCHINI 1997], [WOLFE e CHINKES 1992].

O uso de isótopos estáveis no Brasil vem sendo aprimorado, principalmente através das pesquisas realizadas nas principais universidades do país. Entre os colaboradores para este ganho de qualidade está a Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", através do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais em Ciências da Vida (CIE), uma unidade auxiliar do Instituto de Biociências de Botucatu. Através de recursos da Fundação Banco do Brasil, FAPESP e UNESP, foi implantado o CIE, voltado inicialmente para as análises isotópicas de bebidas e alimentos e, timidamente, em algumas áreas envolvendo animais. Atualmente, a proposta do Centro de Isótopos Estáveis é a expansão da aplicabilidade prática e sistemática desta ferramenta analítica.

Outro grande colaborador é a Universidade de São Paulo, através do Laboratório de Espectrometria de Massa do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Este foi o primeiro laboratório de espectrometria de massa, voltado para área médica, e está à disposição da comunidade científica desde o final de 1997. Destacam-se os estudos em reciclagem protéica, gasto energético e composição corporal [MARCHINI 1997].

Os poucos laboratórios de isótopos estáveis no Brasil possuem a distribuição geográfica como mostrado na Figura 1 e Tabela 1.



Figura 1: Distribuição das equipes de trabalho com Isótopos Estáveis no Brasil.

Os respectivos estados e cidades dos laboratórios, assim como a instituição e as principais aplicações estão indicadas na Tabela 1, onde nota-se a predominância das universidades públicas.

Tabela 1: Identificação das equipes de trabalho com Isótopos Estáveis no Brasil.

Grupo - Estado/Cidade	Instituição	Aplicação
A - Pará/Belém	UFPA - Instituto de Geociência	Geoquímica
B - Pernambuco/Recife	UFPE - Departamento de Geociência	Geoquímica
C - Bahia/Salvador	UFBA - Instituto de Geociência	Hidrologia
D - Rio de Janeiro/Itaquai	EMBRAPA	Agronomia
D - Rio de Janeiro/Rio de Janeiro	CENPES	Geoquímica e Petróleo
D - Rio de Janeiro/Rio de Janeiro	UFRJ - LADETEC	Controle de Doping
D - Rio de Janeiro/Rio de Janeiro	UFRJ - Departamento de Geologia	Geoquímica
E - São Paulo/Piracicaba	USP - CENA	Ecologia, Meio Ambiente e Agronomia
E - São Paulo/Piracicaba	USP - CENA	Compostos Enriquecidos e Agronomia
E - São Paulo/Botucatu	UNESP - Instituto de Biociências	Alimentos, Bebidas e Zootecnia
E - São Paulo/São Paulo	USP - Instituto de Geociências	Hidrologia
E - São Paulo/São Paulo	USP - Instituto de Geociências	Geoquímica
E - São Paulo/Ribeirão Preto	USP - Faculdade de Medicina	Seres Humanos/Pediatria
F - Rio Grande do Sul/Caxias do Sul	Secretaria da Agricultura do Estado do RS - LAREN	Vinhos e Sucos
G - Distrito Federal/Brasília	UNB - Departamento de Geologia	Geoquímica e Hidrologia

FONTE: [DUCATTI 2008].

2 Fundamentação Teórica

2.1 Física e Química Geral

A palavra *átomos*, do grego, quer dizer indivisível. Atualmente, o átomo não é a menor e indivisível partícula da matéria, mas é a menor estrutura neutra da matéria que conserva as propriedades dos elementos químicos e é capaz de reagir quimicamente. Todo átomo apresenta um pequeno núcleo carregado positivamente, no qual concentra-se 99,9% de sua massa. O núcleo é rodeado por uma nuvem de elétrons em movimento. No átomo neutro as cargas positivas dos prótons são exatamente balanceadas pelas cargas negativas dos elétrons, os quais estão dispostos nos orbitais quantizados [JAMES e GERARD 1986],[ATKINS 2001].

O átomo contém um grande número de diferentes partículas elementares que interagem entre si. Para a compreensão dos isótopos estáveis é suficiente o conhecimento de três deles: próton (carga positiva), nêutron (carga neutra), os quais conferem a massa e a carga positiva do núcleo. O outro componente principal são os elétrons (carga negativa), os quais envolvem o núcleo em órbitas específicas fornecendo as propriedades químicas [JAMES e GERARD 1986],[ATKINS 2001],[EISBERG e RESNICK 1979]. As propriedades das partículas subatômicas necessárias para um melhor entendimento são encontradas na Tabela 2.

Tabela 2: Propriedades das principais partículas elementares do átomo.

	Massa (g)	Carga (Coulombs)
Próton	$1,67 \times 10^{-24}$	$+6,02 \times 10^{-19}$
Nêutron	$1,67 \times 10^{-24}$	0
Elétron	$9,11 \times 10^{-28}$	$-6,02 \times 10^{-19}$

FONTE: [JAMES e GERARD 1986].

A nomenclatura isotópica expressa-se por A_ZX , na qual, X representa o elemento químico, A reflete o número de massa em unidades de massa atômica e Z o número de prótons, de modo que $A = Z + N$, onde N representa o número de nêutrons [ATKINS 2001], [JAMES e GERARD 1986].

As propriedades de um elemento são determinadas quase que inteiramente pelo número e pela distribuição dos seus elétrons. Portanto, é o número atômico (ou número de prótons) que serve, indiretamente, para distinguir o átomo de um elemento do átomo de outro, uma vez que o número de elétrons deve ser igual ao número de prótons em um átomo eletricamente neutro [ATKINS 2001],[EISBERG e RESNICK 1979]. Teoricamente, define-se isótopos como átomos que possuem o mesmo número atômico, ou seja,

ocupam o mesmo lugar na tabela periódica. Estes podem ser estáveis ou radioativos [ATKINS 2001],[EISBERG e RESNICK 1979].

Cada elemento, por exemplo, o carbono, pode ter várias formas isotópicas que possuem as mesmas características químicas, mas, pelo fato de possuírem diferentes números de nêutrons, têm diferentes massas. Certos isótopos são radioativos e se desintegram, emitindo partículas alfa, beta e gama, que podem ser nocivas aos seres humanos. Outros isótopos, no entanto, como o 1_6C e ${}^{13}_6C$, não se desintegram, sendo portanto estáveis e, portanto, inócuos aos seres humanos. A incorporação destes isótopos, em moléculas de interesse biológico, permite sua utilização em experimentos tendo como objeto o homem, de qualquer idade, sem submetê-lo a nenhuma exposição radioativa [FRANCO et al. 2004].

As moléculas isotópicas ${}^{12}CO_2$ e ${}^{13}CO_2$ não são diferenciadas pelas membranas biológicas de origem vegetal ou animal, ou seja, a pequena sutileza escondida no núcleo não é detectada, tornando os isótopos de Carbono excelentes traçadores a nível de variação natural ou compostos enriquecidos, o que é extensivo para os demais bioelementos.

Atualmente existem mais que 2500 diferentes isótopos conhecidos em 110 elementos químicos diferentes com 264 isótopos estáveis. Na área biológica e disciplinas afins, os principais elementos químicos de interesse são os bioelementos formados por CHON'S (Carbono, Hidrogênio, Oxigênio, Nitrogênio e Enxofre), os quais fazem parte da estrutura de carboidratos, lipídeos, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos e são os responsáveis por mais de 90% de todos os tecidos vivos [CRISS 1999]. Os principais isótopos estáveis dos bioelementos estão explícitos na Tabela 3.

Tabela 3: Os isótopos estáveis dos elementos H, C, N, O e S e suas moléculas gasosas comumente utilizadas na espectrometria de massas.

Isótopos Estáveis	Abundância átomos %	Gás
1H	99,9844	H_2
2H	0,0156	
${}^{12}C$	98,8890	CO_2
${}^{13}C$	1,1110	
${}^{14}N$	99,6340	N_2
${}^{15}N$	0,3660	
${}^{16}O$	99,7628	CO_2
${}^{17}O$	0,0372	
${}^{18}O$	0,2000	SO_2
${}^{32}S$	95,0180	
${}^{33}S$	0,7500	
${}^{34}S$	4,2150	
${}^{36}S$	0,0170	

FONTE: [PRESTON 1992].

Os átomos dos elementos químicos fazem parte da seguinte hierarquia estrutural: áto-

mos $\rightarrow$ moléculas $\rightarrow$ estruturas supra moleculares $\rightarrow$ células $\rightarrow$ órgãos $\rightarrow$ sistemas fisiológicos $\rightarrow$ seres vivos. Os isótopos estáveis do Carbono, Hidrogênio, Oxigênio, Nitrogênio e Enxofre ocorrem naturalmente na atmosfera, hidrosfera, litosfera, biosfera e também fazem parte dos grandes ciclos naturais, o que evidencia o importante papel de rastreabilidade que eles conferem nas grandes áreas das Ciências da Vida [DUCATTI 2008].

A utilização dos isótopos estáveis, depende da sua proporção na natureza, sendo uteis para estudos metabólicos aqueles isótopos que aparecem em menor proporção (menos que 10%) em relação ao isótopo mais abundante, permitindo, assim, que sejam enriquecidos e diferenciados pelo espectrometro. Um outro fator, não menos importante e aparentemente óbvio, é que o elemento isotópico em questão esteja presente no organismo humano em quantidades mensuráveis. Por exemplo, o organismo humano tem 18% de carbono, sendo 98,9% de ^{12}C e 1,1% de ^{13}C . O enriquecimento do ^{13}C superior a 1,1% torna a separação possível de ser realizada e distinguível das substâncias que contenham a proporção natural de ^{12}C [DUCATTI 2008], [FRANCO et al. 2004].

As moléculas isotópicas $^{12}\text{CO}_2$ e $^{13}\text{CO}_2$ não são diferenciadas pelas moléculas biológicas de origem vegetal ou animal, ou seja, a pequena sutileza escondida no núcleo (nêutron) não é detectada, tornando os isótopos de Carbono excelentes traçadores a nível de variação natural ou compostos enriquecidos, que é extensível para os demais bioelementos [CASTRO et al. 2004].

2.2 Espectrômetro de Massa

O espectrômetro de massa é conhecido pelo fato de obter medidas precisas em concentração isotópica muito baixa. Desde o início de seu desenvolvimento, em 1910 por J. J. Thomson, tem se mostrado como uma ferramenta técnico-analítica das mais importantes disponíveis para os cientistas, pois é capaz de fornecer importantes informações a respeito do microscópico mundo dos átomos, moléculas e íons, tais como, a composição elementar da amostra, estrutura molecular e a composição quantitativa e qualitativa de misturas complexas [GROOT 2004].

Continuando na mesma linha de estudos, Francis Willian Aston construiu um novo instrumento, utilizando de sistemas de vácuo mais eficientes, com um sistema coletor de íons otimizado e um mecanismo de focalização do feixe iônico, o qual ele chamou de espectrógrafo de massa, utilizado para confirmar a existência dos isótopos estáveis para quase todos os elementos conhecidos até então. Aston descobriu 212 dos isótopos que ocorrem naturalmente, mediu suas massas atômicas com precisão de 0,1% e determinou sua abundância isotópica, provocando significativas alterações na tabela periódica. Devido a essas enormes contribuições para a Ciência, Thomson e Aston foram premiados com o Nobel de Física de 1906, e Química em 1922, respectivamente [GROOT 2004],

[MENAND et al. 1997].

Hoje em dia, os modelos de espectrômetros de massa de alta resolução contam com um sistema de separação de íons constituído de um analisador eletrostático de 90° e um analisador magnético de 60° , conhecido como "sistema óptico Nier-Johnson", criadores do projeto.

No Espectrômetro de massa, a substância a ser analisada sofre ionização por impacto de elétrons na fonte de ionização e os íons isotópicos obtidos são extraídos por campo elétrico e acelerados por placas eletrônicas. O único feixe isotópico obtido é resolvido por campo magnético, abrindo em diversos feixes, os quais são detectados nos copos de Faraday.

Na fonte de ionização, a energia cinética atingida é devido à diferença de potencial entre as placas e o resultado pode ser obtido através da Equação 1, na qual q é a carga do íon, V a diferença de potencial, m a massa e v a velocidade [DUCATTI 2008], [HALLYDAY 2003].

$$qV = \left(\frac{1}{2}\right)mv^2 \quad (1)$$

O movimento dos íons isotópicos é afetado pelo campo magnético (B) e ou campo elétrico (E) de acordo com a **Lei de Lorentz**, apresentada na Equação 2 [DUCATTI 2008], [HALLYDAY 2003], [TIPLER 1999].

$$|F| = qE + qv \times B \quad (2)$$

De acordo com a configuração, o instrumento pode apresentar focalização pela velocidade, pela energia e pelo momento.

Na focalização pela velocidade, o campo elétrico (E) e o campo magnético (B) podem ser ajustados de modo que não ocorra deflexão do feixe do íon quando passa na região dos campos (Figura 2, parte a). Assim sendo, a força resultante será zero e a Equação 2 pode ser escrita como demonstrado na Equação 3, ou seja, somente íons com a velocidade dada por esta equação passam pelo sistema sem deflexão, caso contrário, a focalização pela velocidade pode ser usada ao longo do caminho do íon para a remoção de íons indesejáveis [HALLYDAY 2003], [TIPLER 1999].

$$V = \frac{E}{B} \quad (3)$$

Quando a focalização é dada pela energia (Figura 2, parte b), o analisador apresenta configuração encurvada, na qual as placas elétricas carregadas separam os íons de acordo com a sua energia. O movimento circular dos íons pode ser obtido pela Equação 4, conseqüentemente o raio é diretamente proporcional a energia cinética clássica [DUCATTI 2008], [TIPLER 1999].

$$r = \frac{mv^2}{qE} \quad (4)$$

A maioria dos instrumento emprega um simples analisador magnético (B) para separar os diversos feixes iônicos, correspondente aos diferentes feixes isotópicos (Figura 2, parte c). As partículas carregadas, ao se movimentarem através do campo magnético, sofrem a ação da força magnética (Equação 2), responsável pela força centrípeta. Pela ortogonalidade do campo B , os íons sofrem trajetória de raio r , expressa pela Equação 5 [DUCATTI 2008], [TIPLER 1999].

$$r = \frac{mv}{qB} \quad (5)$$

Assim procedendo, cria a condição de focalização pelo momento, ou seja, partículas com a mesma carga q e mesmo momento movem-se com o mesmo raio de curvatura, enquanto que os demais com diferentes valores definem trajetórias distintas. Torna-se comum utilizar a Equação 1, que expressa a diferença de potencial V aplicada, e o campo magnético utilizado (B) para obter a relação $\frac{\text{massa}}{\text{carga}}$, através da Equação 6 [HALLYDAY 2003], [TIPLER 1999].

$$r = \sqrt{\frac{2Vm}{B^2q}} \quad (6)$$

Dessa forma, o íon isotópico de maior massa apresenta maior raio de deflexão.

2.3 Método de preparo de amostra e do padrão

No sistema de admissão, os isótopos dos elementos a serem analisados (C, H, O, N, S) são introduzidos na forma gasosa (CO_2, H_2, N_2, SO_2). O preparo destes gases pode ser acoplado diretamente ao equipamento (*on-line*) ou preparado antecipadamente (*off-line*) [DUCATTI 2008], [TRAVER et al. 2008].

A instrumentação básica tem sido continuamente refinada para a análise de uma simples amostra gasosa. A matriz orgânica ou inorgânica é destruída por diversos métodos, dependendo do gás necessário para a análise isotópica. No método de preparo *off-line*, os procedimentos utilizados para cada amostra exigem rigor e habilidade elevados. Normalmente, utiliza-se uma linha de alto vácuo *off-line*, que consiste de uma bomba mecânica de duplo estágio, com a qual se obtém o pré-vácuo da ordem de $10^{-1}mbar$. Em série, utiliza-se de uma bomba difusora e *trap* (armadilha) de nitrogênio líquido, que complementam o sistema para a obtenção do alto vácuo da ordem de 10^{-2} a $10^{-3}mbar$, como pode ser observado na Figura 3 [DUCATTI 2008].

Os principais assessorios destas linhas são: manômetro de mercúrio, *trap* criogênico

de gelo seco moído com álcool (-96°C) para a retenção de moléculas de H_2O e *trap* criogênico de nitrogênio líquido (-196°C) para a retenção do CO_2 . Fornos de combustão (950°C) com CuO normalmente são utilizados na oxidação da matriz, assim como *traps* químicos são utilizados para a retenção de impurezas, que potencialmente afetam a análise isotópica [DUCATTI 2008].

Salienta-se que o método do preparo da amostra (secagem, moagem e homogeneização) é tão importante quanto à própria análise e a interpretação dos resultados.

Em função da necessidade de aumentar o número de análises sem a perda da precisão analítica, exigência das áreas biológicas, vários espectrômetros atuais já vêm acoplados com acessórios de preparo das amostras. Assim, estes equipamentos possuem método de preparo *on-line* que diminui consideravelmente o tempo de preparo da amostra.

Recentemente os métodos de preparo *on-line* estão sendo realizados no acoplamento direto do Analisador Elementar (como exemplo de acessório) com o espectrômetro de massas.

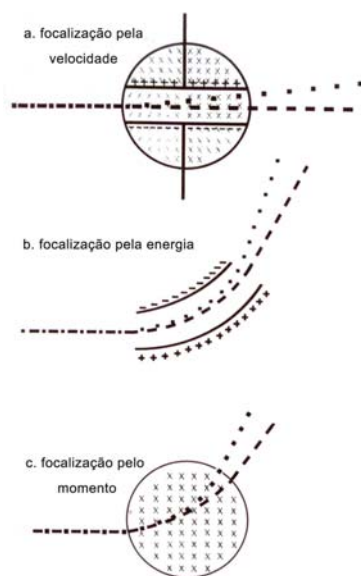


Figura 2: Condições de focalizações para a separação das massas dos feixes de íons dos isótopos pesados (traço) e leves (ponto). Campos elétricos (E) são designados pelas placas dos metais carregados (linhas com cargas positivas (+) e negativas (-)) e paralelos à página. Campos magnéticos (B) designados pela letra x são orientados perpendicularmente à página (penetrando) [CRISS 1999].

2.4 Linguagem Analítica

Nas diversas áreas científicas que utilizam os isótopos estáveis dos bioelementos, o espectrômetro de massa fornece duas linguagens analíticas: abundância isotópica (átomos %) e enriquecimento isotópico relativo (delta per mil) [GROOT 2004], [DUCATTI 2008].

Na Equação 7, que define a abundância ou concentração isotópica, o símbolo [] pode indicar o número de mols (neste caso R_i identifica-se com a fração molar, massa, etc), e a somatória é feita sobre todas as espécies isotópicas presentes. Como exemplo, a concentração do carbono-13 na molécula de $^{13}\text{CO}_2$ enriquecida expressa-se pela Equação 8.

$$R_i = \frac{A_i}{\sum A_j} \quad (7)$$

$$\text{atomos\%}^{13}\text{C} = \frac{[^{13}\text{CO}_2]}{[^{12}\text{CO}_2] + [^{13}\text{CO}_2]} 100 \quad (8)$$

Substratos enriquecidos individualmente com ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , ^2H , ^{34}S podem ser adquiridos desde baixa a alta concentração (2 a 99 átomos%), assim como em qualquer composto, desde as moléculas mais simples como as complexas e em qualquer posição da estrutura molecular.

A determinação absoluta da razão isotópica, dada pela Equação 9, limita-se a poucos estudos isotópicos, com ênfase nas medidas dos padrões isotópicos e de interesse geofísico, geoquímico e hidrológico [DUCATTI 2008].

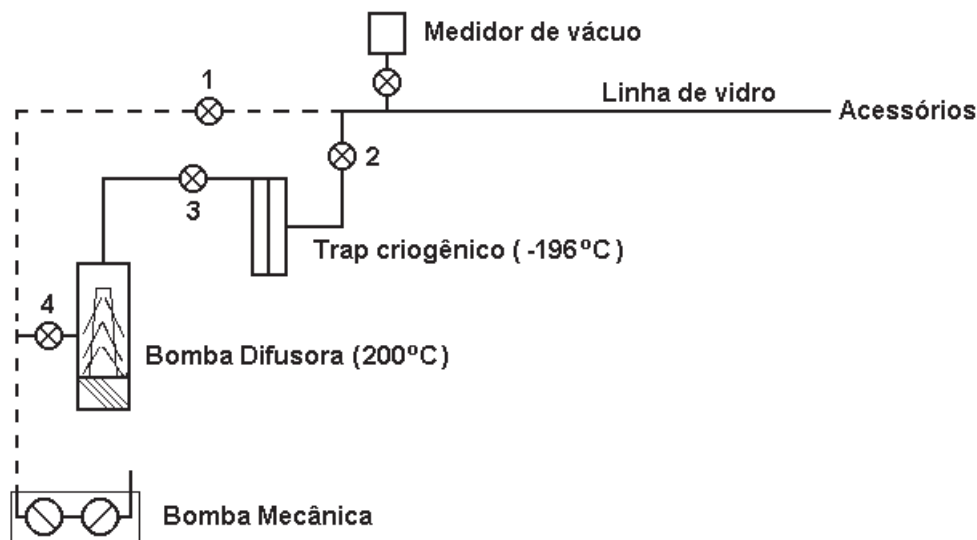


Figura 3: Esquema geral da linha de alto vácuo. FONTE: [DUCATTI 2008].

$$r_i = \frac{A_i}{\sum A_m} \quad (9)$$

O maior interesse e o maior número das análises referem-se as determinações das diferenças das razões isotópicas, comparativamente ao do padrão. Este tipo de análise, conhecida como análise relativa ou análise do delta (δ), permite precisão da ordem de 0,2 per mil ou menor [GROOT 2004].

As medidas precisas destas diferenças isotópicas requerem tipo especial de espectrômetro de massas, que apresenta um sistema duplo de entrada (*dual inlet system*). Nestes equipamentos, a amostra gasosa é admitida de um lado e o gás padrão do outro lado do sistema de entrada. Após equalizarem as pressões, medidas alternativas (amostra versus padrão) são realizadas automaticamente pelo sistema de válvulas de troca (*changeover valve*) [MARCHINI 1997].

A alta precisão alcançada ($\leq 0,2$ per mil) é devido a diversos fatores, dentre eles: a medida de dois ou três feixes iônicos de interesse nos coletores (*cup Faraday*) e a medida repetitiva (aproximadamente 08 ciclos de repetições) das razões isotópicas dos gases, da amostra e do padrão, durante uma simples análise. A medida relativa, expressa na terminologia delta (δ), como enriquecimento isotópico relativo, é calculada através da expressão adimensional demonstrada pela Equação 10, na qual, r é a 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. Como os valores numéricos das diferenças são pequenos, costuma-se multiplicar e dividir a expressão por 1000, obtendo-se a terminologia em delta per mil [δ per mil (amostra, padrão)] [MARCHINI 1997].

$$\delta(\text{amostra}, \text{padrao}) = \frac{r_{\text{amostra}} - r_{\text{padrao}}}{r_{\text{padrao}}} \quad (10)$$

Normalmente os valores dos deltas são correlacionados aos padrões isotópicos internacionais, os quais foram escolhidos arbitrariamente como padrões isotópicos primários ($\delta = 0 \text{ permil}$).

Para os isótopos estáveis do hidrogênio, o padrão internacional é o *Vienna Standard Mean Ocean Water*, abreviadamente V-SMOW, cujas razões isotópicas absolutas estão explícitas na Tabela 4. Para os isótopos estáveis do nitrogênio, o padrão aceito é o ar atmosférico, no qual é considerada uma mistura isotópica homogênea dos gases da superfície terrestre. Para os isótopos estáveis do carbono, o padrão é o *Cretaceous carbonate fossil Belemnite americana*, da formação *Peedee* da Carolina do Sul/USA, abreviadamente V-PDB. Para os isótopos estáveis do enxofre, o padrão considerado é o mineral troilita do meteorito *Cañon Diable*, abreviadamente CDT. Conforme Tabela 4, os padrões isotópicos do oxigênio podem ser o V-PDB ou V-SMOW, dependendo da sua aplicação [MARCHINI 1997].

Tabela 4: Padrões isotópicos primários ($\delta = 0$ per mil). Razão isotópica absoluta dos padrões internacionais.

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

FONTE: [DUCATTI 2008].

2.5 Turnover

Os constituintes corporais encontram-se em estado dinâmico, sendo continuamente formados e utilizados para diferentes propósitos. Esse processo é geralmente chamado turnover. Todas as substâncias do corpo sejam elas metabólitos orgânicos ou inorgânicos, estão sujeitas ao turnover [RODWELL 1990], [DUCATTI, CARRIJO e PEZZATO 2002].

Em um homem adulto saudável, a taxa diária de renovação normal das proteínas representa 1 a 2% do total das proteínas corporais. Essa renovação resulta predominantemente da degradação de proteínas musculares a aminoácidos. Em torno de 75 a 80% dos aminoácidos liberados da degradação protéica tecidual são reutilizados para síntese de novas proteínas, e o restante é metabolizado a nitrogênio, glicose, e/ou dióxido de carbono [RODWELL 1990].

A aplicação futura de metodologias envolvendo variação natural da abundância de isótopos estáveis em estudos de nutrição e fisiologia animal deve ser estimulada em função de vantagens sanitárias, ambientais e econômicas, bem como pela possibilidade de desenvolvimento de novos modelos que contemplem detalhes das taxas de aquisição, síntese, degradação e destino dos nutrientes nos diversos tecidos animais [RODWELL 1990],

[DUCATTI, CARRIJO e PEZZATO 2002].

3 Aplicações de Isótopos Estáveis

Uma das aplicações mais importantes relaciona-se com análises orgânicas, como, por exemplo, na determinação do peso molecular, a partir de quantidades diminutas do analisado, sempre que for necessário elucidar a estrutura química do composto alvo. Este método tornou-se importante na detecção de concentrações traçadoras de compostos orgânicos no sangue, urina, gás expirado e outros fluidos biológicos. Ele pode fornecer informações, relacionando o diagnóstico de doenças e contribuindo com o seu entendimento patofisiológico.

As aplicações na saúde incluem o diagnóstico de doenças que alteram o metabolismo de ácidos orgânicos, como, por exemplo, os aminoácidos, e, simultaneamente, análises multicomportamentais, que se mostraram úteis na identificação de vias metabólicas anormais (estudo do metabolismo protéico, de hidratos de carbonos e de lipídeos). Assim, são passíveis de serem estudados os ácidos orgânicos, como, por exemplo, os ácidos metilmalônico (aciduria metilmalônica) e fenilacético (fenilcetonúria); ácidos graxos de cadeia curta; compostos orgânicos voláteis, como as cetonas e aldeídos; polióis; aminas; prostaglandinas; esteróides; ácidos biliares; constituintes dos ácidos nucleicos e aminoácidos.

Nos pacientes urêmicos, por meio de espectrometria de massa, é possível demonstrar, no sangue, por exemplo, a presença de ácidos orgânicos, como o ácido eritrônico, ácido 2-deoxieritropentônico, ácido tartárico, ácido glicérico, ácido 2-metilglicérico, ácido vanílico, compostos voláteis, fenóis, polióis e esteróides. Nos pacientes diabéticos, por exemplo, no soro e/ou urina, ácidos orgânicos, ácido succínico, ácido adípico, ácido láctico, ácido 2-cetobutírico, ácido 3-hidroxyoctanedicarboxílico, compostos voláteis, 1-etanol, 1-octanol, demetiletilpirazina.

Na doença de Parkinson, por exemplo, estudo do metabolismo do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, da 1,2,3,4-tetrahidroisoquinoline, da L-Dopa e das catecolaminas.

Nas doenças hepáticas, por exemplo, metabolismo dos ácidos biliares e do colesterol, nos erros inatos do metabolismo, além do estudo de possíveis toxinas relacionadas com a encefalopatia hepática.

Uma das aplicações que elucida o poder analítico do uso de isótopos estáveis, está diretamente relacionada com a medida de tempo de trânsito intestinal e no diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori*, que está presente no estômago da maioria dos pacientes portadores úlcera duodenal.

Esta aplicação foi apresentada no Brasil através do Laboratório de Espectrometria de

Massa do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Para seu diagnóstico são utilizados: técnicas de histopatologia, o teste da urease e testes respiratórios (UBT) com uréia marcada com o isótopo radioativo (^{14}C) ou do estável (^{13}C).

Este trabalho teve por objetivos: 1) realizar o UBT como procedimento diagnóstico da presença de *Helicobacter pylori* utilizando isótopo estável; 2) comparar os resultados com os obtidos por meio da urease, histopatologia (considerados padrão-ouro) e UBT com ^{14}C -uréia. Foram avaliados 54 pacientes com idades entre 30 e 55, sendo 25 mulheres.

Neste estudo, o UBT com ^{13}C -uréia foi prático, adequado, de fácil execução e inócuo, recomendando este procedimento diagnóstico na suspeita da presença do *Helicobacter pylori* em adultos e crianças, independente do sexo ou condição fisiopatológica.

Além do Laboratório de Espectrometria de Massa do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, o Centro de Isótopos Ambientais da UNESP de Botucatu, possui toda a infra-estrutura básica necessária para a realização de testes como esse, além de profissionais com grande experiência no trabalho com animais e pesquisadores diretamente ligados a trabalhos com humanos no câmpus que esta inserido.

4 Referências Bibliográficas

Referências

- [ATKINS 2001]ATKINS, P. *Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente*. [S.l.]: Bookman, 2001.
- [CASTRO et al. 2004]CASTRO, A. et al. Urea breath test for the detection of helicobacter pylori using a stable isotope. *Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 40, n. 2, p. 63–7, Abr 2004.
- [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.
- [DUCATTI, CARRIJO e PEZZATO 2002]DUCATTI, C.; CARRIJO, A.; PEZZATO, A. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono 13 em tecidos de mamíferos e aves. *Sci. Agric.*, n. 59, p. 29–33, 2002.
- [EISBERG e RESNICK 1979]EISBERG, R. .; RESNICK, R. *Física Quântica. Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas*. [S.l.]: Campus, 1979.
- [FAURE e MENSING 2005]FAURE, G.; MENSING, T. Isotopes Principles and Applications. *New Jersey: John Wiley & Sons*, p. 897, 2005.
- [FRANCO et al. 2004]FRANCO, M. et al. *Métodos de Espectrometria de Massa em Nutrição Humana*. [S.l.: s.n.], 2004.
- [GROOT 2004]GROOT, P. *Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques*. [S.l.: s.n.], 2004.
- [HALLYDAY 2003]HALLYDAY. *Fundamentos de Física - Eletromagnetismo 3.6*. ed. [S.l.: s.n.], 2003.
- [JAMES e GERARD 1986]JAMES, E. B.; GERARD, E. H. *Química Geral*. 2. ed. [S.l.: s.n.], 1986.
- [MARCHINI 1997]MARCHINI, J. Utilização de espectrometria de massa para o estudo do metabolismo protéico e aminoacídico, em medicina. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 30, p. 494–507, Out/Dez 1997.
- [MENAND et al. 1997]MENAND, C. et al. Determination of low enrichments ^{13}C -glutamine using gas chromatographycombustionisotope ratio mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 32, p. 1094–1099, 1997.

- [PRESTON 1992]PRESTON, T. The measurament of stable isotope natural abundance variations. p. 1091–1097, Dez 1992.
- [RODWELL 1990]RODWELL, V. *Catabolismo do nitrogênio dos aminoácidos*. [S.l.: s.n.], 1990.
- [TIPLER 1999]TIPLER, P. *Eletricidade e Magnetismo, Ótica*. 4. ed. [S.l.: s.n.], 1999.
- [TRAVER et al. 2008]TRAVER, L. et al. Deuterium equilibrium time in saliva of newborn infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2008.
- [WOLFE e CHINKES 1992]WOLFE, R. R.; CHINKES, D. L. *Isotope tracers in metabolic research: Principles and practices of kinetic analysis*. [S.l.: s.n.], 1992.