

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP

Instituto de Biociências de Botucatu-IBB

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Adequação do método de destilação criogênica a
vácuo para análise isotópica de amostras de urina
pela técnica HTC-IRMS**

Lucas Moreira de Campos Pinto

Botucatu-SP

Fevereiro, 2017

Adequação do método de destilação criogênica a vácuo para análise isotópica de amostras de urina pela técnica HTC-IRMS

Lucas Moreira de Campos Pinto

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista – IBB/UNESP, para obtenção do título de mestre.

Orientador

Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa

Centro de Isótopos Estáveis “Prof. Dr. Carlos Ducatti” – IBB/UNESP

Botucatu-SP

Fevereiro, 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pinto, Lucas Moreira de Campos.

Adequação do método de destilação criogênica a vácuo para análise isotópica de amostras de urina pela técnica HTC-IRMS / Lucas Moreira de Campos Pinto. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vladimir Eliodoro Costa
Capes: 90400003

1. Destilação. 2. Isótopos estáveis. 3. Pirólise.
4. Urina - Análise.

Palavras-chave: Água duplamente marcada; Destilação; Isótopos estáveis; Pirólise.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa
Centro de Isótopos Estáveis “Prof. Dr. Carlos Ducatti” – IBB/UNESP
Orientador

Prof. Dr. Marcelo Zacharias Moreira
Laboratório de Ecologia Isotópica – CENA/USP
Membro Titular

Prof. Dr. Gustavo Rocha de Castro
Departamento de Química e Bioquímica – IBB/UNESP
Membro Titular

Prof. Dr. Maria Márcia Pereira Sartori
Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – FCA/UNESP
Membro Suplente

Prof. Dr. Joel Mesa Hormaza
Departamento de Física e Biofísica – IBB/UNESP
Membro Suplente

*Ao meu mestre e amigo, Professor Carlos
Ducatti†, um exemplo de dedicação e amor
à ciência e à arte de ensinar.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mauricio e Elma, e ao meu irmão, Leandro, por todo o carinho, apoio e pela confiança depositada;

Ao Professor Vladimir que me acolheu entre seus alunos de maneira calorosa, e me aconselhou nos momentos de vacilo;

Aos meus familiares (avós, tios e primos), por quem possuo grande apreço;

À minha amiga Gabriela, pessoa especial com quem dividi muitas das experiências, boas e ruins, dos anos dedicados a essa pesquisa;

Aos meus amigos da república Grão de Boi que, ao longo dos anos, se tornaram verdadeiros irmãos na caminhada rumo à felicidade;

Aos meus colegas do Centro de Isótopos Estáveis “Prof. Dr. Carlos Ducatti”, principalmente à Michelle, sem a qual esse trabalho não seria possível;

Aos funcionários do Centro por criar um ambiente de fácil convívio e companheirismo, principalmente ao Evandro e ao Edson, pela colaboração nos experimentos, e à Mariana, pela prontidão em ajudar;

Aos professores Marcelo Zacharias Moreira, Gustavo Rocha de Castro e Maria Márcia Pereira Sartori, pelas fantásticas contribuições;

A todos os amigos que, de forma direta ou indireta, participaram dessa etapa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa de Mestrado;

Enfim, a todos os seres de bem que enviaram boas vibrações para o desenvolvimento dessa pesquisa.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	07
ÍNDICE DE TABELAS	08
ÍNDICE DE FIGURAS	09
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
2. INTRODUÇÃO	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1. Isótopos estáveis.....	14
3.2. Água duplamente marcada	15
3.3. Gasto energético total (GET).....	18
3.4. Destilação	19
3.5. HTC-IRMS.....	20
3.6. Efeito de memória	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Delineamento experimental	23
4.2. Método de destilação criogênica a vácuo	24
4.2.1. Descrição do aparato de destilação criogênica a vácuo	25
4.3. Validação da destilação.....	28
4.4. Avaliação do efeito de memória	31
5. RESULTADOS	34
6. DISCUSSÃO	39
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
8. CONCLUSÃO.....	43
9. REFERÊNCIAS	43

1. RESUMO

O projeto de pesquisa para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, desenvolvido no Centro de Isótopos Estáveis “Prof. Dr. Carlos Ducatti”, visou adequar um método de destilação criogênica a vácuo à espectrometria de massas de razão isotópica por decomposição sob alta temperatura (HTC-IRMS, do inglês *High Temperature Conversion - Isotope Ratio Mass Spectrometry*), utilizada na metodologia da água duplamente marcada, para determinar a necessidade energética (em kcal d⁻¹) de indivíduos. Os resultados mostraram que o método de destilação criogênica a vácuo é adequado para extrair 1,5 mL de água de amostras de urina, sem causar fracionamento isotópico, em 32min e 32s; além disso, mostraram que alguns cuidados, como o planejamento da ordem das análises do experimento de água duplamente marcada, devem ser adotados visando atenuar o efeito de memória. Concluimos que a utilização do método de destilação para o preparo das amostras de urina, em conjunto com um protocolo específico de análises em espectrômetro de massa, garante um menor efeito de memória na técnica HTC-IRMS.

Palavras-chave: isótopos estáveis; deutério; oxigênio-18; pirólise.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Abundâncias naturais dos isótopos estáveis dos elementos C, H, O e N.	15
Tabela 2. Descrição dos experimentos de validação do método de destilação	23
Tabela 3. Amostras utilizadas no Protocolo #2 (análise das amostras em ordem crescente de enriquecimento esperado) divididas por grupo de enriquecimento..	33
Tabela 4. Condutividade elétrica das amostras de água não destiladas e destiladas pelo método de destilação criogênica a vácuo. Apresentados os valores de média e desvio padrão (N = 6).....	34
Tabela 5. Valores de enriquecimento relativo isotópico de hidrogênio (δ^2H) e de oxigênio ($\delta^{18}O$) de amostras de água de torneira (AT) não destiladas e destiladas pelo método de destilação criogênica a vácuo. Valores expressos pela média, acompanhada do desvio padrão (N = 15).....	34
Tabela 6. Valores de enriquecimento relativo isotópico de hidrogênio (δ^2H) de amostras de água de torneira (não enriquecida) e água enriquecida, destiladas simultaneamente pelo método de destilação criogênica a vácuo. Valores expressos em média e desvio padrão (N = 5).	35
Tabela 7. Valores de enriquecimento relativo isotópico de oxigênio ($\delta^{18}O$) de amostras de água de torneira destiladas, pelo método de destilação criogênica a vácuo, anteriormente (AT ₁) e posteriormente (AT ₂) à destilação de uma água enriquecida ($\delta^{18}O = 3188,29 \pm 87,92 \text{ ‰}$). Valores expressos em média e desvio padrão (N = 10).	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectrômetro de massa de razão isotópica de decomposição sob alta temperatura.....	20
Figura 2. Esquema do reator de “pirólise”. Adaptado de [DE GROOT, 2009]...	21
Figura 3. Aparato de destilação criogênica a vácuo.....	24
Figura 4. Desenho esquemático do aparato de destilação criogênica a vácuo. 1- Bomba mecânica; 2- bomba difusora; 3- medidor de pressão “ <i>Edwards APG-M-NW16</i> ”; 4- flautas de vidro; 5- cilindro de N ₂ ultrapuro; 6- balão volumétrico contendo a amostra não destilada; 7- frasco coletor; 8- nitrogênio líquido (-196 °C)	25
Figura 5. Bomba mecânica utilizada na destilação	26
Figura 6. Bomba difusora utilizada na destilação	26
Figura 7. Flauta de vidro com seus cinco bocais	27
Figura 8. Unidade de destilação. Saída dupla de um bocal da flauta com acopladores de teflon. As unidades possuem válvulas individuais.....	27
Figura 9. Destilação criogênica a vácuo. O nitrogênio líquido envolvendo o frasco coletor cria uma armadilha criogênica	27
Figura 10. Cilindro contendo gás nitrogênio ultrapuro.....	28
Figura 11. Frasco contendo tampas com septo	28
Figura 12. Valores de enriquecimento relativo isotópico ($\delta^{18}O$) de dez amostras de urina, destiladas pelo método de destilação criogênica a vácuo, representados em função do tempo de destilação. Valores apresentados em forma de média e desvio padrão. A curva ajustada é uma exponencial de 1ª ordem, e o tempo necessário para destilar 99% do conteúdo de água foi $t = 32,54$ min.	36

Figura 13. Comparação dos valores de enriquecimento relativo isotópico transformado de hidrogênio (δ^2H_{transf} ; a) e de oxigênio ($\delta^{18}O_{transf}$; b), em função do tempo, entre protocolos de análise de amostras de urina por HTC-IRMS (N = 20). Protocolo 1: ordem de análise igual à ordem cronológica de coleta das amostras; Protocolo 2: ordem de análise considerou o grau de enriquecimento esperado para as amostras de cada dia. Valores apresentados em forma de média e desvio padrão.....38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2H_2O – Água deuterada;

δ^2H – Enriquecimento relativo isotópico de deutério;

δ^2H_{transf} – δ^2H transformado;

$\delta^{18}O$ – Enriquecimento relativo isotópico de oxigênio-18;

$\delta^{18}O_{transf}$ – $\delta^{18}O$ transformado;

AE – Água enriquecida;

AM – Água mineral commercial;

AT – Água de torneira;

CRDS – *Cavity ring-down spectroscopy*;

F – Taxa de progresso da reação;

FTIR – *Fourier transform Infrared spectroscopy*;

GET – Gasto energético total;

$H_2^{18}O$ – Água rica em oxigênio-18;

HTC-IRMS – *Isotope ratio mass spectrometry by high temperature conversion*;

IAEA – *International atomic energy agency*;

IRMS – *Isotope ratio mass spectrometry*;

k_H – Taxa de troca de deutério;

k_O – Taxa de troca de oxigênio-18;

N – Tamanho do *pool* corporal de água;

QR – Quociente respiratório;

R_a – Razão isotópica da amostra;

rCO_2 – Taxa de produção de dióxido de carbono;

rH_2O – Taxa de perda de água;

R_{std} – Razão isotópica do padrão internacional;

SLAP – *Standard light Antartic precipitation*;

VSMOW – *Vienna standard mean ocean water*.

2. INTRODUÇÃO

O interesse em avaliar a composição de isótopos estáveis de amostras de urina está na aplicação da metodologia da água duplamente marcada, considerada “padrão ouro” na determinação do gasto energético total de indivíduos (BURROWS *et al.*, 2010).

A metodologia envolve a ingestão, pelo indivíduo, de dois compostos enriquecidos, ou traçadores: água deuterada ($^2\text{H}_2\text{O}$) e água rica em oxigênio-18 (H_2^{18}O). Os traçadores são misturados em doses extremamente precisas, de acordo com a água corporal total do indivíduo para avaliar seu gasto energético total (IAEA, 2009).

Apesar de conceitualmente simples, a metodologia de água duplamente marcada possui variadas técnicas de análise da razão isotópica da água, entre as quais, as mais utilizadas são: espectroscopia de infravermelho (FTIR, do inglês *Fourier Transform InfraRed*) e de cavidade (CRDS, do inglês *Cavity Ring-Down Spectroscopy*), e a espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS, do inglês *Isotope Ratio Mass Spectrometry*) (IAEA, 2009). A IRMS é a técnica mais versátil para análise de isótopos estáveis. Devido ao fato de a IRMS analisar apenas gases, os diferentes espectrômetros de massa podem ser classificados em duas formas de preparo desses gases.

O preparo pode ser *off-line*, ou seja, os gases são gerados externamente ao equipamento de IRMS, e.g. preparo por redução por zinco ou preparo por equilíbrio (IAEA, 2009). Além disso, o preparo pode ser feito *on-line*, onde os gases são gerados no próprio sistema de IRMS de fluxo contínuo, e.g. redução por cromo ou pelo método de “pirólise”.

A técnica de “pirólise”, ou de decomposição sob alta temperatura (HTC-IRMS), é baseada na reação de Schütze-Unterzaucher, que ocorre com a água na presença de carbono a temperaturas elevadas.

Porém, as amostras obtidas na metodologia de água duplamente marcada são, geralmente, de urina. Portanto, na HTC-IRMS é necessário tratá-las para a obtenção da água pura da urina (PIPER *et al.*, 2014). Esse tratamento evita que moléculas provenientes da fase sólida afetem a análise isotópica de forma desconhecida, além de prevenir problemas de ordem prática, como o entupimento da seringa de injeção ou a contaminação do sistema interno do equipamento (GUIDOTTI *et al.*, 2013). O método convencional de extração da água de compostos para análise de isótopos estáveis é a destilação (ORLOWSKI *et al.*, 2013). Um método de destilação específico, utilizado na área de hidrologia, é a destilação criogênica a vácuo, que pode ser adaptado à extração da água de amostras de urina (GUIDOTTI *et al.*, 2013).

Devido à alta sensibilidade de detecção do sistema de IRMS e à ampla variação nos valores de enriquecimento das amostras, os resultados estão sujeitos a alterações isotópicas, descritas como efeito de memória (HORITA & KENDALL, 2004). As causas desse efeito devem estar relacionadas às características físicas e químicas da água, que a tornam uma molécula de fácil adsorção (MORSE *et al.*, 1993).

A HTC-IRMS é vantajosa devido ao seu nível de automatização, que requer poucas manipulações nas amostras antes de serem analisadas. Porém, ainda não há consenso de como conduzir as análises, principalmente, como proceder com a extração da água da urina e como evitar o efeito de memória.

Nesse trabalho, o objetivo foi de validar a utilização de um método específico de destilação criogênica a vácuo para extrair a água de amostras de urina para análises de razão isotópica de água duplamente marcada por HTC-IRMS. Além disso, determinar um protocolo de rotina para essas análises de forma a atenuar o efeito de memória.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Isótopos estáveis

Para se entender a visão geral dos isótopos estáveis, é necessária a compreensão do modelo atômico proposto por Niels Bohr em 1913, que é o mais aproximado do modelo quântico mecânico, porém, mais simples (TIPLER & LLEWELLYN, 2010). O modelo postulado por Bohr prevê a mobilidade do elétron, separadamente do núcleo positivo, em órbitas circulares estáveis chamadas de estados estacionários. Nesse modelo, o núcleo é composto de prótons e nêutrons e confere massa ao átomo, enquanto a região que compreende os elétrons é chamada eletrosfera.

A massa atômica (A) é a soma das quantidades de prótons (Z) e nêutrons (N), ou seja, $A = Z + N$ (TIPLER & LLEWELLYN, 2010). A partir disso, é possível definir isótopos: são átomos que apresentam o mesmo número de prótons e diferentes números de nêutrons, portanto, massas atômicas diferentes. Por isso, as eventuais diferenças serão muito menores em relação às observáveis entre elementos distintos, mesmo quando pertencentes a um mesmo grupo químico. Os isótopos podem ser radioativos ou estáveis – que não emitem radiação (SHARP, 2007). A notação usual para o isótopo de um elemento químico (X) é AX (TIPLER & LLEWELLYN, 2010).

A diferença em suas massas torna possível a quantificação dos isótopos de determinada amostra a partir de técnicas específicas, principalmente, a IRMS (WOLFE & CHINKES, 2005). Em termos de matéria orgânica, os elementos químicos predominantes são o carbono, o hidrogênio, o oxigênio e o nitrogênio (CHON), e seus isótopos ocorrem naturalmente. A abundância dos isótopos estáveis destes pode ser observada na Tabela 1 (PRESTON, 1992).

Tabela 1. Abundâncias naturais dos isótopos estáveis dos elementos C, H, O e N.

Elemento químico	Isótopo estável	Abundância (átomos %)
Hidrogênio	^1H	99,9844
	^2H (deutério)	0,0156
Carbono	^{12}C	98,8890
	^{13}C	1,1110
Nitrogênio	^{14}N	99,6340
	^{15}N	0,3660
Oxigênio	^{16}O	99,7628
	^{17}O	0,0372
	^{18}O	0,2000

O interesse em isótopos estáveis prevalece sobre os radioativos devido à sua inocuidade, fato que permite a aplicação em grupos de risco, como idosos e recém-nascidos (IAEA, 2009). Além das análises de abundância natural, surgiram aplicações do conceito de isótopos relativamente enriquecidos, ou traçadores. A utilização de um traçador isotópico consiste, primariamente, na marcação de uma molécula, ou composto, através da adição de um isótopo menos abundante para torná-la enriquecida em relação à abundância natural (WOLFE & CHINKES, 2005). Pode-se exemplificar tal marcação com a produção de $^2\text{H}_2\text{O}$ através de destilação fracionada (MILLER, 2001), disponível comercialmente em concentrações de até 99 átomos % (FERRIOLLI, 2006).

3.2. Água duplamente marcada

A metodologia de água duplamente marcada foi idealizada no início da década de 1950 por Lifson e colaboradores, em dois experimentos. No primeiro, verificaram o rápido equilíbrio entre as moléculas de oxigênio presentes na água corporal e no dióxido de carbono produzido na respiração (CO_2 respiratório) (LIFSON *et al.*, 1949). No

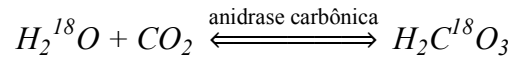
segundo, utilizaram água enriquecida com os isótopos pesados de hidrogênio e oxigênio (^2H e ^{18}O , respectivamente) para calcular a produção de CO_2 em ratos (LIFSON *et al.*, 1955).

Porém, apesar de ser promissora, a metodologia perdeu espaço no cenário científico devido à falta de sensibilidade e acurácia dos equipamentos da época, que necessitavam de um alto grau de enriquecimento para a detecção correta do traçador, tornando a técnica inviável economicamente (IDECG WORKING GROUP, 1990). Então, em meados da década de 1970, com o avanço tecnológico foi possível retomar as pesquisas utilizando isótopos estáveis como traçadores metabólicos *in vivo* (WOLFE & CHINKES, 2005). A partir disso, surgiram inúmeros estudos com água duplamente marcada. Primeiro com animais (NAGY, 1980; WILLIAMS & NAGY, 1984; SPEAKMAN & RACEY, 1988) e, logo em seguida, com humanos (PRENTICE, 1985; SCHOELLER, 1988). Sua utilização se estendeu até os dias de hoje (PIPER *et al.*, 2014; PONTZER *et al.*, 2016; SAGAYAMA *et al.*, 2016) e, apesar de ser constantemente aprimorada, a metodologia possui conceitos básicos bem estabelecidos.

Basicamente, a metodologia consiste em enriquecer a água corporal com uma dose única de água marcada com ^2H e ^{18}O e, então, determinar a cinética de eliminação dos isótopos estáveis dos dois elementos à medida que suas concentrações se reaproximem da abundância natural (IAEA, 2009). Isso é possível porque a água enriquecida se equilibra rapidamente com a água corporal. Além disso, pelo fato de o organismo apresentar um equilíbrio dinâmico, onde, apesar das constantes trocas, a concentração de água permanece constante em condições saudáveis (FERRIOLLI, 2006).

A necessidade de se utilizar ambos os isótopos na aplicação da metodologia é justificada pelo fato de que o hidrogênio é eliminado exclusivamente na forma de água,

enquanto o oxigênio é eliminado, também, na forma de CO₂ respiratório (IDECG WORKING GROUP, 1990). Isso ocorre porque, fisiologicamente, o oxigênio da água corporal está em constante equilíbrio com o CO₂ respiratório (LIFSON *et al.*, 1949). Tal equilíbrio se inicia no ciclo do ácido cítrico, onde há inserção de água nas moléculas provenientes da glicose para possibilitar a formação de íons H⁺ e gás CO₂ (NELSON & COX, 2013). Porém, é na corrente sanguínea que a troca atinge seu ápice, onde a água reage com o CO₂ produzido na respiração celular formando ácido carbônico por meio da ação da enzima anidrase carbônica, que catalisa o seguinte equilíbrio (IDECG WORKING GROUP, 1990; WOLFE & CHINKES, 2005):



Portanto, a taxa de troca (ou *turnover*) do ¹⁸O será maior em relação à do ²H (IDECG WORKING GROUP, 1990; IAEA, 2009). Isso pode ser matematicamente descrito, considerando um único *pool* de água corporal, pelas equações (WOLFE & CHINKES, 2005):

$$rH_2O = k_H \cdot N \quad (1)$$

$$rH_2O + 2rCO_2 = k_O \cdot N \quad (2)$$

Onde rH_2O e rCO_2 são, respectivamente, as taxas de perda de água e de produção de dióxido de carbono. k_H e k_O são as taxas de troca do ²H e do ¹⁸O, respectivamente. E N é o número de moléculas de água no corpo, ou seja, o tamanho do *pool* de água corporal (WOLFE & CHINKES, 2005). Substituindo (1) em (2), é possível obter a taxa de produção de CO₂, denotada por:

$$rCO_2 = \frac{N}{2} \cdot (k_O - k_H) \quad (3)$$

Portanto, a diferença entre as taxas de eliminação do ^{18}O e do 2H resulta na produção de CO_2 . Porém, para relacionar a produção de CO_2 com o gasto energético total, devem ser levados em consideração outros fatores: a diferença no espaço de diluição entre hidrogênio e oxigênio em relação à água corporal, e a ocorrência de fracionamentos isotópicos no processo de evaporação (perda de água na forma de vapor), que afeta ambas as concentrações relativas de 2H e ^{18}O , e no processo de equilíbrio entre água e CO_2 respiratório, que afeta apenas a concentração relativa de ^{18}O (WOLFE & CHINKES, 2005).

3.3. Gasto energético total (GET)

O cálculo do gasto energético total (*GET*), em quilocalorias por dia ($kcal\ d^{-1}$), é feito, a partir de rCO_2 ($L\ d^{-1}$), pela equação de DeWeir (WOLFE & CHINKES, 2005):

$$GET = 3,9 \cdot \frac{rCO_2}{QR} + 1,11 \cdot rCO_2 \quad (4)$$

Onde *QR* é o quociente respiratório (WOLFE & CHINKES, 2005), determinado pela razão entre CO_2 produzido e O_2 consumido (IOM, 2005), e está relacionado ao quociente alimentar (BLACK *et al.*, 1986). O valor de *QR* está usualmente entre 0,85 e 0,86, porém, deve-se considerar um valor representativo da dieta local (IAEA, 2009).

3.4. Destilação

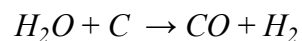
A extração da água da urina é indispensável às amostras que serão inseridas no reator de “pirólise”. Entre os meios de extração mais utilizados estão a filtragem (SAGAYAMA *et al.*, 2016) e a destilação (GUIDOTTI *et al.*, 2013; MOREHEN *et al.*, 2016). A destilação consiste na evaporação da fase líquida (volátil) de uma mistura e a posterior condensação da mesma em um coletor (ATKINS & JONES, 2010; VALANIDES, 2000). Sua utilização no preparo de amostras para análise isotópica já é adotada, além da urina, em amostras de vinho, para fins de rastreabilidade (DUTRA *et al.*, 2011). Porém, essa prática teve início na área de hidrologia (ORLOWSKI *et al.*, 2013), e é onde seu uso é mais disseminado.

Em hidrologia, alguns dos métodos de destilação existentes são: destilação criogênica a vácuo (GOEBEL & LASCANO, 2012), por fluxo de hélio (IGNATEV *et al.*, 2013) e destilação azeotrópica utilizando tolueno (INGRAHAM & SHADEL, 1992). A importância dos estudos realizados com tais métodos está em avaliar os parâmetros envolvidos no processo de extração (e.g. tempo ótimo do processo, existência de fracionamento isotópico), o que permite a comparação entre os mesmos.

Em se tratando de amostras de urina, o método que prevalece é a destilação criogênica a vácuo (GUIDOTTI *et al.*, 2013; MOREHEN *et al.*, 2016). Com sua crescente utilização surgiram diversos aparatos e procedimentos. Porém, nessa área, ela permanece pouco estudada. Por isso, se faz necessário testar se o método é adequado à extração de amostras dessa natureza, além de determinar os parâmetros envolvidos, especificamente.

3.5. HTC-IRMS

A reação de Schütze-Unterzaucher está descrita como (DE GROOT, 2009):



Essa reação ocorre no interior do reator de “pirólise” localizado no analisador elementar de um sistema IRMS de fluxo contínuo (Figura 1). O reator consiste de um tubo revestido internamente de carbono vitrificado com uma camada externa de óxido de alumínio (Figura 2). Para a água reagir com o carbono do tubo é necessária uma temperatura superior a 1400 °C (DE GROOT, 2009).



Figura 1. Espectrômetro de massa de razão isotópica de decomposição sob alta temperatura.

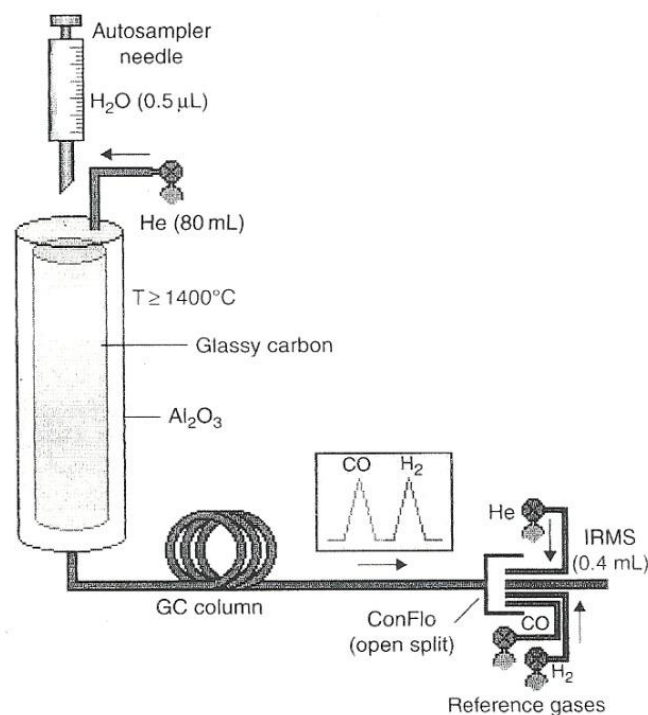


Figura 2. Esquema do reator de “pirólise”. Adaptado de [DE GROOT, 2009].

Após serem extraídas, as amostras de água resultantes são inseridas no reator de “pirólise”, onde se tornam gás hidrogênio (H_2) e monóxido de carbono (CO), que serão analisados no espectrômetro de massa (DE GROOT, 2009). No espectrômetro, os gases são ionizados por uma fonte de elétrons, sendo, em seguida, separados em feixes de íons pela ação de campos elétrico e magnético de acordo com sua relação carga/massa (BARRIE & PROSSER, 1996). Então, as concentrações das moléculas de diferentes carga/massa são determinadas pelas correntes elétricas geradas pelos feixes iônicos.

As concentrações das moléculas determinadas no espectrômetro de massa são processadas por software específico para gerar valores de razão isotópica que serão normalizados em enriquecimento relativo isotópico de hidrogênio (δ^2H) e de oxigênio ($\delta^{18}O$) pela relação (FRITZ & FONTES, 1980; SHARP, 2007):

$$\delta^A X(a, std) = \frac{(R_a - R_{std})}{R_{std}} \quad (5)$$

Onde $^A X$ é o isótopo mais pesado do elemento em questão (especificamente, 2H e ^{18}O), e R_a é a razão isotópica $^2H/^1H$ ou $^{18}O/^{16}O$ da amostra em relação à razão isotópica do padrão internacional R_{std} (SHARP, 2007). O valor obtido é multiplicado por mil e expresso em partes por mil (‰). A normalização dos dados em relação ao padrão, com valor arbitrariamente definido em 0,0‰, é importante para comparações inter-laboratoriais (NELSON, 2000). Os padrões internacionais utilizados para análises de hidrogênio e oxigênio são o VSMOW (*Vienna Standard Mean Ocean Water*) e o SLAP (*Standard Light Antartic Preciptation*).

Os resultados de δ^2H e $\delta^{18}O$ obtidos experimentalmente ao longo do tempo são utilizados para se determinar o *turnover* de ambos os isótopos (2H e ^{18}O) e o tamanho do *pool* de água corporal, que serão relacionados com a taxa de produção de CO_2 (WOLFE & CHINKES, 2005).

3.6. Efeito de memória

O efeito de memória (em inglês, *sample-to-sample memory*) é a variação na análise de uma amostra causada por contaminantes remanescentes de análises anteriores (HORITA & KENDALL, 2004). Quaisquer análises de amostras de água são propensas a esse tipo de efeito (MORSE *et al.*, 1993), porém, as análises realizadas em reator de “pirólise” são conhecidas por sofrer de grande efeito de memória (GUIDOTTI *et al.*, 2013).

Sabe-se que esse efeito não tem origem em uma única entidade, mas é causado por diversos *pools* (GUIDOTTI *et al.*, 2013), por isso a dificuldade em lidar com ele. Para evitá-lo são utilizados métodos matemáticos de correção (IAEA, 2009) e,

principalmente, alguns cuidados são tomados no protocolo de análises, como a lavagem da seringa de injeção e o emprego de múltiplas repetições na análise da mesma amostra, descartando as análises iniciais (GUIDOTTI *et al.*, 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

Para avaliar se o método de destilação criogênica a vácuo é adequado à extração da água de amostras de urina foi necessário realizar sua validação. Para tanto, realizamos cinco experimentos, descritos na Tabela 2. Após sua validação, aplicamos o método na análise de amostras de água duplamente marcada, visando avaliar o efeito de memória relacionado à técnica HTC-IRMS. Dessa forma, foi possível atestar a aplicabilidade da técnica na metodologia de água duplamente marcada em amostras de urina.

Tabela 2. Descrição dos experimentos de validação do método de destilação.

Exp.	Descrição	Amostra (N)	Volume por amostra
#1	Eficácia do processo de separação	AT (6), AT destilada (6) AM (6), AM destilada (6)	10,0 mL
#2	Adequação à análise isotópica	AT (15) AT destilada (15)	1,5 mL
#3	Contaminação cruzada	AT (5) AE (5)	1,5 mL
#4	Contaminação na unidade de destilação	AT (20)	1,5 mL
#5	Efeito do tempo de extração	Urina (10)	1,5 mL

AT = água de torneira; AM = água mineral comercial; AE = água enriquecida.

4.2. Método de destilação criogênica a vácuo

O aparato de destilação é um sistema físico fechado e fixo em estrutura metálica, em forma de grade, sobre uma bancada móvel (Figura 3). Esse sistema, controlado por válvulas, possui uma bomba mecânica, uma bomba difusora, duas flautas de vidro (em paralelo entre si) e um cilindro de gás nitrogênio (N_2) ultrapuro (Figura 4), conectados em série através de capilares de vidro ou de silicone com diâmetro (φ) = 9 mm.



Figura 3. Aparato de destilação criogênica a vácuo.

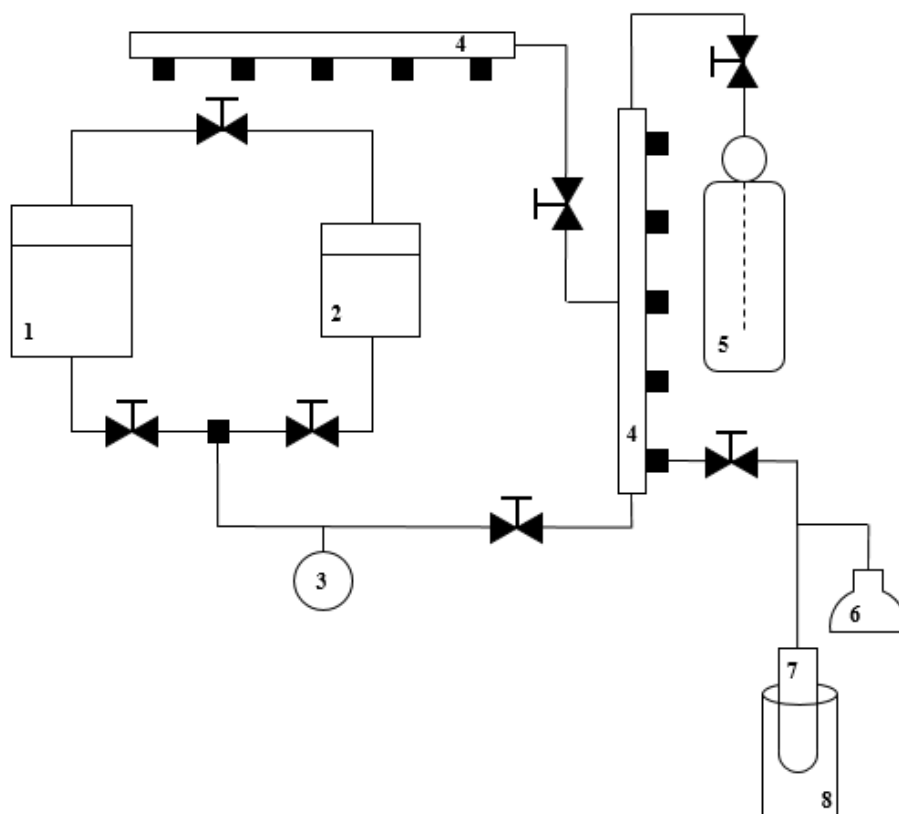


Figura 4. Desenho esquemático do aparato de destilação criogênica a vácuo. 1- Bomba mecânica; 2- bomba difusora; 3- medidor de pressão “*Edwards APG-M-NW16*”; 4- flautas de vidro; 5- cilindro de N₂ ultrapuro; 6- balão volumétrico contendo a amostra não destilada; 7- frasco coletor; 8- nitrogênio líquido (-196 °C).

4.2.1. Descrição do aparato de destilação criogênica a vácuo

Bomba Mecânica “*Edwards E2M5 high vacuum pump*” – bomba mecânica de dois estágios (Figura 5) que atua no sistema de destilação como bomba de baixo vácuo (ou pré-vácuo), ou seja, ela começa a operar à pressão atmosférica para produzir no sistema um vácuo de 10^{-2} mbar (O’HANLON, 2003). Portanto, acionamos essa bomba antes do início do processo de destilação, quando as válvulas dos bocais das flautas de vidro estão fechadas. Porém, quando abertas as válvulas, é necessário o acionamento conjunto com a bomba difusora.



Figura 5. Bomba mecânica utilizada na destilação.



Figura 6. Bomba difusora utilizada na destilação.

Bomba Difusora “*Edwards EO50/60 diffusion pump*” – bomba de difusão refrigerada a ar (Figura 6) que é responsável por manter a pressão em 10^{-2} mbar após o início do processo de destilação. Essa bomba atua como bomba de alto vácuo, sendo capaz de trabalhar em pressões inferiores a 1,0 mbar (segundo especificações do fabricante). Por isso, seu acionamento ocorre após o estabelecimento do pré-vácuo, sucedido pela abertura das válvulas dos bocais que serão utilizados. Em paralelo ao estabelecimento do vácuo no sistema, montamos as unidades de destilação nos bocais das flautas de vidro.

Flautas de vidro – tubos de vidro com conexões. Cada flauta contém cinco bocais (Figura 7). Os bocais têm saída dupla para o acoplamento simultâneo, através de acopladores de politetrafluoretileno (teflon), dos componentes das unidades de destilação.



Figura 7. Flauta de vidro com seus cinco bocais.

Unidade de destilação – composta de um tubo coletor e um balão volumétrico, fixos nos bocais das flautas de vidro (Figura 8), arranjados de forma que a fase líquida da amostra (contida no balão volumétrico), ao evaporar, passa necessariamente por dentro do tubo coletor, que fica envolto em nitrogênio líquido (Figura 9). Após estabelecer o vácuo no sistema e concluir a montagem das unidades de destilação, abrimos as válvulas dos bocais, iniciando o processo de destilação.



Figura 8. Unidade de destilação. Saída dupla de um bocal da flauta com acopladores de teflon. As unidades possuem válvulas individuais.



Figura 9. Destilação criogênica a vácuo. O nitrogênio líquido envolvendo o frasco coletor cria uma armadilha criogênica.

No processo, a fase líquida da amostra evapora devido à baixa pressão do sistema. O vapor formado percorre o capilar de vidro até sublimar na armadilha criogênica de nitrogênio líquido. Decorrido o tempo do processo, fechamos as válvulas dos bocais, removemos o nitrogênio líquido (para o descongelamento das amostras resultantes) e permitimos a passagem momentânea de N₂ ultrapuro.

Cilindro de N₂ ultrapuro – contém gás nitrogênio com 99,999% de pureza (Figura 10). A válvula desse cilindro é ativada momentaneamente, antes da quebra do vácuo, para que o gás ultrapuro remova quaisquer impurezas restantes no sistema. Essa prática evita contaminações que devem refletir na análise das amostras por IRMS (ORLOWSKI *et al.*, 2013). Essas amostras são, então, colocadas em frascos contendo tampas com septo (Figura 11), que permitem a entrada da seringa de injeção do sistema de IRMS, e armazenadas em temperatura de 5,0 °C até a análise.



Figura 10. Cilindro contendo gás nitrogênio ultrapuro.



Figura 11. Frascos contendo tampas com septo.

4.3. Validação da destilação

Experimento #1, eficácia do processo de destilação – Medimos a condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$), a 25 °C, de seis amostras destiladas de água de torneira (AT) e seis de água mineral comercial (AM); e seis não destiladas de AT e seis de AM. Para efetuar a medição com condutivímetro “Marconi CA 150” foram necessários 10 mL de cada

amostra. Comparamos os valores de condutividade elétrica pelo teste t de Student com intervalo de confiança de 95%.

Experimento #2, adequação à análise isotópica – Comparamos os valores de enriquecimento relativo isotópico de hidrogênio (δ^2H ; Eq. 5) e de oxigênio ($\delta^{18}O$) entre 15 amostras destiladas e 15 não destiladas de AT para verificar se a destilação causa fracionamento isotópico nas amostras. Nesse experimento, a amostra líquida foi inserida no reator de “pirólise” do analisador elementar modelo “*FLASH 2000 – Automatic Elemental Analyzer*” por amostrador automático em forma de seringa. Os gases gerados no reator (H_2 e CO) foram, então, separados por cromatografia gasosa e introduzidos, via “*CONFLO IV*”, em espectrômetro de massa de razão isotópica modelo “*DELTA V ADVANTAGE*”. Foram realizadas oito repetições de análise para cada amostra e as três primeiras foram descartadas. Comparamos os valores obtidos, em ‰ (Eq. 5), pelo teste t de Student com intervalo de confiança de 95%.

O erro analítico, relacionado à precisão da técnica HTC-IRMS, foi de 5,00‰ e 1,00‰ para δ^2H e $\delta^{18}O$, respectivamente. Em relação à acurácia, a curva de calibração é ajustada utilizando dois padrões-de-trabalho, calibrados, de forma indireta, a partir dos padrões internacionais (FERRIOLLI, 2006): uma água não enriquecida ($\delta^2H = -109,86 \pm 5,00$ ‰ e $\delta^{18}O = -7,01 \pm 1,00$ ‰) e uma água enriquecida ($\delta^2H = 1677,00 \pm 5,00$ ‰ e $\delta^{18}O = 47,97 \pm 1,00$ ‰). Esses padrões são reanalisados a cada 20 amostras analisadas no equipamento.

Experimento #3, contaminação cruzada – Destilamos simultaneamente cinco amostras de AT e cinco de água enriquecida em deutério (AE) com valores de δ^2H previamente conhecidos ($\delta^2H_{AT} = -109,86 \pm 5,00$ ‰ e $\delta^2H_{AE} = 380,06 \pm 5,00$ ‰). As amostras foram arranjadas de forma intercalada nos bocais do aparato de destilação, visando testar se as unidades de destilação são independentes, ou seja, se não há

contaminação cruzada entre amostras destiladas simultaneamente. Para esse teste, avaliamos o δ^2H das amostras destiladas, de forma análoga ao experimento #2. Utilizamos o teste t de Student, com intervalo de confiança de 95%, para verificar a relação entre o enriquecimento relativo isotópico de amostras com diferentes graus de enriquecimento, e o teste Z (normal-padrão) com intervalo de confiança de 95% para comparar os resultados obtidos experimentalmente com os valores preditos.

Experimento #4, contaminação na unidade de destilação – Destilamos em sequência no mesmo aparato, utilizando todas as dez unidades de destilação do aparato: dez amostras de água de torneira (AT_1), dez de água enriquecida ($\delta^{18}O = 3188,29 \pm 87,92 \text{ ‰}$) e, novamente, dez de água de torneira (AT_2 , da mesma fonte que AT_1). Nesse experimento, analisamos o $\delta^{18}O$, analogamente ao experimento #2, das amostras destiladas anterior e posteriormente à destilação da água enriquecida. Dessa forma, verificamos se há contaminação em uma mesma unidade de destilação, pois por serem da mesma fonte, os valores de $\delta^{18}O$ obtidos para AT_2 devem estar correlacionados com os obtidos para AT_1 . Avaliamos essa correlação pelo teste t de Student com intervalo de confiança de 95%.

Experimento #5, efeito do tempo de extração – Realizamos um experimento de desempenho visando determinar o tempo mínimo necessário ao processo de destilação que elimina o fracionamento isotópico em amostras de urina. Para tanto, utilizamos dez amostras de urina não enriquecida de uma paciente inserida em outra pesquisa de nosso grupo (Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa nº 306.538). Destilamos 1,5 mL de cada amostra por 10, 15, 20 e 25 min e, então, submetemos as amostras destiladas à análise do $\delta^{18}O$, analogamente ao experimento #2. Os resultados obtidos, em ‰ (Eq. 5), foram representados graficamente em função do tempo de destilação e, então, realizamos um ajuste exponencial de 1ª ordem visando determinar o

tempo ótimo de destilação para 1,5 mL de urina. O ajuste seguiu conforme a equação (CRISS, 1999):

$$\delta^{18}\text{O}(t) = \delta^{18}\text{O}_f + (\delta^{18}\text{O}_i - \delta^{18}\text{O}_f) \cdot e^{-k \cdot t} \quad (6)$$

Onde t é o tempo (min) e k é o *turnover* (min^{-1}) do ^{18}O , e os índices i e f indicam, respectivamente, o tempo inicial e o final no equilíbrio. Então, estabelecemos, a partir de k , o tempo necessário para se destilar 95% e 99% do conteúdo de água. Para tanto, utilizamos a equação (DUCATTI *et al.*, 2016):

$$t = \left(-\frac{1}{k_x} \right) \cdot \ln(1 - F) \quad (7)$$

Onde k_x é o *turnover* do isótopo pesado do elemento x e F é definido como a variável de progresso da reação, ou seja, representa a fração que se aproxima do equilíbrio.

4.4. Avaliação do efeito de memória

Para essa etapa, foram utilizadas amostras de urina de 20 pacientes mulheres obesas mórbidas (Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa nº 306.538). Cada paciente havia ingerido uma dose contendo 2 g/kg de água corporal de H_2^{18}O (10,8 atom%) e 0,12 g/kg de água corporal de $^2\text{H}_2\text{O}$ (99,8 atom%). Foram coletadas 15 amostras, sendo uma pré-dose (basal) e as outras, uma por dia, pelos 14 dias que sucederam a ingestão da dose.

Submetemos as amostras dos dias 1, 2, 3, 6, 9, 10, 12, 13 e 14 (d1, d2, d3, etc.), e a basal (totalizando 10 amostras por paciente) à destilação criogênica a vácuo e

analisamos por HTC-IRMS, analogamente ao Experimento #2. Porém, o total de 200 amostras foi analisado em dois protocolos de rotina diferentes, para verificar o efeito de memória atribuído a cada protocolo. Teoricamente, o efeito de memória é evitado quando os valores de enriquecimento das amostras atingem o *plateau* de reprodutibilidade, ou seja, o desvio padrão entre as repetições será mínimo (HORITA & KENDALL, 2004).

Protocolo #1 – Nesse protocolo, as análises foram feitas para cada paciente de forma sequencial, ou seja, na ordem cronológica de coleta no experimento, com oito repetições de análise por amostra (sendo as três primeiras descartadas).

Protocolo #2 – O segundo protocolo atentou para o princípio de que as análises devem ser feitas em ordem crescente, ou decrescente, de enriquecimento (esperado) para evitar o efeito de memória (DE GROOT, 2009). Para tanto, determinamos grupos de enriquecimento a partir de cálculos metabólicos utilizando valores fixos para o *turnover* dos dois isótopos ($k_H = 0,080 \text{ d}^{-1}$ e $k_O = 0,100 \text{ d}^{-1}$) utilizando a Eq. 7 que, nesse caso, determinou a fração já metabolizada (F) para cada dia de experimento (DUCATTI *et al.*, 2016).

Com base nos cálculos, e no conhecimento de que a duração do experimento é equivalente ao tempo de aproximadamente duas meias vidas do deutério e do ^{18}O , propusemos a formação de quatro grupos de enriquecimento (G1 a G4) para serem analisados em blocos, ou seja, analisamos o G1 para todas as pacientes, então o G2, e assim por diante. Os grupos foram compostos conforme a Tabela 3.

Assim como no Protocolo #1, oito repetições de análise por amostra foram realizadas e as três primeiras foram descartadas. Porém, para os ajustes da curva de calibração, utilizamos a água não enriquecida ($\delta^2\text{H} = -109,86 \pm 5,00 \text{ ‰}$ e $\delta^{18}\text{O} = -7,01 \pm$

1,00 ‰) a cada vinte amostras analisadas dos grupos G1, G2 e G3. Para o G4, utilizamos a água enriquecida ($\delta^2H = 1677,00 \pm 5,00 \text{ ‰}$ e $\delta^{18}O = 47,97 \pm 1,00 \text{ ‰}$).

Tabela 3. Amostras utilizadas no Protocolo #2 (análise das amostras em ordem crescente de enriquecimento esperado) divididas por grupo de enriquecimento.

Grupo	Amostras
G1	Basal (pré-dose)
G2	d14, d13 e d12
G3	d10, d9 e d8
G4	d3, d2 e d1

d1 = dia 1, d2 = dia 2, etc.

Objetivando comparar os protocolos distintos, normalizamos os dados de cada paciente em relação à amostra basal de acordo com a equação:

$$\delta^A X_{transf} = \left| \frac{\delta^A X - \delta^A X_{basal}}{\delta^A X_{basal}} \right| \quad (8)$$

Onde $^A X$ é o isótopo mais pesado do elemento em questão (especificamente, 2H e ^{18}O), e os índices *transf* e *basal* indicam, respectivamente, o enriquecimento transformado e a composição isotópica basal da paciente.

Então, expressamos média e desvio padrão, entre os pacientes, em função do tempo de coleta das amostras (em dias) para avaliar o comportamento da curva de eliminação de ambos os isótopos dentro de cada protocolo de análise.

5. RESULTADOS

Observamos que o processo de destilação interferiu na condutividade das amostras de água (Tabela 4). Ambos os resultados para as amostras destiladas (AT e AM) apresentaram uma taxa de redução superior a 85% em relação às amostras não destiladas. Além disso, os valores de condutividade de amostras destiladas e não destiladas não estão correlacionados ($p < 0,01$).

Tabela 4. Condutividade elétrica das amostras de água não destiladas e destiladas pelo método de destilação criogênica a vácuo. Apresentados os valores de média e desvio padrão (N = 6).

Amostra (V = 10 mL)	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
AT	$78,47 \pm 3,31^a$
AT destilada	$9,65 \pm 5,53^b$
AM	$119,02 \pm 2,84^c$
AM destilada	$11,86 \pm 5,28^d$

AT = água de torneira; AM = água mineral comercial.

Não houve fracionamento isotópico nas amostras de água devido à destilação (Tabela 5). Ambos os valores de δ^2H e $\delta^{18}O$ entre as amostras destiladas e não destiladas apresentaram correlação ($p = 0,107$ e $p = 0,119$, respectivamente).

Tabela 5. Valores de enriquecimento relativo isotópico de hidrogênio (δ^2H) e de oxigênio ($\delta^{18}O$) de amostras de água de torneira (AT) não destiladas e destiladas pelo método de destilação criogênica a vácuo. Valores expressos pela média, acompanhada do desvio padrão (N = 15).

Amostra	δ^2H (‰)	$\delta^{18}O$ (‰)
AT	$-110,11 \pm 2,10^a$	$-9,23 \pm 0,66^b$
AT destilada	$-111,71 \pm 2,91^a$	$-8,90 \pm 0,37^b$

O processo de destilação não causa contaminação cruzada entre amostras destiladas simultaneamente (Tabela 6). Os valores de δ^2H entre amostras de AT e AE não apresentaram correlação ($p < 0,01$). Além disso, os valores obtidos estão em conformidade ($p = 0,519$ e $p = 0,786$, para AT e AE, respectivamente) com os valores esperados para ambas as amostras.

Tabela 6. Valores de enriquecimento relativo isotópico de hidrogênio (δ^2H) de amostras de água de torneira (não enriquecida) e água enriquecida, destiladas simultaneamente pelo método de destilação criogênica a vácuo. Valores expressos em média e desvio

padrão (N = 5).		
Amostra	δ^2H analisado (‰)	δ^2H esperado (‰)
AT	$-111,30 \pm 0,46^a$	$-109,86 \pm 5,00^a$
AE	$379,45 \pm 3,72^b$	$380,06 \pm 5,00^b$

AT = água de torneira; AE = água enriquecida.

Não houve contaminação devido à destilação, em sequência, de amostras com níveis variados de enriquecimento isotópico (Tabela 7). Os valores de $\delta^{18}O$ das amostras AT₁ e AT₂ não divergiram ($p = 0,065$).

Tabela 7. Valores de enriquecimento relativo isotópico de oxigênio ($\delta^{18}O$) de amostras de água de torneira destiladas, pelo método de destilação criogênica a vácuo, anteriormente (AT₁) e posteriormente (AT₂) à destilação de uma água enriquecida ($\delta^{18}O = 3188,29 \pm 87,92$ ‰). Valores expressos em média e desvio padrão (N = 10).

Amostra	$\delta^{18}O$ (‰)
AT ₁	$-9,85 \pm 0,35^a$
AT ₂	$-9,41 \pm 0,57^a$

Os valores de $\delta^{18}O$, na forma de média e desvio padrão, representados em função do tempo de destilação demonstraram o comportamento exponencial do processo (Figura 12). Substituindo os valores obtidos pelo ajuste na Eq. 6, temos:

$$\delta^{18}\text{O}(t) = -8,287 - 8,781 \cdot e^{-0,1415t} \quad (9)$$

Que descreve o comportamento do enriquecimento relativo isotópico de oxigênio em função do tempo ($R^2 = 0,9885$). O tempo de destilação considerando $F = 0,95$ e $F = 0,99$, com $k = 0,1415 \text{ min}^{-1}$, obtido a partir da Eq. 7, foi de 21,17 min e 32,54 min, respectivamente.

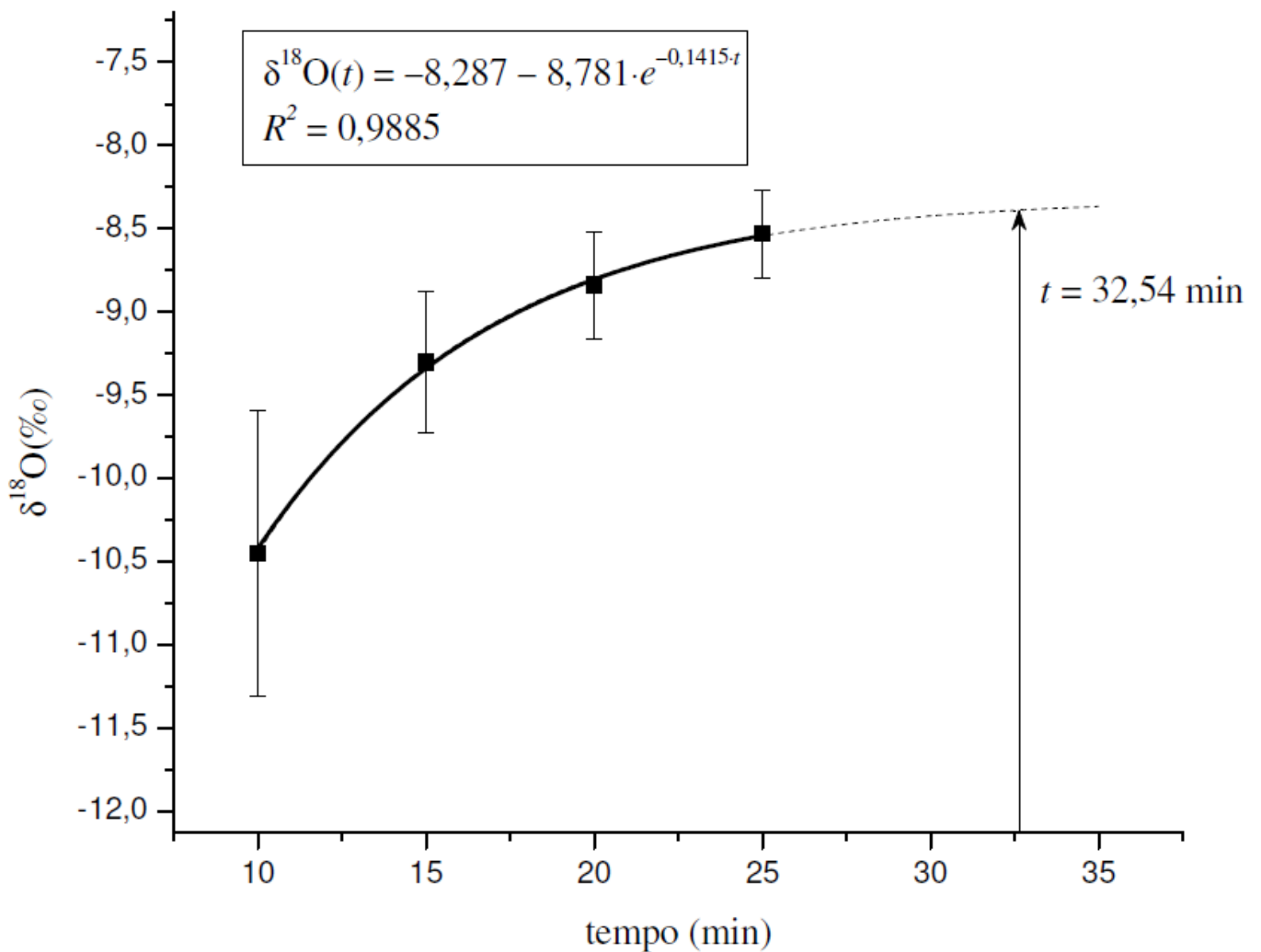


Figura 12. Valores de enriquecimento relativo isotópico ($\delta^{18}\text{O}$) de dez amostras de urina, destiladas pelo método de destilação criogênica a vácuo, representados em função do tempo de destilação. Valores apresentados em forma de média e desvio padrão. A curva ajustada é uma exponencial de 1ª ordem, e o tempo necessário para destilar 99% do conteúdo de água foi $t = 32,54 \text{ min}$.

Os valores, para ambos os protocolos de análise por HTC-IRMS, de δ^2H_{transf} e $\delta^{18}O_{transf}$ (Eq. 8; adimensionais) têm comportamento de função exponencial de 1ª ordem quando representados em função do tempo, em dias, do experimento de água duplamente marcada (Figuras 13a e 13b). Os resultados foram mais espalhados para o protocolo 1, em relação ao protocolo 2.

Para o δ^2H_{transf} , o protocolo 2, apesar do ajuste menos preciso ($R^2 = 0,9608$ vs. $0,9992$ do protocolo 1), apresentou um comportamento mais descritivo de uma função exponencial de 1ª ordem (Figura 13a). Na Figura 13b, que mostra o $\delta^{18}O_{transf}$ relativo ao tempo, observamos desvios muito menores para o protocolo 2, em relação ao protocolo 1.

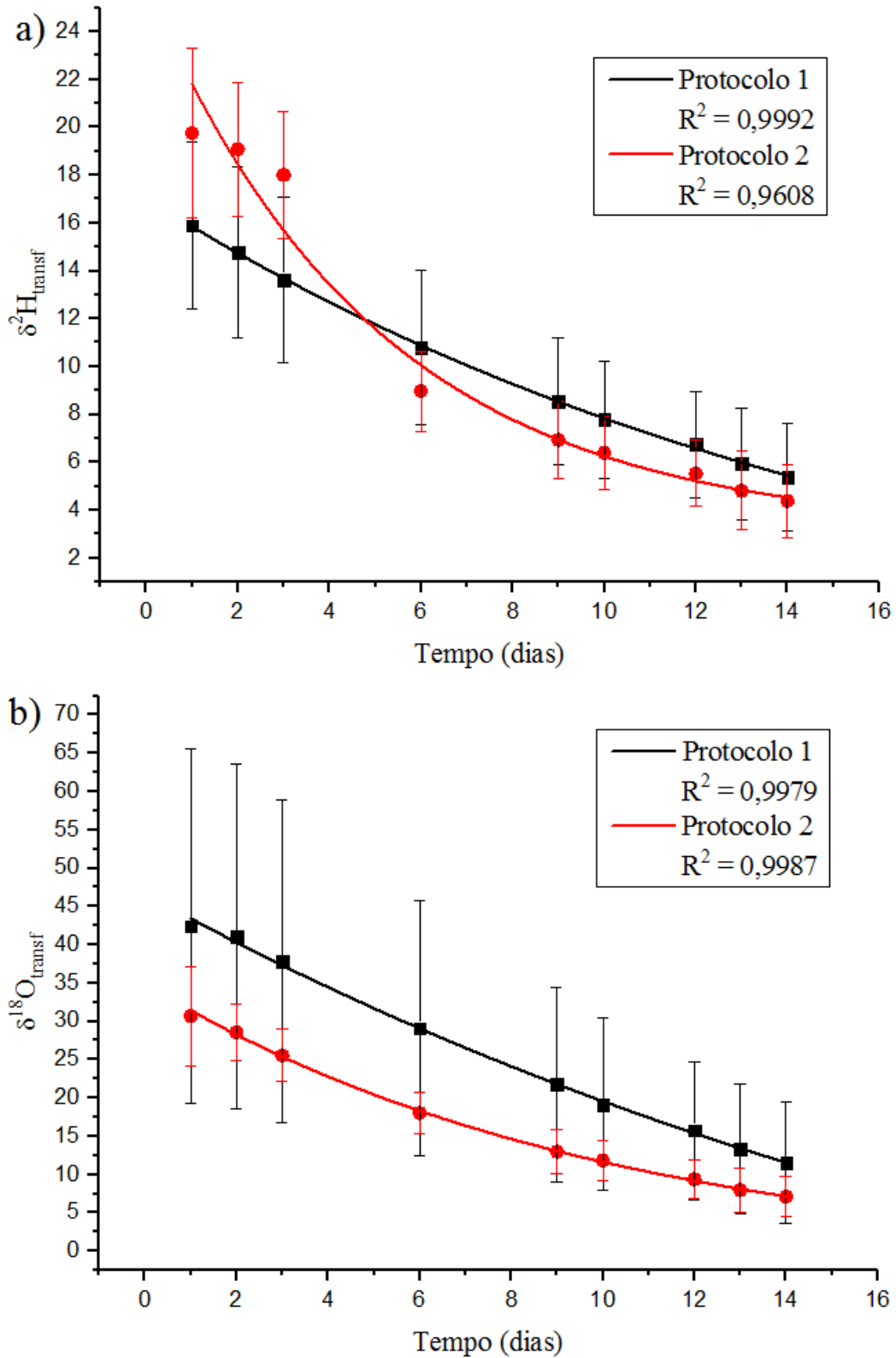


Figura 13. Comparação dos valores de enriquecimento relativo isotópico transformado de hidrogênio (δ^2H_{transf} ; a) e de oxigênio ($\delta^{18}O_{transf}$; b), em função do tempo, entre protocolos de análise de amostras de urina por HTC-IRMS (N = 20). Protocolo 1: ordem de análise igual à ordem cronológica de coleta das amostras; Protocolo 2: ordem de análise considerou o grau de enriquecimento esperado para as amostras de cada dia. Valores apresentados em forma de média e desvio padrão.

6. DISCUSSÃO

Esse trabalho buscou avaliar a utilização do método de destilação criogênica a vácuo para preparar amostras de água duplamente marcada para análise isotópica, e atenuar o efeito de memória envolvido na técnica HTC-IRMS. Os resultados mostraram que o método de destilação é adequado à análise isotópica. Além disso, mostraram que, ao adotar alguns cuidados em relação à forma como conduzir as análises, é possível atenuar o efeito de memória. Portanto, a análise de amostras de urina por HTC-IRMS com preparo de amostras por destilação criogênica a vácuo e uma rotina de análises por grupos de enriquecimento é capaz de produzir resultados satisfatórios.

O delineamento experimental visou testar a adequação do método de destilação à técnica HTC-IRMS, tendo como foco verificar a ausência de fracionamento isotópico e de contaminação decorrentes do processo de destilação, bem como demonstrar que o método, de fato, destila as amostras. Além disso, o método de destilação foi aplicado à análise de amostras de urina e, dessa forma, foi possível avaliar o efeito de memória produzido na HTC-IRMS.

No processo de destilação, especificamente durante a evaporação da fase líquida da amostra, ocorre um equilíbrio entre líquido e vapor. Porém, na faixa de pressão em que o sistema trabalha, não é possível a existência de água líquida (ATKINS & JONES, 2010). Isso ocorre porque, em tais condições, o potencial químico da água líquida se eleva, favorecendo sua mudança de fase. Consequentemente, as moléculas da superfície da água líquida retirarão energia na forma de calor das moléculas internas para elevar a pressão de vapor na superfície e possibilitar a evaporação. Isso causa um resfriamento na fase líquida, que tenderá a se solidificar. A solidificação da água dificultaria o processo de destilação, pois a mudança de fase envolvida seria a sublimação, em lugar de evaporação. Para solucionar esse problema, os balões volumétricos contendo as

amostras são envolvidos por béqueres contendo água a temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante todo o processo. Essa água troca calor com a amostra, retardando a solidificação da fase líquida.

A redução observada na condutividade elétrica das amostras em resposta ao processo de destilação (Tabela 4) era esperada. Isso ocorre porque um processo de destilação remove íons metálicos presentes na água (VALANIDES, 2000), acarretando uma queda na condutividade do destilado.

O processo de destilação não afeta a composição isotópica da amostra (Tabela 5). A existência de fracionamento isotópico inviabilizaria a utilização do método de destilação na HTC-IRMS. O fracionamento isotópico em um processo de destilação pode ser relacionado com o volume da amostra e, principalmente, com a duração do processo, que obedece à curva de destilação de Rayleigh, onde as moléculas de água de maior massa (i.e. H_2^{18}O) evaporam mais tardiamente (INGRAHAM & SHADEL, 1992).

O método de destilação criogênica a vácuo é capaz de dez destilações simultâneas independentes, ou seja, não há contaminação cruzada no processo (Tabela 6). A existência de contaminação entre as amostras também inviabilizaria a utilização do método de destilação na HTC-IRMS. Tal contaminação é observada no caso de alguma fração da fase volátil da amostra não sublimar na armadilha de nitrogênio líquido, podendo, ao ser puxada pela bomba mecânica, contaminar outra unidade de destilação.

Testamos a existência de contaminação, entre amostras destiladas em sequência em uma mesma unidade de destilação, devido ao fato de as moléculas de água serem altamente adsorptivas (MORSE *et al.*, 1993). Apesar disso, não há contaminação em uma única unidade de destilação (Tabela 7).

As propriedades físico-químicas variam de substância para substância, e.g. de urina para água (VALANIDES, 2000). Tais variações devem influenciar no tempo necessário para se extrair a fase líquida de determinada substância. Por isso, avaliamos o desempenho do método de destilação criogênica a vácuo aplicado a amostras de urina (Figura 12).

O processo de destilação obedece à curva de destilação de Rayleigh (INGRAHAM & SHADEL, 1992), justificando o ajuste exponencial de primeira ordem utilizado na avaliação do desempenho do método de destilação criogênica a vácuo (Eq. 9). O tempo necessário foi estabelecido como o tempo para se destilar 99% do conteúdo de água da amostra. Portanto, o método de destilação criogênica a vácuo é capaz de extrair 1,5 mL de água de amostras de urina, sem causar fracionamento isotópico, em um tempo mínimo de 32,54 min (Figura 12).

O efeito de memória relativo à HTC-IRMS foi avaliado sob dois protocolos de análises diferentes (Figuras 13a e 13b). O Protocolo #1 foi utilizado por ser a ordem direta de análise, por isso, apresentou um efeito de memória significativo. Os resultados demonstraram que o Protocolo #2 é mais homogêneo, em termos do desvio padrão dos dados (Figuras 13a e 13b). Portanto, sugerimos a utilização de uma rotina de análises em bloco de enriquecimento na HTC-IRMS, em lugar da análise das amostras em ordem direta.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse é o primeiro estudo a avaliar os parâmetros envolvidos no processo de extração (e.g. tempo ótimo do processo, existência de fracionamento isotópico) da água de amostras de urina pelo método de destilação criogênica a vácuo. Outros estudos envolvendo a extração da água de amostras de urina por outros métodos são necessários

para permitir, pela comparação entre os métodos, um melhor entendimento do processo de extração.

A importância desse trabalho está em entender, qualitativa e quantitativamente, a técnica de HTC-IRMS. Esse entendimento permite a realização de ajustes finos, tanto no equipamento como no preparo das amostras. O domínio da técnica permite a ampliação de sua aplicação para além da metodologia de água duplamente marcada. Além disso, a ampliação da utilização do método de destilação para preparar amostras de outra natureza para análise de isótopos estáveis, e.g. análise de vinho ((DUTRA *et al.*, 2011).

O método de destilação criogênica a vácuo é capaz de dez destilações simultâneas em tempo máximo de 90 min, considerando o tempo para a montagem e desmontagem do sistema. Além disso, não expõe as amostras e o seu manipulador a altas temperaturas, o que é comum em outros métodos de destilação criogênica (GUIDOTTI *et al.*, 2013; ORLOWSKI *et al.*, 2013; GOEBEL & LASCANO, 2012). Portanto, o método pode ser considerado mais seguro, e mais econômico em termos de gasto de energia com aquecimento.

Apesar do fato de que o efeito de memória na técnica HTC-IRMS está relacionado com o protocolo de análises utilizado, existem ajustes mais complexos capazes de reduzir ainda mais tal efeito. Por exemplo, a utilização de algoritmos matemáticos para corrigir o efeito de memória (GUIDOTTI *et al.*, 2013). Sugerimos, como estudo subsequente, a comparação entre demais protocolos de análise por HTC-IRMS para gerar dados mais conclusivos acerca do efeito de memória relacionado à técnica.

8. CONCLUSÃO

Concluimos que o método de destilação criogênica a vácuo é adequado à extração da água em amostras de urina para análises de água duplamente marcada por HTC-IRMS. Portanto, a utilização do método de destilação para o preparo das amostras, em conjunto com um protocolo específico de análises em espectrômetro de massa, garante a atenuação do efeito de memória da técnica HTC-IRMS.

9. REFERÊNCIAS

ATKINS, P.; JONES, L. **Chemical Principles**. W. H. Freeman and Company, New York, 2010.

BARRIE, A.; PROSSER, S. Automated Analysis of Light-Element Stable Isotopes by Isotope Ratio Mass Spectrometry. In: Boutton, T. W. (ed.), **Mass Spectrometry of Soils**. Marcel Dekker Inc., New York, p. 1-46, 1996.

BLACK, A.E.; PRENTICE, A.M.; COWARD, W.A. Use of Food Quotients to Predict Respiratory Quotients for the Doubly Labelled Water Method of Measuring Energy Expenditure. **Human Nutr. Clin. Nutr.**, v. 40, n. 5, p. 381-391, 1986.

BURROWS, T. C.; MARTIN, R. J.; COLLINS, C. E. A Systematic Review of the Validity of Dietary Assessment Methods in Children when Compared with the Method of Doubly Labeled Water. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 110, n. 10, p. 1501-1510, 2010.

CRISS, R. E. Nonequilibrium fractionation and isotopic transport. In: CRISS, R. E. (ed.), **Principles of Stable Isotopes Distribution**. Oxford University Press, New York, p. 139-142, 1999.

DE GROOT, P. A. **Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques**. Elsevier, v. 2, 2009.

DUCATTI, C. *et al.* Modelling and Determination of Metabolic Pools by Stable Carbon Isotopes in the Avian Duodenal Mucosa and Albumen. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.**, v. 100, p. 77-84, 2016.

DUTRA, S. V. *et al.* Determination of the Geographical Origin of Brazilian Wines by Isotope and Mineral Analysis. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 401, p. 1571-1576, 2011.

FERRIOLLI, E. **Estudos Gerontológicos Empregando Isótopos Estáveis e Espectrometria de Massa: Implantação da Metodologia e Estudos da Composição Corporal, Metabolismo Energético e Protéico de Idosos.** Tese (livre-docência), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Departamento de Clínica Médica. Ribeirão Preto, 2006.

FRITZ, P.; FONTES, J. C. Introduction. In: FRITZ, P.; FONTES, J. C. (ed.), **Handbook of Environmental Isotope Geochemistry.** Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, p. 1-17, 1980.

GOEBEL, T. S.; LASCANO, R. J. System for High Throughput Water Extraction from Soil Material for Stable Isotope Analysis of Water. **J. Anal. Sci. Methods and Instr.**, v. 2, p. 203-207, 2012.

GUIDOTTI, S. *et al.* Doubly Labelled Water Analysis: Preparation, Memory Correction, Calibration and Quality Assurance for $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ Measurements Over Four Orders of Magnitudes. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 27, p. 1055-1066, 2013.

HORITA, J.; KENDALL, C. Stable Isotope Analysis of Water and Aqueous Solutions by Conventional Dual-Inlet Mass Spectrometry. In: De Groot, P. A. (ed.), **Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques.** Elsevier, v. 1, Cap. 1, 2004.

IDECG WORKING GROUP. The Doubly Labelled Water Method for Measuring Energy Expenditure: a Consensus by the IDECG Working Group. Prentice, A. M. (ed.). **International Atomic Energy Agency**, Vienna, 1990.

IGNATEV, A. *et al.* A Soil Water Distillation Technique Using He-Purging for Stable Isotope Analysis. **J. Hydrol.**, v. 498, p. 265-273, 2013.

INGRAHAM, N. L.; SHADEL, C. A Comparison of the Toluene Distillation and Vacuum/Heat Methods for Extracting Soil Water for Stable Isotopic Analysis. **J. Hydrol.**, v. 140, p. 371-387, 1992.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Dietary Reference Intakes: Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Protein and Amino Acids (Macronutrients)**. Cap. 5, p. 107-264. National Academy Press, Washington D. C., 2005.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Assessment of Body Composition and Total Energy Expenditure in Humans Using Stable Isotope Techniques, No: 3, In: IAEA Human Health Series. **International Atomic Energy Agency**, Vienna, 2009.

LIFSON, N. *et al.* The Fate of Utilized Molecular Oxygen and the Source of the Oxygen of Respiratory Carbon Dioxide, Studies With the Aid of Heavy Oxygen. **J. Biol. Chem.**, v. 180, p. 803-811, 1949.

LIFSON, N.; GORDON, G. B.; MCCLINTOCK, R. Measurement of Total Carbon Dioxide Production by Means of D₂¹⁸O. **J. Appl. Physiol.**, v. 7, p. 704-710, 1955.

MILLER, A. I. Heavy Water: A Manufacturers' Guide for the Hydrogen Century. **Canadian Nuclear Society Bulletin**, v. 22, n. 1, 2001.

MOREHEN, J. C. *et al.* The Assessment of Total Energy Expenditure During a 14-Day In-Season Period of Professional Rugby League Players Using the Doubly Labeled Water Method. **Int. J. Sport Nutr. Exe.**, v. 26, n. 5, p. 464-472, 2016.

MORSE, A. D.; WRIGHT, I. P.; PILLINGER, C. T. An Investigation Into the Cause of Memory Effects Associated With the Conversion of H₂O to H₂ for D/H Measurement. **Chem. Geol.**, v. 107, p. 147-158, 1993.

NAGY, K. A. CO₂ Production in Animals: Analysis of Potential Errors in the Doubly Labeled Water Method. **Am. J. Physiol.**, v. 238, n. 5, p. R466-R473, 1980.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, Principles of Biochemistry**. 6^a Ed., W. H. Freeman and Company, New York, 2013.

NELSON, S. T. A Simple Practical Methodology for Routine VSMOW/SLAP Normalization of Water Samples Analyzed by Continuous Flow Methods. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 14, p. 1044-1046, 2000.

O'HANLON, J. F. **A User's Guide to Vacuum Technology**. 3^a Ed., John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2003.

ORLOWSKI, N. *et al.* Validation and Application of a Cryogenic Vacuum Extraction System for Soil and Plant Water Extraction for Isotope Analysis. **J. Sens. Sens. Syst.**, v. 2, p. 179-193, 2013.

PIPER, M. D. W. *et al.* Using Doubly-Labeled Water to Measure Energy Expenditure in an Important Small Ectotherm *Drosophila melanogaster*. **J. Genetics and Genomics**, v. 41, p. 505-512, 2014.

PONTZER, H. *et al.* Metabolic Acceleration and the Evolution of Human Brain Size and Life History. **Nature**, v. 0, p. 1-3, 2016.

PRENTICE, A. M. *et al.* Unexpectedly Low Levels of Energy Expenditure in Healthy Women. **Lancet**, v. 325, p. 1419-1422, 1985.

PRESTON, T. The Measurement of Stable Isotope Natural Abundance Variations. **Plant, Cell & Environment**, v. 15, p. 1091-1097, 1992.

SAGAYAMA, H. *et al.* Dilution Space Ratio of ^2H and ^{18}O of Doubly Labeled Water Method in Humans. **J. Appl. Physiol.**, v. 120, p. 1349-1354, 2016.

SCHOELLER, D. A. Measurement of Energy Expenditure in Free-Living Humans by Using Doubly-Labelled Water. **J. Nutr.**, v. 118, p. 1278-1289, 1988.

SHARP, Z. **Principles of Stable Isotope Geochemistry**. 1^a Ed., Pearson Education Inc., 2007.

SPEAKMAN, J. R.; RACEY, P. A. Consequences of Non Steady-State CO_2 Production for Accuracy of the Doubly Labelled Water Technique: The Importance of Recapture Interval. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 90A, n. 2, p. 337-340, 1988.

TIPLER, P. A.; LLEWELLYN, R. A. **Modern Physics**. 6^a Ed., W. H. Freeman and Company, New York, 2010.

VALANIDES, N. Primary Student Teacher's Understanding of the Process and Effects of Distillation. **Chem. Education: Research and Practice in Europe**, v. 1, n. 3, p. 355-364, 2000.

WILLIAMS, J. B.; NAGY, K. A. Validation of the Doubly Labeled Water Technique for Measuring Energy Metabolism in Savannah Sparrows. **Physiol. Zool.**, v. 57, n. 3, p. 325-328, 1984.

WOLFE, R. R.; CHINKES, D. L. **Isotope Tracers in Metabolic Research: Principles and Practice of Kinetic Analysis**. 2^a Ed., John Wiley and Sons Inc., New Jersey, 2005.