



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014

TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

DETECCIÓN FOTOACÚSTICA DE BIO-MARCADORES PARA EL ANÁLISIS DE METABOLITOS EN EL ALIENTO HUMANO.

Argelia Pérez Pacheco^a, Jesús Flores Mijangos^b, Antonio M. Juárez Reyes^a, Marcela Grether González^c, Enrique López Moreno^c.

^aInstituto de Ciencias Físicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 48-3, 62251 Cuernavaca, Morelos, México argeliapp@ciencias.mx,

fis.mol.icf.unam@gmail.com

^bInstituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70-543, C.P. 04510, México D.F.,

flores@nucleares.unam.mx

^cFacultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México D.F.,

RESUMEN

Los procesos de diagnóstico y monitoreo terapéutico usando análisis de aliento humano representan actualmente un área de desarrollo creciente y muy prometedora. Numerosos estudios han reportado que la presencia de ciertos componentes volátiles orgánicos (VOC's) en partes por mil-millón (10^{-9}) en el aliento humano están relacionados con algunas enfermedades como: función hepática alterada, diabetes, cáncer pulmonar. Para llevar a cabo estos estudios se han desarrollado diversas técnicas tales como: espectroscopía de masas, espectrometría de movilidad iónica, y la espectroscopía fotoacústica.

En este trabajo se presentan los avances en el desarrollo de un espectroscopio fotoacústico cuyo objetivo es permitir la detección de metabolitos en el aliento humano. La espectroscopía fotoacústica se basa en el estudio de ondas de presión generadas por luz pulsada o modulada al incidir sobre una muestra, en este caso, en estado gaseoso. El espectroscopio cuenta con un láser de CO₂ que sintoniza más de 220 líneas del espectro roto-vibracional de esta molécula, en el intervalo de 9.6 a 11.6 μm . La potencia del láser es de 11 W y es modulada con un cortador mecánico (chopper). Los cambios de presión debidos al proceso de absorción-relajación que experimenta el gas son sensados al interior de una celda a través de un micrófono de electrete operando en la región audible (20 a 20,000 Hz). La señal se amplifica vía la técnica de detección en fase.

Se presentan los resultados relacionados a la detección de alcohol metílico en dos presentaciones: grado pureza del 99.95 % e industrial. Se contempla el uso de este instrumento para el análisis del aliento de pacientes diabéticos.

1. INTRODUCCIÓN

El análisis del aliento representa un nuevo enfoque para realizar diagnósticos en medicina [1]. A diferencia de los estudios de análisis de sangre o tejidos, el de aliento es una herramienta completamente no invasiva que puede realizarse repetidamente y con frecuencia, sin ninguna carga para el paciente y sin ningún riesgo para el personal de recogida de las muestras. El aliento humano es una mezcla de componentes volátiles y no volátiles que se producen cuando el aire ambiente inhalado es expulsado de los pulmones a través de los bronquios, tráquea y cavidades nasales y orales [2]. Los principales componentes de aire exhalado son: vapor de agua, hidrógeno, amonio, monóxido de carbón, metano y trazas de componentes volátiles orgánicos (VOC's) tales



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD 5, 6 y 7 de junio de 2014 TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

como acetona, metanol y etanol, principalmente en el rango de partes-por-billón (ppb) o partes-por-trillón (ppt). La detección de ciertos VOC's proporciona una prometedora plataforma para el diagnóstico de varias enfermedades incluyendo cáncer, asma, diabetes e infecciones respiratorias [3,4].

Hoy en día, las técnicas de espectroscopia fototérmica comprenden un grupo de métodos altamente sensibles que pueden ser utilizados para detectar niveles de trazas de gases usando absorción óptica [5]. El poder de este tipo de técnicas es que se pueden realizar en tiempo real y en algunos casos, pueden ser portátiles. Una de estas técnicas es la espectroscopía fotoacústica, la cual se lleva a cabo usando luz láser y cavidades ópticas en el rango del infrarrojo medio (MIR). La fotoacústica estudia la onda de presión producida en una muestra debido a la excitación de la luz láser modulada que incide sobre ella.

Cuando se hace incidir luz modulada sobre una muestra, parte de esta energía es absorbida por el material, pasando a un estado más energético. Después de un cierto tiempo las moléculas excitadas decaerán mediante procesos de desexcitación radiativa y no radiativa. Aquellos procesos no radiativos generan calor en la región iluminada que se convierte en una expansión local y se detecta como una señal de presión. Por lo tanto, el tipo de muestra que se desea estudiar tiene que absorber en la longitud de onda de la fuente de excitación. Algunas moléculas relacionadas con el tipo de bio-marcadores de interés biomédico tienen sus frecuencias de resonancia en la región del infrarrojo (IR), además de que en esta región del espectro electromagnético, numerosas moléculas contaminantes en el medio ambiente absorben fuertemente esa radiación.

Debido a su alta potencia de salida, su capacidad de ajuste de las líneas de transiciones vibracionales fundamentales, los láseres de CO_2 y CO resultan ser ideales para la detección de trazas moleculares. En el Laboratorio de Resonancia Magnética y Luminiscencia de la Facultad de Ciencias-UNAM, hemos construido en conjunto con el Instituto de Ciencias Nucleares-UNAM, un láser de CO_2 , sintonizable en cada una de las líneas de emisión de la molécula, dentro de un alcance del IR que incluye las líneas de absorción de varias otras moléculas muestra. Cada línea de nuestro láser alcanza una potencia máxima de 15 W. De este modo, en el dispositivo experimental contamos con un enorme número de fotones IR, cuya frecuencia podemos seleccionar para que se encuentren en condiciones de transferir su energía a la muestra, de manera resonante, en condiciones de una muy reducida población presente, como sería el caso de la acetona en el aliento humano en el caso de la prediabetes, o aún peor, la diabetes. Una de nuestras metas es lograr obtener la reproducibilidad y calibración de las señales de la absorción resonante por el efecto fotoacústico el cual ya hemos observado.

Como resultados preliminares, presentamos los relacionados a la detección de alcohol metílico (CH_3OH) en dos presentaciones: grado pureza del 99.95 % e industrial. La molécula de alcohol metílico tiene la ventaja de ser un sistema que absorbe varias líneas del láser de CO_2 , siendo ideal para optimizar la operación del espectroscopio fotoacústico, posteriormente se pasara a detectar acetona, la cual se sabe está correlacionada con la presencia de diabetes mellitus tipos I y II [6].

2. TEORÍA

Cuando la luz incidente pasa a través de una cavidad, parte de esta energía es absorbida por las moléculas del gas como energía de excitación aumentando sus vibraciones. La relajación vibracional resultante produce procesos que conducen a un intercambio de energía y un eventual cambio en la temperatura del gas. Este calor genera ondas de presión que pueden ser detectadas por un micrófono. La salida del micrófono convierte esta respuesta en una señal eléctrica que es amplificada por un detector de fase (lock-in detector) el cual filtra la señal dejando pasar sólo

V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD
5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

aquella con la misma frecuencia a la que el cortador mecánico interrumpe el haz láser y con una relación de fase específica.

La ecuación 1, describe el comportamiento fenomenológico del efecto fotoacústico:

$$V = \alpha C P_i S_M c \quad (1)$$

Donde V [V] es la señal fotoacústica; α [$\text{cm}^{-1} \text{atm}^{-1}$] es el coeficiente de absorción del gas a una longitud de onda dada; C [Pa cm W^{-1}] es la constante de la celda; P_i [W] es la potencia del láser antes del chopper; S_M [V Pa^{-1}] la capacidad de respuesta del micrófono y c [atm] la presión parcial o concentración de trazas del gas [7].

3. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

La instrumentación básica de un experimento fotoacústico consiste de 3 componentes principales: una fuente de luz pulsada o modulada (lámparas, láseres con sus sistemas de modulación de luz), contenedor o celda fotoacústica donde se encuentra la muestra y el sistema de detección (transductor) [8]. Dependiendo de la elección de estas componentes, se requerirá de elementos electrónicos adicionales para la amplificación y estudio de la señal generada.

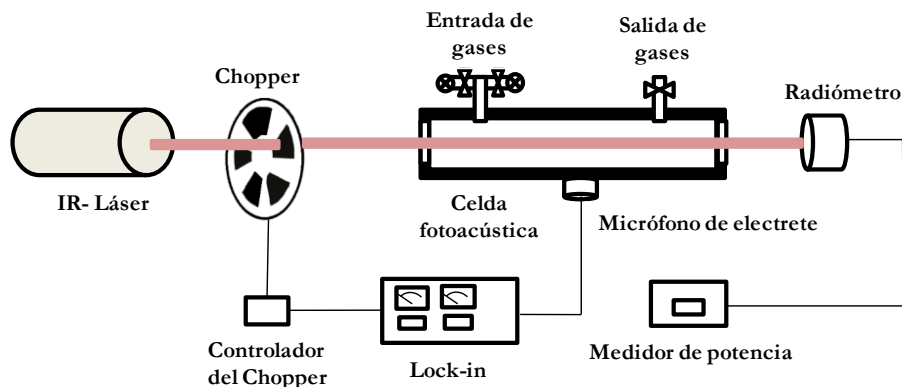


Figura 1. Diseño experimental empleado para la detección de alcohol metílico mediante espectroscopia fotoacústica.

La Figura 1 muestra el diseño experimental usado para la detección de alcohol metílico (99.95% de pureza e industrial). Como fuente de excitación se usó un láser de CO_2 sintonizado en la línea 10R38. El intervalo de operación en longitud de onda del láser es de 9.6 a 11.6 μm y su potencia máxima es de 11 W. El haz del láser fue pulsado a 222 Hz por medio de un cortador mecánico (chopper) conectado a un controlador Modelo SR540 (Standford Research System).

La celda fotoacústica, diseñada y construida en el laboratorio de Luminiscencia y Resonancia Magnética de la Facultad de Ciencias en conjunto con el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM, consiste de un tubo de cobre de 32.5 cm de largo y 5.3 cm de diámetro. En cada extremos de la celda se encuentran una ventana de ZnSe con una transmitancia del 99.5% a luz de 10.6 μm . La celda cuenta con dos aberturas, una por donde entran simultáneamente dos gases y otra por donde salen, junto a estas salidas está el medidor de presión tipo Pirani (Thermovac TM20). El detector de la señal es un micrófono condensador de electrete (Panasonic)



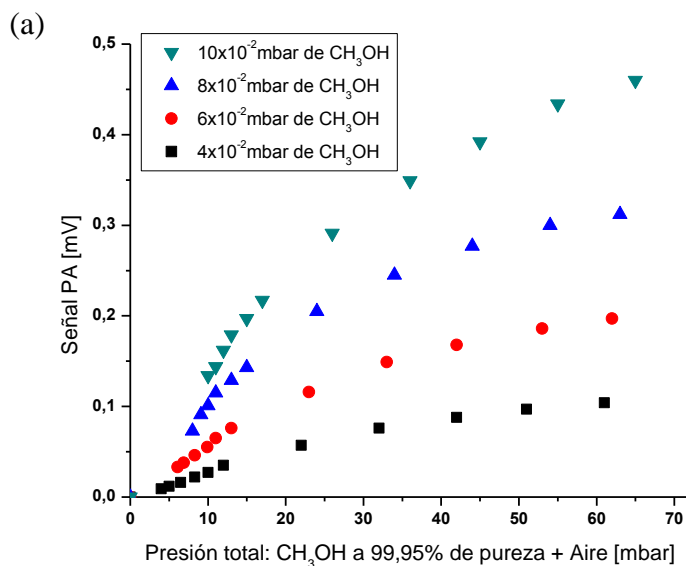
V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014

TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

Corp.) con un intervalo de frecuencias entre 20 Hz y 20 kHz, colocado a la mitad de la celda. La señal es procesada por un detector en fase (Standford Research SR530).

El proceso de medición de la señal fotoacústica es el siguiente: Se elige la línea de emisión del láser de CO_2 (10R38), cuya radiación pasa a través del cortador mecánico (chopper) para ser modulada. Luego, los pulsos de luz inciden en el interior de la celda donde la energía es absorbida por vapor del alcohol metílico aumentando la energía vibracional de las moléculas y por lo tanto la temperatura del gas. Estos pulsos de luz dan lugar a variaciones de presión del gas interno produciendo una onda de sonido. El sonido se trasforma en una señal eléctrica mediante el micrófono para luego ser procesada en el detector de fase donde se filtra. La señal efectiva registrada por el sistema será aquella que además de tener la misma frecuencia tendrá una fase específica. De esta forma se obtiene la señal fotoacústica del gas en una escala de 0 a 0.5 mV. Por lo tanto, la señal generada es directamente proporcional a la potencia incidente absorbida por el gas así como a la cantidad de alcohol metílico.



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD
5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

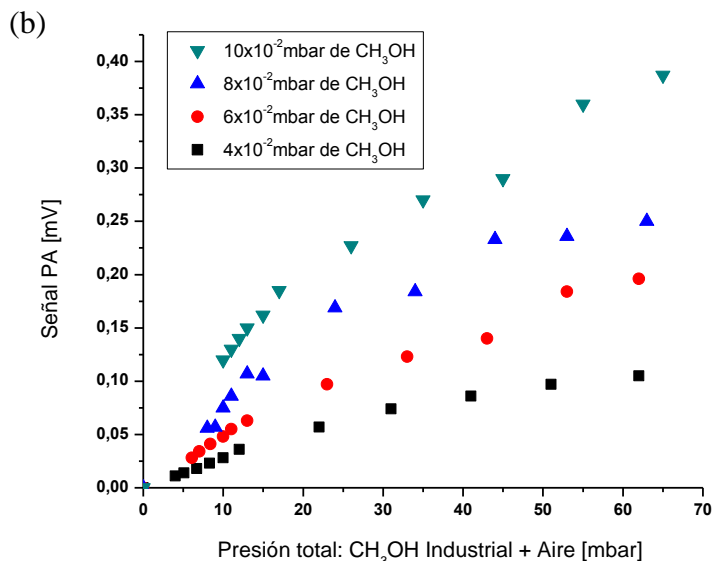


Figura 2. Señales fotoacústicas obtenidas para diferentes presiones de alcohol metílico: (a) a 99.95% de pureza (Aldrich) y (b) industrial.

En la figura 2 se presentan las curvas obtenidas de la señal fotoacústica para diferentes presiones de alcohol metílico (CH_3OH) con 99.95% de pureza (a) e industrial (b) de una mezcla con aire.

Como puede observarse en ambas gráficas, de una presión total de aire y alcohol metílico (CH_3OH), se tiene que la señal fotoacústica aumenta con la presión de gas de alcohol metílico. Esto es razonable pues al aumentar la presión del CH_3OH , aumenta también la concentración de moléculas de este gas generando una mayor absorción resonante; el aire actúa aquí como buffer de la señal fotoacústica. Por otro lado fue posible observar que si solo se introduce aire a la celda no se obtiene ninguna señal, confirmando que la señal obtenida en el espectroscopio es debido únicamente al efecto fotoacústico causado por la absorción de la luz IR incidente.

Según estos resultados la técnica fotoacústica es lo suficientemente sensible para discriminar entre las dos clases de muestras utilizadas, grado alta pureza 99.95% e industrial de alcohol metílico. Pese a que ambas gráficas tienen un comportamiento similar, las señales fotoacústicas obtenidas para el alcohol metílico industrial (Fig.2.b) tienen una respuesta ligeramente menor a las del alcohol metílico con pureza del 99.95% (Fig.2.a). Estos resultados demuestran que es posible detectar alcohol metílico así como identificar dos muestras donde la proporción en la que está presente el alcohol es diferente.

4. CONCLUSIONES

El análisis de metabolitos presentes en concentraciones típicamente ultra-diluidas en el aliento proporciona información muy valiosa sobre la bioquímica y metabolismo humanos. Distintas técnicas en el análisis de bio-marcadores se han desarrollado. En este trabajo hemos empleado el uso de un espectroscopio fotoacústico para detectar trazas de alcohol metílico en dos presentaciones: alcohol metílico al 99.95% de pureza e industrial. Esta técnica basada en la



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014

TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

absorción de la luz pulsada o modulada, mostró ser muy sensible al detectar diferencias entre las dos muestras con alcohol metílico. Estos resultados nos permiten cuantificar la presencia de CH_3OH en dos muestras diferentes. Parte de este trabajo es desarrollar este sistema espectroscópico para aplicar la técnica a la detección de metabolitos en el aliento humano y su correlación con enfermedades tales como la diabetes de manera in-situ y no invasiva.

BIBLIOGRAFÍA

1. J. Wojtas, F. K. Tittel, T. Stacewicz, Z. Bielecki, R. Lewicki, J. Mikolajczyk, M. Nowakowski, D. Szabra, P. Stefanski, J. Tarka, "Cavity-Enhanced Absorption Spectroscopy and Photoacoustic Spectroscopy for Human Breath Analysis" *Opto-Electron. Rev.*, 20 no.1, 2012.
2. Dryahina K, Smith D, Spanel P. "Quantifications of methane in humid air and exhaled breath using selected ion flow tube mass spectrometry". *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010; 24: 1296-304.
3. Anton Amann, David Smith "Volatile Biomarkers: Non-Invasive Diagnosis in Physiology and Medicine", 2013.
4. Cristina E. Davis, Michael J. Bogan, Shankar Sankaran, Mary A. Molina, Bryan R. Loyola, Weixiang Zhao, W. Henry Benner, Michael Schivo, George R. Farquar, Nicholas J. Kenyon, and Matthias Frank. "Analysis of Volatile and Non-Volatile Biomarkers in Human Breath Using Differential Mobility Spectrometry (DMS)", *IEEE Sensor Journal* 10, No. 1, 114-122, 2010.
5. Ellen Holthoff, John Bender, Paul Pellegrino and Almon Fisher, "Quantum Cascade Laser-Based Photoacoustic Spectroscopy for Trace Vapor Detection and Molecular Discrimination", *Sensor* 2010, 10, 1986-2002.
6. F. Di Francesco, R. Fuoco, M.G. Trivella, A. Ceccarini, "Breathanalysis: trends in techniques and clinical applications", *Microchemical Journal* Volume 79, Issues 1-2, January 2005, Pages 405-410
7. D. C. Dumitras, D. C. Dutu, C. Matei, A. M. Magureanu, M. Petrus, C. Popa, M. Patachia, "Measurements of ethylene concentration by laser photoacoustic techniques with applications at breath analysis", *Romanian Reports in Physics* Vol.60, No.3, 593-602, 2008.
8. Christoph Haisch, "Photoacoustic spectroscopy for analytical measurements", *Meas. Sci. Technol.* 23 (2012) 012001 (17pp).