



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

GEISA LOURANE FERREIRA BRITO

**CARACTERIZAÇÃO DE CERÚMEN POR CROMATOGRAFIA GASOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS: Uma análise exploratória de
doadores com Parkinson.**

Barreiras – BA

2022

GEISA LOURANE FERREIRA BRITO

**CARACTERIZAÇÃO DE CERÚMEN POR CROMATOGRAFIA GASOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS: Uma análise exploratória de
doadores com Parkinson.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Federal do Oeste da Bahia,
como requisito parcial para obtenção do
Diploma de Graduação no Curso de Farmácia.

Orientador: Prof. Dr^o. Raphael Contelli Klein

Coorientador: Prof. Dr^o. José Domingos Santos da Silva

Barreiras – BA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

B862 Brito, Geisa Lourane Ferreira.

Caracterização de cerúmen por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas: uma análise exploratória de doadores com Parkinson. / Geisa Lourane Ferreira Brito – 2022.

58f.

Orientador: Prof. Dr^o. Raphael Contelli Klein.

TCC (Graduação) – Bacharelado em Farmácia. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2022.

1. Biomatriz. 2. 5 α -Cholestan-3-one. 3. Diagnóstico. I. Klein, Raphael Contelli. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 616.04703

Biblioteca Universitária de Barreiras - UFOB

GEISA LOURANE FERREIRA BRITO

**CARACTERIZAÇÃO DE CERÚMEN POR CROMATOGRAFIA GASOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS: Uma análise exploratória de
doadores com Parkinson.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Oeste da Bahia, como
requisito parcial para obtenção do Diploma de
Graduação no Curso de Farmácia.

Aprovado em 29 de julho de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
 Raphael Contelli Klein
Data: 29/07/2022 20:09:49-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.º Dr.º Raphael Contelli Klein
(Orientador)

Stefania Neiva
Lavorato:0153522
4614

Assinado de forma digital p
Stefania Neiva
Lavorato:01535224614
Dados: 2022.07.29 11:20:00
-03'00'

Prof.ª Dr.ª Stefânia Neiva Lavorato
(Membro)

Documento assinado digitalmente
 GIOVANA DAMASCENO SOUSA
Data: 29/07/2022 15:37:16-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.ª Dr.ª Giovana Damasceno Sousa
(Membro)

Dedico este trabalho ao Senhor Deus, para que a luz da sua glória seja manifesta pela ciência e às pessoas que já foram ou ainda serão acometidas pelo Parkinson, não posso solucionar os transtornos que sofrem diariamente em decorrência da doença, mas, espero contribuir de algum modo para melhoria dos métodos de diagnóstico!

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus que me permitiu realizar o sonho de cursar uma universidade pública e Federal, que me alcançou com a Sua maravilhosa graça e que me deu e forças para execução deste trabalho, que me animou em cada momento difícil dentro e fora da universidade e, que colocou ao meu lado pessoas tão especiais e dispostas a me ajudar.

Agradeço aos meus pais Cleonice e Milton e a meu irmão Wesley, que me ajudaram e suportaram nesse processo, que sonharam junto comigo e colaboração para que este dia tão sonhado chegasse, mesmo quando não havia nada concreto. Agradeço aos professores que encontrei na estrada que me trouxe até aqui, que me fascinaram na busca pelo conhecimento e despertaram em mim o desejo de aprender mais, de um modo muito especial ao meu orientador Raphael e sua esposa também professora Mary Hellen, pela experiência do processo e pela oportunidade de aprendizado, pela paciência no ensino, pelas noites mal dormidas e todas as privações de lazer que passaram em função desta orientação.

Aos colaboradores, mestrandos e doutorandos Daniele Aragão, Pedro Fernando e Thamilin Nakamura e, ao meu coorientador José Domingos Netto que cooperarão arduamente para execução deste trabalho. Aos funcionários das portarias Nubia, Davi e Luzimario que sempre se mostram acolhedores mediante as barreiras que enfrentei e dispostos a ajudar, e a Universidade Federal do Oeste da Bahia - UFOB, por todas as condições para realização desta pesquisa.

Agradeço ainda aos meus amigos e colegas de curso, de forma especial a Ingrid, Manoel, Alfredo e Kacio, pois ninguém se gradua sozinho e vocês tiveram um papel de suma importância em minha graduação, no aprendizado e por trazerem um pouco de cor aos dias mais nebulosos, de forma ainda mais especial a Bruna, minha amiga e dupla de estudos, trabalhos, atividades, sofrimentos e alegrias que suportou comigo cada fase dessa jornada. Agradeço também aos meus colegas de universidade, com muito carinho à ABU.

Agradeço ainda aos meus familiares, avós, tios, tias, primos e primas que torceram por mim e por muitas vezes me ajudaram a enxergar meu potencial, por ótica muito particular, me fazendo acreditar que barreiras existem para serem ultrapassadas e não para impedir o caminho!

*“Quanto mais eu estudo a natureza,
mais eu fico maravilhado com as
obras do Criador. A ciência me
aproxima de Deus.”*

Louis Pasteur

RESUMO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) 1% da população acima dos 65 anos sofre de uma doença neurodegenerativa ainda incurável, conhecida como Doença de Parkinson (DP), cujo diagnóstico é demorado, invasivo e oferece risco radiológico ao paciente e, que apesar dos esforços empregados, ainda não dispõe de perspectiva laboratorial. O presente trabalho caracterizou o cerúmen humano de doadores saudáveis em comparação com doadores acometidos por DP, a fim de propor uma análise exploratória preliminar. Para isto, os componentes amostrais de cerúmen humano, foram separados em cromatógrafo gasoso e os analitos analisados em espectrômetro de massas no modo Scan, que por sua vez resultaram em cromatogramas que permitiram identificar 37 analitos. Exclusivamente em amostras de doadores com DP foi detectado o derivado do colesterol denominado 5 α -Cholestan-3-one. Esse composto se destaca, pois pode estar aumentado em desordens metabólicas como a Doença de Parkinson. Paralelamente, detectou-se em 7 das 13 amostras analisadas, a presença do canabidiol (2-p-menta-1,8-dien-3-il-5-pentil-,(-)-(E)-resorcinol), sugerindo que este método pode ser empregado em análises toxicológicas utilizando cera de ouvido para detecção de *Cannabis sativa*, bem como dosagem dos fármacos derivados desta espécie. Embora este estudo tenha utilizado um número limitado de amostras, os resultados obtidos demonstraram que a cera de ouvido pode representar uma biomatriz promissora a ser explorada para o diagnóstico da Doença de Parkinson.

Palavras-chave: Biomatriz. 5 α -Cholestan-3-one. Diagnóstico. Cera de ouvido.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO) 1% of the population over 65 years old suffers from a still incurable neurodegenerative disease, known as Parkinson's Disease (PD), whose diagnosis is time consuming, invasive and offers radiological risk to the patient and, despite of the efforts employed, does not yet have a laboratory perspective. The present work characterized the human cerumen of healthy donors in comparison with donors affected by PD, in order to propose a preliminary exploratory analysis. For this, the sample components of human cerumen were separated in a gas chromatograph and the analytes analyzed in a mass spectrometer in Scan mode, which in turn resulted in chromatograms that allowed the identification of 37 analytes. Exclusively in Parkinson's samples, the cholesterol derivative called 5 α -Cholestan-3-one was detected. This compound stands out as it may be increased in metabolic disorders such as Parkinson's disease. At the same time, the presence of cannabidiol (2-p-mentha-1,8-dien-3-yl-5-pentyl-,(-)-(E)-resorcinol) was detected in 7 of the 13 analyzed samples, suggesting that this method can be used in toxicological analysis using ear wax for detection of *Cannabis sativa*, as well as dosage of drugs derived from this species. Although this study used a limited number of samples, the results obtained showed that earwax may represent a promising biomatrix to be explored for the diagnosis of Parkinson's Disease.

Key words: Biomatrix. 5 α -Cholestan-3-one. Diagnosis. Earwax.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP	Doença de Parkinson
CBD	Canabidiol
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
g	Grama
mg	Miligrama
min	Minuto
EM	Espectrometria de Massas
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RM	Ressonância Magnética
SBGG	Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia
SD	Saudáveis
SIM	Select Ion Monitoring
THC	Tetrahydrocannabinol
UFOB	Universidade Federal do Oeste da Bahia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Corte Coronal do cérebro com visualização de núcleos da base.	16
Figura 2 - Anatomia do canal auditivo.	18
Figura 3 - Representação esquemática de um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas.	21
Figura 4 - Representação gráfica de um cromatograma.	22
Figura 5 - Esquematização do modo de operação de um analisador do tipo quadrupolo.	23
Figura 6 - Comparação entre os espectros produzidos pelo modo de varredura SCAN e pelo modo SIM respectivamente.	24
Figura 7 - Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas.	27
Figura 8 - Cromatograma da cera de ouvido no teste 1.	30
Figura 9 - Cromatograma da cera de ouvido no teste 2.	30
Figura 10 - Cromatograma da cera de ouvido no teste 3.	31
Figura 11 - Cromatograma da cera de ouvido no teste 4.	31
Figura 12 - Cromatograma para exemplo do tempo de eluição dos compostos detectados no cerúmen.	33
Figura 13 - Sobreposição dos espectros cromatográficos de doadores saudáveis e doadores com DP.	33
Figura 14 - Estrutura química da molécula de 2-p-menta-1,8-dien-3-il-5-pentil-(-)-(E)-resorcinol encontrada no cromatograma do cerúmen de alguns doadores.	38
Figura 15 - Gráfico de distribuição das substâncias encontradas no cerúmen de doadores saudáveis e acometidos por DP.	40

LISTA DE SÍMBOLOS

°C Graus centígrados

μ Micro

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Proporções testadas dos solventes extratores.	31
Tabela 2 - Compostos encontrados no cerúmen de doadores acometidos por DP, e doadores saudáveis.	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON	15
2.2 O CERÚMEN HUMANO	18
2.3 A CERA COM DIAGNÓSTICOS DE DOENÇAS	19
2.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS	20
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4. 1. MATERIAIS	26
4.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DO CERÚMEN	27
4.3 MÉTODO ANALÍTICO	28
4.3.1 Determinação dos analitos	28
4.3.2 Preparo das amostras	28
4.3.3 Análise em CG-EM	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO	29
5.2 RESULTADOS ANALÍTICOS	32
5.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS MOLÉCULAS ENCONTRADAS EM PESSOAS SAUDÁVEIS E ACOMETIDAS POR PARKINSON	39
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	52

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 1% da população acima dos 65 anos sofre de uma doença neurodegenerativa e ainda incurável, conhecida como Doença de Parkinson (DP). Causada por um mecanismo elucidado por Hornykiewicz, em 1960, a DP é responsável, principalmente, pela degeneração das áreas do cérebro que recebem o nome de substância nigra e núcleo caudado, onde estão localizados os neurônios dopaminérgicos, causando assim tremores nos doadores, alterações na fala e no equilíbrio, rigidez muscular e letargia nos movimentos.

De acordo com Sato (2017), apesar dos esforços empregados pela ciência, os métodos de diagnóstico disponíveis até o momento ainda são invasivos, demorados e pouco precisos, de modo que se faz necessário a busca por um método que possa trazer um diagnóstico mais assertivo e, preferencialmente, não invasivo. Sugere-se que, um importante ponto de partida na busca por um diagnóstico laboratorial para doenças, como a de Parkinson, seja a caracterização de moléculas presentes em fluidos biológicos em busca daquelas com potencial para biomarcadores.

Dentre os fluidos biológicos que podem ser empregados, está o cerúmen, uma matriz biológica ainda pouco explorada, porém com grande potencial para demonstrar as alterações homeostáticas do indivíduo (BARBOSA et al., 2019). Produzido por um processo natural, é uma substância cerosa, estável e com capacidade de bioacumular traços da mudança do funcionamento normal do corpo, além de apresentar uma coleta fácil, rápida e indolor e com pouco risco de contaminação (DAMASCENO, 2013).

Para a caracterização da cera de ouvido uma importante e poderosa ferramenta analítica que pode ser empregada é a cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), uma técnica analítica sensível, robusta e precisa (SKOOG et al., 2015). Essa técnica vem ganhando cada vez mais espaço, principalmente na área da saúde, na realização de exames e testes para qualificar as alterações na homeostase do indivíduo e para análise de fluidos corporais (CANEVER; NAZÁRIO, 2019). Uma das principais características CG-EM é a sua alta sensibilidade e especificidade para a identificação molecular das amostras (SKOOG et al., 2015).

Isso posto, o presente trabalho realizou uma caracterização molecular do cerúmen, tanto de doadores sadios quanto daqueles diagnosticados com a doença de Parkinson, utilizando uma técnica de extração sólido-líquido, aliado ao método analítico de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. A identidade molecular da cera de ouvido de doadores saudáveis e aqueles acometidos por DP foram qualificadas e comparadas, visando dar início a um primeiro passo para um diagnóstico mais assertivo e menos invasivo para a doença de Parkinson.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo. De acordo com dados de 2014 do Ministério da Saúde, estima-se que em média existam de 100 a 200 casos a cada 100.000 habitantes, ocorrência esta que se deve a sua distribuição universal, não fazendo distinção entre as classes socioeconômicas, gênero ou etnia (BRASIL, 2017).

A DP é uma condição neurodegenerativa, progressiva e de intensidade variável, ainda sem prognóstico de cura, que afeta principalmente a neurotransmissão dopaminérgica nos gânglios da base na substância nigra em sua parte compacta e do núcleo caudado, também chamada de estriado. (LIAN, 2019; SATO, 2017; SILVA et al., 2020). Essa degeneração é evidenciada pela morte das células neuronais da camada ventral da parte compacta da substância nigra e do corpo estriado (formados pelo putamen e o núcleo caudado), globo pálido e núcleo subtalâmico, apontados na figura 1, bem com a presença de corpos de Lewy (HAUSER, 2020, SATO, 2017). Este processo é agravado com o envelhecimento pois a perda de neurônios dopaminérgicos é um fenômeno que se dá naturalmente com o avanço da idade (SOUZA, 2011).

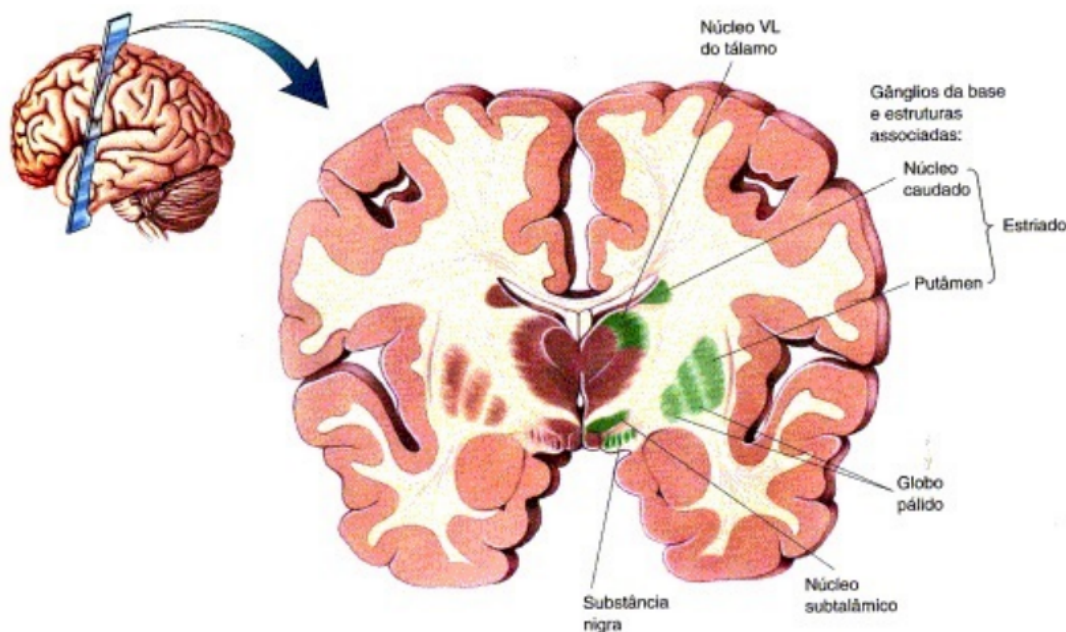


Figura 1 - Corte Coronal do cérebro com visualização de núcleos da base. Nesta figura são mostradas, através de um corte coronal, as áreas mais susceptíveis à degradação neuronal que são provocadas pela doença de Parkinson.

Fonte: SATO (2017).

Em estudo Silva e colaboradores (2020), apontaram que o mecanismo de morte neuronal está relacionado ao desbalanço resultante da redução da atividade de moléculas antioxidante, que leva ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), especialmente ao ânion radical superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esse desequilíbrio provavelmente resulta na liberação de fatores pró-inflamatórios e de necrose, por consequência na ativação do processo de apoptose celular devido a ativação das células de defesa atuantes na região cerebral, pelo estresse oxidativo (CAMARGO FILHO et al., 2019).

O processo degenerativo passa a produzir um conjunto de sinais manifestados através de distúrbios motores, como: tremores de repouso, sobretudo das mãos; bradicinesia; rigidez muscular do tipo plástica ou cética; assim como instabilidade postural por perda de reflexos posturais e cognitivos como os da fala (GONÇALVES, 2017; SILVA et al., 2020).

Segundo a Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia (SBGG) (2021), o diagnóstico é um desafio, por não existirem testes ou exames capazes de identificar marcadores sorológicos da DP, associando a isto, está a dificuldade de identificação de sinais clínicos, que podem facilmente ser relacionados a outras patologias, por

este motivo não é incomum que o diagnóstico somente seja possível após 2 a 3 anos do início dos sintomas (SATO 2017; SBGG, 2021).

Atualmente o diagnóstico da DP é baseado em suas características clínicas a partir do histórico do paciente e do exame neurológico (POSTUMA et al., 2015). No mínimo, bradicinesia e tremor ou rigidez devem estar presentes para considerar o diagnóstico clínico de DP. Além disso, uma boa resposta à terapia dopaminérgica é uma importante característica de suporte do diagnóstico. A instabilidade postural também é uma característica da DP, mas geralmente é um sintoma tardio da doença. Assim, os doadores com sinais parkinsonianos que exibem instabilidade postural no início do curso da doença provavelmente têm outra forma de parkinsonismo (POSTUMA et al., 2015).

A ressonância magnética (RM) é razoável para excluir imitações raras e inesperadas da DP, como acidente vascular cerebral ou hidrocefalia, além de ser útil em doadores com achados clínicos que sugerem parkinsonismo atípico, mas dispensável em doadores com apresentação clássica de DP, sem outros sinais neurológicos e com boa resposta à terapia com levodopa (STERN et al., 1989).

Técnicas de ressonância magnética mais avançadas, incluindo volumetria de RM, espectroscopia de ressonância magnética, imagem de transferência de magnetização, ressonância magnética ponderada em difusão, ressonância magnética com tensor de difusão e imagem de alta resolução (por exemplo, ressonância magnética a 7 Tesla), são métodos promissores que podem oferecer maior sensibilidade do que a ressonância magnética convencional para detectar os correlatos de neuroimagem da neurodegeneração da DP e para separar a DP idiopática de síndromes parkinsonianas atípicas (VAILLANCOURT et al., 2009).

Desse modo, para um diagnóstico conclusivo, após a identificação dos sinais e sintomas clínicos, assim como a exclusão de outras doenças são ainda necessários exames de natureza invasiva como a punção lombar para análise do líquido cefalorraquidiano e exames que expõem o paciente a altos níveis de radiação, como é o caso das ressonâncias magnética e tomografias computadorizadas (BRASIL, 2022).

2.2 O CERÚMEN HUMANO

A orelha é anatomicamente dividida em três pavilhões, a saber, ouvido externo, ouvido médio e ouvido interno, como pode ser observado na figura 2 (DAMASCENO, 2013). Na terceira parte do ouvido externo, é produzida uma substância cerosa, de forma natural e completamente saudável, conhecida como cerúmen ou apenas cera de ouvido, cuja função é manter o tímpano flexível e lubrificado, assim como impermeabiliza e limpa o canal auditivo externo (DAMASCENO et al., 2015). Também já foi reportado que o cerúmen pode apresentar atividade antimicrobiana (PROKOP-PRIGGE et al., 2014).

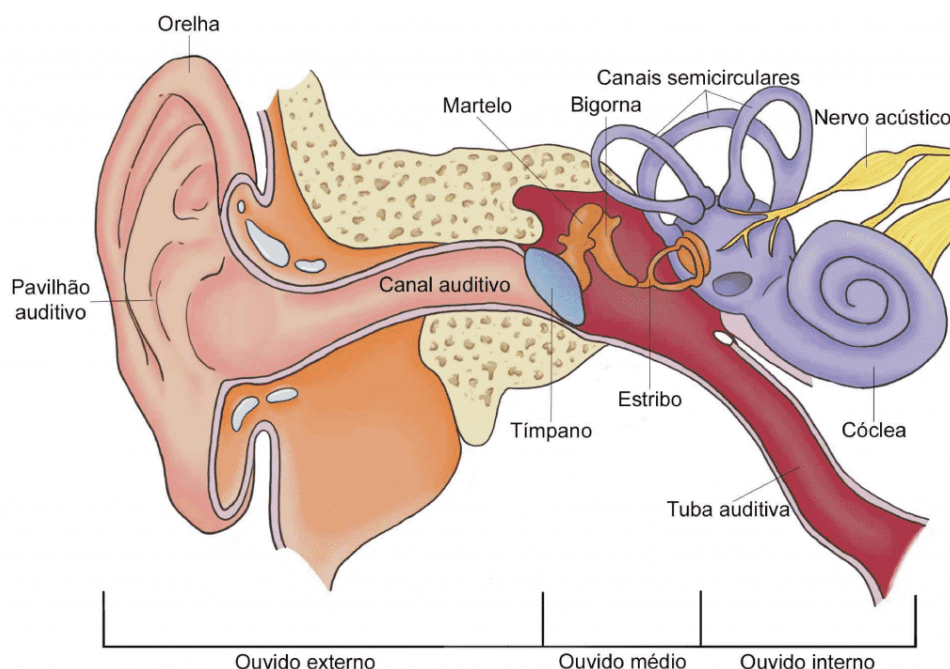


Figura 2 - Anatomia do canal auditivo. Nesta imagem é possível observar as divisões anatômicas, bem como os órgãos que constituem o ouvido humano, de modo a demonstrar o canal auditivo, local de excreção do cerúmen.

Fonte: Barbosa e Pannanzio (2017).

A cera de ouvido, é uma mistura de secreções, cerosas e amareladas, produzidas por glândulas sudoríparas especializadas, e material gorduroso advindo de glândulas sebáceas, sugerindo uma grande semelhança com a constituição do suor (SHOKRY et al., 2017). Em sua composição estão presentes basicamente água, ureia, imunoglobulinas, álcoois de cadeia longa, hidrocarbonetos, colesterol, triglicerídeos, lisozima, glicopeptídeos, ácidos graxos, ácido cerótico e outros elementos como compostos de nitrogênio, diterpenos e esteróides por exemplo

(DAMASCENO et al., 2015). Essa mistura de secreções que compõem o cerúmen de humanos e animais, é constituída também de metabólitos orgânicos, isto é, compostos produzidos durante o metabolismo e a degradação celular (BARBOSA et al., 2019).

O metabolismo celular pode, em algumas condições patológicas, produzir radicais livres como as espécies reativas de oxigênio (EROs), que liberados atacam muitas estruturas celulares (incluindo RNA e DNA), e que quando se acumulam em tecidos, destróem muitas moléculas diferentes, dando origem à variadas classes de metabólitos (BARBOSA et al., 2019; MARTELLI e NUNES, 2014). A produção de EROs está associada à maioria das condições inflamatórias nas células e seus produtos derivados manifestam-se em diferentes níveis em condições celulares anormais, podendo ser acumulados em várias biomatrizes, como na urina, fezes, suor, lágrimas, saliva, hálito e cerúmen (BARBOSA et al., 2019).

Sabe-se que a produção de cera de ouvido aumenta gradativamente com a idade (BESDINE, 2019), mas isto também pode acontecer devido a doença de Parkinsons (SILVA et al., 2020).

2.3 A CERA COMO DIAGNÓSTICOS DE DOENÇAS

A literatura disponível demonstra que o cerúmen pode fornecer quantidades amostrais suficientes para vários ensaios. Além disso, acredita-se que a cera pode servir como um indicador da história cumulativa de mudanças fisiológicas que ocorrem no período que precede a coleta de amostra (até algumas semanas) que é o tempo recomendado para o acúmulo da amostra (SHOKRY et al., 2017).

O cerúmen apresenta inúmeras vantagens em relação às outras matrizes biológicas já utilizadas, pois é uma amostra fácil para coletar, por ser extraída de forma indolor e com menor risco de contaminação externa em comparação ao pelo e ao suor por exemplo, devido à localização na parte interna do aparelho auditivo como mostrado também na figura 2. Embora seja uma fonte de excreção concentrada de metabólitos polares e não polares, adequados para rastrear mudanças de longo prazo, essa matriz ainda tem sido pouco explorada (BARBOSA et al., 2019).

Considerando as evidências científicas apresentadas, alguns autores vêm buscando utilizar cera de ouvido para o diagnóstico de diversos tipos de câncer, como Linfomas, Carcinomas e Leucemias, desde os estágios iniciais até os mais

avançados. Essa matriz biológica também tem sido empregada para o diagnóstico de diabetes mellitus (tipos 1 e 2), por meio da identificação de biomarcadores (BARBOSA et al., 2019; SHOKRY et al., 2017).

2.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Dentre os diversos tipos de cromatografia, uma das mais utilizadas é a cromatografia gasosa, uma técnica de separação de misturas de compostos volatilizados, os quais são distribuídos em duas fases: 1) uma fixa denominada estacionária (FE) que pode ser sólida ou líquida e a 2) outra móvel (FM) constituída de um gás de arraste com alto grau de pureza, cuja vazão é controlada, esta por sua vez elui o analito, após vaporização da amostra, sem interagir com ela, com o objetivo de identificar, quantificar ou obter a substância pura (Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde, 2016; SKOOG et al., 2015).

A separação dos compostos acontece de acordo com a interação entre a espécie e a fase estacionária (SKOOG et al., 2015), de forma que a molécula do analito é adsorvida ou particionada na superfície do sólido ou líquido da FE, respectivamente, por interações com as forças de Van Der Waals. A separação acontece quando essas interações são “quebradas” por meio do gradiente de temperatura, tornando as espécies mais solúveis ao gás de arraste promovendo a eluição com auxílio da força que este emprega (AMORIM, 2019).

A quantidade de amostra a ser injetada nas colunas também necessita de atenção, pois a injeção de amostras muito volumosas pode promover o espalhamento das bandas o que promove uma baixa resolução. Geralmente as colunas capilares necessitam de amostras menores, isto é, um fator de 100 ou maior por exemplo (SKOOG et al., 2015). A temperatura ótima de operação da coluna é outro fator importante na eluição, e está intimamente ligada ao ponto de ebulição da amostra e do grau de separação requerido, por este motivo, amostras muito complexas, com grande faixa de eluição requerem um gradiente de temperatura (SKOOG et al., 2015).

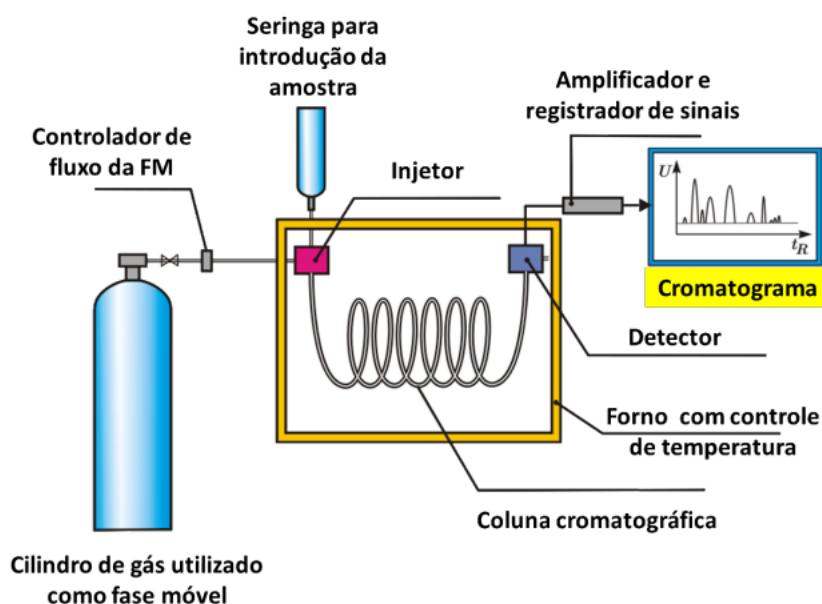


Figura 3 - Representação esquemática de um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas. Nessa figura, estão dispostos os componentes do equipamento, de modo a exemplificar o funcionamento do mesmo.

Fonte: PEDROSA (2018).

Após o devido tratamento, a amostra é inicialmente introduzida no cromatógrafo através do injetor, ilustrado na figura 3, sendo direcionada para a coluna cromatográfica contendo a FE. Essa coluna é mantida dentro do forno que varia a temperatura de acordo com o gradiente programado. Após a separação os alvos analíticos seguem para o detector presente no equipamento, dentre os quais está o espectrômetro de massas (AMORIM, 2019).

A espectrometria de massas é uma importante ferramenta para análises instrumentais, usada para caracterizar a composição molecular através das massas dessas moléculas que são fracionadas por uma fonte iônica (CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, 2016; GOMES, 2015), sendo capaz de medir a razão massa/carga (m/z) desses íons que são produzidos pela amostra (SKOOG et al., 2015). Os resultados são expressos, no software, graficamente por meio de cromatogramas, a exemplo tem-se a figura 4, que apresenta um cromatograma, no qual cada pico representa uma molécula específica.

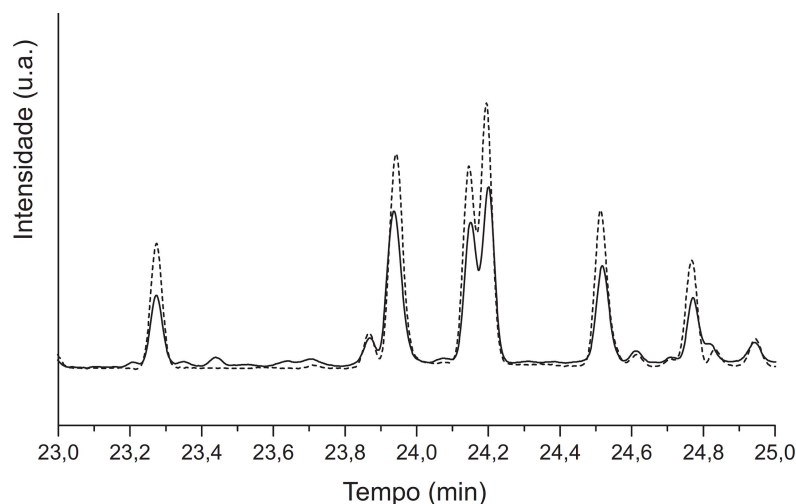


Figura 4 - Representação gráfica de um cromatograma. O eixo Y representa a intensidade em unidades de absorvância (μ .a.) e o eixo x representa o tempo. No gráfico pode-se observar os diferentes picos obtidos em um exemplo de análise.

Fonte: SANTOS (2015).

A técnica de EM está baseada na indução da excitação molecular de modo a promover a ionização destas. Entre os métodos utilizados está o mais comum a ionização por elétrons (Electron Ionization - EI), no qual, um feixe de elétrons é produzido a partir do aquecimento de um filamento de tungstênio juntamente com a aplicação de aproximadamente 70 eV entre o filamento, que atua como um catodo, e um anodo. Na colisão entre o feixe eletrônico e a molécula é gerado o íon molecular (GOMES, 2015).

O EM é composto basicamente por um sistema de entrada da amostra, uma fonte de ionização, um analisador de massa, um detector, um processador de dados e um sistema de vácuo com a finalidade de criar baixas pressões para evitar influência de compostos atmosféricos na análise. Os analisadores de massas são a parte responsável do espectrômetros por separar os íons em função da sua m/z , essa separação por sua vez pode gerar uma transmissão seletiva dos íons, podendo ser ajustadas para transmitir apenas um íon de interesse (GOMES, 2015; IGLESIAS, 2020).

Entre os analisados disponíveis, um dos mais utilizados é o tipo quadrupolo, devido ao fato de ser mais simples, fácil de entender e operar, relativamente mais barato e por possuir boa linearidade em análises quantitativas. Esse analisador é composto de dois pares de barras de metal emparelhadas, enquanto um recebe um potencial elétrico positivo que age como um filtro para massas maiores, o outro

recebe, um potencial negativo que atua como um filtro para massas pequenas (FERNANDO, 2013), como é possível observar na figura 5.

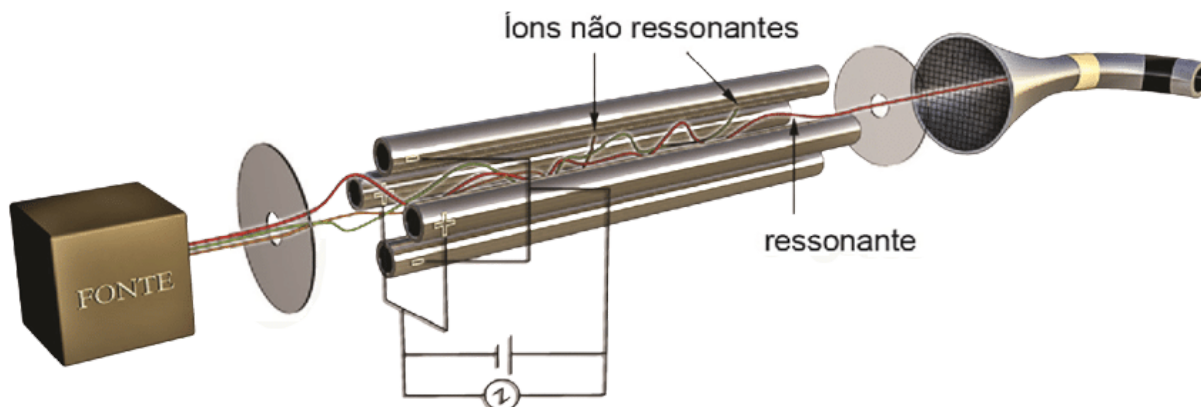


Figura 5 - Esquemática do modo de operação de um analisador do tipo quadrupolo. Esta figura mostra a instrumentação de analisador quadrupolo, nela estão dispostos a fonte de ionização e os dois pares de barras de metal emparelhados que funcionam como filtros para separação das moléculas por massa.

Fonte: FERNANDO (2013).

O analisador quadrupolo pode realizar dois tipos de variedades diferentes. A primeira configura o modo seleção (Select Ion Monitoring - SIM), que se atém a um espectro de massas conhecido ou o modo varredura Scan (IGLESIAS, 2020). O segundo tipo de varredura, o modo Scan, detecta todos os íons presentes na amostra, no intervalo de m/z determinado pelo operador do equipamento, e, com isso, apresenta maior capacidade investigativa nas análises de natureza qualitativas, que buscam revelar a identidade molecular da alíquota em estudo. A figura 6 faz uma comparação entre os espectros produzidos pelo modo Scan e pelo SIM (CHIARADIA et al., 2018).

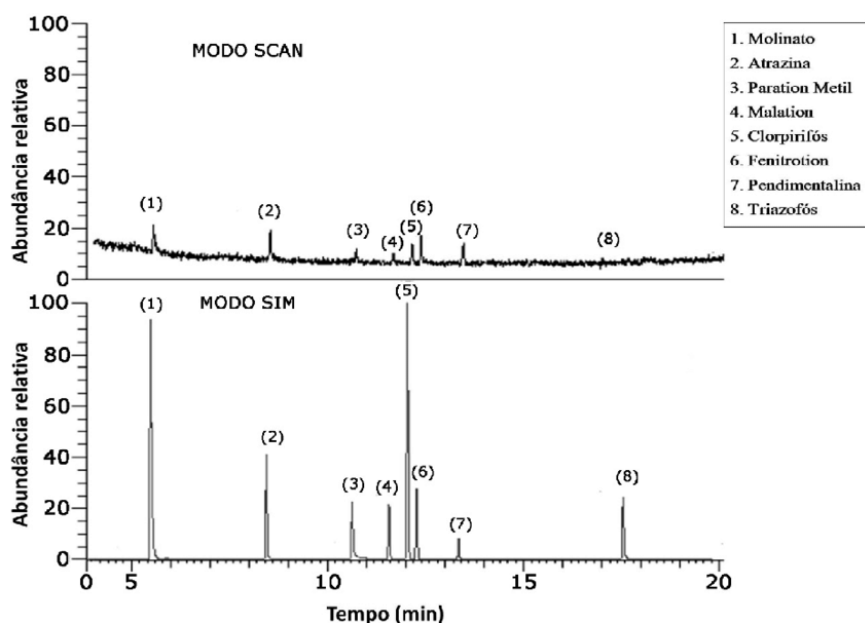


Figura 6 - Comparação entre os espectros produzidos pelo modo de varredura Scan e pelo modo SIM respectivamente. Os gráficos acima são representações dos modos de varredura SIM e Scan, onde, em ambos o eixo y representa a absorbância e o eixo x representa o tempo (em minutos); neles é possível observar a variação da amplitude dos picos.

Fonte: NASCIMENTO (2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma análise exploratória do cerúmen de doadores acometidos pela Doença de Parkinson utilizando CG-EM, de modo a qualificar as moléculas identificadas, comparando-as com o cerúmen de doadores saudáveis.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o cerúmen de indivíduos acometidos pela Doença de Parkinson, utilizando a técnica analítica de CG-EM;
- Caracterizar o cerúmen de indivíduos saudáveis, utilizando a técnica analítica de CG-EM;
- Comparar as moléculas encontrados nas amostras de pessoas saudáveis e diagnosticadas com DA;
- Determinar as condições mais adequadas para o tratamento pré-análise da amostra;
- Realizar uma análise exploratória dos dados obtidos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Destaca-se que todos os procedimentos foram realizados após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFOB (CAAE: 30062720.8.0000.5026).

4.1 MATERIAIS

UTENSÍLIOS:

- Cureta metálica;
- Microtubos;
- Hexano (J.T. Baker);
- Acetona (J.T. Baker);
- Sulfato de sódio anidro (Alphatec);
- Ácido sulfúrico (Dinâmica);
- Micropipetas;
- Vials;
- Tubo de ensaio;
- Béqueres;
- Vidro de relógio;
- Espátulas metálicas;
- Pinças metálicas;
- Estante para tubo de ensaio.

EQUIPAMENTOS:

- Freezer -80°C;
- Vórtex (modelo K45-2820, Kasvi);
- Cromatógrafo gasoso acoplado com espectrômetro de massas, (modelo GCMS-QP2020, Shimadzu);
- Centrífuga (modelo CT - 0603, Parsec);
- Banho maria (Quimis);
- Balança analítica (modelo ay220, Shimadzu).

4. 2 COLETA E ARMAZENAMENTO DO CERÚMEN

A cera foi coletada de 18 indivíduos de ambos os sexos, de acordo com a disponibilidade dos voluntários. A coleta do cerúmen foi realizada por uma médica otorrinolaringologista, com uma cureta metálica em ambas as orelhas por meio de movimentos de raspagem e acondicionado em criotubos devidamente etiquetados. Os criotubos foram tampados e levados para a refrigeração em um freezer a -80 °C.

Para que o material pudesse atingir uma quantidade suficiente para realização dos testes, definida com base na literatura em 20 mg, os voluntários foram instruídos a não limparem o ouvido interno por pelo menos 10 dias, e orientados a não usar perfumes ou derivados afins, principalmente aqueles aplicados em jatos de spray próximo as orelhas para que não haja risco de contaminação, por pelo menos, três dias antes da coleta assim como não lavar os cabelos no dia em que se submeteram a coleta.

4.3 MÉTODO ANALÍTICO

4.3.1 Determinação dos analitos

Os analitos foram determinados por cromatógrafo gasoso acoplado com espectrômetro de massas, modelo GCMS-QP2020, Shimadzu (Kyoto, Japão), de quadrupolo simples,

com injetor split/splitless. Para a separação cromatográfica foi utilizada coluna capilar (DB-5, 5% fenil, 95% metilsiloxano, Shimadzu) de sílica fundida como fase estacionária (30 m × 0,25 mm e 0,25 µm). O CG-EM utilizado no presente estudo é mostrado na figura 7.



Figura 7 - Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas. Esta figura mostra o equipamento disponível no laboratório 114 da Universidade Federal do Oeste da Bahia - UFOB, *campus* Reitor Edgard Santos.

4.3.2 Preparo das amostras

Para análise dos compostos presentes na cera de ouvido, uma matriz complexa composta majoritariamente por ácidos graxos, primeiramente realizou-se testes de extração baseados na metodologia proposta por Souza et al. (2020).

O preparo de amostras foi feito pesando-se 10 mg de cera de ouvido em um vidro de relógio, transferindo posteriormente para um tubo de ensaio e adicionado 6 mL de uma combinação binária de solventes orgânicos, a saber 4 mL de hexano e 2 mL de acetona. A mistura foi agitada em vórtex (modelo K45-2820, Kasvi) por 5 minutos e centrifugada por 2 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi retirado e

transferido para outro tubo de ensaio, onde foram adicionados 2 g de sulfato de sódio, para retirada de umidade do extrato. Seguiu-se centrifugando a solução por 2 minutos a 300 rpm. O sobrenadante foi novamente coletado, transferido para um frasco âmbar de 5 mL.

Para a etapa de concentração, o extrato presente no frasco âmbar foi posto para secar em banho maria a 40 °C. Após a secagem total, foi então ressuspendido em 1 mL de hexano, transferido para um tubo de ensaio, onde foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico para digestão dos ácidos graxos presentes na amostra, deixando os outros compostos disponíveis no solvente. Em seguida, a solução foi centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi então transferido para um vial e injetado no CG-EM.

4.3.3 Análise em CG-EM

As condições ideais de trabalho basearam-se nos resultados obtidos por Rêgo et al. (2021). A rampa de temperatura iniciou em 60 °C e permaneceu durante 1min⁻¹, de 60 para 150 °C a 5 °C min⁻¹, permanecendo por 2 min, seguida do aumento de 5 °C min⁻¹ até 220 °C (durante 2 min), finalizando com 5 °C min⁻¹ até 300 °C durante 2 min, totalizando 55 minutos. Foi utilizado modo de injeção splitless de 1,0 µL de volume de amostra, com temperatura do injetor em 300 °C, tempo de purga de 0,75 min, hélio (99,999% de pureza) como gás de arraste e vazão na coluna constante de 1,0 mL min⁻¹. A linha de transferência e a fonte de íons operaram em temperatura de 300 °C, com energia de impacto de elétrons de 1,0 kV. O método foi desenvolvido em modo Scan.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Como um primeiro passo para a realização de uma análise exploratória da cera de ouvido por CG-EM, foram realizadas diferentes combinações de solventes para extração de modo a encontrar as melhores condições para o estudo da cera. Como ponto de partida utilizou-se a metodologia proposta por Souza e colaboradores (2020), que trabalhou com a extração de compostos Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), em leite humano, uma matriz biológica, rica em ácidos graxos. Apesar de possuir uma relativa similaridade com a composição química do leite, o cerúmen possui uma composição mais rica em ácidos graxos (MELZER, 2019), o que demandou proporções diferentes de solvente extratores conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Proporções testadas dos solventes extratores.

Condições de Análise			
Teste	Hexano (mL)	Acetona (mL)	Proporção (v:v)
1	5	1	5:1
2	4	2	2:1
3	3	3	1:1
4	2	4	1:2

Fonte: Dados gerados a partir dos testes realizados para otimização dos métodos de extração.

Ao se analisar os perfis cromatográficos que resultaram das extrações das diferentes combinações de solventes utilizadas para a extração (figuras 8, 9, 10 e 11), observou-se que os testes 2 (figura 9) e 4 (figura 11) apresentaram uma maior quantidade de picos e uma boa separação entre eles. Mas a proporção de 2:1 (v/v) hexano:acetona era mais eficiente para extração dos componentes do cerúmen, uma vez que resultou em picos maiores e mais separados que as demais combinações de solventes, indicando uma maior concentração dos compostos extraídos.



Figura 8 - Cromatograma da cera de ouvido no teste 1. O espectro apresenta o perfil cromatográfico da alíquota de 10 ug de cera de ouvido após o processo de extração utilizando-se a proporção de 5 mL de hexano para 1 mL de acetona.

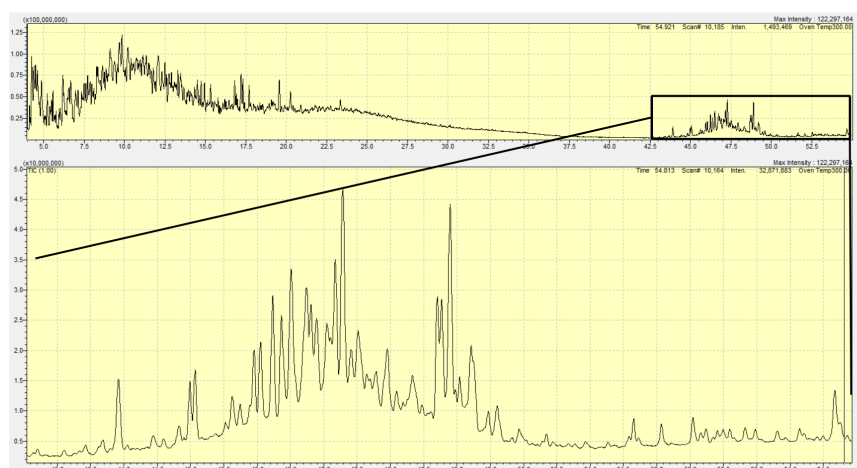


Figura 9 - Cromatograma da cera de ouvido no teste 2. O espectro apresenta o perfil cromatográfico da alíquota de 10 ug de cera de ouvido após o processo de extração utilizando-se a proporção de 4 mL de hexano para 2 mL de acetona.

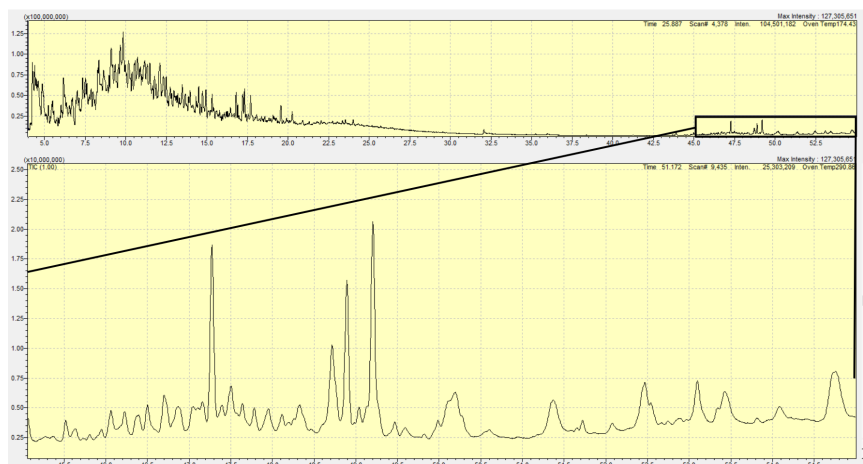


Figura 10 - Cromatograma da cera de ouvido no teste 3. O espectro apresenta o perfil cromatográfico da alíquota de 10 ug de cera de ouvido após o processo de extração utilizando-se a proporção de 3 mL de hexano para 3 mL de acetona.

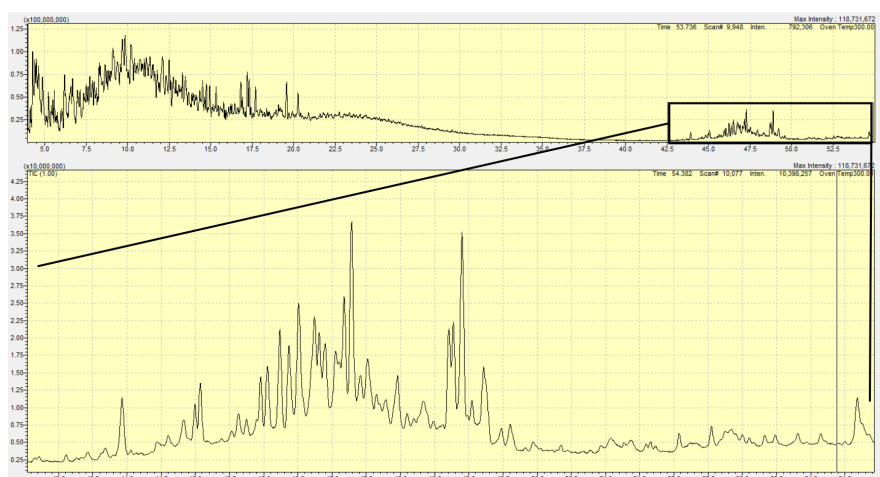


Figura 11 - Cromatograma da cera de ouvido no teste 4. O espectro apresenta o perfil cromatográfico da alíquota de 10 ug de cera de ouvido após o processo de extração utilizando-se a proporção de 2 mL de hexano para 4 mL de acetona.

A respeito da proporção utilizada, 2:1 (v:v) de hexano/acetona, pode-se inferir que foi necessária uma maior quantidade de solvente apolar (hexano) em virtude de uma maior quantidade de compostos apolares presentes na composição cera de ouvido, para que houvesse solubilidade da amostra no solvente extrator. Entretanto, o cerúmen não é constituído exclusivamente de compostos apolares, mas sim de uma mistura complexa, que depende de solvente polares como a acetona, para diluição completa da matriz e a extração da maior quantidade de analitos possíveis (MELZER, 2019).

5.2 RESULTADOS ANALÍTICOS

Uma vez definidas as condições para extração das moléculas, procedeu-se com a corrida cromatográfica, a qual foi programada para 55 minutos em modo Scan. Esse modo foi escolhido, pois é empregado quando se deseja fazer uma varredura para detecção de todos os íons presentes na amostra, no intervalo de m/z determinado pelo operador do equipamento. Dessa forma, o modo Scan apresenta uma maior capacidade investigativa nas análises de natureza qualitativas, que buscam revelar as diferentes moléculas presentes em uma determinada amostra (CHIARADIA et al., 2018).

Por se tratar de uma análise exploratória inicial, o modo Scan é o mais adequado para esse tipo de estudo, uma vez que não se tinha um conhecimento experimental de quais compostos poderiam ser detectados nas amostras e que pudessem estar qualitativamente ou quantitativamente diferentes nos dois grupos de doadores (saudáveis e acometidos pela doença de Parkinson). Nesse modo de monitoramento, ocorre uma varredura sequencial passando cada relação de carga/massa (m/z) da faixa selecionada para o detector. Gerados os cromatogramas, os picos resultantes foram integrados e comparados com o espectro de referência registrado nas bibliotecas espectrais do próprio equipamento e a semelhança estimada para cada referência.

Após o término das corridas cromatográficas, notou-se um intervalo significativo na eluição das substâncias encontradas. Os primeiros elementos foram eluídos entre aproximadamente 4 e 25 minutos, e os últimos eluíram por volta de 40 e 55 minutos, como pode ser observado na figura 12. Com o método padronizado, todas as amostras foram então submetidas às mesmas condições analíticas apresentadas, obtendo-se um total de 37 analitos detectados.

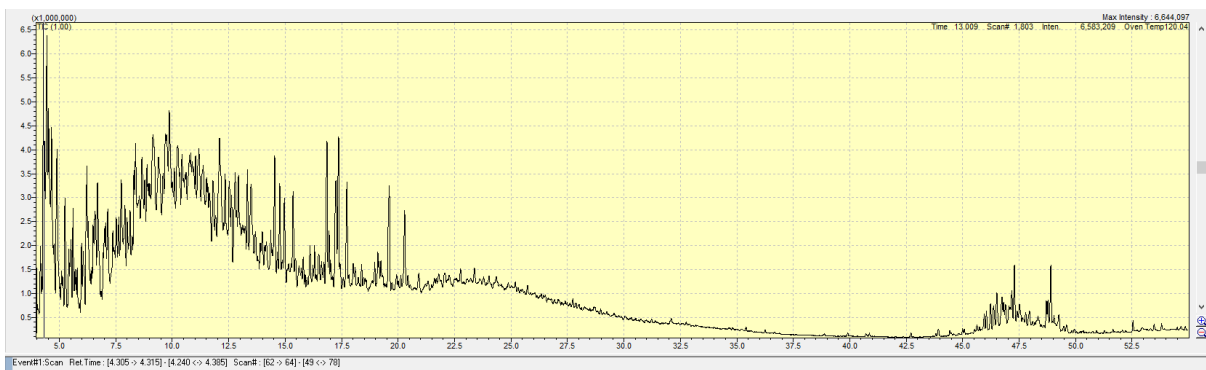


Figura 12 - Cromatograma para exemplo do tempo de eluição dos compostos detectados no cerúmen. Este cromatograma foi gerado a partir da eluição da amostra de um paciente com DP, no qual é possível observar o intervalo de eluição em função do tempo da corrida cromatográfica.

Ao se comparar os espectros de todas as amostras testadas observa-se que não houveram diferenças significativas entre os cromatogramas gerados (figura 13). Nos primeiros 25 minutos de corrida há uma uniformidade nos picos de todas as amostras. Somente após 40 minutos de corrida cromatográfica é que se observou uma maior intensidade nos picos provenientes de amostras parkinsonianas.

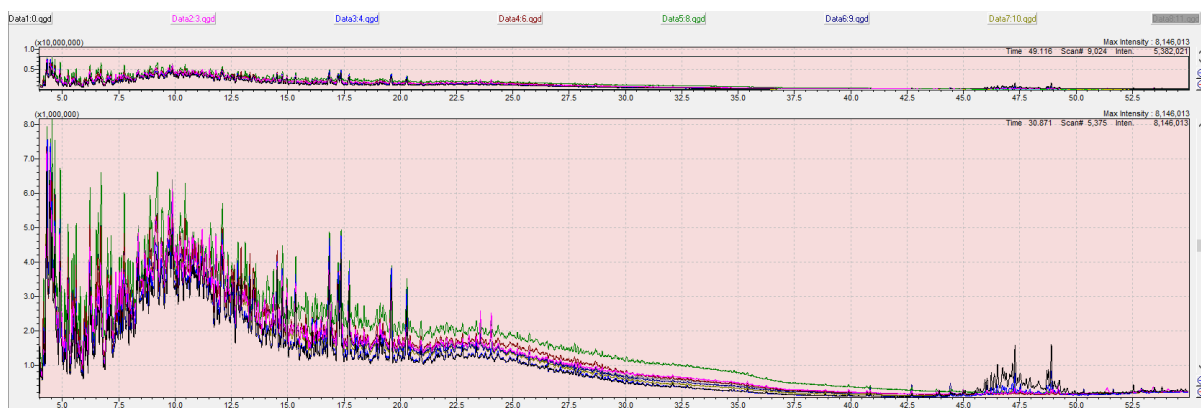


Figura 13 - Sobreposição dos espectros cromatográficos de doadores saudáveis e doadores com DP. Uma comparação entre todos os espectros obtidos durante a corrida a fim de comparar visualmente a amplitude e quantidade de picos gerados entre os grupos de doadores.

Tabela 2 - Compostos encontrados no cerúmen de doadores acometidos por DP, e doadores saudáveis.

Componentes da Amostra			Distribuição por Paciente		
Quantidade	Tempo de Eluição (min)	Substâncias	Quantidade total	doadores DP	doadores SD
1	4,440 - 4,448	4-Metil-1,6-heptadien-4-ol	2	1	1
2	4,886 - 4,902	3,3,5-trimetil-heptano	6	1	5
3	5,237 - 5,244	2,3,5-trimetil-heptano	3	2	1
4	5,244 - 5,255	2,5-Dimetildecano	9	0	9
5	5,593 - 5,607	3-metilnonano	4	2	2
6	6,215 - 6,216	3,5,5-trimetil-Hexanal	4	0	4
7	6,618 - 6,696	2,2,6-Trimetiloctano	6	1	5
8	6888 - 6,721	Porulan / isodecano	8	0	8
9	7,728 - 7,740	Óxido Rosa	6	0	6
10	9,872 - 9,885	2-Etil-deca-hidro-naftaleno	5	1	4
11	12,075 - 12,108	1-(1,1-dimetiletil)-3-etil-Benzeno	4	0	4
12	12,092	3-Icosina	1	1	0
13	12,094 - 15,347	1-(1,1-dimetiletil)-3,5-dimetil-Benzeno	5	1	4
14	14,522 - 14,533	2-terc-Butiltolueno	4	0	4
15	14,964	Jasmorange	1	0	1
16	15,332 - 15,763	2,4,6-Trimetilpropiofenona	7	0	7
17	16,850"	Fitol	1	1	0
18	17,239 - 17,253	Epicubenol	2	1	1
19	17,345 - 17,358	1,1'-(1,1,10,10-tetrametil-1,10-decanodiil)bis[3,4-dimetil-Benzeno	2	1	1
20	17,358	Trimetil(feniletinil)-Silano	1	0	1
21	17,714 - 17,739	Florazone	13	2	11
22	19,582 - 19,630	1,2,3,6,7,8,8a,8b-octa-hidro-4,5-dimetil-Bifenileno	7	0	7
23	20,284 - 20,297	Tetrametil-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno	4	0	4

Componentes da Amostra			Distribuição por Paciente		
Quantidade	Tempo de Eluição (min)	Substâncias	Quantidade total	doadores DP	doadores SD
24	20,284 - 20,301	1,4,5,6-Tetrametil-1,2,3,4-tetra-hidronaftaleno	8	1	7
25	23,551 - 23,558	Neoheptanol	2	0	2
26	40,857 - 46,023	n-Heptatriacontano	3	1	2
27	42,703 - 42,706	Tetratriacontano	2	0	2
28	43,910'	Cholest-14-en-7-ol	1	0	1
29	46,020 - 46,026	Nonatriacontano	3	0	3
30	47,270'	2-p-menta-1,8-dien-3-il-5-pentil-, (-)-(E)-resorcinol	7	2	5
31	47,273 - 47,289	5 α -Cholestan-3-one	2	2	0
32	47,274 - 48,891	[(3,3,5,5-Tetrametil-1-ciclohexen-1-il)sulfanil]benzeno	1	0	1
33	48,888 - 48,093	5 α -Cholestan-3-one	3	2	1
34	48,203	Cholest-5-en-3-ol (3 β)-acetato	1	0	1
35	49,197	Cholest-5-en-3-ol (3 β)-carbonocloreto	1	0	1
36	51,376 - 54,076	1-Hentetracontanol	2	1	1
37	52,544 - 53,437	1,54-Dibromotetrapentacontano	2	1	1

Fonte: Dados gerados a partir dos cromatogramas das 37 substâncias encontradas na eluição do cerúmen de indivíduos saudáveis e acometidos pela doença de Parkinson.

Dos 37 analitos encontrados, cerca de 27% podem ser classificados como compostos cíclicos, entre os quais estão os compostos como benzenicos e fenilicos, sem função biológica determinada (tabela 2). Entre os quais, foram encontrados compostos derivados de naftaleno, um hidrocarboneto policíclico aromático, usado em repelente de insetos, fumigante, lubrificantes e como matéria prima para síntese de outros produtos (OLIVEIRA et al., 2020).

Assim como os outros hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, o naftaleno integra uma classe de importantes contaminantes para o ambiente. Podem ser

encontrados presentes na água, no ar, no solo e diversos alimentos, cuja degradação é difícil e pode ser deletério à saúde humana, sendo ainda destacados em um estudo como potentes carcinógenos (MENDES, 2018). Em função das diversas fontes de origem, não se pode afirmar qual delas pode ter proporcionado a incorporação da molécula no cerúmen.

Neste estudo, aproximadamente 11% dos compostos encontrados nas ceras dos doadores são componentes de produtos cosméticos, são eles, Porulan, Jasmorange, Óxido Rosa e Florazone (tabela 2):

- Jasmorange, é um aldeído amplamente utilizado em perfumaria (VYGLAZOV et al. 2001).
- Porulan, é uma isoparafina utilizada como emoliente, costumeiramente utilizada em cosméticos (LANXESS.com.br, 2014).
- O óxido rosa, também conhecido como Z-óxido de gerânio, é um dos componentes do o óleo essencial de Gerânio, sendo bastante utilizado na indústria de cosméticos (MACHADO; FERNANDES JÚNIOR, 2011).
- O Florazone, por sua vez, é enquadrado na categoria de agentes de fragrância, amplamente utilizado na indústria de perfumaria e cosméticos (IFRA, 2019).

Tendo em vista que esses compostos não são metabólitos produzidos pelo corpo, nem moléculas naturais da cera de ouvido, pode-se supor que, provavelmente, os compostos mencionados, detectados nas ceras dos doadores foram provenientes de uma administração exógena, que pode ser devido ao uso de cosméticos, nos quais esses compostos estavam contidos. Em virtude da ampla utilização destes produtos pela indústria cosmética e de perfumaria, sua presença ou ausência na cera de ouvido está condicionada apenas ao tipo de cosmético utilizado por cada doador.

Cerca de 23% dos compostos detectados são hidrocarbonetos de cadeia acíclica (tabela 2), sem relação biológica conhecida ou discriminada na literatura, porém naturalmente encontrados no cerumen (DAMASCENO et al., 2015). Por volta de 16% das substâncias encontradas neste estudo, podem ser classificadas como álcoois de cadeia longa (tabela 2), e assim como os hidrocarbonetos, podem ser encontrados entre os constituintes básicos da cera produzida no canal auditivo (DAMASCENO et al., 2015).

Entre os álcoois de cadeia longa encontrados, está o Epicubenol (tabela 2), um sesquiterpenóide derivado do metabolismo vegetal frequentemente encontrado em óleos essenciais, como o de *Copaifera* spp. (ZOGHBI et al., 2009), *Campomanesia xanthocarpa* (OLIVEIRA et al., 2021), *Eugenia* spp. (SILVEIRA et al., 2021) e *Cedrus atlântica*, *Cedrela odorata* (PUBCHEM, 2004). O epicubenol também pode ser produzido por algumas espécies de *Streptomyces*, uma bactéria Gram-positivas que pode crescer em vários ambientes (NAKANO et al. 2012; PROCÓPIO et al., 2012). A detecção deste composto em amostras de cerúmen pode ser derivada do uso de produtos contendo óleos essenciais, uma prática que vem crescendo nos últimos anos (RAMSAY et al., 2020). Outra possibilidade é a colonização do canal auricular por alguma espécie de *Streptomyces* após pequenos traumas ou erupções supurativas chamadas de micetomas (PEREIRA et al., 2017).

O fitol (tabela 2), é um diterpeno, que também pertencente a classe de álcoois de cadeia longa, cíclica e ramificada. O fitol é amplamente empregado na indústria de xampus, sabonetes e detergentes e, portanto, o uso de qualquer um desses produtos pode ter sido a fonte deste composto. Além disso, o fitol também pode ser encontrado na membrana de bactérias e, portanto, infecções bacterianas próximas à região de coleta da cera de ouvido, ter proporcionado a detecção dessa molécula pelo CG-EM (VEGA, 2014).

A molécula de 3-icosina foi encontrada apenas em um paciente com a Doença de Parkinson (tabela 2), e trata-se de um produto natural encontrado na espécie vegetal *Basella alba*, popularmente conhecida como bortalha (PUBCHEM, 2004). Além de costumeiramente consumida como hortaliça a bortalha como é conhecida, também é utilizada na medicina popular para tratar pressão alta, malária e anemia, além de possuir propriedades anti fúngicas, anti-inflamatórias e analgésicas (MANI et al., 2021). Apesar de ter sido encontrada somente em um paciente com a Doença de Parkinson, a detecção dessa molécula não pode representar um candidato a um biomarcador que possa ser utilizado para diferenciar entre os doadores saudáveis ou com Parkinson, pois não se trata de um composto naturalmente produzido pelo corpo humano.

Outra substância encontrada no cerúmen foi a molécula de 2-p-menta-1,8-dien-3-il-5-pentil-(-)-(E)-resorcinol, cuja estrutura é apresentada na figura 14, uma substância pertencente à classe dos canabinóides produzida pela espécie *Cannabis sativa*. Essa molécula também é conhecida como canabidiol

(CBD), um fitocanabinóide não-psicoativo da planta que possui uma grande importância farmacológica (LUZ et al., 2020; MATOS et al., 2017).

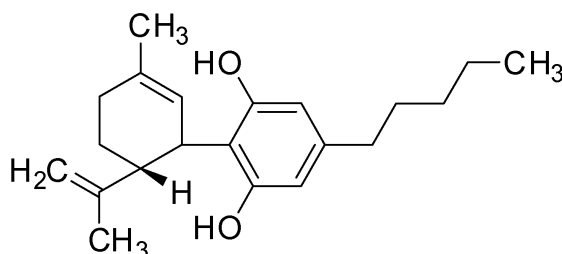


Figura 14 - Estrutura química da molécula de 2-p-menta-1,8-dien-3-il-5-pentil-(-)-(E)-resorcinol encontrada no cromatograma do cerúmen de alguns doadores.

Vários autores têm descrito a eficácia dos métodos cromatográficos na detecção de produtos da *Cannabis* em amostras biológicas, devido ao bioacúmulo que garante excreção de resíduos por dias ou semanas, em matrizes biológicas como sangue, suor, urina, cabelo, respiração, matrizes *post mortem*, leite materno e cordão umbilical (ABD-ELSALAM et al., 2019; HUBBARD et al., 2019; NICOLAOU et al 2021). Apesar da presença de canabinóides, especificamente o tetrahydrocannabinol (THC), em amostras de cera de ouvido já tenha sido detectada (MEIER et al., 2017), na literatura ainda não há registros da identificação do canabidiol em cerúmen humano.

Em estudo conduzido por Meier e colaboradores (2017), foi avaliada a presença de drogas em cera de ouvido de dezoito usuários de *Cannabis* por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, mas em apenas uma das amostras foi possível confirmar a presença da droga a partir da detecção do THC. Nesse estudo, a presença da mesma droga foi detectada em 7 das 13 amostras analisadas, no entanto a substância encontrada foi o canabidiol. Esse dado pode sugerir que o canabidiol seja um marcador mais eficiente para as análises toxicológicas com finalidade forense utilizando o cerume com biomatriz, com tudo é importante destacar o fato de que essa substância é comumente utilizada isoladamente em fármacos para tratamento de diversas enfermidade (GONTIJO et al., 2016), deste modo seria necessário identificação de outros metabólitos derivados da *C. sativas* para confirmar o uso ilícito. Por se tratar de uma análise exploratória,

esses resultados acabam abrindo portas para uma outra frente de trabalho voltada para a toxicologia forense.

Os derivados de colesterol (tabela 2), representam cerca de 13% dos analitos encontrados nesta pesquisa. Estes por sua vez podem ser considerados produtos normais do metabolismo humano, e da composição básica do cerúmen (DAMASCENO et al., 2015).

5.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS MOLÉCULAS ENCONTRADAS EM PESSOAS SAUDÁVEIS E ACOMETIDAS POR PARKINSON

Das 37 moléculas identificadas, por volta de 43% foram identificadas nos dois grupos de doadores, dentre as quais podemos citar hidrocarbonetos, derivados de colesterol e álcoois, que podem ser considerados parte integrante da composição normal da cera de ouvido humano (DAMASCENO et al., 2015). De modo semelhante são os compostos empregados em cosméticos, que possivelmente foram introduzidos no cerúmen pelo uso dos mesmos (IFRA, 2019; LANXESS.com.br, 2014; MACHADO, 2011; VYGLAZOV et al., 2001).

Cerca de 49% dos compostos foram encontrados exclusivamente em doadores saudáveis. Ao observar esses compostos exclusivos descritos na tabela 2, nota-se que são moléculas de hidrocarbonetos, alguns derivados de colesterol, que podem ser encontrados normalmente na composição do cerúmen, cujas proporções (figura 15), estão condicionadas ao metabolismo e hábitos de vida de cada indivíduo (DAMASCENO et al., 2015). Os derivados de naftaleno, substância utilizada na composição de diversos produtos, incluindo inseticidas, estão, certamente, atrelados à particularidade do uso na rotina de cada pessoa (MENDES 2018; OLIVEIRA et al., 2020).

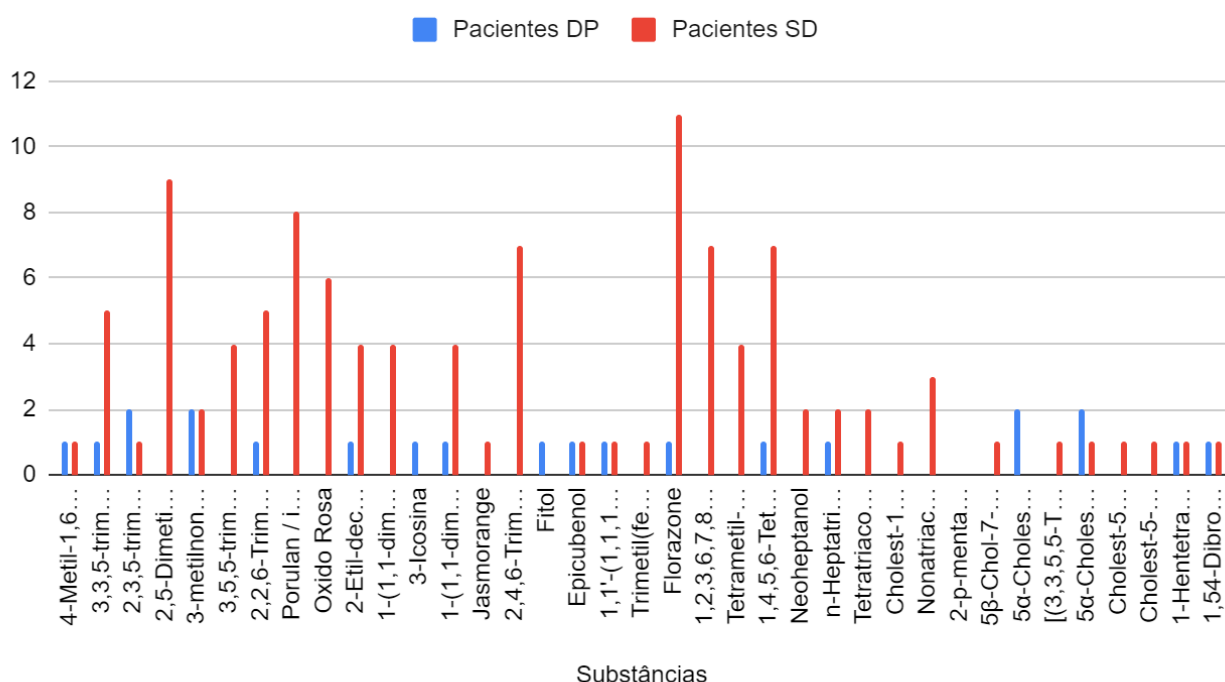


Figura 15 - Gráfico de distribuição das substâncias encontradas no cerúmen de doadores saudáveis e acometidos por DP. O gráfico foi gerado a partir de dados dos cromatogramas obtidos. Nele estão representados a distribuição das 37 substâncias encontradas nos 13 doadores; as barras em azul representam os doadores acometidos pela doença de Parkinson e as barras em vermelho simbolizam os doadores saudáveis.

Nesse estudo aproximadamente 8% das moléculas foram identificadas apenas em doadores diagnosticados com Doença de Parkinson, sendo elas:

- 3-icosina uma molécula natural, fruto do metabolismo de uma hortaliça (MANI et al. 2021);
- 5α-Cholestan-3-one, é um derivado de colesterol, possivelmente parte integrante da composição do cerúmen humano (DAMASCENO et al., 2015);
- Fitol, um derivado de clorofila que pode ser encontrado em diversas fontes, como alimentação provinda de animais, medicamentos e até cosméticos e produtos de higiene.

Embora tenham sido encontrados exclusivamente em doadores diagnosticados com DP, o fitol e a 3-icosina não poderiam ser utilizados como

possíveis biomarcadores para essa enfermidade, em razão de se tratar de moléculas provenientes de fontes exógenas, como descrito no item 5.2.

O 5 α -Cholestan-3-one é um derivado do colesterol produzido endogenamente. Embora alterações na quantidade de colesterol possam estar relacionadas com fatores como o sexo, idade, período menstrual, quantidade de gordura corporal (DAMASCENO, 2013), elas também podem ser devidas a alterações causadas por desordens metabólicas. Estudos apontam que desbalanços na homeostase do colesterol podem estar relacionados a condições neurodegenerativas como a doença de Huntington, doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (GARCÍA-SANZ et al., 2021). A presença aumentada do colesterol facilita a oligomerização da alfa-sinucleína que tem implicação direta nos mecanismos fisiopatológicos da DP (GARCÍA-SANZ et al., 2021). Desse modo, a detecção de derivados do colesterol, exclusivamente, em todas as amostras de doadores com a doença de Parkinson, pode ser devido a esse metabolismo alterado do colesterol celular que pode ter refletido em um aumento do composto na cera de ouvido, permitindo assim sua detecção. Esse é o primeiro trabalho que apresenta um achado relacionando o aumento dessa molécula em cera de ouvido com a doença de Parkinson. Este resultado pode representar um possível direcionamento para pesquisas que visem moléculas como biomarcadores para o diagnóstico da DP.

Notou-se neste estudo ainda, uma redução na quantidade de hidrocarbonetos encontrados na composição do cerúmen de doadores acometidos pela DP. Mesmo sendo este composto, parte integrante da composição básica da cera do ouvido humano, serão necessários estudos mais aprofundados para associar essa redução à condição patológica conferida pela doença de Parkinson.

6 CONCLUSÃO

Este é um trabalho pioneiro que explora a composição diferencial da cera de ouvido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, como um primeiro passo para a busca de biomarcadores que possam ser empregados para o diagnóstico da Doença de Parkinson. A metodologia de extração e análise cromatográfica empregada se mostrou capaz de extrair compostos em quantidade suficiente para a identificação de 37 analitos. Dentre os compostos identificados, detectou-se em 7 amostras, a presença do canabidiol (2-p-menta-1,8-dien-3-il-5-pentil-(-)-(E)-resorcinol), indicando que essa substância pode ser utilizada como um marcador mais eficiente do que outros canabinóides para análises toxicológicas utilizando cera de ouvido. Foram encontradas 3 moléculas identificadas exclusivamente em doadores com Parkinson, dentre elas um derivado do colesterol (5 α -Cholestan-3-one) se destaca, pois, essa detecção pode ser motivada pelas alterações metabólicas do colesterol, envolvidas nesta doença. Embora este estudo tenha utilizado um número limitado de amostras, os resultados obtidos demonstraram que a cera de ouvido pode representar uma biomatriz promissora a ser explorada para o diagnóstico de Parkinson. Investigações futuras com um maior número de amostras e o uso de padrões moleculares devem ser conduzidos para confirmar esses achados.

REFERÊNCIAS

ABD-ELSALAM, W. H. et al. Quantificação LC–MS/MS de fitocanabinóides e seus metabólitos em matrizes biológicas. **Talanta**, v. 204, p. 846-867, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914019306782>>. Acesso em: 17 de jul. 2022.

ALBUQUERQUE, R. A. M. **Extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME) para análise de agrotóxicos em água potável**. 2019. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Bacharelado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/43795>>. Acesso em: 31 abr. 2022.

Associação Brasil Parkinson. **O que é o Parkinson?**. Disponível em: <<https://www.parkinson.org.br/tudo-sobre-parkinson>>. Acesso em: 28 de mar. 2022.

BARBOSA, J. M. G. et al. Cerumenogram: a new frontier in cancer diagnosis in humans. **Scientific Reports**. v. 9, p. 117-122. 2019. Disponível em <<https://www.nature.com/articles/s41598-019-48121-4#:~:text=The%20Cerumenogram%20is%20performed%20in,human%20that%20suffers%20from%20cancer.>>>. Acesso em 17 nov. 2020.

BESDINE, R.W. **Mudanças no corpo com o envelhecimento**. Manual MSD, 2019. Disponível em: <<https://www.msdmanuals.com/pt-br/casa/quest%C3%B5es-sobre-a-sa%C3%BAde-de-pessoas-idosas/o-envelhecimento-corporal/mudan%C3%A7as-no-corpo-com-o-e-nvelhecimento>>. Acesso em: 01 abr. 2022.

BORDIN, D. C. M., et al. Análise forense: pesquisa de drogas vegetais interferentes de testes colorimétricos para identificação dos canabinoides da maconha (*Cannabis sativa* L.). **Química Nova**, v. 35, p. 2040-2043, 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/YqKJmDLr3HPwtrkjdzwbCHH/?lang=pt#>>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

BORDIN, D. C. M., et al. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. *Sci Chromatogr*, v. 7, n. 2, p. 125-43, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Marcela-Alves-2/publication/282349724_Tecnicas_de_preparo_de_amstras_biologicas_com_interesse_forense/links/56dc4a7508aeb4638c02d5e/Tecnicas-de-preparo-de-amostras-biologicas-com-interesse-forense.pdf>. Acesso em: 30 de jun. 2022.

Brasil. Biblioteca Virtual em Saúde, Ministério da saúde. **Dia Mundial de Conscientização da Doença de Parkinson: avançar, melhorar, educar, colaborar!**. Disponível em: <<https://bvsms.saude.gov.br/11-4-dia-mundial-de-conscientizacao-da-doenca-de-parkinson-avancar-melhorar-educar-colaborar/#:~:text=De%20acordo%20com%20a%20Organiza%C3%A7%C3%A3o,n%C3%BAmero%20pode%20dobrar%20at%C3%A9%202040.>>>. Acesso em: 28 de mar. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde . Portaria conjunta nº 10, de 31 de outubro de 2017. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Parkinson e seus Anexos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 2017. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/14/Portaria-Conjunta-PCDT-Doenca-de-Parkinson.pdf>>. Acesso em: 08 maio 2021.

CAMARGO FILHO, M. F. A., et al. Canabinóides como uma nova opção terapêutica nas doenças de Parkinson e de Alzheimer: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 55, n. 2, p. 17-32, 2019. Disponível em: <<https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/08/1010037/revista552-v21-artigo3.pdf>>. Acesso em: 23 de jun. 2022.

CANEVER, L. M.; NAZÁRIO, M. V.. **Métodos de diagnósticos para halitose de origem bucal: revisão de literatura**. 2019. Disponível em: <<http://repositorio.unesc.net/bitstream/1/7405/1/La%20Mendes%20Caneve%20e%20Marceli%20Velho%20Nazario.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2022.

Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde: Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (cg-em) e suas diversas aplicações. In: Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde - CONBRACIS. **Anais**. Campina Grande: Realize

Editora, 2016. Disponível em: <<https://editorarealize.com.br/artigo/visualizar/19078>>. Acesso em: 21 jan 2021.

COSTA, L. M. Al., et al. **Simulação da extração sólido-líquido de vanilina de favas de *Vanilla planifolia***. 2017. Monografia de graduação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para a aprovação na disciplina de Projeto de Graduação do curso de Engenharia Química. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/20349/1/Simula%C3%A7%C3%A3oExtra%C3%A7%C3%A3oS%C3%B3lido.pdf>>. Acesso em: 03 de jul. 2022.

DAMASCENO, R. J., et al. Caracterização biológica do cerume humano. 2015, Anais. São Paulo: Academia Brasileira de Audiologia, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/item/002710832>> . Acesso em: 07 jul. 2022.

GARCÍA-SANZ, P. et al. "The Role of Cholesterol in α -Synuclein and Lewy Body Pathology in GBA1 Parkinson's Disease." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. v. 36, n. 5, p. 1070-1085, 2021. Disponível: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33219714/>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

GONTIJO, Érika Cardoso et al. Canabidiol e suas aplicações terapêuticas. **Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**, v. 5, n. 1, p. 2016. Disponível em: <<http://periodicos.unievangelica.edu.br/index.php/refacer/article/view/3360>>. Acesso em: 23 ago. 2022.

IGLESIAS, A. H. **Introdução ao acoplamento Cromatografia líquida-Espectrometria de massas**. 2020. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao%20ao%20acoplamento%20cromatografia%20liquida%20-%20espectrometria%20de%20massas.pdf>> . Acesso em: 06 jul. 2022.

HUBBARD, J. A. et al. Validação de um método de espectrometria de massa em tandem de cromatografia líquida (LC-MS/MS) para detectar canabinóides em sangue total e respiração. **Química Clínica e Medicina Laboratorial (CCLM)**, v. 58, n. 5, pág. 673-681, 2020. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2019-0600/html> 21/07

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**. v .2, n. 1, p. 13-25, 2010. Disponível em:
<<https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v2n1a2.pdf>>. Acesso em: 25 de jun. 2022.

LANCAS, F.. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**. v. 5. p. 27-46, 2013. Disponível em:
<<http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/sc.2013.005>>. Acesso em: 12 jul. 2022.

LANXESS APRESENTOU A ISOPARAFINA PUROLAN NA 1ª EDIÇÃO DA FEIRA IN-COSMETICS NO BRASIL. **LANXESS.com.br**, 2014. Disponível em:
<<https://protectedbylanxess.com.br/pt/quem-somos/noticias/br-lanxess-to-exhibit-at-the-1st-in-cosmetics-fair-in-brazil/>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

LORENZ, J. G. **Otimização e validação dos métodos quechers CG/ECD e HS-SPME-CG/MS para análises de agrotóxicos em maçã, morango e tomate**. 2015. p. 123. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, 2015. Disponível em:
<<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/158904>>. Acesso em: 17 maio 2021.

LUZ, G.I H. C. et al. CANABIDIOL E SUAS APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS. In: Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências - CONAPESC, V. **Anais**, 2020. Disponível em:
<https://www.editorarealize.com.br/editora/anais/conapesc/2020/TRABALHO_EV138_MD1_SA22_ID1222_23112020182115.pdf>. Acesso em: 17 de jul. 2022.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos acadêmicos**, p. 105-127, 2011. Disponível em:<<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/137219/ISSN2175-2532-2011-03-02-105-127.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

MANI, M. et al. Studies on the spectrometric analysis of metallic silver nanoparticles (Ag NPs) using Basella alba leaf for the antibacterial activities. **Environmental Research**, v. 199, p. 111274- 2021.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0013935121005685>. Acesso em: 17 jul. 2022.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Cienc. Cult.**, São Paulo , v. 66, n. 3, p. 54-57, 2014 . Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252014000300017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 24 de jun. 2022.

MATOS, R. L. A. et al. O Uso do Canabidiol no Tratamento da Epilepsia. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. , 2017.

MEIER, S. I. et al. Analysis of drugs of abuse in Cerumen - correlation of postmortem analysis results with those for blood, urine and hair. *Drug Test Anal.* v. 1, p. 1572-1585, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28240418/>>. Acesso em: 22 jul. 2017

MELZER, E. E. M. **Preparo de Soluções - Reações e Interações Químicas**. Ed. Saraiva, 2014. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#!/books/9788536521237/>>. Acesso em: 04 jul. 2022.

MENDES, G. P.. Tratabilidade de solo contaminado com naftaleno através de oxidação química: análises da fase sorvida, aquosa e vapor. 2018. 90f: Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2018. Disponível: <[https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/25969/1/Tratabilidadesolocontamina do_Mendes_2018.pdf](https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/25969/1/Tratabilidadesolocontamina%20do_Mendes_2018.pdf)>. Acesso em: 18 de jul. 2022.

MORAIS, M. T. et al. **Estudo Do Potencial De Biodegradação De Uma Bactéria Isolada Do Rejeito De Petróleo**. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Marcio-Tavares-6/publication/339033409_ESTUDO_DO_POTENCIAL_DE_BIODEGRADACAO_DE_UMA_BACTERIA_ISOLADA_DO_REJEITO_DE_PETROLEO/links/6282bb1d37d496476ab56069/ESTUDO-DO-POTENCIAL-DE-BIODEGRADACAO-DE-UMA-BACTERIA-ISOLADA-DO-REJEITO-D E-PETROLEO.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Marcio-Tavares-6/publication/339033409_ESTUDO_DO_POTENCIAL_DE_BIODEGRADACAO_DE_UMA_BACTERIA_ISOLADA_DO_REJEITO_DE_PETROLEO/links/6282bb1d37d496476ab56069/ESTUDO-DO-POTENCIAL-DE-BIODEGRADACAO-DE-UMA-BACTERIA-ISOLADA-DO-REJEITO-D-E-PETROLEO.pdf)>. Acesso em: 18 de jul. 2022.

NAKANO, C. et al. Identificação do produto do gene SGR6065 como uma sesquiterpeno ciclase envolvida na biossíntese de (+)-epicubenol em *Streptomyces griseus*. **J. Antibiótico**, v. 65, p. 551-558, 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ja201268#citeas>>. 21 jul. 2022.

NASCIMENTO, R. F. et al. **Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/330702907_Cromatografia_gasosa_aspectos_teoricos_e_praticos>. Acesso em: 07 jul. 2022.

NICOLAOU, A. G. et al. Análise de canabinóides em matrizes biológicas convencionais e alternativas por cromatografia líquida: Aplicações e desafios. **Journal of Chromatography A**, v. 1651, p. 4622-77, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967321004015>>. Acesso em: 21 jul. 2022.

OLIVEIRA, D. K. et al. Análise in vitro de frações cromatográficas isoladas de *Pseudomonas aeruginosa* sobre a degradação de naftaleno. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 11, n. 2, p. 189-199, 2020. Disponível em: <<https://desafioonline.ufms.br/index.php/sameamb/article/view/11819>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

PAVIA, D. L. et al. Introdução à espectroscopia. **Cengage Learning Brasil**, 2016. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788522123391/>. Acesso em: 27 abr. 2022.

PEREIRA, A. C. S. F. et al. Eumicetoma e actinomicetoma: uma breve revisão da literatura. **PNCQ GESTOR 2019**, v. 50, n. 4, p. 309-14, 2018. Disponível em: <<http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2019/04/RBAC-vol-50-4-2018-edi%C3%A7%C3%A3o-completa-corrigida-editorial.pdf#page=11>>. Acesso em: 21 jul. 2022.

PÉREZ, Héctor Acosta. **Reações de alquilação eletrofílica de cetonas promovidas por reagentes de iodo hipervalente**. 2017. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade de São Paulo. <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46136/tde-25112019-152809/publico/DissertDefendidaHectorAcosta.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2022.

PINTO, J.R. M.; RIBEIRO, M. G. TC; MACHADO, A. A. S. C. **Desafio Na Escolha Dos Solventes Em Síntese-O Workup Como Exemplo**. Química nova, v. 42, p. 971-982, 2019. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/mNWBXMZKwz3RSsRZQpyFjNr/?lang=pt#>>. Acesso em: 04 de jul. 2022.

POSTUMA, R. B. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. **Official journal of the Movement Disorder Society**, v. 30, n. 12, p. 1591–1601, 2015. Disponível em: <<https://www.medicine.mcgill.ca/epidemiology/Joseph/publications/Methodological/Postuma2016.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2022.

PROCÓPIO, R. E. L. et al. Antibiotics produced by Streptomyces. **The Brazilian Journal of infectious diseases**, v. 16, n. 5, p. 466-471, 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/bjid/a/ghTc6tJh5wbFSrKCpcP57Yg/?lang=en>>. Acesso em: 21 jul. 2022.

PROKOP-PRIGGE, K. A. et al. Identification of volatile organic compounds in human cerumen, **Journal of Chromatography B**, v. 953–954, p. 48-52, 2014. disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023214000555>>. Acesso em: 17, jul. 2022.

Resumo do Composto PubChem para CID 549159, 3-Eicosina. **PubChem**. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/61886-66-6#section=Literature> 21/ 07

PubChem Compound Summary for CID 11831045, (+)-Epicubenol. **PubChem**. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Epicubenol>>. Acesso em: 20 jul. 2022.

RAMSEY, J, T, et al. **Essential Oils and Health. Yale J Biol Med**. v. 93, n. 2, p. 291-305, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32607090/>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

OLIVEIRA, R., et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Campomanesia xanthocarpa* DOI:10.34117/bjdv7n5-332. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.5, p. 48790-48802 may. 2021

SANTOS, C. C. M. P. et al. **Atividade antinociceptiva e antioxidante do fitol em modelos in vivo e in vitro**. 2011. Disponível em:
<<https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/tede/6714/1/arquivototal.pdf>>. Acesso em: 21 de jul. 2022.

SATO, J. H. **Estudo Comparativo entre Estimulação Medular Espinhal e Estimulação Cerebral Profunda na Doença de Parkinson**. Dissertação (Mestrado em em Neuroengenharia) – Instituto Internacional de Neurociências Edmond e Lily Safra: Programa de Pós-Graduação em Neuroengenharia. Macaíba, p. 96. 2017. Disponível em:
<<http://www.institutosantosdumont.org.br/wp-content/uploads/2018/08/dissertacao-mestrado-iinels-juliana-sato.pdf>>. Acesso em: 23 de jun. 2022.

SELBACH, T. C. D. A. fissura labiopalatina. In: BARBOSA, D. A. PANNUNZIO, L. (org.). As fissuras guia de informações sobre fissuras labiopalatinas. São Paulo: Booktoy, 2017. Cap 3, p. 36-43.

SHOKRY, E. et al. Earwax metabolomics: An innovative pilot metabolic profiling study for assessing metabolic changes in ewes during periparturition period. **PLoS ONE**. v. 12, n. 8, 2017. Disponível em
<<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0183538>>. Acesso em 28 nov. 2020.

SILVA, N. D. S. H. et al. **Fisiopatologia da doença de Parkinson: Revisão de Literatura**. In: MATTOS, S. M. e ARAÚJO, A. L. Ponta Grossa, PR: Atena, 2020. p. 1-11.

SILVEIRA, R. M., et al. Diversity of the Chemical Composition of Essential Oils of *Eugenia* (Myrtaceae): a review. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.3, p. 33276-33303, 2021. Disponível em:
<<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/27441>>. Acesso em: 20 jul. 2022.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**: Tradução da 9ª edição norte-americana . Cengage Learning, Brasil: 2015. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788522121373/>>. Acesso em: 01 abr. 2022.

THE INTERNATIONAL FRAGRANCE ASSOCIATION - IFRA. **Notification of the 49th Amendment to the IFRA Code of Practice**. 2019. Disponível em: <https://ifrafragrance.org/docs/default-source/ifra-code-of-practice-and-standards/49th-amendment/notification-letter---49th-amendment.pdf?sfvrsn=61fd4b0c_3>. Acesso em: 17 de jul. 2022.

STERN, M. B., et al. **Ressonância magnética na doença de Parkinson e síndromes parkinsonianas**. Neurologia. v. 39, n. 11, p. 1524, 1989.

VAILLANCOURT, D. E. et al. High-resolution diffusion tensor imaging in the substantia nigra of de novo Parkinson disease. **Neurology**. v. 72, n. 16, p. 1378-84, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2677508/>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

VALENTE, A. L. P. et al. Análise quantitativa por cromatografia. **Revista Chemkeys**, n. 10, p. 1-10, 2003. Disponível em: <https://zeus.qui.ufmg.br/~valmir/Analise_Quantitativa_Cromatografia_Gasosa.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2022.

VEGA, D. S. M. **Caracterização de fitol e verificação de uma segunda via de biossíntese de filoquinona e tocoferol nos estágios intraeritrocíticos de Plasmodium falciparum**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas: Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo. <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-18072014-141833/publico/DanielleSilvaMenchacaVega_Mestrado_I.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2022.

Vyglazov, O. G., Chuiko, V. A., Izotova, L. V., Vintarskaya, Z. V., & Yudenko, R. Y. (2001). Russian Journal of Applied Chemistry, v. 74, n. 11, p. 1888–1891. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1014848929083>>. Acesso em: 17 de jul. 2022.

ZOGHBI, M. G. B. et al. Volatiles of oilresins of *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer, *C. piresii* Dwyer and *C. pubiflora* Benth. (Leguminosae). J. Essent. **Oil Res.** v. 21, p 403-404, 2009. Disponível em: <<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301678426>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

APÊNDICE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA

Pesquisador responsável: Raphael Contelli Klein

Endereço: Rua da Prainha, 1326. Morada Nobre cidade: Barreiras Estado: Bahia

Telefone: (77) 99923-9447 **E-mail:** raphael.klein@ufob.edu.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Avaliação do cerume na busca por biomarcadores para a doença de Parkinson”** que tem como objetivos avaliar o cerume na busca de biomarcadores capazes de diagnosticar, precocemente ou não, a doença de Parkinson.

O motivo que nos leva a estudar o cerume é a busca por um biomarcador capaz de diagnosticar, de forma não invasiva e de baixo custo, os pacientes com doença de Parkinson.

Para este estudo adotaremos os seguintes procedimentos: Preenchimento de questionário padronizado contendo dados do participante da pesquisa. A coleta será realizada por um médico especializado em otorrinolaringologista em ambulatório e utilizando equipamento apropriado. Em caso de qualquer trauma, o próprio médico fornecerá atendimento imediato e caso necessário irá encaminhar para unidade de atendimento. A pesquisa oferece riscos relacionados à participação dos pacientes envolvidos, pois serão coletados dados de identificação dos pacientes além da amostra de cera de ouvido, que pode gerar algum tipo de trauma no conduto auditivo externo. Serão tomadas todas as precauções para que a coleta da cera de ouvido aconteça com o mínimo de risco. Também serão tomadas medidas protetivas para que os dados de identificação do paciente e das amostras fiquem sob os cuidados dos pesquisadores do projeto. As amostras receberão um código a partir do qual todas as demais análises e procedimentos sejam realizados referenciando somente esse código, sem a identificação dos pacientes. Os seus dados serão manuseados somente pelos pesquisadores. O material com suas informações ficará guardado sob a responsabilidade do pesquisador principal com a

garantia de manutenção do sigilo e confidencialidade em arquivo, físico ou digital, sob sua responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa. Com os dados obtidos por esse projeto, será possível a identificação de biomarcadores para diagnóstico da doença de Parkinson, utilizando uma técnica não invasiva que possibilite o diagnóstico antes do aparecimento dos sintomas. Dado que os sujeitos do estudo são seres humanos, obedeceremos ao previsto na Resolução 466/12 do Ministério da Saúde no Brasil.

O motivo deste convite é que você se enquadra nos seguintes critérios de inclusão: pacientes maiores de 18 anos e diagnosticados com a doença de Parkinson. Você poderá deixar de participar da pesquisa nos casos em que forem observados os seguintes critérios de exclusão: pacientes menores de 18 anos; pacientes que não apresentem cerume; pacientes com otite externa aguda ou crônica; e pacientes que não assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo para participar deste estudo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. O responsável por você poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento.

A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador responsável. O pesquisador responsável irá tratar a sua identidade com sigilo e privacidade. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a permissão do responsável por você.

Os autores do projeto firmam o compromisso de tornar público os resultados obtidos em revistas científicas, congressos ou eventos científicos após o término da pesquisa.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, na Universidade Federal do Oeste da Bahia e a outra será fornecida a você.

Caso haja danos decorrentes dos riscos desta pesquisa, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelo ressarcimento e pela indenização. O ônus

financeiro do projeto será de responsabilidade do pesquisador, isentando o participante de qualquer despesa.

Eu, _____, portador do CPF _____, nascido (a) em ____/____/_____, residente no endereço _____, na cidade de _____, Estado _____, podendo ser contatado (a) pelo número

telefônico () _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo “**Avaliação do cerume na busca por biomarcadores para a doença de Parkinson**”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desse estudo e que recebi uma via deste

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Barreiras, Bahia, _____ de _____ de _____.

Nome do Participante

Assinatura da testemunha (por extenso)

(Para casos de analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de necessidades gerais).

Assinatura do pesquisador

Em caso de dúvidas quanto aos aspectos éticos deste estudo, você, ou os responsáveis por você, poderão consultar o:

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), localizado na Rua: Br 135, Km 01, nº 2.341, Bairro Boa Sorte, Cep: 47805-270, Barreiras – BA, Prédio II, 1º andar.

Tel. (77) 3613-8840 / e-mail: cepfasb@fasb.edu.br.