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

RAFAEL SILVA RINCO

# Aperfeiçoamento de métodos de determinação de acetona para análise em ar exalado

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
**24/06/2019**

RAFAEL SILVA RINCO

# Aperfeiçoamento de métodos de determinação de acetona para análise em ar exalado

*Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Química*

*Orientador: Prof. Dr. Ivano Gebhardt Rolf Gutz*

SÃO PAULO

2019

**Aos meus avós,**

**Antônio (in memoriam) e Inês,**

**e Roberto e Oneida (in memoriam).**

## AGRADECIMENTOS

Como é bom saber que todo o nosso esforço valeu a pena!

Por esse trabalho e mais essa etapa na minha vida, pessoal e acadêmica, quero agradecer primeiramente a Deus, que em sua infinita graça me permitiu e deu forças, ânimo e saúde para que eu conseguisse dar mais esse pequeno, mas significativo passo em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Rogério e Sandra, que sempre acreditaram em mim e foram os maiores exemplos de honestidade, inteligência e dedicação para mim. Meu pai, sempre gosto de lembrar isso, que desde que eu era pequeno me ensinou e plantou em mim a vontade de querer saber como as coisas funcionavam e sempre teve paciência quando eu queria abrir os objetos de casa. A minha mãe, que sempre com muito carinho me incentivou, confiou e me deu aquela injeção de ânimo para seguir na direção dos meus objetivos.

Agradeço ao meu orientador, prof. Ivano Gutz, que sempre com muita dedicação e bom humor proporcionou ótimas sugestões e valiosas reflexões que contribuíram ricamente aos meus trabalhos.

Agradeço ao meu ex-professor, hoje amigo, Éder Gonçalves, que com sua amizade, paciência e confiança, me incentivou antes e durante o mestrado, sempre disposto a ajudar e ensinar de maneira exemplar sempre que necessário. Coragem!

Agradeço às Faculdades Oswaldo Cruz, instituição pela qual sou graduado, por ter formado com excelência a base de todo conhecimento que adquiri. A todos os mestres que participaram desta etapa de minha formação, o meu muito obrigado!

Um agradecimento especial a todos os amigos que fiz durante o mestrado, são tantas pessoas que passaram em minha vida neste período que é até difícil enumerar todas de maneira justa. Agradeço aos amigos que fiz no Laboratório de Automação e Instrumentação da Universidade de São Paulo (LAIA-USP), onde desenvolvi meu mestrado, agradeço a todos! Obrigado por todos os bons momentos e risadas que passamos juntos!

Faço um agradecimento especial à minha querida namorada Heloise, por seu carinho e por estar ao meu lado, sempre disposta e solícita a me ajudar todas as vezes que precisei.

Agradeço ao meu amigo Marcos, que apesar de estar longe, tenho sempre boas recordações de nossos tempos de faculdade.

Agradeço aos meus amigos Leonardo e Marco Aurélio, que apesar de hoje em dia nos vermos pouco, sempre lembro com carinho dos nossos tempos de colégio.

Agradeço ao Guilherme Batista (Splinter), meu antecessor no projeto, e aos integrantes do INCOR-FM-USP: Fabiana e prof. Fernando Bacal, aqueles que deram início a esse projeto.

Agradeço também ao CNPq pela bolsa concedida.

Meu muito obrigado a todos!

# RESUMO

RINCO, R. S. **Aperfeiçoamento de métodos de determinação de acetona para análise de ar exalado**. 2019. 88 p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A relevância da análise de acetona do ar exalado vem aumentando como biomarcador não-invasivo e alternativo de doenças como diabetes e, mais recentemente, insuficiência cardíaca (IC), em decorrência da colaboração entre pesquisadores do IQ-USP e do INCOR-FM-USP. Os trabalhos descritos nesta dissertação se situam no que diz respeito ao aprimoramento do procedimento já bem estabelecido, que foi empregado na colaboração entre o IQ-USP e o INCOR-FM-USP, para determinação espectrofotométrica de acetona em ar exalado, baseada na reação entre a acetona e o salicilaldeído em meio fortemente alcalino. As atividades foram desenvolvidas de modo a se obter os resultados de maneira rápida e confiável. Inicialmente, foi feita uma revisão do comprimento de onda utilizado na determinação. Para isso, foram registrados espectros de absorção UV/Vis do produto colorido da reação em diversas concentrações de acetona, para algumas condições (exposição ou não à luz, algumas mudanças de proporção entre solução reagente e solução contendo acetona, além do aquecimento), e foi analisado, em função do comprimento de onda, o coeficiente angular da curva de calibração, o coeficiente linear e a razão entre os dois coeficientes. Posteriormente, foi avaliado o comportamento da reação quando modificadas as temperaturas durante o aquecimento, as diversas proporções reagente/solução contendo acetona, além da adição extra de hidróxido de sódio, a fim de se reduzir o tempo de determinação. Após terem sido definidos quais parâmetros deveriam ser alterados e como, o método modificado foi aplicado a uma série de amostras reais, coletadas no hospital por colaboradores.



**PALAVRAS-CHAVE:** Acetona. Espectrofotometria. Insuficiência Cardíaca. Ar exalado.

# ABSTRACT

RINCO, R. S. **Improvement of methods of acetone analysis in exhaled air**. 2019. 88 p. Master's Dissertation – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Exhaled breath acetone (EBA) is gaining relevance as an alternative noninvasive biomarker of diseases like diabetes and, more recently, also of heart failure (HF), thanks to contributions of joint work of researchers from IQ-USP and INCOR-FM-USP. This dissertation is about improvements that have been made in the spectrophotometric method of acetone determination aiming to speed up and improve the reliability of the methodology for EBA analysis that is routinely used in the IQ/INCOR collaboration. The method is based on the reaction between acetone and salicylaldehyde in strong alkaline medium. All activities have been developed in order to get results quickly and reliably. First of all, the determination wavelength has been revised. In order to do that, some UV/Vis absorption spectra of the colored reagent and product were recorded, at many acetone concentrations, for some conditions (such as light exposure or not, variations of reagent/acetone solution proportion and heating vials containing reactive medium). After that, slope of analytical curve, intercept and slope/intercept quotient were plotted as a function of wavelength. Posteriorly, reaction kinetics were tested, also in some conditions (such as heating in many temperatures, variations of reagent/acetone solution proportion and extra addition of sodium hydroxide) in order to reduce determination time. Finally, after being defined some aspects of the procedure to be changed, that changes were applied to the determination of acetone in some real samples, collected by coworkers in the hospital.



**KEYWORDS:** Acetone. Spectrophotometry. Heart Failure. Exhaled Breath.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ..... 9

1.1 Ar exalado ..... 9

1.2 Acetona exalada ..... 13

1.3 Métodos de amostragem de ar exalado ..... 16

1.4 Métodos de determinação ..... 21

2 OBJETIVOS ..... 28

3 MATERIAIS E MÉTODOS ..... 29

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 33

4.1 Determinação de acetona ..... 33

4.1.1 Escolha do comprimento de onda e normalização de espectros ..... 33

4.1.2 Avaliação da proporção volumétrica entre solução reagente/acetona ..... 43

4.1.3 Avaliação da utilização de reagente envelhecido ..... 46

4.1.4 Interferência da exposição à luz na reação ..... 50

4.1.5 Avaliação cinética da reação ..... 53

4.1.6 Avaliação da conservação do reagente ..... 70

4.1.7 Aplicação a amostras reais ..... 72

4.1.8 Método aperfeiçoado – procedimento ..... 77

5 CONCLUSÃO ..... 80

6 BIBLIOGRAFIA ..... 83

# 1 INTRODUÇÃO

Nesta seção são abordados brevemente aspectos relevantes ao entendimento da dissertação, a começar pela análise de ar exalado para fins de diagnóstico não invasivo de doenças. O enfoque principal é dado à análise de acetona exalada como biomarcador de insuficiência cardíaca, sendo apresentadas técnicas e métodos analíticos típicos para sua amostragem e determinação.

## 1.1 Ar exalado

A detecção de compostos oriundos do ar exalado é uma técnica empregada há séculos para o diagnóstico de determinadas doenças. Hipócrates, pai da Medicina, correlacionava o odor do hálito de seus pacientes a doenças como diabetes, abscesso no pulmão e problemas hepáticos e renais.

No ar exalado, estão presentes muitas espécies químicas, sendo que algumas estão em maior quantidade, como é o caso de gases inalados do ar atmosférico (oxigênio, nitrogênio, argônio, etc.), compostos provenientes do metabolismo (principalmente o dióxido de carbono) e vapor de água evaporado dos pulmões e das vias respiratórias. Já outras espécies estão presentes em menor quantidade, principalmente espécies orgânicas voláteis.

Durante a respiração, componentes do ar podem tanto ser incorporados, sofrendo ou não transformações no organismo, isto é, ser absorvidos ou consumidos em menor ou maior escala, quanto podem ser exalados novamente ao ambiente, ao mesmo tempo que novos componentes voláteis transportados pelo sangue e originados por processos

metabólicos são adicionados ao ar exalado.

O processo respiratório consiste em duas etapas, a inspiração (entrada de ar atmosférico nas vias respiratórias) e a expiração (saída do ar que estava nas vias respiratórias). A cada ciclo de entrada e saída do ar dos pulmões humanos, cuja capacidade média é de 5 L para um adulto saudável, aproximadamente 0,50 L de ar são expirados na condição de repouso. Desse volume, por volta de 0,15 L iniciais provém das vias aéreas preenchidas ("volume morto", pouco alterado), e o restante (0,35 L), do pulmão, apresentando maiores alterações, vez que já participou das trocas gasosas. (VAN DEN VELDE et al., 2007)

A **Figura 1** esquematiza o processo de trocas gasosas durante o processo de respiração.

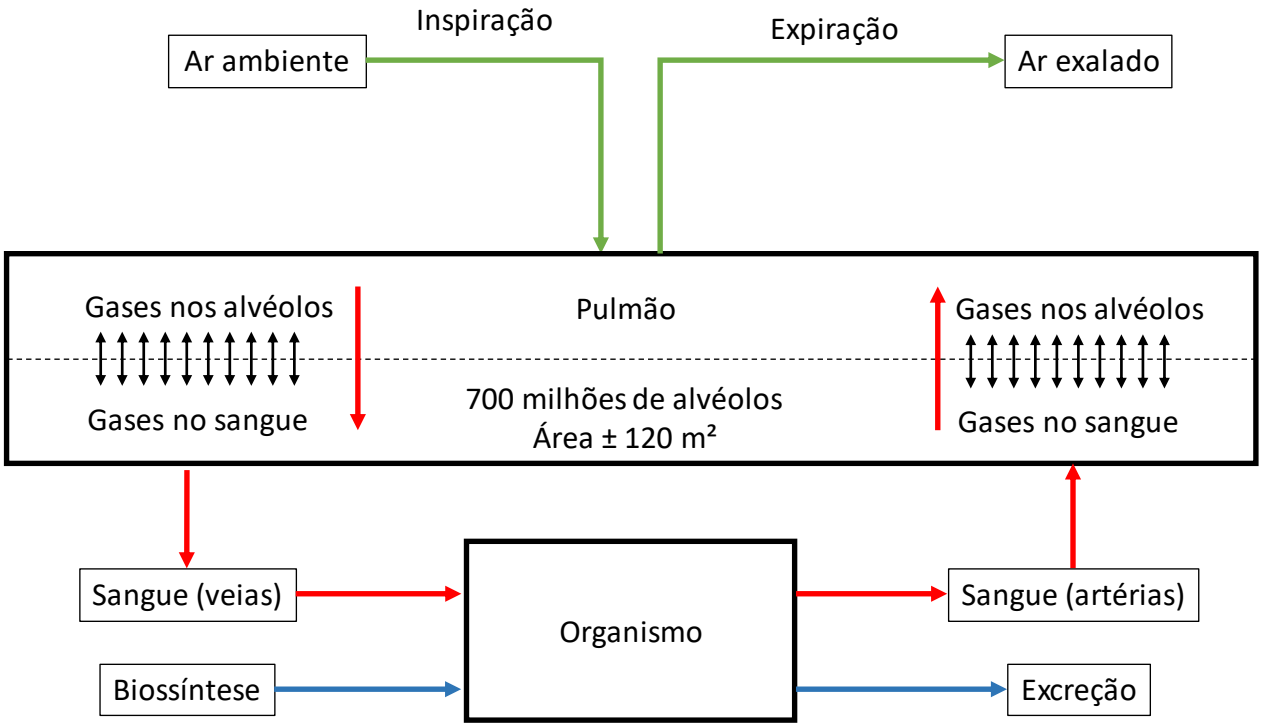


***Figura 1:*** *Caminho que o ar percorre dentro do organismo desde entrada pelas vias respiratórias, durante o processo de inspiração. (Adaptado de: MARCONDES-BRAGA et al., 2016)*

As trocas gasosas ocorrem nos alvéolos pulmonares, membranas muito finas que permitem a passagem (distribuição) de espécies gasosas, seja do ar para o sangue, seja de espécies voláteis, dissolvidas no sangue, para o ar, sem que, necessariamente, haja tempo suficiente para estabelecimento de equilíbrio, ditado pelas constantes de Henry de cada componente.

Alguns trabalhos apontam para aproximadamente 3500 espécies (PRABHAKAR; TAO, 2013), quando incluídas espécies detectáveis em concentrações da ordem de ppbv (partes por bilhão em volume) ou mesmo pptv. Algumas delas tem sido associadas a condições alteradas do organismo, conforme mostra a **Tabela 1**.

***Tabela 1:*** *Correlação entre espécies químicas encontradas no ar exalado e algumas prováveis causas. (Extraído de: VAN DEN VELDE et al., 2007)*

| Espécies encontradas | Provável correlação |
|---|---|
| Sulfeto de hidrogênio, metil mercaptana, dimetilsulfeto e dimetildissulfeto | Halitose |
| Acetona | Diabetes mellitus, perda de peso, dentre outros |
| Dimetilamina, trimetilamina, amônia | Falência renal |
| Dimetilsulfeto, etanotiol, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido isovalérico | Doenças hepáticas |
| Acetona, 2-butanona, 1-propanol, anilina, o-toluidina | Câncer no pulmão |
| Trimetilamina | Trimetilaminúria |
| Alilmetilsulfeto e metilpropilsulfeto | Ingestão de alho ou cebola |

A **Tabela 2** relaciona algumas espécies voláteis encontradas no ar exalado, sua respectiva origem metabólica e aplicação clínica em potencial.

***Tabela 2:*** *Correlação entre algumas espécies voláteis encontradas no ar exalado, sua origem metabólica e eventuais aplicações clínicas. (Adaptado de: PRABHAKAR; TAO, 2013)*

| Espécie química | Origem metabólica | Aplicação clínica em potencial |
|---|---|---|
| **Acetaldeído** | Metabolismo do etanol | Monitoramento do metabolismo do etanol ou estresse oxidativo |
| **Acetona** | Descarboxilação do acetoacetato ou desidrogenação do isopropanol | Monitoramento de diabetes e da perda de peso |
| **Acetonitrila** | Absorção por contato com fumaça de cigarro | Monitoramento do comportamento fumante |
| **Amônia** | Metabolismo proteico | Doenças renais em estágio final |
| **Dimetilsulfeto** | Falência hepática | Monitoramento de danos no fígado |
| **Etano** | Produto da peroxidação lipídica | Monitoramento do estresse oxidativo |
| **Etileno** | Produto da peroxidação lipídica | Monitoramento do estresse oxidativo |
| **Isopreno** | Biossíntese do colesterol | Monitoramento de terapias com estatina |
| **Malondialdeído** | Produto da peroxidação lipídica | Monitoramento do estresse oxidativo |
| **Metano** | Bactérias intestinais | Doenças gastrointestinais |
| **Propionaldeído** | Produto da peroxidação lipídica | Monitoramento do estresse oxidativo |
| **Propofol** | Anestesia intravenosa | Monitoramento de fármacos durante anestesia |
| **Trimetilamina** | Absorção por contato com trimetilamina ou precursor | Monitoramento da eficiência de hemodiálise |

De acordo com Prabhakar e Tao (PRABHAKAR; TAO, 2013), já se encontram aprovados e reconhecidos pelo FDA (*United States Federal Drug Administration*) para monitoramento por análise do ar exalado, o etanol para controle do etanol presente no sangue, óxido nítrico para monitoramento da asma, monóxido de carbono para icterícia neonatal, hidrogênio como indicador do metabolismo de carboidratos, bem como os hidrocarbonetos exalados como evidência de rejeição dos transplantes de órgãos. Também a acetona é aceita e amplamente divulgada como indicadora de diabetes mellitus (WANG; WANG, 2013).

## 1.2 Acetona exalada

Na presente dissertação, o interesse recai sobre a análise de acetona em ar exalado. Trata-se de metabólito cuja produção pode evidenciar diversas condições no organismo, por exemplo: cetoacidose, cetonúria, diabetes descompensada, intoxicação por álcool (até mesmo seu consumo sem exageros pode alterar os níveis de acetona exalada), insuficiência cardíaca, perda de peso, jejum prolongado, dentre outros. A análise de acetona no ar exalado consiste, dessa maneira, em uma forma bastante conveniente de se monitorar tais condições corporais por ser não invasiva e não requerer uma única gota de sangue, causando pouco ou nenhum tipo de desconforto ao paciente.

De acordo com revisão literária feita por Wang e Wang (WANG; WANG, 2013), além da acetona, dois outros “corpos cetônicos” são produzidos no fígado humano, o acetoacetato e o 3-β-hidroxibutirato. A **Figura 2** mostra as estruturas químicas dessas espécies.

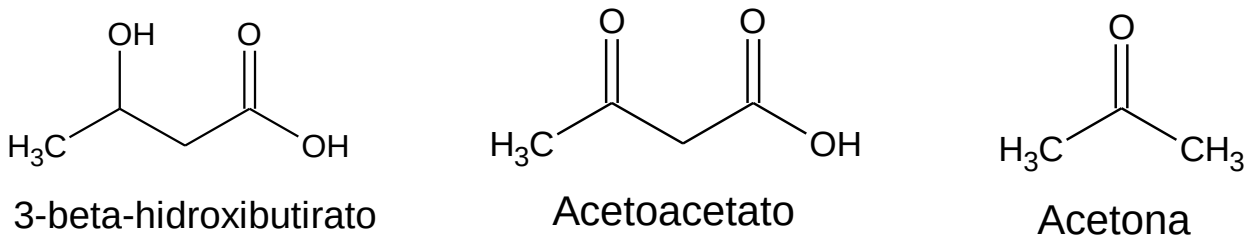


***Figura 2**: Estruturas químicas das três espécies conhecidas como "corpos cetônicos".*

Em geral, a produção metabólica de acetoacetato e 3-β-hidroxibutirato se dá por via hepática, como resultado do metabolismo dos ácidos graxos. A acetona se forma pela descarboxilação do acetoacetato, conforme mostrado na **Figura 3**, ou, ainda, pode ser gerada pela desidrogenação do isopropanol, como já citado anteriormente.

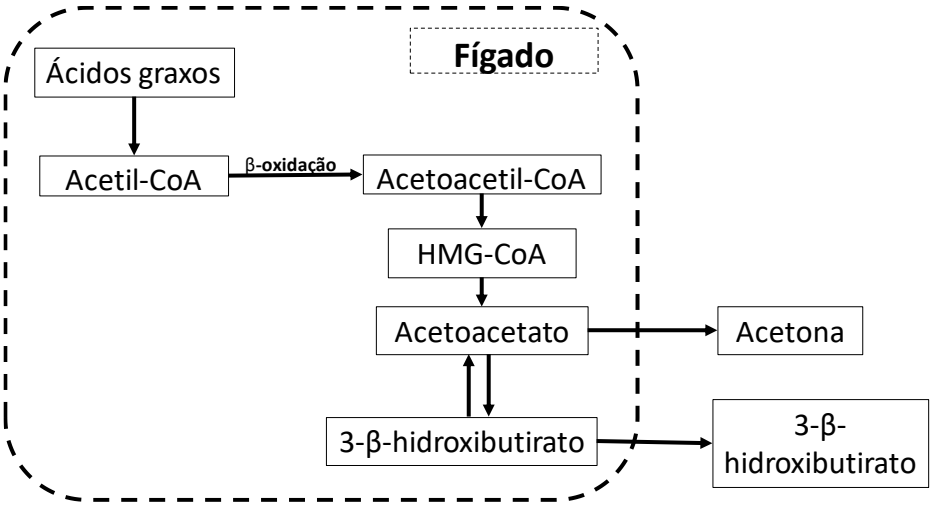


***Figura 3:** Formação de acetona por via hepática através da descarboxilação do acetoacetato. (Adaptado de: WANG; WANG, 2013)*

O prof. Dr. Fernando Bacal, cardiologista do INCOR-FM-USP, observava há tempo odor característico no ar exalado por pacientes com insuficiência cardíaca grave e, por volta de 2007, procurou o IQ-USP para investigá-lo, dando início à colaboração com o grupo do prof. Dr. Ivano Gutz, orientador do presente trabalho de mestrado. Bacal e sua então aluna de doutorado, Fabiana Marcondes, passaram a coletar amostras de ar

exalado dos pacientes, enquanto que Gutz e seu então aluno de mestrado, Guilherme Batista, acabaram identificando a acetona como sendo a espécie química mais relevante, o que os levou desenvolver método simples para coleta, preservação de amostra e determinação analítica de acetona. Estudos sistemáticos do ar exalado por grupos controlados de pacientes do INCOR conduziram à proposição da acetona como biomarcador efetivo para a insuficiência cardíaca em teses, publicações de impacto e em uma patente concedida. (BATISTA, 2010, 2015; MARCONDES-BRAGA, 2012; MARCONDES-BRAGA et al., 2012, 2016). Nesses trabalhos os autores estabeleceram as diferenças entre pacientes saudáveis e acometidos por insuficiência cardíaca (IC) com base em tratamento estatístico de resultados de concentração de acetona em ar exalado por pacientes. Batista, em sua dissertação de mestrado (BATISTA, 2010), em parceria com Braga, que à época desenvolvia sua tese de doutoramento, constataram que a média de concentração da acetona exalada por pessoas saudáveis se situava em torno de 0,4±0,4 μg $L^{-1}$, possuindo máximo de 1,1 μg $L^{-1}$. Pacientes com insuficiência cardíaca descompensada apresentavam acetona exalada em concentração muito maior, subdivididas em faixas diversas de concentração.

Posteriormente, Braga (MARCONDES-BRAGA, 2012) conseguiu, através da análise da curva ROC para diagnóstico da insuficiência cardíaca por meio da acetona exalada, em consonância com dados obtidos para o BNP plasmático (peptídeo natriurético do tipo B), diferenciar graus de avanço da insuficiência cardíaca. Foi constatado que o valor de corte de aproximadamente 1,16 μg $L^{-1}$ da concentração de acetona exalada permite o diagnóstico de IC em aproximadamente 86% dos casos, enquanto que o valor de corte de 2,50 μg $L^{-1}$ permite diagnóstico de aproximadamente 84% dos casos de IC descompensada. Quando considerados simultaneamente, no modelo de regressão

logística, os valores das concentrações de acetona exalada e BNP plasmático, foi possível diagnosticar aproximadamente 95 % dos casos de IC e 92 % dos casos de IC descompensada. Nos mesmos trabalhos, Braga (MARCONDES-BRAGA, 2012) conseguiu diferenciar, utilizando o procedimento desenvolvido em parceria com Batista, diversos grupos de IC através das concentrações de acetona exalada.

## 1.3 Métodos de amostragem de ar exalado

Quando não se dispõe de instrumentação para a análise direta da (s) espécie (s) gasosa (s) de interesse no ar exalado, é necessário coletar o ar exalado. Basicamente existem três maneiras de proceder: coletar de certo volume de fase gasosa, condensar o (s) analito (s) juntamente com a umidade contida no ar exalado ou extraí-lo (s) para uma fase sólida ou líquida pela qual tenham grande afinidade. No caso da acetona, essa etapa ainda é necessária porque os raros dispositivos comerciais ainda não são suficientemente seletivos, sensíveis, portáteis e práticos para fazer a análise direta, sem nenhum tipo de tratamento ou pré-concentração.

A amostragem por coleta de gás se dá de maneira relativamente simples e prática. O mais comum, como mostram os trabalhos de Blaikie e colaboradores (BLAIKIE et al., 2016) e Walton e colaboradores (WALTON et al., 2014), é utilizar um saco plástico com volume definido, provido de um bocal (que pode possuir ainda um dispositivo de retenção de gotículas de saliva e/ou uma válvula de retenção de gás) pelo qual o paciente assopra e o ar é armazenado. Como os polímeros são permeáveis a espécies gasosas, é necessário que o saco plástico seja metalizado (geralmente por uma fina camada de alumínio que é depositada sobre o plástico ou entre camadas do mesmo) de modo

minimizar a perda de analitos por permeação durante o período de tempo entre a coleta e a determinação. Além disso, para impedir que haja algum tipo condensação da umidade na parede do dispositivo, as amostras devem ser armazenadas ou reaquecidas a temperatura controlada, preferencialmente 37ºC.

Existem também os coletores que condensam a umidade presente no ar exalado, retendo ao menos parte dos analitos solúveis. Um dispositivo típico é constituído de um tubo encamisado com material refrigerante, de modo que a parede interna do tubo fica gelada, promovendo a condensação enquanto o paciente assopra no bocal que direciona o ar para dentro do tubo. Ao entrar em contato com superfície gelada do amostrador, o vapor de água presente na amostra se condensa com os analitos, formando pequenas gotas de líquido. A **Figura 4** ilustra um coletor de ar exalado deste tipo.

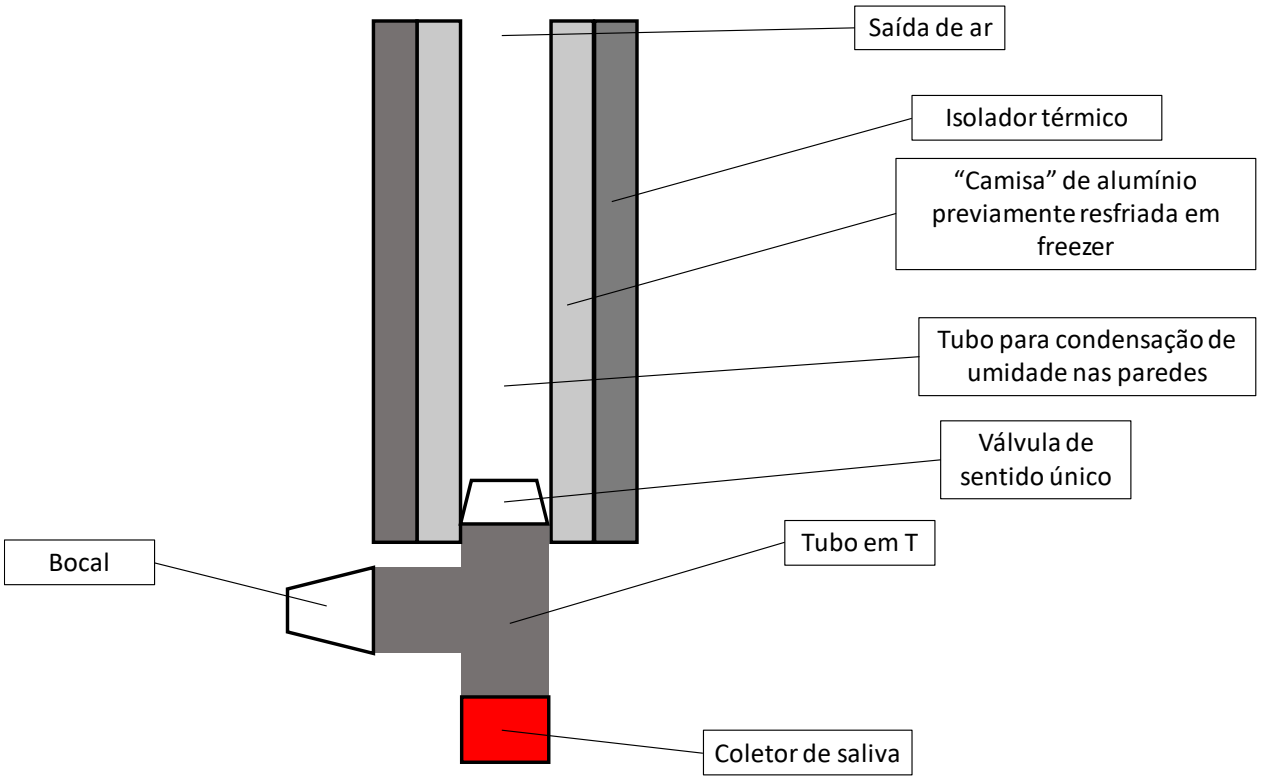


***Figura 4:*** *Esquema de um coletor de ar exalado condensado RTube. (Adaptado de FOX et al., 2013)*

Com o auxílio de um êmbolo, todas essas gotículas ao longo do tubo são reunidas, formando um pequeno volume de solução (por volta de 0,5 a 1 mL) que é mantido em geladeira ou congelado até pouco antes da determinação analítica (FOX et al., 2013; KONSTANTINIDI et al., 2015).

A coleta também pode ser dar por extração ou retenção das espécies presentes no ar exalado em uma fase sólida ou líquida, como ilustrado, por exemplo na **Figura 5**.

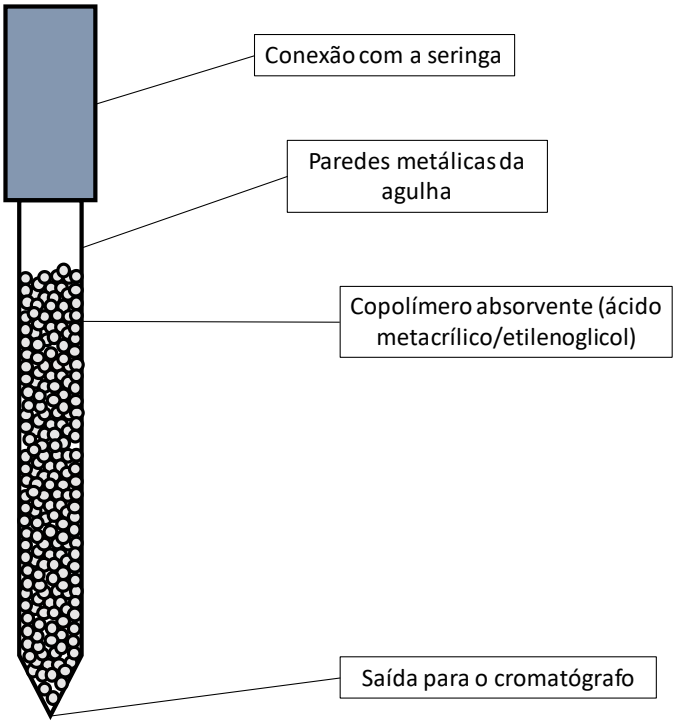


***Figura 5:*** *Esquema do coletor baseado na absorção de acetona exalada por copolímero de ácido metacrilico e etilenoglicol. (Adaptado de: UETA et al., 2009, 2014)*

Os dispositivos de retenção em fase sólida são feitos de cartuchos com sólidos granulados ou porosos cujo material pode absorver ou adsorver as espécies voláteis. Geralmente essa forma de coleta é usada em combinação com a cromatografia gasosa, já que a remoção das espécies retidas na fase sólida é feita por dessorção térmica. O

dispositivo utilizado por Ueta e colaboradores (UETA et al., 2009, 2014) é feito de uma agulha de seringa contendo uma camada de copolímero de ácido metacrílico e etileno glicol que absorve a acetona de maneira reversível, possibilitando posterior separação e quantificação por CG-MS mediante introdução da agulha no injetor pré-aquecido, no qual a acetona volatilizada é transportada para a coluna cromatográfica por um fluxo de nitrogênio.

Já a retenção das espécies em fase líquida se utiliza da partição do analito, que se distribui (conforme o equilíbrio da Lei de Henry) entre as fases gasosa e líquida. De modo a favorecer a partição da acetona na fase líquida, é necessário que a fase líquida esteja gelada. Na colaboração entre o IQ-USP e o INCOR-FM-USP, projeto do qual faz parte esse mestrado, foi desenvolvido, na dissertação de Batista, um frasco borbulhador ou *impinger* resfriado para coleta de acetona do ar exalado pelos pacientes (BATISTA, 2010; MARCONDES-BRAGA et al., 2012, 2016). O paciente borbulha o ar exalado por intermédio de um tubo com dispersor com ponta de vidro sinterizado em um frasco contendo certa quantidade de água, mantida gelada por banho de gelo externo até completar o volume do saco plástico, inicialmente vazio, conectado à saída do *impinger*. A água em que foi dissolvida a acetona (entre outras espécies) é transferida para um recipiente menor e preservada por congelamento até momentos antes da determinação analítica. A **Figura 6** mostra um esquema deste tipo de coletor de acetona.

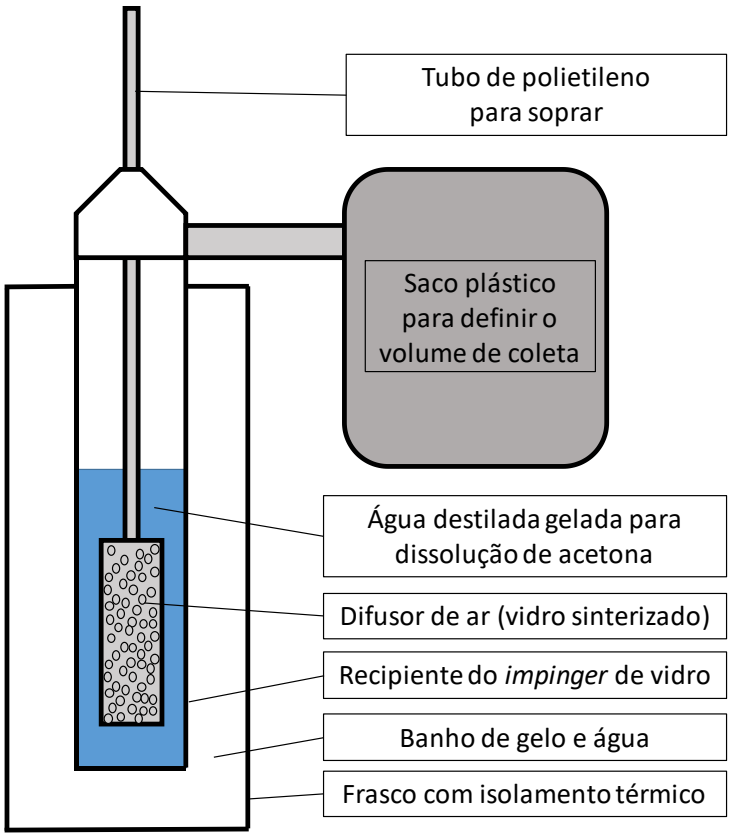


***Figura 6:*** *Esquema do amostrador utilizado na atual colaboração entre IQ-USP e o INCOR-FM-USP. (Adaptado de BATISTA, 2010)*

Teshima e colaboradores (TESHIMA et al., 2005) desenvolveram um equipamento com o qual tanto a coleta quanto a determinação são feitas em fluxo. Numa das formas de operação, o paciente sopra por um bocal e o ar exalado é acumulado num saco plástico aquecido, no qual fica armazenado a 40ºC e de onde é aspirado à vazão de 0,4 L $min^{-1}$ através do coletor durante 3 min em um ciclo de 10 min. No seu interior, o ar exalado passa pelo interstício entre dois tubos concêntricos, sendo o externo feito de poli(metilmetacrilato) e o interno, de membrana microporosa de polipropileno, com água destilada passando pelo seu interior. Em analogia com os alvéolos pulmonares, os poros da membrana permitem trocas entre a fase gasosa e líquida, de forma que uma fração da acetona se dissolve na água. A **Figura 7** mostra um esquema desse tipo de coletor.

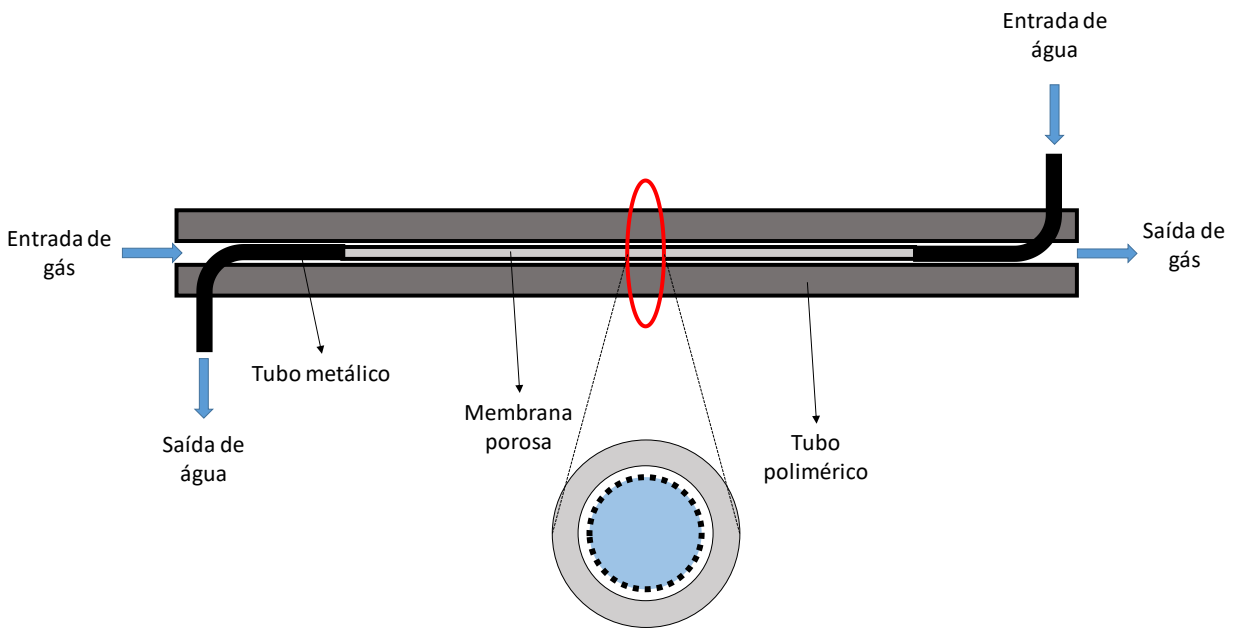


***Figura 7:*** *Esquema do coletor de ar exalado em fluxo utilizando membrana porosa de polipropileno. (Adaptado de TESHIMA et al., 2005)*

A adsorção do analito na parede externa de acrílico (PMMA) do tubo coletor poderia ocasionar perdas de acetona ou efeito de memória, entretanto, como o coletor é mantido a 40 °C, os autores avaliaram que essas perdas podem ser negligenciadas.

## 1.4 Métodos de determinação

Idealmente, a determinação de acetona no ar exalado deveria ser feita em um equipamento portátil, que permitisse a medição quase instantânea, diretamente na fase gasosa, da mesma forma que acontece em um etilômetro (os populares “bafômetros”). Para isso, necessita-se de sensor ou dispositivo compacto que responda com alta sensibilidade e alta especificidade, grande rapidez e boa reversibilidade à acetona, na presença de outras espécies no ar exalado, como amônia, vapor de água, etanol, peróxido de hidrogênio, ácido acético, formaldeído, acetaldeído, dentre outras que podem

causar interferência na medida.

Dadas estas características, os analisadores que parecem mais atraentes são os que se utilizam de sensores catalíticos baseados em óxidos metálicos (APARICIO-MARTÍNEZ et al., 2018; CHUANG et al., 2018; EVANS et al., 2014; LI et al., 2017; RIGHETTONI; AMANN; PRATSINIS, 2015; RIGHETTONI; TRICOLI; PRATSINIS, 2010; RYDOSZ, 2018; WALTON et al., 2014), que conseguem suprir diversos desses aspectos, principalmente no que diz respeito à construção de equipamentos portáteis. No entanto, estes sensores ainda apresentam dois problemas principais: baixa seletividade, respondendo principalmente ao vapor de água e ao etanol e a necessidade de, geralmente, ser necessário aquecimento do elemento sensível a acetona, cuja resistividade ou condutividade é diretamente proporcional à concentração de acetona. Existem propostas de desenvolvimento de sensores que operam à temperatura ambiente e outros que não são influenciados pela umidade do ar, mas que ou ainda não conseguiram alcançar limite de detecção suficientemente baixo (em torno de 0,1 ppmv), ou ainda, apresentam resposta muito maior a outros componentes do ar exalado do que à acetona.

A interferência da acetona na resposta de etilômetros baseados em técnicas como a espectrofotometria de absorção no infravermelho, sensores de estado sólido (óxidos semicondutores) e eletroquímicos (eletrooxidação) foi anteriormente estudada (até a concentração de 600 μg $L^{-1}$)(DUBOWSKI; ESSARY, 1984), visto que boa imunidade é necessária para não falsear o resultado do teor de etanol medido por exemplo, no ar exalado por pessoas diabéticas. A intensidade da interferência varia com a técnica, sendo mínima para os etilômetros eletroquímicos e maior, mas variável de um sensor para outro, para os etilômetros baseados em óxidos semicondutores, sendo que para o exemplar

testado no artigo citado o sinal para acetona corresponde metade do medido para etanol quando ambos estão em igual concentração (em m/V). Essa significativa interferência da acetona nos etilômetros de baixo custo deu origem a vídeos veiculados entre leigos sugerindo sua utilização para estimar a concentração de acetona no ar exalado por pessoas que se submetem a dietas *low carb*, precária e não recomendada, mesmo para voluntários que não ingeriram bebidas alcoólicas por longo período antes do teste. Um dispositivo comercial para praticantes de dietas *low carb*, comercializado em pequena escala sob o nome de Ketonix, apresenta, sabidamente, interferência de etanol (KETONIX, 2016).

Superando todas as técnicas anteriores, destacam-se as cromatográficas, principalmente a cromatografia gasosa, CG, que atingem limites de detecção suficientemente baixos e com possibilidade de análise direta na fase gasosa. Consegue-se quantificação satisfatória com a cromatografia gasosa seguida de detector por ionização em chama, mas, quando possível, prefere-se a detecção por espectrometria de massas, MS, principalmente se o analito não tiver sido identificado previamente (GONG et al., 2014). Além de CG-MS, utiliza-se também a espectrometria de massas diretamente, sem prévia separação cromatográfica, nas modalidades SIFT-MS (WALTON et al., 2014) e PTR-MS (SAASA et al., 2018). Outros métodos cromatográficos para a determinação de aldeídos e cetonas em geral, incluindo a acetona, utilizam a técnica da cromatografia líquida após etapa de derivatização por reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (AKGUL KALKAN et al., 2016).

Contudo, a relativa complexidade e falta de portabilidade destes cromatógrafos, a necessidade de analista especializado e o alto custo tanto dos instrumentos quanto de sua manutenção são fatores que limitam o emprego de tais técnicas, já que nem todas

as instituições possuem recursos para adquirir e/ou manter este tipo de equipamento, instalado, tipicamente, em laboratórios. Cabe acrescentar, no entanto, que há no mercado cromatógrafos a gás portáteis desenvolvidos para aplicações específicas, mas não ainda para monitorar acetona em ar exalado. Serve de exemplo o OralChroma, que separa e quantifica alguns compostos sulfurados voláteis ($H_2S$, metilmercaptana, dimetilsulfeto), relevantes para o diagnóstico de halitose (AWANO et al., 2011).

Competindo com os sofisticados métodos cromatográficos de determinação de acetona mencionados acima, persistem os métodos de quantificação em fase líquida, que abrangem técnicas espectrofotométricas e eletroquímicas (MOTSEGOOD; LEDDY, 2012; WANG; WENG; CHOU, 2007). As técnicas eletroquímicas necessitam de bastante aprimoramento, já que ainda não possuem limite de detecção satisfatório para determinação de acetona. Batista, em sua tese de doutorado, conseguiu atingir limite de detecção satisfatório (0,2 mg $L^{-1}$) utilizando voltametria de onda quadrada em eletrodo de gota de mercúrio e em meio de glicina e hidróxido de sódio, mas somente depois de desenvolver um novo processamento dos sinais via ajuste de curvas de Bézier. Observou que o acetaldeído também forma imina eletroativa passível de redução em potencial próximo, mas suficientemente separado do pico referente à acetona para possibilitar a determinação de ambas as espécies (BATISTA, 2015). Todavia, Batista não alcançou o mesmo limite de detecção requerido para acetona ao avaliar outros materiais de eletrodo, inclusive amálgamas, em substituição ao mercúrio, material de manuseio indesejável fora do laboratório ou em um analisador portátil.

Há muitos métodos espectrofotométricos de determinação de acetona em fase líquida, vez que de há muito tempo são largamente aplicados à análise de sangue e urina (BEHRE; BENEDICT, 1926; CSONKA, 1916; HUBBARD, 1920). Assim mesmo, novas

contribuições continuam surgindo, servindo de exemplo a aplicação de nanopartículas de ouro modificadas com o ancoramento de cisteína (KESHVARI; BAHRAM; FARHADI, 2016), reação com ácido antranílico, gerando produto fluorescente (GARCÍA DE MARÍA; HUESO DOMÍNGUEZ; MARTÍN GARRIDO, 2007) e reação com resorcinol impregnado em membrana ionomérica (Nafion) (WORRALL; BERNSTEIN; ANGELOPOULOS, 2013).

Um método espectrofotométrico clássico (BERNTSSON, 1956; CSONKA, 1916; HUBBARD, 1920; WALLHAUSER, 1928), adotado nas pesquisas anteriores do grupo (BATISTA, 2010; MARCONDES-BRAGA et al., 2016) e no desenvolvimento da presente dissertação de mestrado se baseia na reação de condensação aldólica entre acetona e salicilaldeído em meio alcalino com formação de di-salicilidenoacetona por meio de etapas intermediárias não mostradas na **Figura 8**.

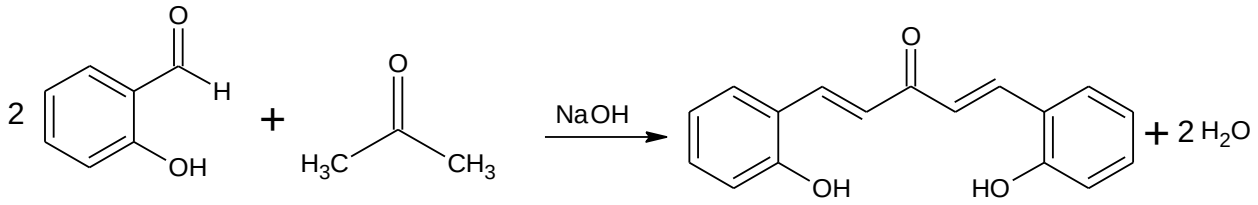


***Figura 8:*** *Reação entre salicilaldeído (2-hidroxibenzaldeído) e acetona (propanona) em meio alcalino com formação de di-salicilidenoacetona (1,5-Bis(2-hidroxifenil)-1,4-pentadieno-3-ona, CAS 131359-24-5), ou a forma dissociada do sal dissódico,* $Na_2C_{17}H_{12}O_3$ *(precipitável em meio alcalino).*

O método se destaca pela simplicidade, confiabilidade, baixo custo e seletividade, mas, na forma como foi implementado pelo grupo (BATISTA, 2010), o elevado tempo de reação (10 a 24 h de reação) retarda a obtenção de resultados, tornando inviável sua aplicação no consultório ou no hospital à beira-leito do paciente (*point of care, POC*). Uma forma de acelerar a reação é recorrer ao aquecimento, como descrito por Bahner e Schulze (BAHNER; SCHULZE, 1965), que também observaram que a solução reagente escurece reversivelmente com o aumento da temperatura do meio, enquanto que o

produto colorido clareia, também reversivelmente. Notaram ainda que o reagente escurece ao envelhecer, processo este acelerado pela presença de oxigênio e luz. Cabe acrescentar que, em sistema aberto, o aumento da temperatura também pode ocasionar perdas de analito que ainda não tenha reagido, dada a alta volatilidade da acetona.

Teshima e colaboradores (TESHIMA et al., 2005) levaram o aquecimento ao ponto de conseguir resultados em poucos minutos. Para tanto desenvolveram um sistema complexo em fluxo em que a reação é conduzida sob aquecimento a 95 °C, sendo o produto detectado fotometricamente. Esse sistema foi acoplado ao dispositivo de coleta com membrana microporosa, parcialmente descrito acima (seção 1.3, **Figura 7**). Na saída do coletor, a solução com a acetona extraída do ar conflui com o reagente (salicilaldeído em meio alcalino), passa por aquecimento e segue para detector fotométrico (465 nm, caminho óptico de 10 cm). Para evitar o contato dos componentes ópticos com o fluxo de solução alcalina aquecida a 95 °C, foram utilizadas pequenas lentes esféricas de safira nas extremidades do caminho óptico do detector. Além disso, para evitar a formação de bolhas, que interferem na detecção e podem conter acetona não reagida, foi colocado um tubo capilar na saída para restringir o fluxo, mantendo pressurizada essa parte do sistema.

O sistema foi testado somente na determinação de acetona em ar exalado por voluntários saudáveis, emitindo menos de 1 ppmv, sendo de 14 ppbv (partes por bilhão em volume) o limite de detecção alcançado. Os autores (TESHIMA et al., 2005) demonstraram a imunidade do sistema a potenciais interferentes em concentrações usuais em ar exalado (etanol, metanol, formaldeído, metilisobutilcetona e amônia).

Trata-se de um sistema relativamente grande, complexo e caro, que requer certo tempo para entrar em operação estável (tem setores termostatizados em 3 temperaturas

distintas e depende de duas bombas para o funcionamento) e pode requerer procedimentos de descontaminação biológica do módulo de amostragem. Uma vez estabilizado e suprido de reagente, permitiria a realização de uma análise a cada 10 minutos (ou 30 min, se feitas em triplicata ou com intercalação de padrão). Talvez possa vir a despertar interesse em algum hospital se a análise de acetona exalada vier a ser aplicada rotineiramente, com agendamento sequencial de pacientes. Se, por um lado, a operação relativamente rápida e automatizada do sistema proporciona resultados com menor influência do operador no procedimento, dificulta a portabilidade e o uso não contínuo ou eventual, importante para locais de pequena demanda ou em projetos de pesquisa.

Pelo que foi visto nesta Introdução, justifica-se, portanto, buscar aperfeiçoar e tornar mais práticos e rápidos dispositivos e métodos simples de amostragem e de determinação de acetona em ar exalado, mesmo que a determinação se dê por métodos fotométricos clássicos em fase líquida, como o da reação de acetona com salicilaldeído, já em uso na colaboração entre o INCOR-HC-FM-USP e o IQ-USP.

# 2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral aperfeiçoar o método analítico usado rotineiramente na colaboração do grupo com o INCOR-HC-FM-USP, especialmente o procedimento de determinação fotométrica baseado na reação entre a acetona e salicilaldeído por 10 horas (ou mais), buscando reduzir o tempo necessário para a determinação, alcançar maior praticidade, de preferência, possibilitando aplicação do método no local onde é feita a coleta, todavia, sem prejuízo no limite de detecção e na reprodutibilidade do método, tendo por prioridades:

- Avaliar a aceleração da reação por meio do aquecimento e da mudança de proporção entre solução reagente e solução contendo acetona, ajustando os parâmetros cinéticos de modo a otimizá-los.
- Ajustar condições experimentais e avaliar a estocagem das soluções para uso rotineiro do método em laboratório, visando futuro desenvolvimento de um kit para a determinação da acetona no local de amostragem (*point of care*).

# 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção é descrito o procedimento empregado em todos os testes feitos nesta dissertação. Foram feitos testes para definição do comprimento de onda a ser empregado na determinação, foi verificada a influência da exposição do meio reacional à luz, foram estudadas as interferências da mudança de proporção entre reagente (salicilaldeído + NaOH) e solução contendo acetona, no que diz respeito ao espectro de absorção da espécie formada. Definido o comprimento de onda a ser utilizado nas determinações e um procedimento de normalização de espectros para compensar variações no escurecimento da solução de uma determinação para outra, foram avaliadas as cinéticas reacionais em diferentes proporções entre reagente e solução contendo acetona, além dos efeitos individuais do aumento da concentração final de NaOH. Após estes testes, o método aperfeiçoado foi aplicado a amostras reais, coletadas no hospital.

Nos experimentos descritos, utilizou-se a reação entre a acetona e o salicilaldeído em meio alcalino, seguida de determinação de absorbância em cubetas com 1,00 cm de caminho óptico, utilizando espectrofotômetro visível da marca Femto, mod. 600-PIµs. O comprimento de onda adotado foi selecionado com base em espectros registrados utilizando cubetas de quartzo com 1,00 cm de caminho óptico em espectrofotômetro modelo Agilent 8453. A solução reagente usada para a determinação de acetona consistia de salicilaldeído (*ACROS Organics*) 0,11 mol $L^{-1}$ e NaOH (*Synth*) 4,68 mol $L^{-1}$. Além disso, para o preparo, limpeza dos recipientes e calibração dos espectrofotômetros foi utilizada água deionizada Milli-Q.

Salvo indicação em contrário, a solução reagente de salicilaldeído e NaOH era preparada e usada no mesmo dia, a proporção da mistura entre solução reagente solução

contendo acetona (padrão ou amostra) era 1:1 (v/v) e a reação era conduzida à temperatura ambiente de 25±5 °C durante pelo menos 10 h (quando atingia estabilização da absorbância). Ensaios em temperatura mais elevada foram realizados utilizando banho termostático Formatemp, enquanto que ensaios padronizados de influência da luz visível foram realizados utilizando lâmpada de LED branco (sem marca) proporcionando iluminância com de cerca de 34000 lux quando se posicionava o luxímetro a 10 cm de distância, aproximadamente a mesma em relação aos tubos onde ocorria a reação.

As análises de acetona efetuadas no âmbito da parceria entre IQ-USP e o INCOR-FM-USP da qual este trabalho de mestrado representa continuação, englobam a coleta de amostras no hospital por borbulhamento de volume fixo de ar exalado (7,6 L) em água gelada (5 mL) e a posterior determinação em fase aquosa utilizando a reação entre a acetona e o salicilaldeído em meio alcalino. O dispositivo de coleta utilizado no INCOR já foi descrito na página 20 e representado na **Figura 6**.

A fase líquida gelada do coletor é transferida do frasco de vidro (*impinger*) para vial de 15 mL com tampa rosqueável, que é armazenado em *freezer* mantido a -80 °C até o momento da determinação, quando se efetua o descongelamento. A eficiência da transferência da acetona do ar exalado para a fase líquida não é quantitativa, mesmo com o uso de *impinger* com difusor de ponta porosa, e foi anteriormente estudada na dissertação de Batista (BATISTA, 2010) com auxílio de gerador de atmosfera com teor controlado de acetona. Para condições idênticas às que se aplicam ao presente trabalho, o fator de extração do amostrador, $f_e$, reportado por Batista é de 0,78 ou 78%.

Também as etapas de congelamento, conservação por até 30 dias e descongelamento da amostra extraída introduzem perdas na concentração de acetona.

Por se ter mantido inalteradas as condições estudadas anteriormente (BATISTA, 2010), adotou-se o mesmo fator de conservação, $f_c$, de 0,90 ou 90%.

A concentração na fase gasosa do ar exalado é calculada a partir da concentração obtida na fase aquosa. Para isso, procede-se aplicando os fatores de extração do coletor e recuperação pelo congelamento das amostras, conforme a Equação 1.

$$\boxed{C_g = \frac{C_{aq} \cdot V_{slc}}{f_c \cdot f_e \cdot V_{ar}}} \qquad (1)$$

Em mol $L^{-1}$, a concentração de acetona na fase gasosa é dada por:

$$[acetona]_g = \frac{C_{aq} \cdot V_{slc}}{M_{ac} \cdot f_c \cdot f_e \cdot V_{ar}} \qquad (2)$$

Onde:

$C_g$ é a concentração de acetona na fase gasosa

$C_{aq}$ é a concentração de acetona na fase líquida

$V_{slc}$ é o volume de água utilizado para extração da acetona exalada ($5{,}0 \cdot 10^{-3}$ L)

$f_c$ é o fator de conservação devido ao congelamento/descongelamento da amostra (90 % = 0,90)

$f_e$ é o fator de extração do amostrador de ar exalado (78 % = 0,78)

$V_{ar}$ é o volume de ar amostrado (definido pelo saquinho plástico conectado na saída do amostrador) (7,6 L)

$M_{ac}$ é a massa molecular da acetona (58,08 g $mol^{-1}$)

Substituindo todos os valores na equação ( 1 ), obtém-se a seguinte equivalência:

$$\boxed{C_g = C_{aq} \cdot 9{,}37 \times 10^{-4}} \qquad (3)$$

O que significa que 1,0 mg $L^{-1}$ de acetona na fase aquosa equivale a $9{,}4.10^{-4}$ mg $L^{-1}$ = 0,94 µg $L^{-1}$ na fase gasosa.

As concentrações em fase gasosa expressas em mg $L^{-1}$ (unidades preferidas aqui e nos trabalhos anteriores do grupo) ou mol $L^{-1}$ devem estar acompanhadas da temperatura e pressão ambiente à qual se referem, já que, com o aumento da temperatura, assim como com a redução da pressão, os gases sofrem expansão. As amostras reais utilizadas nesta dissertação foram coletadas no INCOR sob pressão atmosférica média de 690 mm de Hg (altitude ~830 m) e temperatura média de 23 ºC, vez que a medição do volume de ar exalado (saco de 7,6 L) se deu em temperatura próxima à do ambiente climatizado do hospital. Pequenas diferenças não são determinantes da incerteza das análises e a conversão para outras pressões e temperaturas (p. ex., 37 ºC) se faz aplicando a lei dos gases (assumindo idealidade). Evita-se a necessidade de indicar a temperatura e pressão da amostragem ao expressar a concentração em ppmv (parte por milhão em volume), porcentagem massa/massa ou em fração molar porque, idealmente, todos os componentes da mistura gasosa se expandem ou contraem na mesma proporção.

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados e discutidos os resultados obtidos seguindo o procedimento experimental já apresentado. Primeiramente, foi revisto o comprimento de onda de trabalho, bem como as condições ideais de trabalho. Posteriormente, foi avaliada a cinética da reação, de modo a diminuir o tempo de análise.

## 4.1 Determinação de acetona

Visando estabelecer um procedimento pelo qual sejam obtidos resultados confiáveis e em intervalo de tempo menor que o do método tradicional, foram avaliados os efeitos dos seguintes parâmetros: comprimento de onda mais favorável com base nos espectros do reagentes e do produto, proporção ótima (v/v) de solução reagente/solução contendo acetona, possibilidade de utilizar reagente envelhecido, influência da exposição à luz, conservação do reagente e cinética reacional à temperatura ambiente e sob aquecimento. Tendo sido estabelecidos os parâmetros ótimos e o procedimento em si, o método foi aplicado a amostras reais, coletadas de pacientes no hospital por colaboradores.

### 4.1.1 Escolha do comprimento de onda e normalização de espectros

Na região espectral examinada, de 190 a 1100 nm, a solução alcalina de salicilaldeído absorve radiação eletromagnética entre 190 e 450 nm e se apresenta quase transparente entre 500 e 1100 nm. As absortividades molares sofrem variação com parâmetros experimentais como tempo de envelhecimento após o preparo da solução alcalina, temperatura e efeito da luz (ou ainda procedência e tempo de estocagem do

salicilaldeído). Para exemplificar o efeito de um dos parâmetros que serão avaliados e discutidos mais à frente, apresenta-se na **Figura 9** a modificação do espectro do reagente recém preparado por exposição à luz branca de lâmpada LED durante uma hora.

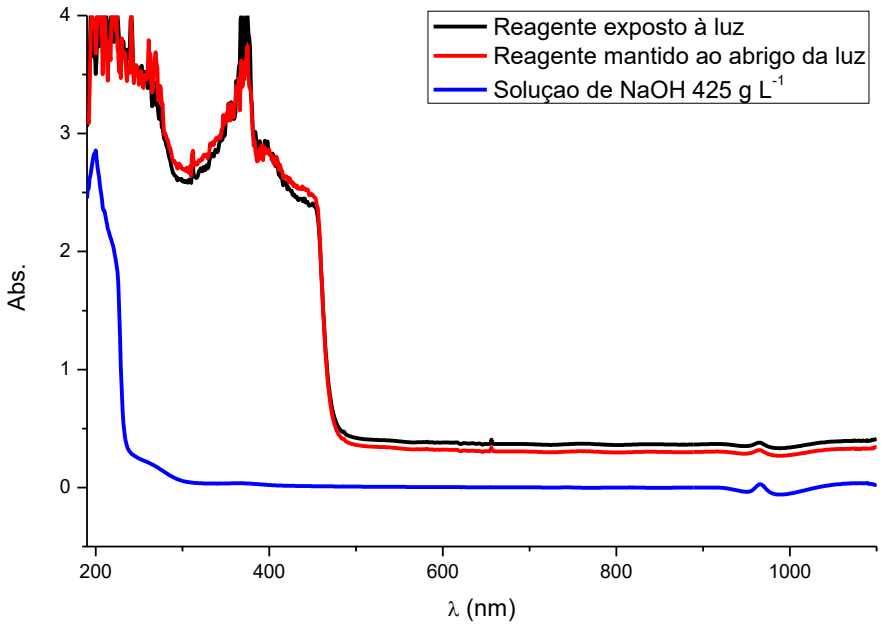


***Figura 9:*** *Comparação dos espectros de absorção do reagente contendo salicilaldeído 0,110 mol $L^{-1}$ e NaOH 4,7 mol $L^{-1}$ (na ausência de acetona) recém preparado e depois de exposto à iluminância de ≈34.000 lux (LED branco) por ≈1 h; o espectro com pico em 200 nm é de solução de NaOH 10,6 mol $L^{-1}$. Cubeta de quartzo com 1,00 cm de caminho óptico, zero de absorbância ajustado com água deionizada.*

O terceiro espectro da figura corresponde ao NaOH 10,6 mol $L^{-1}$, ou seja, aproximadamente o quádruplo do que será usado doravante para alcalinizar o reagente (salvo indicação em contrário). Com exceção do pico a 200 nm, verifica-se que a contribuição do NaOH é desprezível nos outros dois espectros. A absorbância praticamente nula do NaOH entre 300 e 900 nm frente à água usada para ajustar A = 0 (T = 100%) também evidencia que a diferença do índice de refração desses dois meios (≈1,41 frente a 1,33 para água) não afetou de forma perceptível a quantidade de luz incidente nos fotodiodos do espectrofotômetro (possivelmente, devido ao bom

paralelismo do feixe óptico que atravessa a cubeta, entre outros fatores). Essas características favoráveis permitem desconsiderar efeitos físicos causados pelo NaOH, em distintas concentrações sobre a variação dos espectros da solução reagente.

Por ser muito elevado o ruído e o erro fotométrico ao se medir absorbância superior a 3 (T<0,1%), passou-se a suprimir nas figuras a região espectral em que esse limite é excedido, a começar pela **Figura 10**. Também se estabeleceu efetuar o ajuste de zero de absorbância sempre com água deionizada (e não com um branco de reagente + água sem acetona). Isso porque assim se tem registro do valor da absorbância na ausência de acetona, indicando que o reagente está em boas condições se o valor no espectro for próximo a 0,25, com pequenas variações devido a diferenças em algum parâmetro experimental (p.ex., tempo de exposição à luz difusa do laboratório).

O produto de reação, di-salicilidenoacetona, apresenta uma banda larga de absorção, já iniciada em 450 nm e se estendendo até 605 nm, como pode ser avaliado observando os espectros registrados para várias concentrações de acetona apresentados na **Figura 10**. Nesse experimento, a reação se desenvolveu por aproximadamente 20 h, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente de 25±5 °C, e na proporção (reagente/amostra v/v) de 1:1 (tradicionalmente utilizada pelo grupo na determinação de acetona em amostras coletadas no INCOR-FM-USP), o que significa concentração final no meio reacional de salicilaldeído de 6,90 g $L^{-1}$ (0,055 mol $L^{-1}$) e NaOH de 95,3 g $L^{-1}$ (2,35 mol $L^{-1}$). Já para a acetona, é importante ressaltar que as concentrações indicadas (em mg $L^{-1}$) na figura abaixo são dos padrões e, dada a diluição com o reagente, caem pela metade.

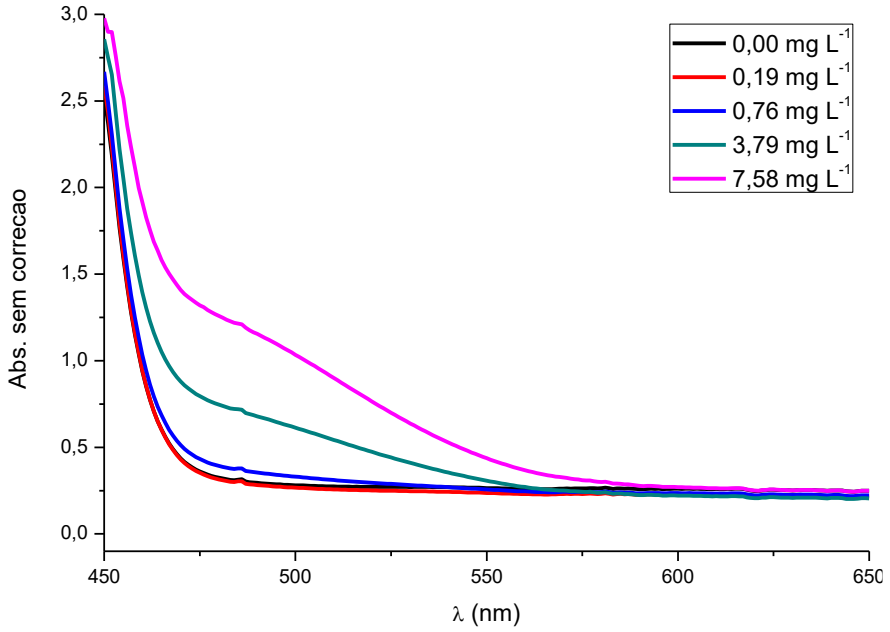


***Figura 10:*** *Espectros obtidos de soluções de salicilaldeído (0,055 mol $L^{-1}$) e NaOH (2,35 mol $L^{-1}$) após 20 horas de reação com várias concentrações de acetona à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Zero de absorbância ajustado com água deionizada em cubeta de quartzo.*

Levando em conta a elevada concentração de salicilaldeído na solução reagente frente à de produto formado, pequenas variações na sua absorbância (observáveis nas **Figura 9** e, acima de 605 nm, também **Figura 10**) já comprometem o limite de detecção e a precisão da determinação de acetona nas mais baixas concentrações. Por exemplo, a 474 nm ($\lambda$ usado no método tradicional) tem-se um $\varepsilon \approx 6{,}7$ L $mol^{-1}$ $cm^{-1}$ para o reagente e $\varepsilon \approx 7600$ L $mol^{-1}$ $cm^{-1}$ para o produto, expresso em termos da concentração inicial de acetona. A variação de 0,055 unidades de absorbância entre os espectros da **Figura 9** (presença e ausência de luz) a 474 nm corresponde a $7{,}3.10^{-6}$ mol $L^{-1}$ ou 0,42 mg $L^{-1}$ de acetona.

Conseguiu-se bons resultados na compensação dessas diferenças mínimas de linha base e consequente redução na dispersão dos pontos das curvas de calibração em função da concentração de acetona mediante a introdução de um procedimento de

“normalização” dos espectros que consiste em descontar, em todos os comprimentos de onda, o valor da média das absorbâncias registradas entre 620 e 640 nm. Esse procedimento foi adotado no restante da dissertação. Guarda semelhança, por exemplo, com a detecção fotométrica em dois comprimentos de onda, um na banda de absorção do produto e outro numa região em que não há absorção, utilizado na análise por injeção em fluxo para correção do efeito Schlieren (originado por variação do índice de refração, fator irrelevante aqui, como visto) (ZAGATTO et al., 1990). A aplicação da normalização da **Figura 10** conduz à **Figura 11** apresentada abaixo.

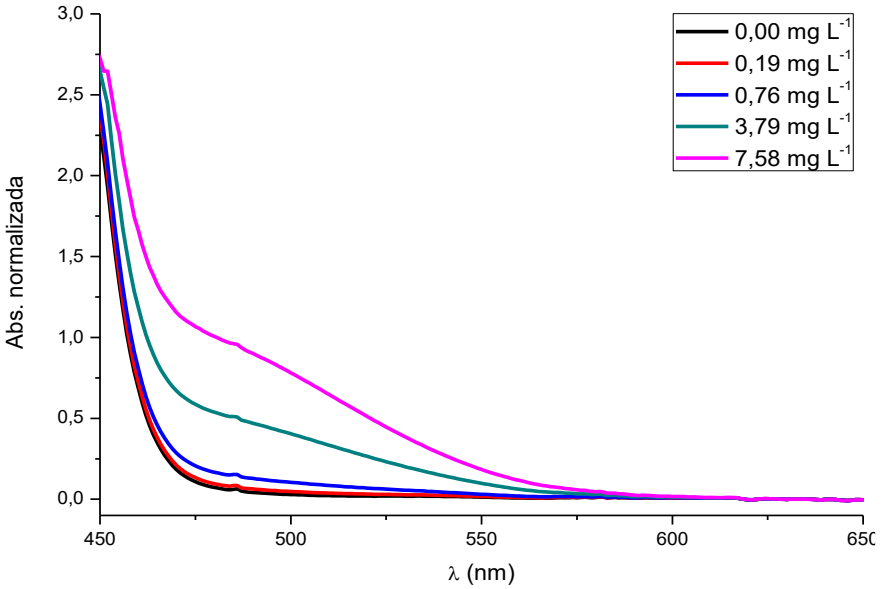


***Figura 11:*** *Espectros da* ***Figura 10*** *após normalização por subtração de média das absorbâncias entre 620 e 640 nm*

Essas curvas foram “cortadas” verticalmente em vários comprimentos de onda e, com os dados, foram construídas curvas de calibração (curvas analíticas) em função da concentração da acetona em fase aquosa, como mostrado na **Figura 12**. Nessa figura se observa boa linearidade em qualquer comprimento de onda entre 460 e 550 nm, com intersecções que decrescem mais rapidamente que as inclinações nesse intervalo. Para evidenciar esse comportamento, construiu-se gráficos dos coeficientes angular e linear

em função do comprimento de onda, originando as **Figuras 13** e **14**.

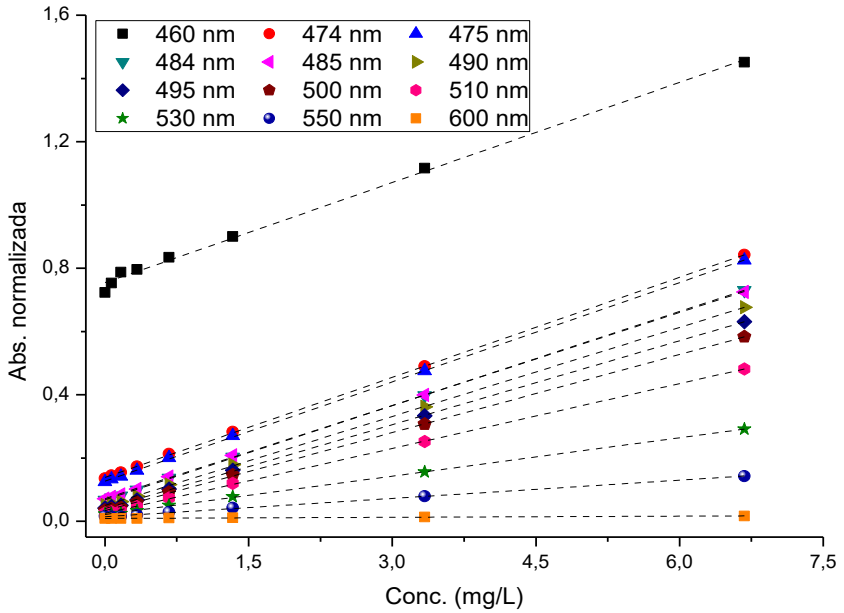


***Figura 12:*** *Curvas de calibração construídas a partir dos espectros da* ***Figura 11*** *referentes ao meio contendo salicilaldeído (0,055 mol L$^{-1}$), NaOH (2,35 mol L$^{-1}$) e várias concentrações de acetona, após 20 h de reação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.*

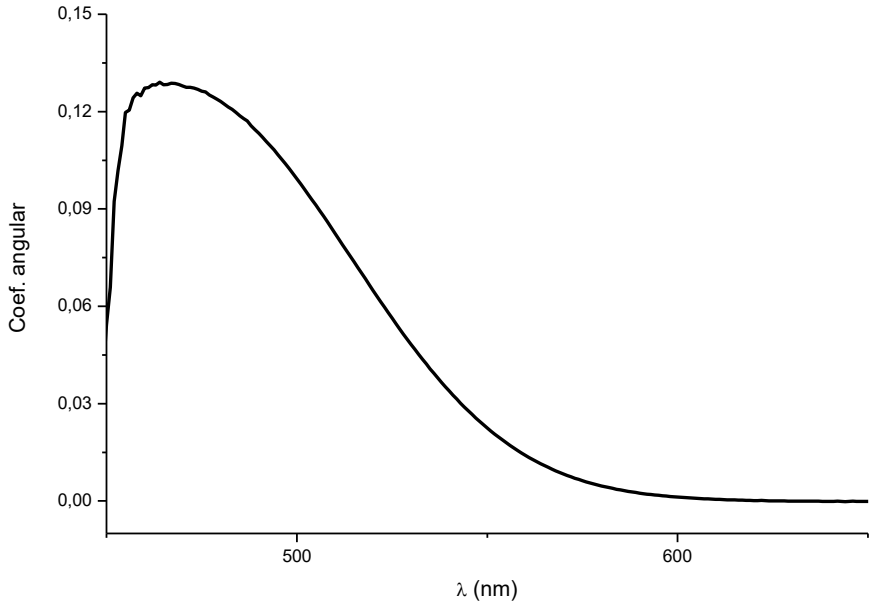


***Figura 13:*** *Coeficiente angular (A/mg L$^{-1}$) das curvas de calibração em função do comprimento de onda para a reação que se desenvolveu à temperatura ambiente e ao abrigo da luz (condições da Figura 11).*

Um critério comum de escolha de comprimento de onda para determinações analíticas é o da máxima absortividade da espécie, situada, no caso, ao redor de 470 nm. Não é por outro motivo que o λ de 465 nm foi escolhido na literatura (TESHIMA et al., 2005) enquanto que o grupo vinha trabalhando em 474 nm (BATISTA, 2010). No entanto, como mostra a **Figura 14**, nessa região o coeficiente linear é alto e varia abruptamente com o λ de forma que qualquer eventual flutuação na absorbância da mistura reacional ou no λ (p.ex., aquecimento do espectrofotômetro) pode comprometer a precisão do sinal medido, erro tanto mais significativo quanto menor for a concentração (ao redor do limite de determinação).

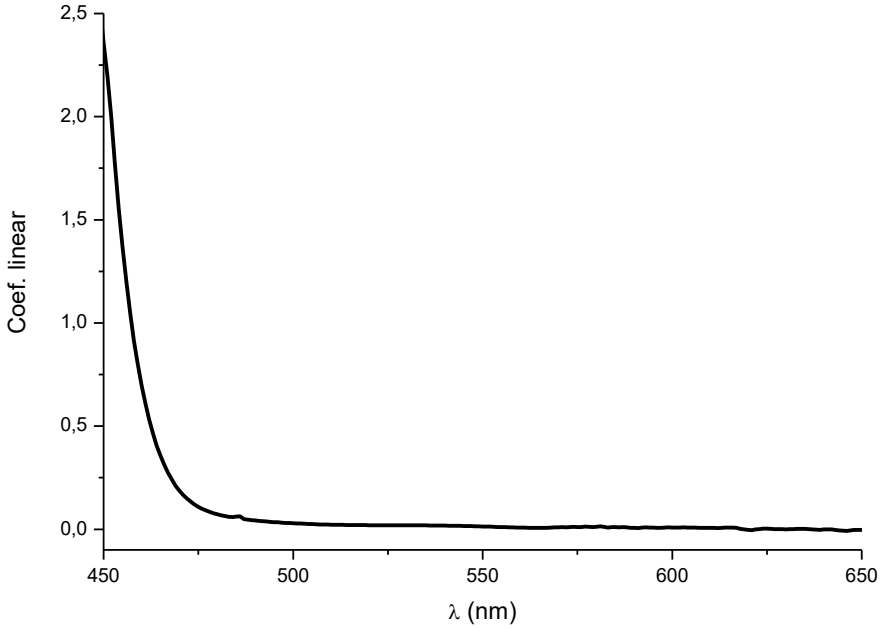


***Figura 14:*** *Coeficiente linear em função do comprimento de onda obtidos pelas curvas de calibração construídas para a reação que se desenvolveu à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.*

Dessa forma, buscando encontrar o melhor compromisso entre a sensibilidade do método (coeficiente angular da curva de calibração) e intensidade/variação da linha-base (coeficiente linear), foi construída a curva apresentada na **Figura 15**, que mostra a razão coeficiente angular/coeficiente linear em função do comprimento de onda. Com base

nesta figura, o λ que proporciona melhor compromisso, nas condições dadas, é 510 nm, no qual a sensibilidade já é significativamente sacrificada em favor da menor absorbância do branco e, portanto, maior imunidade a suas eventuais variações.

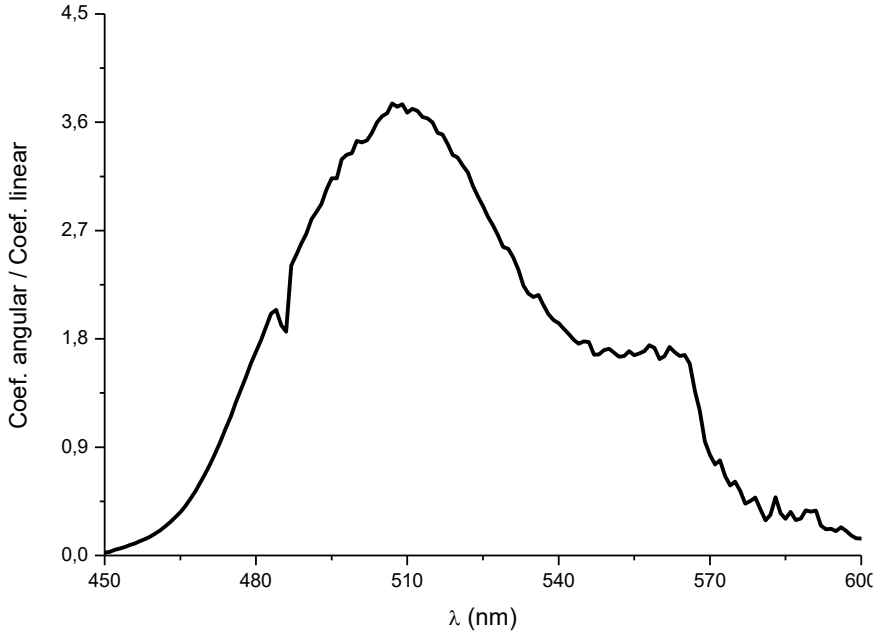


***Figura 15:*** *Razão entre coeficiente angular e linear em função do comprimento de onda calculado por meio das curvas de calibração construídas para a reação que se desenvolveu à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.*

Após o estudo do comprimento de onda, o método (utilizando, no mais, os parâmetros tradicionais de reação com salicilaldeído em meio alcalino) foi aplicado a um conjunto de amostras obtidas no hospital por borbulhamento de ar exalado e *impinger* de vidro com água gelada. Essas amostras foram misturadas com reagente (salicilaldeído 0,055 mol $L^{-1}$ e NaOH 2,35 mol $L^{-1}$) na proporção 1:1 (v/v). Após aproximadamente 20 h de reação a temperatura ambiente (25±5 °C), foram registrados espectros das amostras e padrões. Dos espectros foram extraídas as absorbâncias em 474, 490, 495, 500 e 510 nm para construção das curvas de calibração e, finalmente, as amostras foram quantificadas nesses comprimentos de onda.

A **Figura 16** mostra os resultados finais, ordenados em concentração crescente na fase aquosa (mg $L^{-1}$), para os cinco comprimentos de onda testados.

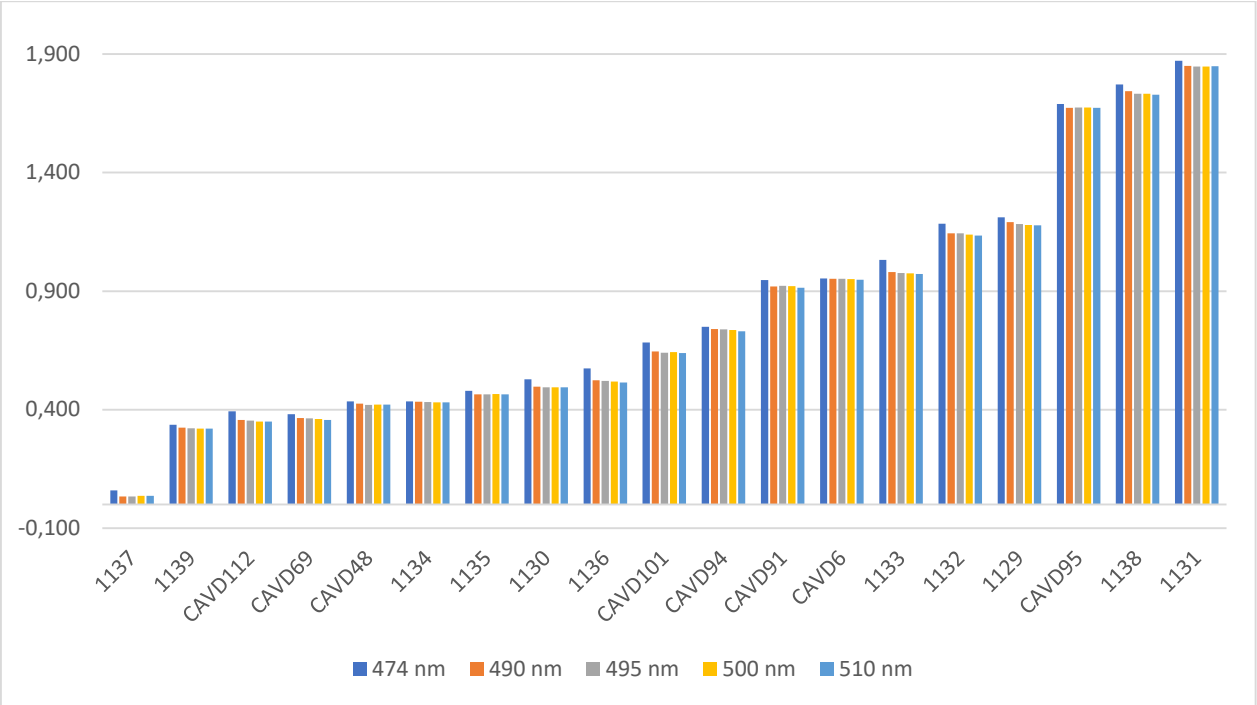


***Figura 16:*** *Comparação das concentrações obtidas em diferentes comprimentos de onda, para amostras reais de acetona provenientes de hospital, expressas em mg $L^{-1}$ na fase líquida (5 mL), coletadas utilizando impinger de vidro resfriado com gelo, pelo qual o paciente borbulhou ar exalado (7,6 L) (determinações feitas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz).*

Observando a figura, percebe-se que faz pouca diferença no resultado final usar 490, 495, 500 ou 510 nm. No entanto o resultado obtido em 474 nm (o mais susceptível deles a eventuais flutuações da linha base ou "escurecimento" do reagente), para concentrações baixas (exceto a menor de todas), chegou a ser até 10% maior do que o registrado em outros comprimentos, enquanto que a diferença entre todos os outros λ fica em torno de 1 a 2 %.

Quanto aos limites de detecção e quantificação, há pouca diferença entre medir em 474, 495 ou 510 nm, conforme mostrado na **Figura 17**, vez nessa região se mantém

próximos a 0,10 e 0,34 mg $L^{-1}$ respectivamente.

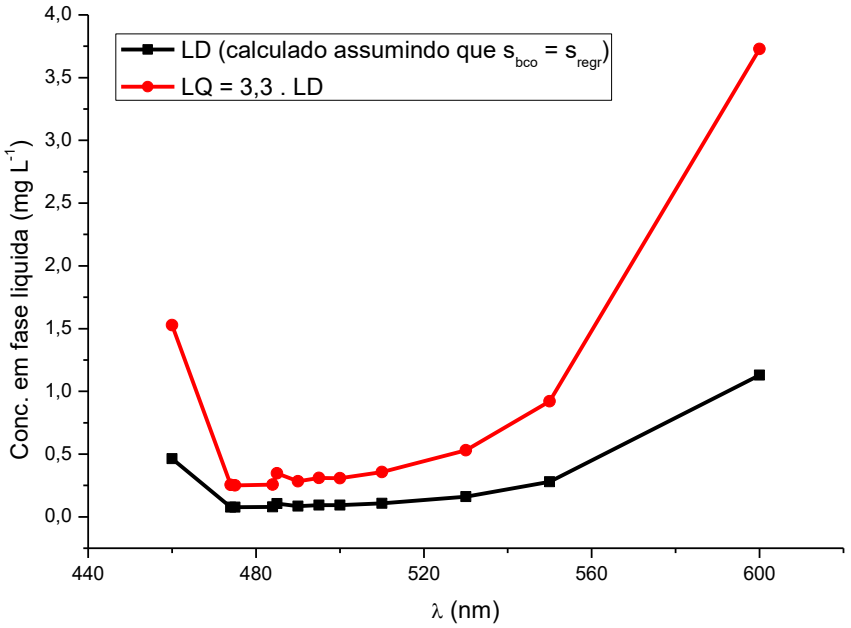


***Figura 17:*** *Limites de detecção e quantificação obtidos para as determinações realizadas após reação ao abrigo da luz e à temperatura ambiente durante ~20 h.*

Com base nos resultados apresentados nas **Figuras 16 e 17**, obtidas já contando com a ajuda da normalização pela subtração da média das absorbância entre 620 e 640 nm para compensar em parte as flutuações de linha base, optou-se por alterar o λ do método de 474 nm para 495 nm para efetuar as determinações, privilegiando, desta forma, um pouco mais a sensibilidade, algo menor em 510 nm, já que se manteve bem uniformes para padrões e amostras os parâmetros experimentais que serão discutidos a seguir. Todavia, quando as condições experimentais para padrões e amostras não forem rigorosamente uniformes, p.ex. fora do laboratório, poderá ser preferível optar pela maior imunidade a variações no escurecimento do reagente e do produto, preferindo 510 nm para efetuar as determinações.

### 4.1.2 Avaliação da proporção volumétrica entre solução reagente/acetona

Após avaliar o efeito do comprimento de onda e escolher 495 nm como mais favorável para a determinação, isto é, preservando a sensibilidade e reduzindo a interferência de flutuações na linha base ou efeitos de imprecisões/variações de comprimento de onda do monocromador utilizado, foi estudada a relação entre a proporção volumétrica das soluções reagente (salicilaldeído 0,11 mol $L^{-1}$ e hidróxido de sódio 4,68 mol $L^{-1}$) e a solução contendo acetona ~16,5 mg $L^{-1}$ ($2{,}84.10^{-4}$ mol $L^{-1}$). Foram testadas, a princípio, as proporções 1:1 e 2:1 de reagente/acetona (posteriormente, visando à diminuição do tempo de reação, foram testadas outras proporções), no que diz respeito à relação entre o volume de solução contendo acetona. Na **Figura 18** compara-se as sensibilidades obtidas para essas duas proporções.

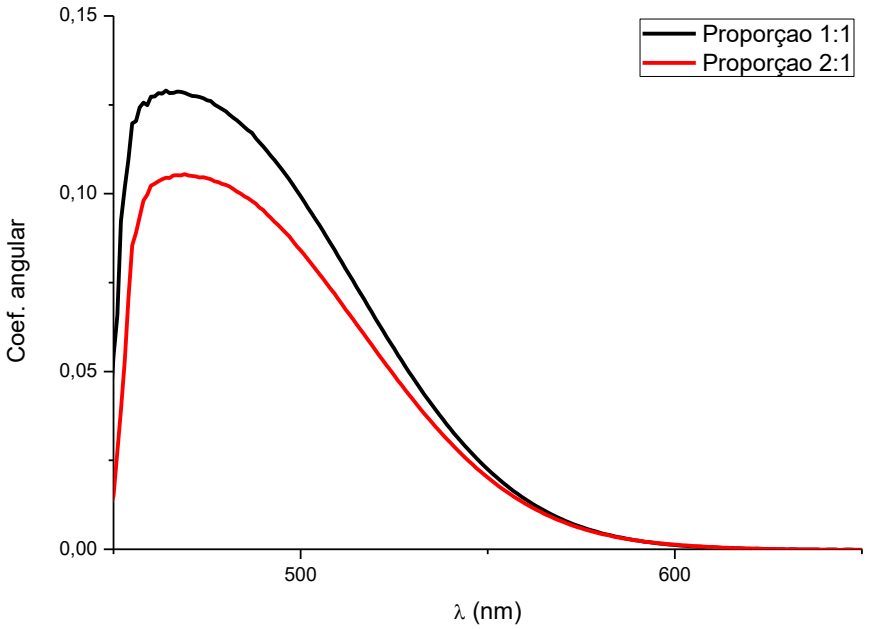


***Figura 18:*** *Comparação dos coeficientes angulares obtidos nas proporções 1:1 e 2:1 (v/v) em função do comprimento de onda (ensaios feitos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz).*

De acordo com a figura, que reafirma os dados apresentados na seção 4.1.1, isto é, que mostra o máximo de sensibilidade em aproximadamente 470 nm, a sensibilidade do método sofre decréscimo de somente 18% para redução de 33% na concentração de acetona na mistura ao se aumentar a proporção da solução reagente, perfazendo-se, na proporção 2:1 uma concentração final de salicilaldeído de 9,2 g $L^{-1}$ (0,075 mol $L^{-1}$) e de concentração final de NaOH de 125 g $L^{-1}$ (3,12 mol $L^{-1}$). Como é de se esperar, por haver mais salicilaldeído em solução, além do aumento da absorbância média entre 620 e 640 nm, imperceptível na **Figura 19** por causa da normalização, também ocorre escurecimento crescente com o decréscimo de λ, visível na figura.

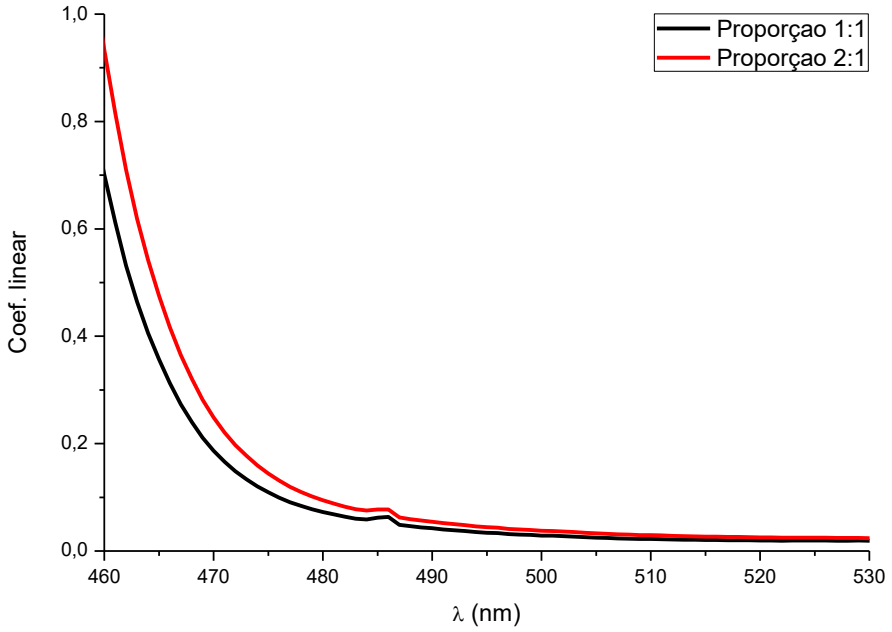


***Figura 19:*** *Comparação dos coeficientes lineares obtidos nas proporções 1:1 e 2:1 (v/v) em função do comprimento de onda (ensaios feitos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz).*

Para buscar a melhor relação entre a sensibilidade do método e a influência da absorbância do branco em função do comprimento de onda, foi construída a **Figura 20**, que apresenta o quociente entre os coeficientes angular e linear como função do λ.

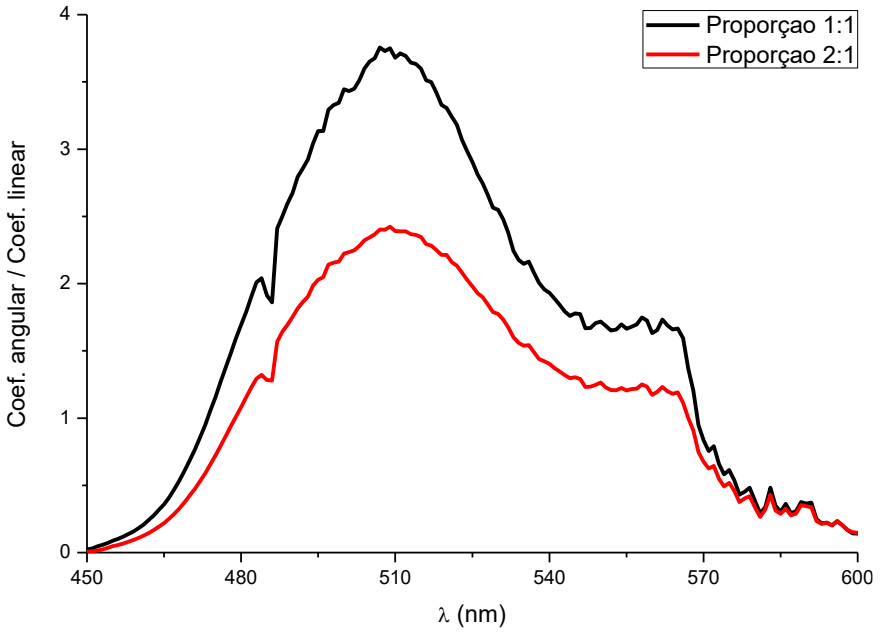


***Figura 20:*** *Comparação dos quocientes entre os coeficientes angular e linear obtidos nas proporções 1:1 e 2:1 (v/v) em função do comprimento de onda (ensaios feitos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz).*

O comprimento de onda que apresenta melhor relação entre a sensibilidade do método e intensidade/variação da linha-base prossegue sendo 510 nm, para ambas as proporções, conforme já mencionado na seção 4.1.1. Sob o ponto de vista da sensibilidade, é mais vantajoso, portanto, prosseguir utilizando a proporção 1:1. Todavia, considerações adicionais serão ser levadas em conta posteriormente, quando forem apresentados resultados para outras proporções quanto à cinética reacional, visando atingir tempo de determinação mais curto. Foram testadas além das proporções 1:1 e 2:1, as proporções 5:1 e 10:1 que, como será explicado em mais detalhes na seção 4.1.50, proporcionaram redução considerável do tempo de determinação.

### 4.1.3 Avaliação da utilização de reagente envelhecido

Foi avaliada a utilização de reagente envelhecido ao abrigo da luz durante aproximadamente 20 h, em temperatura ambiente de 25±5 °C, simulando a situação de aproveitar o reagente preparado no dia anterior. Após esse envelhecimento da solução, foram adicionados os padrões contendo acetona e deixados reagir por mais ~20 h. Foram registrados os respectivos espectros e, posteriormente foram calculados, em cada comprimento de onda, os coeficientes angular e linear para cada curva de calibração, bem como o quociente entre coeficiente angular e linear, para avaliar a melhor razão entre sensibilidade e influência da absorbância do branco.

A **Figura 21** apresenta a sensibilidade do método em função do comprimento de onda, para a proporção (v/v) 1:1, originando as concentrações finais de salicilaldeído e NaOH já citadas anteriormente.

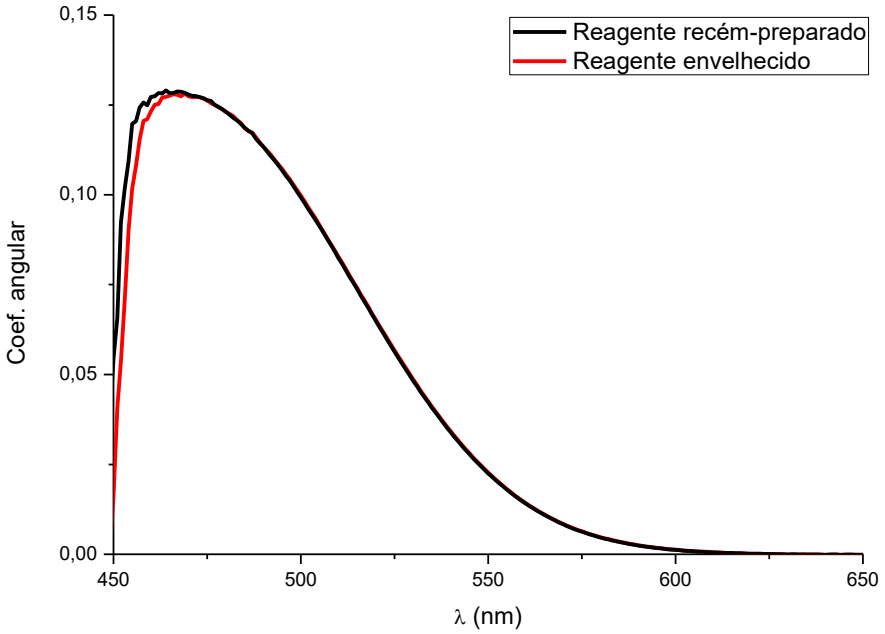


***Figura 21:*** *Comparação dos coeficientes angulares obtidos utilizando reagente recém-preparado e reagente envelhecido (durante ~20 h ao abrigo da luz e à temperatura ambiente) em função do comprimento de onda (ensaios feitos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz).*

De acordo com os dados apresentados, há pouca diferença, em termos da sensibilidade do método na região de máxima absortividade, em usar solução reagente recém-preparada ou envelhecida durante ~20 h evitando o contato com a luz durante todas as etapas.

Para apreciar o efeito do aumento da proporção de reagente de 1:1 para 2:1, montou-se a **Figura 22** com as curvas de sensibilidade em função do comprimento de onda, tanto para reagente recém preparado quanto para reagente envelhecido.

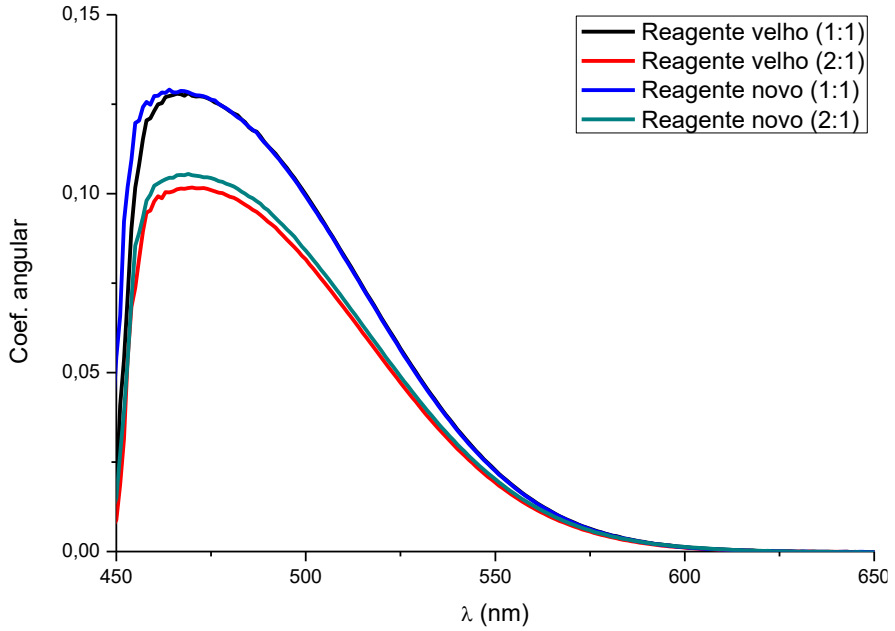


***Figura 22:*** *Comparação dos coeficientes angulares obtidos utilizando reagente recém-preparado e reagente envelhecido (durante ~20 h ao abrigo da luz e à temperatura ambiente) nas proporções (v/v) 1:1 e 2:1 em função do comprimento de onda (ensaios feitos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz).*

Verifica-se na figura que tanto para a proporção 1:1 como 2:1 praticamente não há diferenças na sensibilidade obtida com reagente recém preparado ou guardado do dia anterior, desde que, como será mostrado mais a frente, seja evitado o contato com a luz intensa em todas as etapas. Já no que diz respeito ao aumento da proporção de reagente e, consequentemente, de salicilaldeído na solução, foi observado decréscimo de

sensibilidade de aproximadamente 20% no máximo de absorção (470 nm). Seria previsível redução de 33 %, ao levar em conta que a concentração de acetona foi reduzida a 2/3 da concentração original. Isso significa que houve maior rendimento na conversão de acetona no produto colorido, di-salicilidenoacetona, embora não ao ponto de sobrepujar o efeito da diluição.

Além dessa redução da sensibilidade, a presença de mais salicilaldeído na solução também a tornou, visualmente, mais escura, o que, mesmo após a normalização, pode ser confirmado na **Figura 23**.

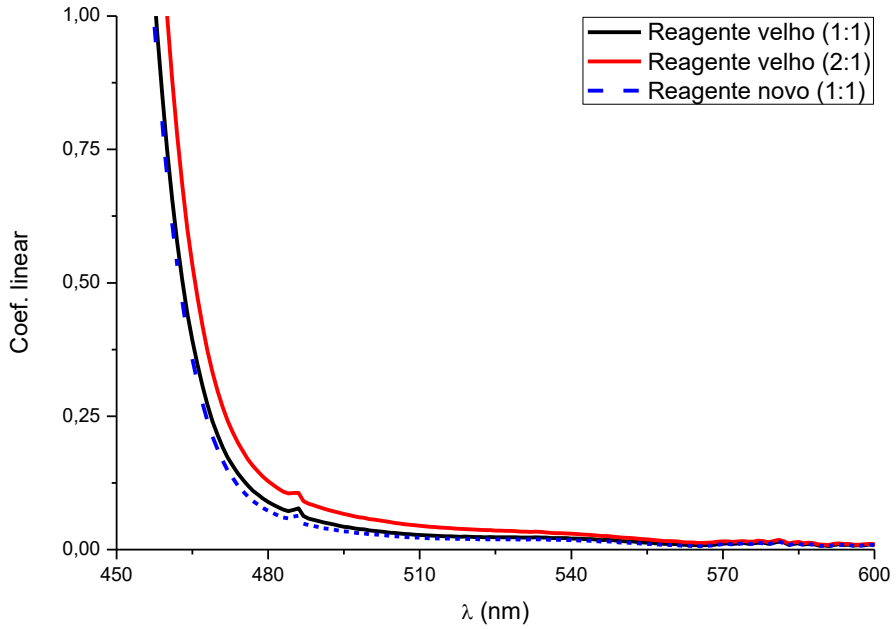


***Figura 23:*** *Comparação dos coeficientes lineares obtidos utilizando reagente recém-preparado e reagente envelhecido (durante ~20 h ao abrigo da luz e à temperatura ambiente) nas proporções (v/v) 1:1 e 2:1 em função do comprimento de onda (ensaios feitos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz).*

Esse escurecimento influi na repetibilidade e reprodutibilidade do método, sendo mais crítico para amostras em baixíssimas concentrações de acetona, isto é, que estejam próximas do limite de determinação.

Buscando o melhor compromisso entre sensibilidade do método e influência do

branco, foi construída também a **Figura 24**, que relaciona o quociente entre coeficiente angular e coeficiente linear como função do comprimento de onda.

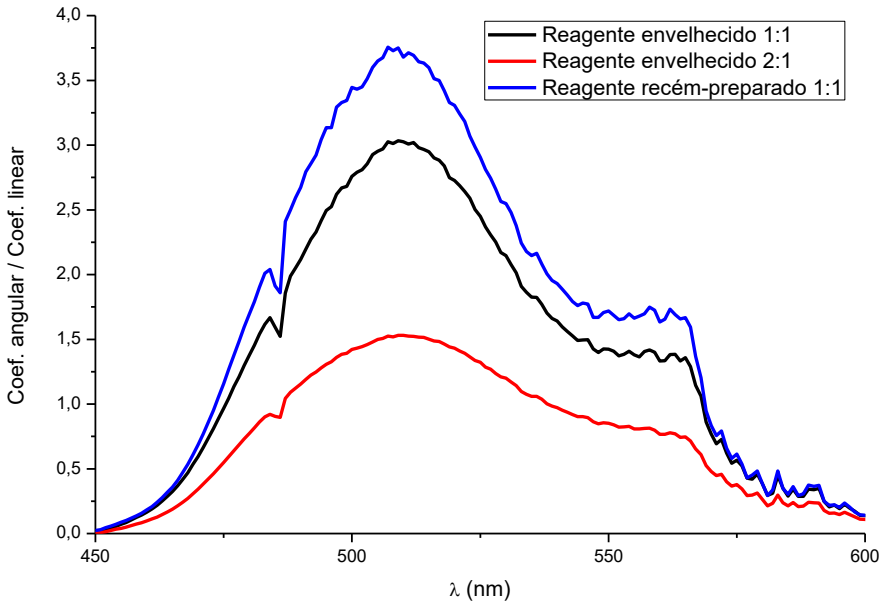


***Figura 24:*** *Comparação do quociente entre os coeficientes angular e linear obtido utilizando reagente recém-preparado e reagente envelhecido (durante ~20 h ao abrigo da luz e à temperatura ambiente) nas proporções (v/v) 1:1 e 2:1 em função do comprimento de onda (ensaios feitos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz).*

Nesta figura é visualizada, mais claramente, a diferença entre utilizar o reagente envelhecido (em ambas as proporções) e também o reagente recém-preparado. Nas soluções preparadas em maior proporção, há menor sensibilidade (menor coeficiente angular) e o escurecimento da solução é mais evidenciado (maior coeficiente linear). Por isso, a razão entre os dois coeficientes acabou sendo bastante prejudicada.

Cabe ressaltar, ainda, que todas as figuras mostram que o comprimento de onda que parece ser o mais razoável para ser utilizado na determinação da acetona, por ser menos suscetível a eventuais flutuações do coeficiente linear ou possíveis imprecisões do monocromador, além de apresentar o melhor compromisso com a sensibilidade do método é, como já mencionado, 510 nm.

### 4.1.4 Interferência da exposição à luz na reação

No estudo da interferência da luz na determinação, a reação entre salicilaldeído e acetona foi desenvolvida sob exposição (ou não) por aproximadamente 20 h à luz de lâmpada LED “branco” que proporciona iluminância aproximada de 34000 lux nos frascos de reação, para a distância média escolhida (aproximadamente 10 cm de distância da tampa dos tubos). Depois foram registrados os espectros de cada amostra, e extraídos os coeficientes angular e linear, além da razão coeficiente angular/coeficiente linear, todos em função do comprimento de onda.

Como pode ser visto na **Figura 25**, a sensibilidade é afetada para as amostras que foram expostas à luz durante a reação, haja vista a redução de 10% em 474 nm, na proporção reagente/solução de acetona 1:1 (v/v). Com o aumento da proporção para 2:1, a sensibilidade do método cai 46%, ao invés dos 20% vistos na **Figura 22**.

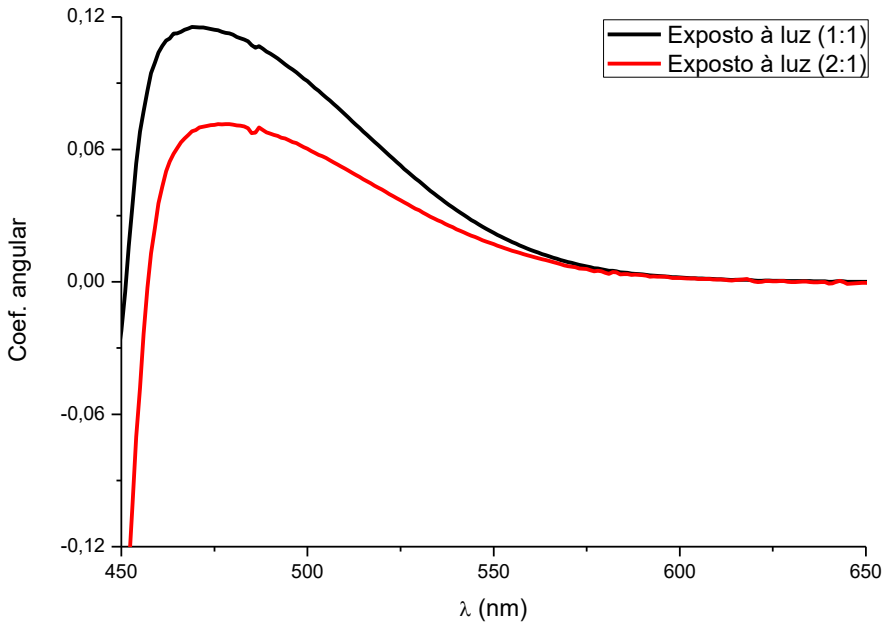


***Figura 25:*** *Comparação dos coeficientes angulares obtidos utilizando reagente recém-preparado nas proporções (v/v) 1:1 e 2:1 em função do comprimento de onda (ensaios feitos à temperatura ambiente e sob exposição direta à luz de LED branco - ~34000 lux).*

A queda na sensibilidade devido à exposição à luz é acompanhada de escurecimento da solução reagente, o que pode ser visto na **Figura 26**, na qual o coeficiente linear está em função do comprimento de onda. Isso permite explicar a irrelevância dos coeficientes angulares negativos em $\lambda < 460$ nm na **Figura 25**, vez que vem acompanhados de um desvio padrão de ±0,02 nessa região.

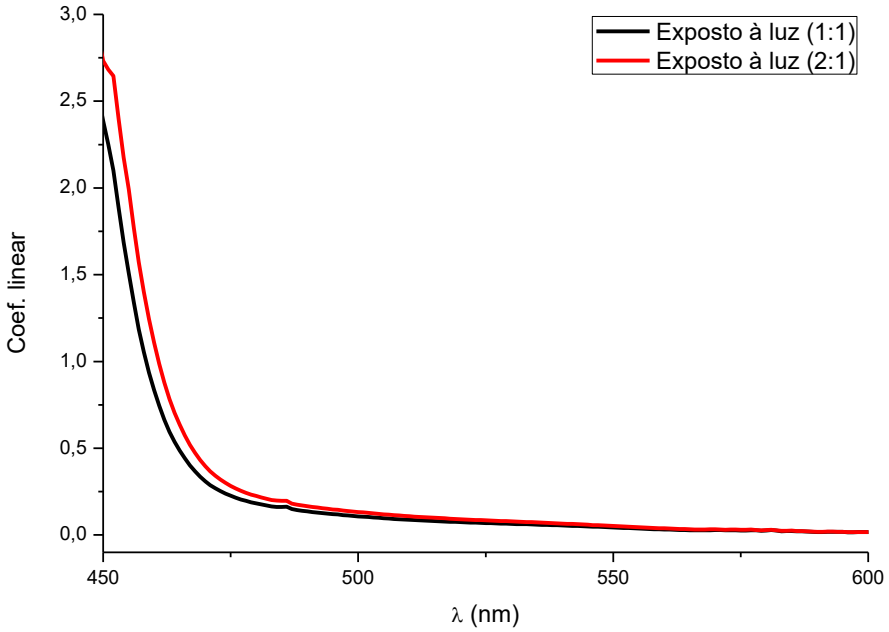


***Figura 26:*** *Comparação dos coeficientes lineares obtidos utilizando reagente recém-preparado nas proporções (v/v) 1:1 e 2:1 em função do comprimento de onda (ensaios feitos à temperatura ambiente e sob exposição direta à luz de LED branco - ~34000 lux).*

Os resultados obtidos detalham a constatação mencionado na literatura (BAHNER; SCHULZE, 1965) de que a luz interfere na reação. Ocorre tanto o escurecimento da solução reagente, como se verifica ao confrontar a **Figura 26** com a **Figura 23**, como a diminuição da sensibilidade, observável pelo coeficiente angular (**Figura 25** versus **Figura 21**). Vale ressaltar novamente que as amostras mais afetadas, em termos do erro relativo, são as de baixíssima concentração, uma vez que, devido às interferências de variações na linha-base, parcialmente compensadas pela normalização (que só não foi

aplicada nas **Figura 9** e **Figura 10**) e quedas na sensibilidade, também o limite de detecção do método é prejudicado.

Para ressaltar o efeito da luz no resultado final da determinação, foi construída a **Figura 27**, que relaciona o quociente entre coeficientes angular e linear como função do comprimento de onda.

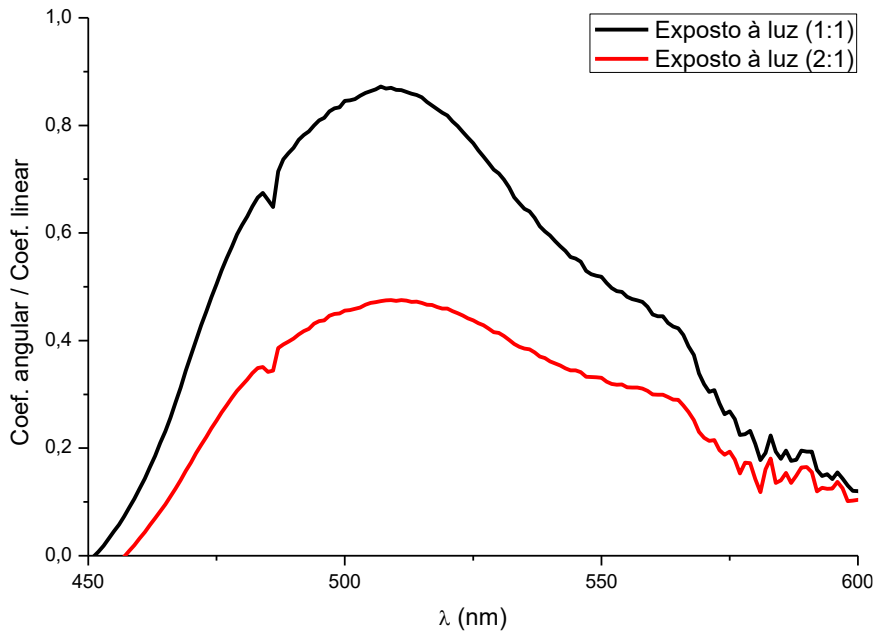


***Figura 27:*** *Comparação dos quocientes entre os coeficientes angular e linear obtidos para curvas de calibração utilizando reagente recém-preparado nas proporções (v/v) 1:1 e 2:1 em função do comprimento de onda (ensaios feitos à temperatura ambiente e sob exposição direta à luz de LED branco - ~34000 lux por 20h).*

O efeito indesejável da iluminação nos ensaios fica mais evidente ao se contrastar a **Figura 27** com a **Figura 20**, com resultados obtidos ao abrigo total da luz. As razões entre o coeficiente angular e o coeficiente linear observadas no máximo a 510 nm caem a menos que ¼ sob iluminância de 34000 lux durante o período de reação.

A iluminação intensa deve ser, portanto, evitada, de modo a não prejudicar os limites de detecção e (consequentemente) de determinação do método. Por ser um inconveniente indesejável ter-se que aplicar o método na ausência de luz, também se

realizou ensaios com exposição uniforme de padrões à iluminação difusa do laboratório, com iluminância na faixa de 300 a 500 lux dependendo do local, durante o processamento da reação. Com a aplicação da normalização de espectros, os resultados sob iluminação difusa se aproximaram dos da **Figura 20**, valendo o mesmo para os limites de detecção. Portanto, os inconvenientes da rigorosa exclusão da luz não se aplicam ao método, sendo tolerável a iluminação difusa normal de laboratório, salvo incidência de luz artificial ou solar intensa e, pior que isso, incidindo de forma não uniforme em todas as amostras e padrões, dando origem a grande dispersão dos dados.

### 4.1.5 Avaliação cinética da reação

Com o intuito de estabelecer uma forma prática e simples de abreviar o tempo necessário para a determinação espectrofotométrica de acetona, avaliou-se o efeito da proporção entre acetona e reagentes, bem como do aquecimento na velocidade e sensibilidade da reação. Inicialmente serão apresentados e discutidos resultados do andamento da formação do produto colorido ao se variar o meio reacional à temperatura ambiente para, em seguida, apresentar resultados obtidos mediante aquecimento.

A **Figura 28** mostra o desenvolvimento da absorbância do meio reacional à temperatura ambiente para a proporção 1:1 (v/v) entre reagente recém-preparado ou envelhecido (ao abrigo da luz por ~20h) e acetona nas primeiras 5 h de reação. Neste ensaio, misturou-se 0,5 mL da solução reagente e 0,5 mL de solução contendo 16,6 mg $L^{-1}$ de acetona (ou 8,3 mg $L^{-1}$ após a diluição com o reagente).

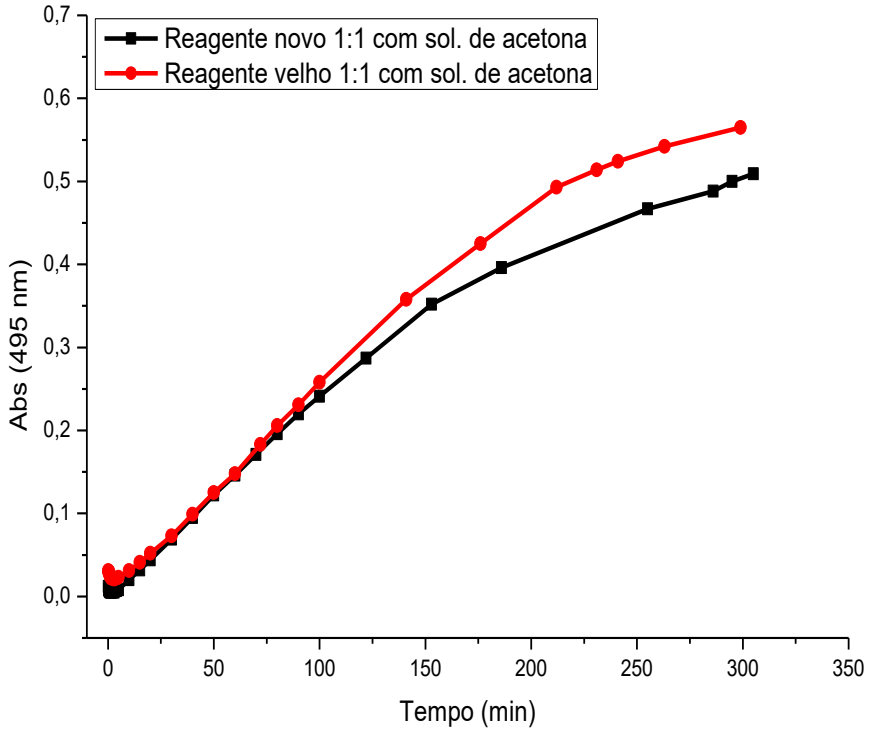


***Figura 28:*** *Comparação do desenvolvimento das primeiras 5 h de reação em função do tempo, quando utilizados reagente recém-preparado e envelhecido ao abrigo da luz por ~20 h, à temperatura ambiente.*

Nota-se, na **Figura 28**, que a formação do produto colorido não tem início imediato, só ocorrendo após alguns minutos (~5 min). Observa-se até mesmo um ligeiro decréscimo inicial da absorbância, mais nítido para a solução envelhecida por 20 h, que apresenta absorbância inicial um pouco mais elevada quando comparada ao reagente novo. Por se afastar dos objetivos, não se buscou esclarecer a origem desse processo, aparentemente, de indução ou formação de intermediário de reação. Posteriormente ocorre subida linear da absorbância, com inclinação quase idêntica para as duas preparações até aproximadamente 100 min, seguida de gradual declínio do coeficiente angular, um pouco mais acentuado para o reagente novo, abrindo uma diferença de cerca de 16% em favor da absorbância do reagente envelhecido após cerca de 300 min (5 h). Já é sabido de estudos anteriores (BATISTA, 2010) que, ao menos na proporção 1:1, a

absorbância atinge seu valor máximo, ao redor de 1,2 e estável após 10 h.

Também foram avaliadas as cinéticas em outras proporções (v/v) com reagente recém-preparado, a saber: 1:1, 2:1, 5:1 e 10:1. As concentrações iniciais de acetona no meio reacional foram, respectivamente 8,3 (como já mencionado), 5,3, 2,8, e 1,5 mg $L^{-1}$. Na **Figura 29** abaixo tem-se o andamento da formação do produto de reação nas proporções 1:1 e 2:1. Dobrar a proporção (v/v) de solução reagente, por exemplo, implica tanto na diluição da solução de acetona a $9{,}53.10^{-5}$ mol $L^{-1}$ como no aumento da concentração de salicilaldeído e também de hidróxido na solução final para 0,073 e 3,12 mol $L^{-1}$, respectivamente.

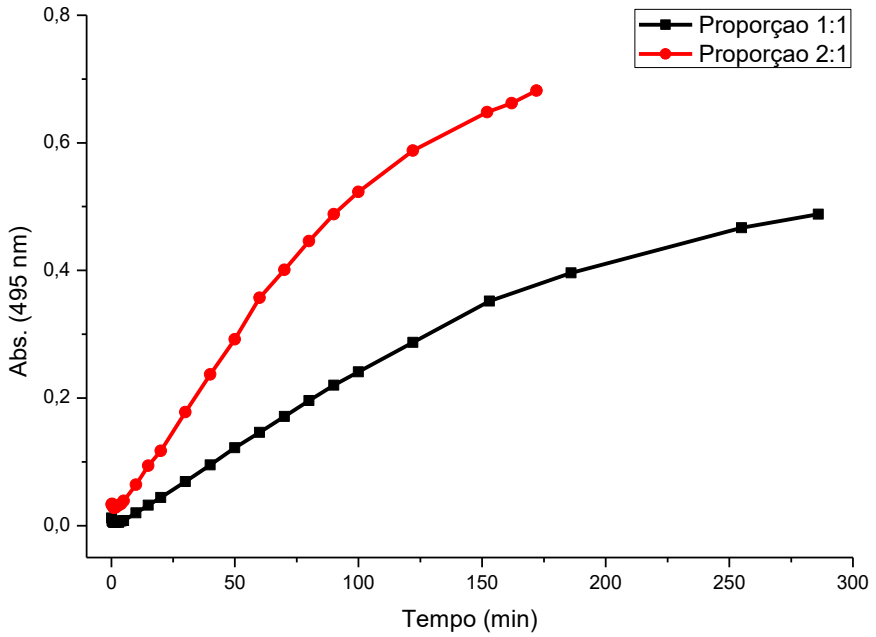


***Figura 29:*** *Comparação do desenvolvimento das primeiras 5 h de reação utilizando reagente recém-preparado nas proporções (v/v) 1:1 e 2:1 (ensaios feitos à temperatura ambiente). Concentrações finais de acetona: 8,3 e 5,3 mg $L^{-1}$, respectivamente.*

Verifica-se na figura que, na região inicial linear, o coeficiente angular é cerca de 2,4 vezes maior na proporção de 2:1 frente a 1:1. Levando em conta também a concentração

inicial menor de acetona, essa razão sobe para 3,6. A tendência à estabilização do sinal também se manifesta antes na proporção 2:1, bastando 150 min para que o coeficiente angular caia a aproximadamente um 1/3, o que só ocorre após 300 min na proporção 1:1. Na **Figura 30** pode-se observar duplicação adicional do coeficiente angular ao passar de proporção 2:1 para 5:1 ou 10:1. Levando em conta a diluição da acetona, o ganho na velocidade inicial da reação de sua condensação aldólica com salicilaldeído se aproxima de 3,8 e 7,0 vezes, respectivamente, ou algo ao redor de 14 e 25 vezes frente à proporção 1:1.

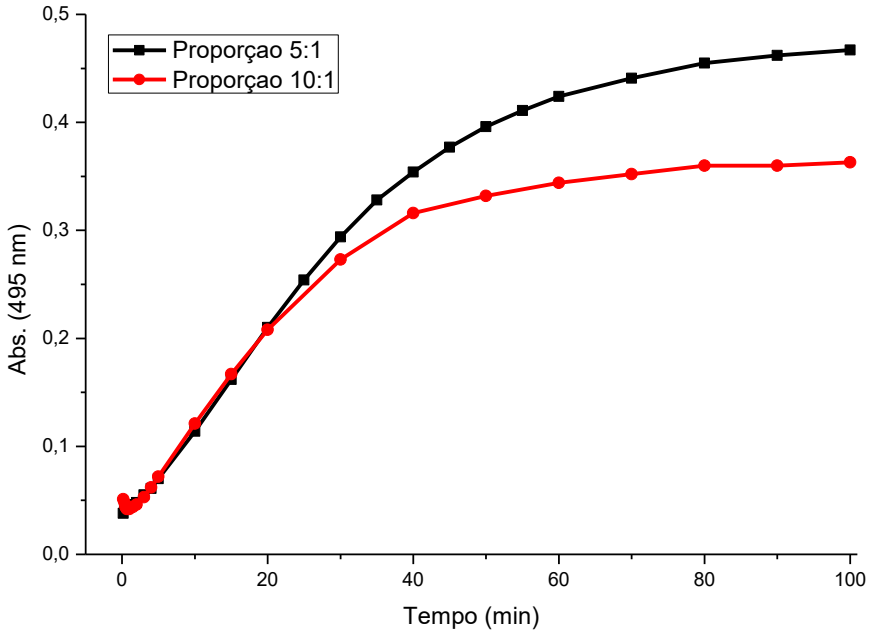


***Figura 30:*** *Comparação do desenvolvimento dos primeiros 100 min de reação utilizando reagente recém-preparado nas proporções (v/v) 5:1 e 10:1 (ensaios feitos à temperatura ambiente). Concentrações finais de acetona: 2,8 e 1,5 mg $L^{-1}$, respectivamente.*

Como mostrado na **Figura 31**, no qual a reação foi desenvolvida por ~1 h em duas condições (abrigo total da luz e exposição direta a luz de LED – 34000 lux), o efeito da iluminação é maior, por conta da maior concentração de salicilaldeído (0,10 mol $L^{-1}$).

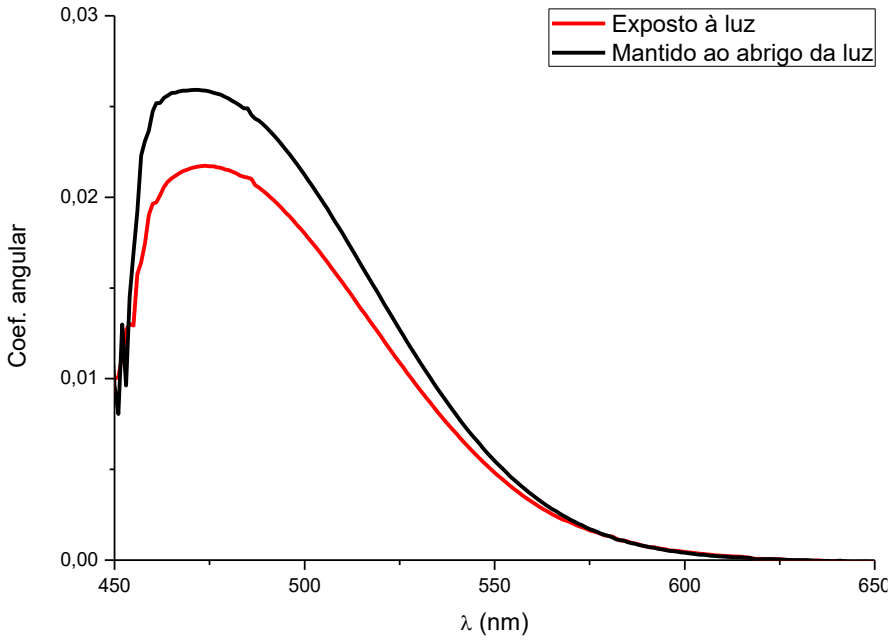


***Figura 31:*** *Estudo da influência da luz nos coeficientes angulares obtidos utilizando reagente recém-preparado na proporção (v/v) 10:1 em função do comprimento de onda (feitos à temperatura ambiente).*

Entretanto, como se observa na **Figura 32**, a iluminação pouco influencia no coeficiente linear obtido. Talvez por conta do curto tempo de exposição (~1 h), o reagente escureça muito menos frente ao observado anteriormente em outras preparações (expostas por pelo menos 20 h à luz), que tiveram escurecimento muito mais evidente.

De modo a visualizar mais claramente o efeito da luz, apesar do tempo de exposição 20 vezes menor, foi construída a **Figura 33** que relaciona a razão entre os coeficientes angular e linear como função do comprimento de onda.

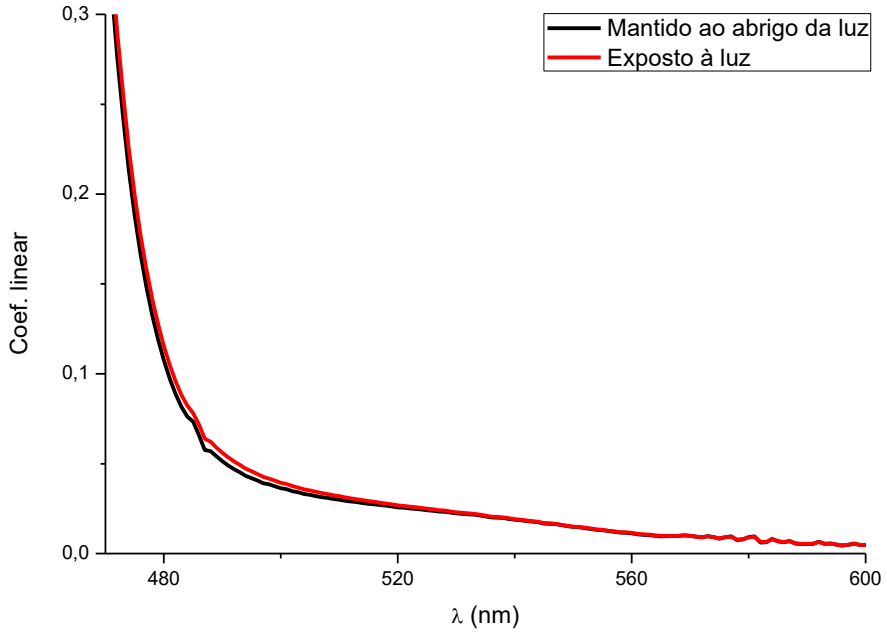


***Figura 32:*** *Estudo da influência da luz nos coeficientes lineares das curvas de calibração obtidos utilizando reagente recém-preparado na proporção (v/v) 10:1 em função do comprimento de onda (feitos à temperatura ambiente).*

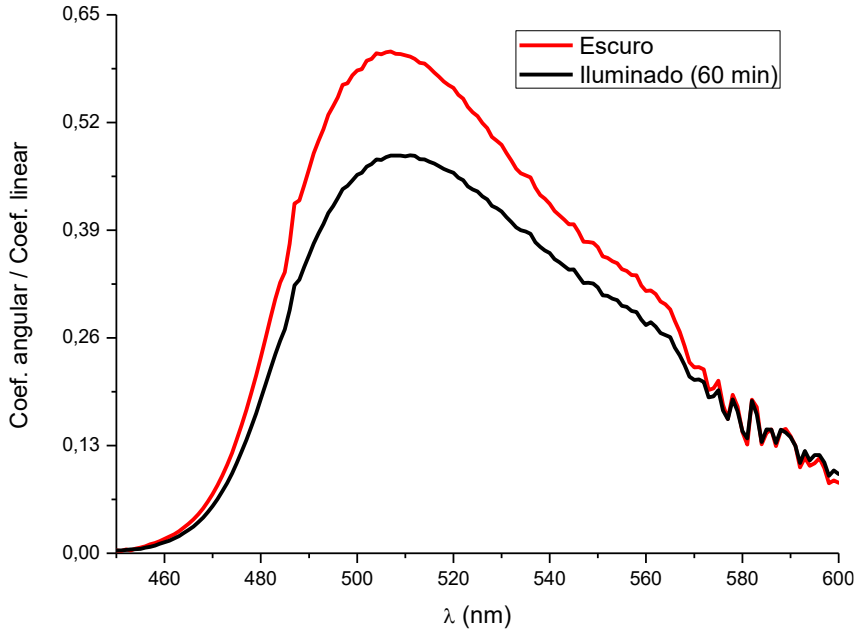


***Figura 33:*** *Estudo da influência da luz na razão entre coeficientes angular e linear obtidos para curvas de calibração obtidas com reagente recém-preparado na proporção (v/v) 10:1 em função do comprimento de onda (feitos à temperatura ambiente).*

Ao se comparar os coeficientes angulares das curvas de calibração nas proporções 1:1 (**Figura 22**, 20 h de reação, 25±5 °C) com 10:1 (**Figura 31**, 1 h de reação 25±5 °C), observa-se declínio de aproximadamente 5 vezes, o que não impediu que se fizesse determinações de acetona com razoável precisão, como mostrado na **Tabela 3**, que reproduz os limites de detecção obtidos para as curvas na proporção 1:1 e 10 :1.

***Tabela 3**: Limites de detecção em fase aquosa obtidos nas determinações ao abrigo da luz utilizando proporção 1:1 (~20 h de reação) e 10:1 (~30 min de reação), calculados assumindo que o desvio padrão do branco é igual ao desvio padrão da regressão.*

| Proporção Reagente/solução com acetona | Limite de detecção a 495 nm (mg $L^{-1}$ em fase aquosa) |
|---|---|
| **1:1** | 0,47 |
| **10:1** | 0,34 |

Nesses ensaios de observação da cinética inicial de reação, também foi avaliado o efeito da concentração de NaOH mediante adição de solução concentrada (425 g $L^{-1}$ = 10,6 mol $L^{-1}$), visando acelerar a determinação. Imediatamente após misturar o reagente usual com a solução contendo acetona na proporção 5:1, injetou-se e misturou-se 500 µL de solução concentrada de NaOH, para então monitorar o desenvolvimento da reação a 495 nm durante 1 h, encontrando-se os resultados na **Figura 34**.

Um fato corriqueiro indesejável, evidenciado nesta figura, é a precipitação de parte do salicilaldeído dissolvido ao se aumentar a concentração de NaOH no meio reacional por injeção de solução concentrada (10,6 mol $L^{-1}$). Em geral, o problema era contornado com agitação do balão em que se preparava a solução com subsequente imersão em banho de ultrassom até que se desaparecesse a turvação. Entretanto, a preparação para o teste cinético (solução reagente + NaOH + solução contendo acetona) foi feita

diretamente na cubeta em que se acompanhou o desenvolvimento da reação.

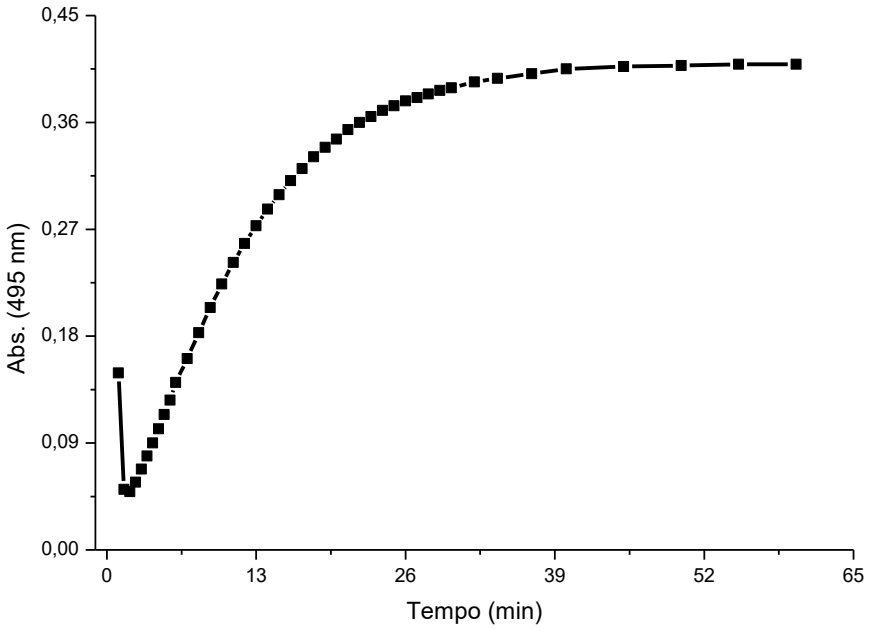


***Figura 34:*** *Desenvolvimento dos primeiros 60 min de reação utilizando reagente recém-preparado na proporção (v/v) 5:1 após adição de 500 µL de NaOH 425 g $L^{-1}$, concentração final de 5,9 mol $L^{-1}$ de NaOH e 0,065 mol $L^{-1}$ de salicilaldeído (ensaio feitos à temperatura ambiente). Concentração final de acetona: 1,9 mg $L^{-1}$.*

A turbidez provocada pela presença de partículas de salicilaldeído em suspensão dentro da cubeta explica a absorbância inicial mais alta. Após a adição da solução aquosa de acetona perdeu-se cerca de 1,5 min da coleta de dados para redissolver o material por agitação vigorosa na própria cubeta.

Grande elevação da concentração de NaOH tem como vantagem a maior rapidez da reação, mas a dificuldade em redissolver as partículas de salicilaldeído é um inconveniente que inviabiliza a aplicação rotineira do método a um número maior de amostras reais. Tanto é assim que uma tentativa de aplicação dessas condições de elevada concentração de NaOH a um lote de amostras oriundas do hospital foi malsucedida, levando ao descarte das amostras e dos dados.

Levando em conta essa limitação, registrou-se curvas cinéticas para concentrações

intermediárias de hidróxido de sódio, representadas na **Figura 35**.

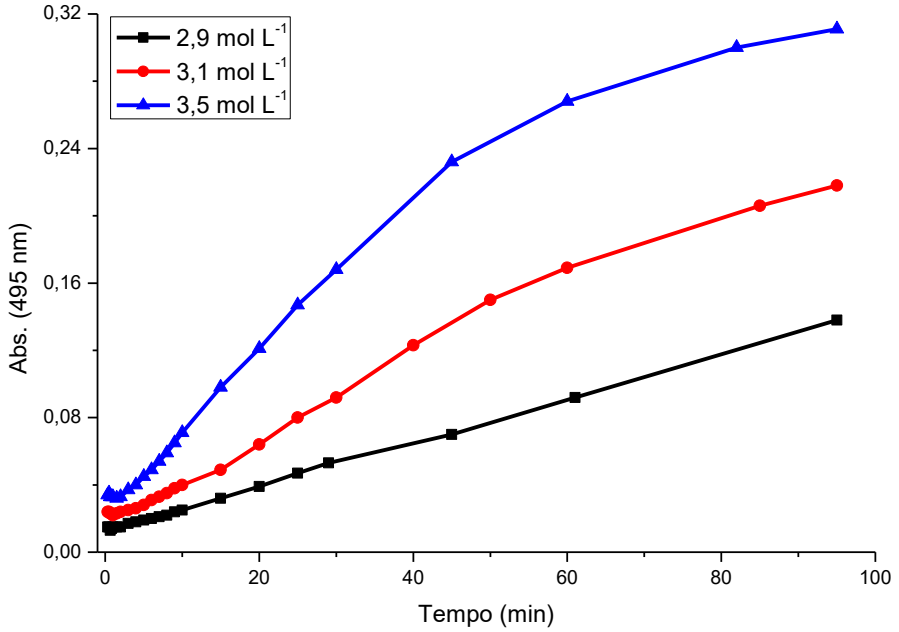


***Figura 35:*** *Desenvolvimento dos primeiros 95 min de reação utilizando reagente recém-preparado na proporção (v/v) 5:1 após adição de 500 µL de soluções de NaOH, originando concentrações finais de 2,9, 3,1 e 3,5 mol $L^{-1}$ de NaOH e 0,065 mol $L^{-1}$ de salicilaldeído (ensaios feitos à temperatura ambiente). Concentração final de acetona: 1,9 mg $L^{-1}$.*

Reunindo os coeficientes angulares da região linear das curvas das **Figuras 34** e **35** na **Figura 36**, constata-se que a velocidade aumenta de forma aparentemente linear ao longo do intervalo estudado, mostrando ser vantajoso, sob este aspecto, trabalhar na mais alta concentração acessível de NaOH (sem turvação). Não se efetuou medições para concentrações de NaOH inferiores a 2,9 mol $L^{-1}$, mas a velocidade deve se aproximar rapidamente de zero (obviamente sem se tornar negativa, como poderia fazer supor a extrapolação da reta aparente na **Figura 36**).

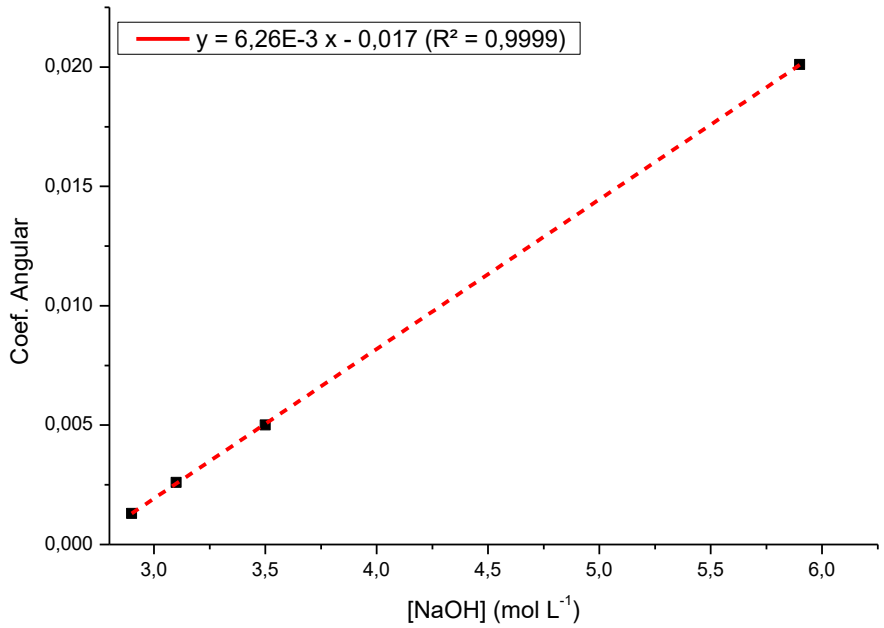


***Figura 36:*** *Coeficientes angulares (A min$^{-1}$) das regiões iniciais lineares das curvas das Figuras 34 e 35 em função da concentração final de NaOH, nas mesmas condições das figuras citadas.*

Para o ensaio com 2,9 mol L$^{-1}$ de NaOH, o comportamento (linear) da reação é semelhante ao observado quando utilizada a proporção 1:1, no procedimento tradicional (vide **Figuras 29** e **30**), ocorrendo o mesmo com as concentrações dos componentes dos meios reacionais, afora a concentração de acetona, que é 3 vezes menor na proporção 5:1.

Outra alternativa avaliada para a acelerar a reação foi o efeito do aquecimento. Já é sabido da literatura que a absorbância final do produto é menor quando a reação é feita a quente (BERNTSSON, 1956) e que ocorre forte aceleração, levando à adoção de temperatura tão alta como 95º C num sistema em fluxo operado sob pressão (TESHIMA et al., 2005). Para o presente estudo, escolheu-se duas proporções, 1:1 e 10:1, e algumas temperaturas mantidas com auxílio de banho termostático. Para a proporção 1:1, testou-se 50, 60 e 70 °C, encontrando-se os resultados na **Figura 37**, enquanto que para a proporção 10:1 aplicou-se 40, 50 e 60 °C, resultando a **Figura 38**. Baterias de 12 a 15

frascos de reação foram preparadas e mantidas no banho termostático pelo período indicado no eixo das abcissas e imediatamente lidas (~30 s, o suficiente para transferir a solução para a cubeta e colocá-la no espectrofotômetro).

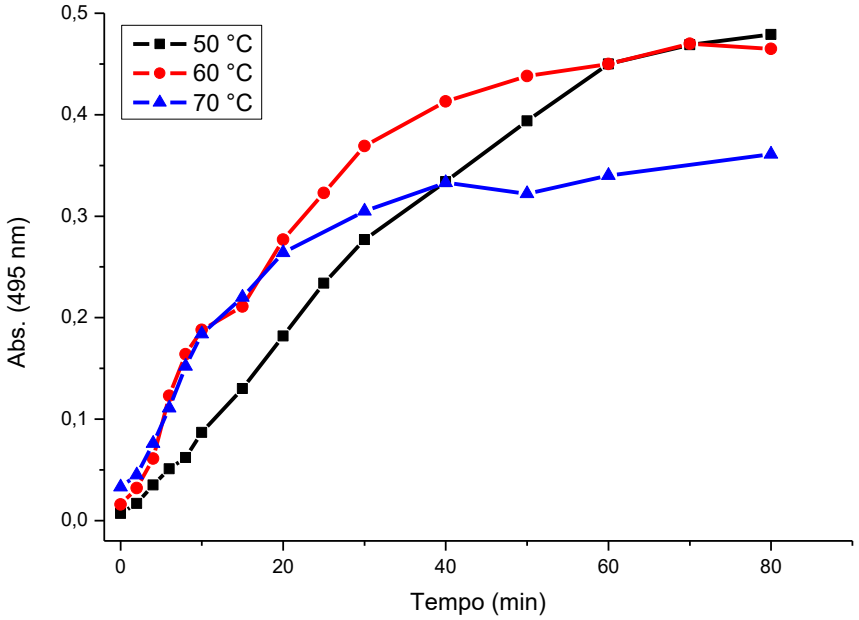


***Figura 37:*** *Desenvolvimento dos primeiros 60 min de reação utilizando reagente recém-preparado na proporção (v/v) 1:1 sob aquecimento a 50, 60 e 70 °C.*

Para os testes feitos nas condições supracitadas e utilizando reagente novo, na proporção 1:1 (v/v), foi verificada a possibilidade de redução do tempo de determinação, para 60 min a 50 °C, 40 min a 60 °C e 30 min a 70 °C. No entanto, contrapõe-se a essa economia considerável (esperada e favorável) de tempo a queda bastante significativa na resposta à acetona. Situação semelhante foi observada na proporção 10:1 (v/v), conforme mostrado na **Figura 38**.

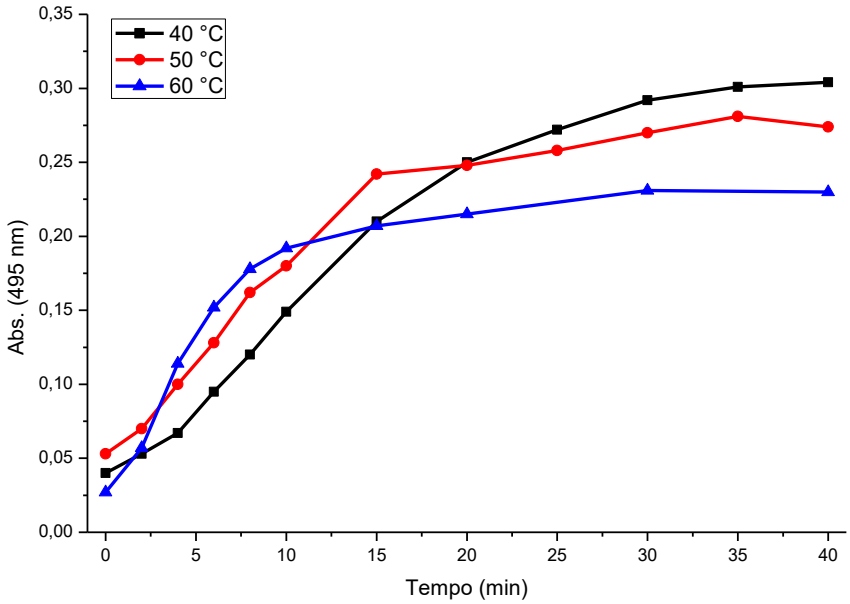


***Figura 38:*** *Desenvolvimento dos primeiros 60 min de reação utilizando reagente recém-preparado na proporção (v/v) 10:1 sob aquecimento a 40, 50 e 60 °C.*

Para ambas as proporções, a temperatura que parece ser a mais razoável, ao se priorizar o menor tempo para a realização do ensaio em detrimento da queda da sensibilidade, é 60 °C. Para a proporção 1:1 o tempo de reação é reduzido de 10 h à temperatura ambiente de 25±5 °C para aproximadamente 60 min a 60 °C, enquanto para a proporção 10:1, a partir de 10 min a 60 °C já se obtém medida relativamente estável, desde que se adote um tempo fixo de imersão no banho e de efetivação da medição, como se verá a seguir.

Foi também avaliado como a absorbância estabiliza após o meio reacional ter sido tirado do aquecimento. A proporção escolhida foi 10:1 e o aquecimento, 25 min no banho termostático a 60 °C. A solução ainda quente foi transferida para uma cubeta e imediatamente colocado no espectrofotômetro, previamente zerado com água, para monitoramento da absorbância, sendo obtida a **Figura 39**.

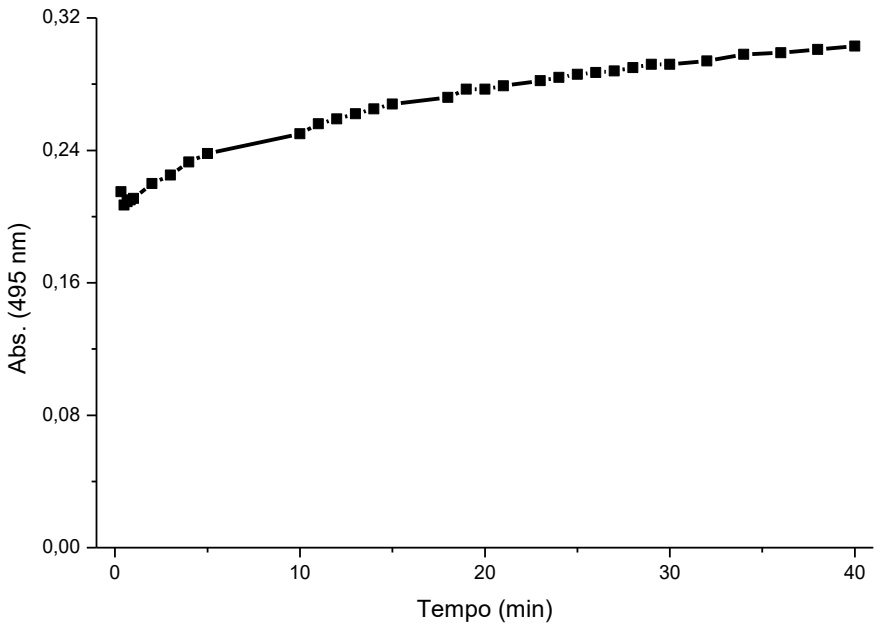


***Figura 39:*** *Desenvolvimento de absorbância do meio reacional após ser retirado do aquecimento por 25 min a 60 °C (ensaio realizado utilizando reagente recém-preparado na proporção (v/v) 10:1, medição a 495 nm).*

Vê-se na **Figura 39** que a absorbância continuou crescendo, chegando a aumentar quase 50% em 40 min de resfriamento, porém tendendo à estabilização, observada após 80 min. Portanto, a não ser que se aguarde 2 h no total, para efetuar determinações mais rápidas de acetona recorrendo às proporções 10:1 ou 5:1 (dados não mostrados), a temperatura e o período de aquecimento, assim como o tempo de espera até ser feita a medida, uma vez definidos, precisam respeitados para amostras e padrões de forma a conferir repetibilidade e reprodutibilidade ao procedimento.

O aumento de absorbância durante o resfriamento se deve, provavelmente, a uma combinação de fatores que incluem uma posição diferente do equilíbrio de formação do produto à quente e a frio, sendo favorecido o produto à temperatura ambiente, mas bem mais lento o reequilíbrio quando se esfria a solução do que quando volta a aquecê-la. Isso porque, depois de aguardar o reequilíbrio a frio por 2 h ou mais, ao reaquecer a solução a 60 ºC, a absorbância imediatamente diminui cerca de 30%, no caso das

proporções 10:1 e 5:1. Essas observações se alinham com as da literatura (BAHNER; SCHULZE, 1965), de que a cor do produto é mais intensa na solução fria que na solução quente.

Para avaliar a sensibilidade, intensidade de linha-base e a relação entre os dois coeficientes, registrou-se os espectros de um conjunto de padrões de acetona após ~30 min de reação da mistura na proporção 1:1 a 60 °C. Dos dados das curvas de calibração obtidas foram construídas as **Figuras 40** a **42**. Na **Figura 40** constatou-se redução de cerca de 61% na sensibilidade frente às medição à temperatura ambiente, uma desvantagem a ser confrontada com a vantagem da redução do tempo de reação de, no mínimo 10 h a temperatura ambiente para 30 min quando a reação foi conduzida a 60 °C.

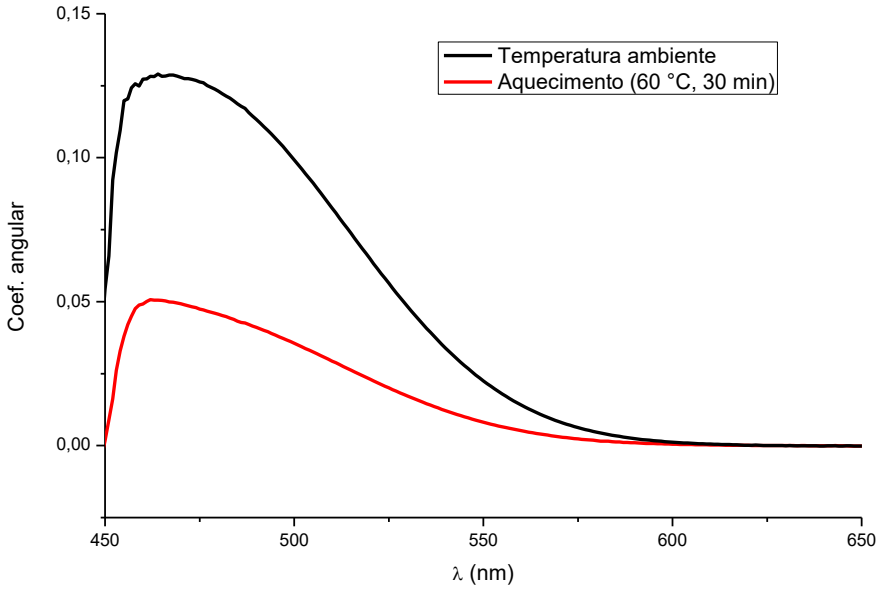


***Figura 40:*** *Comparação dos coeficientes angulares obtidos utilizando reagente recém-preparado na proporção (v/v) 1:1 em função do comprimento de onda, a temperatura ambiente e o coeficiente angular obtido após 30 min de aquecimento a 60 ° C.*

Por haver na literatura relato de escurecimento da solução quando a reação é realizada a quente (BAHNER; SCHULZE, 1965), resolveu-se verificar se esse

comportamento é relevante nas condições das **Figuras 37** e **39**. O espectro do reagente previamente submetido a 30 min de aquecimento a 60 ºC não se diferenciou do obtido sem aquecimento em comprimento de onda superiores a 450 nm, como pode ser visto na **Figura 41**. Em parte, isso pode ser decorrente da efetividade do procedimento de normalização dos espectros, qual seja, subtrair do espectro inteiro a média das absorbâncias entre 620 e 640 nm.

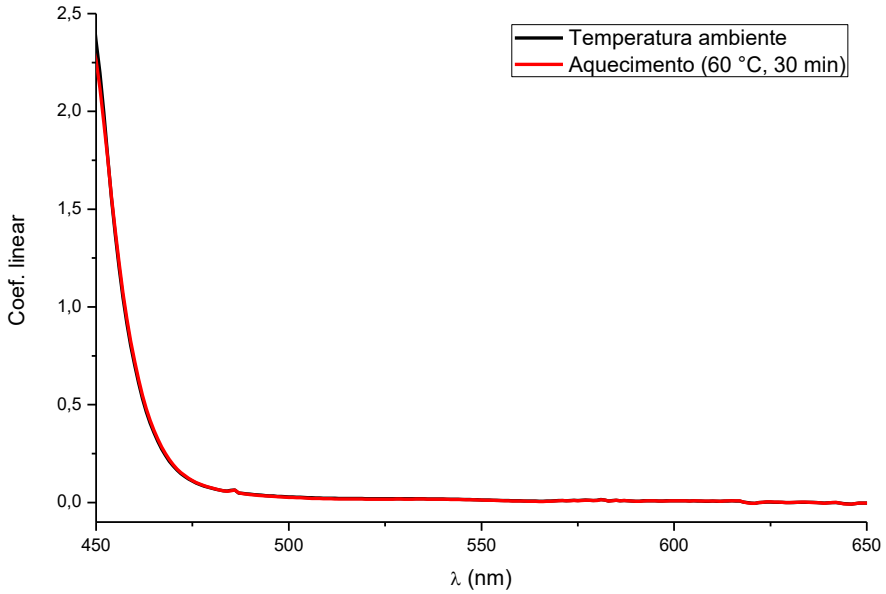


***Figura 41:*** *Comparação dos coeficientes lineares obtidos utilizando reagente recém-preparado na proporção (v/v) 1:1 em função do comprimento de onda, a temperatura ambiente e durante 30 min de aquecimento a 60 º C.*

Ainda, de modo a verificar-se qual o efeito do aquecimento sobre o resultado final da reação, foi construída a **Figura 42**, que mostra a razão entre os coeficientes (angular/linear) como função do comprimento de onda.

Tal como na **Figura 40**, também na **Figura 42** (por serem iguais as curvas da **Figura 41**) se observa queda da ordem de 60% por efeito do aquecimento frente à reação conduzida a temperatura ambiente e sem exposição à luz.

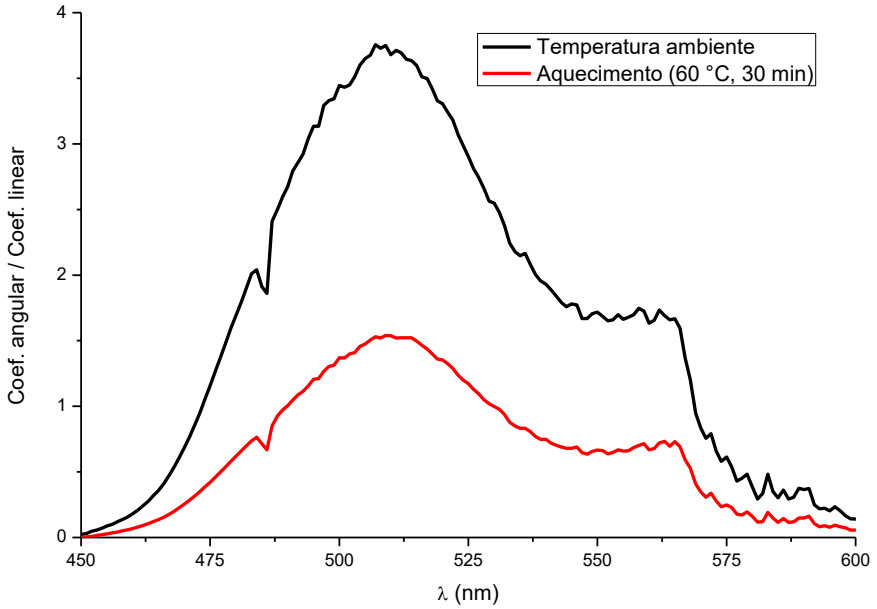


***Figura 42:*** *Comparação das razões entre os coeficientes angular e linear obtidos utilizando reagente recém-preparado na proporção (v/v) 1:1 em função do comprimento de onda, a temperatura ambiente de 25±5 °C e durante 30 min de aquecimento a 60 ° C.*

Revendo as cinéticas reacionais em diversas temperaturas e proporções entre reagente e solução contendo acetona verifica-se que o aquecimento prejudica a sensibilidade do método (agravada na proporção 10:1), aumenta a linha-base, problema compensado pela efetiva normalização, e obriga ao controle dos tempos das etapas. Essas são as desvantagens a considerar quando a rapidez da determinação (~30 min ao invés de 10 h) é o aspecto a prestigiar na aplicação real em vista. Espera de 80 min de reequilíbrio à temperatura ambiente após o aquecimento por 30 min a 60º C na proporção 1:1 representa uma condição intermediária. Quando aceitável o longo tempo de 10 h até a estabilização da absorbância, a melhor condição, em termos de sensibilidade e da menor influência da variação de sinal atribuída ao reagente tomado como branco da determinação, é alcançada à temperatura ambiente, na proporção 1:1. Em qualquer caso, é necessário conduzir a reação sob luz pouco intensa e difusa, evitando o contato

desigual dos frascos contendo o meio reacional com eventuais fontes de luz direta.

Uma alternativa para a redução do tempo de determinação para 30 min ou 1h à temperatura ambiente foi encontrada variando a proporção entre reagente/padrão de acetona para 5:1 (v/v), ao custo de significativa redução da sensibilidade, mas mantendo o limite de detecção próximo do alcançado segundo o método já empregado. Maior redução no tempo de determinação foi obtida usando a proporção 10:1, mas a perda de sensibilidade do método foi ainda mais acentuada.

A **Tabela 4** relaciona a absorbância média a 495 nm e o desvio padrão relativo para 5 replicatas de solução de acetona 1,00 mg $L^{-1}$, utilizando o procedimento tradicional, o aquecimento e a proporção 5:1. Para esses pequenos conjuntos de dados, o método com aquecimento acabou dando o limite de detecção mais favorável mesmo com sensibilidade prejudicada, mas, como dito, o procedimento envolve mais etapas a serem executadas com alta repetibilidade.

***Tabela 4**: Absorbância média (495 nm) e desvio padrão relativo para determinação de acetona nos dois procedimentos propostos, comparados com o método tradicional (concentração 1,00 mg $L^{-1}$), 5 replicatas.*

| Procedimento | Absorbância média | Desvio padrão relativo (%) | Limite de detecção (mg $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| **Aquecimento** (~ 75 min, 60 °C, proporção 1:1) | 0,055 | 4,1 | 0,16 |
| **Proporção 5:1** (~75 min, 25 °C) | 0,071 | 2,6 | 0,36 |
| **Tradicional** (~20 h de reação, 25 °C, proporção 1:1) | 0,088 | 1,8 | 0,47 |

### 4.1.6 Avaliação da conservação do reagente

Foi avaliado o tempo de conservação da solução-reagente, constituída de salicilaldeído 0,11 mol $L^{-1}$ em meio de NaOH 4,68 mol $L^{-1}$. Para isso, foi preparada uma solução-reagente seguindo o procedimento tradicional e mantida sob refrigeração (temperatura de ~5 °C, iluminação somente ao se abrir a geladeira) durante 26 dias, quando o ensaio foi interrompido por se observar formação de precipitado no fundo do frasco em que a solução reagente estava armazenada. Periodicamente foram retiradas alíquotas cujas absorbâncias foram medidas no espectrofotômetro a 495 nm. A **Figura 43** mostra os dados obtidos.

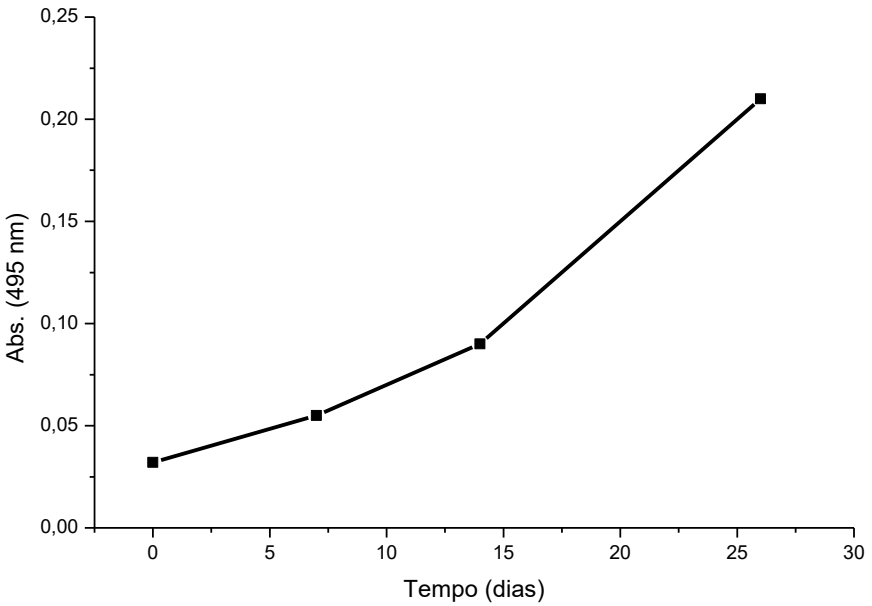


***Figura 43:*** *Escurecimento do reagente (salicilaldeído 0,11 mol $L^{-1}$ + NaOH 4,68 mol $L^{-1}$), durante estocagem em geladeira por 26 dias. Medições discretas feitas a 495 nm contra cubeta de plástico contendo água deionizada.*

Observa-se na figura que o escurecimento da solução reagente cresce com tendência exponencial durante o período de estocagem na geladeira. Foi descartada a possibilidade de contaminação da solução por alguma acetona que pudesse estar na fase gasosa dentro da geladeira junto com o frasco contendo o reagente, pois dados

preliminares revelaram que o frasco utilizado (tubo Eppendorf de 2 mL, polietileno), possui paredes relativamente espessas, permitindo que pouquíssima ou nenhuma acetona permeie o frasco e entre em contato com a solução armazenada nele; mesmo quando os frascos foram colocados em contato direto com vapor de acetona, não foi observada contaminação significativa após aproximadamente 10 h de exposição dos frascos fechados em recipiente saturado de vapor de acetona.

Uma alternativa avaliada foi conservar a solução-reagente de salicilaldeído com baixa concentração de NaOH (0,43 mol $L^{-1}$) na geladeira, elevando-a para 4,68 mol $L^{-1}$ somente no momento do uso. Isso baseado na suposição de que a presença de alta concentração de NaOH acelera o escurecimento da solução. Na prática, observou-se um escurecimento ainda mais rápido nessas condições. Além disso, foi constatada redução da eficiência de conversão da acetona em moléculas do produto colorido, ou seja, tanto a sensibilidade quanto a absorbância do branco ficaram prejudicadas mais rapidamente, razão pela qual não se coletou dados mais completos.

Desse modo, ainda é necessário que se prepare o reagente no mesmo dia em que será utilizado, o que requer a devida familiaridade ou treinamento da parte de quem for executá-la, se não se tratar de um químico ou outro profissional habilitado. Isso porque há que tomar os devidos cuidados também com aspectos de segurança na manipulação de NaOH e do salicilaldeído. Naturalmente, também será necessário zelar para que não haja contaminação por acetona gasosa tanto no local de coleta como naquele em que será feita a determinação (se for outro), visto que a correção introduzida pela obtenção de “brancos” se torna crescentemente imprecisa com o aumento da contaminação.

### 4.1.7 Aplicação a amostras reais

Com base nos resultados acima discutidos, resolveu-se selecionar três procedimentos promissores no atendimento dos objetivos da dissertação e compará-los com o método tradicional em uso rotineiro mediante aplicação a amostras reais de acetona exalada coletadas no INCOR-FM-USP. Avaliou-se, portanto, comparativamente, 4 procedimentos, a saber: (i) método tradicional, usando proporção 1:1 entre reagente e solução contendo acetona, com tempo de reação de pelo menos 10 h à temperatura ambiente (25±5 °C); (ii) procedimento (i), afora a temperatura, elevada para 60 °C em banho termostatizado, e tempo de reação reduzido para 60 min, medição imediata, a quente; (iii) utilização de proporção 5:1 entre reagente e acetona, sem aquecimento; (iv) utilização da proporção 5:1 entre reagente e solução contendo acetona com adição de 0,5 mL de solução de NaOH 425 g $L^{-1}$, sem aquecimento. Todas essas aplicações a amostras reais foram efetuadas empregando um espectrofotômetro Femto, sem varredura, operado em comprimento de onda fixo de 495 nm.

Não foi possível realizar as medições pelo procedimento (iv) por causa da precipitação do salicilaldeído. As tentativas de redissolução incluíram: agitação utilizando agitador Vortex, banho de ultrassom por ~15 s e agitação manual vigorosa. Os sólidos não se redissolveram e continuavam em suspensão após 3 dias.

Na **Figura 44** apresenta-se a comparação das curvas de calibração para os procedimentos (i) e (iii), que diferem somente na proporção entre reagente e solução com acetona, respectivamente, 1:1 e 5:1.

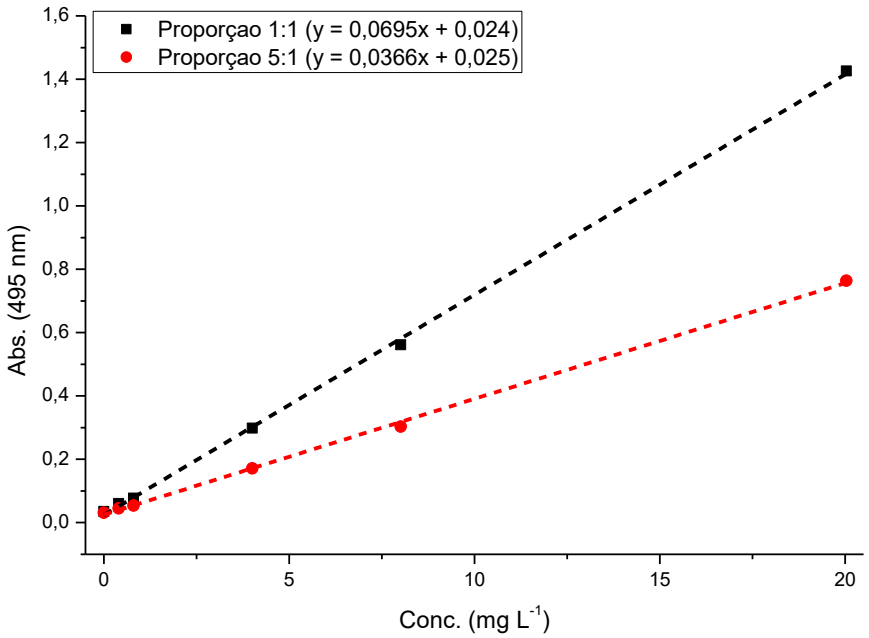


***Figura 44:*** *Comparação entre curvas de calibração obtidas pelo método tradicional, afora λ alterado de 474 nm para 495 nm (proporção 1:1, ao abrigo da luz, leitura após ~20 h) e o modificado para proporção 5:1 de reagente para amostra (ao abrigo da luz direta, leitura após 1 h, a 495 nm).*

A **Figura 44** comprova, conforme já apresentado acima, a redução de 47 % da sensibilidade ao se diminuir de 77% a concentração de acetona na mistura reacional, mudando a proporção de 1:1 para 5:1. O limite de detecção foi menos afetado, subindo de 0,57 mg $L^{-1}$ para 0,75 mg $L^{-1}$ (ligeiramente superiores aos da **Tabela 4** e obtidos com menos pontos).

Aplicação dos dois métodos a um conjunto de 10 amostras reais coletadas no INCOR originou a **Figura 45**, que mostra a perfeita correlação entre as concentrações em fase aquosa obtidas pelo método proposto e pelo método tradicional. Ao fazer as análises estatísticas (testes F e t) não foram encontradas diferenças significativas ao nível de 95 % entre as médias dos resultados ao utilizar a proporção 5:1 ou 1:1 tradicional, validando o método modificado. Pode-se afirmar, portanto, que a simples alteração na proporção reagente/solução da amostra de acetona proporciona ganho de uma ordem de grandeza

no tempo necessário para a determinação sem prejuízo comprometedor no limite de detecção ou complicações no procedimento ou ainda com precipitação ou turvação da solução.

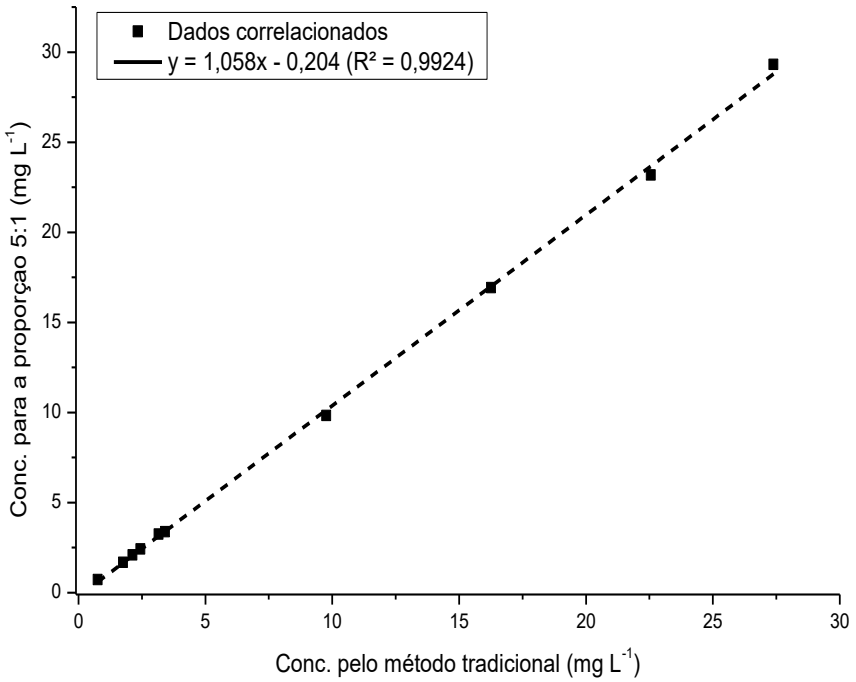


***Figura 45:*** *Correlação entre os dados obtidos para os dois procedimentos (tradicional e proporção 5:1) aplicadas a um conjunto de 10 amostras coletadas no hospital.*

Para as determinações com reação feita sob aquecimento a 60 °C por ~30 min, a comparação entre as curvas de calibração também mostrou a redução na sensibilidade do método contrapondo-se ao ganho em tempo de determinação, como já foi mostrado anteriormente na seção 4.1.5 como se observa na **Figura 46**. Os coeficientes lineares da reta de regressão linear ajustada aos pontos indicam que não houve escurecimento (que não tenha sido compensado pela normalização) após o aquecimento, em concordância com a Figura 41. A redução de sensibilidade, considerando os coeficientes angulares, foi de 64%. Mesmo assim, o limite de detecção melhorou para 0,16 mg $L^{-1}$, frente a 0,47 mg

$L^{-1}$ para o tradicional, ao menos para o limitado conjunto de dados apresentado na figura, já usado na **Tabela 4**. Para outros conjuntos de dados (e.g., **Figura 17**) o limite de detecção do método tradicional se equipara aos demais).

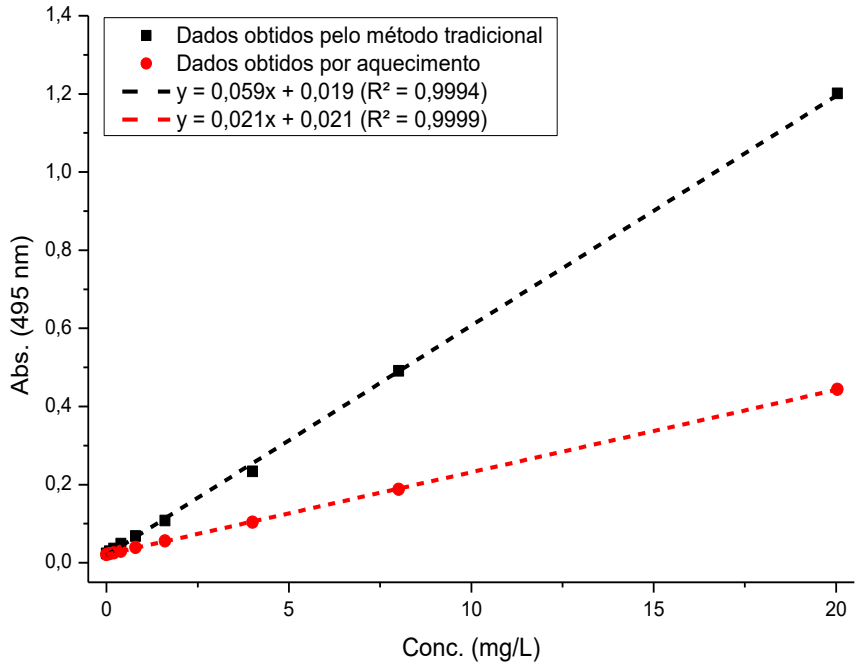


***Figura 46:*** *Comparação entre o método tradicional (proporção 1:1, ao abrigo da luz, temperatura ambiente), e proporção 1:1 sob aquecimento (60°C, 30 min).*

Aplicação a um conjunto de 14 amostras reais permitiu a construção da **Figura 47**, que mostra a elevada correlação entre as concentrações em fase aquosa obtidas pelos procedimentos (i) e (ii). Ao fazer as análises estatísticas (testes F e t) não foram encontradas diferenças significativas ao nível de 95 % entre os resultados ao utilizar a proporção 1:1 com aquecimento versus 1:1 a temperatura ambiente, validando essa modificação do método, que proporciona redução do tempo de reação para 30 min ou menos de uma hora para o procedimento completo de determinação, possivelmente, com alguma melhora no limite de detecção.

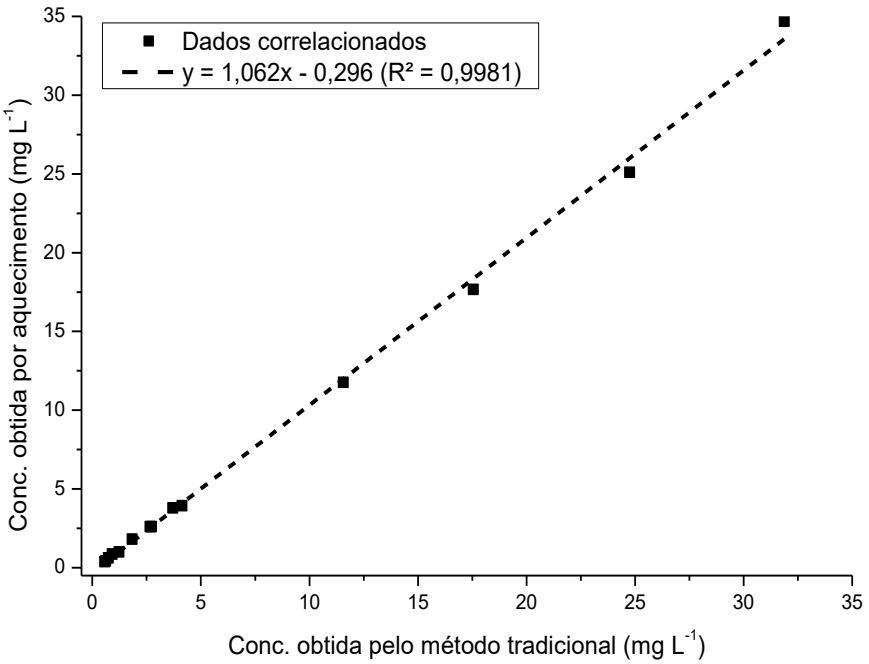


***Figura 47:*** *Correlação entre os dados obtidos para os dois métodos (tradicional e aquecimento – 60 °C, 30 min) aplicadas a um conjunto de 14 amostras coletadas no hospital.*

Tanto na **Figura 45** como na **Figura 47** há amostras (incomuns) com concentrações superiores ao padrão mais concentrado utilizado nas curvas de calibração, mas medições não reportadas aqui para o método tradicional mostraram que a linearidade se mantém nessa região.

É possível, portanto, realizar a determinação de acetona rapidamente, com resultados reprodutíveis e confiáveis, acrescentando etapa simples de aquecimento a 60 °C por 30 min. Entretanto, a temperatura precisa ser bem controlada para que as amostras reais não tenham que ser sempre acompanhadas de padrões, vez que, diferenças de alguns graus Celsius podem afetar os resultados, como observado nas **Figuras 37** e **38** da seção 4.1.5. Banhos termostáticos de laboratório costumam ser grandes, pesados e caros, o que prejudica a portabilidade do método, mas há equipamentos mais simples, portáteis e baratos que poderiam ser avaliados para esse

propósito, por exemplo, aquecedores de marmita ou de mamadeira.

As duas modificações do método oferecem alternativas aplicáveis para se obter os resultados em tempo relativamente curto (em ambas as modificações, foi alcançada redução do tempo de determinação de pelo menos 10 h originalmente para 40 min a 60 min), de maneira confiável, já que foi observada correlação linear com os resultados para a determinação utilizando o método tradicional (proporção 1:1 à temperatura ambiente) e, com base nos testes estatísticos empregados (testes F e t de Student – Microsoft Excel), não foram observadas diferenças significativas entre os resultados frente ao procedimento tradicional.

Os valores de concentração encontrados para as amostras reais oriundas do hospital mostram que apesar da redução da sensibilidade dos métodos (em torno de 50 %), o resultado final não fica prejudicado, ou seja, ainda assim é possível fazer as medições. Além disso, foi constatado que há pouca interferência em termos do limite de detecção, para qualquer uma das modificações nos métodos.

### 4.1.8 Método aperfeiçoado – procedimento

Em vista do estudos, resultados e aplicações apresentadas, considerou-se que o método aperfeiçoado mais acessível para uso prático rotineiro, com melhora na rapidez, decréscimo aceitável da sensibilidade e preservação do limite de detecção e da reprodutibilidade sem introdução de nova etapa, como aquecimento, no procedimento consiste, simplesmente, em: (i) mudar a proporção entre reagente e solução contendo acetona, tradicionalmente 1:1, para 5:1; (ii) alterar o comprimento de onda de 474 para 495 nm; (iii) em se usando espectrofotômetro de varredura, aplicar a normalização do

espectro por subtração da média de absorbância entre 620 e 640 nm; (iv) usar reagente preparado no mesmo dia e guardado ao abrigo da luz; (v) evitar exposição desigual de amostras e padrões à luz ambiente difusa. Segue o procedimento estabelecido:

Inicialmente, prepara-se solução estoque de NaOH aproximadamente 10 mol $L^{-1}$ dissolvendo lentamente 80 g de NaOH em lentilhas adicionando-as lentamente, sob agitação, a 186 mL de água em um béquer de 500 mL (em banho de água ou de gelo). Guarda-se a solução rotulada em recipiente de polietileno de paredes espessas. Diariamente, prepara-se 50 mL de solução reagente (suficiente para ≈40 determinações), adicionando a um balão volumétrico de 50 mL, em sequência: 20,0 mL de água, 1,0 mL de NaOH 10 mol $L^{-1}$; 600 µL de salicilaldeído, sob agitação vigorosa; lentamente para ocorrer menos precipitação, 25,0 mL de NaOH 10 mol $L^{-1}$. Em seguida, agita-se e completa-se o volume até a marca com água. Se persistir a turvação, coloca-se o balão em banho de ultrassom até que esta desapareça.

Para efetuar a reação utiliza-se microtubos do tipo Eppendorf (1,5 ou 2,0 mL). Adiciona-se 1,00 mL solução reagente a todos os tubos e acrescenta-se a cada tubo 200 µL de solução de um padrão ou amostra contendo acetona ou água (branco). Agita-se e deixa-se reagir por pelo menos uma hora ao abrigo da luz. Finalmente, transfere-se, com auxílio de pipeta ou conta-gotas, o conteúdo de cada tubo para cubeta de plástico, vidro ou quartzo (rigorosamente iguais). Seleciona-se o comprimento de onda de 495 nm no espectrofotômetro em 495 nm, ajusta-se o valor da absorbância em zero com água deionizada e procede-se a medida do branco, padrões e amostras (a medida do branco vs. água serve para verificar se o reagente envelheceu). O número de padrões, tipicamente de 6 ou 7 para obtenção de resultados quantitativos em ampla faixa,

dependendo da finalidade, pode ser reduzido para 2 ou mesmo um só, e.g. quando se quer somente distinguir entre amostras acima ou abaixo de um valor de corte.

# 5 CONCLUSÃO

As modificações no método analítico para determinação espectrofotométrica de acetona em ar exalado apresentadas nesta dissertação permitiram, no que diz respeito à sua aplicação na colaboração entre os grupos de pesquisa do IQ-USP e do INCOR, obter resultados confiáveis e em tempo significativamente menor do que o procedimento originalmente aplicado. Além disso, foram constatados aspectos novos e confirmados outros já mencionados em trabalhos anteriores, que serão destacados a seguir.

Originalmente, utilizava-se para a determinação espectrofotométrica da acetona, seguindo a literatura, o comprimento de onda no qual era alcançado o máximo de absorção no visível (em torno de 470 nm). No entanto, foi verificado que este comprimento de onda é bastante afetado por variações de absorbância na linha-base, prejudicando a precisão da determinação de amostras com baixas concentrações de acetona, de especial interesse, por se situarem na faixa de discriminação entre pessoas sadias e com insuficiência cardíaca. Concluiu-se que o comprimento de onda poderia ser deslocado até 510 nm, sendo escolhido o de 495 nm como compromisso entre diminuição da sensibilidade e minimização do efeito de flutuações da linha-base devido à condição da solução reagente. Como recurso adicional para melhorar a repetibilidade medições a 495 nm, introduziu-se a normalização dos espectros por subtração da média das absorbâncias entre 620 e 640 nm.

No que se refere ao efeito da luz, já reportado na literatura, comprovou-se que a luz intensa de fato interfere, escurecendo a solução reagente (salicilaldeído + NaOH) antes e durante a reação elevando, consequentemente, o coeficiente linear das curvas de calibração do produto colorido. Mostrou-se, contudo, que para amostras e padrões

expostos à mesma intensidade de luz difusa de laboratórios o efeito no sinal medido é mínimo e similar para todas as soluções, portando, negligenciável, por haver compensação, ainda mais quando se aplica a normalização de espectros proposta. Aconselha-se, todavia, conservar o reagente ao abrigo da luz para utilização posterior.

Mudar a proporção volumétrica entre a solução reagente e a solução contendo acetona (amostra) foi a forma mais simples e efetiva de alcançar resultados rápidos e sem introduzir nenhuma etapa adicional ao método. De algumas proporções testadas, a que apresentou melhor compromisso entre a intensidade do sinal lido ao final do experimento e o tempo do procedimento foi a proporção 5:1. Outra alternativa avaliada para se obter resultados rápidos foi o aquecimento da solução. Resultou mais favorável o procedimento com aquecimento a 60 °C por 30 min, contudo, requer banho de aquecimento e controle dos períodos de tempo das etapas do procedimento. Redução do tempo de determinação para 10 min foi alcançado combinando aquecimento com a modificando a proporção para 10:1, mas a intensidade do sinal foi substancialmente menor do que utilizando somente uma ou outra modificação no método.

Pensando no posterior desenvolvimento de um kit para determinação de acetona fora do laboratório analítico, e.g., junto ao local de amostragem do ar exalado, seja no consultório, clínica ou a beira leito, os estudos e resultados desta dissertação permitem afirmar que o principal fator limitante é a baixa durabilidade da solução reagente (salicilaldeído em meio de NaOH), que precisa ser preparada no dia em que será usada. Isso implica na necessidade treinar o médico, enfermeiro ou técnico a misturar volumes definidos de água, solução estoque de NaOH concentrado e salicilaldeído (ambas com boa conservação) e depois misturar essa solução reagente com as amostras e padrões com precisão analítica e seguindo normas de segurança. Quanto à medição da

absorbância, em substituição aos espectrofotômetros, existem alternativas comerciais simples, baratas e portáteis, como as utilizadas, por exemplo, na análise de águas. Também poderia ser desenvolvido dispositivo microcontrolado dedicado à aplicação, baseado em fotodiodos e LEDs emitindo ao redor de 495 nm e 610 nm, servindo o segundo $\lambda$ para corrigir o efeito do escurecimento da solução. Outra alternativa seria aproveitar recursos de smartphones que, utilizando aplicativo especializado e fotografando o frasco contendo o produto colorido contra fundo iluminado, mediria os sinais RGB correspondentes à cor da solução, permitindo, após calibração, a determinação analítica, ainda que semiquantitativa.

# 6 BIBLIOGRAFIA

AKGUL KALKAN, E.; SAHINER, M.; ULKER CAKIR, D.; ALPASLAN, D.; YILMAZ, S. Quantitative Clinical Diagnostic Analysis of Acetone in Human Blood by HPLC: A Metabolomic Search for Acetone as Indicator. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, Canakkale, v. 2016, 2016.

APARICIO-MARTÍNEZ, E.; OSUNA, V.; DOMINGUEZ, R. B.; MÁRQUEZ-LUCERO, A.; ZARAGOZA-CONTRERAS, E. A.; VEGA-RIOS, A. Room Temperature Detection of Acetone by a PANI/Cellulose/WO3Electrochemical Sensor. **Journal of Nanomaterials**, Chihuahua, v. 2018, 2018.

AWANO, S.; TAKATA, Y.; SOH, I.; YOSHIDA, A.; HAMASAKI, T.; SONOKI, K.; OHSUMI, T.; NISHIHARA, T.; ANSAI, T. Correlations between health status and OralChroma™-determined volatile sulfide levels in mouth air of the elderly. **J. Breath Research**, Kitakyushu, v. 046007, n. 5, p. 1–6, 2011.

BAHNER, V. F.; SCHULZE, G. Bestimmung des Acetons mit Vanillin und mit Salicylaldehyd. **Z. klin. Chem.**, Heidelberg, p. 10–14, 1965.

BATISTA, G. L. **Análise de acetona em ar exalado: metodologia para estudo em pacientes hospitalizados**. São Paulo: IQ-USP, 2010.

BATISTA, G. L. **Análise de acetona em ar exalado: desenvolvimento de método eletroanalítico e algoritmo para processamento de sinais**. São Paulo: IQ-USP, 2015.

BEHRE, J. A.; BENEDICT, S. R. A colorimetric method for the determination of acetone bodies in blood and urine. **Journal of biological chemistry**, New York City, v. 70, p. 487–494, 1926.

BERNTSSON, S. Spectrophotometric Determination of Acetone by the Salicylaldehyde

Method. **Analytical Chemistry**, Gothenburg, v. 28, n. 8, p. 1337, 1956.

BLAIKIE, T. P. J.; COUPER, J.; HANCOCK, G.; HURST, P. L.; PEVERALL, R.; RICHMOND, G.; RITCHIE, G. A. D.; TAYLOR, D.; VALENTINE, K. Portable device for measuring breath acetone based on sample preconcentration and cavity enhanced spectroscopy. **Analytical Chemistry**, Oxford, v. 88, n. 22, p. 11016–11021, 2016.

CHUANG, M. Y.; LIN, Y. T.; TUNG, T. W.; CHANG, L. Y.; ZAN, H. W.; MENG, H. F.; LU, C. J.; TAO, Y. T. Room-temperature-operated organic-based acetone gas sensor for breath analysis. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, Taipei, v. 260, p. 593–600, 2018.

CSONKA, F. A. A colorimetric method for the determination of acetone in urine. **The Journal of biological chemistry**, Pittsburgh, v. 27, n. 1, p. 209–212, 1916.

DUBOWSKI, K. M.; ESSARY, N. A. Response of breath-alcohol analyzers to acetone: Further studies. **Journal of Analytical Toxicology**, Oklahoma, v. 8, n. 5, p. 205–208, 1984.

EVANS, G. P.; BUCKLEY, D. J.; SKIPPER, N. T.; PARKIN, I. P. Single-walled carbon nanotube composite inks for printed gas sensors: Enhanced detection of NO2, NH3, EtOH and acetone. **RSC Advances**, London, v. 4, n. 93, p. 51395–51403, 2014.

FOX, J. R.; SPANNHAKE, E. W.; MACRI, K. K.; TORREY, C. M.; MIHALIC, J. N.; EFTIM, S. E.; LEES, P. S. J.; GEYH, A. S. Characterization of a portable method for the collection of exhaled breath condensate and subsequent analysis of metal content. **Environmental Sciences: Processes and Impacts**, Washington, v. 15, n. 4, p. 721–729, 2013.

GARCÍA DE MARÍA, C.; HUESO DOMÍNGUEZ, K. B.; MARTÍN GARRIDO, N. Flow-injection determination of acetone with diazotized anthranilic acid through a fluorescent reaction intermediate. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], 2007.

GONG, Z. Y.; SUN, M. X.; JIAN, C. Y.; WANG, Z. N.; KANG, M. L.; LI, Y. X.; WANG, C. A

Ringdown Breath Acetone Analyzer: Performance and Validation Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, Tianjin, v. S7, n. 012, 2014.

HUBBARD, R. S. Determination of acetone in expired air. **Journal of biological chemistry**, Clifton Springs, v. XLIII, n. 1, p. 57–65, 1920.

KESHVARI, F.; BAHRAM, M.; FARHADI, K. Sensitive and selective colorimetric sensing of acetone based on gold nanoparticles capped with l-cysteine. **Journal of the Iranian Chemical Society**, Urmia, v. 13, n. 8, p. 1411–1416, 2016.

KETONIX. **The KETONIX Manual v2.1**, 2016. Disponível em: <http://www.ketonix.com/images/PDF/Ketonix-Manual-2.1.pdf>

KONSTANTINIDI, E. M.; LAPPAS, A. S.; TZORTZI, A. S.; BEHRAKIS, P. K. Exhaled Breath Condensate: Technical and Diagnostic Aspects. **Scientific World Journal**, Atenas, v. 2015, 2015.

LI, S. M.; ZHANG, L. X.; ZHU, M. Y.; JI, G. J.; ZHAO, L. X.; YIN, J.; BIE, L. J. Acetone sensing of ZnO nanosheets synthesized using room-temperature precipitation. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, Tianjin, v. 249, p. 611–623, 2017.

MARCONDES-BRAGA, F. G. **Acetona exalada como novo biomarcador do diagnóstico de insuficiência cardíaca**. São Paulo: FM-USP, 2012.

MARCONDES-BRAGA, F. G.; BATISTA, G. L.; BACAL, F.; GUTZ, I. Exhaled Breath Analysis in Heart Failure. **Current Heart Failure Reports**, New York, v. 13, n. 4, p. 166–171, 2016.

MARCONDES-BRAGA, F. G.; GUTZ, I. G. R.; BATISTA, G. L.; SALDIVA, P. H. N.; AYUB-FERREIRA, S. M.; ISSA, V. S.; MANGINI, S.; BOCCHI, E. A.; BACAL, F. Exhaled acetone as a new biomarker of heart failure severity. **Chest**, Glenview, v. 142, n. 2, p. 457–466,

2012.

MOTSEGOOD, P.; LEDDY, J. Detection of Acetone on Human Breath using Cyclic Voltammetry. **ECS Transactions**, Iowa City, v. 41, n. 18, p. 1–7, 2012.

PRABHAKAR, A.; TAO, N. **Portable Sensors for Breath Analysis**, 2013.

RIGHETTONI, M.; AMANN, A.; PRATSINIS, S. E. Breath analysis by nanostructured metal oxides as chemo-resistive gas sensors. **Materials Today**, Zurich, v. 18, n. 3, p. 163–171, 2015.

RIGHETTONI, M.; TRICOLI, A.; PRATSINIS, S. E. Si : WO 3 Sensors for Highly Selective Detection of Acetone for Easy Diagnosis of Diabetes by Breath Analysis. **Anal. Chem.**, Zurich, v. 82, n. 9, p. 3581–3587, 2010.

RYDOSZ, A. Sensors for enhanced detection of acetone as a potential tool for noninvasive diabetes monitoring. **Sensors**, Krakow, v. 18, n. 7, p. 1–14, 2018.

SAASA, V.; MALWELA, T.; BEUKES, M.; MOKGOTHO, M.; LIU, C.-P.; MWAKIKUNGA, B. Sensing Technologies for Detection of Acetone in Human Breath for Diabetes Diagnosis and Monitoring. **Diagnostics**, Pretoria, v. 8, n. 1, p. 12, 2018.

TESHIMA, N.; LI, J.; TODA, K.; DASGUPTA, P. K. Determination of acetone in breath. **Analytica Chimica Acta**, Lubbock, v. 535, n. 1–2, p. 189–199, 2005.

UETA, I.; MIZUGUCHI, A.; OKAMOTO, M.; SAKAMAKI, H.; HOSOE, M.; ISHIGURO, M.; SAITO, Y. Determination of breath isoprene and acetone concentration with a needle-type extraction device in gas chromatography-mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, Kofu, v. 430, p. 156–159, 2014.

UETA, I.; SAITO, Y.; HOSOE, M.; OKAMOTO, M.; OHKITA, H.; SHIRAI, S.; TAMURA, H.; JINNO, K. Breath acetone analysis with miniaturized sample preparation device: In-needle preconcentration and subsequent determination by gas chromatography-mass

spectroscopy. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Toyohashi, v. 877, n. 24, p. 2551–2556, 2009.

VAN DEN VELDE, S.; QUIRYNEN, M.; VAN HEE, P.; VAN STEENBERGHE, D. Differences between alveolar air and mouth air. **Analytical Chemistry**, Leuven, v. 79, n. 9, p. 3425–3429, 2007.

WALLHAUSER, A. **Method for the detection of acetone**, 1928.

WALTON, C.; PATEL, M.; PITTS, D.; KNIGHT, P.; HOASHI, S.; EVANS, M.; TURNER, C. The use of a portable breath analysis device in monitoring type 1 diabetes patients in a hypoglycaemic clamp: Validation with SIFT-MS data. **Journal of Breath Research**, Bedfordshire, v. 8, n. 3, p. 1–19, 2014.

WANG, C. C.; WENG, Y. C.; CHOU, T. C. Acetone sensor using lead foil as working electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 122, n. 2, p. 591–595, 2007.

WANG, Z.; WANG, C. Is breath acetone a biomarker of diabetes? A historical review on breath acetone measurements. **Journal of Breath Research**, Starkville, v. 7, n. 3, 2013.

WORRALL, A. D.; BERNSTEIN, J. A.; ANGELOPOULOS, A. P. Portable method of measuring gaseous acetone concentrations. **Talanta**, Cincinnati, v. 112, p. 26–30, 2013.

ZAGATTO, E. A. G.; ARRUDA, M. A. Z.; JACINTHO, A. O.; MATTOS, I. L. Compensation of the Schlieren effect in flow-injection analysis by using dual-wavelength spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, Piracicaba, v. 234, p. 153–160, 1990.

## SÚMULA CURRICULAR

1. **Dados pessoais**

Nome: Rafael Silva Rinco

Data de nascimento: 12/06/1995

Nacionalidade: Brasileiro

2. **Educação**

Ensino Médio: Escola Paulista, São Paulo, Brasil, 2012.

Bacharelado em Química, Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo, Brasil, 2016

3. **Ocupação**

Bolsista de mestrado, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Agosto/2018 até o presente.

Estagiário, Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – USP, Química Analítica Instrumental, Julho/2017-Novembro/2017.

Monitor, Faculdades Oswaldo Cruz, 2014-2015.