UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

GUILHERME LOPES BATISTA

Análise de acetona em ar exalado:
Desenvolvimento de método eletroanalítico
e algoritmo para processamento de sinais

Versão da corrigida da tese conforme resolução CoPgr5890

O original se encontra disponível na secretaria de pós graduação do IQ-USP

São Paulo

Data de depósito na SPG:

17/11/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

GUILHERME LOPES BATISTA

**Análise de acetona em ar exalado:
Desenvolvimento de método eletroanalítico
e algoritmo para processamento de sinais**

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Química)*

Orientador: Prof. Dr. Ivano Gebhardt Rolf Gutz

São Paulo

Data de depósito na SPG:

17/11/2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

B333a	<p>Batista, Guilherme Lopes</p> <p>Análise de acetona em ar exalado: desenvolvimento de método eletroanalítico e algoritmo para processamento de sinais / Guilherme Lopes Batista. -- São Paulo, 2015.</p> <p>108p</p> <p>Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.</p> <p>Orientador: Gutz, Ivano Gebhardt Rolf</p> <p>1. Métodos instrumentais : Análise química 2. Voltametria 3. Processamento de sinais 4. Compostos voláteis 5. Cetona 6. Prognóstico I. T. II. Gutz, Ivano Gebhardt Rolf, orientador.</p> <p style="text-align: right;">546.08 CDD</p>
-------	--

Nome: BATISTA, Guilherme Lopes

Título: Análise de acetona em ar exalado: Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica e algoritmo para processamento de sinais

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências (Química).

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

O estímulo, suporte e confiança que recebi ao longo do desenvolvimento deste projeto de doutorado estão além de qualquer agradecimento que eu seja capaz de realizar nos próximos parágrafos. Espero que consiga transmitir meus sentimentos de gratidão de maneira tão intensa e sincera quanto os sinto, não apenas aqui, mas pela minha postura ao longo de minha vida.

A união e o apoio de meus pais (André e Maria Luiza) e minhas irmãs (Priscila e Larissa) é um verdadeiro presente que recebi em minha vida. Sou absolutamente grato por todo o suporte e certamente não poderia ter seguido esse caminho se não fosse por eles. Sinto que sou uma pessoa melhor hoje, por tudo que me permitiram viver, de maneira independente e junto a eles. Espero evoluir mais a cada dia e lhes dedicar o meu melhor. São poucas palavras frente ao sentimento de consideração e gratidão que tenho, que não pode ser medida em escala alguma.

A oportunidade de ter conhecido, trabalhado e convivido com meu orientador, Ivano G.R. Gutz, foi uma experiência ímpar e de valor inestimável na minha vida. O estímulo que ele me deu pelos estudos veio ainda antes de eu pensar em fazer faculdade ou até mesmo o conhecer, pela organização da Olimpíada Paulista de Química (OQSP), me aproximando tanto do Instituto de Química quanto desta ciência, em si. Em um segundo momento, já como aluno de pós-graduação, ele depositou em mim uma confiança até ousada de me deixar seguir pelos caminhos que eu quis, sem nunca deixar de oferecer seu apoio e sua sabedoria sempre surpreendentes. Até mesmo os erros que o professor me permitiu cometer e a liberdade que me deu para eu me aprofundar em assuntos pouco explorados nesta tese foram absolutamente importantes em minha formação, nos mais diversos aspectos, e sei o quanto é rara (se não for única) essa maneira de ensinar. Tenho plena consciência que muitas das qualidades que tenho hoje são resultantes desta influência, da qual sou extremamente grato, e gostaria de registrar aqui minha enorme admiração pela sua postura, competência e pelo grande homem que ele é.

O Grupo de Pesquisas em Química Analítica Instrumental (GPQAI), também conhecido (informalmente) como LAIA, é um ambiente de trabalho e colaboração também fascinante. A excelente interação entre as pessoas, sempre dispostas a ajudar em um ambiente sempre leve não poderiam ser melhores, e me considero uma pessoa de sorte também por ter feito parte disso. Eu hoje entendo o que

realmente significa ter ser parte do LAIA, e creio que apenas quem tenha vivido isso possa compreender bem isso. Certamente o LAIA sempre será parte de mim.

Toda a estrutura e apoio que recebi também do Instituto de Química foram especiais, e o grande nome e força da instituição se fazem do trabalho e dedicação de docentes e funcionários que devem ser valorizados, e aos quais deixo agradecimentos sinceros.

Certamente também não posso esquecer do apoio de grandes amigos que, mesmo não estando diretamente ligados ao trabalho, estiveram junto e certamente ajudaram de maneira decisiva.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo apoio financeiro.

“All models are wrong,
but some are useful”

George E. P. Box

RESUMO

Batista, G.L. Análise de acetona em ar exalado: Desenvolvimento de método eletroanalítico e algoritmo para processamento de sinais [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Química, 2015. 111 páginas

Propõe-se método novo e completo para análise de acetona em ar exalado envolvendo coleta com pré-concentração em água, derivatização química e determinação eletroquímica assistida por novo algoritmo de processamento de sinais. Na literatura recente a acetona expirada vem sendo avaliada como biomarcador para monitoramento não invasivo de quadros clínicos como diabetes e insuficiência cardíaca, daí a importância da proposta. Entre as aminas que reagem com acetona para formar iminas eletroativas, estudadas por polarografia em meados do século passado, a glicina apresentou melhor conjunto de características para a definição do método de determinação por voltametria de onda quadrada sem a necessidade de remoção de oxigênio (25 Hz, amplitude de 20 mV, incremento de 5 mV, eletrodo de gota de mercúrio). O meio reacional, composto de glicina ($2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em meio NaOH ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), serviu também de eletrólito e o pico de redução da imina em $-1,57 \text{ V vs. Ag|AgCl}$ constituiu o sinal analítico. Para tratamento dos sinais, foi desenvolvido e avaliado um algoritmo inovador baseado em interpolação de linha base por ajuste de curvas de Bézier e ajuste de gaussiana ao pico. Essa combinação permitiu reconhecimento e quantificação de picos relativamente baixos e largos sobre linha com curvatura acentuada e ruído, situação em que métodos convencionais falham e curvas do tipo *spline* se mostraram menos apropriadas. A implementação do algoritmo (disponível em <http://github.com/batistagl/chemapps>) foi realizada utilizando programa *open source* de álgebra matricial integrado diretamente com *software* de controle do potenciostato. Para demonstrar a generalidade da extensão dos recursos nativos do equipamento mediante integração com programação externa em linguagem Octave (*open source*), implementou-se a técnica da cronocoulometria tridimensional, com visualização de resultados já tratados em projeções de malha de perspectiva 3D sob qualquer ângulo.

A determinação eletroquímica de acetona em fase aquosa, assistida pelo algoritmo baseado em curvas de Bézier, é rápida e automática, tem limite de detecção de

$3,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($0,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e faixa linear que atende aos requisitos da análise em ar exalado. O acetaldeído, comumente presente em ar exalado, em especial, após consumo de bebidas alcoólicas, dá origem a pico voltamétrico em $-1,40 \text{ V}$, contornando interferência que prejudica vários outros métodos publicados na literatura e abrindo possibilidade de determinação simultânea. Resultados obtidos com amostras reais são concordantes com os obtidos por método espectrofotométrico, em uso rotineiro desde o seu aperfeiçoamento na dissertação de mestrado do autor desta tese. Em relação à dissertação, também se otimizou a geometria do dispositivo de coleta, de modo a concentrar a acetona num volume menor de água gelada e prover maior conforto ao paciente. O método completo apresentado, englobando o dispositivo de amostragem aperfeiçoado e o novo e efetivo algoritmo para tratamento automático de sinais voltamétricos, está pronto para ser aplicado. Evolução para um analisador portátil depende de melhorias no limite de detecção e facilidade de obtenção eletrodos sólidos (impressos) com filme de mercúrio, vez que eletrodos de bismuto ou diamante dopado com boro, entre outros, não apresentaram resposta.

Palavras-chave: Ar exalado. Acetona. Voltametria. Processamento de sinal. Curvas de Bézier. Octave.

ABSTRACT

Batista, G.L. Breath Acetone Analysis: Development of electroanalytical method and signal processing algorithm. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Química, 2015. 111 pages

A new and complete method for analyzing acetone in exhaled breath is proposed, involving sample collection by preconcentration in water, chemical derivatization and electrochemical determination assisted by a new signal processing algorithm. Breath acetone is under investigation in the medical literature as a biomarker for noninvasive monitoring of clinical conditions such as diabetes and heart failure and better analyzers are demanded. Some amines that react with acetone to form electroactive imines, already studied by polarography in the middle of the last century, were evaluated here as derivatizing agents and glycine presented the best compromise for the definition of a determination method by square wave voltammetry without purging of dissolved oxygen (20 mV pulses at 25 Hz with 5 mV scanning steps, mercury drop electrode). The derivatization medium of glycine ($2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and NaOH ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) also serves as electrolyte and the imine reduction peak at -1.57 V vs. Ag|AgCl constitutes the analytical signal. For signal processing a novel algorithm based on baseline automatic prediction using Bézier curves was developed in combination with Gaussian peak fitting. This innovative combination enables the recognition and quantification of relatively low and broad peaks on a curved and noisy baseline while standard procedures fail and fitting of *splines* is less appropriate. The algorithm (available at <http://github.com/batistagl/chemapps>) was implemented using open source matrix algebra software directly integrated with the potentiostat control software. The generality of this approach to extend the native resources of commercial equipment was evidenced by proceeding the implementation of 3D chronocoulometry with help of the open source Octave language. The processed charge vs. potential vs. time function 3-D surfaces for the forward and backward steps can be observed from any angle on the screen.

The fast automatic electrochemical determination of acetone assisted by the Bézier based curve fitting algorithm, with an acetone detection limit of $3.5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and a wide linear range is entirely satisfactory for breath analysis.

Acetaldehyde, an expected component of breath, especially after ingestion of alcohol, and a common interferent for some other analytical methods, generates a peak at -1.40 V that does not interfere with the acetone determination and that is possibly suitable for simultaneous determination of this analyte.

Results obtained with real samples are in agreement with spectrophotometric determinations routinely applied to breath analysis, formerly developed in the master dissertation of the author of this thesis. The geometry of the impinger sampling device was also improved (in comparison with the dissertation) in order to collect the acetone in a smaller volume of cooled water and to allow the patient to breath more freely. The complete method at its current state of development, encompassing the improved sampler and the new effective signal processing algorithm for voltammetric signals is ready for use. Evolution to a portable analyzer can be envisioned if the shortcomings of detection limits of solid (screen-printed) electrode preparation with a mercury film are overcome, once the imine signal was not observed on solid electrodes like bismuth and boron doped diamond.

Keywords: Breath analysis. Acetone. Square Wave Voltammetry. Signal Processing. Bézier Curves. Octave.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Balanço de massa no organismo.....	17
Figura 1.2: Representação de sinais transientes.....	26
Figura 1.3: Ajuste de spline cúbica a conjunto de dados.....	29
Figura 1.4: Operação na filtragem de dados por transformada de Fourier.....	30
Figura 1.5: Exemplo de curva de Bézier Cúbica.....	32
Figura 3.1: Impinger para coleta de ar exalado (desenvolvido no mestrado).....	46
Figura 3.2: Impinger para coleta de ar exalado (proposto neste trabalho).....	47
Figura 4.1: Voltamograma cíclico de solução de glicina contendo acetona.....	50
Figura 4.2: Formação da imina a partir de glicina e acetona.....	51
Figura 4.3: Redução eletroquímica da imina.....	51
Figura 4.4: Efeito da purga na determinação voltamétrica.....	52
Figura 4.5: Efeito do pré condicionamento.....	52
Figura 4.6: Comparação entre técnicas voltamétricas.....	53
Figura 4.7: Efeito da frequência de aplicação na voltametria de onda quadrada.....	55
Figura 4.8: Efeito da amplitude de pulso na Voltametria de onda Quadrada.....	56
Figura 4.9: Curva de Calibração utilizando amálgama de ouro.....	57
Figura 4.10: Avaliação do contra íon do alcalinizante utilizado.....	58
Figura 4.11: Influência da concentração de hidróxido.....	59
Figura 4.12: Mecanismo de formação de imina.....	60
Figura 4.13: Mecanismo de redução eletroquímica de imina.....	60
Figura 4.14: Teste de interferência a acetaldeído.....	62
Figura 4.15: Voltamograma de onda quadrada de solução contendo acetona.....	64
Figura 4.16: Ilustração do método de estimativa de linha base.....	66
Figura 4.17: Esquema explicativo do algoritmo desenvolvido para tratamento dos sinais.....	68
Figura 4.18: Sequência de tratamento de sinais aplicados a uma amostra.....	69
Figura 4.19: Curva de calibração em eletrodo de gota pendente de mercúrio.....	70
Figura 4.20: Ajustes de curvas de Bézier de diferentes graus para linha base.....	71
Figura 4.21: Comparação de algoritmos para previsão de linha base.....	72
Figura 4.22: Comando do NOVA utilizado para integração com programa externo. .	73
Figura 4.23: Fluxo de dados entre softwares durante análise.....	74
Figura 4.24: Importação dos dados calculados pelo Octave pelo NOVA.....	75
Figura 4.25: Sequência de procedimentos da Cronocoulometria Tridimensional.....	80

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Aspectos históricos.....	13
1.2 Composição da amostra.....	15
1.3 Análise química de ar exalado.....	19
1.3.1 Coleta da amostra.....	19
1.3.2 Determinação Química.....	21
1.3.3 Tratamento de dados.....	24
1.4 Análise de Acetona em ar exalado.....	36
2 OBJETIVOS.....	41
3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Otimização do coletor de ar exalado.....	47
4.2 Desenvolvimento do método de determinação.....	48
4.2.1 Aspectos gerais do sistema eletroquímico.....	48
4.2.2 Utilização de eletrodo sólido.....	52
4.2.3 Considerações sobre o alcalinizante.....	57
4.2.4 Interferência a acetaldeído.....	60
4.2.5 Comparação entre métodos voltamétricos.....	61
4.3 Processamento dos sinais obtidos.....	62
4.3.1 Perfil do sinal e abordagem de tratamento.....	62
4.3.2 Implementação do algoritmo.....	66
4.4 Sistema de análise integrado.....	71
4.5 Aplicação em amostras reais.....	74
4.6 Cronocoulometria tridimensional.....	77
5 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICE A – Scripts e Códigos.....	91

1 INTRODUÇÃO

A análise de acetona em ar exalado, tema já abordado na dissertação de mestrado do presente autor¹, é um assunto extensivamente explorado há décadas²⁻⁸ e, ainda assim, está longe de ser esgotado. Analisadores robustos e portáteis, de simples operação e imunes a interferentes, semelhantes ao etilômetro (conhecidos popularmente como bafômetros, hoje facilmente encontráveis até mesmo em farmácias) infelizmente ainda não são uma realidade. Para entender os motivos para tanto, bem como as novidades que este trabalho apresenta para este campo, é necessário conhecer um pouco sobre esse tipo de amostra e o estado da arte das técnicas de análise.

1.1 Aspectos históricos

Apesar de aparentemente ousada, a análise de ar exalado para fins clínicos é uma ideia bastante antiga. Hipócrates (460-370 A.C.), reconhecido como pai da medicina ocidental, já recomendava a seus discípulos sentirem o odor que seus pacientes exalavam durante a respiração. Por meio desta prática, quadros de doenças graves como diabetes e insuficiência renal já podiam ser identificados de maneira não invasiva⁹.

A composição do ar exalado veio a ser estudada ainda nos primórdios da Química moderna. Em 1768, Lavoisier e Laplace detectaram o consumo de oxigênio atmosférico e a geração de gás carbônico no processo respiratório. Tais resultados, acompanhados por experimentos calorimétricos, levaram estes pesquisadores a concluir que a respiração se trata de um lento processo de combustão¹⁰.

O reconhecimento de outros compostos nesta amostra ocorreram apenas dali cerca de um século, pela introdução de testes analíticos por colorimetria. Em meados do século XIX, A. Nebelthau observou uma mudança rápida na coloração de uma solução de iodo em meio alcalino quando expostas ao ar exalado por

pacientes com elevado grau de diabetes, e em 1874, F. A. Anstie detectou etanol na amostra de voluntários após consumo de bebidas alcoólicas, utilizando solução de ácido crômico⁹.

Diversos métodos foram desenvolvidos para análise de ar exalado no final do século XIX e no começo do século XX. Por eles, foi possível quantificar o gás carbônico exalado no processo respiratório¹¹, verificar a proporção de etanol entre o sangue e o ar exalado¹² e até determinar acetona, primeiramente em voluntários em jejum e, com procedimentos aprimorados, inclusive em pessoas saudáveis². Requeriam analistas treinados por envolver laboriosas etapas de amostragem, tratamento de amostra (para pré concentração e eliminação de interferentes) e quantificação.

A demanda toxicológica por análises de álcool motivou o desenvolvimento de analisadores mais práticos, chegando a dispositivos para uso em delegacias já na década de 1930, que vieram a ser aplicados largamente nos Estados Unidos nos anos posteriores¹².

O surgimento das técnicas instrumentais, a partir de então, começou a tornar a área de análise de ar exalado mais acessível. Em 1943, medições mais precisas da concentração de gás carbônico foram realizadas por meio da emergente espectroscopia fotoacústica¹³. Na década de 1950 o surgimento dos espectrômetros de massa permitiu a avaliação dos gases do volume morto da respiração¹⁴ e da concentração de acetona no condensado do ar exalado por pacientes diabéticos³, em medidas mais precisas já realizando a identificação dos compostos.

Uma grande intensificação dos estudos na área veio a ocorrer a partir do final da década de 1960, decorrente dos progressos na área de análises instrumentais, em especial das técnicas de cromatografia a gás¹⁵. Alguns quadros clínicos foram suficientemente estudados ao ponto do desenvolvimento de testes clínicos com ar exalado, como a capnografia¹⁶ e a análise de infecções gastrointestinais^{17,18}. Ainda em 1971, um estudo exploratório por cromatografia a gás demonstrou a presença de mais de duzentos compostos voláteis em uma única amostra¹⁹. Estudos posteriores com cromatografia acoplada a espectrometria de massas identificaram mais de mil compostos entre diferentes amostras de ar exalado, revelando que a maioria das

espécies exaladas não se repetem em todos os indivíduos²⁰.

Deste ponto duas abordagens são seguidas no estudo da análise de ar exalado e suas aplicações. De um lado, equipamentos mais complexos, versáteis, sensíveis e específicos permitem uma caracterização mais precisa e abrangente da amostra, em estudos de cunho mais básico para a melhor compreensão de sua complexidade. Do outro lado se encontra o desenvolvimento de métodos e dispositivos mais baratos, fáceis de operar e suficientemente seletivos, visando a resposta a um biomarcador ou mesmo a um conjunto destes, capaz(es) de diagnosticar um quadro clínico específico^{21,22}. As estratégias instrumentais para cada uma destas abordagens, bem como outros aspectos relevantes para esse tipo de análise, serão discutidos mais adiante.

1.2 Composição da amostra

As evidências médicas citadas e a verificação da mudança da composição do ar durante o processo de respiração ilustram a riqueza de informações que se pode encontrar nesta amostra. Esse processo pode ser entendido como parte do balanço de massa do organismo²⁰, esquematizado na Figura 1.1. Sendo uma das vias de saída de matéria do sistema, o ar exalado contém diversas moléculas voláteis ingeridas, absorvidas, injetadas pelo corpo e até geradas em processos metabólicos, que se misturam ao ar previamente inspirado. Vale ressaltar aqui a intensa troca gasosa ocorrida entre o sangue nos alvéolos e os gases nos pulmões*, de forma que a concentração de muitas moléculas voláteis presentes no sangue possui correlação direta com a sua concentração no ar exalado¹⁵.

Como se pode presumir do exposto acima, o ar exalado contém moléculas voláteis geradas em todos os tecidos corpóreos, não se limitando apenas aos processos químicos ocorridos em vias aéreas^{23,24}. Desta forma, inúmeras evidências de processos metabólicos podem ser observadas por meio de sua análise química, que vem, pois, a apresentar grande potencial diagnóstico. Pode parecer

* A área de contato superficial entre o sangue nos alvéolos pulmonares e os gases respirados é estimada em torno de 120 m², comparável a uma quadra de tênis.

surpreendente que este tipo de análise não se encontre mais difundido e em uso corriqueiro em campo clínico, fato que pode ser explicado pelas características da amostra e dos métodos analíticos disponíveis, aspectos a serem discutidos ao longo deste capítulo.

Figura 1.1: Esquema representativo do balanço de massa que ocorre no organismo

O ar exalado pouco difere do ar atmosférico, sendo majoritariamente constituído de nitrogênio, oxigênio, gases nobres e outros gases inertes presentes na atmosfera. Porém, além do consumo de oxigênio e produção de gás carbônico já evidenciadas por Lavoisier no século XVIII, a principal diferença entre as duas amostras reside na presença e concentração de diversos compostos voláteis em concentração traço. Esta fração corresponde a menos de cem partes por milhão na amostra²⁵ e contém numerosas e valiosas informações relevantes a respeito do metabolismo. Sua análise é um grande desafio para a Química Analítica: além da baixa concentração exigir sistemas bastante sensíveis, frequentemente precedidos de procedimentos para pré-concentração de compostos de interesse, a grande diversidade destes compostos exige detectores altamente seletivos ou o acoplamento com poderosas técnicas de separação.

É interessante ressaltar, dentro deste contexto, que a análise química de etanol em ar exalado, a aplicação em campo mais conhecida e mais precoce, é um caso analítico de menor complexidade. A faixa de concentração em que este analito se encontra em indivíduos após ingestão de bebidas alcoólicas é cerca de cem vezes maior do que a dos compostos orgânicos comumente presentes. Ainda que, nesta situação, o método precise ser menos sensível e a presença de substâncias interferentes pouco interfiram na análise, as técnicas modernas se comprovam suficientemente específicas²⁶⁻²⁸.

O etanol consumido pela ingestão de bebidas alcoólicas sofre processos de degradação no organismo, gerando diversas espécies químicas. Uma delas é o acetaldeído, que também se torna presente no ar exalado devido a sua alta volatilidade²⁹. É um composto que apresenta elevada toxicidade, de forma que diversos efeitos decorrentes da ingestão de álcool são creditados a sua presença no organismo³⁰, além de ser comprovadamente mutagênico e carcinogênico³¹.

Em algumas localidades, o acetaldeído pode ser encontrado no ar atmosférico, em decorrência do uso de combustíveis fósseis (em especial o etanol). Reiterando a Figura 1.1, pode-se observar que compostos inalados também podem ser incorporados pelo organismo, efeito observado para acetaldeído em estudos pioneiros realizados no Instituto de Química com participação do autor desta tese³². Ratos expostos a acetaldeído em câmaras com fluxo contínuo de ar previamente purificado adicionados a concentrações controladas do poluente apresentaram a formação de adutos entre o DNA e o composto, em especial no pulmão (onde foi possível observar forte correlação positiva com a concentração do poluente em fase gasosa).

Enquanto o acetaldeído gera efeitos ainda em estudo no organismo, outras substâncias possuem metabolismo bastante conhecido e podem ser utilizadas como corpos de prova em alguns testes. Uma abordagem comum é a administração de um composto normalmente não metabolizado pelo organismo, mas sim por algum patógeno a ser identificado em uma infecção. Dois exemplos são o teste para verificar a presença da bactéria *Campylobacter Pylori* (associada a doenças do sistema digestório, como úlcera gástrica), que detecta hidrogênio formado após ingestão de dose de uréia¹⁸, e o teste de supercrescimento bacteriano no intestino

delgado, que detecta metano ou hidrogênio após ingestão de açúcares específicos¹⁷.

Outras espécies são geradas durante o metabolismo continuamente, sem a interferência direta de algo recém-inserido no balanço de massa do organismo. Um exemplo é o isopreno, encontrado no ar exalado em qualquer indivíduo, subproduto da síntese natural do colesterol²³. Mesmo sendo comum no ar exalado³³, a verificação de variações na sua concentração pode indicar distúrbios na produção de colesterol pelo organismo²⁴. Por ser uma espécie não comumente encontrada no ar atmosférico, um estudo curioso propõe que a presença humana prévia em um ambiente pode ser confirmada pela detecção deste analito no ambiente³⁴.

A constatação de outros hidrocarbonetos no ar exalado, comumente presentes em partes por bilhão, é frequentemente associada à ocorrência de processos de *stress* oxidativo no organismo, e seu aumento é associado a diversas condições clínicas, como fumo, inflamação no intestino delgado, infecção por HIV³⁵ e rejeição a transplantes cardíacos, este último sendo um teste já aprovado pela FDA (Heartsbreath, H030004)³⁶.

Compostos orgânicos nitrogenados não são comumente encontrados no ar exalado mas podem ser observados especialmente em pacientes com problemas renais, em decorrência de problemas associados ao mecanismo de formação de uréia³⁷. Mercaptanas e compostos sulfurados são comumente sintetizados por ação bacteriana e são indícios de problemas na saúde bucal³⁸. Em alguns casos, certos compostos desta classe também podem indicar problemas hepáticos²³. Há também interesse em monitorar compostos inorgânicos voláteis. Como exemplos podem ser citados o óxido de nitrogênio e o peróxido de hidrogênio, associados a quadros de inflamação respiratória e asma³⁹.

Dos compostos orgânicos presentes no ar exalado, o que mais se destaca em termos de concentração sob metabolismo comum é a acetona (propanona), formada, via de regra, pela descarboxilação da acetil coenzima A durante os processos de lipólise ou peroxidação lipídica⁸. Isso acontece quando o organismo busca fontes de energia alternativas à glicose, seja por problemas em seu metabolismo (como no caso da diabetes)^{3,4}, ou quando os níveis de glicose no sangue estão baixos e o organismo começa a consumir substratos lipídicos (quadros

estimulados por algumas dietas⁷ ou jejum⁴⁰). Em quadros clínicos graves pode apresentar concentrações na ordem de dezenas de microgramas de acetona por litro de ar exalado.

Recentemente, medições realizadas no InCor em conjunto com o autor desta tese comprovaram empiricamente um aumento da concentração exalada de acetona por pacientes de insuficiência cardíaca^{41,42}. Os resultados obtidos culminaram na proposição da medida como um método prognóstico e diagnóstico para este quadro clínico⁴³. O método de análise utilizado consiste na coleta em água deionizada, conservação da amostra a -80°C e determinação espectrofotométrica após envio destas amostras ao laboratório do IQUSP¹.

Estes estudos abrem perspectivas para diversas investigações químicas, desde a compreensão das rotas metabólicas envolvidas até o desenvolvimento de metodologias de análise e sensores para estudos e realização de diagnósticos em campo, seja, em um primeiro momento, nos hospitais, mas posteriormente um dispositivo que permita o auto-monitoramento dos pacientes em suas casas, como ocorre hoje com medidores de glicose utilizando uma gota de sangue do voluntário.

1.3 Análise química de ar exalado

Como já pontuado anteriormente, os métodos de análise de ar exalado exigem cuidados em cada etapa de sua realização, e existem diversas estratégias para melhorar a precisão e a exatidão dos resultados obtidos.

1.3.1 *Coleta da amostra*

A etapa de coleta é crítica para a análise de ar exalado. Os compostos voláteis, em baixa concentração, podem sofrer permeação ou adsorção pelas superfícies dos recipientes nos quais são coletados. Visando evitar estes problemas comumente se buscam recipientes (*canisters*) metálicos ou bolsas poliméricas inertes (tais quais fluoreto de polivinilina)⁴⁴ quando se realiza coleta direta. Visto que a

maioria destes compostos não são detectáveis diretamente pela maioria das técnicas analíticas disponíveis atualmente, frequentemente uma etapa de pré-concentração é realizada durante ou logo após a coleta^{22,45}.

Na coleta por resfriamento, tipicamente realizada em temperaturas próximas a 0 °C, parte da umidade (presente em alto teor no ar exalado) condensa no coletor, retendo componentes de grande afinidade com a água (como por exemplo, peróxido de hidrogênio). Também é utilizada para coleta de analitos menos voláteis emitidos no processo respiratório, bem como para coleta de substâncias não voláteis presentes em aerossóis (como, por exemplo, íons inorgânicos e proteínas)⁴⁶⁻⁴⁸.

Em alguns casos é interessante a absorção da amostra diretamente em alguma solução aceptora previamente contida no recipiente de coleta. Neste caso, substâncias que possuam maior interação com a fase líquida (seja por derivatização ou mesmo apenas por apresentarem uma partição favorável) são retidas com maior eficiência. Esta abordagem foi estudada e utilizada no projeto que originou a dissertação de mestrado do autor desta tese¹, na qual se pode encontrar a discussão acerca de sua eficiência, e é aplicada também neste trabalho.

A acepção em líquido pode ainda ser realizada por métodos de microextração. Em uma das formas, a amostra flui por tubo permeável ao analito, concêntrico a um segundo tubo contendo solução extratora⁴⁹. Outra forma é pelo contato da amostra em fino filme ou gota de solução aceptora, por meio dos quais ocorre uma grande pré-concentração devido a relação bastante favorável de área/volume no processo de extração⁵⁰.

Outra abordagem possível e bastante explorada é a pré-concentração por meio de adsorção em fase sólida. Cartuchos contendo material de grande área superficial e afinidade química com a espécie a ser adsorvida (há diversos modelos com diferentes composições disponíveis comercialmente)⁵¹ são expostos a fluxo do gás a ser analisado, ocorrendo adsorção de moléculas de interesse a serem analisadas. Na etapa de análise, tais moléculas sofrem dessorção por aquecimento ou eluição com solvente^{20,44}.

Uma forma alternativa de se realizar a coleta com pré-concentração é pelo uso de fibras recobertas por material sólido ou líquido. Frequentemente montadas

dentro de agulhas, elas são expostas a amostra durante o procedimento de amostragem, e o processo de dessorção pode ocorrer diretamente no injetor do cromatógrafo (termicamente) ou também por extração em solvente^{52,53}.

É importante se atentar sempre em processos de coleta por adsorção para que não ocorram efeitos de memória ou saturação do material adsorvente^{51,22}. O efeito de memória consiste na dessorção incompleta de compostos durante um procedimento de análise, de forma que parte do material remanescente é encontrado em análises posteriores, ocasionando observação de concentrações maiores do que as reais (ou até falsos positivos). O efeito de saturação ocorre quando o material sofre sobreexposição ao analito, de forma que a quantidade deste não varia linearmente com a concentração da amostra. Neste caso, a concentração estimada no processo de análise tende a ser menor do que aquela presente na amostra.

A baixa concentração dos compostos de interesse na amostra, que implicam em menor detectabilidade e difícil preservação da amostra, não é a única particularidade da amostra a ser observada. Apesar da maior parte do volume exalado ser oriunda dos pulmões e representativa da troca dos alvéolos (conforme explicado na Seção 1.2), parte do volume advém do trato respiratório, no qual o equilíbrio de fases entre o sangue e o ar exalado é muito menos representativo, e a composição é mais influenciada por substâncias voláteis geradas nas vias respiratórias⁵⁴. Apesar de haver propostas para aproveitamento exclusivo do ar alveolar^{55,56}, o método mais utilizado, por questão de praticidade, ainda é a amostragem do volume total coletado²³. É interessante comentar, contudo, que alguns casos podem demandar justamente a coleta de ar não alveolar, por exemplo para estudos de inflamações no trato respiratório³⁹ ou halitose crônica⁵⁷.

1.3.2 *Determinação Química*

Conforme já citado neste texto, existem dois paradigmas para a elaboração de um método de determinação analítica: instrumentos mais complexos, versáteis e compreensivos permitem estudos mais aprofundados e detalhados acerca da

amostra, sendo uma abordagem geralmente utilizada frente a algum problema desconhecido; e o desenvolvimento de dispositivos mais simples direcionados à resolução de um problema analítico já conhecido (muitas vezes por meio da primeira abordagem).

Como técnicas exploratórias para análise de ar exalado, na grande maioria dos casos se utiliza cromatografia a gás e espectrometria de massas, na maioria das vezes acopladas. Potencialmente capazes de determinar qualquer composto na amostra em concentrações tão baixas quanto nanogramas por litro de amostra, são utilizadas para estudar o perfil de amostras e reconhecer padrões entre grupos^{21,22}. Apesar de serem técnicas poderosas, ainda vale ressaltar a relevância da estratégia de coleta e armazenamento da amostra, que precisa ser otimizada para os analitos estudados de forma a obter resultados precisos e confiáveis. A contrapartida da versatilidade destes equipamentos é sua grande complexidade, que os torna grandes, dispendiosos e de difícil operação e manutenção, dificultando o uso em campo.

Existem no mercado hoje propostas de equipamentos de espectrometria de massas que, apesar de não tão versáteis, são instrumentalmente mais simples, utilizando pressões mais próximas a atmosférica e ionização por precursores químicos. Permitem a análise simultânea de diversas moléculas de baixa massa molecular e possuem grande detectabilidade para alguns analitos^{58,59}.

Um equipamento ainda mais simples é o espectrômetro de mobilidade iônica, que opera a pressão ambiente e é amplamente utilizado como detector em, por exemplo, em inspeção de bagagem de aeroportos, sendo encontrado até mesmo em versões portáteis. A separação dos íons é feita em uma câmara de deslocamento sob efeito de elevado campo elétrico e em presença de contra fluxo de gás inerte. Vem sendo aplicada em análise de ar exalado⁶⁰, e sua baixa resolução por vezes é suprida pelo acoplamento com uma separação cromatográfica prévia²¹.

A evolução de equipamentos de espectroscopia também abre a possibilidade de determinações multianalito simultâneas em concentrações traço, por meio de fontes de luz de *laser* e, frequentemente, câmaras de múltipla reflexão. Ainda não tão versáteis quanto técnicas espectrométricas, realizam a análise de diversos

compostos, tem grande sensibilidade e custo relativamente menor do que espectrômetros de massas⁶¹.

Os equipamentos citados nos últimos parágrafos, apesar de permitirem estudos aprofundados, são, via de regra, inviáveis para uso em campo, seja pelo seu tamanho, seja por conta de seu custo. Desta forma, o desenvolvimento de técnicas mais simples e baratas, já direcionadas a alguma aplicação específica, é bastante interessante especialmente para aplicações a beira leito ou até mesmo auto monitoramento (eventualmente assistido remotamente) de pacientes. A grande demanda de dispositivos deste caráter é comprovada pelo grande número de aplicações já desenvolvidas, sendo algumas até disponíveis comercialmente.

Diversas classes de sensores eletroquímicos podem ser utilizadas em análises de gases. Sensores voltamétricos ou amperométricos, baseados na resposta de corrente em função de aplicação de um potencial entre eletrodos uma solução, tem sido aplicados a gases eletroativos depois de coletados em meio líquido (seja por borbulhamento, seja por absorção em filme de líquido sob membrana permeável a gases). A célula de Clark para medição amperométrica de oxigênio⁶² é um exemplo clássico deste tipo de sensores que, em casos favoráveis, podem apresentar elevada sensibilidade e satisfatória seletividade. Modificações de sensores com enzimas podem melhorar a seletividade ou ainda estender a gama de analitos mensuráveis^{63,64}, mas, em geral, diminuem sua vida útil e o tempo de estocagem.

Curiosamente, testes agora instrumentais e precisos eram feitos por meio do olfato humano, capaz de reconhecer alguns padrões químicos de substâncias voláteis. Buscando ainda se valer de abordagem similar, alguns estudos realizados com animais com olfato mais desenvolvido que o humano tem apresentado grande capacidade no reconhecimento de quadros clínicos ainda não solucionados pela química analítica⁶⁵. Casos como esses ilustram a grande capacidade de sensores do tipo olfatório para resolução de problemas complexos, inspirando a criação de dispositivos de comportamento similar, frequentemente chamados de "narizes eletrônicos".

O olfato animal é constituído do arranjo de centenas de sensores, e a combinação das respostas permite a identificação de uma gama extremamente

variada de odores em diversas intensidades. Apesar da inespecificidade dos sensores e da não linearidade de suas respostas, o cérebro consegue interpretar a combinação dos estímulos e identificar diversos padrões, constituindo um sistema bastante versátil.

Sistemas químicos contendo diversos sensores inespecíficos também podem ser construídos, e, apesar da aparente complexidade instrumental, muitas vezes são sistemas quimिरresistivos, eletroquímicos ou espectrofotométricos cuja eletrônica e sensores são simples e de dimensão reduzida, podendo ser portabilizado com facilidade⁶⁶. A compreensão da resposta gerada por sua combinação, no entanto, muitas vezes não pode ser realizada de maneira direta, requerendo análises quimiométricas mais rebuscadas ou algoritmos mais complexos de combinação das respostas.

1.3.3 *Tratamento de dados*

Mesmo em sensores específicos ou seletivos, etapas de tratamento de sinais frequentemente são necessárias para obtenção de resultados satisfatórios^{67,68}. O processamento matemático destes sinais obtidos é tão comum em Química Analítica que, em alguns casos, já se encontra até mesmo incorporado aos procedimentos de análise (por vezes sem a completa anuência do analista).

O termo “sinal” comumente se refere a uma sequência de medidas relativas a uma variável ordinal (por exemplo: tempo, comprimento de onda, etc.), obtida após transdução de sinal elétrico, em medidas instrumentais⁶⁹. As etapas de processamento de sinais, nesse contexto, procuram diferenciar com maior clareza a informação útil (parte da resposta referente à grandeza estimada no processo de medida) de outras informações que se misturam ao sinal observado.

Nos próximos parágrafos serão apresentadas algumas ferramentas utilizadas para processamento de sinais. Apesar do foco desta tese, nesta parte de processamento, ser em atenuação de ruídos e processamento de linha base, alguma atenção nesta introdução é dada a transformadas integrais, devido a sua

utilização muito frequente nas mais diversas etapas de processamento.

As transformadas são operações que permitem a representação alternativa de dados redefinindo a variável independente sem perda de informações⁶⁹. Um dos exemplos mais comumente utilizados, especialmente em tratamento de sinais, é a transformada de Fourier, pela qual um conjunto de dados obtidos em função do tempo podem visualizados em função da frequência de sua ocorrência.

Em química analítica, alguns dados obtidos em função do tempo podem ser interpretados com muito maior facilidade quando apresentados em função de sua frequência⁶⁹. Exemplos bastante recorrentes são a espectroscopia no infravermelho por interferometria e a ressonância magnética nuclear. Os dados a serem analisados já são apresentados após transformada de Fourier para conversão de domínio.

O uso desta transformada, que se tornou muito mais frequente pela implementação de um algoritmo otimizado para dados discretos em 1965⁷⁰ (um dos artigos mais citados da atualidade na área), também é utilizado para outras aplicações em processamento de sinais, que virão a ser apresentadas em parágrafos posteriores.

A interpretação de sinais transientes, foco deste trabalho, será discutido com base no sinal hipotético representado na Figura 1.2. O perfil dele, bem como estratégias para obter informações mais precisas, serão descritos nos próximos parágrafos.

Figura 1.2: Representação de sinais transientes para discussão de etapas de processamento de sinais

Conforme apresentado nesta figura, diversas distorções podem se sobrepor ao sinal que se busca, podendo interferir em sua correta interpretação. Antes de discutir o perfil e as características destas distorções, o primeiro aspecto que deve ser ressaltado como diferença entre os dois conjuntos de dados é sua natureza: enquanto o perfil teórico se apresenta como uma curva suave e contínua, as medidas experimentais se manifestam em pontos discretos.

Uma diferença aparente entre ambos os gráficos da Figura 1.2 é que os pontos do perfil observado apresentam certo “serrilhamento”, flutuando ao redor de um perfil médio. Esse tipo de variação, comumente denominada ruído, é onipresente em medidas experimentais devido a natureza de fenômenos físicos concomitantes envolvidos, sendo alguns dos mais comuns explicados a seguir.

Toda medida elétrica (e, por consequência, instrumental) está sujeita a ruídos por agitação térmica dos transportadores de elétrons no circuito (ruído *Johnson*) e flutuação do campo elétrico pela passagem dos elétrons, de natureza discreta, em um condutor ou semicondutor (ruído “*Shot*”), bem como outros efeitos inerentes a cada tipo de medida realizada ou circuito eletrônico utilizado. Além destes ruídos aleatórios, as medidas também sofrem interferências do ambiente e da oscilação da rede elétrica⁷¹.

Para lidar com esta flutuação indesejada, diversas estratégias podem ser empregadas. Nenhuma solução é indiscutível e perfeita para todos os casos, e comumente se baseiam na premissa que o ruído tem natureza aleatória e normal com média zero (uma consideração válida considerando os fenômenos mais comuns citados).

Havendo-se disponíveis diversas medições semelhantes (replicatas) de um mesmo fenômeno, a realização de médias entre as medidas é uma das formas mais simples e efetivas de filtrar tais ruídos. Por meio desta abordagem, a variância do ruído sobre o sinal observado tende a diminuir de maneira inversamente proporcional ao número de medidas consideradas na média.

A atenuação do ruído aleatório pela realização de médias também é aplicável em dados ordinais, como por exemplo as técnicas espectroscópicas e voltamétricas, mesmo sem replicatas. Neste caso se realizam médias entre grupos de pontos

adjacentes para cada ponto do gráfico, conforme é ilustrado na Tabela 1 para um filtro utilizando cinco pontos. A escolha do número de pontos utilizados na média se baseia num compromisso entre a atenuação do ruído (mais acentuada para mais pontos) e a distorção no sinal central em virtude dos pontos adjacentes (menor para menos pontos), sendo um filtro tanto mais interessante quanto maior a resolução de leitura dos dados.

Tabela 1 – Tabela explicativa para cálculo de média móvel

Ponto	x	y	Média Móvel (5)	y_filtrado (5)
1	0	0,2		
2	0,1	0,3		
3	0,2	0,2	$\frac{y_1+y_2+y_3+y_4+y_5}{5}$	0,28
4	0,3	0,3	$\frac{y_2+y_3+y_4+y_5+y_6}{5}$	0,34
5	0,4	0,4	$\frac{y_3+y_4+y_5+y_6+y_7}{5}$	0,36
6	0,5	0,5	$\frac{y_4+y_5+y_6+y_7+y_8}{5}$	0,42
7	0,6	0,4	(...)	(...)
8	0,7	0,5		

Noutra abordagem, os dados da janela utilizada para filtrar ruídos são ajustados a um polinômio, de forma que os pontos estimados representam melhor a variação entre pontos adjacentes e sem comprometer significativamente a filtragem. Este filtro veio a ser aplicado com grande frequência a partir dos trabalhos de Savitsky e Golay⁷², que o implementaram por meio do uso de médias móveis ponderadas, tornando o problema computacionalmente simples.

Uma das propriedades interessantes do ajuste de polinômios a dados, que explica sua ampla utilização, é a facilidade algébrica que este apresenta para diversos cálculos. Valendo-se da facilidade em lidar com suas derivadas, é possível fazer um conjunto de regressões de polinômios a dados adjacentes de forma a definir uma curva com derivadas contínuas até um determinado grau desejado. Estas curvas, denominadas de *splines*⁷³, são bastante utilizadas em processamento

de sinais, e uma *spline* cúbica (a mais comumente utilizada, que apresenta derivadas contínuas de primeira e segunda ordem) se encontra ilustrada na Figura 1.3.

Figura 1.3: Ajuste de *spline* cúbica a conjunto de dados

Como pode ser observado na figura acima, o uso de uma *spline* cúbica a cada dois pontos permite a interpolação entre pontos, mas não realiza propriamente uma filtração no perfil observado. Para isso, uma alternativa é o uso de dados mais espaçados do que os adquiridos⁷⁴ (estratégia potencialmente eficaz quando utilizados dados em alta resolução) ou quando o ajuste é realizado considerando a soma quadrática do desvio entre as curvas e as séries de dados com a soma quadrática de uma das derivadas destas, sendo cada um desses dois parâmetros ponderados (com fatores determinados empiricamente)⁷⁵. Este último tipo de ajuste pode ser observado na planilha CurTiPot, *software* gratuito para análise de curvas de titulação potenciométrica⁷⁶.

A transformada de Fourier também é extremamente útil neste tipo de

processamento⁷¹. Os dados adquiridos, uma vez convertidos, podem sofrer operações de convolução de forma a atenuar ou até zerar o sinal referente a um dado conjunto de frequências, e então serem reconvertidos ao domínio original (conforme ilustra a Figura 1.3). Esta estratégia se mostra bastante eficaz pois o sinal geralmente se encontra em uma região de frequência definida (baixa), enquanto o ruído se distribui uniformemente no espectro de frequências.

Figura 1.4: Representação da operação de filtragem de dados por transformada de Fourier⁶⁹

A observação mais cautelosa da Figura 1.2 mostra outros tipos de distorção no sinal, que possuem natureza diferente. Pode-se notar, por exemplo, dois pontos de medida muito superior ao esperado, destoando até mesmo de seus valores adjacentes. Estes pontos discrepantes (frequentemente denominados *outliers*) podem ocorrer devido a alguma falha eletrônica na conversão de dados ou até por eventos espúrios como picos de rede elétrica, choques mecânicos, maus contatos intermitentes, entre outros. Os filtros até aqui apresentados são ineficientes para lidar com isso, podendo até distorcer consideravelmente os dados quando aplicados.

Uma das formas de se descartar dados como esses é pelo uso de critérios estatísticos como o de Chauvenet, proposto ainda em 1863⁷⁷: para dados distribuídos normalmente, um ponto pode ser rejeitado quando exceder um dado valor proporcional ao desvio padrão de um conjunto de pontos adjacentes (esse valor varia de acordo com o número de pontos utilizados).

Outra ferramenta para a exclusão de *outliers* é o uso de medianas móveis⁷⁸ (similar a média móvel, porém se vale da mediana da janela de dados). Possui um excelente resultado mesmo operando em uma janela muito pequena, minimizando a possibilidade de provocar grandes distorções nas séries de dados.

Além do ruído e da presença de dados espúrios, o sinal representado na Figura 1.2 também se sobrepõe a outra componente de sinal desconhecida, tal qual um sinal largo sob o pico desejado. Esta componente é usualmente denominada sinal de fundo ou linha base e ocorre com grande recorrência em medidas instrumentais. A sua dedução ou tratamento pode influenciar fortemente a quantificação do sinal estimado e, por ser um aspecto central neste trabalho, será discutido com maior detalhamento nos próximos parágrafos.

O perfil de linha base frequentemente é determinado por características do sistema e da matriz da amostra⁷⁹. Comumente o sinal do branco é utilizado para estimar o sinal de fundo, sendo este subtraído do sinal da análise realizada. No entanto, em muitos casos não é viável a realização de brancos com a matriz da amostra, e em algumas técnicas analíticas, como a voltametria, a reprodutibilidade deste sinal de fundo é baixa, sendo necessário se presumir a resposta referente ao sinal sobreposta a linha base.

O reconhecimento visual de picos ainda é prática corrente em análises químicas. Neste caso, o analista reconhece o início e o final da região onde o(s) sinal(is) se apresenta(m) e traça um segmento que se ajuste a base do pico quantificado. Este procedimento também é adotado por *softwares* de diversos instrumentos comerciais de voltametria e cromatografia, de forma automática ou assistida pelo operador. Comumente, se traça simplesmente uma linha reta sob os picos, mas em casos de linha base bastante curvas e picos bastante baixos, a aproximação linear pode gerar grandes erros ou mesmo ser inviável, e aproximações curvas podem ser irreprodutíveis⁷⁴.

Nesses casos em que a simples reta falha, pode-se recorrer a interpolação de linha base por curva baseada nas adjacências do pico. Uma proposta diferente, ainda pouco mencionada na literatura química e ausente na área de eletroanalítica é o ajuste manual de curvas cúbicas do tipo de Bézier⁸⁰, ilustrada na Figura 1.5 (linha em preto).

Figura 1.5: Exemplo de curva de Bézier cúbica⁸²

Esta curva foi proposta ao final da década de 1950 para uso em projetos automotivos por ser desenhada de maneira intuitiva e envolvendo simples polinômios. Utilizada amplamente em *softwares* para representação de curvas e superfícies⁸¹, é definida pelos seus pontos iniciais e finais (p1 e p4) e por pontos de

controle (p2 e p3) que definem a curvatura do segmento. Matematicamente, essas curvas são funções polinomiais não paramétricas, descritas pelas seguintes equações:

$$\begin{cases} x(t) = w_{x1} \cdot t^3 + w_{x2} \cdot 3 \cdot t^2 \cdot (1-t) + w_{x3} \cdot 3 \cdot t \cdot (1-t)^2 + w_{x4} \cdot (1-t)^3 \\ y(t) = w_{y1} \cdot t^3 + w_{y2} \cdot 3 \cdot t^2 \cdot (1-t) + w_{y3} \cdot 3 \cdot t \cdot (1-t)^2 + w_{y4} \cdot (1-t)^3 \end{cases} (0 \leq t \leq 1)$$

sendo w pesos dados a cada parte do polinômio. Dentro de seu domínio (t entre 0 e 1), a curva se molda em função de seus pesos: para $t = 0$, seu par ordenado valerá $p1 = (w_{x4} = 200; w_{y4} = 250)$; para $t = 1$, $p4 = (w_{x1} = 35, w_{y1} = 50)$; e, para os valores intermediários, ela ligará os dois pontos se curvando em função dos pesos restantes.

O exemplo apresentado é um modelo de curva bidimensional de terceiro grau. As curvas de Bézier, contudo, podem ser definidas em graus maiores, descritas nesse caso por mais pontos de controle, e/ou até mesmo em maiores dimensões. Uma referência bastante didática e suficientemente aprofundada sobre o assunto é listada na bibliografia⁸².

Em uma aplicação para tratamento de sinais espectroscópicos, foi implementado em *software* o ajuste manual desta curva para ajuste de linha base⁸⁰, logo dependendo de etapa de reconhecimento subjetivo.

Existem propostas de tratamentos de linha base automáticos. Proposta em literatura mas não presente em *softwares* de instrumentos comerciais, as *splines* também podem ser utilizadas para previsão de linha base⁸³. Neste caso, a linha base é estimada com base pontos adjacentes à posição do sinal. Além de não ser reprodutível dependendo do espaçamento escolhido entre os pontos (problema supostamente minimizável pelo uso de *splines* fracionárias⁸⁴), depende do conhecimento prévio da região na qual o sinal se manifesta.

Recentemente foi realizada a previsão de linha base por sucessivos ajustes de polinômios em toda a região e leitura. A cada iteração, o dado acima dos previstos para linha base eram desconsiderados e uma previsão era realizada com os pontos restantes. Apesar de não exigir que se defina região de pontos a ser

utilizada, o grau do polinômio a ser ajustado é determinado empiricamente e a técnica não foi aplicada para amostras reais⁷⁹.

É curioso notar que, mesmo com a aplicação frequente de polinômios para previsão de linha base, o uso de equações paramétricas (como as que regem a curva de Bézier) é muito incomum e restrito, até onde se tem conhecimento, ao ajuste manual de curvas (ao menos para aplicações em Química).

O uso de transformadas de Fourier, já citado acima por sua eficiência para a remoção de ruído em frequências distantes da do sinal, também já foi proposto para a correção de linha base. Todavia, a escolha das frequências baixas que permitam a eliminação das variações da linha base sem comprometer o sinal é difícil, e em muitos casos não é possível encontrar uma faixa na qual não ocorra deriva de linha base e o sinal não apresente fortes distorções⁷⁴.

As técnicas de tratamento de sinal são tão imprescindíveis para a prática analítica que elas se encontram já incorporadas nos mais diversos softwares de operação de equipamentos⁷⁴. O uso de médias e polinômios móveis, bem como análises e filtros de transformada de Fourier e estratégias para detecção de quantificação de picos, ou mesmo, em casos de sobreposição de picos, sua deconvolução por ajuste de curvas de Gauss ou assemelhadas, são quase onipresentes nas soluções comerciais. Pode-se dizer que por vezes são até usadas de forma despercebida ou indiscriminada por leigos na área de processamento de sinais.

Se, por um lado, os softwares comerciais de controle e aquisição de dados de equipamentos prosseguem sendo fechados (para proteger o investimento feito), tendências atuais incluem, em sentidos opostos, a elevação do grau de automação, reduzindo a intervenção humana e a flexibilização da operação, permitindo que o usuário avançado possa controlar o equipamento e o processamento dos dados da maneira mais versátil possível. Neste sentido, na área das técnicas eletroquímicas a Metrohm-Autolab trouxe há alguns anos a proposta de um programa bastante versátil – o NOVA –, de modo a permitir a programação de cada etapa experimental da forma que o analista/cientista julgar melhor para seu experimento, filosofia também estendida para o tratamento de dados.

Além das operações supracitadas, o NOVA permite ainda que sinais sejam

calculados por dentro do programa por meio de equações definidas pelo usuário, utilizando os sinais como variáveis e até mesmo possibilitando o uso de funções trigonométricas e logarítmicas se desejado.

Mesmo com toda essa versatilidade, a implementação de rotinas mais complexas não se faz possível internamente. Todavia, o NOVA permite comunicação com programas externos, de forma a realizar externamente operações de maior complexidade e mais especializadas. Essa alternativa foi explorada nesta tese, mas é pouco usual talvez devido à necessidade simultânea de conhecimentos de eletroquímica e programação, e ao investimento de tempo. Isso possivelmente explica a preferência por pós-processamento externo com *softwares* gráficos e numéricos mais especializados e poderosos.

Entre as ferramentas preferidas para tratamento de dados por químicos analíticos, em especial para avaliação e tratamento manual de sinais, vale destacar o Origin (OriginLab, EUA). Possui extenso repertório de ferramentas matemáticas e estatísticas para lidar com dados experimentais em uma interface repleta de opções e bastante amigável. Apesar de poderosa, é uma ferramenta de custo elevado, e a sua interface gráfica amigável torna o programa relativamente pesado e, por vezes, instável.

Outra classe de ferramentas amigáveis e acessíveis também são as planilhas eletrônicas, valendo destacar o Excel (Microsoft, EUA). Dispõe de um grande repertório de operações matemáticas e estatísticas e, devido à grande difusão do programa nas mais diversas áreas, possui interface de trabalho familiar. É um programa pago, mas possui custo relativamente baixo para uso estudantil e residencial. Não voltado especificamente para aplicações científicas, o Excel executa de forma transparente macros ou *scripts* programadas em *Visual Basic for Applications* (VBA), lhe conferindo grande versatilidade até mesmo cálculos complexos como previsão de curvas de titulação, alisamento de dados experimentais e análise de dados experimentais por regressão não linear⁷⁶.

Mais refinado e versátil que os *softwares* apresentados anteriormente, o MatLab (MathWorks, EUA) tem sido a escolha preferida entre muitos cientistas, inclusive da área de Quimiometria, para a análise de dados. Dispondo de sintaxe

intuitiva, permite o sequenciamento de operações matriciais por meio de *scripts* e possui centenas de funções otimizadas, daí a larga aceitação do MatLab nas áreas acadêmica e científica⁷⁴. Este versátil software multiplataforma tem, contudo, um custo relativamente alto.

Deve-se ressaltar, neste ponto, que as desvantagens do uso de *softwares* comerciais vão além dos custos que eles incorporam, podendo apresentar problemas ligados a seu suporte e até mesmo seu uso. Nesse sentido, a escolha de programas livres e de código aberto permite o desenvolvimento de aplicações mais confiáveis, além de mais baratas⁸⁵.

A grande força do movimento de *software* livre, em especial no ambiente acadêmico, gerou ferramentas livres muito interessantes aplicáveis para cálculos numéricos. Algumas destas ferramentas, nos dias de hoje, são inclusive preferidas pelos seus usuários frente a alternativas comerciais.

O universo das linguagens de programação tradicionais, propostas, via de regra, para aplicações muito mais versáteis que análise de dados, sempre ofereceu alternativas livres para o tratamento de dados. O grande preço que se paga para a implementação de rotinas, em sua maioria, é a complexidade de se programar, sendo necessária a implementação de diversas funções para realização de cálculos (apesar da disponibilidade de bibliotecas livres já escritas e difundidas pela comunidade científica)^{86,87}.

Uma linguagem programação interpretada extremamente poderosa e versátil, e que tem sido bastante utilizada para tratamento de dados é o *Python*. Inicialmente desenvolvida para uso geral, conta com uma comunidade acadêmica e científica bastante presente e possui amplo suporte de bibliotecas muito bem documentadas e poderosas para uso científico e análise de dados^{87,88}.

Já para o tratamento estatístico de dados, uma ferramenta livre que ganhou bastante espaço no ambiente acadêmico é a linguagem R. Não tão versátil quanto uma linguagem de uso geral, possui ampla documentação na internet e centenas de funções podem ser encontradas em repositório de livre acesso online (<https://cran.r-project.org/>), sendo otimizada para tratamento e apresentação de dados. Estima-se que mais de 200.000 pessoas trabalhem regularmente com a ferramenta⁸⁹.

Outra ferramenta livre que tem ganhado bastante popularidade é o GNU *Octave*, software similar ao MatLab e compatível com a maior parte de sua sintaxe. Até mesmo pela compatibilidade que essa ferramenta livre apresenta com o programa comercial, o aproveitamento de *scripts* entre os programas faz com que o Octave se insira de maneira bastante rápida e natural em substituição ao MatLab nos contextos em que seu custo seria proibitivo.

O emprego as ferramentas supracitadas, mesmo que para pós-processamento independente em relação aos sistemas de análise química, já tem permitido o teste e desenvolvimento de diversas aplicações. Uma das propostas desta tese é a demonstração da grande versatilidade e potencialidade do desenvolvimento de soluções integradas, aproveitando a combinação de *software* comercial nativo de instrumentos eletroquímicos com a estrutura de tratamento de dados fornecida, no caso, pelo programa de código livre *Octave*.

1.4 Análise de Acetona em ar exalado

Apesar da grande quantidade de equipamentos e sensores existentes para diversos biomarcadores, ainda se busca um dispositivo portátil capaz de realizar, de maneira confiável, a análise de acetona em ar exalado. Visto que a análise deste composto nessa matriz é extremamente interessante para diversas aplicações ligadas ao acompanhamento de quadros metabólicos, um número grande de trabalhos é dedicado ao tema, envolvendo diversas abordagens instrumentais.

Baseado em análise por via úmida, Teshima e colaboradores propõem a adaptação de método colorimétrico proposto na década de 1950 para soluções aquosas⁹⁰ e o aplicam para ar exalado, com grandes melhorias: pré-concentração do material coletado em fase líquida utilizando capilares microporosos e aquecimento da mistura reacional para aceleração da reação, utilizando volumes de coleta tão pequenos quanto um sopro e limite de detecção de 14 partes por bilhão em volume (ppbv), dez vezes menor do que a concentração mínima encontrada em voluntários

saudáveis⁴⁹.

O trabalho supracitado ilustra a importância da consideração de alguns aspectos práticos para o desenvolvimento de método de análise em campo. Apesar de apresentar grande inovação instrumental e refinamento, a complexidade da proposta, seja na montagem do dispositivo de coleta, seja no aquecimento da mistura reacional em sistema fechado previamente à análise, seja pelo uso de bombas para o manuseio das soluções no sistema, diminui sua viabilidade de aplicação em campo. As soluções utilizadas possuem relativa toxicidade e instabilidade, o que dificulta seu armazenamento e eventual manipulação.

Na dissertação de mestrado do autor desta tese, a necessidade de alternativa viável para a realização de relevante estudo clínico relacionado com insuficiência cardíaca, motivou o desenvolvimento de um método mais simples, baseada na mesma reação de derivatização citada, que permitiu a realização de parceria entre FMUSP e IQUSP. A não necessidade de ponto de energia durante a coleta, realizada se utilizando difusor simples (impinger), possibilitou a coleta à beira-leito, do paciente. A determinação de acetona no material coletado, a exemplo de tantas outras análises clínicas, era realizada posteriormente após conservação criogênica da amostra, em um laboratório químico (ou clínico)¹.

Recentemente, muitos trabalhos reportam avanços no desenvolvimento de quimirresistores em estado sólido atuando como sensores de acetona. Um dos exemplos de maior destaque é o sensor interdigitado à base de WO_3 dopado com Si e operado a 400 °C que, segundo os autores, alcança concentrações tão baixas como 20 ppbv e é imune a interferências de etanol e água (relativamente comuns a esse tipo de sensor)⁹¹. Apesar das características promissoras, pesquisas adicionais são requeridas visto que a relativa inespecificidade deste sensor frente a uma amostra tão complexa quanto o ar exalado pode apresentar problemas de interferências em aplicações reais.

Técnicas eletroquímicas também tem servido de base para métodos de determinação de acetona. Todavia, só se encontraram dois trabalhos voltados para aplicação a ar exalado. Num deles, a técnica amperométrica foi combinada com um eletrodo modificado com enzimas no qual uma cascata de reações gera peróxido de hidrogênio (responsável pelo sinal) a partir de subprodutos da degradação

enzimática da acetona⁶⁴. Mesmo contando com a seletividade de reações enzimáticas, esse sensor, apresentado pelos autores na forma de um dispositivo portátil de reduzidas dimensões, ainda sofre interferência de algumas espécies relevantes para a aplicação pretendida, em especial acetaldeído⁶⁴. Ademais, muitas enzimas, além do custo expressivo, apresentam baixa estabilidade, o que não é ideal para o armazenamento do sensor.

O segundo trabalho explora a inibição parcial da onda de redução de hidrogênio sobre platina por acetona adsorvida⁹². Um eletrodo de platina limpo e seco é exposto a um fluxo constante de ar exalado acondicionado numa seringa, ocorrendo adsorção de acetona. Em seguida o eletrodo é imerso em solução ácida para registro de dois voltamogramas cíclicos. A inibição só ocorre no primeiro ciclo, sendo o perfil usual de redução de hidrogênio restaurado no ciclo voltamétrico subsequente. A diferença de corrente entre a onda inibida e a regenerada, medida em -0,05 V vs. Ag|AgCl, aumenta proporcionalmente com o logaritmo da concentração de acetona. Trata-se de ideia relativamente simples, mas o procedimento parece pouco robusto e o autor do artigo admite que o protocolo requer aprofundamento visando refinamento e validação.

Diferentes métodos para análise voltamétrica de acetona são descritos em literatura, porém nunca aplicados para análise de ar exalado. Visto que as técnicas voltamétricas são interessantes por permitirem, em muitos casos, análises rápidas, sensíveis e de baixo custo, algumas alternativas são apresentadas abaixo.

Sua redução direta (a álcool isopropílico), apesar de possível, ocorre apenas em potenciais tão negativos quanto -2,1 V vs. Ag|AgCl, no qual íons alcalinos também sofrem redução. A análise por esta via, portanto, precisa ser feita em meio orgânico ou meio aquoso fortemente alcalinizado com hidróxido de tetra alquilamônio⁹³. Visando evitar o uso de potenciais tão extremos (que exigem condições tão específicas), alternativas envolvendo derivatização de amostra foram desenvolvidas⁹⁴.

Uma das alternativas é a condensação da acetona com semicarbazidas, formando semicarbazonas⁹⁵. No entanto, esta determinação tem o inconveniente de ser mais sensível a aldeídos do que cetonas, não podendo ser realizada em sua

presença. A redução de hidrazona formada após reação com hidrazina também é possível, porém não foi explorado com sucesso para análise de acetona^{95,96}.

Outra abordagem presente em literatura é a derivatização da acetona com uma amina primária, formando uma imina, que pode ser reduzida a sua amina correspondente. As propostas iniciais envolviam o uso de aminas primárias voláteis: amônia como meio tamponante e reacional, sendo o uso de butilamina proposto como mais favorável para análise de acetona⁹⁷. Estudos posteriores mostram a possibilidade do uso de glicina que, por não ser volátil e possuir baixíssima toxicidade, foi explorado no trabalho que se segue. A reação será melhor apresentada e discutida na seção 4.2 desta tese.

Vale ressaltar que todos métodos citados envolvendo derivatização são polarográficos, logo utilizam eletrodo gotejante de mercúrio e dependem de eliminação de oxigênio, sendo que borbulhamento com nitrogênio na presença da amostra ocasiona perda parcial da acetona (em equilíbrio com a imina) por volatilização. Os limites de detecção reportados em literatura também se encontram cerca de duas ordens de grandeza acima dos requeridos para a aplicação pretendida nesta tese.

Nesse contexto, o desenvolvimento de um método, envolvendo detecção e tratamento de sinal, para análise voltamétrica de acetona, que seja prática e rápida e que alcance os baixos níveis a serem determinados em ar exalado, se apresenta como interessante desafio de pesquisa, tanto pela perspectiva de pronta utilidade de aplicação real nas investigações de pesquisadores do InCor do HC da FMUSP sobre o potencial da acetona exalada como biomarcador, quanto pelos possíveis desdobramentos decorrentes de seu desenvolvimento.

2 OBJETIVOS

O objetivo central da tese é desenvolver método eletroanalítico para viabilizar a análise química de acetona em ar exalado de forma seletiva, rápida e prática. Este objetivo compreende:

Alcançar um limite inferior de concentração mais baixo do que o do método polarográfico clássico envolvendo derivatização do analito, necessário para a aplicação pretendida, mediante o uso de técnicas voltamétricas modernas assistidas por algoritmo inovador de reconhecimento e quantificação do sinal analítico.

Integrar algoritmo de tratamento de dados mais sofisticado que o disponível no *software* nativo de instrumentação eletroanalítica comercial, para que funcione em conjunto com este, de forma transparente ao usuário, permitindo execução automática da determinação ao simples toque de uma tecla.

Avaliar a potencialidade da integração de *software* nativo com o programado pelo usuário para elaboração de procedimentos eletroquímicos e tratamentos de dados mais elaborados.

Contornar a necessidade de eliminação de oxigênio na determinação voltamétrica e, se possível, de uso do eletrodo renovável de gota de mercúrio, para compatibilizá-lo com o futuro desenvolvimento de um analisador eletroquímico portátil e autônomo de acetona para uso hospitalar ou mesmo domiciliar.

Aperfeiçoar o dispositivo de amostragem desenvolvido durante o mestrado do autor para tornar seu uso mais confortável ao paciente.

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os estudos voltamétricos realizados neste trabalho utilizaram potenciostato μ Autolab tipo III (Metrohm, Suíça) acoplado a módulo para operação e controle de eletrodo gotejante de mercúrio (IME663 e 663 VA Stand, Metrohm, Suíça), eletrodo de referência Ag|AgCl(s) (em relação ao qual todos os potenciais desta tese são reportados) e contra eletrodo de platina. O eletrodo de trabalho, quando não reportado de maneira diferente, foi o eletrodo de gota pendente de mercúrio. Para o controle das operações do equipamento foi utilizado nitrogênio industrial (99,5%, Oxylumen, Brasil).

O controle e programação dos procedimentos de análise no μ Autolab tipo III foram realizados utilizando *software* NOVA 1.10.1 (Metrohm, Suíça) e o tratamento de dados foi feito mediante o GNU Octave 3.8.1 de maneira integrada. Isso foi realizado por execução do Octave como programa externo, comando permitido pelo NOVA, sendo os dados transmitidos entre os programas por meio de arquivos de texto, que podem ser gerados em ambos os programas.

A observação dos sinais e a avaliação intuitiva, etapa importante para o desenvolvimento do algoritmo implementado em álgebra matricial, foi realizado por meio de software open source de desenho vetorial Inkscape 0.48.

A solução derivatizante foi preparada em uma solução de hidróxido de sódio (Synth, Brasil) a $2,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, e nessa foi solubilizada glicina (Sigma Aldrich, EUA), previamente triturada em almofariz e pistilo (para favorecer solubilização), a $4,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

O preparo da amostra derivatizada, exceto quando anotado de forma diferente, se fez pela mistura direta da solução descrita acima com volume igual de padrão em meio aquoso ou de amostra de ar exalado previamente colhida em água desionizada. Outros testes de alcalinização foram efetuados com hidróxido de potássio (Synth, Brasil).

As soluções utilizadas para avaliação da influência do pH na reação foram preparadas pela mistura de soluções de Glicina $2,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em água desionizada e em solução de hidróxido de sódio $10,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

A preparação dos padrões se deu por diluição de solução estoque de acetona

(99,5%, Merck, EUA) a 0,1% obtida pela pesagem direta, em água deionizada, de acetona previamente resfriada em freezer a -4°C , sendo sucedidas diluições posteriores em volume para as concentrações almejadas. As soluções eram sempre preparadas no dia de realização dos estudos. As soluções contendo acetaldeído, para testes de interferências, foram preparadas de maneira similar.

Diversos testes de determinação foram realizados com eletrodos de superfícies diferentes. Eletrodos com diferentes bases alotrópicas de carbono (carbono vítreo e grafite) foram utilizados diretamente após tratamento mecânico de limpeza (por meio de polimento com alumina de granulometrias $1\text{ }\mu\text{m}$ e $0,3\text{ }\mu\text{m}$). O eletrodo de diamante dopado com boro também foi testado, sendo previamente condicionado eletroquimicamente (tanto em tratamento catódico, $-3,0\text{ V}$ por 300 s , quanto anódico, $3,0\text{ V}$ por 300 s).

Resultados mais promissores foram obtidos e explorados com eletrodos modificados com mercúrio. Para amalgamação direta do substrato de ouro, o eletrodo (bastão com disco de ouro de 3 mm diâmetro, Metrohm, Suíça) foi tratado inicialmente em ácido nítrico 65% (Merck, EUA) por imersão direta durante três segundos, para redissolução de metais contaminantes em ouro e então polido em lixa 320, 600 e 1200 (Carbodurum, Brasil) e em alumina de granulometrias $1\text{ }\mu\text{m}$ e $0,3\text{ }\mu\text{m}$. Após o tratamento, o eletrodo foi imerso em mercúrio (99,6%, bidestilado à vácuo no IQ-USP) durante ao menos cinco minutos e então o excesso de mercúrio foi removido passando suavemente uma lâmina de plástico ou cerâmica na gota formada. Procedimentos similares foram utilizados para testes com eletrodos de cobre e de prata amalgamados.

A modificação do eletrodo de carbono vítreo com filme de mercúrio se procedeu pela aplicação de potencial de $-0,600\text{ V}$ durante 900 s entre o eletrodo de trabalho e solução de mercúrio (solução padrão $5,0 \cdot 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em $\text{HNO}_3\text{ }2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Merck, EUA), baseado em procedimento anteriormente descrito em literatura⁹⁸.

O preparo do eletrodo de carbono vítreo, em um primeiro momento, foi realizado com limpeza em ácido nítrico 65% (Merck, EUA) e posterior polimento utilizando alumina de granulometria $1,0\text{ }\mu\text{m}$, e posterior lavagem com água deionizada. Em alguns casos, foi realizada redissolução do mercúrio previamente

depositado a 0,600 V em solução de ácido nítrico 2 mol·L⁻¹.

Testes analíticos (sem resultados satisfatórios) também foram realizados em substrato de bismuto depositado sobre cobre *ex-situ* utilizando solução contendo citrato em meio ácido, conforme procedimento descrito em literatura⁹⁹.

A etapa de amostragem do ar exalado foi realizada, inicialmente, de forma idêntica à apresentada na dissertação de mestrado do presente autor¹, utilizando coletor conforme representado na Figura 3.1. O voluntário expira o ar por um pequeno tubo de polietileno descartável (canudo) (1) conectado diretamente ao impinger (2) contendo água deionizada (4). Para aumentar a contactação entre as fases gasosa e líquida no impinger, uma ponta de vidro sinterizado encontra-se soldada à extremidade do tubo de entrada (3). A água deionizada contida no *impinger* é resfriada num banho de água e gelo (5), e uma bolsa descartável de polietileno é acoplada ao sistema para medir e limitar o volume final de coleta (6).

Figura 3.1: *Impinger* para coleta (modelo conforme desenvolvido no mestrado)¹. (1): tubo descartável de polietileno; (2): impinger; (3): difusor de ar; (4): água desionizada; (5): banho térmico (gelo e água); (6): saco plástico (para medida de volume de coleta).

Visando maior conforto de amostragem do paciente, a vidraria utilizada foi redesenhada de forma a ter poros maiores no dispersor, conforme Figura 3.2. O vidro sinterizado foi removido e substituído por nove pequenos furos feitos diretamente no vidro com agulha metálica aquecida, diminuindo a obstrução ao fluxo de ar durante a coleta. Outro aspecto otimizado foi a diminuição do volume de

solução aceptora (redução de 5 mL para 2 mL), realizado pelo estreitamento do frasco do *impinger*. Esta peça foi construída sob medida pela Hermex (Brasil).

O método de determinação desenvolvido foi confrontado com um método colorimétrico para determinação de acetona desenvolvido durante o trabalho de mestrado do autor desta tese¹. O extrato aquoso de ar exalado é misturado, em quantidades iguais, com solução de salicilaldeído $0,11 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ preparada em $4,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de hidróxido de sódio, sendo medida a absorbância da amostra em 474 nm após 10 horas de reação.

Figura 3.2: Modelo de *impinger* otimizado. Os números na figura seguem correspondência da Figura 3.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do coletor de ar exalado

O dispositivo de amostragem desenvolvido durante o mestrado do autor desta tese (Figura 3.1) vem sendo utilizado regularmente para coleta à beira-leito e em laboratório nos estudos sobre diagnóstico de insuficiência cardíaca em curso no Instituto do Coração do HC-USP. Relatos da prática continuada de utilização do equipamento incluem casos em que houve dificuldade durante a amostragem, especialmente por pacientes com casos clínicos mais agudos, indicando que, para uso mais amplo, um amostrador que oferecesse menor resistência ao fluxo de ar exalado seria bem-vindo.

Mesmo quando novos, os difusores feitos de vidro sinterizado oferecem resistência ao fluxo considerável e diferente para cada unidade, podendo eventualmente aumentar com o uso repetido, após procedimentos de limpeza, vez que alguns poros da vidraria podem ficar obstruídos por partículas de vidro desprendidas no interior do difusor. Ademais, finda a coleta, parte do líquido aceptor pode ficar retida nos poros do difusor ao se fazer a transferência da fase líquida para outro recipiente menor, no qual a amostra será refrigerada e enviada para determinação analítica. Para a resolução do problema acima, se avaliou a substituição do vidro sinterizado por alternativas que resultassem numa solução de compromisso entre a mínima resistência ao fluxo do impinger convencional, com um tubo aberto imerso no líquido, e elevada superfície de contato entre as fases líquida e gasosa proporcionada pelas bolhas pequenas desprendidas do vidro sinterizado. Após testes preliminares, que incluíram ponteiras feitas de plástico, vidro ou metal, com estrangulamentos, telas, furos ou cortes, o resultado mais satisfatório (considerando o compromisso citado) foi alcançado com o dispositivo apresentado na Figura 3.2. Testes práticos mostraram que o conforto durante a coleta aumenta de maneira bastante significativa em decorrência desta alteração que, somada a

outras, possibilitou que também a eficiência da extração da acetona não ficasse comprometida.

A segunda alteração proposta se refere ao volume de líquido acceptor colocado no amostrador. Apesar do aumento de eficiência de remoção de analito do ar aumentar de acordo com o volume de líquido acceptor utilizado durante a coleta, a concentração da solução ao final da coleta tende a ser menor. Sendo assim, para fins analíticos, utilizar um volume pequeno de coleta pode tornar o sistema mais sensível, mesmo que menos eficiente, e a limitação de seu volume se dá pelo mínimo necessário para realização da posterior determinação.

Para a comparação de eficiência entre os dispositivos de coleta, uma série de dezesseis amostragens foi realizada com um mesmo voluntário saudável alternadamente entre os dois modelos de *impinger* apresentados e analisadas por método colorimétrico. Obtiveram-se concentrações médias de $(0,5 \pm 0,2) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ no *impinger* antigo e $(1,2 \pm 0,2) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para o modelo novo, que indicam que a nova proposta, além de mais confortável, permite melhor pré concentração, resultando, pois, em equipamento muito mais conveniente para aplicações no futuro. É interessante notar que os valores de concentração são inversamente proporcionais aos volumes utilizados de solução acceptora, indicando que a quantidade de acetona extraída da amostra foi a mesma nos dois casos (correspondendo a eficiência de 78% na coleta, já reportada anteriormente¹).

4.2 Desenvolvimento do método de determinação

4.2.1 *Aspectos gerais do sistema eletroquímico*

Primeiramente foi realizado um estudo voltamétrico da imina formada na reação entre glicina $2,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em NaOH $1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (solução derivatizante) e acetona em eletrodo de gota pendente de mercúrio. O voltamograma da solução de

derivatização pura (Figura 4.1, tracejado cinza claro) mostra, além das ondas de redução do solvente ou dos íons de Na^+ em potenciais mais extremos, uma única onda irreversível com corrente máxima em torno de $-1,0 \text{ V}$, resultante da redução do oxigênio dissolvido na amostra.

Figura 4.1: Voltamogramas Cíclicos de solução derivatizante pura (linha cinza tracejada) e após adição de $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de acetona em eletrodo de gota pendente de mercúrio. Velocidade de varredura: $250 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. (B) Voltamograma de solução derivatizante adicionada de $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ acetona, a $5 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

Após a adição de $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de acetona na solução se pode observar um processo de redução em torno de $-1,6 \text{ V}$ (Figura 4.1, linha cinza escura). Não há reversibilidade aparente do processo eletroquímico, nem indicação de etapa química posterior observável em velocidade de varredura de $5 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figura 4.1 B).

O método analítico que se desenvolve aqui se baseia em duas reações: primeiramente, a glicina e a acetona em meio básico participam de um equilíbrio de formação de uma imina, conforme ilustrado na Figura 4.2. A imina formada então sofre redução eletroquímica à amina correspondente (Figura 4.3), que é observada no pico descrito na Figura 4.1 (linha cinza escura).

Figura 4.2: Representação da formação da imina em equilíbrio, a partir da acetona e glicina

Figura 4.3: Representação da redução da imina formada conforme Figura 4.2 a amina correspondente.

Foi registrada também uma curva voltamétrica desta solução após dez minutos de purga no sistema (Figura 4.4), podendo ser observada a drástica diminuição do sinal referente a redução do oxigênio e considerável diminuição do sinal referente a redução da imina. Isso pode ser explicado pelo equilíbrio comentado no parágrafo anterior e representado na Figura 4.2, pois a purga favorece a eliminação da acetona do meio, desfavorecendo a formação da imina. Desta forma, a remoção de oxigênio para diminuição de corrente de fundo por purga de gás inerte (comum em voltametria com eletrodo de mercúrio) não apenas é um procedimento pouco prático para esta análise como pode provocar perdas significativas de analito.

Uma tentativa exitosa de diminuir a corrente de redução do oxigênio sem realizar purgas foi o pré-condicionamento do eletrodo durante alguns segundos em potencial suficientemente negativo antes da varredura. Durante essa etapa, parte do oxigênio das imediações a superfície do eletrodo é reduzido e, por ser lenta a reposição por difusão, a componente da corrente relativa ao processo com o oxigênio é diminuída no momento de aquisição da curva voltamétrica. Pode-se observar bons resultados de atenuação desta corrente já com dez segundos de pré-condicionamento (Figura 4.5).

Figura 4.5: Efeito do pré condicionamento do eletrodo em potencial inicial (-1,5 V) na corrente de fundo em voltametria de varredura linear ($100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$). Demais condições experimentais conforme Figura 4.1.

As técnicas voltamétricas de pulso diferencial e de onda quadrada costumam ser as preferidas para fins analíticos, pois geralmente apresentam melhor resolução e ganho de sinal frente a técnica de varredura linear, especialmente para sistemas reversíveis e, por serem diferenciais, suprimem melhor a linha base. Apesar de não ser evidente o ganho em sensibilidade por se encontrar em estudo um sistema irreversível, pode-se ver na comparação da Figura 4.6 que a linha base da técnica pulsada possui menor deriva, resultado esperado para uma técnica diferencial, capaz de descontar do sinal medido processos concomitantes e indesejados (no caso, correntes capacitiva e de redução de oxigênio dissolvido), além de apresentar

varredura mais rápida. Desta forma, o trabalho seguiu com adoção da voltametria de onda quadrada como método de determinação.

4.2.2 Utilização de eletrodo sólido

Apesar dos estudos apresentados acima, realizados com eletrodo de gota pendente de mercúrio, apresentarem resultado bastante favorável, o uso deste eletrodo em campo se mostra inconveniente, especialmente pela necessidade de manipulação do metal puro em estado líquido. Visando contornar este problema, investigaram-se alternativas de substituição do eletrodo de mercúrio por eletrodos sólidos, modificados ou não. A busca de condições que possibilitassem a portabilização do sistema levou à realização de testes utilizando estas estratégias.

Figura 4.6: Comparação de sinal entre técnicas voltamétricas, em solução derivatizante contendo $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de acetona. Voltamograma cíclico foi rebatido para cima e deslocado para baixo (para melhor comparação dos sinais). Voltametria linear realizada a 250 mVs^{-1} ; Parâmetros da voltametria de onda quadrada:

Considerando-se o potencial de redução da imina (cerca de $-1,6 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl), o uso de eletrodos de platina ou de ouro não foi cogitado devido à prevalência da reação de formação de hidrogênio em potenciais tão negativos. Foram testados eletrodos a base de carbono em diferentes formas, a saber, grafite,

carbono vítreo (GC) e diamante dopado com boro (com tratamentos anódico e catódico), porém nenhum destes apresentou sinal de redução da imina formada. Eletrodos de bismuto eletrodepositado sobre cobre também não apresentaram sinal de redução da imina formada.

Retomando o uso do mercúrio, recorreu-se à modificação de eletrodo de disco de carbono vítreo com filme de mercúrio por eletrodeposição (GC-Hg), que apresentou resposta frente ao aduto formado entre acetona e glicina, sendo realizados com este eletrodo estudos de otimização de condições voltamétricas na técnica de onda quadrada.

A resposta do eletrodo modificado em função da frequência de pulso aplicada mostra-se linear em função de sua raiz quadrada até 25 Hz (Figura 4.7), possível indicação que o processo é governado por transporte difusional nesta região. Desta forma, foi adotada a frequência de pulso de 25 Hz, por proporcionar maior repetibilidade e rapidez.

O efeito da amplitude do pulso sobre o voltamograma também foi estudado (Figura 4.8). Observou-se um claro aumento na magnitude do sinal em função do aumento da amplitude de pulso até 20 mV, valor escolhido para determinações analíticas. Para valores mais altos, o pequeno ganho em magnitudes de pico não compensa o incremento e a maior curvatura da linha base, dificultando a determinação da altura do pico.

A Figura 4.8 indica excelente repetibilidade dos voltamogramas obtidos em quintuplicata (desvio padrão relativo de 1,8%), sucessivamente, no mesmo filme depositado, sem qualquer tratamento intermediário. Todavia, por não ser removido O_2 das soluções e devido à exposição ao ar na troca de soluções, a sensibilidade cai com o tempo, sendo necessário refazer o filme de mercúrio após algumas dezenas de medidas. Os resultados preliminares, apesar de promissores, não foram reproduzíveis quando realizadas sucessivas deposições e os limites de detecção observados ainda são notadamente se encontravam visivelmente maiores do que o necessário para este tipo de análise: amostras de ar exalado, em pessoas saudáveis, contém cerca de $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (equivalente a $0,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) na fração coletada após pré-concentração (valores cem vezes menores que os examinados nos voltamogramas das figuras 4.7 e 4.8).

Figura 4.7: Voltamogramas de onda quadrada de solução de acetona $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em diferentes frequências (1 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 25 Hz, 50 Hz, 75 Hz e 100 Hz, quintuplicatas), utilizando eletrodo de carbono vítreo com filme de mercúrio (CG-Hg). Demais parâmetros voltamétricos: $E_{\text{inicial}} = -1,4 \text{ V}$; $E_{\text{Final}} = -1,75 \text{ V}$; $E_{\text{pulso}} = 20 \text{ mV}$; $E_{\text{degrau}} = 5 \text{ mV}$.

Outros testes ainda foram realizados com eletrodos de carbono em outras matrizes, pela modificação de eletrodos impressos (Dropsens C110) e até mesmo o uso de eletrodo impresso recoberto com filme de acetato de mercúrio¹⁰⁰, porém os resultados iniciais não foram satisfatórios. Não se descarta, contudo, que limites mais baixos ou procedimentos mais reprodutíveis venham a ser desenvolvidos com tais materiais.

Figura 4.8: Voltamogramas de onda quadrada com diferentes amplitudes de pulso (em quintuplicatas) de solução de acetona $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, em eletrodo de carbono vítreo com filme de mercúrio (CG-Hg). Demais parâmetros voltamétricos: $E_{\text{inicial}} = -1,4 \text{ V}$; $E_{\text{Final}} = -1,75 \text{ V}$; $E_{\text{degrau}} = 5 \text{ mV}$; Freq = 25 Hz.

Uma proposta recorrente para a substituição do eletrodo de gota pendente de mercúrio é o uso de eletrodos de amálgama¹⁰¹, sendo testados neste trabalho a aplicação de filme de mercúrio sobre cobre, prata e ouro. Por meio da amalgamação por contato direto em ouro, o sinal de amostras a $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pode ser visualizado (Figura 4.9). O sinal observado no excerto, de fato, é um desafio para ser quantificado. Neste trabalho, devido à necessidade de se analisar dados como tais, foi desenvolvido um algoritmo capaz de realizar sua quantificação, que será apresentado posteriormente.

Apesar dos resultados preliminares bastante animadores, a reprodutibilidade da resposta do eletrodo ao longo do tempo, bem como a de seu procedimento de modificação, não se mostraram suficientemente boas para sua aplicação rotineira.

É interessante comentar, neste ponto, as condições adversas ao mercúrio da análise realizada, possíveis razões para explicar a dificuldade do uso de eletrodos de filme. O meio bastante alcalino da solução derivatizante pode levar à formação de complexos entre o hidróxido e o mercúrio e degradar o eletrodo de mercúrio mais facilmente, especialmente na presença de oxigênio dissolvido. A conservação do eletrodo amalgamado ao ar também é problemática seja pelo gradual aumento da

concentração de ouro (ou cobre ou prata, dependendo do substrato) no mercúrio na superfície, baixando a sobretensão de hidrogênio, seja pela oxidação do mercúrio pelo ar. Ademais, a necessária renovação periódica do filme de Hg seria inconveniente e pouco reprodutível fora do laboratório, por envolver manipulação de mercúrio metálico e procedimentos de limpeza.

A substituição do carbono vítreo por platina (pouco solúvel em mercúrio) como substrato condutor para o filme de mercúrio eletrodepositado poderá ser futuramente avaliada para superar parte dos problemas da operação em campo. Mas, no momento, decidiu-se seguir os estudos utilizando voltametria de onda quadrada em gota pendente de mercúrio.

Figura 4.9: Curva de calibração realizada com amálgama de ouro. Excerto abaixo da curva de calibração apresenta sinal de voltametria de onda quadrada de solução de branco e de solução contendo 0,7 mg·L⁻¹ ($1,2 \cdot 10^{-5}$ mol·L⁻¹) de acetona. Parâmetros voltamétricos: $E_{\text{inicial}} = -1,4$ V; $E_{\text{Final}} = -1,75$ V; $E_{\text{pulso}} = 20$ mV; $E_{\text{degrau}} = 5$ mV; Freq = 25 Hz.

4.2.3 Considerações sobre o alcalinizante

O sinal representado no excerto da Figura 4.9 mostra que uma grande variação de linha base ocorre na região do sinal estudado, subindo de maneira aparentemente exponencial em valores mais negativos de potencial. Isso ocorre devido a redução do contra íon presente na solução. Visando tornar essa sobreposição menos influente e aparente, testes foram realizados com hidróxido de potássio como agente alcalinizante (Figura 4.10), visto que seu potencial de redução é mais catódico que o potencial de redução do íon sódio (que veio sendo utilizado nos testes anteriormente apresentados)¹⁰².

Figura 4.10: Avaliação do perfil de linha base em função do contra íon utilizado. Solução derivatizante contendo $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ acetona. Voltametria cíclica a $250 \text{ m} \cdot \text{Vs}^{-1}$. Parâmetros de voltametria de onda quadrada: $E_{\text{inicial}} = -1,4 \text{ V}$; $E_{\text{Final}} = -1,75 \text{ V}$; $E_{\text{pulso}} = 20 \text{ mV}$; $E_{\text{degrau}} = 5 \text{ mV}$; Freq = 25 Hz.

Apesar de ser observável o efeito do contra íon no sinal de fundo, a utilização de técnica voltamétrica de onda quadrada torna esse efeito menos relevante. Neste caso, deu-se preferência ao uso de hidróxido de sódio para os testes subsequentes,

visto que este costuma ter pureza comercial mais elevada (e o uso de hidróxido de potássio provocou, em alguns momentos, menor reprodutibilidade em testes com o método colorimétrico anteriormente proposto¹).

Para complementar as indicações em literatura a respeito da concentração ótima de hidróxido a ser utilizada, foi realizado um estudo avaliando o perfil do sinal voltamétrico da espécie derivatizada em função do pH da solução. Como pode ser observado na Figura 4.11, uma maior sensibilidade ocorre em região próxima a concentração de $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de hidróxido. Outro aspecto interessante é a dependência linear do potencial do pico de redução observado em função do pH.

A explicação do comportamento observado nas figuras acima é coerente com os mecanismos esperados para as reações^{103–105}. A formação da imina na reação de derivatização (Figura 4.12) ocorre pelo ataque nucleofílico da amina na carbonila da acetona (4.12b), formando uma carbinolamina (4.12c), que então sofre uma desidratação (4.12d).

Figura 4.11: Influência da concentração de hidróxido na altura e posição de pico de redução da imina formada na voltametria de onda quadrada em meio de glicina. Parâmetros de voltametria de onda quadrada conforme otimização. Solução derivatizante com adição de $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de acetona (curva preta). Parâmetros da voltametria: $E_{\text{inicial}} = -1,4 \text{ V}$; $E_{\text{Final}} = -1,75 \text{ V}$; $E_{\text{degrau}} = 5 \text{ mV}$; $E_{\text{pulso}} = 20 \text{ mV}$; Freq 25 Hz.

O nitrogênio do agrupamento amino da glicina é consideravelmente básico ($pK_a = 9,6$), de forma que um meio de maior acidez favorece sua protonação e, conseqüentemente, desfavorece o ataque nucleofílico da amina sobre a carbonila.

A linearidade da dependência entre potencial de pico e pH apresentada na Figura 4.11 (gráfico da direita) indica o envolvimento de prótons na reação¹⁰⁶. O coeficiente angular da curva (próxima de 30 mV) sugere que o mecanismo de reação envolva a incorporação simultânea de dois elétrons no processo.

Figura 4.12: Mecanismo da formação da imina pela reação entre glicina e acetona (baseado em reação análoga com metilamina)¹⁰³.

Os resultados obtidos são coerentes com investigações anteriores¹⁰⁵, e o mecanismo de reação proposto é ilustrado na Figura 4.13. A imina incorpora um elétron via eletrodo, formando um ânion radicalar, que muito rapidamente reage com um próton do meio (lembrando que a reação ocorre em água, solvente polar prótico). O radical neutro formado possui potencial de redução menos negativo que a imina ao começo da reação, que sofre redução eletroquímica. Por fim, o ânion formado abstrai mais um próton do meio para sua estabilização. Por envolver duas etapas eletroquímicas intercaladas com uma etapa química, esse tipo de mecanismo comumente é descrito como ECE (sendo E referente a *electrochemical* e C, *Chemical*).

Figura 4.13: Representação de mecanismo proposto para redução eletroquímica da imina¹⁰⁵.

Aumentar a alcalinidade do meio, apesar de permitir maior desprotonação da glicina para o ataque nucleofílico, chega a desfavorecer a reação. Uma possível explicação pode ser que a etapa de reação no eletrodo envolve prótons, de forma que uma baixa disponibilidade iniba o processo como um todo. Ademais, é interessante notar também que a concentração de base utilizada ($1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) forma um sistema tamponado com a glicina adicionada ($2,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), aumentando sua robustez, seja para a realização da determinação, cuja etapa eletroquímica envolve o consumo de prótons, seja para aplicações nas quais as amostras podem apresentar maiores variações de pH.

4.2.4 *Interferência a acetaldeído*

Outro aspecto relevante para um método de determinação de acetona em ar exalado é o estudo da interferência de acetaldeído, espécie comum em ar exalado e que afeta a maioria dos métodos propostos na literatura.

Para o reagente colorimétrico utilizado no método adotado no mestrado do autor o acetaldeído apresenta intensificação da coloração do produto reacional tal qual a acetona, porém com menor sensibilidade (próxima a 10%). Essa interferência, mesmo pequena, causa superestimação de resultados para pacientes saudáveis que tenham ingerido bebidas alcoólicas. Estudos indicam que a concentração de aldeído exalado pode ultrapassar em cinco vezes ou mais a de acetona após consumo moderado de álcool por voluntários caucasianos, e pode apresentar proporções bem mais desfavoráveis para pessoas que apresentem inatividade da isoenzima álcool desidrogenase (caso comum entre orientais)¹⁰⁷.

O voltamograma de onda quadrada de uma solução derivatizante contendo acetona e acetaldeído (Figura 4.14) revela que o aldeído forma um pico voltamétrico em potencial bem distinto ($-1,41 \text{ V vs. Ag|AgCl}$) do pico formado para a acetona ($-1,57 \text{ V vs. Ag|AgCl}$) e com maior intensidade de sinal para a mesma concentração. O resultado apresentado não apenas demonstra a não interferência do composto na análise, como também abre perspectiva de estudos posteriores de análise

simultânea de ambos os compostos em ar exalado, abrangendo as etapas de amostragem e determinação.

Figura 4.14: Voltamograma de onda quadrada de solução derivatizante contendo $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ de acetona e $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ de acetaldeído. Parâmetros da voltametria: $E_{\text{inicial}} = -1,2 \text{ V}$; $E_{\text{Final}} = -1,2 \text{ V}$; $E_{\text{degrau}} = 5 \text{ mV}$; $E_{\text{pulso}} = 20 \text{ mV}$; Freq 25 Hz.

4.2.5 Comparação entre métodos voltamétricos

Antes de adotar a glicina como reagente derivatizante para dar sequência ao desenvolvimento da aplicação almejada, realizaram-se testes com outros reagentes já recomendados na literatura para análise de compostos carbonílicos por métodos voltamétricos^{95,96,108}. Alguns destes reagentes alternativos chegaram a apresentar sensibilidades até maiores do que a da abordagem explorada mas, na prática laboratorial, se mostraram menos estáveis e, muitas vezes, mais voláteis e tóxicos do que a glicina em meio básico, ou produziam resultados menos reprodutíveis ou ainda reagem de forma lenta (conforme já mencionado previamente em literatura), como indicados na Tabela 2.

Tabela 2: Comparação entre diferentes estratégias para derivatização

	Sensibilidade pico / nA/(mg/L) acetona	Toxicidade	Tempo de reação	Observação
Glicina	1,3	Muito Baixa	15 s (**)	
Sulfato de Hidrazina	16,9	Considerável	~ 30 min	Baixa Reprodutibilidade ⁹⁶
Etilenodiamina	24,3	Alta	~ 15 min	Volátil

4.3 Processamento dos sinais obtidos

4.3.1 *Perfil do sinal e abordagem de tratamento*

Neste ponto é interessante explicitar os motivos pelos quais o desenvolvimento de uma estratégia de tratamento de sinal é especialmente importante no contexto apresentado. Não apenas o reconhecimento e o cálculo do sinal facilita de maneira considerável a realização da determinação, mas viabiliza a obtenção de resultados dessas análises.

Para entender melhor esta necessidade, consideremos o gráfico da Figura 4.15: o sinal, em cinza, se refere à solução alcalina do reagente derivatizante, enquanto o sinal em preto se refere a uma solução similar, com concentração de acetona de $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Ainda que seja pouco evidente, é possível observar, por inspeção visual, a existência de um sinal pequeno e largo, centrado em cerca de -1,57 V, sobreposto à linha base na curva em preto. Identificar e quantificar esse sinal são problemas de ordem prática fora do alcance dos recursos disponíveis no software nativo NOVA, fornecido pelo fabricante do potenciostato e que o algoritmo proposto visa solucionar.

A primeira tentativa sempre recorrente ao químico analítico para interpretação de sinal sobreposto à linha base é a subtração do sinal de solução não contendo

** Tempo de reação estimado pelo tempo de meia vida apresentado em literatura

analito, ou seja, branco. Para curvas voltamétricas é comum que haja diferença de perfil de linha base entre as corridas, como na situação ilustrada (em toda a região explorada flui corrente faradaica significativa devido à redução de oxigênio e no extremo negativo tem início o crescimento exponencial de corrente de redução do íon sódio e/ou de formação de hidrogênio). O excerto da Figura 4.15 (subtração do sinal em cinza do sinal em preto) ilustra a não efetividade deste procedimento para a recuperação do sinal da acetona.

Figura 4.15: Voltamogramas de onda quadrada em eletrodo de gota pendente de soluções de derivatizante puro (curva cinza) e após adição de $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de acetona (curva preta). Excerto apresenta sinal com analito subtraído do branco. $E_{\text{inicial}} = -1,4 \text{ V}$; $E_{\text{Final}} = -1,4 \text{ V}$; Freq 25 Hz; $E_{\text{degrau}} = 5 \text{ mV}$; $E_{\text{pulso}} = 20 \text{ mV}$.

Visando estabelecer um possível mecanismo que mimetizasse a percepção humana de que há um leve sinal na curva em presença de traços de acetona, o perfil do branco (e do sinal), fez-se uma apreciação qualitativa do sinal em um programa de desenho vetorial. Notou-se que o ajuste manual de uma curva de Bézier à curva do branco, assim como à obtida em presença de acetona nas regiões extremas nas quais o sinal analítico não se observa, é bastante natural, intuitivo e satisfatório.

Tais curvas, em programas de desenho vetorial, são operadas da seguinte

forma: primeiramente são definidos os pontos de início (P_1) e término (P_4) da curva, definindo um segmento de reta. Para gerar uma curvatura nesses pontos, são definidos dois pontos de controle (P_2 e P_3), de forma que a curva definida seja tangente ao segmento P_1P_2 em P_1 e tangente ao segmento P_3P_4 em P_4 , formando uma curva suave. A Figura 4.16 apresenta uma representação passo a passo (tal qual descrito neste parágrafo), e será melhor discutida nos parágrafos subsequentes.

Em um teste visual, uma curva empírica (sinal de solução com analito da Figura 4.15) foi copiada para um programa de desenho vetorial, com o objetivo de se estimar uma linha base razoável com suas ferramentas. A primeira etapa foi definir os pontos de início (P_1) e final (P_4) da curva, sendo escolhidos o primeiro e o último dado do voltamograma (Figura 4.16 A). Definido este segmento, os pontos de controle (P_2 e P_3) foram alterados (Figura 4.16 B). Após os primeiros contatos com a ferramenta, torna-se uma tarefa natural “arrastar” os pontos de controle para se encontrar a curvatura desejada e, dessa forma, a curva de linha base foi estimada de maneira visualmente satisfatória (Figura 4.16 C).

Os procedimentos realizados para a estimativa de linha base da forma descrita podem parecer arbitrários em um primeiro momento, mas seguem uma lógica que pode ser implementada de maneira bastante sistemática por meio de um computador.

Na primeira etapa as extremidades da curva (P_1 e P_4) são escolhidas: por se tratarem do início e o final do voltamograma, é uma etapa bem simples de leitura dos dados.

Na segunda, os pontos de controle (P_2 e P_3) são escolhidos de maneira empírica até que a curva desenhada seja o mais próxima possível da curva medida nas regiões dos dados nas quais o pico não se encontra. Esse ajuste iterativo de um modelo definido a uma série de dados é justamente a mesma lógica utilizada pelos algoritmos de regressão não linear. Sendo assim, o computador otimiza P_2 e P_3 até que a soma dos quadrados das diferenças entre os pontos desenhados e um trecho da série de dados seja mínimo.

Figura 4.16: Esquema ilustrativo de método de estimativa de linha base. Explicações e detalhes nos próximos parágrafos do texto

Se o modelo de previsão de sinal de fundo for satisfatório, a curva definida pela equação com os parâmetros definidos pelo algoritmo acima será ótima, e o sinal analítico se constituirá da diferença entre os dados medidos e a linha base estimada (exceto por pequenas variações de ruído do sistema). Logo, na terceira etapa basta subtrair a linha obtida dos dados medidos.

Ao final, será obtido o sinal a ser quantificado, se mostrou razoável o ajuste de uma função gaussiana a esses dados, sendo a altura do pico ajustado proporcional à concentração de analito.

Apesar de conceitualmente simples, o processo de tratamento de sinal proposto ainda não foi explorado em técnicas analíticas. A previsão de linha base por meio de uma curva de Bézier foi encontrado apenas em um trabalho de espectroscopia e, ainda assim, realizando ajuste manual das curvas⁸⁰.

A realização de um método automático não apenas dispensa um tratamento de dados laborioso que demanda um especialista treinado, mas principalmente visa diminuir a subjetividade e aumentar a reprodutibilidade no processamento dos dados.

4.3.2 *Implementação do algoritmo*

O método proposto para tratamento de sinais foi implementado em GNU *Octave*. É composto de uma função (`Bac_treat_func`) e duas pequenas subrotinas (`Bac_baseline_func` e `Bac_peak_func`), e se encontra esquematizado na Figura 4.17. Os algoritmos desenvolvidos podem ser examinados no apêndice e se encontram disponíveis em <https://github.com/batistagl/chemapps>.

A função principal (`Bac_treat_func`) basicamente inicia o processo. Ela realiza a leitura dos dados analisados pelo potenciostato os normaliza tornando o valor de corrente inicial do voltamograma em zero e o final em um. Esta etapa é feita apenas para compatibilização dos dados com algoritmo de regressão não linear (utilizado em `Bac_baseline_func`, que será descrito posteriormente. Nesta função também se pode definir um vetor de pesos (**w**) a serem utilizados na etapa em

Bac_baseline_func.

Figura 4.17: Esquema explicativo de etapas de cálculo do algoritmo automático de tratamento de sinais desenvolvido

A sub-rotina `Bac_baseline_func` realiza a previsão de linha base, a etapa crucial do tratamento proposto. Definidos os pontos iniciais P_1 ($E_{inicial} ; 0$) e P_4 ($E_{final} ; 1$), os pontos de controle da curva de Bézier (P_2 e P_3) são alterados iterativamente de forma a se ajustarem, por regressão não linear, aos dados de entrada, de forma a minimizar a soma do quadrado das diferenças ponderadas por w . O vetor de pesos neste algoritmo seleciona as regiões de dados a serem consideradas para o ajuste, de forma similar ao que se faz intuitivamente ao se ajustar a curva desenhada aos pontos que se tomam como linha base.

Para que se possa realizar a regressão, os pontos previstos pela curva de Bézier (definida parametricamente) precisam ser alinhados aos dados, isto é, os valores de abscissa previstos precisam ser iguais aos de potencial lidos. Para tanto, a curva é inicialmente definida para um delimitado número de pontos (tipicamente cem) e então é interpolada de forma a encontrar o valor para estes pontos. O grande número de pontos utilizados para a definição do polinômio é uma forma de garantir que o erro de interpolação seja mínimo.

Definida a linha base, os dados de análise e o resultado de

Bac_baseline_func são encaminhados para a sub-rotina Bac_fitpeak_func, na qual a diferença entre os dados e a linha base é ajustada para um pico gaussiano (também por regressão não linear), sendo obtidos a altura, a largura e a posição do pico ajustado.

As informações obtidas aqui são, então, retornadas para a rotina principal, que retorna os dados para o usuário. Elas podem ser salvas em arquivos ou mesmo implementadas no *software* de controle do potenciostato, com será apresentado mais adiante.

Exemplo de resultados obtidos e procedimentos envolvidos são ilustrados na Figura 4.18: a linha base estimada (1, curva sem ruído), é removida do sinal bruto, e a esse sinal tratado é então ajustado a um pico gaussiano (2), restando apenas resíduos aleatórios ao final do processo (3), um indicativo de bom ajuste.

Figura 4.18: Sequência de tratamento de sinais aplicada a uma amostra. 1: estimativa de linha base; 2: estimativa de sinal analítico; 3: resíduos dos ajustes subsequentes (1 e 2)

Em uma etapa de calibração, por exemplo, a função pode ser realizado repetidamente, e os dados obtidos podem ser utilizados por outra sub-rotina para realização de curva de calibração, considerando replicatas para estimativas de desvios, conforme ilustrado na Figura 4.19.

Figura 4.19: Curva de calibração obtida utilizando parâmetros tratados por `Bac_treat_func`.

Apesar de praticamente todo automático, o algoritmo ainda possui alguns parâmetros determinados de maneira arbitrária. Os pontos P_1 e P_4 , por exemplo, são definidos nesta aplicação pela conveniência (início e final do voltamograma), mas podem ser colocados em pontos diversos do voltamograma (desde que não estejam já em meio ao sinal analítico). Os pesos também precisam ser definidos previamente, podendo ser feita por critérios analíticos (validação do método utilizado) ou estatísticos (por critérios de dispersão entre amostras), e será discutida posteriormente.

O algoritmo proposto foi testado para curvas de Bézier de graus maiores, visto que, hipoteticamente, equações polinomiais mais versáteis e completas poderiam ser mais efetivas. Todavia, para a aplicação pretendida, os ajustes não foram melhores e houve frequentes problemas de não convergência do algoritmo de regressão linear (Figura 4.20). A função utilizada para regressão (`fminunc`, contida na biblioteca comum do *software* GNU Octave) é oferecida para uso genérico, e seus eventuais problemas de divergência em aplicações mais complexos e específicas possivelmente podem ser superados pela elaboração (não tentada) de rotina de regressão mais apropriada para o problema proposto, incluindo, por exemplo, limites de valores para a otimização das variáveis.

Figura 4.20: Ajustes de curvas de Bézier de diferentes graus sobre o sinal. Mesmas condições da Figura 4.16.

O procedimento apresentado, apesar de se basear em uma curva polinomial, possui diferenças conceituais em relação ao ajuste de linha base por *splines* cúbicas. A principal delas é que, no caso das *splines*, uma série de diferentes curvas é traçada passando por pontos do voltamograma (nós), enquanto a curva de Bézier é uma figura geométrica única que se ajusta, quando não a toda série de dados, a um trecho relativamente grande do gráfico. Com a definição de uma curva de *splines* para cada conjunto de pontos, o espaçamento entre os nós e até a posição deles ao longo da curva podem influenciar muito a linha base estimada, como pode ser visto na Figura 4.21. Já no caso da curva de Bézier, a alteração destes parâmetros praticamente não altera em nada o formato das curvas ajustadas. Ademais, o ajuste de *splines* tenderá a formar curvas mais irregulares em especial quando a quantidade de ruído for mais elevada, como se pode ver pelas oscilações da curva Spline 5 (Figura 4.21) em potenciais menos negativos.

Figura 4.21: Previsões de linha base utilizando algoritmos de *splines* e curvas de Bézier. Curva cinza escuro: sinal. Curvas cinza claro: linha base ajustada por Bézier, espaçadas ponto a ponto, a cada cinco pontos e a cada oito pontos; Curvas em preto: previsão de linha base por *splines*, separadas a cada cinco pontos, a cada oito pontos, e a cada oito pontos deslocando-se a série de dados amostrada. Condições da Figura 4.16.

4.4 Sistema de análise integrado

Havendo-se definido o algoritmo para tratamento dos dados, a sequência do trabalho se pautou na elaboração de um sistema de análise integrado, pelo qual fosse possível comandar uma sequência de procedimentos (instrumentais e de processamento) de forma integrada e até mesmo automática, se pensando em um procedimento já otimizado em seus parâmetros.

O *software* NOVA (Metrohm, Suíça), projetado para controle dos potenciostatos da empresa, foi desenvolvido visando fornecer um sistema de análise completo, desde o controle dos experimentos até a manipulação dos dados. Oferece interface para encadeamento de comandos e se pretende mais flexível que o *software* mais antigo da empresa (GPES) e até do que outros softwares de potenciostatos de outras marcas, alegando maior poder e versatilidade para a realização de experimentos eletroquímicos.

Um dos aspectos mais interessantes deste *software* é encadeamento bastante livre de ações a serem tomadas durante experimentos de múltiplas etapas. Além de permitir que cada etapa do procedimento seja pensada e alterada

independentemente, o software disponibiliza ferramentas de alça de repetição (*loops*) e controle interativo de entrada de dados no sistema, afora métodos para tratamento e apresentação dos dados.

Com maiores conhecimentos das potencialidades e das limitações dos softwares utilizados, foi possível desenvolver um conjunto de aplicações que realizasse os experimentos eletroquímicos conforme desejado e fizesse o tratamento dos dados adequado para a automação da determinação de acetona em extratos aquosos de ar exalado por meio de voltametria de onda quadrada da imina obtida por derivatização com glicina.

A integração dos programas, se mostrou possível pela funcionalidade do NOVA de integração com ambiente .NET (onde este foi desenvolvido). Entre as possibilidades demonstradas em sua documentação, se pode executar um programa externo, em comando ilustrado na Figura 4.22. Uma vez que o algoritmo proposto já havia sido desenvolvido em *Octave*, e até para demonstrar essa possibilidade de integração, a estratégia de interfaceamento dos programas seguiu este princípio, e é ilustrada na Figura 4.23 vindo as explicações nos próximos parágrafos.

Chamar programa externo	
... .NET assembly file	C:\Program Files\Metrohm Autolab\Nova 1.10\Shared DataBases\Tutorials\External DOTNET DLL\... \StaticVBModule.dll
... .NET class name	StaticVBModule.StaticVBModule
... .NET method name	Int32 RunExternalExe(System.String, Boolean)
... ExecutableName	C:\Octave\Octave-4.0.0\bin\octave-gui.exe
... Wait	True
... ReturnValue	0

Figura 4.22: Comando apresentado em documentação do software NOVA e utilizado para integração com programa externo de tratamento de dados

Assim que o procedimento de análise é acionado, é solicitado ao usuário um nome de identificação para a amostra. O experimento voltamétrico então é realizado e os dados obtidos são exportados para um arquivo de texto, cujo nome é formado pelo identificador fornecido pelo usuário. Por meio deste arquivo, os dados obtidos são então lidos pelo *script* desenvolvido em *Octave*, realizando as operações previamente descritas. Os dados, uma vez processados, podem ser lidos em arquivo salvo pelo *Octave*, mas também podem ser reimportados pelo NOVA, que pode utilizar esses dados para apresentação (exemplificado na Figura 4.24) ou até para

posteriores tratamentos matemáticos. É possível até mesmo utilizar o resultado do programa externo como parâmetro para experimentos posteriores, o que não foi explorado nessa tese.

Figura 4.23: Integração entre softwares de análise (NOVA) e de processamento de sinais (Octave)

A implementação destas etapas, de maneira integrada com *software* comercial, além de convenientes para a realização deste trabalho, abre possibilidades para incorporação de aplicações. Vez que os códigos são intercambiáveis, a integração entre o NOVA e o Octave tem um campo vastíssimo de aplicações em tratamento de dados que podem ser desenvolvidos por programadores, mas podem ser utilizados até por usuários inexperientes. A adição de novas funcionalidades no NOVA programadas em Octave pode dar-se por simples procedimento de instalação autoexecutável ou por cópia do Octave para a pasta de programas do mesmo computador em que se encontra instalado o NOVA e importação de procedimento já pré elaborado no NOVA ou adição de novos comandos.

Figura 4.24: Importação dos dados calculados pelo Octave no NOVA. Curva cheia em preto: sinal normalizado; curva pontilhada em cinza: linha base prevista; curva cheia em cinza: sinal subtraído da linha base (multiplicado por dez e somado, para facilitar visualização); curva pontilhada em preto: pico ajustado ao sinal subtraído.

4.5 Aplicação em amostras reais

Após a elaboração do sistema da forma que se julgou ótima, o equipamento foi testado com amostras de ar exalado coletadas no Instituto do Coração (Tabela 3). Para comparação dos algoritmos de tratamento de dados, os dados voltamétricos foram submetidos a três algoritmos diferentes: o uso de *splines* com seleção de janela de dados conforme literatura (s), o uso de curvas de Bézier utilizando janela de dados (w) e o uso de curva de Bézier sem janela de dados (f), ou seja, se ajustando a curva à série inteira de dados. A quantificação por identificação visual ou mesmo utilizando algoritmos de reconhecimento de linha base e pico presentes em *softwares* de potenciostatos comerciais mostrou-se inaplicável nessas condições desfavoráveis, inviabilizando sua inclusão nos métodos da tabela (vale lembrar que

o perfil do sinal apresentado na Figura 4.15 se apresenta na faixa de concentração das amostras medidas).

Tabela 3: Comparação entre método de análise colorimétrico (método utilizado como referência) e voltamétrico para análise de acetona em amostras de ar exalado. (s) desconto de branco por ajuste de *spline* ; (w) desconto de branco por ajuste de curva de Bézier, excluindo região do pico; (f) igual a (w), mas com ajuste à curva toda. Concentrações reportadas em $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Amostra	Colorimetria	HDME (w)	HDME(f)	HDME(s)
1	$0,46 \pm 0,10$	$0,33 \pm 0,11$	$0,31 \pm 0,08$	$0,37 \pm 0,10$
2	$4,57 \pm 0,10$	$4,73 \pm 0,09$	$4,57 \pm 0,11$	$3,93 \pm 0,10$
3	$0,89 \pm 0,10$	$0,78 \pm 0,11$	$0,68 \pm 0,10$	$0,96 \pm 0,05$
4	$0,46 \pm 0,10$	$0,41 \pm 0,12$	$0,27 \pm 0,08$	$0,67 \pm 0,05$
5	$0,78 \pm 0,10$	$0,55 \pm 0,07$	$0,51 \pm 0,05$	$0,74 \pm 0,10$
6	$0,57 \pm 0,10$	$0,81 \pm 0,21$	$0,6 \pm 0,16$	$0,69 \pm 0,07$
7	$0,91 \pm 0,10$	$0,85 \pm 0,13$	$0,75 \pm 0,10$	$1,12 \pm 0,10$
8	$1,54 \pm 0,10$	$1,38 \pm 0,06$	$1,23 \pm 0,07$	$1,23 \pm 0,07$
9	$0,97 \pm 0,10$	$0,7 \pm 0,11$	$0,63 \pm 0,06$	$0,78 \pm 0,11$
Limite de detecção	0,30	0,23	0,20	0,23
Comparações (com Colorimetria)				
R²	(1)	0,987	0,992	0,981
Valor-p	---	0,263	0,003	0,449
intercepto	(0)	$-0,13 \pm 0,08$	$-0,22 \pm 0,06$	$0,15 \pm 0,07$
inclinação	(1)	$1,05 \pm 0,05$	$1,04 \pm 0,04$	$0,82 \pm 0,04$

Os resultados apresentam aparente grande similaridade e precisão comparável ao método colorimétrico (desenvolvido anteriormente e utilizado como referência)¹, e com limite de detecção um pouco melhor. No entanto, uma análise mais cuidadosa dos dados permite chegar a conclusões diferentes a respeito de cada método.

Um teste interessante para a comparação de dados pareadas é a regressão linear¹⁰⁹ entre as duas séries de dados. Por meio desta pode-se ver a correlação entre os dados, bem como se há erros sistemáticos (pelo intercepto) ou erros proporcionais (de acordo com a inclinação do gráfico). Nas últimas quatro linhas da tabela apresentam-se parâmetros de comparação em relação ao método colorimétrico, anteriormente proposto e utilizado como referência neste trabalho.

Uma análise inicial dos coeficientes de correlação mostra que o resultado dos três métodos de tratamento são altamente correlacionados (R^2) com o método de referência, um resultado aparente pela inspeção dos valores da tabela. Para uma melhor discussão e caracterização, cabe atentar para os outros parâmetros analisados.

Antes de prosseguir com a análise baseada na regressão linear, é interessante notar o valor-p para cada um dos métodos comparados em relação à colorimetria. Apesar de grande correlação, a amostra HDME(f) apresenta valor de p baixo o suficiente para se desconsiderar esse método em um nível de 95% (ou até 99%) de confiança.

Voltando a análise de regressão linear, algo pode ser visto para explicar tal divergência. O valor do intercepto para regressão do método f é consideravelmente diferente de zero, indicando que este método possui um erro sistemático negativo. A observação mais cautelosa das amostras mostra que praticamente todas as amostras estão em valores mais baixos por este método.

A análise da inclinação da reta mostra que o método de *splines* empregado apresentou um coeficiente consideravelmente menor do que 1, indicando um erro proporcional nas estimativas, apesar de apresentar valor-p alto, bem como alta correlação com o método colorimétrico.

Por fim, o método de análise proposto, utilizando curva de Bézier e janela de seleção de linha base mostrou todas as características analisadas favoráveis. Em um nível de confiança de 95%, pode-se dizer que o coeficiente angular calculado é igual a um e o coeficiente linear é igual a zero.

4.6 Cronocoulometria tridimensional

Os resultados apresentados acima indicam a grande versatilidade que a integração dos recursos do NOVA com o *Octave* oferece. Essa nova perspectiva abriu a possibilidade de implementação de procedimentos eletroquímicos mais complexos, paradigma avaliado numa extensão dos objetivos principais da tese.

A Cronocoulometria tridimensional, introduzida na década de 1980 por Gutz¹¹⁰, consiste na realização sequencial de cronocoulogramas com diferentes degraus de potencial, organizados em um gráfico tridimensional tratado matematicamente. O perfil deste gráfico permite identificar o controle difusional de um processo e a ocorrência de processos de adsorção por inspeção visual e/ou recorrendo a equações bem estabelecidas. Muitas das informações providas pela cronocoulometria também podem ser obtidas por outras técnicas, mas as extrapolações de carga faradaica a tempo zero favorecem a escolha da técnica quando o processo de eletrodo envolve adsorção de reagentes ou produtos eletroativos.

Para sua implementação, na época, foi utilizado computador HP-9825 e potenciostato PAR-170 (ambos equipamentos fora de linha nos dias de hoje), sendo necessário construir interfaces de controle, programar *software* em HPL e realizar adaptações em partes eletrônicas do potenciostato. Este procedimento não foi reproduzido por outros grupos de pesquisa, provavelmente devido a grande complexidade do sistema.

Nesse contexto se mostrou interessante a implementação desta técnica utilizando os *softwares* apresentados ao longo da tese: por serem programas amplamente conhecidos e distribuídos em laboratórios de pesquisa, a elaboração de um *script* capaz de realizar esta função viabilizaria, de maneira bastante simples, a reprodução e difusão desta técnica pela comunidade científica.

O programa a realizar a cronocoulometria tridimensional, logo, precisa aplicar uma sequência de cronocoulogramas de duplo potencial (com variação no degrau aplicado e mudanças de escala de corrente), coletar a corrente de cada etapa, organizar e realizar cálculos para a linearização dos dados, e os representar como

uma superfície tridimensional. Este procedimento se apresenta na Figura 4.25 e é descrito com mais detalhes a seguir.

A etapa de programação de potenciais se apresenta na Figura 4.25 (A). O formato da onda de aplicação de potencial se assemelha ao de uma voltametria de pulso diferencial, porém sendo a duração da etapa de retorno igual à da etapa de ida. A temporização dessas etapas de aplicação são especialmente críticas em cronocoulometria, visto que há grande interesse em extrapolar medidas para tempo zero, sendo desejadas medidas rápidas logo na aplicação de potencial.

Considerando a natureza deste fenômeno eletroquímico, a quantidade de carga consumida logo na mudança de potencial, momento no qual ocorre a carga de dupla camada elétrica e eventuais processos eletroquímicos de adsorbatos, é consideravelmente maior do que durante o resto do patamar. Desta forma, é desejável que a escala de corrente do potenciostato seja alterada durante o experimento: que seja alta neste primeiro momento e baixa no segundo.

O *software* NOVA apresenta um modo de programação de experimentos rápidos, inicialmente explorado para a Cronocoulometria tridimensional. Apesar de bastante versátil, a programação das etapas de potencial são realizadas de maneira manual e bastante laboriosa, sendo muito pouco prático programar um experimento com algumas dezenas de pulsos de potencial. Outra peculiaridade encontrada no sistema se deu na mudança de escala de corrente. Dentro do modo citado acima, o *software* não realiza mudanças de escala de corrente, mesmo apesar de oferecer essa possibilidade durante a programação.

Para contornar este problema, foi implementada a programação sequencial de vários modos de experimentos rápidos de forma a controlar o potencial aplicado e a mudança de corrente em comandos externos a cada etapa de experimento rápido. Apesar de, conceitualmente, não haver diferença na programação por esta abordagem, os comandos do potenciostato são processados mais lentamente, de forma que não se sabe precisamente a carga consumida ou mesmo o momento exato de uma mudança de potencial entre cada uma destas etapas. Esta imprecisão ocorre a cada mudança de escala ou de potencial (correspondentes aos pequenos espaços entre os segmentos de reta apresentados na Figura 4.25 A).

Figura 4.25: Sequência de procedimentos para montagem do cronocoulograma tridimensional. (A) Programação de potenciais; (B) Cronocoulogramas de duplo potencial; (C) Cronocoulogramas linearizados e extrapolados a tempo infinito; (D): Cronocoulograma tridimensional. Solução de Cd^{2+} $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ em $NaNO_3$ $0,1 \cdot \text{mol} \cdot L^{-1}$ em eletrodo de gota pendente de mercúrio. $E_{inicial} = -1,45 \text{ V}$; $E_{final} = -0,65 \text{ V}$; $E_{incremento} = -10 \text{ mV}$

Cada sequência de dois potenciais (ida e volta) forma um cronocoulograma

de duplo potencial (Figura 4.25 B), que então é processado matematicamente (conforme mostra Figura 4.25 C). Os cronocoulogramas são apresentados então na forma de uma superfície, sendo o sinal de carga reportado em função do tempo e do potencial aplicado (Figura 4.25 D).

A matriz de dados obtida pelo equipamento consistia em dois vetores, de tempo e de carga, sendo o potencial determinado em cada etapa do experimento. A carga acumulada também era zerada toda vez que se o sistema reiniciava o modo de temporização rápido, sendo necessário contabilizar matematicamente a carga acumulada na etapa anterior.

Os dados acima obtidos e classificados ainda eram linearizados e extrapolados. Na etapa de ida, a corrente é plotada em relação a raiz quadrada do tempo, enquanto etapa de volta o tempo é reportado como $|t^{1/2} - (t - t_{\text{pulso}})^{1/2}|$. Na etapa de volta, alguns pontos eram extrapolados para estimar a carga a tempo infinito (pontos vazados em Figura 4.25 C).

A realização das etapas acima, bem como a plotagem em superfície tridimensional, foram realizadas por um *script* programado em *Octave* (anexado em um apêndice deste documento). A ferramenta se mostrou bastante prática pela facilidade que ela apresenta em lidar com dados matriciais e pelas ferramentas de apresentação de gráficos, que permite a rotação e redimensionamento de escalas dos gráficos por simples movimentos do *mouse*.

O desenvolvimento da cronocoulometria tridimensional utilizando estas ferramentas comerciais, por fim, apresentou limitações práticas, em especial por conta dos momentos de operação do potenciostato nos quais não se sabe ao certo o potencial aplicado ou a carga consumida. No entanto, a grande potencialidade de programação do sistema e integração com *software open source* de álgebra linear para tratamento dos dados mostra a grande potencialidade desta integração e da exploração desta versatilidade. Ainda, as limitações apresentadas nesta técnica podem vir a ser superadas pelo estudo mais aprofundado do comportamento eletrônico do potenciostato, de forma a considerar nos cálculos os processos que ocorrem nestes momentos.

5 CONCLUSÕES

Alcançaram-se, nesta tese, importantes avanços no estabelecimento de método eletroanalítico de análise de acetona em ar exalado. Frente às técnicas eletroanalíticas anteriormente propostas para este fim, a presente se baseia em onda voltamétrica bem definida de uma imina e não de inibição da redução de hidrogênio⁹², susceptível a interferências; não depende também de enzimas para proporcionar seletividade compatível⁶⁴, nem sofre interferência de acetaldeído.

Acredita-se no potencial de aproveitamento posterior das contribuições desta tese no desenvolvimento de um sensor, monitor ou dispositivo eletroquímico para análise de acetona para fins de diagnóstico ou monitoramento laboratório analítico, seja a beira leito ou uso pessoal domiciliar. Desde já, a metodologia proposta representa uma alternativa real à determinação espectrofotométrica para acelerar e deixar imunes à possível interferência de acetaldeído as análises de acetona requeridas pelas pesquisas com centenas de pacientes com insuficiência cardíaca, em curso no Instituto de Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, que também irão se beneficiar dos aperfeiçoamentos no amostrador.

A quantificação da acetona por esta técnica, por sua vez, só se fez possível pela combinação da utilização da técnica de voltametria de onda quadrada assistida pelo novo algoritmo de processamento de sinais desenvolvido. A detecção e quantificação do sinal da imina, obtida por derivatização da acetona com glicina, se tornou possível até a região de interesse ($0,2 \text{ mgL}^{-1}$ em fase líquida), além de se ter alcançado a automação da determinação eletroquímica. Em relação às ancestrais determinações polarográficas, deixou-se de usar o eletrodo no modo gotejante e também se conseguiu dispensar a eliminação de oxigênio dissolvido por purga com gás inerte, economizando tempo e reduzindo perdas de acetona por volatilização. Todavia, as inúmeras insistentes tentativas de contornar o uso de mercúrio, seja na forma de gota pendente, seja na de filme fino sobre suporte condutor sólido não permitiram ainda alcançar o limite de detecção necessário para o uso pretendido, mesmo que aceitável para outras demandas.

O algoritmo elaborado para tratamento dos dados obtidos, etapa crucial para quantificação e reconhecimento do sinal analítico, constitui uma inovação no

tratamento de sinais. O uso desta ferramenta, baseada no ajuste de curva de Bézier à linha base e curva de Gauss ao pico apresenta resultados mais precisos aos do ajuste por *splines* descrito em literatura para a aplicação proposta.

Além de ser mais preciso, o método com curva de Bézier se mostra muito mais robusto que o por *splines*, para o qual a seleção de região para estimativa de linha base e até mesmo espaçamento entre pontos se mostram críticos para a reprodutibilidade do experimento, enquanto o uso de curva de Bézier mesmo sem seleção de região de linha base apresentou resultado próximo ao método com seleção (apesar do desvio sistemático, aspecto curioso que pode vir a ser estudado futuramente). Além disso, a estratégia desenvolvida permite a detecção e quantificação de picos não observáveis por meio das ferramentas tradicionalmente incorporadas a sistemas comerciais de análise.

Restou demonstrada, pelo exemplo da implementação da cronocoulometria tridimensional, que a sinergia da integração entre o software nativo comercial NOVA com a linguagem livre Octave transcende a simples assistência ao tratamento de dados, permitindo a elaboração de experimentos eletroquímicos mais elaborados.

Como perspectiva futura, o desenvolvimento e aplicação de um eletrodo modificado ou procedimento de modificação exequível em campo virá a viabilizar a criação de dispositivo prático e portátil para análise de acetona em ar exalado, um desafio de bastante interesse acadêmico e comercial.

Outra perspectiva interessante é a aplicação e desenvolvimento de novos algoritmos de processamento de sinais baseados no ajuste automático de linha base por curvas de Bézier. O teste e adaptação deste algoritmo a outras aplicações pode trazer maior precisão e até mesmo melhorar a detectabilidade de analitos em métodos instrumentais.

Por fim, as perspectivas atuais de desenvolvimento de procedimentos experimentais e *softwares* integrados trazem inúmeras possibilidades para a elaboração de novos experimentos instrumentais, seja pela programação e encadeamento de experimentos e/ou por novas abordagens para tratamento de dados.

REFERÊNCIAS[^]

1. Batista, G. L. Breath Acetone Analysis: Methodology for studying hospitalized patients. (2011).
2. Hubbard, R. S. Determination of acetone in expired air. *J. Biol. Chem.* **XLIII**, 57–65 (1920).
3. Henderson, M. J., Karger, B. A. & Wrenshall, G. A. W. Acetone in the breath. *Diabetes* **1**, 188–200 (1952).
4. Tassopoulos, C. N., Barnett, D. & Russell Fraser, T. Breath-Acetone and Blood-Sugar Measurements in Diabetes. *Lancet* **293**, 1282–1286 (1969).
5. Crofford, O. B. *et al.* Acetone in breath and blood. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **88**, 128–139 (1977).
6. Phillips, M. & Greenberg, J. Detection of endogenous acetone in normal human breath. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **422**, 235–238 (1987).
7. Kundu, S. K., Bruzek, J. A., Nair, R. & Judilla, A. M. Breath acetone analyzer: Diagnostic tool to monitor dietary fat loss. *Clin. Chem.* **39**, 87–92 (1993).
8. Wang, Z. & Wang, C. Is breath acetone a biomarker of diabetes? A historical review on breath acetone measurements. *J. Breath Res.* **7**, 037109 (2013).
9. Phillips, M. Breath tests in medicine. *Scientific American* **267**, 74–79 (1992).
10. Lavoisier, A. & Laplace, P. Memoir on Heat. *Read to R. Acad. Sci.* **2**, 117 (1783).
11. Haldane J.S., Priestley, J. G. The Regulation Of The Lung-Ventilation. By J. S. Haldane, M.D., F.R.S., And J. G. Priestley, B.A. (Eleven Figures in the Text.) (From the Physiological. *Lung* (1905).
12. Harger, R. N. Debunking the Drunkometer. *J. Crim Law Criminol.* **40**, (1950).
13. Gravenstein JS; Jaffe, Michael B; Gravenstein, Nikolaus; Paulus, D. A. *Capnography*. (2011).
14. Bartels, J., Severinghaus, J. W., Forster, R. E., Briscoe, W. A. & Bates, D. V. The respiratory dead space measured by single breath analysis of oxygen, carbon dioxide, nitrogen or helium. *J. Clin. Invest.* **33**, 41–8 (1954).
15. Dubowski, K. M. Breath analysis as a technique in clinical chemistry. *Clin. Chem.* **20**, 966–972 (1974).

[^] De acordo com o Estilo Vancouver e por sistema numérico de chamada.

16. van Weerden, G. Some clinical applications of capnography. *Am. J. Med. Electron.* **1**, 199–207 (2008).
17. Gearhart, H. L. *et al.* Determination of lactose malabsorption by breath analysis with gas chromatography. *Anal. Chem.* **48**, 393–398 (1976).
18. Graham, D. *et al.* Campylobacter Pylori Detected Noninvasively By the ¹³C-Urea Breath Test. *Lancet* **329**, 1174–1177 (1987).
19. Pauling, L., Robinson, a B., Teranishi, R. & Cary, P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 2374–2376 (1971).
20. Philips, M. *et al.* Variation in volatile organic ompounds in the breath of normal humans. *Journal of Chromatography B* **729**, 75–88 (1999).
21. Pereira, J. *et al.* Breath Analysis as a Potential and Non-Invasive Frontier in Disease Diagnosis: An Overview. *Metabolites* **5**, 3–55 (2015).
22. Miekisch, W. & Schubert, J. K. From highly sophisticated analytical techniques to life-saving diagnostics: Technical developments in breath analysis. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **25**, 665–673 (2006).
23. Miekisch, W., Schubert, J. K. & Noeldge-Schomburg, G. F. E. Diagnostic potential of breath analysis--focus on volatile organic compounds. *Clin. Chim. Acta.* **347**, 25–39 (2004).
24. Buszewski, B., Keszy, M., Ligor, T. & Amann, A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed. Chromatogr.* **21**, 553–66 (2007).
25. Risby, T. H. & Solga, S. F. Current status of clinical breath analysis. *Appl. Phys. B* **85**, 421–426 (2006).
26. Dubowski, K. M. & Essary, N. A. Response of breath-alcohol analyzers to acetone. *J. Anal. Toxicol.* **7**, 231–234 (1983).
27. Dubowski, K. M. & Essary, N. A. Response Of Breath-Alcohol Analyzers To Acetone - Further-Studies. *J. Anal. Toxicol.* **8**,
28. Jones, a W. Breath-acetone concentrations in fasting healthy men: response of infrared breath-alcohol analyzers. *J. Anal. Toxicol.* **11**, 67–69 (1987).
29. Freund, G. & O'Hollaren, P. Acetaldehyde concentrations in alveolar air following a standard dose of ethanol in man. *J. Lipid Res.* **6**, 471–477 (1965).
30. Quertemont, E. & Didone, V. Role of acetaldehyde in mediating the pharmacological and behavioral effects of alcohol. *Alcohol Res. Health* **29**,

- 258–265 (2006).
31. Garcia, C. C. M. Quantification of DNA damage induced by acetaldehyde. Potential biomarker for environmental pollution. (2010).
 32. Garcia, C. C. M., Batista G.L., Freitas, F.P., Lopes F.S., Sanchez A.B., Gutz I.G.R., Mascio P.D., Medeiros, M.H.G.. Quantification of DNA adducts in lungs, liver and brain of rats exposed to acetaldehyde. *Free Radic. Biol. Med.* **75 Suppl 1**, S41, (2014).
 33. Gelmont, D., Stein, R. A. & Mead, J. F. Isoprene - The main hydrocarbon in human breath. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**, 1456–1460 (1981).
 34. Kwak, J. *et al.* Detection of volatile organic compounds indicative of human presence in the air. *J. Sep. Sci.* **38**, 2463–2469 (2015).
 35. Aghdassi, E. & Allard, J. P. Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 880–886 (2000).
 36. Phillips, M. *et al.* Prediction of heart transplant rejection with a breath test for markers of oxidative stress. *Am. J. Cardiol.* **94**, 1593–1594 (2004).
 37. Simenhoff, M. L., Burke, J. F., Saukkonen, J. J., Ordinario, A. T. & Doty, R. Biochemical profile of uremic breath. *N. Engl. J. Med.* **297**, 132–5 (1977).
 38. Halitosis-inducing, M. The Relationship Between Volatile Sulfur. *Arch. Oral Biol.* **74**, 1–6
 39. Horváth, I. *et al.* Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, 1042–1046 (1998).
 40. Statheropoulos, M., Agapiou, A. & Georgiadou, A. Analysis of expired air of fasting male monks at Mount Athos. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **832**, 274–279 (2006).
 41. Braga, F. G. M. Exhaled breath acetone as a new biomarker of heart failure diagnosis. (2012).
 42. Marcondes-Braga, F. G. *et al.* Exhaled Acetone as a New Biomarker of Heart Failure Severity. *CHEST J.* **142**, 457–66 (2012).
 43. Braga, F. G. M., Batista, G. L., Bacal, F. & Gutz, I. G. R. Non-invasive method for diagnosing the severity of heart failure by extracting and analyzing acetone concentrations in captured exhaled breath. (2014).
 44. Ligor, T. Analytical Methods for Breath Investigation. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **39**, 2–12 (2009).
 45. Cao, W. & Duan, Y. Breath analysis: Potential for clinical diagnosis and

- exposure assessment. *Clin. Chem.* **52**, 800–811 (2006).
46. Mutlu, G. M., Garey, K. W., Robbins, R. a, Danziger, L. H. & Rubinstein, I. Pulmonary Perspective Collection and Analysis of Exhaled Breath Condensate in Humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 731–737 (2001).
 47. Corradi, M. *et al.* Collecting exhaled breath condensate (EBC) with two condensers in series: a promising technique for studying the mechanisms of EBC formation, and the volatility of selected biomarkers. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **21**, 35–44 (2008).
 48. Czebe, K. *et al.* Influence of condensing equipment and temperature on exhaled breath condensate pH, total protein and leukotriene concentrations. *Respir. Med.* **102**, 720–725 (2008).
 49. Teshima, N., Li, J., Toda, K. & Dasgupta, P. K. Determination of acetone in breath. *Anal. Chim. Acta* **535**, 189–199 (2005).
 50. Ohira, S. I. & Toda, K. Micro gas analyzers for environmental and medical applications. *Anal. Chim. Acta* **619**, 143–156 (2008).
 51. Harper, M. Sorbent trapping of volatile organic compounds from air. *J. Chromatogr. A* **885**, 129–151 (2000).
 52. Grote, C. & Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction for the analysis of human breath. *Anal. Chem.* **69**, 587–596 (1997).
 53. Deng, C., Zhang, J., Yu, X., Zhang, W. & Zhang, X. Determination of acetone in human breath by gas chromatography-mass spectrometry and solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **810**, 269–275 (2004).
 54. Van Den Velde, S., Quirynen, M., Van Hee, P. & Van Steenberghe, D. Differences between alveolar air and mouth air. *Anal. Chem.* **79**, 3425–3429 (2007).
 55. Schubert, J. K., Spittler, K. H., Braun, G., Geiger, K. & Guttman, J. CO₂-controlled sampling of alveolar gas in mechanically ventilated patients. *J. Appl. Physiol.* **90**, 486–492 (2001).
 56. Hamilton, S. D. Air sampling device and method for sampling exhaled air. (1995).
 57. Awano, S. *et al.* The assessment of methyl mercaptan, an important clinical marker for the diagnosis of oral malodor. *J. Dent.* **32**, 555–559 (2004).

58. Hansel, A. *et al.* Proton transfer reaction mass spectrometry: on-line trace gas analysis at the ppb level. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **149-150**, 609–619 (1995).
59. Smith, D. & Spanel, P. The novel selected-ion flow tube approach to trace gas analysis of air and breath. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1183–1198 (1996).
60. Fink, T., Baumbach, J. I. & Kreuer, S. Ion mobility spectrometry in breath research. *J. Breath Res.* **8**, 027104 (2014).
61. Wang, C. & Sahay, P. Breath analysis using laser spectroscopic techniques: Breath biomarkers, spectral fingerprints, and detection limits. *Sensors* **9**, 8230–8262 (2009).
62. Clark. Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography. *J. Appl Physiol.* **6**, 189–193 (1953).
63. Gessei, T. *et al.* Bio-sniffers for ethanol and acetaldehyde using carbon and Ag/AgCl coated electrodes. *Microchim. Acta* **165**, 179–186 (2009).
64. Landini, B. E. & Bravard, S. T. Breath Acetone Concentration Measured Using a Palm-Size Enzymatic Sensor System. *IEEE Sens. J.* **9**, 1802–1807 (2009).
65. Oh, Y., Lee, Y., Heath, J. & Kim, M. Applications of animal biosensors: A review. *IEEE Sens. J.* **15**, 637–645 (2014).
66. Di Natale, C., Paolesse, R., Martinelli, E. & Capuano, R. Solid-state gas sensors for breath analysis: A review. *Anal. Chim. Acta* **824**, 1–7 (2014).
67. Esteban, M., Ariño, C. & Díaz-Cruz, J. M. Chemometrics in Electroanalytical Chemistry. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **36**, 295–313 (2006).
68. Smolinska, a *et al.* Current breathomics-a review on data pre-processing techniques and machine learning in metabolomics breath analysis. *J. Breath Res.* **8**, 27105 (2014).
69. Wentzell, P. D. & Brown, C. D. Signal Processing in Analytical Chemistry. *Encyclopedia Anal. Chem.* 9764–9800 (2000).
70. Cooley, J. W. & Tukey, J. W. An Algorithm for the Machine Calculation of Complex Fourier Series. *Math. Comput.* **19**, 297 (1965).
71. Cerqueira, E. O., Poppi, R. J., Kubota, L. T. & Mello, C. Utilization of Fourier transform filter for noise minimization in analytical signals. *Quim. Nova* **23**, 690–698 (2000).
72. Savitzky, A. & Golay, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by

- Simplified Least Squares Procedures. *Anal. Chem.* **36**, 1627–1639 (1964).
73. Cunha, M. *Métodos Numéricos*. (Editora Unicamp, 2009).
74. Jakubowska, M. Signal Processing in Electrochemistry. *Electroanalysis* **23**, 553–572 (2011).
75. Reinsch, C. H. Smoothing by spline functions. II. *Numer. Math.* **16**, 451–454 (1971).
76. Gutz, I. G. R. CurTiPot - pH e Curvas de Titulação Potenciométrica: Análise e Simulação. (2015).
77. Barnett, V. & Lewis, T. *Outliers in Statistical Data (Probability & Mathematical Statistics)*. (John Wiley & Sons Ltd, 1978).
78. do Lago, C. L., Juliano, V. F. & Kascheres, C. Applying moving median digital filter to mass spectrometry and potentiometric titration. *Anal. Chim. Acta* **310**, 281–288 (1995).
79. Górski, Ł., Ciepiela, F. & Jakubowska, M. Automatic baseline correction in voltammetry. *Electrochim. Acta* **136**, 195–203 (2014).
80. Koch, A. & Weber, J. V. Baseline correction of spectra in Fourier transform infrared: Interactive drawing with Bézier curves. *Appl. Spectrosc.* **52**, 970–973 (1998).
81. Farin, G. *Handbook of computer aided geometric design*. (2002).
82. Kamermans, M. A Primer on Bézier Curves. (2011). Available at: <http://pomax.github.io/bezierinfo>. (Accessed: 15th November 2015)
83. Hirst, J. & Armstrong, F. A. Fast-Scan Cyclic Voltammetry of Protein Films on Pyrolytic Graphite Edge Electrodes: Characteristics of Electron Exchange undergo rapid electron exchange with the electrode. *Anal. Chem.* **70**, 5062–5071 (1998).
84. Romanenko, S. V., Romanenko, E. S. & Kolpakova, N. A. Use of a Spline Function of a Fractional Degree for the Description of the Base Line in the Determination of Platinum by Stripping Voltammetry. *J. Anal. Chem.* **56**, 51–55 (2001).
85. Alsberg, B. K. & Hagen, O. J. How octave can replace Matlab in chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **84**, 195–200 (2006).
86. Gough, B. GNU Scientific Library Reference Manual - Third Edition. (2009).

87. Oliphant, T. E. Python for Scientific Computing. *Comput. Sci. Eng.* **9**, 10–20 (2007).
88. Jarvis, R. M., Broadhurst, D., Johnson, H., O'Boyle, N. M. & Goodacre, R. PYCHEM: A multivariate analysis package for python. *Bioinformatics* **22**, 2565–2566 (2006).
89. Vance, A. R, the Software, Finds Fans in Data Analysts - NYTimes.com. *The New York Times* (2009). Available at: http://www.nytimes.com/2009/01/07/technology/business-computing/07program.html?pagewanted=all&_r=0. (Accessed: 24th February 2016)
90. Berntsson, S. Spectrophotometric Determination of Acetone by Salicylaldehyde Method. *Anal. Chem.* **28**, 1337–1337 (1956).
91. Righettoni, M., Tricoli, A. & Pratsinis, S. E. Si: WO₃ Sensors for Highly Selective Detection of Acetone for Easy Diagnosis of Diabetes by Breath Analysis. *Anal. Chem.* **82**, 3581–3587 (2010).
92. Motsegood, P. & Leddy, J. Detection of Acetone on Human Breath Using Cyclic Voltammetry. in *ECS Transactions* **41**, 1–7 (The Electrochemical Society, 2012).
93. ZUMAN, P. Polarographic Behaviour of Acetone. *Nature* **165**, 485–486 (1950).
94. Heyrovský, J., Zuman, P. *Practical Polarography: An introduction for chemistry students*. (1968).
95. Zuman, P. *Organic polarographic analysis*. (1964).
96. Lupton, J. M. & Lynch, C. C. Polarographic Examination of Carbonyl Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **66**, 697–700 (1944).
97. Van Atta, R. E. & Jamieson, D. R. Polarographic Determination of Acetone. *Anal. Chem.* **31**, 1217–1219 (1959).
98. Pomeroy, R. S., Denton, M. B. & Armstrong, N. R. Voltammetry at the thin-film mercury electrode (TFME): Anodic and cathodic stripping voltammetries and simple potentiostat construction. *J. Chem. Educ.* **66**, 877 (1989).
99. Nunes, L. M. S. & Faria, R. C. The influence of the electrodeposition conditions on the electroanalytical performance of the bismuth film electrode for lead determination. *Electroanalysis* **20**, 2259–2263 (2008).
100. Palchetti, I., Laschi, S. & Mascini, M. Miniaturised stripping-based carbon modified sensor for in field analysis of heavy metals. *Anal. Chim. Acta* **530**, 61–67 (2005).

101. Yosypchuk, B. & Barek, J. Analytical Applications of Solid and Paste Amalgam Electrodes. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **39**, 189–203 (2009).
102. Haynes, W. M. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 96th Edition*. (CRC Press, 2015).
103. Williams, A. & Bender, M. L. Studies on the Mechanism of Oxime and Ketimine Formation 1. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 2508–2513 (1966).
104. Bender, M. L. & Williams, A. Ketimine Intermediates in Amine-Catalyzed Enolization of Acetone 1a. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 2502–2508 (1966).
105. Fry, A. J. & Reed, R. G. The Electrochemical Reduction. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 6448–6451 (1969).
106. Walczak, M. M., Dryer, D. A., Jacobson, D. D., Foss, M. G. & Flynn, N. T. pH Dependent Redox Couple: An Illustration of the Nernst Equation. *J. Chem. Educ.* **74**, 1195 (1997).
107. Jones, a W. Measuring and reporting the concentration of acetaldehyde in human breath. *Alcohol Alcohol* **30**, 271–285 (1995).
108. Fleet, B. The Determination of Aliphatic Ketones by Polarography of their Girard T Hydrazone Derivatives. *Analyst* **95**, 649–651 (1970).
109. Deming, S. N., Michotte, Y., Massart, D. L., Kaufman, L. & Vandeginste, B. G. M. *Chemometrics: A Textbook*. (1988).
110. Gutz, I. G. R. Chemometrics and automation in analytical chemistry: some contributions. (1985).

APÊNDICE A – Scripts e Códigos

SCRIPT BAc_treat_func.m

```

%% BAc_treat_func é a função principal de tratamento de dados,
%% englobando o reconhecimento de linha base e o de pico
%%
%% [r c] = BAc_treat_func(x, y, v, w);
%%
%% PARÂMETROS DE SAÍDA:
%% r Se for solicitada apenas uma variável de resposta,
%% retorna a altura calculada dos picos previstos.
%%
%% Para duas variáveis de resposta, r é um vetor contendo:
%% Parâmetros do pico ajustado
%% r(1): Altura; r(2): Posição; r(3): Largura; r(4):
Offset
%% Pontos de controle da curva de Bézier (padrão: curvas
cúbicas)
%% r(5): p1_x; r(6): p1_y; r(7): p2_x; r(8): p2_y
%% r(9): Correntes inicial; r(10): Corrente final
%%
%% c Uma matriz bidimensional contendo:
%% Dados de corrente normalizados(:,1)
%% Linha base prevista(:,2)
%% Pico previsto (sobre sinal subtraído de linha base)
(:,3)
%% Fatores de ponderação para cada ponto da curva
(:,4);
%%
%% PARÂMETROS DE ENTRADA:
%% x Variável independente
%% y Variável dependente
%% v Escolha do ponto inicial e final a ser utilizado
(parâmetro opcional)
%% w Ponderação dos pontos do ajuste de linha base
(maiores informações em BAc_baseline_func) (opcional)
%%

function [r c d] = BAc_treat_func(x, y, v = [1 find(x == x(end))], w
= x < -1.65 | x > -1.5 );
    x = x(v(1) : v(2) ); y = y(v(1) : v(2) ); w = w(v(1) : v(2) );
    [~, o] = sort(x); x = x(o); y = y(o); clear o;
    y_norm = @(y) ( y .- y( end , : ) ) / ( y( 1 , end)
- y( end , end ) );
    [bl bp] = BAc_baseline_func(x, y_norm(y), w);
    [r pk] = BAc_fitpeak_func( x, y_norm(y) - bl );

```



```

    if (nargout == 1)
        r = r(1);
    else
        printf("Returning all parameters obtained from
calculations...\n");
        r = [r reshape(bp,1,4) y(1) y(end)]';
        c = [x y_norm(y) bl pk w];
    end
end
%%      *-*-*-*-*      FIM DO SCRIPT      *-*-*-*-*

```


SCRIPT BAc_peakfit_func.m

```
% BAC_fitpeak_func ajusta um pico gaussiano aos dados.
%%
%% [r pk] = BAC_peakfit_func(x, y, param);
%%
%%   PARÂMETROS DE SAÍDA:
%%       r      Parâmetros ajustados para pico
%%             r(1): Altura; r(2): Posição; r(3): Largura; r(4): Offset
%%       pk     Picos estimados (utilizando "r" encontrado e "x"
fornecido)
%%
%%   PARÂMETROS DE ENTRADA:
%%       x      Vetor de dados independentes
%%       y      Vetor de dados dependentes (medidos)
%%       param  Parâmetros iniciais para regressão não linear (opcional)
%%             Parâmetros padrão otimizados para aplicação proposta na
tese

function [r pk] = BAC_fitpeak_func(x, y, param = [max(y) -1.57
x(11)-x(1) 0])
    GaussCurve = @(x, par) par(1) * exp(-(x - par(2)).^ 2 ) /
par(3) ^ 2 ) + par(4);
    min_func = @(param) sum((y - GaussCurve(x, param)) .^ 2 );
    r = fminunc(min_func, param );
    pk = GaussCurve( x, r);

end
```

SCRIPT run_BAc.m

```

%% run_BAc é o script que inicia sequência de tratamento de dados
%%
%% FUNCIONAMENTO: run_BAc "Medida"
%%
%%      Adiciona a biblioteca de funções utilizadas
%%      Carrega dados medidos de arquivo "Medida"
%%      Salva variáveis obtidas em arquivo externo
%%      (Viabilizando reimportação pelo NOVA)

addpath('C:\Octave-4.0.0\lib\BAc_lib');
[y x] = load_nova(argv(){1});
[r c] = BAc_treat_func(x, y);
file = argv(){1}(1 : end - 4 );
save([file ".rBAc"], 'r', '-ascii');
save([file ".cBAc"], 'c', '-ascii');

%%      *_*_*_*_*_*_*_*      FIM DO SCRIPT      *_*_*_*_*_*_*_*

```

SCRIPT load_nova.m

```

%% load_nova lê arquivos exportados pelo NOVA
%%
%% Etapa necessária para remoção de bytes iniciais
%% do arquivo exportado pelo NOVA (UTF8 Byte Order Mark),
%% caracteres não imprimíveis que aparecem no processo de exportação
%%
%% [y x] = load_nova(file, st)
%%
%% PARÂMETROS DE SAÍDA:
%%      y      Segunda coluna de dados
%%      x      Primeira colina de dados
%%
%% PARÂMETROS DE ENTRADA:
%%      file Arquivo a ser lido
%%      st    Linha inicial a ser lida (opcional)
%%

function [y x] = load_nova(file, st = 6, op = 10)
    ifelse(strread(char(fread(fopen(file,'r'))(1:3))) == 'ï¿',
bom = 4,bom = 1);
    c = strread(char(fread(fopen(file,'r'))(bom:end)))'; % Remove
UTF8 BOM
    x = reshape(c,2,size(c)/2)'( st : end - op, 1 );
    y = reshape(c,2,size(c)/2)'( st : end - op, 2 );
    clear c;
    fclose(fopen(file));
end
%%      *_*_*_*_*_*_*      FIM DO SCRIPT      *_*_*_*_*_*_*

```

Procedimento para análise de acetona pelo NOVA

Commands	Parameters	Links
NOVA+Octave		
Remarks		
End status Autolab		
Signal sampler	Time, WE(1).Current	
Options	No Options	
Instrument		
Instrument description		
Definições iniciais de pastas de arquivo		
Atalho do Script do Octave		
Format	C:\Octave-4.0.0\bin\octave-cli.e...	
Text		
Pasta dos Dados Salvos		
Format	C:\Octave-4.0.0\lib\swapdata	
Text		
<..>		
Repetições Voltamograma (Curva completa)	11	
Number of repetitions	11	
Concentração da Amostra		
Title of box		
Message	Concentração da Amostra	
Value	0	
Time limit (s)	30	
Use time limit	No	
Inicialização do Potenciostato		
Autolab control		
WE(1).Current range	100 nA	
WE(1).Mode	Potentiostatic	
WE(1).Bandwidth	High stability	
Set potential	-1.450	
Potential (V)	-1.450	
Set cell	On	
WE(1).Cell	On	
Wait time (s)	3	
Duration (s)	3	
<..>		
Replicatas (com índice do arquivo)	1; 2; 3; 4; 5	
Number of repetitions	5	
Parameter link	1	
Create new drop		
MDE(1).Number of new drops	3	
Wait time (s)	3	
Duration (s)	3	
SWV (Determinação)	[-1.450, -1.750, -0.00500, 0.020...	
Initial potential (V)	-1.450	
End potential (V)	-1.750	
Step potential (V)	-0.00500	
Amplitude (V)	0.02000	
Frequency (Hz)	25.00000	
Estimated number of points	70	
Interval time (s)	0.04000	
Scan rate (V/s)	0.12500	
Signal sampler	Time, WE(1).Current	

Commands	Parameters	Links
Options	No Options	
Potential applied	<..array..> (V)	
Forward.Time	<..array..> (s)	
WE(1).Forward.Current	<..array..> (A)	
WE(1).Backward.Current	<..array..> (A)	
WE(1).δ.Current	<..array..> (A)	
Index	<..array..>	
δi vs E		
X	Potential applied (V)	
Y	WE(1).δ.Current (A)	
Z	Forward.Time (s)	
Show during measurement	Yes	
Measurement plot number	1	
Exportação de dados (para tratame...		
(Montagem do nome)		
Format	{0}{1}{2}.BAc	
Text		
{0}	<...>	
{1}	<..0..>	
{2}	<..1..>	
(Salvamento do arquivo)		
Filename		
Number of columns	2	
Column delimiter	Tab	
Decimal separator	.	
File mode	Overwrite	
Remarks		
Write column headers	No	
Column 1	Potential applied (V)	
Column 2	WE(1).δ.Current (A)	
<..>		
Tratamento Octave		
(Montagem do comando para e...		
Format	{0} "{1}"	
Text		
{0}	<...>	
{1}	<...>	
(Chamada do Octave)		
.NET assembly file	C:\Program Files\Metrohm...	
.NET class name	StaticVBModule.StaticVBM...	
.NET method name	Int32 RunExternalExe(Syste...	
ExecutableName		
Wait	True	
ReturnValue	0	
<..>		
Importação dos dados obtidos pelo...		
Curvas		
(Montagem do nome)		
Format	{0}{1}{2}.cBAc	
Text		
{0}	<...>	
{1}	<..0..>	

Commands	Parameters	Links
{2}	<..1..>	
(Salvamento do arquivo)		
Filename		
Number of columns	5	
Column delimiter	Space	
Decimal separator	.	
Number of rows to skip	0	
Potential	<..array..> (V)	
Norm i	<..array..>	
Baseline	<..array..>	
Guessed Peaks	<..array..>	
Weights	<..array..>	
Index	<..array..>	
<..>		
Parâmetros Escalares		
(Montagem do Nome)		
Format	{0}{1}{2}.rBAc	
Text		
{0}	<...>	
{1}	<..0..>	
{2}	<..1..>	
(Salvamento do Arquivo)		
Filename		
Number of columns	1	
Column delimiter	Space	
Decimal separator	.	
Number of rows to skip	0	
Parameters	<..array..>	
Index	<..array..>	
<..>		
Gráficos com dados tratados		
Corrente Normalizada		
X	Potential (V)	
Y	Norm i	
Z	<..empty..>	
Show during measurement	Yes	
Measurement plot number	2	
Linha base		
X	Potential (V)	
Y	Baseline	
Z	<..empty..>	
Show during measurement	Yes	
Measurement plot number	2	
<..>		
<..>		
(Desligamento da Célula)	Off	
<..>		
<..>		

SCRIPT Conv_CC3D.m

```

%% ConvCC3D.m
%% Lê dads de Cronocoulometria 3D do NOVA (já carregado nas variá-
veis)
%% Extrai dados (tempo, potencial, carga) em valores da Crono3D
%% SEM CORREÇÃO DE DERIVA DO INTEGRADOR (já realizada pelo NOVA)
%% Linearização do tempo
%% Extrapola dados linearizados para tempo zero e infinito
%%
%%
%% [cc3d_raw cc3d_transf] = CC3Dnew(raw_data)
%% PARÂMETROS DE SAÍDA:
%%     cc3d_transf : Dados tridimensionas com extrapolação de tem-
po
%%     being cc3d.raw : Dados 3D sem extrapolações
%%
%% PARÂMETROS DE ENTRADA
%%     raw_data : Dados exportados pelo NOVA
%%

function [cc3d_raw cc3d_transf] = CC3Dnew(raw_data)

%% Variáveis
%%     t           Tempo
%%     E           Potencial
%%     Q           Carga
%%     K           Constantes para correções/extrapolações
%%     R           Cell Ranges

DataSize = zeros(length(raw_data), 1); % Tamanho do vetor de dados

E.start    = -0.45;
E.step     = -0.01;

Q.raw      = DataSize; % Carga (soma dos estágios individuais de
cada cronocoulograma)
t.raw      = DataSize; % Tempo (para cada cronocoulograma)
E.raw      = DataSize; % Potencial (degrau de potencial para
cada cronocoulograma)

Q.correct = DataSize; % Carga corrigida de deriva
t.transf = []; % Tempo linearizado (raiz(t) na etapa de ida, theta
+ sqrt(thau) na volta)

t.thau     = 0.112; % Intervalo de tempo (mínimo) no qual ocorre a
mudança de potencial

```

```

t.cc = 0.01; % Intervalo de tempo (mínimo) entre crolocoulogramas
t.ch = 0.003; % Tempo entre cada mudança dentro do cronocoulograma
de duplo potencial

% Outros descritores:
% he relacionado a extrapolação para o infinito
% le relacionado a extrapolação para zero

% Valores iniciais
t.raw(1) = 0;
E.raw(1) = E.start;
Q.raw(1) = raw_data(1, 2);

    for n = [2: length(raw_data)];
        if (raw_data(n, 1) - raw_data(n-1, 1) > t.cc)
            t.raw(n) = 0;
            E.raw(n) = E.raw(n-1) + E.step;
            Q.raw(n) = raw_data(n, 2);
        elseif (raw_data(n, 1) - raw_data(n-1, 1) > t.ch)
            t.raw(n) = t.raw(n-1) + raw_data(n, 1) -
raw_data(n-1, 1);
            E.raw(n) = E.raw(n-1);
            Q.raw(n) = raw_data(n, 2) + Q.raw(n-1);
        else
            t.raw(n) = t.raw(n-1) + raw_data(n, 1) -
raw_data(n-1, 1);
            E.raw(n) = E.raw(n-1);
            Q.raw(n) = raw_data(n, 2) - raw_data(n-1, 2) + Q.-
raw(n-1);
        endif
    endfor

% Zerar tempo para cada sequência (guia de tempo)
E.raw(find(t.raw==0)) = [];
Q.raw(find(t.raw==0)) = [];
t.raw(find(t.raw==0)) = [];

% Salvando arquivo sem transformação
cc3d_raw = [t.raw, E.raw, Q.raw];

% Transformação de tempo
for n = [1: length(t.raw)]
    if (t.raw(n) < t.thau)
        t.transf(n) = t.raw(n) ^ (1 / 2); % ida
    else
        t.transf(n) = 2 * t.thau^(1/2) + (t.raw(n) - t.-
thau)^(1/2) - t.raw(n)^(1/2); % volta
    endif
endfor

```

```

endfor

t.transf = t.transf';

% Extrapolação de valores

for n = sort(unique(E.raw), "descend")';

    % Extrapolação a zero (primeira etapa)
    R.fe = intersect(find(E.raw == n), find(t.raw < .
01));
    K.fe = polyfit(t.transf(R.fe), Q.raw(R.fe), 1);
    t.fe = [0: .005: sqrt(.005)]';
    Q.fe = t.fe * K.fe(1) + K.fe(2);
    E.fe = ones(1, length(t.fe))';

    % Extrapolação a infinito (segunda etapa)
    R.he = intersect(find(E.raw == n), ...
        intersect(find(t.raw > max(t.raw) * 2 / 3), ...
            find(t.raw < max(t.raw))));
    K.he = polyfit(t.transf(R.he), Q.raw(R.he), 1);

    t.he = linspace(max(t.transf(find(E.raw == n))) + .001, 2 *
sqrt(t.thau), 10)';
    Q.he = t.he * K.he(1) + K.he(2);
    E.he = ones(1, length(t.he))';

    % Extrapolation a zero (segunda etapa)
    R.le = intersect(find(E.raw == n), ...
        intersect(find(t.raw > t.-
thau), ...
            find(t.raw < t.thau
+ .01)));
    K.le = polyfit(t.transf(R.le), Q.raw(R.le), 1);
    t.le = [sqrt(t.thau): 0.005: 0.38]';
    Q.le = t.le * K.le(1) + K.le(2);
    E.le = ones(1, length(t.le))';

% Composição da matriz de dados

```

```

        t.transf = cat(1, t.transf, t.fe, t.le, t.he);
        E.raw    = cat(1, E.raw, E.fe *
n, E.le * n, E.he * n);
        Q.raw    = cat(1, Q.raw, Q.fe, Q.le, Q.he);

        clear R t.fe t.he t.le Q.fe Q.he Q.le E.fe E.he
E.le;
    endfor

    % Salvando arquivo com transformação de tempo
    cc3d_transf = [t.transf, E.raw, Q.raw];

end

%%      *_*_*_*_*_*_*_*      FIM DO SCRIPT      *_*_*_*_*_*_*_*

```

Procedimento para Cronocoulometria Tridimensional no NOVA

Commands	Parameters	Links
CC3D 10/01/14		
Remarks	CC3D com mudanç...	
End status Autolab		
Signal sampler	Time, WE(1).Current	
Options	No Options	
Instrument		
Instrument description		
± Determinar Escala Baixa		
▢ Nested procedure		
▢ Autolab control		
WE(1).Mode	Potentiostatic	
WE(1).Bandwidth	High speed	
Integrator(1).Dischar...	On	
Integrator(1).Drift	0	
▢ Wait time (s)	1	
Duration (s)	1	
▢ Autolab control		
Integrator(1).Dischar...	Off	
Integrator(1).Integrat...	10 ms	
▢ Ca0	[1, 1]	
Number of repeats	1	
Total duration (s)	1	
Estimated number of...	1000	
Signal sampler	Time, WE(1).Curre...	
Corrected time	<..array..> (s)	
Level	<..array..>	
Time	<..array..> (s)	
WE(1).Current	<..array..> (A)	
Integrator(1).Charge	<..array..> (C)	
Index	<..array..>	
▢ Q vs t		
X	Time (s)	
Y	Integrator(1).Charge (C)	
Z	Index	
Show during me...	Yes	
Measurement pl...	1	
▢ Regression	[Linear]	
Graphical settings		
Input X	Corrected time (s)	
Input Y	Integrator(1).Charge (C)	
Regression type	Linear	
Polynomial order	1	
Number of signifi...	5	
Direction	All	
Start X	Not used	
End X	Not used	
a	0	
b	0	
1/Slope	0	
<..>		
▢ Determinar Escala Alta		
WE(1).Current range	100 μ A	

Commands	Parameters	Links
Nested procedure		
Autolab control		
WE(1).Mode	Potentiostatic	
WE(1).Bandwidth	High speed	
Integrator(1).Dischar...	On	
Integrator(1).Drift	0	
Wait time (s)	1	
Duration (s)	1	
Autolab control		
Integrator(1).Dischar...	Off	
Integrator(1).Integrat...	10 ms	
Ca0	[1, 1]	
Number of repeats	1	
Total duration (s)	1	
Estimated number of...	1000	
Signal sampler	Time, WE(1).Curre...	
Corrected time	<..array..> (s)	
Level	<..array..>	
Time	<..array..> (s)	
WE(1).Current	<..array..> (A)	
Integrator(1).Charge	<..array..> (C)	
Index	<..array..>	
Q vs t		
X	Time (s)	
Y	Integrator(1).Charge (C)	
Z	Index	
Show during me...	Yes	
Measurement pl...	1	
Regression	[Linear]	
Graphical settings		
Input X	Corrected time (s)	
Input Y	Integrator(1).Charge (C)	
Regression type	Linear	
Polynomial order	1	
Number of signifi...	5	
Direction	All	
Start X	Not used	
End X	Not used	
a	0	
b	0	
1/Slope	0	
<..>		
Purga	600	
Duration (s)	600	
Nova Gota		
MDE(1).Number of new...	5	
Potencial Inicial	-0.450	
Potential (V)	-0.450	
Ligar Potenciostato	On	
WE(1).Cell	On	
Tempo de estabilização	3	
Duration (s)	3	

Commands	Parameters	Links		
Potencial Degrau	-0.45; -0.46; -0.47; -...			
Number of repetitions	21			
Parameter link	-0.45			
Cronocoulometria				
Escala Alta (Regene...				
WE(1).Mode	Potentiostatic			
WE(1).Bandwidth	High speed			
Integrator(1).Dis...	On			
WE(1).Current ra...	100 μ A			
Ativar Integrador				
Integrator(1).Dis...	Off			
Integrator(1).Inte...	10 ms			
Integrator(1).Drift	0			
Potencial Degrau	-0.450			
Potential (V)	-0.450			
Ca	[1, .01]			
Number of repea...	1			
Total duration (s)	.01			
Estimated numb...	5			
Signal sampler	Time, WE(1).Curre...			
Corrected time	<..array..> (s)			
Level	<..array..>			
Time	<..array..> (s)			
WE(1).Current	<..array..> (A)			
Integrator(1).Ch...	<..array..> (C)			
Index	<..array..>			
Q vs t				
X	Time (s)			
Y	Integrator(1).Charge (C)			
Z	Index			
Show during...	Yes			
Measuremen...	1			
Escala Baixa (Regen...				
WE(1).Mode	Potentiostatic			
WE(1).Bandwidth	High speed			
Integrator(1).Dis...	On			
WE(1).Current ra...	1 μ A			
Ativar Integrador				
Integrator(1).Dis...	Off			
Integrator(1).Inte...	10 ms			
Integrator(1).Drift	0			
Cb	[1, .08]			
Number of repea...	1			
Total duration (s)	.08			
Estimated numb...	42			
Signal sampler	Time, WE(1).Curre...			
Corrected time	<..array..> (s)			
Level	<..array..>			
Time	<..array..> (s)			
WE(1).Current	<..array..> (A)			
Integrator(1).Ch...	<..array..> (C)			
Index	<..array..>			

Commands	Parameters	Links
Q vs t		
X	Time (s)	
Y	Integrator(1).Charge (C)	
Z	Index	
Show during...	Yes	
Measuremen...	1	
Escala Alta (Regene...		
WE(1).Mode	Potentiostatic	
WE(1).Bandwidth	High speed	
Integrator(1).Dis...	On	
WE(1).Current ra...	100 μ A	
Ativar Integrador		
Integrator(1).Dis...	Off	
Integrator(1).Inte...	10 ms	
Integrator(1).Drift	0	
Cc1	[1, .01]	
Number of repea...	1	
Total duration (s)	.01	
Estimated numb...	5	
Signal sampler	Time, WE(1).Curre...	
Corrected time	<..array..> (s)	
Level	<..array..>	
Time	<..array..> (s)	
WE(1).Current	<..array..> (A)	
Integrator(1).Ch...	<..array..> (C)	
Index	<..array..>	
Q vs t		
X	Time (s)	
Y	Integrator(1).Charge (C)	
Z	Index	
Show during...	Yes	
Measuremen...	1	
Potencial Inicial	-0.450	
Potential (V)	-0.450	
Cc2	[1, .01]	
Number of repea...	1	
Total duration (s)	.01	
Estimated numb...	5	
Signal sampler	Time, WE(1).Curre...	
Corrected time	<..array..> (s)	
Level	<..array..>	
Time	<..array..> (s)	
WE(1).Current	<..array..> (A)	
Integrator(1).Ch...	<..array..> (C)	
Index	<..array..>	
Q vs t		
X	Time (s)	
Y	Integrator(1).Charge (C)	
Z	Index	
Show during...	Yes	
Measuremen...	1	
Escala Baixa (Regen...		

Commands		Parameters	Links
WE(1).Mode	Potentiostatic		
WE(1).Bandwidth	High speed		
Integrator(1).Dis...	On		
WE(1).Current ra...	1 μ A		
Ativar Integrador			
Integrator(1).Dis...	Off		
Integrator(1).Inte...	10 ms		
Integrator(1).Drift	0		
Cd	[1, .09]		
Number of repea...	1		
Total duration (s)	.09		
Estimated numb...	47		
Signal sampler	Time, WE(1).Curre...		
Corrected time	<..array..> (s)		
Level	<..array..>		
Time	<..array..> (s)		
WE(1).Current	<..array..> (A)		
Integrator(1).Ch...	<..array..> (C)		
Index	<..array..>		
Q vs t			
X	Time (s)		
Y	Integrator(1).Charge (C)		
Z	Index		
Show during...	Yes		
Measuremen...	1		
<..>			
<..>			
Set cell	Off		
WE(1).Cell	Off		
<..>			

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Guilherme Lopes Batista
Data de Nascimento: 03/06/1985
Nacionalidade: Brasileiro

2. EDUCAÇÃO

Ensino médio: Colégio Objetivo (Unidade Paulista), São Paulo, Brasil, 2003.

Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP-SP), São Paulo, Brasil, 2007.

Mestrado em Química, Área de Concentração Química Analítica, Universidade de São Paulo (USP-SP), São Paulo, 2010.

3. OCUPAÇÃO

Bolsista de Iniciação Científica, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), julho/2005-junho/2006. Orientação: Liliana Marzorati.

Estagiário, SABESP (ETE Barueri), julho/2006-fevereiro/2007.

Bolsista de Mestrado, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Março/2008-Fevereiro/2010. Orientação: Ivano G. R. Gutz.

Estagiário, Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – USP, Química Analítica Instrumental, Fevereiro/2009-Junho/2009.

Bolsista de Doutorado, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Novembro/2010-Outubro/2014. Orientação: Ivano G. R. Gutz.

Estagiário, Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – USP, Química Analítica Instrumental, Fevereiro/2015-Junho/2015.

4. PUBLICAÇÕES (Artigos completos e resumos em congressos)

Santos, A.P., Batista, G.L., Cardoso Filho, J.E.P., Marzorati, L., Wladislaw, B., Vitta, C., “Reações de substituição nucleofílica no aduto cloranil-ciclopentadieno, 30^a Reunião Anual da SBQ – 2007

Batista, G.L., Gutz, I.G.R., Braga, F.G.M., Bacal, F., “Desenvolvimento de método prático para análise de acetona em ar exalado por pacientes de insuficiência Cardíaca”, 15^o Encontro Nacional de Química Analítica, Salvador, BA, 2009.

Marcondes-Braga, F.G., Bacal F., Batista G.L., Saldiva P., Ayub-Ferreira, S.M., Issa, V., Mangini, S., Bocchi, E., Gutz, I.G.R., “Exhaled Acetone as a new biomarker for heart failure severity”, 60th Annual Scientific Session and Expo of the American-College-of-Cardiology, New Orleans, LA, 2011

Marcondes-Braga, F.G., Bacal F., Batista G.L., Saldiva P., Ayub-Ferreira, S.M., Issa, V., Mangini, S., Bocchi, E., Gutz, I.G.R., “Exhaled Acetone as a new biomarker for heart failure diagnosis and short-term prognosis”, *European Heart Journal*, 32, 1089-1089, Supl. 1., 2011

Batista G.L., Lopes F.S., Coelho, L.H.G., Gutz I.G.R., “Propulsores para sistemas amperométricos em fluxo: comparação e tratamento de sinais por FFT”, 16º Encontro Nacional de Química Analítica, Campos do Jordão, São Paulo, 2011.

Marcondes-Braga, F. G Bacal F., Batista G.L., Saldiva P., Ayub-Ferreira, S.M., Issa, V., Mangini, S., Bocchi, E., Gutz, I.G.R., “Exhaled Acetone as a New Biomarker of Heart Failure Severity”. *CHEST J.* **142**, 457–66 (2012).

Bacal, F., Braga, F.G.M., Gutz, I.G.R., Batista, G.L., “Non-invasive Method for Diagnosing the Severity of Heart Failure, Use of a Biomarker for Diagnosing Decompensated Heart Failure, Collector Device for the Heart Failure Biomarker from Exhaled Breath and a Diagnosis Kit”, US8747325 B2, United States Patent and Trademark Office (USPTO – Department of Commerce), publicada em 10 de Julho De 2014.

Garcia, C. C. M., Batista G.L., Freitas, F.P., Lopes F.S., Sanchez A.B., Gutz I.G.R., Mascio P.D., Medeiros, M.H.G., Quantification of DNA adducts in lungs, liver and brain of rats exposed to acetaldehyde. *Free Radic. Biol. Med.* **75 Suppl 1**, S41 (2014).

Batista G.L., Gutz I.G.R., “Análise de Acetona em ar exalado por absorção em fase líquida, derivatização e determinação por onda quadrada”, XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Uberlândia, MG, 2015.

5. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Medalha de Bronze, Olimpíada de Química do Estado de São Paulo para estudantes do ensino médio, 2001.

Prêmio Lavoisier, concedido pelo CRQ-IV, por melhor aluno do curso de bacharelado com atribuições tecnológicas, Setembro 2007.

Marcondes-Braga F.G., Bacal F., Gutz I.G.R., Batista G.L., Olimpíada USP de Inovação 2011, 2º Colocado (Tecnologias da Saúde e Biológicas).