

QUANTIFICAÇÃO DA HIDROCORTISONA PELA ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

QUANTIFICATION OF HYDROCORTISONE BY VIBRATIONAL FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY (FT-IR)

¹Juliana Nunes Lara.

²Bruna Ferro Brun.

³Lívia Carla de Melo Rodrigues.

⁴Valério Garrone Barauna.

^{5*}Leonardo Barbosa Leal

¹Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: juliananuneslara@gmail.com.

²Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail:brunafbrun@gmail.com.

³Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail:susuvi@gmail.com.

⁴Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail:barauna2@gmail.com.

⁵Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail:leal.leob@gmail.com.

*Autor de correspondência

Artigo submetido em 15/09/2022, aceito em 13/11/2022 e publicado em 10/03/2023.

Resumo: Cortisol é um hormônio esteroide secretado pelo eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), relacionado ao funcionamento adrenal e responde diretamente aos estímulos estressores. Objetiva-se, com este estudo, quantificar o cortisol em sua forma hidrocortisona utilizando a técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (ATR-FTIR). O pó da hidrocortisona foi diluído em formol e etanol na proporção de 1:1 e diluídos com água deionizada em seis pontos com range de 1 a 8ng/mL. As leituras foram realizadas com o espectrômetro Agilent Cary 630 para cada curva de diluição. Para análise estatística foram utilizados os pré-processamentos de suavização de Savitsky-Golay 21 pontos e 2ª ordem polinomial, e a correção de linha utilizada de Rubberband e PLSR para realização da curva de calibração. Como resultado, observou-se que a melhor região para análise de concentração da hidrocortisona foi entre 2800-3000cm⁻¹, responsável pelas ligações químicas entre CH₂, CH₃ e C-H em cadeias cíclicas. Através do PLSR foram obtidos resultados de predição de RMSE: 0,367 e R²: 0,96%. Os resultados deste estudo sugerem que é possível pela técnica de FTIR-ATR juntamente com a utilização do algoritmo de PLSR, fazer uma curva de calibração para a compreensão dos níveis de hidrocortisona em água.

Palavras-chave: cortisol; hidrocortisona; quantificação; FTIR.

Abstract: The abstract (summary in English) must be consistent with the Portuguese version (Resumo). The text should be formatted with the same standards listed above.

Keywords: three to five words.

1 INTRODUÇÃO

O cortisol é um esteroide produzido pelas glândulas adrenais, e controlado pela cascata metabólica do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (JÚNIOR *et al.*, 2017). O cortisol tem alta taxa de ligação as proteínas transcortinas (globulinas de ligação de cortisol- CBG) no plasma sanguíneo, servindo como reservatório, e esse mecanismo diminui as flutuações da concentração de hormônios no meio (ARAÚJO *et al.*, 2016). Outras funções estão relacionadas ao sistema imunológico, prevenção de processos inflamatórios e manutenção dos níveis de glicose no sangue, juntamente com o controle da pressão arterial (SILVA *et al.*, 2021). O nível de cortisol nos fluidos corporais segue o ciclo circadiano, apresentando um pico máximo pela manhã, com um decréscimo durante o dia e aumento novamente durante o sono REM (Rapid Eye Movement) (GATTI *et al.* 2009)

Os desequilíbrios dos níveis de cortisol podem ocorrer em doenças como a Síndrome de Addison ou Síndrome de Cushing (CAZON *et al.*, 2016) O tratamento dessas síndromes é realizado através da prescrição de cortisol na forma sintética, a hidrocortisona (SILVA, 2015 e CAZON *et al.*, 2016). Os desequilíbrios deste esteroide na corrente sanguínea podem ocorrer também quando o organismo entra em contato com algum agente estressor (físico, emocional psicológico ou fisiológico). O sistema de resposta ao estresse é ativado, havendo aumento dos níveis de cortisol (BOOIJ *et al.*, 2013). O cortisol induzido pelo estresse causa alerta, aumenta a pressão sanguínea e interfere em outras funcionalidades, como cicatrização, crescimento ósseo, digestão e outras características relacionadas à reprodução (SULTANA *et al.*, 2011).

Os métodos utilizados para detecção de cortisol são: cromatografia, ensaios imunológicos, ELISA, ensaios colorimétricos, ensaios enzimáticos, ensaios cinéticos e espectrometria de massa

(GATTI *et al.*, 2009 e SULTANA *et al.*, 2011). A quantificação do cortisol toma como referência principal o horário da coleta, uma vez que os níveis tendem a seguir o ciclo de sono-vigília, o horário do exame é especificado pelo médico responsável sendo mais comum que seja feito pela manhã (UPASHAM *et al.*, 2018).

A coleta do cortisol salivar, por exemplo, tem se mostrado promissora, principalmente por ser menos invasiva, uma vez que o próprio método da coleta pode significar um agente estressor para o paciente (KHAUSTOVA *et al.*, 2010).

A utilização da espectroscopia vibracional, (do inglês, *Fourier Transform Infrared - Attenuated total reflection*) FTIR-ATR tem sido estudada atualmente no campo de diagnóstico clínico, e tem indicado a possibilidade do desenvolvimento de uma metodologia menos invasiva, com alta acurácia e replicabilidade, podendo ser utilizada em qualquer biofluidos, incluindo a saliva (KHAUSTOVA *et al.*, 2010 e CAZON *et al.*, 2016). O objetivo deste estudo foi quantificar o cortisol em sua forma hidrocortisona utilizando técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (ATR-FTIR).

2. MÉTODOS

2.1. Cortisol

Para realização da padronização e quantificação do cortisol foi utilizado o pó de hidrocortisona, forma sintética do cortisol e composição química idêntica, de acordo com o fabricante. A hidrocortisona foi obtida da Sigma-Aldrich (Brasil, código H4001).

O frasco de hidrocortisona, obtido com 1g do composto foi diluído em 1ml de clorofórmio com etanol na proporção de 1:1 seguindo recomendação do fabricante, resultando em 1g/mL de hidrocortisona para solução estoque.

Da solução estoque foram obtidos seis pontos de diluições. Estas foram realizadas utilizando água deionizada com volume final de 1mL para cada diluição. As concentrações das diluições variaram de 1 a 8ng/mL, conforme descrito na Tabela 1. As bases dos cálculos foram realizadas de acordo com os valores do intervalo de cortisol salivar utilizado por Vieira, *et al.*, (2014) e Laboratório Mayo Clinicals.

Tabela 1. Pontos de diluição e modo de preparo para posterior leitura das amostras no FTIR

Pontos de diluição	Solução estoque (uL)	Água deionizada (uL)	Alíquota Final (uL)
1 – (1ng/mL)	5	95	100
2 – (2,5ng/mL)	13	87	100
3 – (4ng/mL)	20	80	100
4 – (5,5ng/mL)	28	72	100
5 – (7ng/mL)	30	70	100
6 – (8ng/mL)	40	60	100

Após o preparo, as amostras foram mantidas em geladeira (4°C) durante as leituras, e armazenadas no freezer (-20°C) após a finalização.

2.2. FT-IR

O FTIR é uma técnica que utiliza o range da luz infravermelha média (650-4000cm⁻¹) para identificação da diferença de vibração entre cada grupo funcional de moléculas, diferenciando assim lipídeos, carboidratos, glicose, ac. Graxos, entre outros.

O equipamento utilizado foi o Agilent (Cary 630 FTIR Spectrometer, Agilent, Santa Clara, California, United States), equipado

com complemento de ATR e cristal de diamante cedido gentilmente pela LapPetro-UFES. A faixa espectral obtida foi de 650 e 4000 cm⁻¹ com resolução de 4cm⁻¹, 32 scans de varredura e 32 scans de background.

O pó puro de hidrocortisona foi colocado no cristal para registro do espectro utilizado como comparação para os demais espectros que foram registrados posteriormente. Para a obtenção do registro dos espectros de cada ponto de diluição foram pipetados 10uL diretamente no cristal do equipamento e registrados em quintuplicata, após 50 minutos de secagem em temperatura ambiente. Após cada análise, a amostra era removida do cristal com água MiliQ, o equipamento seco com papel absorvente e, logo em seguida, o cristal era limpo com álcool a 70% para remoção total de interferentes, evitando assim a contaminação entre as amostras.

2.3. Pré-processamento e análise de dados

Os softwares utilizados para o pré-processamento de dados foram o OriginLab8.5 e o Orange Data Mining. Os ruídos foram retirados através da suavização de Savitzky-Golay 21 pontos e 2^a ordem polinomial, e a correção de linha utilizada de Rubberband.

O modelo PLSR foi realizado para análise da quantificação e curva de calibração dos espectros. Esta técnica também é conhecida como Partial Least Square Regression, traduzindo para Regressão dos Quadrados Mínimos Parciais. Este modelo realiza uma regressão, comparando os dados obtidos com um modelo linear, fornecendo assim parâmetros estatísticos para prever o erro do modelo criado (RMSE) e calcular o quanto este modelo se encaixa no modelo linear (MEVIK, 2004).

Os dados foram pré-processados e divididos em calibração e predição (proporção de 70%:30% de forma randômica). As

amostras de calibração ainda foram testadas com validação cruzada pelo método de LOOPCV (Leave One Out Patient Cross Validation).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados de temperatura e umidade foram registrados para melhor compreensão das condições ambientais dos resultados, com temperatura de $22,44 \pm 0,19$ °C e umidade $61,08 \pm 1,62\%$.

A figura 1 representa a média das replicatas do pó da hidrocortisona, utilizada neste estudo como comparativo padrão para detecção dos níveis de cortisol pela espectroscopia vibracional de FT-IR.

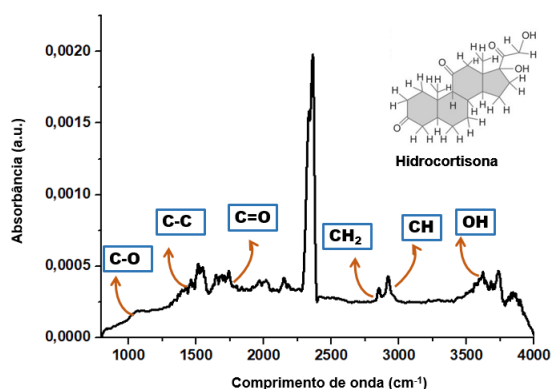
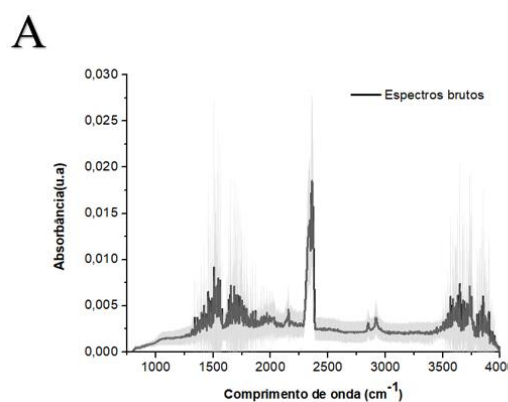


Figura 1: Média dos espectros do pó de hidrocortisona com descrição das suas moléculas

Segundo Khaustova *et al.*, (2010), as regiões espectrais 2800-3200 e 1900-900 são altamente indicativas para a determinação da concentração de cortisol, devido a composição da molécula descrita na figura 1. A hidrocortisona é composta por ciclohexanos, um ciclopentano ligado a duas cetonas, além de possuir ligação dupla entre os carbonos 4 e 5, e agrupamentos hidroxila e metil. Este composto puro possui bandas características nas regiões 3411 e 2918cm^{-1} para ligações O-H e C-H, enquanto ligações C=O geram bandas proeminentes em 1709 e 1638cm^{-1} (ALTAMIMI, 2019).

Na figura 2 está demonstrado todos os espectros obtidos em suas respectivas concentrações. A figura 2A é a representação da média dos espectros brutos de todos os pontos de diluição, juntamente com o desvio padrão. Na figura 2B podemos observar a mudança do perfil da média espectral e desvio padrão quando se realiza o pré-processamento dos dados. A figura 2C representa a região de escolha para quantificação, representada pela média e desvio padrão de cada concentração onde: I: Ponto 1 (C=1ng/mL), II: Ponto 2 (C=2,5ng/mL), III: Ponto 3 (C=4ng/mL), IV: Ponto 4 (C=5,5ng/mL), V: Ponto 5 (C=7ng/mL) e VI: Ponto 6 (C=8ng/mL). Para detecção e quantificação da hidrocortisona, esta região demonstrou ser de maior interesse, pois há duas bandas, $2840-2870$ e $2910-2940\text{cm}^{-1}$, formando um acréscimo em sua absorbância espectral de acordo com que a concentração era aumentada.



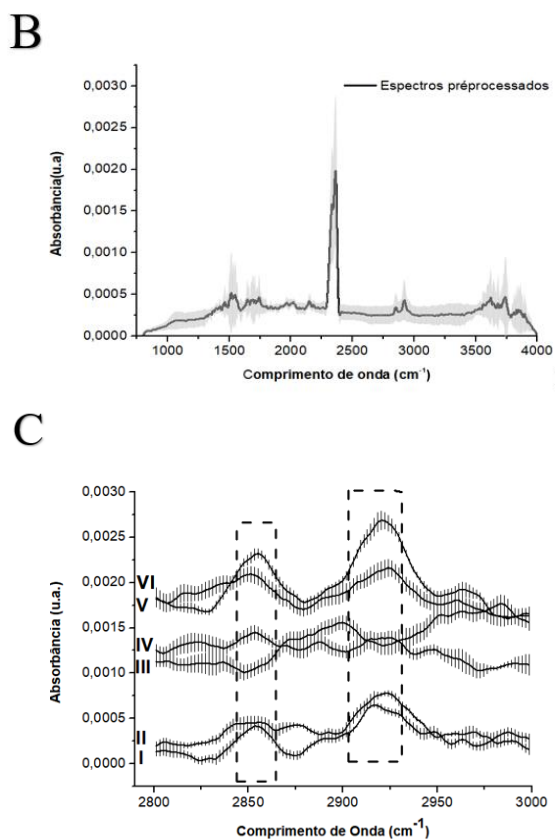


Figura 2: Etapas do pré-processamento dos espectros e seleção de bandas. A: Linha preta representa os espectros brutos e sombreado cinza o desvio padrão. B: Linha preta representa os espectros pré-processados com linha de base de Rubberband e suavização de 21 pontos. Sombreado cinza representa o desvio padrão entre os espectros. C: Média e desvio padrão representado pela área hachurada do espectro dos pontos de diluição onde I: Ponto 1 (C=1ng/mL), II: Ponto 2 (C=2,5ng/mL), III: Ponto 3 (C=4ng/mL), IV: Ponto 4 (C=5,5ng/mL), V: Ponto 5 (C=7ng/mL) e VI: Ponto 6 (C=8ng/mL)

Neste sentido, os espectros mostraram-se fiéis para os dados da literatura supracitados, principalmente em relação ao trabalho de Altamini, 2019. A região observada com bom diagnóstico dos níveis de hidrocortisona em solução corresponde às ligações de O-H e C-H dos intervalos 3400 a 2900 cm⁻¹.

Lemes *et al.* (2016), provaram que com análise de correlação através de análises univariadas que a concentração e cortisol pode ser avaliada no sangue de atletas de acordo com momentos pré e pós exercício. Resultados mostram R² superiores a 0,70, enquanto no presente estudo foi utilizado o método multivariado de PLSR que permitiu

analisar as concentrações de hidrocortisona. Foi possível estimar e quantificar o composto com correlação de R² de 0.96 com erro de predição de 0.36ng/mL. Tal metodologia teve o intuito de construir um modelo preditivo para o intervalo de concentração, além de avaliar a capacidade preditiva da curva de concentração de hidrocortisona.

Para quantificação do nível de hidrocortisona foram utilizadas a região das bandas representadas na figura 2.

A figura 3 representa a correlação entre os dados de todos os espectros de acordo com suas concentrações já conhecidas e preditas pelo modelo de PLSR construído.

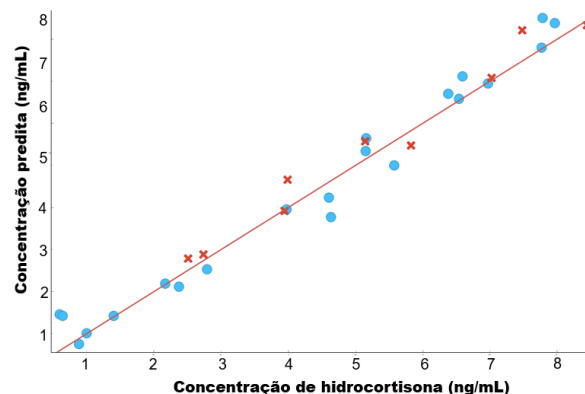


Figura 3: Modelo de PLSR. Correlação entre os dados demonstrada pela linha central. Círculos em azul mostram as amostras de calibração e “X” em vermelho mostram as amostras de validação

Na tabela 2 estão as figuras de mérito (FM) do modelo de PLSR, no qual foram utilizadas 2 variáveis latentes. Foi obtido um erro de predição de 0.36ng/mL e R² de 0.96.

Tabela 2. Figuras de mérito do modelo PLSR para quantificação da hidrocortisona

Modelo PLSR	FM (ng/mL)
Variáveis latentes	2
RMSEC	0,408
R ² (calibração)	0,975

RMSEP	0,367
R ² (predição)	0,967

Os resultados deste estudo sugerem que é possível pela técnica de FTIR-ATR juntamente com a utilização do algoritmo de PLSR, fazer uma curva de calibração para a compreensão dos níveis de hidrocortisona em água.

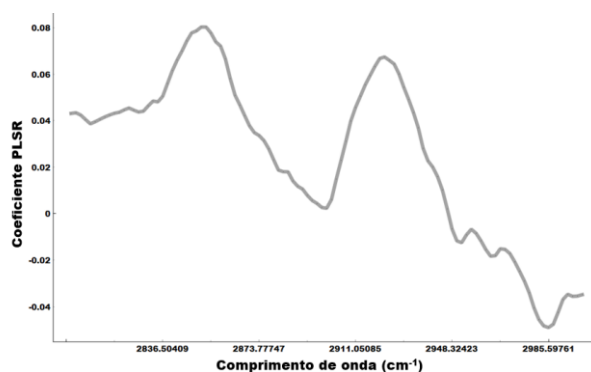


Figura 4. Coeficientes do modelo de PLSR mostrando as bandas relacionadas aos resultados obtidos.

Tal resultado está relacionado as bandas de 2840-2870 e 2910-2940cm⁻¹, as quais envolvem ligações químicas de O-H, C-H e C=O, predominantes na hidrocortisona (ALTAMIMI, 2019). O limite de quantificação (LOQ) obtido foi de 0,77ng/mL e o limite de detecção (LOD) do modelo foi de 0,48ng/mL

Os próximos passos neste estudo envolvem a necessidade de ser repetida a mesma metodologia em amostras biológicas, como saliva ou sangue, para que a técnica possa ser transportada para a clínica e realmente diagnosticar os níveis de cortisol ou hidrocortisona nos pacientes que necessitam deste tipo de exame.

4. CONCLUSÃO

A melhor região de identificação e para realização da curva de calibração para concentrações da hidrocortisona encontrado neste estudo foi a de 2800-3000cm⁻¹. Sendo este estudo de importância médica, profissional e social, visto que sugere uma

nova metodologia, menos invasiva, mais rápida e econômica para os exames de quantificação de cortisol no organismo. Os resultados deste estudo sugerem que é possível pela técnica de FTIR-ATR juntamente com a utilização do algoritmo de PLSR, fazer uma curva de calibração para a compreensão dos níveis de hidrocortisona em água. Adicionalmente, sabendo da importância do cortisol e as aplicações da hidrocortisona, são necessárias as realizações de estudos e a elaboração de melhorias em respeito do monitoramento dos níveis de cortisol no organismo.

AGRADECIMENTOS

Todos os autores agradecem ao LabPetro (UFES) pela utilização do espectrômetro de FTIR, (Técnico Acordos de Cooperação nº 0050.0022844.06.4). Este estudo foi apoiado pela FAPES (#300/2021; #113/2021), CNPq (#401870/2020-0; #315340/2021-5) e CAPES.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M. F. M. *et al.* Níveis plasmáticos de cortisol em universitários com má qualidade de sono. **Cad. Saúde Colet**, v 24, p. 105-110, 2016.
- BOOIJ, S. H. *et al.* Chronicity of depressive problems and the cortisol response to psychosocial stress in adolescents: **The TRAILS study**. **Psychoneuroendocrinology**. v. 38, p. 659-666, 2013.
- CAZON, K. M. J. *et al.* Doença de Addison e esclerose múltipla: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 17, p. 35-37, 2016.
- Gatti, R. *et al.* Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. **Clinical biochemistry**, v. 42, p. 1205-1217, 2009.
- JÚNIOR, P. C. C. *et al.* Isokinetic muscle performance and salivary immune-endocrine responses in handball players by

- Fourier transform infrared spectroscopy. **Revista Andaluza de Medicina del Deporte**, v.10, p. 125-131, 2017.
- KHAUSTOVA, S. *et al.* Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. **Analyst**, v. 135, p. 3183-3192, 2010.
- SILVA, C. Q. *et al.* Evaluation of the psychopathological profile of medical students and its correlation with cortisol levels. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, p. 43490-43510, 2021.
- SILVA, E. Efeitos do estresse crônico em áreas do cérebro. **Revista Eletrônica da Estácio Recife**, 2015.
- SULTANA, R. R. *et al.* A comparative study of spectral exploration of saliva of nonalcoholic and alcoholic men at diferente time using FTIR Analysis. **International Research Journal of Management Science & Technology**, v. 2, p. 38-55, 2011.
- UPASHAM, S. *et al.* Development of ultra-low volume, multi-bio fluid, cortisol sensing platform. **Scientific reports**, v 8, p 1-12, 2018.
- VIEIRA, J. G. H. *et al.* Determination of cortisol and cortisone in human saliva by a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 58, p. 844-50, 2014.
- MEVIK, B. H. Mean squared error of prediction (MSEP) estimates for principal component regression (PCR) and partial least squares regression (PLSR). **Journal of Chemometrics** v 18 p 422-429, 2004.
- ALTAMIMI, M. A. *et al.* Evaluation of the bioavailability of hydrocortisone when prepared as solid dispersion. **Saudi Pharmaceutical Journal**. v 27, p 629-636, 2019.
- LEMES, L. C. *et al.* Analysis of serum cortisol levels by Fourier Transform Infrared Spectroscopy for diagnosis of stress in athletes. **Research on Biomedical Engineering** v 32. p. 293-300, 2016.