

EQUIPAMENTO AUXILIAR AO DIAGNÓSTICO DE FIBROSE CÍSTICA UTILIZANDO AMOSTRAS DE SUOR

AUXILIARY EQUIPMENT FOR DIAGNOSIS OF CYSTIC FIBROSIS USING SWEAT SAMPLES

*Data de entrega dos originais à
redação em: 27/02/2016,
e recebido para diagramação
em: 30/11/2016.*

Renato Zattar Afonso da Cunha¹
Eduardo Tavares Costa²
Francisco Ubaldo Vieira Junior³

Este artigo tem como objetivo apresentar o desenvolvimento de um equipamento eletrônico para a realização de titulações coulométricas para a determinação da concentração de cloretos em amostras de suor coletadas de pacientes. Esse parâmetro fisiológico é utilizado pelos médicos para o diagnóstico da doença genética e hereditária conhecida por fibrose cística. A titulação coulométrica se baseia nas leis de Faraday da equivalência eletroquímica e é um método quantitativo de grande precisão e exatidão. Os princípios de funcionamento do equipamento e a metodologia do teste serão explicados neste artigo, bem como serão mostrados os resultados preliminares alcançados na avaliação inicial do protótipo montado.

Palavras-chave: *Coulometria. Teste do Suor. Fibrose Cística. Titulação.*

The purpose of this article is to show the development of an electronic equipment that performs coulometric titrations on sweat samples extracted from patients. Physicians use this physiological parameter to diagnosis of cystic fibrosis, a heritable genetic disorder. The coulometric titration is based on the Faraday's law of electrochemical equivalence and it is a very precise and accurate quantitative method. The equipment functioning principles and the test methodology are explained on this article. Finally, the achieved preliminary results of the initial evaluation of the assembled prototype are shown.

Keywords: *Coulometry. Sweat Test. Cystic Fibrosis. Titration.*

¹Bolsista do CNPq – Brasil, Departamento de Engenharia Biomédica – DEB/FEEC/UNICAMP, Campinas, Brasil, cunha64@ceb.unicamp.br

²Centro de Engenharia Biomédica, CEB/UNICAMP, Campinas, Brasil, educosta@ceb.unicamp.br

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Campus Campinas, Campinas, Brasil, ubaldo@ifsp.edu.br

1 INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética hereditária, que causa uma disfunção da proteína transmembrana conhecida por ‘cystic fibrosis transmembrane conductance regulator’ (CFTR). Essa proteína atua regulando a passagem de íons de cloro (cloretos) através da membrana celular. As manifestações dessa doença incluem problemas respiratórios, digestivos e reprodutivos. Quando as primeiras fibroses císticas foram reconhecidas, na década de 40, a quase totalidade das pessoas afetadas falecia no primeiro ano de vida. Atualmente, com o diagnóstico e o acompanhamento médico adequado, cerca da metade dos pacientes sobrevivem à terceira década de vida (RIBEIRO; RIBEIRO; RIBEIRO, 2006).

Os pacientes afetados por essa doença apresentam uma elevação na quantidade de cloretos presentes no suor, e é esse indicador, juntamente com a análise clínica, que é utilizado para se fazer o diagnóstico. No Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) inclui a fibrose cística como uma das doenças a serem identificadas na triagem neonatal através de exame de sangue (teste do pezinho). Se esse teste der positivo para a FC, o resultado deve ser confirmado pelo teste do suor (GM/MS, 2001).

Existem vários métodos químicos que podem ser utilizados para se fazer a quantificação de cloretos. Os mais usuais são a condutimetria, o método volumétrico conhecido por método Schales&Schales (SCHALES; SCHALES, 1941) e a coulometria.

A condutimetria é um método qualitativo, e não quantitativo, que mede a condutividade do suor de forma não seletiva; com base na condutividade do suor, infere-se a quantidade de cloretos em termos de uma solução equivalente de cloreto de sódio.

O método de Schales&Schales é baseado na titulometria manual, onde a quantidade de cloretos é determinada estequiometricamente a partir do volume do reagente utilizado.

A coulometria é um método eletroquímico em que uma corrente é aplicada no titulado (suor) por meio de eletrodos, causando uma reação química no analito (cloretos). O valor da corrente aplicada e o tempo de aplicação definem a quantidade de elétrons que participaram da reação e, por consequência a quantidade de analito reagido. Esse método é baseado nas leis de Faraday da equivalência eletroquímica. Ele é considerado um método de grande precisão e exatidão e, no campo da metrologia química, é considerado um método primário para determinação da quantidade de substância (BORGES *et al.*, 2007). No campo clínico, a coulometria era o método indicado pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009), organização reconhecida internacionalmente para definições de padrões de análises clínicas.

Devido a esses pontos indicados, foi definido que o equipamento a ser desenvolvido deveria implementar o método coulométrico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

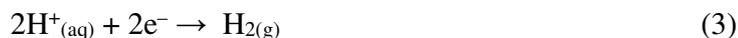
O equipamento que realiza a titulação coulométrica para a determinação de cloretos utiliza um eletrodo de prata (anodo), que é consumido gradativamente a cada uso, e um segundo eletrodo (catodo) que pode ser feito de prata ou platina (CEDERGREN; JOHANSSON, 1971; COTLOVE, 1964; KIES, 1962). Os eletrodos são imersos em um eletrólito aquoso constituído de ácido nítrico, ácido acético e um pouco de gelatina. Uma quantidade precisa do suor é adicionada ao meio e se faz passar pelos eletrodos uma corrente fixa. Essa corrente vai desencadear as reações químicas descritas nas Eq.1, 2 e 3.

Anodo:





Catodo:



No anodo, a corrente elétrica faz com que a prata do eletrodo perca elétrons (oxidação), os íons de prata formados, que são solúveis, se dissolvem na solução. Esse íon ao se encontrar com um íon de cloro combina com ele, formando cloreto de prata e se precipita, por ser insolúvel. No lado do catodo, como a solução utilizada é ácida, a reação que ocorre é de redução dos cátions de hidrogênio, formando gás hidrogênio.

Essas reações vão continuar até que a reação (2) comece a não ocorrer devido à escassez de íons de cloro. A partir desse momento, a concentração de íons de prata começará a aumentar, indicando o final da titulação. A determinação da quantidade de íons cloreto é feita pela Eq.4:

$$n = \frac{It}{zF} \quad (4)$$

onde: n é a quantidade de íons de prata liberados, que é equivalente à quantidade de íons de cloro, I é a corrente, t é o tempo de aplicação da corrente, z é a valência da elemento do eletrodo (no nosso caso 1) e F é a constante de Faraday (96.485 C/mol).

No caso específico do suor, dependendo do processo utilizado para a coleta, a amostra que chega para ser analisada foi previamente diluída e isso precisa ser levado em conta. A fórmula final para a concentração de cloretos no suor do paciente é:

$$[\text{Cl}^-]_{\text{suor}} = \frac{It (V_c + V_{ad})}{F V_c V_t} \quad (5)$$

onde: V_c é o volume do suor que foi coletado, V_{ad} é o volume de água adicionada ao suor e V_t é o volume do titulado que foi colocado no equipamento.

A detecção do ponto de equivalência, que é definido como o momento em que a quantidade de Ag^+ liberada é igual ao de Cl^- na solução, é feito por um segundo par de eletrodos, chamados de eletrodos indicadores. Ao se alimentar esses eletrodos com uma tensão abaixo do potencial de decomposição da prata, a corrente circulante, na ordem de unidades a dezenas de microamperes, varia linearmente com a concentração de Ag^+ na solução. Essa técnica é conhecida como amperometria.

Para se conseguir ter um ponto de parada bem definido, antes de se colocar o analito é feita uma liberação de prata no reagente (titulação do blank). Dessa forma é criado um offset positivo na leitura dos eletrodos indicadores. Quando o analito for titulado, o ponto de parada será quando a corrente indicadora for igual à corrente final da titulação do blank. Esse método permite, também, neutralizar íons de cloreto contaminantes que eventualmente estejam no eletrólito ou depositados nos eletrodos.

Para melhorar as respostas estática e dinâmica do sistema eletroquímico, em especial dos eletrodos indicadores, o meio deve ser agitado continuamente.

Para melhorar a sensibilidade de detecção do ponto de equivalência, a reação inversa da Eq.2 deve ser inibida. Para isso, a titulação é feita em um meio contendo ácido acético e ácido nítrico, que reduz a solubilidade do cloreto de prata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O equipamento eletrônico desenvolvido é composto por três partes: um dispositivo de controle microprocessado, um agitador magnético e a montagem dos dois pares de eletrodos (figuras 1 e 2).

O dispositivo de controle (figura 3) possui um display de cristal líquido e um teclado de membrana para fazer a interface com o operador. Internamente ele possui uma fonte de corrente que alimenta os eletrodos coulométricos e uma fonte de tensão que polariza os eletrodos indicadores com uma tensão de 0,2V. As correntes das duas fontes são monitoradas continuamente durante a titulação. O *software* do microcontrolador foi desenvolvido em linguagem C e é responsável pelo controle completo do equipamento, incluindo a seleção e monitoramento da corrente nos eletrodos coulométricos, tratamento digital dos sinais adquiridos, controle do agitador, contagem do tempo da titulação e o cálculo e apresentação dos resultados.

O agitador que foi desenvolvido é do tipo magnético e foi projetado para trabalhar com um béquer de 10ml. Ele é composto de um motor e um conjunto de ímãs que, por acoplamento, fazem uma barra magnética colocada dentro do béquer girar em velocidade controlada.

O conjunto dos quatro eletrodos foram montados em um suporte que se acopla no béquer (figura 2). Os eletrodos são feitos de fio de prata com diâmetro de 1,5mm e comprimento exposto de 12mm. A disposição dos eletrodos foi definida de forma a deixar os eletrodos indicadores próximos um do outro e os eletrodos coulométricos distantes.

O equipamento permite ainda que os dados coletados sejam armazenados em um cartão de memória SD para posterior análise.



Figura 1 - Equipamento utilizado



Figura 2 – Eletrodos mergulhados na solução ácida, pode-se ver a barra magnética no fundo do béquer

A validação inicial do equipamento e da metodologia de teste foi feita com soluções preparadas de cloreto de sódio simulando amostras de suor. Foram preparados os seguintes materiais químicos consumíveis:

Reagente ácido: 1,0l água desmineralizada, 250ml ácido acético glacial, 25ml ácido nítrico concentrado a 65%.

Gelatina: 6g de gelatina diluída em 1l água desmineralizada.

Padrões: soluções aquosas de NaCl em concentrações de 1 e 10 mM.

As titulações foram feitas em um béquer de 10ml, sendo utilizados 7ml do reagente ácido e 4 gotas de gelatina. Foram então realizadas titulações de cada padrão em volumes diversos para simular as diversas quantidades de íons cloreto esperadas para a operação do equipamento. Os resultados foram comparados com os valores esperados (tabela 1).

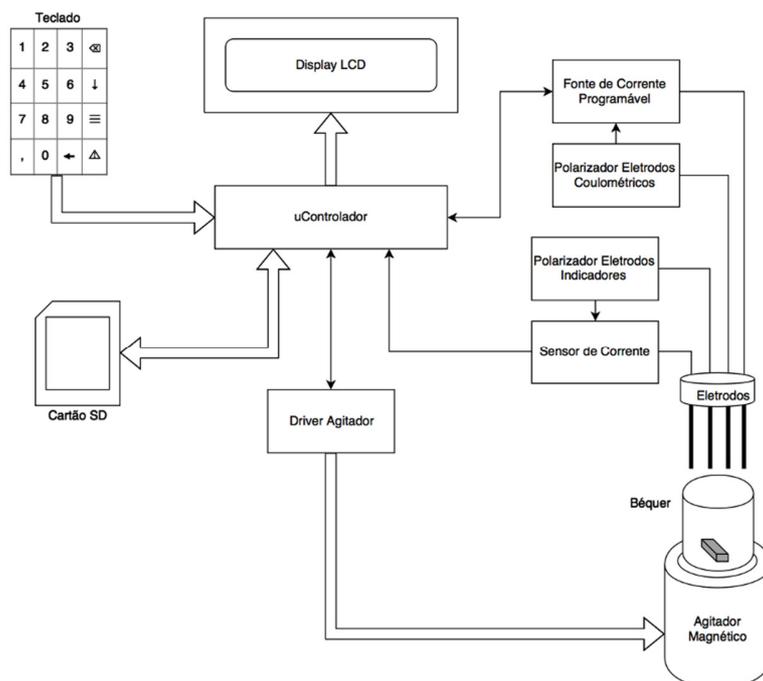


Figura 3 – diagrama em blocos do equipamento

Tabela 1. Resultados obtidos

Amostra Padrão			Medido	
Volume [ml]	Concent. [mM]	Qte Cl ⁻ [nmol]	Qte Cl ⁻ [nmol]	Erro
0,1	1	100	101	1,0%
0,25	1	250	245,2	1,9%
0,1	10	1000	974,0	2,6%
1	10	10000	9856	1,4%

4 CONCLUSÕES

Dos métodos de determinação da quantidade de cloretos em amostras de suor, o que se mostrou mais adequado para ser implementado em um equipamento foi o da coulometria. O equipamento foi projetado, montado e está em fase de testes de validação. As medidas realizadas, de forma ainda preliminar, indicam que o equipamento tem potencial para atingir os requisitos da aplicação pretendida. Mais medidas com padrões e com amostras de suor serão feitas para comprovar a repetibilidade e confiabilidade do equipamento.

REFERÊNCIAS

BORGES, P. P. et al. **O Sistema Primário de Coulometria e o seu uso na Certificação de Materiais de Referência.** Anais do ENQUALAB-2007 - Congresso da Qualidade em Metrologia. São Paulo: REMESP. 2007.

CEDERGREN, A.; JOHANSSON, G. Coulometric Trace Determination of Chloride. **Talanta**, v. 18, n. 9, p. 917-925, set. 1971.

CLSI. **Sweat Testing Sample Collection and Quantitative Chloride Analysis; Approved Guideline**. 3ª. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.

COTLOVE, E. Determination of Chloride in Biological Materials. In: GLICK, D. **Methods of Biochemical Analysis**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Inc., v. 12, 1964.

GM/MS. **Portaria N° 822**, 06 Junho 2001. Disponível em:
<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2001/prt0822_06_06_2001.html>. Acesso em: 12 fev. 2015.

KIES, H. L. Coulometry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 4, n. 5, p. 257-286, Nov. 1962.

RIBEIRO, A. F.; RIBEIRO, J. D.; RIBEIRO, M. A. G. D. O. Fibrose Cística. In: LOPEZ, A. C. **Tratado de Clínica Médica**. 1. ed. São Paulo: Roca, v. 2, 2006. Cap. 224.

SCHALES, O.; SCHALES, S. S. A Simple and Accurate Method for the Determination of Chloride in Biological Fluids. **J. Biol. Chem.**, v. 140, p. 879-884, 1941.