



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**“DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÁCIDOS CAFÊICO E  
CLOROGÊNICO POR FLUORESCÊNCIA”**

Aluna: Larissa Trombetta Palermo

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Campinas, 06 de julho de 2006.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA  
DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

**P174d** **Palermo, Larissa Trombetta.**  
**Determinação simultânea dos ácidos caféico e**  
**clorogênico por fluorescência / Larissa Trombetta**  
**Palermo. -- Campinas, SP: [s.n], 2006.**

*Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.*

*Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Química.*

*1. Ácido caféico. 2. Ácido clorogênico. 3. Calibração  
multivariada. 4. Extratos vegetais. I. Kubota, Lauro Tatsuo. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III.  
Título.*

**Título em inglês:** Simultaneous determination of caffeic and chlorogenic acids by fluorescence

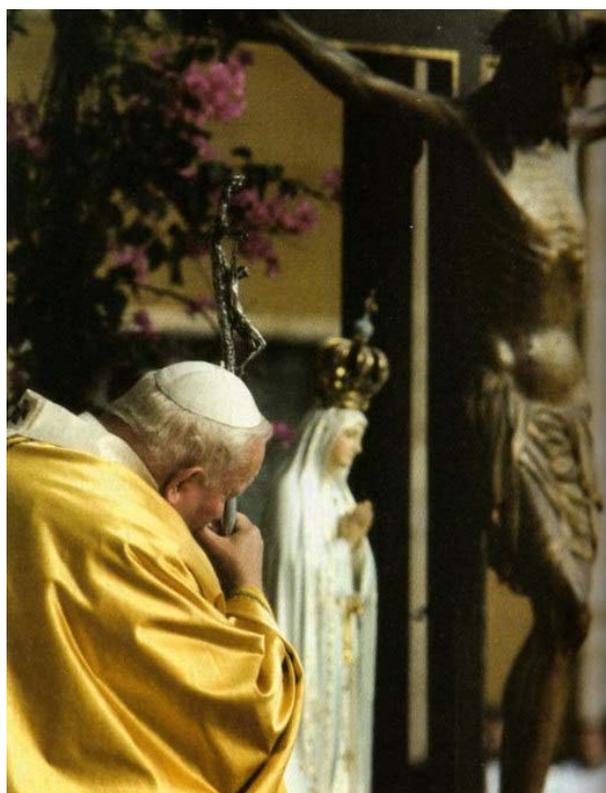
**Palavras-chaves em inglês:** Caffeic acid, Chlorogenic acid, Multivariate calibration, Plant extracts

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Mestre em Química na Área de Química Analítica

**Banca examinadora:** Lauro Tatsuo Kubota (orientador), Adriana Vitorino Rossi, Hideko Yamanaka

**Data de defesa:** 06/07/2006



*“Tudo posso em Cristo que me fortalece”*

*Filipenses 4,13*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Lauro Tatsuo Kubota, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho, e sobretudo pela amizade e compreensão;

Ao Instituto de Química da UNICAMP, por conceder a base intelectual e tecnológica para este trabalho;

Ao corpo docente do Instituto de Química da UNICAMP, pelos ensinamentos transmitidos;

Aos funcionários do Instituto de Química da UNICAMP, por fornecerem o suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho;

À CAPES, pelo auxílio financeiro e bolsa concedida;

Aos colegas do Laboratório de Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores do Instituto de Química da UNICAMP, pela amizade e companheirismo;

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

**- Resumos Publicados em Anais de Congressos**

- Linares, Elisângela M.; Palermo, Larissa T.; Kubota, L. T.; “*Determinação de Salicilato por Espectrofluorimetria Acoplada à Fibra Óptica em Amostras: Análise de Amostras Aplicadas em Papel*” In: Sociedade Brasileira de Química - 28º Reunião Anual, v. 1., p. 17-17, 2005, Poços de Caldas-MG.

- Palermo, L. T.; Kubota, L. T.; “*Desenvolvimento de Método para Determinação de Ácido Cafêico por Fluorescência*” In: 12º Encontro Nacional de Química Analítica, v. único (EM-018), 2003, São Luís-MA.

- Palermo, L. T.; Kubota, L. T.; “*Desenvolvimento de Método para Determinação de Ácido Clorogênico por Fluorescência*” In: Sociedade Brasileira de Química - 26º Reunião Anual, v. único (QA-079), 2003, Poços de Caldas-MG.

- Palermo, L. T.; Sotomayor, M. P. T.; Kubota, L. T.; “*Desenvolvimento de um Spot Test para Determinação Fluorimétrica de Salicilato: Estudos Preliminares*” In: Sociedade Brasileira de Química - 25º Reunião Anual, v. único (QA-054), 2002, Poços de Caldas-MG.

- Palermo, L. T.; Felisberti, M. I.; Sanches, E. M. S.; “*Previsão da Miscibilidade de Blendas Poliméricas a Partir de Medidas Viscosimétricas em Solução*” In: VIII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, v. s/i, p. 70-70, 2000, Campinas-SP.

- Palermo, L. T.; Felisberti, M. I.; Sanches, E. M. S.; “*Propriedades de Soluções Aquosas de PVA e PVP*” In: 5º Congresso Brasileiro de Polímeros, v. s/i, p. 320-321, 1999, Águas de Lindóia-SP.

- Palermo, L. T.; Felisberti, M. I.; “*Propriedades de Soluções Aquosas de PVA e PVP*” In: VII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, v. s/i, p. 64-64, 1999, Campinas-SP.

**- Publicações**

- Linares, E. M.; Palermo, L. T.; Moreira, A. B.; Sotomayor, M. P. T.; Kubota, L. T. “A Fluorescence Spot Test for Salicylate Determination”. *Analytical Letters*. Aceito para publicação.

- Guerreiro, A. e Palermo, L. T. “Preparação de  $[\text{Mo}(\text{CO})_4(\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{PPh}_2)]$  e *cis*- $[\text{Mo}(\text{CO})_4(\text{PPh}_3)_2]$  por Catálise de Transferência de Fase e de *trans*- $[\text{Mo}(\text{CO})_4(\text{PPh}_3)_2]$  por Catálise Homogênea”. *Nossa Inorgânica*, v. 1, n. 1, 18-22, 2000.

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÁCIDOS CAFÊICO E CLOROGÊNICO POR FLUORESCÊNCIA

O presente trabalho trata da aplicação da fluorescência molecular e de métodos de calibração multivariados, na modalidade PLS-1, para a determinação simultânea de uma mistura dos ácidos cafêico (CA) e clorogênico (CGA), tanto em amostras sintéticas quanto em amostras reais, provenientes de extratos vegetais aquosos da planta *Ilex paraguariensis*, aproveitando-se o fato de que ambos os compostos apresentam fluorescência intrínseca. O método desenvolvido não requer reagente, sendo apenas necessário o uso de água aquecida para a etapa de extração. Para tanto, planejamentos fatoriais  $2^3$  foram aplicados no sentido de se determinar as condições ótimas para a obtenção da maior sensibilidade, analisando para isso os efeitos principais e a presença de fatores de interação. Esse estudo foi feito para cada um dos ácidos separadamente. Foram feitos dois tipos de planejamentos: um relacionado às variáveis instrumentais e outro sobre as variáveis relacionadas à condição da amostra. Porém, a escolha dos níveis e dos fatores a serem utilizados foi feita a partir de experimentos preliminares, observando-se o efeito de nove variáveis sobre o comportamento de emissão de fluorescência, para cada um dos ácidos. As melhores condições de análise permitiram a obtenção de uma resposta linear para CA na faixa de 0,08-11,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , a 284 nm de excitação, com limite de detecção (LD) equivalente a 0,02  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e limite de quantificação (LQ) de 0,07  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $r=0,9972$ ,  $n=7$ ). Para o CGA a faixa linear foi de 0,3-8,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , a 330 nm de excitação, com LD=0,07  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e LQ=0,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $r=0,9959$ ,  $n=8$ ).

A etapa seguinte consistiu na construção do modelo de calibração para a mistura, utilizando-se diferentes proporções de CA e CGA (1:7,5; 1:9,5; 1:11,5; 1:13,5; 1:17,5). Os espectros das amostras foram obtidos a 284 nm, e a faixa espectral de 380-500 nm foi decomposta utilizando-se PLS-1. Os dados foram centrados na média, utilizando-se validação cruzada, sem transformação derivativa. O número ótimo de componentes principais encontrados foi de 3 (CA) e 5 (CGA), sendo que 48 amostras foram usadas no conjunto de calibração, e 12 amostras no de validação externa. As concentrações previstas e reais apresentaram-se satisfatoriamente correlacionadas ( $r=0,990007$  e  $0,997176$  para os modelos do CA e CGA), e para ambos os modelos o desempenho da previsão foi avaliado em termos do coeficiente de variabilidade (CV). A quantificação dos ácidos na amostra comercial foi feita utilizando-se os modelos finais obtidos por PLS-1, sendo validada através da adição de padrão, com boas recuperações obtidas ( $94\pm5\%$  e  $104\pm3\%$ , para CA e CGA, respectivamente).

## ABSTRACT

### SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CAFFEIC AND CHLOROGENIC ACIDS BY FLUORESCENCE

The present work concerns the application of molecular fluorescence and multivariate calibration method, in the PLS-1 modality, for the simultaneous determination of caffeic (CA) and chlorogenic (CGA) acids in synthetic samples and in real samples of aqueous vegetable extracts of *Ilex paraguariensis*, using the intrinsic fluorescence of both compounds. The developed method just need the use of warm water for the extraction stage and no chemical is required. A factorial design  $2^3$  was applied to get the optimized conditions looking for the largest sensitivity, evaluating the main effects and the presence of interaction factors. This study was performed for each one of the analyte separately. They were performed two types of design: one related to the instrumental variables and other on the variables related to the sample condition. However, the choice of the levels and the factors was based on the preliminary experiments, being observed the effect of nine variables on the behavior of fluorescence emission. The optimized conditions allowed to obtain a linear response for CA in the range of 0.08-11.1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , using a wavelength of 284 nm for excitation, with a detection limit (LD) equivalent to 0.02  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and quantification limit (LQ) of 0.07  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $r=0.9972$ ,  $n=7$ ). For CGA the linear response range was 0.3-8.5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , excitation at a wavelength of 330 nm, with a LD=0.07  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and LQ=0.2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $r=0.9959$ ,  $n=8$ ). The construction of the calibration model for the mixture was consisted in different proportions of CA and CGA (1:7.5; 1:9.5; 1:11.5; 1:13.5; 1:17.5). The spectra of the samples were obtained exciting at 284 nm, and recording the spectral range of

380-500 nm. The data were decomposed using PLS-1. The data set was mean centered, being used the cross validation, without derivative transformation. The optimum number of factors was found as 3 (CA) and 5 (CGA), and 48 samples were used in the calibration set, and 12 samples in one validation group. A satisfactory agreement between predicted and experimental concentrations was obtained ( $r=0.990007$  and  $0.997176$  for the models of CA and CGA), and for both models the prediction performance was evaluated in terms of the variability coefficient (CV). The acids quantification in the commercial sample was carried out using the final models obtained by PLS-1, being validated through the standard addition, with good recoveries ( $94\pm5\%$  and  $104\pm3\%$ , for CA and CGA, respectively).

## ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	xvi
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Figuras.....	xix
I. INTRODUÇÃO.....	01
1. Aspectos Gerais do Trabalho.....	02
2. Compostos Fenólicos Provenientes de Plantas.....	03
2.1 Ácidos Fenólicos - CA e CGA.....	05
3. Métodos Analíticos Empregados em Análises de CA e CGA.....	07
4. Química Verde.....	12
5. Fluorescência.....	13
6. Extratos Vegetais.....	19
6.1 <i>Ilex paraguariensis</i> .....	20
II. OBJETIVOS.....	21
III. EXPERIMENTAL.....	23
1. Equipamento.....	24
2. Reagentes e Soluções.....	24
2.1 Ácido Cafêico.....	24
2.2 Ácido Clorogênico.....	25
2.3 Tampões.....	25
3. Procedimentos.....	26
3.1 Determinação de Ácido Cafêico.....	26
3.2 Determinação de Ácido Clorogênico.....	26
3.3 Estudos Preliminares.....	27
3.3.1 Preparo das Soluções Padrão de Trabalho.....	27
3.3.1.1 Ácido Cafêico.....	27

3.3.1.2	Ácido Clorogênico.....	27
3.3.2	Variação de Parâmetros: Instrumental.....	28
3.3.2.1	Largura das Fendas.....	28
3.3.2.2	Voltagem da Fotomultiplicadora.....	28
3.3.2.3	Velocidade de Varredura.....	28
3.3.3	Variação de Parâmetros: Condições da Espécie de Interesse Analítico.....	29
3.3.3.1	Temperatura.....	29
3.3.3.2	Presença de Oxigênio.....	29
3.3.3.3	pH.....	29
3.3.3.4	Tipo de Tampão.....	30
3.3.3.5	Concentração do Tampão.....	30
3.4	Planejamentos Fatoriais.....	30
3.4.1	Variáveis Instrumentais.....	31
3.4.2	Variáveis Relacionadas à Condição das Espécies de Interesse Analítico.....	32
3.5	Determinação de uma Mistura Sintética dos Ácidos Cafêico e Clorogênico.....	32
3.6	Amostra Comercial.....	33
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
1.	Estudos Preliminares.....	35
2.	Planejamentos Fatoriais.....	45
2.1	Variáveis Instrumentais.....	46
2.2	Variáveis Relacionadas à Condição das Espécies de Interesse Analítico.....	50
2.2.1	Ácido Cafêico.....	51
2.2.2	Ácido Clorogênico.....	53

3. Aumento de Sensibilidade.....	55
3.1 Ácido Cafêico.....	55
3.2 Ácido Clorogênico.....	57
4. Determinação de uma Mistura dos Ácidos Cafêico e Clorogênico.....	59
4.1 Calibração Multivariada.....	60
4.2 Construção e Validação do Modelo de Calibração para Misturas Sintéticas de CA e CGA.....	62
5. Aplicação: Determinação Simultânea de CA e CGA em Extratos Vegetais de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	69
V. CONCLUSÕES.....	72
VI. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	74
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS\*

CA	<i>Caffeic Acid</i> (Ácido Cafêico)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CGA	<i>Chlorogenic Acid</i> (Ácido Clorogênico)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coefficiente de Variabilidade
CZE	<i>Capillary Zone Electrophoretic</i> (Eletroforese Capilar por Zona)
EC	Eletroforese Capilar
EM	Espectrometria de Massa
LD	Limite de Detecção
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Baixa Densidade)
LQ	Limite de Quantificação
MEKC	<i>Micellar Electrokinetic Electrophoretic Capillary</i> (Eletroforese Capilar por Eletrocinética Micelar)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
PLS(R)	<i>Partial Least Square Regression</i> (Regressão por Mínimos Quadrados Parciais)
PRESS	<i>Prediction Error of Square Sum</i> (Soma dos Quadrados dos Erros de Previsão)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SEP	<i>Standard Error of Prediction</i> (Erro Padrão de Previsão)
UV-vis	Ultravioleta na região do Visível

---

\* Os termos em inglês estão em itálico.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Estruturas de alguns ácidos fenólicos de ocorrência natural (X=A, estrutura de um aldeído; X=B, estruturas hidroxibenzóicas; X=C, estruturas hidroxicinâmicas).....	05
<b>Tabela 2.</b>	Fatores e seus respectivos níveis, escolhidos para realização de um planejamento fatorial $2^3$ (variáveis instrumentais).....	31
<b>Tabela 3.</b>	Fatores e seus respectivos níveis, escolhidos para realização dos planejamentos fatoriais $2^3$ para CA e também para o CGA (variáveis da condição do analito).....	32
<b>Tabela 4.</b>	Variação na intensidade de fluorescência em função da presença ou ausência de $O_2$ , a partir de soluções aquosas de padrões sintéticos de CA e CGA.....	40
<b>Tabela 5.</b>	Sensibilidade em função do tipo de tampão utilizado, em pH=6, a partir de soluções aquosas de padrões sintéticos de CA e CGA.....	44
<b>Tabela 6.</b>	Fatores, níveis e respostas obtidas para o planejamento fatorial $2^3$ proposto para o estudo das variáveis instrumentais.....	47
<b>Tabela 7.</b>	Estimativas dos efeitos calculados pelo planejamento fatorial $2^3$ da Tabela 2 e seus erros padrão (em intensidade de fluorescência).....	48
<b>Tabela 8.</b>	Efeitos calculados a partir do planejamento fatorial $2^3$ da Tabela 3 e seus erros padrão, EP, para o ácido cafêico (em intensidade de fluorescência).....	51
<b>Tabela 9.</b>	Efeitos calculados a partir do planejamento fatorial $2^3$ da Tabela 3 e seus erros padrão, EP, para o ácido clorogênico (em intensidade de fluorescência).....	53

- Tabela 10.** Comparação entre os coeficientes angulares (*b*) das curvas analíticas de CA obtidas (1) previamente à otimização instrumental, (2) após a otimização instrumental e (3) após as otimizações instrumentais e das variáveis relacionadas à amostra.....57
- Tabela 11.** Comparação entre os coeficientes angulares (*b*) das curvas analíticas de CGA obtidas para (1) previamente à otimização instrumental, (2) após a otimização instrumental e (3) após as otimizações instrumentais e das variáveis relacionadas à amostra.....59
- Tabela 12.** Determinação simultânea de CA e CGA em 12 amostras referentes ao conjunto de validação externa, utilizando-se o modelo de calibração construído por PLS-1 para o grupo de calibração.....69
- Tabela 13.** Resultados obtidos por de determinação simultânea, referentes à recuperação de CA e CGA a partir de uma amostra comercial de *I. paraguariensis*, utilizando calibração multivariada.....70

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estruturas químicas dos ácidos cafêico (**a**) e clorogênico (**b**).....06
- Figura 2.** Diagrama de Jablonski ilustrando o processo envolvido na criação de um estado eletrônico excitado singlete por absorção óptica e subsequente emissão de fluorescência [45].....16
- Figura 3.** (**a**) Espectros de excitação para CA ( $\lambda_{ex}=1-280$  nm e  $2-311$  nm) e CGA ( $\lambda_{ex}=3-290$  nm e  $4-332$  nm) e (**b**) espectros de emissão para CA ( $\lambda_{em}=424$  nm) e CGA ( $\lambda_{em}=454$  nm) na presença de água.....36
- Figura 4.** Efeito da variação da largura da fenda de emissão na intensidade do sinal de fluorescência para cada uma das seguintes larguras da fenda de excitação (em nanômetros): 2,5 (■), 5,0 (○), 7,5 (▲), 10,0 (∇), 12,5 (◆), 15,0 (□). As medidas de fluorescência foram feitas a partir de soluções aquosas de padrões sintéticos de CA.....37
- Figura 5.** Intensidade de fluorescência do ácido cafêico em função da variação na voltagem da fotomultiplicadora (mV), utilizando soluções aquosas de padrões sintéticos de CA.....38
- Figura 6.** Variação da intensidade de fluorescência em função da velocidade de varredura ( $\text{nm min}^{-1}$ ) para (**a**) CA e (**b**) CGA, utilizando soluções aquosas de padrões sintéticos de CA e também de CGA.....38
- Figura 7.** Sensibilidade em função da variação de temperatura para CA (■) e CGA (●), a partir de soluções aquosas de padrões sintéticos de CA e CGA.....39
- Figura 8.** Sensibilidade em função da variação do pH para CA (■) e CGA (●), a partir de soluções aquosas de padrões sintéticos de CA e CGA.....43

- Figura 9.** Influência da concentração do tampão (tampão fosfato em pH=6) na sensibilidade de padrões de **(a)** CA e **(b)** CGA.....44
- Figura 10.** Diagrama para interpretação dos efeitos da fenda de emissão e da voltagem da fotomultiplicadora, no planejamento  $2^3$ . Os valores nos vértices do quadrado são as respostas médias (em intensidade de fluorescência).....50
- Figura 11.** Diagrama para interpretação dos efeitos do pH e da concentração do tampão, no planejamento  $2^3$  realizado para o ácido caféico. Os valores nos vértices do quadrado são as respostas médias (em intensidade de fluorescência).....53
- Figura 12.** Curva analítica para CA em tampão fosfato 0,025 M e pH=6.....57
- Figura 13.** Curva analítica para CGA em tampão fosfato 0,025 M e pH=6.....58
- Figura 14.** Número de componentes principais em função do PRESS para o modelo do **(a)** CA e **(b)** CGA, obtidos por PLS-1.....63
- Figura 15.** *Leverage* em função dos resíduos de *Student* para o modelo do **(a)** CA e **(b)** CGA, obtidos por PLS-1.....65
- Figura 16.** Resultados obtidos para os conjuntos de validação modelados com PLS-1, para **(a)** CA e **(b)** CGA ( $r$  = coeficiente de regressão entre valores reais e previstos obtidos para a etapa de validação, usando o modelo de calibração multivariado).....67

# I. INTRODUÇÃO

## **I. Introdução**

### **1. Aspectos Gerais do Trabalho**

Historicamente, o desenvolvimento de métodos analíticos, principalmente os relacionados às técnicas de separação de ácidos fenólicos, tem apresentado diferentes objetivos. Muitos desses métodos se originaram a partir do interesse nesses compostos com relação às suas propriedades biológicas, uma vez que é encontrada em diversas espécies existentes no reino vegetal: como a determinação taxonômica, seus efeitos ecológicos e também como um indicativo do estágio de maturação das plantas. Uma outra parte dos trabalhos analíticos foi desenvolvida para o entendimento do impacto desses ácidos nas propriedades organolépticas ou dos aromas de alimentos e preservação dos mesmos (controle de danos oxidativos), na prevenção da adulteração. Interesses mais recentes baseiam-se na ação desses ácidos fenólicos na proteção contra doenças causadas por esses danos oxidativos, através da adoção de uma dieta baseada, em grande parte, de frutas e vegetais.

Assim, métodos analíticos bem estabelecidos, que possibilitem análises rápidas, simples, sensíveis e não destrutivas do conteúdo de ácidos fenólicos de ocorrência natural em alimentos comumente consumidos, assim como são os extratos vegetais, servem como uma ferramenta importante e atual sendo um meio de se inferir o consumo de tais compostos através da dieta alimentar. Uma das técnicas que atende aos requisitos anteriormente citados relaciona-se à espectroscopia de fluorescência, que além das aplicações convencionais (por exemplo, na determinação da intensidade de fluorescência para compostos isolados), ainda é atualmente pouco explorada no que se refere à avaliação de

misturas de compostos, apesar de ser uma excelente técnica com potencial aplicação para métodos de rotina.

Neste contexto, o trabalho aqui proposto tem como principal meta desenvolver um método que possibilite a resolução de uma mistura dos ácidos cafêico e clorogênico por fluorescência, tanto em amostras sintéticas quanto em amostras comerciais, provenientes de extratos vegetais (uma vez que se observa a ocorrência natural desses dois ácidos fenólicos conjuntamente), no qual haja o compromisso entre sensibilidade e robustez. Associado a isso, está o fato de que ambos os compostos apresentam fluorescência intrínseca, fazendo com que o desenvolvimento do referido método esteja inserido na nova tendência da química analítica - a “Química Verde” - sem que haja a necessidade da utilização de qualquer outro reagente cromóforo e solvente além da água.

Para tanto, a determinação simultânea dos mesmos foi feita aplicando-se métodos de calibração multivariados na modalidade PLS-1 às medidas de fluorescência obtidas. Como aplicação, a análise de extratos aquosos da planta *Ilex paraguariensis* (conhecida como “mate”, ou “erva mate”) foi escolhida, uma vez que é comercialmente de fácil acesso.

## **2. Compostos Fenólicos Provenientes de Plantas**

Compostos fenólicos são largamente distribuídos no reino vegetal, sendo conhecidos como *metabólitos secundários* de plantas. São importantes constituintes da dieta humana, sendo encontrados em vegetais, cereais, frutas, ervas, legumes, assim como em seus derivados (chá, cidra, óleo e vinho tinto) [1,2,3,4]. Também são essenciais ao crescimento e desenvolvimento normal da planta e parecem estar envolvidos na defesa da mesma contra a invasão de elementos patogênicos, como insetos, bactérias, fungos e vírus [2,4-5].

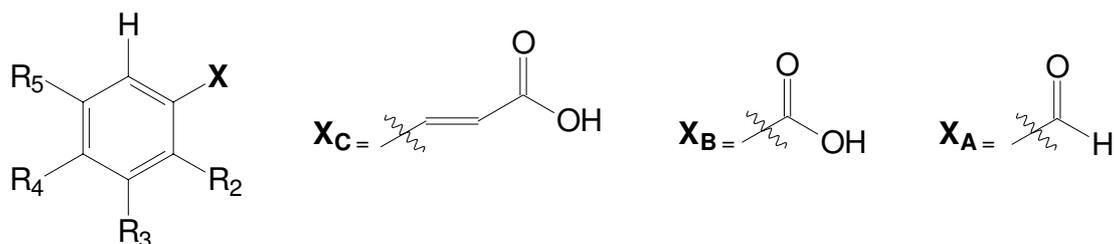
Dentre as diversas moléculas orgânicas sintetizadas pelas plantas vasculares, os metabólitos secundários podem dar origem a diversas categorias de substâncias, sendo que a mais extensa é representada pelos *compostos fenólicos*. Esse termo engloba aproximadamente oito mil compostos de ocorrência natural, todos possuindo em comum uma característica: um fenol. A classificação atual divide a ampla categoria desses compostos fenólicos em *polifenóis* e em *fenóis simples*, baseado unicamente no número de substituintes de fenóis presentes. Porém, de maneira geral, os compostos fenólicos podem ser classificados em duas grandes subclasses: os *ácidos fenólicos* e os *flavonóides*, sendo que a ocorrência entre os mesmos é da ordem de 1:2, respectivamente [6-7].

Os flavonóides englobam um grupo de compostos polifenólicos complexos, que apresenta uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos e um heterociclo oxigenado, sendo uma família composta por mais de quatro mil diferentes compostos fenólicos já descritos. As diferenças individuais dentro de cada grupo resultam de uma variação no número e posição dos grupamentos hidroxilas, por modificações dos núcleos e pelo grau de metilação e glicosilação, as quais afetam várias propriedades dos flavonóides [8], fazendo com que sejam divididos em diversas classes de acordo com o grau de oxidação do oxigênio pertencente ao heterociclo [6-7].

Já o nome ácido fenólico em geral descreve fenóis que possuem uma função de ácido carboxílico. Entretanto, quando descrevem metabólitos de plantas, refere-se a um grupo distinto de ácidos orgânicos (Tabela 1). Esses ácidos fenólicos de ocorrência natural contêm duas estruturas que os diferenciam: as estruturas *hidroxicinâmicas* ( $X_A$ ) e as *hidroxibenzóicas* ( $X_B$ ). Embora o esqueleto básico permaneça o mesmo, os números e as posições dos grupos hidroxila no anel aromático proporcionam essa variedade de compostos. Em muitos casos, até

mesmo análogos de aldeídos ( $X_C$ ) também são agrupados juntamente aos outros, sendo mencionados também como ácidos fenólicos [7].

**Tabela 1.** Estruturas de alguns ácidos fenólicos de ocorrência natural ( $X=A$ , estrutura de um aldeído;  $X=B$ , estruturas hidroxibenzoicas;  $X=C$ , estruturas hidroxicinâmicas).

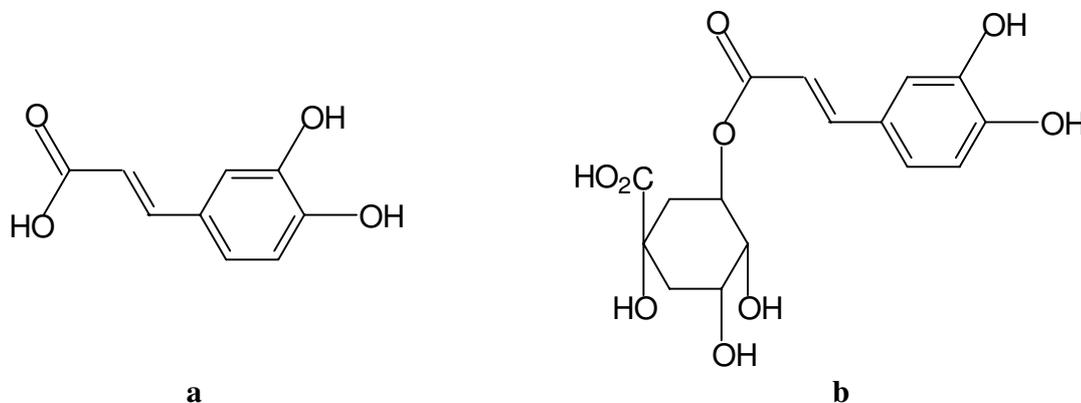


$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R_5$	$X$	Nome
H	H	H	H	C	ácido cinâmico
H	H	-OH	H	C	ácido p-coumárico
H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	H	C	ácido felúrico
H	-OH	-OH	H	C	ácido cafêico
H	H	H	H	B	ácido benzóico
H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	H	B	ácido vanílico
H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	H	A	vanilina

## 2.1 Ácidos Fenólicos - CA e CGA

A maior classe de ácidos fenólicos é representada pelos ácidos hidroxicinâmicos. O composto mais representativo dos ácidos hidroxicinâmicos é o ácido cafêico (ácido 3,4-dihidroxicinâmico), Figura 1a, que possui ocorrência natural principalmente como um éster com o ácido quínico, chamado de ácido clorogênico (ácido 1,3,4,5-tetrahidroxíciclohexano carboxílico 3-(3,4-dihidroxicinamato)), Figura 1b [9]. Isto porque apenas uma menor fração existe na forma de “ácido livre” (CA) em espécies do reino vegetal, sendo que a maioria apresenta-se na forma esterificada (CGA) [7]. Ambos possuem atividade como

reguladores do crescimento de plantas [10] e emitem fluorescência azul, com o máximo ao redor de 440 nm, quando excitadas através de radiação em 337 nm [11].



**Figura 1.** Estruturas químicas dos ácidos cafêico (a) e clorogênico (b).

Possivelmente, o primeiro trabalho referente ao ácido clorogênico foi publicado em 1837 por Robiquet e Boutron, mas esta terminologia para o ácido somente foi introduzida em 1846, por Payen. Em 1932 o ácido clorogênico mostrou ser um ácido cafêico conjugado derivado do ácido quínico [1].

Ácidos fenólicos, tais como o cafêico e o clorogênico, são amplamente reconhecidos como antioxidantes [12]. Associado a isso está o crescente interesse no entendimento da função e do mecanismo de compostos fenólicos como inibidores de processos degenerativos e oxidativos, demonstrado em alguns trabalhos da literatura [13-14]:

A interação desses compostos, incluindo CA e CGA, com radicais peróxido foi estudada por Marzanna *et al* [13] em um modelo de oxidação controlada do ácido homovanílico (HVA), no qual a presença dos ácidos cafêico e clorogênico, dentre outros, preveniu a oxidação do HVA pela remoção do peróxido de hidrogênio. De maneira semelhante também se avaliou a interação desses compostos com radicais peróxidos, através de um estudo *in vitro* de um modelo de oxidação controlada da LDL (lipoproteína de baixa densidade), no qual CA e CGA apresentaram alta reatividade quando comparados ao trolox, análogo solúvel em

água da vitamina E, inibindo a peroxidação dos lipídios da LDL iniciada por radicais peróxidos [14]. A característica de capturar radicais é a base do efeito antioxidante destes compostos.

Nos últimos anos, o papel dos radicais livres na promoção do envelhecimento celular e do crescimento de tumores tem direcionado o foco para os compostos fenólicos. Há relatos de que, devido ao seu poder antioxidante, ambos os ácidos (cafêico e clorogênico) também podem atuar como potenciais agentes antitumorais, antimutagênicos e anticarcinogênicos [9,12,15]. Outros estudos ainda indicam que gêneros alimentícios contendo ácido cafêico, entre outros antioxidantes fenólicos, podem suprimir a formação de amins heterocíclicas em alimentos cozidos, uma vez que tais amins possuem propriedades mutagênicas e carcinogênicas [16].

### **3. Métodos Analíticos Empregados em Análises de CA e CGA**

O crescente interesse nos efeitos anticarcinogênicos de polifenóis tais como CA e CGA, têm ocasionado um grande aumento do desenvolvimento de metodologias analíticas para sua determinação. Os diferentes métodos analíticos que tem sido reportados em literatura relacionam a determinação de tais compostos principalmente em alimentos, mas também em preparações farmacêuticas e em fluídos biológicos - humanos ou não [3,9,15,17-21]. Ainda, dentre as várias técnicas propostas em literatura existem também as relacionadas à determinação desses compostos em extratos vegetais, sendo que as mais utilizadas são as técnicas cromatográficas [18,22-29], de eletroforese capilar [30-32] e de ressonância magnética nuclear [33-35].

Com relação aos trabalhos envolvendo a cromatografia para determinações de compostos fenólicos em extratos vegetais, o realizado por Zgórka *et al* [18]

permitiu a determinação de CA e CGA, além de mais seis componentes, em amostras previamente tratadas provenientes de extratos metanólicos de ginseng siberiano utilizando CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) com eluição isocrática. Monitorou-se a presença desses ácidos com diferentes tipos de detectores sendo que a identidade dos picos (com tempos de retenção muito próximos) foi feita através de comparação com padrões, e a quantificação por integração das áreas dos picos usando um método de padrão externo. Já Areias *et al* [22] utilizaram a mesma técnica, porém usando apenas o detector de arranjo de diodos na determinação de seis compostos fenólicos em espécies de sálvia, incluindo CA. A identificação foi feita pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV-vis na região de 200-400 nm com padrões. A quantificação foi feita pela absorbância registrada nos cromatogramas relativa aos padrões externos em 330 nm. Porém, para a finalidade de quantificação, garantindo-se a total extração dos compostos fenólicos da amostra e com isso a reprodutibilidade do método, a amostra foi sujeita a seis condições de extração, utilizando-se diferentes tempos e volumes de solvente. Além disso, a eluição exigiu um sistema de gradientes complexo.

Outros trabalhos também relacionaram a cromatografia a determinações de compostos fenólicos em extratos vegetais [23-27]. Em um estudo feito por Hu *et al* [23], estimou-se as atividades antioxidantes e pró-oxidantes de extratos derivados de folhas de bambu, onde a presença de CA, CGA e luteonina 7-glucosídeo foi confirmada e quantificada por CLAE. Filip *et al* [24] também identificaram e quantificaram através de CLAE derivados fenólicos em erva mate, dentre eles CA e CGA. Chung *et al* [25] separaram e quantificaram compostos autotóxicos em alfafa, determinando suas atividades biológicas. Após a separação química, as frações dos extratos foram examinadas por CLAE, e a confirmação da presença dos compostos, dentre eles o CGA, ocorreu por CG-EM (cromatografia gasosa

acoplada à espectrometria de massa). Bioensaios feitos com a referida amostra comprovaram o envolvimento do CGA na diminuição da autotoxicidade da alfafa. Caniova *et al* [26] utilizaram a planta medicinal melissa associada a CLAE na determinação de ácidos fenólicos, incluindo CA, aplicando um procedimento simples de extração. Um estudo taxonômico desenvolvido por Zidorn *et al* [27] também envolveu a determinação de compostos fenólicos (CA e CGA, entre outros) e flavonóides de origem vegetal através de CLAE para a diferenciação de subgêneros Oporina, do gênero *Leontodon*. Os dados foram processados através de PCA (análise por componentes principais), e os *clusters* obtidos foram taxonomicamente interpretáveis, de acordo com a morfologia que norteia o gênero *Leontodon*. A quantidade de CA e CGA determinada por este método variou de acordo com a espécie analisada.

Porém, determinações feitas por cromatografia líquida de alta eficiência estão sujeitas ao alto custo de análise, devido à sofisticação instrumental, grandes quantidades de solventes orgânicos, além do longo tempo de análise e da presença de compostos potencialmente interferentes que podem ser co-eluídos, dependendo da matriz analisada. Da mesma forma, a coluna cromatográfica é facilmente contaminada e de difícil limpeza.

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica recentemente desenvolvida, sendo complementar a CLAE e outras técnicas de separação analítica. Alguns trabalhos utilizaram a técnica de EC como uma alternativa mais rápida e simples que a CLAE na separação de compostos derivados de extratos vegetais [30-31]. Sheu *et al* [30] aplicaram dois métodos, o primeiro deles relacionado à eletroforese capilar por eletrocínica micelar (MEKC) e o segundo ao método eletroforético de zona capilar (CZE), na separação de doze constituintes fenólicos da losna. A detecção foi feita em 254 nm, identificando-se os picos por comparação dos tempos de migração da amostra e de uma referência obtida pela adição de padrões a um

extrato da erva de conteúdo conhecido. Apesar terem sido feitos estudos para a otimização das condições de análise, com o objetivo de obter uma relação de tempo de migração e resolução ótimas, o método MEKC não pode ser utilizado para provar a presença de CGA no extrato da erva, devido à presença de picos múltiplos e alargados. Por CZE, esse problema foi resolvido pela presença de um pico altamente simétrico.

A eletroforese capilar acoplada a um sistema de injeção de fluxo foi o alvo de estudo de Arce *et al* [32], possibilitando a determinação simultânea de polifenóis em amostras de chá verde, dentre eles o CA, pela detecção no ultravioleta (210 nm) em um tempo menor ainda do que o obtido por Sheu *et al*. O acoplamento ao sistema de injeção em fluxo permitiu a introdução da amostra sem que fosse necessário nenhum tipo de tratamento prévio ou derivatização da mesma, realizando automaticamente a extração, filtração e diluição dos polifenóis contidos no chá, embora o desenvolvimento do presente método não tenha permitido a determinação do CA nas amostras comerciais analisadas. Problema semelhante a esse, relacionado à determinação e quantificação de CA em amostras reais, ocorreu nos estudos realizados por Lee *et al* [28]. Nesse trabalho, os autores propuseram uma análise comparativa de métodos para a determinação de catequinas e flavinas encontradas em chá (verde e preto), juntamente com outros seis ingredientes - incluindo CA - através de dois tipos de análise: CLAE e EC. As condições ótimas para ambos os métodos analíticos foram investigadas para a obtenção da melhor resolução e da maior sensibilidade possíveis. Em ambos os métodos a detecção no UV foi feita a 205 nm. Em termos de separação, a EC foi claramente mais rápida que a técnica de CLAE (com tempo de análise em cerca de dez e trinta minutos, respectivamente, e mais rápida ainda que os métodos apresentados por Sheu e Arce, para EC), além do consumo de reagentes ser menor. Porém, a técnica de EC apresentou-se menos sensível, uma vez que o menor limite de detecção dos

polifenóis analisados foi cerca de cinco vezes maior do que os valores obtidos por CLAE. No caso específico do CA, a sua quantificação nas oito variedades de chás analisadas não foi possível de ser obtida por CLAE. Da mesma forma, utilizando-se a técnica de EC, a presença deste ácido somente foi possível de ser detectada no eletroferograma contendo a mistura dos padrões.

A determinação em paralelo de ácido cafêico e rosmarínico (RA) foi realizada por Janicsák *et al* [29] através do uso da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) associada a Densitometria na análise de cinco espécies de sálvia. Nesse estudo, as condições para a determinação foram otimizadas, e os extratos das plantas foram co-cromatografados juntamente com amostras dos ácidos. Após a obtenção dos densitogramas, a quantificação foi feita no modo de fluorescência, uma vez que os cromatogramas foram expostos previamente a um tratamento através de exposição à energia luminosa, no UV. A fluorescência dos compostos estudados permitiu a quantificação dos mesmos. No entanto, esta técnica apresenta bons resultados somente se as melhores condições de análise forem máximas.

Esta mesma mistura de ácidos foi analisada em extratos de plantas da família Lamiaceae - que compreende um grande número de plantas herbáceas, cujas espécies são geralmente usadas como condimentos ou em uso medicinal - através de uma combinação de metodologias avançadas de ressonância magnética nuclear (RMN) por Exarchou *et al* [35], sem a necessidade de separação cromatográfica prévia dos componentes. De forma a comparar a técnica apresentada, o autor avaliou os resultados obtidos com a quantificação dos mesmos utilizando-se CLAE. Os resultados quantitativos apresentaram-se razoavelmente em concordância para ambas às técnicas, no entanto a metodologia proposta por RMN não é adequada para um método de rotina, pois exige equipamentos sofisticados e um detalhado tratamento dos dados. Nesse sentido, outros trabalhos ainda utilizaram a técnica de RMN para a obtenção de resultados a partir da análise de extratos vegetais.

Mulinacci *et al* [33] realizaram estudos no intuito de contribuir na análise fitoquímica de extratos de chicória, utilizando para isso CLAE e RMN com a finalidade de se caracterizar todos os compostos isolados, incluindo o CGA.

#### 4. Química Verde

Embora os métodos citados anteriormente sejam precisos, os mesmos estão sujeitos ao alto custo de análise, devido à sofisticação instrumental e ao fato de requererem um tempo de análise consideravelmente alto, mostrando-se claramente dispendiosos no que se refere ao consumo de reagentes - tal como solventes orgânicos, assim como ao tratamento prévio da amostra real a ser analisada. Essas características fazem com que os mesmos não possam ser incluídos na nova tendência da Química Analítica, chamada de “Química Verde”. Essa tendência surgiu da necessidade do gerenciamento da redução do impacto de atividades químicas ao meio ambiente, sendo necessária à busca de alternativas para evitar ou minimizar a produção de resíduos, ao invés da preocupação excessiva com o tratamento dos resíduos apenas no final da linha de produção [36-38]. Os princípios envolvidos nessa classificação são definidos como o planejamento, desenvolvimento e a aplicação de processos químicos para a redução ou eliminação do uso e geração de resíduos tóxicos ao ser humano e ao ambiente [39].

Apesar disso, a cromatografia líquida de alta eficiência é ainda o método de escolha nas indústrias farmacêuticas e de biotecnologia, embora a fluorescência seja um dos métodos de detecção mais sensíveis [40], com a possibilidade de não serem utilizados outros solventes e reagentes além da água no caso em que as espécies de interesse analítico apresentem fluorescência intrínseca. Desse modo, técnicas espectroscópicas, tais como a fluorescência, se tornam mais apropriadas devido também à rápida coleta de dados com o mínimo pré-tratamento da amostra

[41], além de não serem destrutivas. Acrescenta-se ainda o fato de que não foram encontrados trabalhos na literatura que utilizassem as vantagens da fluorimetria para determinações simultâneas dos ácidos cafêico e clorogênico, fazendo com que se abra uma nova oportunidade de desenvolvimento de metodologia analítica para esse fim.

## 5. Fluorescência

A propriedade de absorção de energia e posterior emissão como luz é denominada de luminescência. Este é o termo geral para a emissão de luz proveniente de uma molécula excitada pela absorção de qualquer forma de energia [10]. Luminescência representa uma das técnicas analíticas mais antigas, sendo a primeira observação desse processo feita em 1565 por Monardes sobre a emissão de luz proveniente de um extrato de *Ligrium nephiticium*. A emissão vermelha da clorofila foi notada por Brewster em 1833, mas a primeira publicação completa a respeito de luminescência foi feita em 1852 por G. G. Stokes, que descreveu a base teórica para a técnica [42]. Nesse trabalho, Stokes formulou a lei na qual a luz era absorvida nas regiões do violeta e ultravioleta do espectro, e emitida na região azul ou vermelha, em comprimentos de onda maiores (deslocamento de Stokes) [43].

O conceito básico para o entendimento da luminescência foi introduzido por Einstein em 1917 e pode ser explicado da seguinte maneira: “Qualquer estado excitado de um sistema, caracterizado por uma energia eletrônica  $E_1$ , maior que o estado fundamental de energia  $E_0$ , decai espontaneamente (na ausência de qualquer radiação) para um estado energético menor  $E_0$  pela emissão de um fóton de frequência angular  $\omega$ ”, de forma que [43]:

$$(h/2\pi) \omega = E_1 - E_0 \quad (\text{Eq. 1})$$

onde  $h$  é a constante de Planck ( $6,62 \times 10^{-27}$  erg.s).

A luminescência pode ser classificada de acordo com a maneira pela qual uma molécula luminescente pode ser excitada. Quando moléculas são excitadas através da interação com fótons provenientes de radiação eletromagnética, o processo é chamado de fotoluminescência. Se a energia necessária para a excitação é obtida a partir de energia química proveniente de uma reação, o processo é chamado de quimiluminescência [42].

Na fotoluminescência, dois processos de naturezas distintas podem ocorrer: se a liberação da energia eletromagnética ocorre a partir de um estado eletrônico excitado singlete, o processo é chamado de fluorescência [42]. Em um estado excitado singlete, o elétron no orbital de mais alta energia tem uma orientação de spin contrária em relação ao outro elétron que ocupa o orbital abaixo deste, em energia. Estes dois elétrons são chamados de emparelhados. O retorno ao estado eletrônico fundamental a partir de um estado excitado singlete não requer mudança na orientação do spin [44]. Fosforescência é um processo mais demorado ( $10^{-4}$  a 10 s), que envolve um cruzamento intersistemas de um estado singlete para um estado tripleto. Este processo ocorre pela mudança na orientação do spin de um elétron, e o par de elétrons passa a ser desemparelhado. A conversão interna singlete-triplete (reversão do spin eletrônico) é mais provável, uma vez que a energia do mais baixo nível vibracional no estado tripleto é menor que a do estado singlete. Moléculas no estado excitado tripleto podem então retornar ao estado fundamental diretamente, uma vez que o retorno via singlete neste caso pode ocorrer somente por obtenção de energia a partir do ambiente (isto algumas vezes ocorre, sendo denominado de fluorescência demorada) [42].

Estes processos podem ser mais bem entendidos analisando-se a luz como uma forma de radiação eletromagnética na qual sua propagação ocorre como um

fenômeno de onda, sendo caracterizada por um comprimento de onda ( $\lambda$ ) e uma frequência ( $\nu$ ), relacionados por [42]:

$$\nu = c/\lambda \quad (\text{Eq. 2})$$

onde  $c$  é a velocidade da luz ( $3 \times 10^{10} \text{ cm.s}^{-1}$ ).

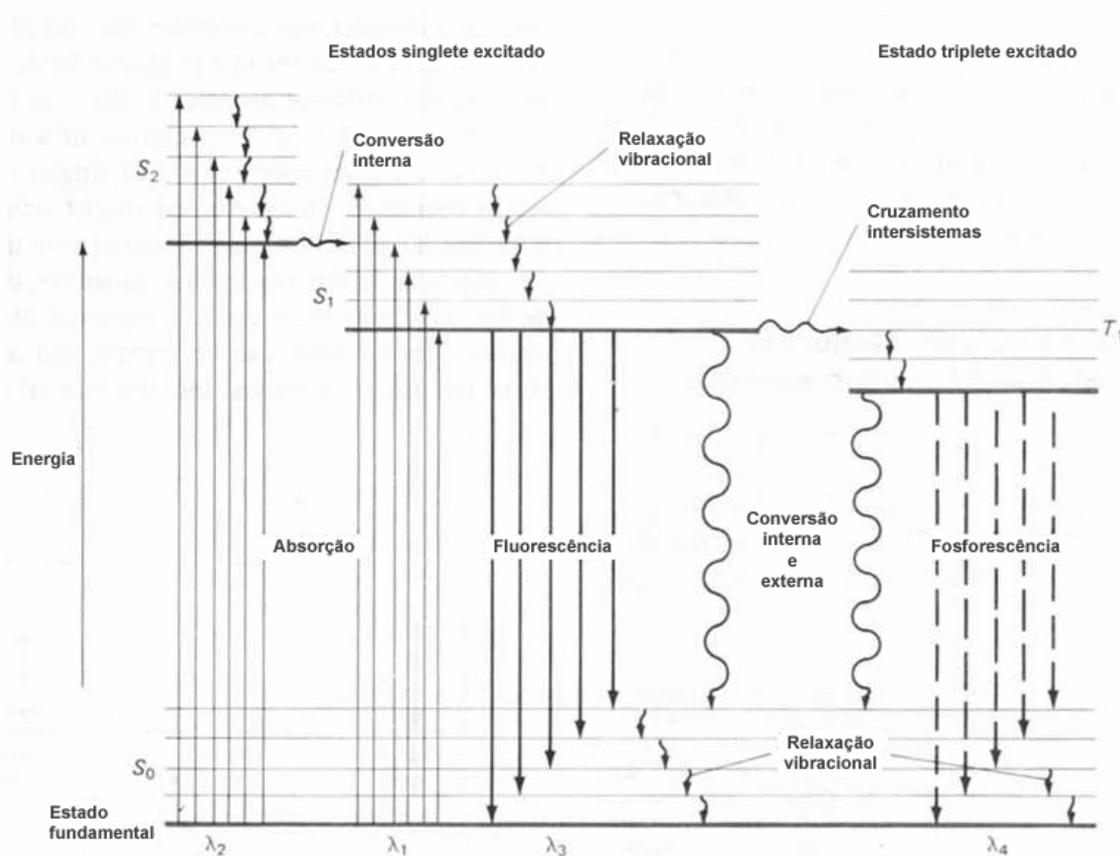
Quando a luz incide na matéria dois eventos podem ocorrer: a radiação luminosa pode passar diretamente sem que haja absorção ou pode ser absorvida pela matéria, inteiramente ou em parte. No último caso, energia é transferida para a molécula em um processo de absorção [42]. A absorção por si mesma é um processo altamente específico, e radiação de uma energia em particular pode ser absorvida somente por estruturas moleculares características [10].

A absorção de energia deve ocorrer em unidades integrais, denominadas de quanta. A relação quanta-energia pode ser expressa pela equação abaixo, derivada da Equação 1 [42]:

$$E = h \nu = h (c/\lambda) \quad (\text{Eq. 3})$$

onde  $E$  é a energia, que é inversamente proporcional ao comprimento de onda  $\lambda$ .

Toda molécula possui uma série de níveis de energia próximos e espaçados, e pode ir de um nível de energia menor para um maior pela absorção de um quantum de luz, equivalente em energia à diferença de energia entre os dois estados energéticos. Somente poucas moléculas interagem com a luz e são promovidas para seu estado excitado mais elevado, sendo dessa forma capazes de apresentar luminescência. Substâncias que apresentam fluorescência significativa geralmente possuem elétrons deslocalizados presentes em ligações duplas conjugadas [42]. O processo responsável pela fluorescência de fluoróforos (moléculas que apresentam fluorescência) é ilustrado através de um diagrama de níveis de energia para um sistema fotoluminescente (Diagrama de Jablonski) mostrado na Figura 2.



**Figura 2.** Diagrama de Jablonski ilustrando o processo envolvido na criação de um estado eletrônico excitado singlete por absorção óptica e subsequente emissão de fluorescência [59].

As linhas mais grossas representam os níveis eletrônicos, e as linhas finas os diversos níveis vibracionais associados a cada um dos níveis eletrônicos. A excitação de um elétron pode ocorrer através da absorção de radiação, na qual um fóton de energia  $h\nu_{EX}$  é fornecido por uma fonte externa, tal como uma lâmpada incandescente ou um laser, e absorvido pelo fluoróforo, criando estados eletrônicos excitados singlete ( $S_{1,2}$ ) e possibilitando transições  $S_0 \rightarrow S_2$  e também  $S_0 \rightarrow S_1$ .

Um elétron excitado pode retornar para seu estado fundamental (que é normalmente o estado singlete  $S_0$ ) através de uma combinação de diversas etapas: duas dessas etapas são representadas por processos que resultam na liberação de um fóton de radiação (fluorescência e fosforescência). As outras etapas de

desativação (indicadas pelas linhas onduladas) são processos não emissivos ou não radiativos. O processo de desativação escolhido será aquele que minimizará o tempo de vida do estado excitado [45].

Considerando-se a fluorescência, nesse tempo de vida do estado excitado (que dura cerca de  $10^{-9}$  s) o fluoróforo está sujeito a mudanças conformacionais e também a várias interações com seu ambiente molecular. Este processo possui duas importantes consequências. Primeiro, a energia de  $S_2$  é parcialmente dissipada, resultando em um estado excitado singlete relaxado  $S_1$  no qual a emissão de fluorescência se origina. Segundo, nem todas as moléculas inicialmente excitadas por absorção retornam ao estado fundamental  $S_0$  por emissão de fluorescência. Outros processos, tais como supressão colisional, transferência de energia fluorescente e cruzamento de intersistemas podem também despovoar  $S_1$ . O rendimento quântico da fluorescência, razão entre o número de fótons fluorescentes emitidos e o número de fótons absorvidos, é uma medida da extensão relativa para que esse processo ocorra [45].

Na transição  $S_1 \rightarrow S_0$  um fóton de energia  $h\nu_{EM}$  é emitido, e o fluoróforo retorna ao seu estado fundamental  $S_0$ . Devido à dissipação de energia durante o tempo de vida do estado excitado, a energia desse fóton é menor, e por essa razão apresenta um comprimento de onda maior que o fóton de excitação  $h\nu_{EX}$ . O deslocamento de Stokes, ou seja, a diferença em energia ou comprimento de onda representada por  $(h\nu_{EX} - h\nu_{EM})$  é fundamental para a sensibilidade da técnica de fluorescência, pois permite a emissão de fótons para serem detectados contra um baixo background, isolados dos fótons de excitação [45].

No entanto, alguns fatores podem influenciar a sensibilidade de medidas baseadas em fluorescência molecular, causando a chamada supressão de fluorescência (*quenching*). A supressão refere-se a qualquer processo que causa uma redução do rendimento quântico de um sistema luminescente, ocorrendo

devido à interação do fluoróforo com determinadas substâncias denominadas de supressores, ou então devido ao elevado nível de concentração das espécies fluorescentes [44].

Altas concentrações de fluoróforos podem gerar dois tipos de supressão: a auto-supressão e a auto-absorção. No primeiro caso, as moléculas excitadas transferem energia às moléculas do solvente, diminuindo a intensidade das bandas de fluorescência. A auto-absorção ocorre quando existe sobreposição das bandas de excitação e emissão de fluorescência, de maneira que a radiação emitida é absorvida para causar a excitação de outras moléculas, chegando apenas parte da radiação emitida ao detector [44].

No entanto, de uma maneira geral, métodos fluorimétricos podem detectar concentrações de substâncias menores que uma parte em dez bilhões, com uma sensibilidade mil vezes superior em relação à maioria dos métodos espectrofotométricos. Isto porque na fluorescência a luz emitida é medida diretamente, e pode ser aumentada ou diminuída alterando-se a intensidade da fonte (excitação). Enquanto os métodos fluorimétricos permitem medir um aumento de sinal acima de um “background” zero, nos métodos espectrofotométricos a medida é relacionada à radiação absorvida, medida indiretamente como sendo uma atenuação entre o feixe incidente e o transmitido. E esse pequeno decréscimo na intensidade de um sinal para baixos níveis da espécie de interesse analítico faz com que haja uma grande perda em sensibilidade, enquanto na fluorimetria a emissão pode ser amplificada de forma a proporcionar uma análise com maior sensibilidade. Outra característica importante da fluorescência é sua seletividade, e as duas maiores razões para isso, ao contrário da absorbância, são: (1) a maioria das moléculas absorve luz ultravioleta/visível, mas nem todas fluorescem; (2) dois comprimentos de onda são usados em fluorimetria, mas somente um é usado em espectrofotometria. Porém, a principal desvantagem da fluorescência como um

instrumento analítico é a sua séria dependência de fatores relacionados à condição da amostra, tais como temperatura, pH, força iônica, etc. [42]. Tais fatores podem, por sua vez, servir como parâmetros fundamentais a serem determinados para a análise de compostos quando esta técnica é aplicada, uma vez que a alta sensibilidade da fluorescência, associada à otimização dessas variáveis, permite a análise rápida e não destrutiva de compostos com simplicidade, alta sensibilidade e boa seletividade, condições que sugerem uma ótima aplicabilidade como um método de rotina, pois não há exigências de equipamentos muito sofisticados.

## 6. Extratos Vegetais

O uso terapêutico de plantas é tão antigo quanto a própria espécie humana, porém o conhecimento de suas propriedades antioxidantes é relativamente recente, especialmente nas duas últimas décadas quando se observou um enorme crescimento da investigação científica sobre o assunto, envolvendo desde o efeito de extratos brutos, frações ou de componentes isolados e/ou modificados [8].

Uma das formas mais simples de se consumir extratos vegetais é através da ingestão de produtos resultantes da infusão de determinadas espécies de plantas, mais conhecido como “chá”. Historicamente, observou-se a existência do chá propriamente dito em 2737 a.c., na China antiga [46]. Segundo a lenda, um imperador chamado Shen Nung, considerado o “pai do chá”, aqueceu água para beber e não observou a presença de algumas folhas dentro do recipiente que continha a água. Sentindo um agradável aroma, ingeriu o conteúdo e iniciou a história do chá fazendo experiências com vários tipos de folhas [47]. A continuidade da difusão do chá para outras culturas se deu pelo seu uso em cerimônias budistas no Japão. No início do século 17 o uso do chá como bebida já

havia chegado à Europa e atualmente cultivam-se plantas para o uso em chás em mais de trinta países, sendo consumido mundialmente [46].

### **6.1 *Ilex paraguariensis***

Esta planta é economicamente muito importante na América do Sul, pois se desenvolve naturalmente, sendo cultivada na Argentina, Brasil e Paraguai. As partes aéreas são largamente empregadas na preparação da bebida (por infusão), sendo muito apreciada por seu sabor peculiar e suas propriedades estimulantes, principalmente devido ao alto conteúdo de cafeína [48]. Essa espécie possui propriedades reconhecidamente hepatoprotetivas, antioxidantes, antireumáticas, diuréticas e lipolíticas. Atualmente é empregada em preparações comerciais como tônico, agente anticelulite e antienvhecimento. Algumas dessas atividades farmacológicas são atribuídas ao alto conteúdo de derivados cafeoínicos e flavonóides [49-50].

## **II. OBJETIVOS**

## II. Objetivos do Trabalho

No presente trabalho, propôs-se determinar as melhores condições de medida para a quantificação de uma mistura aquosa dos ácidos cafêico e clorogênico por fluorescência. A propriedade de que ambos os compostos são intrinsecamente fluorescentes foi explorada na determinação dos mesmos em extratos de plantas, buscando um método que não requeri o uso de reagentes, apenas água na etapa de extração da amostra.

Para tanto, inicialmente foram realizados estudos com as espécies de interesse analítico em separado, no intuito de avaliar as influências de diversas variáveis sobre os espectros de fluorescência. A partir disso, planejamentos fatoriais foram aplicados com o objetivo de determinar as melhores condições de detecção, ou seja, as que promovem aumento de sensibilidade. Posteriormente, o estudo consistiu na determinação desses compostos em uma mistura sintética, através do uso de métodos quimiométricos relacionados à calibração multivariada na modalidade PLSR-1 para o tratamento dos dados, sendo finalizado pela aplicação da metodologia desenvolvida em uma amostra comercial obtida através de extratos vegetais da planta *Ilex paraguariensis* (erva mate).

## **III. EXPERIMENTAL**

### **III. Experimental**

#### **1. Equipamento**

As medidas fluorimétricas foram realizadas em um espectrofluorímetro (Perkin-Elmer, modelo LS 55) equipado com uma lâmpada de xenônio pulsada (20 kW, 8  $\mu$ s), dois monocromadores (Monk-Gillieson) e como sistema detector uma fotomultiplicadora (Hamamatsu), acoplados a um computador para a aquisição e o processamento dos dados espectrais através da utilização do software “FL WINLAB Molecular Spectroscopy” (versão 4.00.00). As fendas de excitação e emissão foram fixadas em 7,5 e 15 nm, respectivamente. Da mesma forma, a voltagem da fotomultiplicadora e a velocidade de varredura foram fixadas em 850 mV e 700 nm min<sup>-1</sup>, respectivamente. Para as medidas fluorimétricas, utilizaram-se cubetas de quartzo padrão de 1x1 cm. O compartimento para a colocação da cubeta no espectrofluorímetro foi conectado a um banho termostaticado, para o controle da temperatura através da circulação de água através do mesmo.

#### **2. Reagentes e Soluções**

Os ácidos cafêico e clorogênico foram utilizados como padrões. Em todos os experimentos as soluções utilizadas foram preparadas a partir do uso de água deionizada, através de um sistema de purificação de água Milli-Q.

##### **2.1 Ácido Cafêico**

Preparou-se 10 mL de uma solução padrão estoque de CA na concentração  $5,55 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, através da dissolução de 10,0 mg do ácido em água quente (80 °C), sob agitação e posterior utilização do banho de ultrassom até a completa

dissolução do CA. Essa solução foi armazenada em um frasco protegido da luz e a temperatura ambiente, sendo diluída a  $5,55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  antes de sua utilização em diluições subseqüentes. Resultados prévios mostraram que a intensidade de fluorescência do ácido cafêico permaneceu estável por pelo menos seis horas.

## 2.2 Ácido Clorogênico

Com relação às soluções contendo apenas o ácido clorogênico, preparou-se 10 mL de uma solução padrão estoque do ácido na concentração  $2,82 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , através da dissolução de 10,0 mg do CGA em água a temperatura ambiente, sendo a mesma armazenada em um frasco protegido da luz e a temperatura ambiente. Essa solução foi diluída a  $2,82 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  antes de seu uso em diluições posteriores. Dados relativos à estabilidade demonstraram a possibilidade de sua utilização por pelo menos doze horas.

## 2.3 Tampões

A solução tampão fosfato utilizada foi a de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0,025 \text{ mol L}^{-1}$  a  $\text{pH}=6$ , preparada pela dissolução de fosfato monobásico de potássio em água e adicionando-se hidróxido de sódio 10 % (m/v) para ajustar o pH [51]. As outras soluções tampão testadas foram preparadas da seguinte maneira [52]: a solução tampão McIlvaine em  $\text{pH}=6$  foi preparada pela adição de ácido cítrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e fosfato dibásico de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , a solução tampão Sorrensen em  $\text{pH}=6$  foi preparada pela adição de uma solução de fosfato monobásico de potássio  $0,07 \text{ mol L}^{-1}$  e de uma solução de fosfato dibásico de sódio  $0,08 \text{ mol L}^{-1}$ , ambos feitos de acordo com o procedimento da literatura, sendo que os valores de pH foram conferidos com o auxílio de um pHmetro após a preparação das referidas soluções.

### 3. Procedimentos

#### 3.1 Determinação de Ácido Cafêico

A curva analítica foi obtida através da adição de volumes apropriados da solução de CA em um balão volumétrico de 10 mL, para fornecer concentrações entre 0,08 e 11,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , sendo completado até o menisco, com solução tampão fosfato 0,025  $\text{mol L}^{-1}$  (pH=6). Os reagentes foram armazenados a 25 °C para minimizar o tempo de equilíbrio da temperatura. Uma alíquota de 3 mL dessa solução foi transferida para uma cubeta de quartzo a temperatura constante e a intensidade de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}=284/424$  nm) foi obtida na faixa de 325 a 530 nm, a 700  $\text{nm min}^{-1}$  de velocidade de varredura e com a voltagem da fotomultiplicadora ajustada em 850 mV. A intensidade de fluorescência das soluções foi obtida em triplicata e medida contra um branco, preparado com as mesmas concentrações dos reagentes, mas sem o CA, e seus sinais foram subtraídos daqueles obtidos para as amostras. As medidas de fluorescência foram feitas usando como fendas de excitação e emissão as largas de 7,5 e 15,0 nm, respectivamente.

#### 3.2 Determinação de Ácido Clorogênico

De maneira semelhante à determinação de CA, para a obtenção da curva analítica do ácido clorogênico foram adicionados em um balão volumétrico de 10 mL, volumes apropriados da solução de CGA para fornecer concentrações entre 0,3 e 8,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , sendo completado até o menisco com solução tampão fosfato 0,025  $\text{mol L}^{-1}$  (pH=6). A intensidade de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}=330/452$  nm) foi obtida

na faixa de 370 a 545 nm ( $700 \text{ nm min}^{-1}$  de velocidade de varredura e 850 mV de voltagem da fotomultiplicadora), com as larguras das fendas de excitação e de emissão ajustadas em 7,5 e 15,0 nm, respectivamente.

### 3.3 Estudos Preliminares

Esses estudos foram realizados no intuito de se avaliar as influências de determinadas variáveis (instrumentais e outras, relacionadas às espécies de interesse analítico) sobre a emissão de fluorescência do CA e também do CGA, individualmente.

#### 3.3.1 Preparo das Soluções Padrão de Trabalho

##### *3.3.1.1 Ácido Cafêico*

As soluções padrão de trabalho ( $7,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foram preparadas a partir da transferência de 130  $\mu\text{L}$  de uma solução padrão estoque a  $5,55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  desse composto para um balão volumétrico de 10 mL, completando-o até o menisco inicialmente apenas com água e posteriormente pela adição da solução tampão fosfato selecionada. Esse procedimento repetiu-se a cada conjunto de experimentos.

##### *3.3.1.2 Ácido Clorogênico*

Da mesma maneira que para o CA, as soluções padrão de trabalho do CGA ( $5,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foram preparadas a partir da adição de 200  $\mu\text{L}$  de uma solução  $2,82 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  do ácido clorogênico em um balão volumétrico de 10 mL, por diluição inicialmente apenas em água e posteriormente pela adição da solução

tampão fosfato selecionada, e esse procedimento também foi repetido previamente a cada conjunto de experimentos.

### 3.3.2 Variação de Parâmetros: Instrumental

As variações instrumentais foram obtidas através de estudo de diferentes parâmetros - utilizando-se apenas as soluções padrão de CA - pela variação de cada um dos fatores selecionados, independentemente:

#### *3.3.2.1 Largura das Fendas*

Variou-se a largura das fendas de excitação (2,5 a 15 nm) e de emissão (2,5 a 20 nm), de maneira que a cada largura fixada para a fenda de emissão, foi obtida medida de fluorescência para o composto a diferentes larguras da fenda de excitação.

#### *3.3.2.2 Voltagem da Fotomultiplicadora*

O estudo relacionado ao parâmetro instrumental de variação da voltagem da fotomultiplicadora foi feito na faixa de 650 a 900 mV, que praticamente corresponde à variação permitida pelo equipamento (600 a 950 mV).

#### *3.3.2.3 Velocidade de Varredura*

Diferentemente dos itens 3.3.2.1 e 3.3.2.2, este estudo foi realizado para ambos os ácidos cafêico e clorogênico, separadamente, variando-se para cada um deles a velocidade de varredura na faixa de 50 a 1500 nm min<sup>-1</sup>, obtendo-se medidas de fluorescência para diferentes intervalos dentro dessa faixa.

### 3.3.3 Variação de Parâmetros: Condições da Espécie de Interesse Analítico

Como é conhecida que a fluorescência é uma técnica altamente dependente de fatores como temperatura, pH, força iônica, etc., outras variáveis foram avaliadas no sentido da obtenção do comportamento do ácido cafêico, e também do ácido clorogênico, frente a tais modificações:

#### *3.3.3.1 Temperatura*

Variou-se a temperatura na faixa de 20 a 30 °C, através da mudança na temperatura do banho termostatizado acoplado ao espectrofluorímetro, sendo que as medidas de fluorescência das soluções de trabalho dos padrões foram feitas após a estabilização prévia dessas soluções por uma hora na temperatura desejada.

#### *3.3.3.2 Presença de Oxigênio*

Uma vez que alguns compostos fenólicos, tais como o CA e o CGA, podem ser oxidados na presença de ar a derivados dicetônicos ou a outros produtos de degradação [2], bem como à formação de o-quinonas [53], o estudo da presença de oxigênio em tais soluções se faz necessário.

Com essa finalidade, para a avaliação do comportamento de uma solução de CA frente à presença de oxigênio, medidas de fluorescência foram feitas antes e imediatamente após a aplicação de um fluxo de nitrogênio (N<sub>2</sub>) através da solução por quinze minutos. O mesmo procedimento foi realizado para o CGA.

#### *3.3.3.3 pH*

As medidas de fluorescência foram feitas nas soluções de trabalho dos padrões imediatamente após o ajuste ao pH desejado, com o auxílio de um

pHmetro. Variou-se o pH das soluções no intervalo de 2,5 a 8, adicionando-se para isso soluções de hidróxido de sódio ou de ácido sulfúrico.

#### *3.3.3.4 Tipo de Tampão*

Os procedimentos para o preparo dos diferentes tipos de tampão utilizados, em pH=6, são descritos no item 2.3. As medidas de fluorescência das soluções de trabalho já diluídas nos tampões especificados foram feitas, de maneira que se obteve valores médios de uma triplicata, descontando-se o valor do branco. Este último corresponde, nesse caso, à emissão de fluorescência para cada tipo de tampão utilizado, sem a espécie de interesse analítico.

#### *3.3.3.5 Concentração do Tampão*

Variou-se a concentração do tampão fosfato (pH=6) no intervalo de 0,025 a 0,4 mol L<sup>-1</sup>. De maneira semelhante ao item 3.3.3.4, o valor do branco foi descontado das medidas de fluorescência das soluções de trabalho dos ácidos cafêico e também clorogênico, obtendo-se seus valores médios.

### **3.4 Planejamentos Fatoriais**

Realizaram-se otimizações através de planejamentos fatoriais 2<sup>3</sup> para a obtenção da condição de maior sensibilidade na determinação quantitativa do ácido cafêico e do ácido clorogênico em solução aquosa, ainda de maneira individual, analisando-se os efeitos principais e a presença de fatores de interação na otimização da resposta (emissão/fluorescência), e considerando-se os parâmetros (ou fatores) que influenciam as medidas de fluorescência. Entretanto, os estudos preliminares relacionados no item 3.3 foram realizados previamente à otimização por planejamentos fatoriais, no intuito de serem definidos os fatores de interesse e

seus níveis adequados para serem aplicados nos planejamentos, a partir do conhecimento obtido com relação ao comportamento dos ácidos CA e CGA frente às referidas modificações de variáveis (instrumentais e de condição das espécies de interesse analítico).

### 3.4.1 Variáveis Instrumentais

A otimização dos métodos para a determinação do ácido cafêico e também do ácido clorogênico, ainda de maneira individual, realizou-se através de um planejamento fatorial em duas etapas, sendo que a primeira relaciona-se às variáveis instrumentais - utilizando-se para isso apenas as soluções de ácido cafêico.

Para essa finalidade, medidas de fluorescência foram feitas utilizando-se as soluções padrão aquosas de trabalho do CA descritas no item 3.3.1.1, em duplicata através de repetições autênticas, e de maneira aleatória. Dessa maneira, os diferentes fatores instrumentais selecionados e a magnitude da correspondente perturbação realizada em seus níveis, para a otimização instrumental, são mostrados na Tabela 2, onde os símbolos “+” e “-“ mostram a direção dessa perturbação.

**Tabela 2.** Fatores e seus respectivos níveis, escolhidos para realização de um planejamento fatorial  $2^3$  (variáveis instrumentais).

Fatores	Níveis	
	(-)	(+)
1 (Largura da Fenda de Excitação/nm)	5	10
2 (Largura da Fenda de Emissão/nm)	12,5	17,5
3 (Voltagem da Fotomultiplicadora/mV)	750	850

### 3.4.2 Variáveis Relacionadas à Condição das Espécies de Interesse Analítico

Posteriormente, e de maneira semelhante ao item anterior, realizaram-se planejamentos fatoriais  $2^3$  com relação a essa segunda classe de variáveis, agora para cada um dos ácidos em separado (preparados de acordo com os itens 3.3.1.1 e 3.3.1.2), porém utilizando-se os mesmos fatores e níveis desses fatores (Tabela 3).

**Tabela 3.** Fatores e seus respectivos níveis, escolhidos para realização dos planejamentos fatoriais  $2^3$  para CA e também para o CGA (variáveis da condição do analito).

Fatores	Níveis	
	(-)	(+)
1 (pH)	5	7
2 (Concentração do Tampão/mol L <sup>-1</sup> )	0,05	0,1
3 (Temperatura/°C)	23	27

### 3.5 Determinação de uma Mistura Sintética dos Ácidos Cafêico e Clorogênico

Prepararam-se as misturas sintéticas dos ácidos da mesma forma que a descrita nos itens 3.1 e 3.2, porém adicionando-se a um mesmo balão volumétrico as duas frações de volume das soluções padrão estoque, de maneira a obter-se a concentração final desejada de cada ácido numa mesma solução. Repetiu-se esse procedimento para cada par de concentrações desejadas de ambos os compostos.

Para a construção do modelo de calibração de uma mistura CA e CGA em solução aquosa, os padrões foram preparados em concentrações que variaram entre 0,08 e 11,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o CA, e de 0,3 e 8,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o CGA. Ainda, utilizaram-se diferentes proporções de CA e CGA (seis conjuntos: 1:7,5; 1:9,5; 1:11,5; 1:13,5; 1:15,5 e 1:17,5). Isto foi feito de maneira que se variasse ao máximo a concentração dos ácidos dentro da faixa linear de cada composto, mantendo-se

para cada um desses seis conjuntos a sua proporção, com a finalidade de melhorar a robustez do modelo construído, minimizando dessa forma os erros de previsão no caso de haver variações pequenas na proporção das espécies de interesse analítico.

Utilizaram-se as mesmas condições instrumentais descritas nos itens 3.1 e 3.2. Porém, para a mistura sintética os espectros foram obtidos na faixa espectral entre 325 e 530 nm, utilizando-se como comprimento de onda de excitação 284 nm.

Construíram-se os modelos de calibração a partir do uso de 48 misturas sintéticas preparadas a partir dos padrões dos ácidos, selecionadas de um conjunto de 60 amostras, sendo que as 12 restantes foram utilizadas na etapa de validação externa.

O tratamento dos dados foi feito aplicando-se métodos estatísticos multivariados utilizando-se o software Pirouette (versão 3.02, Infometrix Inc.), através da aplicação de métodos quimiométricos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR-1).

### **3.6 Amostra Comercial**

Para a avaliação do modelo de calibração construído para a determinação simultânea dos ácidos cafêico e clorogênico, utilizaram-se extratos vegetais da planta *Ilex paraguariensis* obtidos através do uso das amostras comerciais, conhecidas como “erva-mate”.

Para tanto, adicionou-se 2,5g da erva em 70 mL de água, deixando-a em ebulição durante 20 minutos. Essa solução foi resfriada a 50°C e filtrada, ajustando-se o volume a 100 mL pela adição de água. As diluições subsequentes da amostra foram feitas empregando-se tampão fosfato 0,025 M em pH=6.

## **IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## IV. Resultados e Discussão

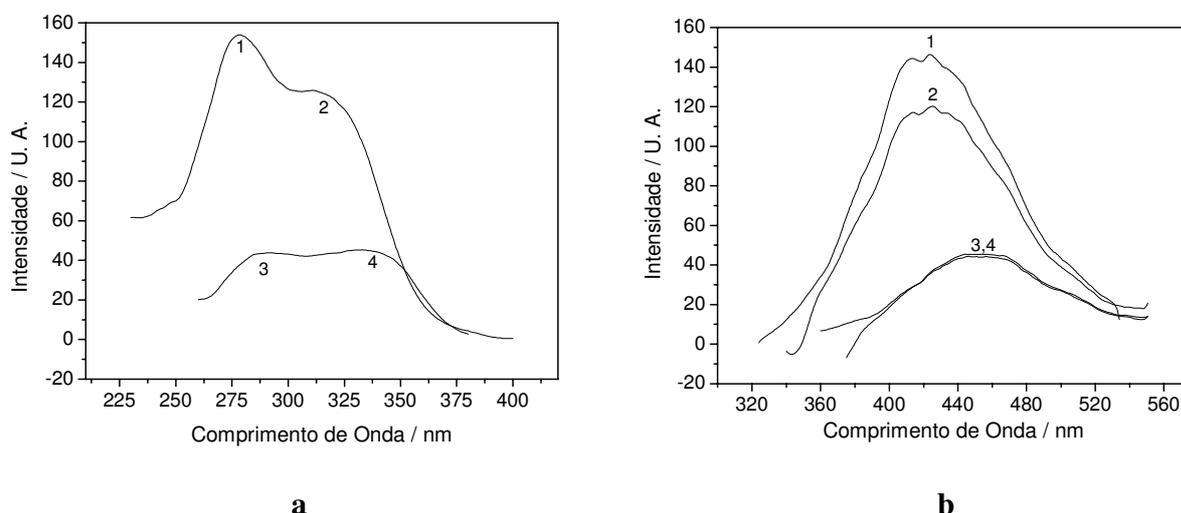
### 1. Estudos Preliminares

Com o objetivo de se obter conhecimentos a respeito do sistema em estudo foram estudados as influências de diversas variáveis na emissão de fluorescência de CA e CGA. Dessa forma, análises fluorimétricas individuais de padrões dos ácidos cafêico e clorogênico foram feitas, de maneira que se podem observar seus espectros de excitação e emissão, ilustrados na Figura 3.

Devido à semelhança estrutural dos compostos e ao alargamento das bandas, ocorre sobreposição espectral tanto dos espectros de excitação (Figura 3a) quanto dos espectros de emissão (Figura 3b) para ambos os ácidos. Observam-se ainda dois máximos de excitação para os dois compostos, sendo que a Figura 3b corresponde à emissão de cada um dos ácidos em cada um de seus comprimentos de onda máximos de excitação (1, 2, 3 e 4). Assim, os comprimentos de onda máximos de excitação para CA (1) e para o CGA (4) foram definidos, pois para o CA essa região promove maiores intensidades de fluorescência, e como para o CGA praticamente não há diferença de intensidade entre os dois máximos na emissão, escolheu-se esse valor de excitação para evitar a incidência de radiação de maior energia.

A influência de diferentes larguras nas fendas de excitação (2,5-15,0 nm) e de emissão (2,5-20,0 nm) em relação à intensidade do sinal fluorescente foram testadas. Os valores obtidos foram comparados com os reportados em literatura [54-55], onde há relatos de que o sinal fluorescente é proporcional ao quadrado do produto das larguras das fendas de excitação e de emissão, e que o uso de larguras estreitas das fendas resultam em um aumento da seletividade e, em geral, um decréscimo na sensibilidade, enquanto que maiores larguras das fendas ocasionam

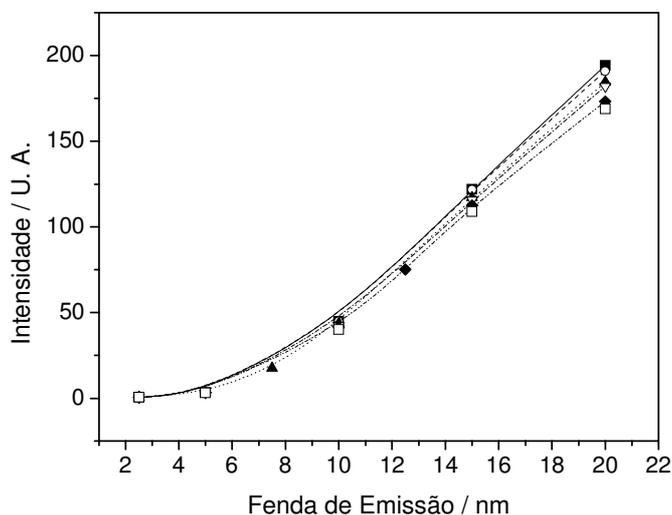
o efeito contrário. Entretanto, o uso da fenda de emissão em seu máximo de abertura deve ser evitado no sentido de prevenir interferências relacionadas a radiações espúrias. Da mesma forma, o uso de fendas de excitação menores promove a incidência de radiação em uma faixa mais estreita de comprimento de onda, e conseqüentemente mais próxima do máximo de excitação da amostra, aumentando-se dessa maneira o rendimento quântico da fluorescência. Por essa razão o sinal fluorescente é maior à medida que se diminui a largura da fenda de excitação, para uma mesma largura de fenda de emissão, como pode ser observado na Figura 4.



**Figura 3. (a)** Espectros de excitação para CA ( $\lambda_{ex}$ =1-280 nm e 2-311 nm) e CGA ( $\lambda_{ex}$ =3-290 nm e 4-332 nm) e **(b)** espectros de emissão para CA ( $\lambda_{em}$ =424 nm) e CGA ( $\lambda_{em}$ =454 nm) na presença de água.

Porém, em larguras da fenda de emissão menores que 10,0 nm esse efeito não é observado, possivelmente devido ao ruído na obtenção do espectro ser mais significativo. Dessa maneira, o compromisso entre a seletividade e a sensibilidade levou à escolha da fenda de excitação em 7,5 nm e da fenda de emissão em 15,0 nm para as análises seguintes, devido ao fato de que menores larguras da fenda de excitação promovem perdas na reprodutibilidade devido ao aumento do ruído, e

maiores larguras na fenda de emissão devem ser evitadas, como pode ser visto anteriormente.

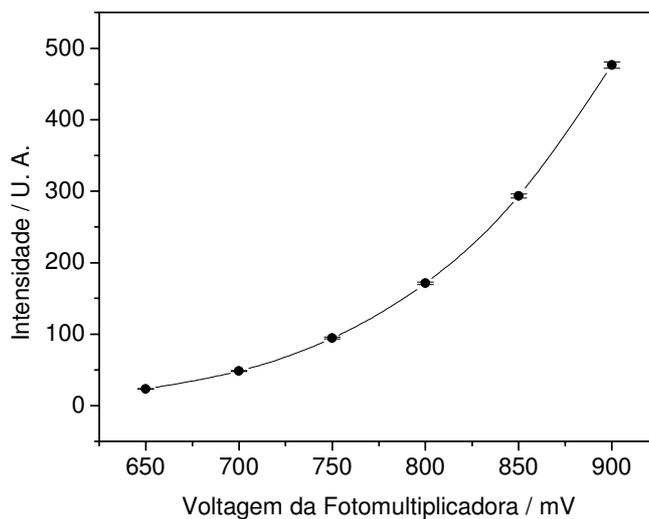


**Figura 4.** Efeito da variação da largura da fenda de emissão na intensidade do sinal de fluorescência para cada uma das seguintes larguras da fenda de excitação (em nanômetros): 2,5 (■), 5,0 (○), 7,5 (▲), 10,0 (▼), 12,5 (◆), 15,0 (□). As medidas de fluorescência foram feitas a partir de soluções aquosas de padrões sintéticos de CA.

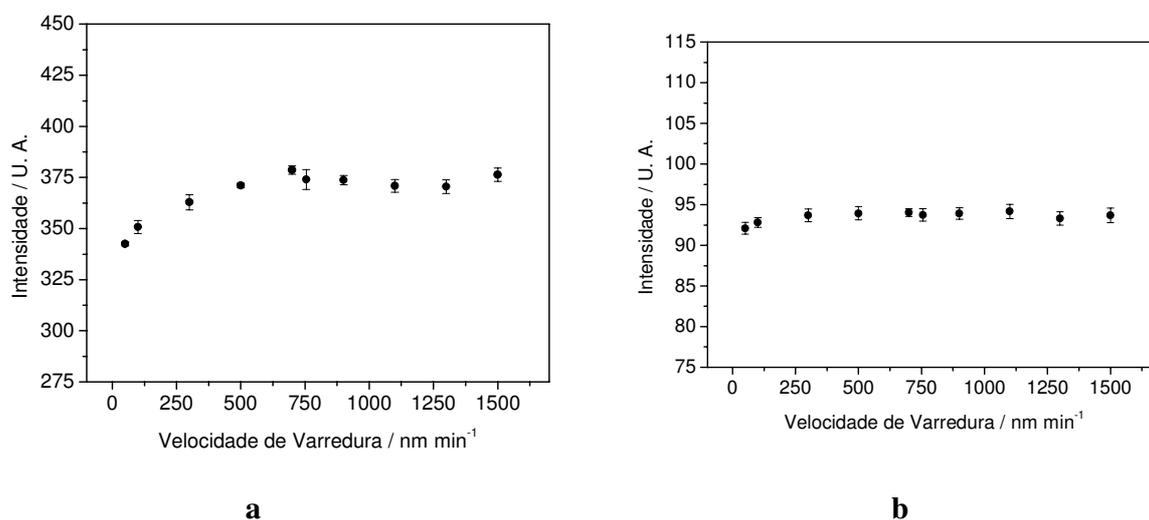
À medida que a voltagem da fotomultiplicadora aumenta, o sinal é amplificado devido ao aumento da corrente gerada, porém essa relação não é linear, como pode ser visto na Figura 5. No intuito de preservar a vida útil da fotomultiplicadora, a voltagem de 850 mV foi definida.

Experimentos similares foram feitos, agora relacionados à velocidade de varredura para cada um dos ácidos em separado, empregando-se incrementos que possibilitaram a obtenção de medidas na faixa de 50 a 1500 nm min<sup>-1</sup>. Os resultados (Figura 6) mostraram que a seleção da velocidade de varredura em 700 nm min<sup>-1</sup> pode ser influenciada por dois fatores importantes: reprodutibilidade e frequência analítica. Enquanto a performance da razão sinal-ruído se manteve constante por toda a faixa em estudo para os dois compostos, tempos elevados de análise quando foram usadas velocidades de varredura menores que 700 nm min<sup>-1</sup>

podem ter promovido fotodegradação do CA, levando a um decréscimo em 10% do sinal fluorescente devido ao maior tempo de radiação incidente. Acima desse valor, uma plataforma é observada.

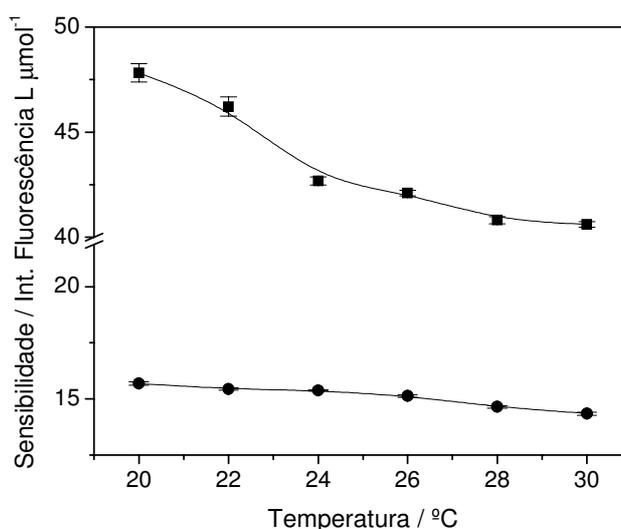


**Figura 5.** Intensidade de fluorescência do ácido caféico em função da variação na voltagem da fotomultiplicadora (mV), utilizando soluções aquosas de padrões sintéticos de CA.



**Figura 6.** Variação da intensidade de fluorescência em função da velocidade de varredura (nm min<sup>-1</sup>) para (a) CA e (b) CGA, utilizando soluções aquosas de padrões sintéticos de CA e também de CGA.

A fluorescência é uma técnica altamente dependente de fatores tais como temperatura, pH, força iônica, etc. É conhecido que a eficiência quântica da fluorescência para a maioria das moléculas diminui com o aumento da temperatura, pois o aumento na frequência de colisões a elevadas temperaturas aumenta a probabilidade de desativação por conversão externa [42]. O comportamento da fluorescência em função da modificação na temperatura foi observado, e os resultados (Figura 7) mostram um decréscimo de sensibilidade em função da elevação da temperatura. Uma vez que a temperatura de 25°C é mais facilmente controlada, por ser próxima à temperatura ambiente, e nessa região de temperatura também se observa que as sensibilidades dos compostos tendem a não sofrer grandes variações, definiu-se a mesma em 25 °C.



**Figura 7.** Sensibilidade em função da variação de temperatura para CA (■) e CGA (●), a partir de soluções aquosas de padrões sintéticos de CA e CGA.

Uma vez que alguns compostos fenólicos, tais como o ácido cafêico, podem ser facilmente oxidados na presença de ar, levando à formação de produtos de degradação [2] e de o-quinonas [53], o estudo da presença de oxigênio em tais soluções se faz de grande importância. Além disso, a presença de oxigênio

dissolvido muitas vezes reduz a intensidade de fluorescência em uma solução [42]. Este efeito pode ser devido a propriedades paramagnéticas do oxigênio molecular, as quais promovem um cruzamento intersistemas e conversão de moléculas excitadas ao estado triplete. Dessa maneira, o efeito da supressão da fluorescência causada pela presença de oxigênio dissolvido foi estudado em soluções de CA e de CGA, através de medidas feitas antes e imediatamente após a remoção de O<sub>2</sub> pela passagem de um gás de N<sub>2</sub> pela amostra, obtendo-se valores médios para cada caso, como pode ser observado pela Tabela 4.

**Tabela 4.** Variação na intensidade de fluorescência em função da presença ou ausência de O<sub>2</sub>, a partir de soluções aquosas de padrões sintéticos de CA e CGA.

<b>Fluorescência</b>	<b>Presença de O<sub>2</sub></b>	<b>Ausência de O<sub>2</sub></b>
<b>CA</b>	350±2	356±2
<b>CGA</b>	88±4	89±3

A comparação entre duas médias pode ser feita utilizando-se cálculos estatísticos que possibilitam avaliar se a resposta (no caso, a intensidade de fluorescência) é realmente afetada pela mudança de nível do fator (onde o fator é representado pela influência de O<sub>2</sub>, considerada em dois níveis: presença ou ausência de O<sub>2</sub>). Para tanto, é preciso avaliar se as variações existentes entre as médias significam ou não a existência de uma diferença sistemática entre a presença ou não de oxigênio, separadamente, para CA e CGA.

Uma extensão do teste *t* pode ser utilizada nesse caso [56], sendo muito valiosa quando a diferença sistemática entre as amostras é causada por um único fator, e é o teste apropriado para se comparar duas médias independentes. Dessa forma, a equação que representa a distribuição de *Student* (Equação 4) pode ser estendida para a diferença de duas médias (Equação 8) da seguinte maneira:

$$t_{N-1} = \frac{\bar{x} - \mu}{s / \sqrt{N}} \quad (\text{Eq. 4})$$

onde  $\bar{x}$  representa a média amostral,  $\mu$  representa a média populacional normalmente distribuída e  $\frac{s}{\sqrt{N}}$  o desvio padrão obtido da própria amostra, sendo  $N$  o número de observações independentes.

Substituindo-se  $\bar{x}$  por  $\bar{x}_A - \bar{x}_B$  e  $\mu$  por  $\mu_A - \mu_B$ , e levando-se em conta a necessidade de determinar o desvio padrão da diferença entre as duas médias amostrais, pode-se admitir que :

$$\hat{V}(\bar{x}_A - \bar{x}_B) = \hat{V}(\bar{x}_A) + \hat{V}(\bar{x}_B) = \frac{s_A^2}{N_A} + \frac{s_B^2}{N_B} \quad \text{(Eq. 5)}$$

onde  $\hat{V}$  representa a estimativa da variância. Considerando-se ainda que  $s_A^2$  e  $s_B^2$  sejam as estimativas da mesma variância populacional, ambas podem ser combinadas em uma única estimativa com um número maior de graus de liberdade:

$$\hat{V}(\bar{x}_A - \bar{x}_B) = s^2 \left( \frac{1}{N_A} + \frac{1}{N_B} \right) \quad \text{(Eq. 6)}$$

A expressão do teste  $t$  torna-se então:

$$\frac{(\bar{x}_A - \bar{x}_B) - (\mu_A - \mu_B)}{s \sqrt{\frac{1}{N_A} + \frac{1}{N_B}}} = t_v \quad \text{(Eq. 7)}$$

À partir dessa expressão, pode-se então determinar um intervalo de confiança para a diferença entre as duas médias populacionais, utilizando para isso valores amostrais:

$$(\mu_A - \mu_B) = (\bar{x}_A - \bar{x}_B) \pm t_v \cdot s \cdot \sqrt{\frac{1}{N_A} + \frac{1}{N_B}} \quad \text{(Eq. 8)}$$

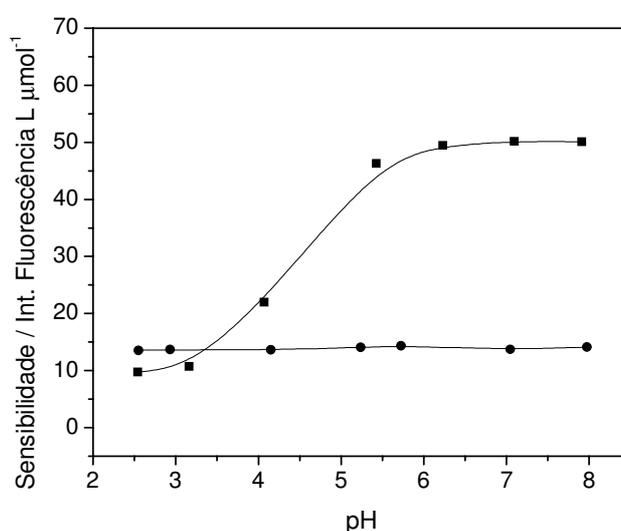
Assim, através da determinação dos intervalos de confiança para cada um dos ácidos separadamente, à partir de medidas feitas com e sem a remoção de oxigênio, pode-se concluir que não há nenhuma diferença estatisticamente significativa entre a presença e a ausência de  $O_2$  nessas soluções, no nível de 95 %

de confiança e  $n=3$  (onde  $n$  é o número de determinações). As medidas subsequentes foram realizadas sem a remoção prévia de oxigênio do meio.

A influência do pH do meio reacional no sinal analítico foi testada, através da utilização de valores de pH (2 a 8) obtidos pela adição de soluções de ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio imediatamente antes das medidas (Figura 8). Os resultados obtidos mostram que a sensibilidade do CGA praticamente não é influenciada pela variação do pH do meio aquoso, ao contrário do CA que somente sofre influência em meio ácido, em valores abaixo de 5,5. Essa diferença entre os ácidos pode ser explicada pelo fato de que o CA possui um hidrogênio - proveniente da hidroxila ligada ao carbono carbonílico - que pode ser susceptível à desprotonação em condições acima de seu pKa (igual à 3,6 [57]), ao contrário de CGA (com pKa=2,66 [58]), e com isso a carga negativa gerada a partir dessa desprotonação pode promover a doação de densidade eletrônica que pode ser estabilizada por ressonância, favorecendo assim a fluorescência - e dessa forma observa-se um patamar de fluorescência máximo para o CA nessas condições. O valor definido a partir desses resultados foi de pH=6, evitando-se valores mais elevados devido ao aumento da basicidade, a qual poderia causar a oxidação desses compostos fenólicos [2].

De acordo com o procedimento previamente citado, o efeito de diferentes tipos solução de tampão na emissão do CA e do CGA foi obtido, conforme se pode observar na Tabela 5. As seguintes soluções tampão foram usadas: McIlvaine (ácido cítrico- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e Sorrensen ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), além do tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{NaOH}$ ), todos em pH=6. Para cada ácido em estudo, os valores médios de sensibilidade utilizando-se cada um das diferentes soluções tampão foram comparados entre si, de maneira que se pode averiguar a possibilidade da existência ou não de diferenças sistemáticas entre as respectivas médias. Para tanto, utilizou-se a Equação 8 na determinação de intervalos de confiança. Como a referida

equação destina-se à comparação entre *duas* médias na determinação da presença ou não de diferenças sistemáticas entre as mesmas, e levando-se em conta que o valor médio de sensibilidade utilizando-se o tampão fosfato foi aparentemente o maior para ambos os ácidos, as comparações entre as médias foram feitas duas a duas, determinando-se intervalos de confiança utilizando os valores de sensibilidade obtidos com o uso das soluções tampão fosfato/McIlvaine e também fosfato/Sorrensen.



**Figura 8.** Sensibilidade em função da variação do pH para CA (■) e CGA (●), a partir de soluções aquosas de padrões sintéticos de CA e CGA.

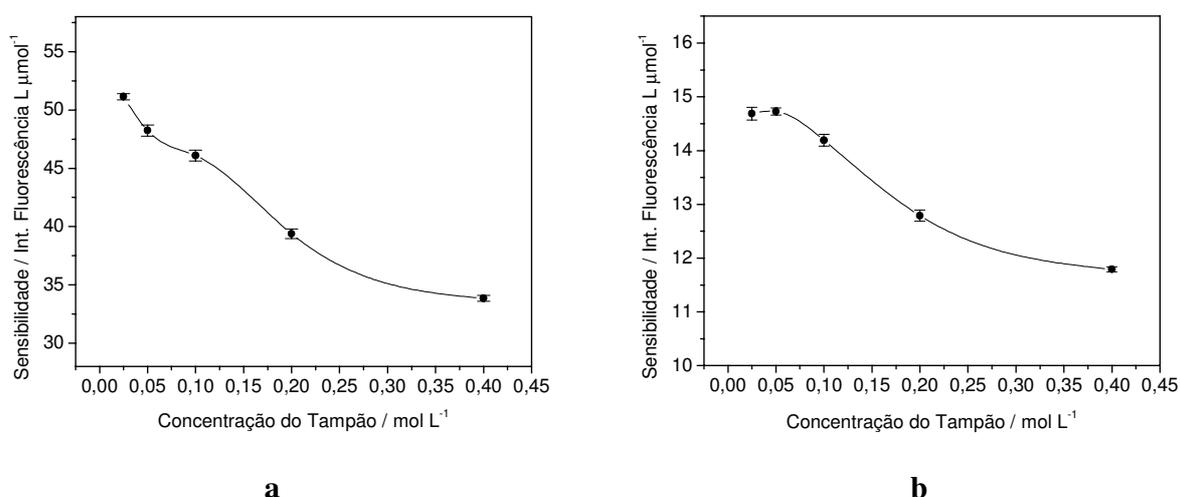
Quando são comparadas as médias relativas somente às soluções de CGA, observa-se que a solução tampão fosfato realmente promove maiores valores de sensibilidade que as soluções tampão McIlvaine e Sorrensen, no nível de confiança de 95 %. No caso do CA, quando se comparam os valores médios obtidos pelo uso da solução tampão fosfato com as médias obtidas para a solução tampão McIlvaine, a sensibilidade pode ser considerada maior quando se usa o primeiro tampão, no nível de 95 % de confiança, porém, são equivalentes estatisticamente quando se

compara a solução tampão fosfato com a solução tampão Sorrensen. Por questões práticas, foi definida a solução tampão fosfato para as medidas posteriores.

**Tabela 5.** Sensibilidade em função do tipo de solução tampão utilizada, em pH=6, a partir de soluções aquosas de padrões sintéticos de CA e CGA.

Sensibilidade (Fluorescência.L.μmol <sup>-1</sup> )	McIlvaine	Sorrensen	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -NaOH
CA	41,6±0,4	43,4±0,7	44,7±0,7
CGA	13,6±0,1	13,8±0,3	15,2±0,2

Uma vez definido a solução tampão fosfato, um estudo sistemático foi realizado acerca do efeito de diferentes condições de concentração dessa solução tampão na emissão dos ácidos cafêico e clorogênico - variável que pode inferir a influência da força iônica na fluorescência, como pode ser observado na Figura 9.



**Figura 9.** Influência da concentração do tampão (tampão fosfato em pH=6) na sensibilidade de padrões de (a) CA e (b) CGA.

A princípio, poder-se-ia pensar que a diminuição da sensibilidade com o aumento da concentração da solução tampão fosse uma função do efeito da concentração da própria solução tampão, mas estudos prévios demonstraram que a diminuição da fluorescência relaciona-se ao efeito supressor ocasionado por um

aumento na concentração do sal do tampão, pois o sinal do branco aumenta à medida que se aumenta também a concentração da solução tampão, indicando alta interferência nesta situação, possivelmente devido ao aumento da presença de impurezas. Dessa maneira, a concentração de  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$  foi a escolhida para ser utilizada na preparação da solução tampão fostato, pois essa condição promove maiores intensidades do sinal de fluorescência.

A partir dos estudos preliminares anteriormente descritos, podem-se escolher adequadamente os fatores que realmente influenciam a resposta nas análises fluorimétricas, em seus níveis adequados, de maneira a se obter planejamentos fatoriais que direcionassem a determinação quantitativa dos ácidos na condição ótima de maior sensibilidade, analisando-se os efeitos principais e a presença de interação entre fatores para a maximização da resposta (assumindo um efeito linear na medida).

## 2. Planejamentos Fatoriais

Planejamentos fatoriais estão relacionados ao planejamento de experimentos que possibilitem a medida dos efeitos de determinados fatores sobre a resposta, levando-se em conta um número total de experimentos consideravelmente reduzido [56]. Dessa forma, a partir dos estudos preliminares feitos para o conhecimento do sistema em estudo, a otimização do presente método - relacionado à determinação ainda de maneira individual de CA e CGA em solução aquosa - foi feita por planejamentos fatoriais  $2^3$  em duas etapas: a primeira delas relacionada às variáveis instrumentais, seguida das variáveis relacionadas à condição do analito (tais como temperatura, pH e concentração do tampão).

## 2.1 Variáveis Instrumentais

Normalmente, um planejamento fatorial pode ser feito de maneira que contenha todos os parâmetros prováveis de causar influência sobre a resposta, porém se forem utilizados níveis muito próximos para cada fator, pode ser que os efeitos significativos não sejam observados. Por outro lado, se forem utilizadas grandes diferenças entre os mesmos níveis, isto poderia resultar facilmente no julgamento do método como sendo robusto. Ainda, a seleção dos fatores de interesse, que merecem estudos mais aprofundados, é necessária, pois quando se considera um número muito grande de fatores em um planejamento, pode ser que alguns deles não tenham influência significativa sobre a resposta, e nesse caso a realização de um planejamento completo poderia ser um desperdício.

Planejamentos fatoriais de dois níveis são muito úteis quando se deseja conhecer se determinados fatores (largura das fendas, velocidade de varredura, etc.) possuem ou não influência sobre a resposta (neste caso, na intensidade de fluorescência), e não há uma preocupação maior em descrever muito rigorosamente essa possível influência. Além disso, podem-se calcular também efeitos de interação entre fatores, ou seja, quando o efeito de uma variável depende do nível de outra. Os fatores e seus respectivos níveis, escolhidos para realização de um planejamento fatorial  $2^3$  (variáveis instrumentais) encontram-se na Tabela 2.

A velocidade de varredura mostrou não ser um fator importante e por isso não merecedor de sua inclusão no planejamento acima, uma vez que o seu comportamento praticamente não sofreu variação, tendo sido definido o valor de  $700 \text{ nm min}^{-1}$ .

O estudo relacionado às variáveis instrumentais foi realizado utilizando-se somente os padrões de ácido caféico, pois como o CA e o CGA possuem estruturas semelhantes, apresentando sobreposição espectral tanto em relação a seus espectros

de excitação, quando aos espectros de emissão, a sensibilidade do aparelho com relação a esses parâmetros instrumentais (com exceção da velocidade de varredura) deve apresentar um comportamento próximo para ambos os ácidos.

Nessa etapa os ensaios foram feitos em duplicata, através de repetições autênticas, para que pudesse ser estimado o erro experimental, e com isso avaliar a significância estatística dos efeitos no nível de 95 % de confiança. Além disso, para que fosse evitada a distorção estatística dos resultados, ou seja, para impedir que fatores não conhecidos, e por isso indesejáveis, contaminassem os efeitos investigados no planejamento fatorial, foi feita a aleatorização dos experimentos. A matriz de planejamento pode ser observada na Tabela 6.

**Tabela 6.** Fatores, níveis e respostas obtidas para o planejamento fatorial  $2^3$  proposto para o estudo das variáveis instrumentais.

Ensaio/Fatores	1	2	3	Resposta <sup>a</sup> (UA)		Resposta Média	Desvios Padrão <sup>b</sup>
1	-	-	-	114,38 (16)	123,66 (5)	119,020	6,5619
2	+	-	-	115,29 (6)	120,09 (10)	117,690	3,3941
3	-	+	-	190,86 (1)	194,49 (12)	192,675	2,5668
4	+	+	-	190,80 (9)	183,94 (11)	187,370	4,8507
5	-	-	+	373,51 (7)	380,61 (8)	377,060	5,0205
6	+	-	+	367,51 (4)	352,53 (14)	360,020	10,5926
7	-	+	+	636,42 (3)	607,12 (15)	621,770	20,7182
8	+	+	+	604,64 (13)	624,65 (2)	614,645	14,1492

<sup>a</sup> Intensidade de fluorescência para CA, obtida à 424 nm (excitação à 284 nm). Os valores em parêntesis relacionam a ordem de obtenção das medidas.

<sup>b</sup> Estimativa do desvio padrão para duas determinações.

Utilizando-se as respostas médias no tratamento matemático aplicado ao planejamento fatorial, as estimativas dos efeitos para o sistema (Tabela 7) foram calculadas de acordo com a Equação 9 [56]:

$$efeito = \bar{y}_+ - \bar{y}_- \quad (\text{Eq. 9})$$

onde o efeito principal é representado pela diferença entre a resposta média no nível superior ( $\bar{y}_+$ ) e a resposta média no nível inferior ( $\bar{y}_-$ ) de um determinado fator.

Exemplo: efeito da largura da fenda de excitação =  $(117,7+187,4+360,0+614,7)/4 - (119,0+192,7+377,1+621,8)/4 = -7,7$ .

Através do erro padrão podem-se construir intervalos de confiança para os valores dos efeitos, usando para isso a distribuição de *Student*. O cálculo dos resultados mostra que um efeito será estatisticamente significativo (no nível de 95 % de confiança), e portanto merecedor de interpretação, se o seu módulo for maior que o produto do erro padrão pelo ponto da distribuição de *Student* (com oito graus de liberdade), ou seja, maior que **11,897**. Aplicando esse critério aos valores da Tabela 7, pode-se observar que apenas os efeitos principais **2** (largura da fenda de emissão) e **3** (voltagem da fotomultiplicadora) são significativos.

**Tabela 7.** Estimativas dos efeitos calculados pelo planejamento fatorial  $2^3$  da Tabela 2 e seus erros padrão (em intensidade de fluorescência).

<b>Efeito</b>	<b>Estimativa do Efeito (<math>\pm EP</math>)<sup>a</sup></b>
<b>Média</b>	323,8 $\pm$ 2,6
<b>Efeitos Principais</b>	
<b>1</b> (Largura da Fenda de Excitação)	-7,7 $\pm$ 5,2
<b>2</b> (Largura da Fenda de Emissão)	160,7 $\pm$ 5,2
<b>3</b> (Voltagem da Fotomultiplicadora)	339,2 $\pm$ 5,2
<b>Interações de Dois Fatores</b>	
<b>12</b>	1,5 $\pm$ 5,2
<b>13</b>	-4,4 $\pm$ 5,2
<b>23</b>	89,0 $\pm$ 5,2
<b>Interações de Três Fatores</b>	
<b>123</b>	3,5 $\pm$ 5,2

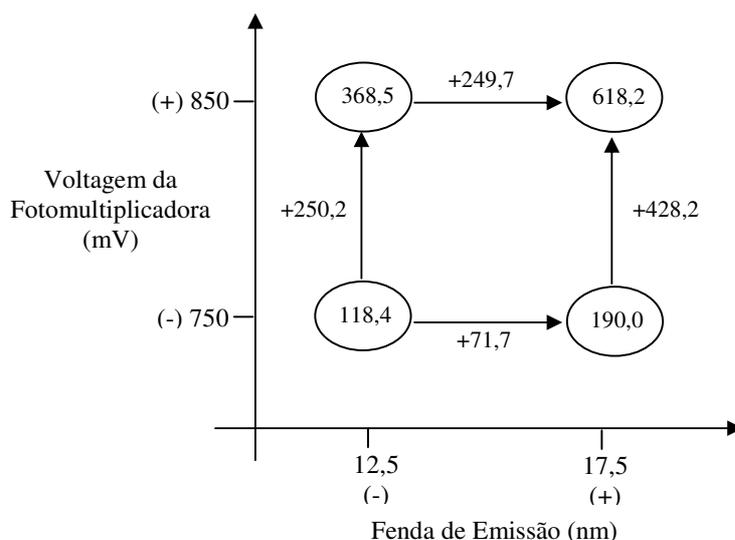
<sup>a</sup> Erro Padrão de um efeito (EP) =  $\sqrt{\hat{V}(\text{efeito})}$ , onde a estimativa da variância de um efeito,  $\hat{V}(\text{efeito}) = \left(\frac{8}{16}\right) \cdot \left(\frac{s^2}{2}\right)$  para um planejamento  $2^3$ ;  $s^2 = [(v_1 s_1^2) + \dots + (v_g s_g^2)] / (v_1 + \dots + v_g)$  onde  $v_g$  representa o número de graus de liberdade, ou seja, o número de replicatas menos um [56].

Como o efeito de interação **23** é significativo, os seus efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente. A melhor forma para esse tipo de interpretação consiste na construção de um diagrama (Figura 10) contendo as respostas médias em todas as combinações de níveis das variáveis.

Dessa maneira, as condições ótimas determinadas pela aplicação do planejamento fatorial podem ser resumidas através da análise da Figura 10:

- (a) Aumentando a largura da fenda de emissão, aumenta-se a intensidade de fluorescência, mas esse efeito é muito mais pronunciado com a voltagem da fotomultiplicadora em 850 mV do que em 750 mV (+249,7 contra +71,7);
- (b) Mudando a voltagem da fotomultiplicadora de 750 para 850 mV, aumenta-se a intensidade do sinal de fluorescência, e esse efeito é muito mais significativo com fenda de emissão a 17,5 nm (+428,2 contra +250,2);
- (c) Maiores intensidades no sinal da fluorescência (618,2 em média) são obtidas com a fenda de emissão em 17,5 nm e voltagem da fotomultiplicadora em 850 mV.

A fenda de excitação parece não ter influência significativa sobre a resposta na faixa experimental estudada pelo planejamento fatorial - embora seu comportamento tenha sido bem estabelecido através da análise da Figura 4 - sendo a mesma fixada em 7,5 nm. Ainda, a utilização de aberturas maiores da fenda de emissão pode provocar interferências relacionadas à detecção de radiação espúria, e dessa forma fixou-se a fenda de emissão no valor intermediário de 15 nm.



**Figura 10.** Diagrama para interpretação dos efeitos da fenda de emissão e da voltagem da fotomultiplicadora, no planejamento  $2^3$ . Os valores nos vértices do quadrado são as respostas médias (em intensidade de fluorescência).

## 2.2 Variáveis Relacionadas à Condição das Espécies de Interesse Analítico

Da mesma maneira que na etapa anterior, os níveis e fatores de interesse para um planejamento fatorial  $2^3$  puderam ser definidos a partir dos estudos preliminares obtidos, para a realização da otimização da melhor condição de medida dos padrões, relativa às variáveis da amostra.

Como o objetivo final do trabalho proposto relaciona-se à determinação simultânea dos ácidos cafêico e clorogênico a partir de uma mistura desses compostos, utilizando-se um conjunto pré-definido de condições ótimas de medidas (as quais deverão ser as mesmas para os dois compostos), a escolha dos fatores para esta etapa foi feita levando-se em consideração esse fato, de maneira que foram realizados planejamentos fatoriais para os dois ácidos separadamente, porém utilizando-se os mesmos fatores e níveis desses fatores (Tabela 3).

O efeito da presença do oxigênio e os diferentes tipos de tampão não foram escolhidos como sendo fatores desse planejamento, sendo fixados nas seguintes condições: sem a remoção prévia de O<sub>2</sub> dissolvido nas soluções previamente às medidas fluorimétricas, e em tampão fosfato.

### 2.2.1 Ácido Cafêico

A Tabela 8 mostra os valores calculados para todos os efeitos e seus erros padrão.

**Tabela 8.** Efeitos calculados a partir do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> da Tabela 3 e seus erros padrão, EP, para o ácido cafêico (em intensidade de fluorescência).

<b>Efeito</b>	<b>Estimativa do Efeito (<math>\pm</math>EP)</b>
<b>Média</b>	468,1 $\pm$ 2,4
<b>Efeitos Principais</b>	
<b>1</b> (pH)	49,5 $\pm$ 4,8
<b>2</b> (Concentração do Tampão)	-36,5 $\pm$ 4,8
<b>3</b> (Temperatura)	-16,6 $\pm$ 4,8
<b>Interações de Dois Fatores</b>	
<b>12</b>	-30,4 $\pm$ 4,8
<b>13</b>	-5,8 $\pm$ 4,8
<b>23</b>	10,1 $\pm$ 4,8
<b>Interações de Três Fatores</b>	
<b>123</b>	-0,4 $\pm$ 4,8

Para esse caso, um efeito será estatisticamente significativo (no nível de 95 % de confiança) se o seu módulo for maior que o produto do erro padrão pelo ponto da distribuição de *Student* (oito graus de liberdade), ou seja, maior que **11,076**. Aplicando esse critério aos valores da Tabela 8, pode-se observar que todos os efeitos principais **1** (pH), **2** (concentração do tampão) e **3** (temperatura) são significativos, além do efeito de interação **12**.

Como o efeito **12** é significativo, os seus efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente, através da análise da Figura 11.

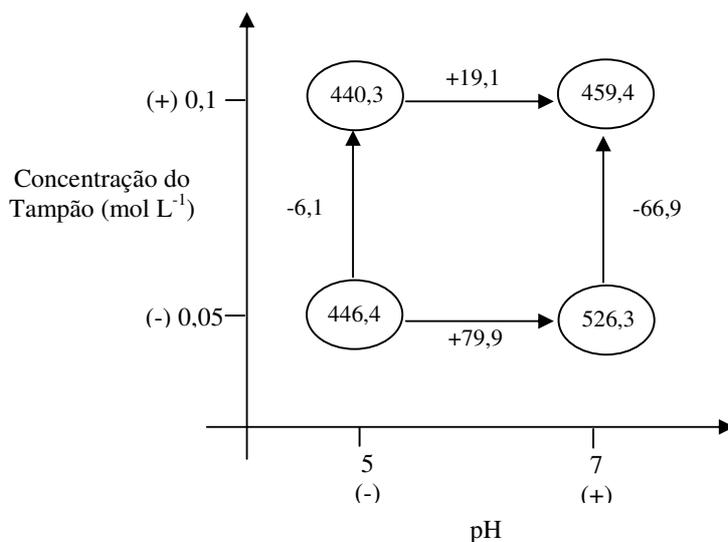
Dessa forma, algumas conclusões podem ser obtidas:

(a) Aumentando o pH, aumenta-se a intensidade de fluorescência, mas esse efeito é muito mais pronunciado com a concentração do tampão em 0,05 M do que em 0,1 M (+79,9 contra +19,1);

(b) Mudando a concentração do tampão de 0,05 para 0,1 M, diminui-se a intensidade do sinal de fluorescência, e esse efeito é muito mais significativo em pH=7 (-66,9 contra -6,1);

(c) Maiores intensidades no sinal da fluorescência (526,3 em média) são obtidas com a concentração do tampão em 0,05 M e pH=7.

Porém, como não há evidência da interação da temperatura com os outros dois efeitos, o efeito principal desse fator pode ser interpretado separadamente: a intensidade da fluorescência diminui em 16,6 unidades, em média, quando a temperatura passa de seu nível inferior (23 °C) para seu nível superior (27 °C), e não há evidência de que essa diminuição dependa dos níveis das outras variáveis, na faixa experimental investigada. No entanto, a temperatura de 25 °C foi escolhida por ser próxima à temperatura ambiente, sendo mais facilmente controlada.



**Figura 11.** Diagrama para interpretação dos efeitos do pH e da concentração do tampão, no planejamento  $2^3$  realizado para o ácido clorogênico. Os valores nos vértices do quadrado são as respostas médias (em intensidade de fluorescência).

### 2.2.2 Ácido Clorogênico

A Tabela 9 mostra os valores calculados para todos os efeitos e seus erros padrão:

**Tabela 9.** Efeitos calculados a partir do planejamento fatorial  $2^3$  da Tabela 3 e seus erros padrão, EP, para o ácido clorogênico (em intensidade de fluorescência).

Efeito	Estimativa do Efeito ( $\pm$ EP)
<b>Média</b>	127,168 $\pm$ 0,66
<b>Efeitos Principais</b>	
1 (pH)	-5,3 $\pm$ 1,3
2 (Concentração do Tampão)	-5,0 $\pm$ 1,3
3 (Temperatura)	-1,9 $\pm$ 1,3
<b>Interações de Dois Fatores</b>	
12	-1,2 $\pm$ 1,3
13	-1,3 $\pm$ 1,3
23	0,4 $\pm$ 1,3
<b>Interações de Três Fatores</b>	
123	0,6 $\pm$ 1,3

Foram considerados como efeitos estatisticamente significativos, no nível de 95 % de confiança, aqueles cujo módulo foi maior que **3,402** (resultado do produto do erro padrão do efeito pelo ponto da distribuição de *Student* com oito graus de liberdade). Aplicando esse critério aos valores da Tabela 9, pode-se observar que apenas os efeitos principais **1** (pH) e **2** (concentração do tampão) são significativos.

Como não há evidência de interação de nenhum efeito principal com os outros fatores, os efeitos principais significativos podem ser interpretados isoladamente. Dessa maneira, a intensidade da fluorescência diminui em 5,3 unidades, em média, quando o pH é elevado de 5 para 7, e não há evidência de que essa diminuição dependa dos níveis das outras variáveis, na faixa experimental investigada. A intensidade de fluorescência também diminui (em 5,0 unidades, em média) quando se aumenta a concentração do tampão de 0,05 para 0,1 mol/L, não havendo evidências que confirmem o fato de que essa diminuição da fluorescência dependa dos níveis dos outros fatores, na faixa estudada.

Pelos dois planejamentos fatoriais realizados nesta etapa, pode ser observado que tanto no planejamento feito para o CA, quanto no do CGA, a intensidade de fluorescência é favorecida na condição de menores concentrações do tampão. De fato, durante os estudos preliminares anteriormente realizados para cada um dos ácidos, pode-se observar que em concentrações ainda menores que 0,05 M, ou seja, em 0,025 M a sensibilidade era ainda mais elevada. Por outro lado, foram obtidas conclusões distintas quando são comparados os planejamentos feitos para o CA e para o CGA, no que se refere ao efeito da elevação do pH na intensidade de fluorescência. Enquanto para o CA a elevação do pH favorece o sinal de fluorescência, para o CGA essa elevação do pH diminui a intensidade desse sinal.

Uma vez que o objetivo final do trabalho proposto relaciona-se à medida de uma mistura de tais compostos, definiu-se o valor intermediário de pH=6 para as

medidas subseqüentes, o qual pode ser corroborado com o fato de que o uso de pH mais elevado poderia prejudicar a estabilidade desses compostos, que são ácidos fenólicos susceptíveis à oxidação. Dessa maneira, as condições ótimas determinadas para o aumento da sensibilidade, observadas através das tendências de comportamento fornecidas pela otimização por planejamentos fatoriais  $2^3$  foram: pH=6, concentração do tampão fosfato de 0,025 M e temperatura intermediária de 25°C.

Como pode ser visto, os resultados apresentados confirmam os estudos preliminares inicialmente realizados, e dessa forma ambos podem ser úteis para a determinação quantitativa dos ácidos cafêico e clorogênico em amostras aquosas, na condição de maior sensibilidade.

### **3. Aumento de Sensibilidade**

Os máximos de excitação e de emissão para os ácidos cafêico e clorogênico, quando todas as variáveis estão em suas condições ótimas obtidas pelos planejamentos fatoriais, foram de 330 e 452 nm para CGA, e de 284 e 424 nm para CA, respectivamente.

Com essa condição ótima de análise, foram obtidas as curvas analíticas para os padrões dos dois compostos em separado de maneira a se determinar a faixa linear, assim como outros parâmetros relacionados à mesma.

#### **3.1 Ácido Cafêico**

Sob essas condições, uma relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração de CA na faixa entre 0,08 e 11,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foi obtida (Figura 12). Cada ponto da curva de calibração corresponde ao valor médio obtido a partir de

três medidas independentes. A equação de regressão da curva analítica é apresentada a seguir:

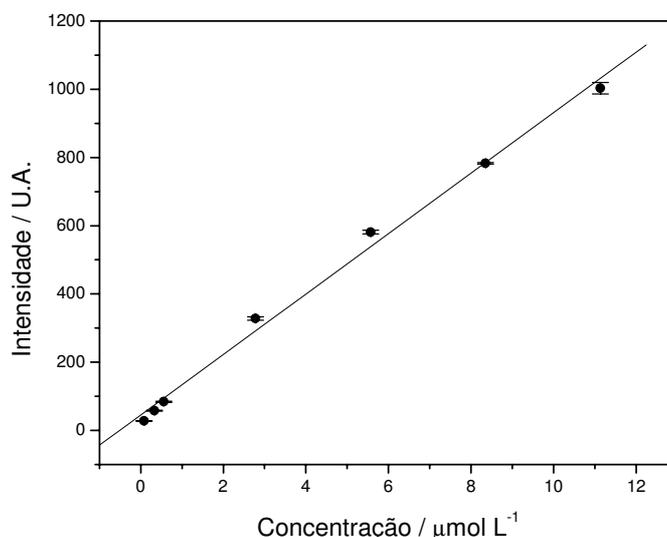
$$F / \text{U.A.} = 44(\pm 17) + 89(\pm 3) \cdot C_{(\text{CA})} / \mu\text{mol L}^{-1}$$

onde,  $F$  é a intensidade de fluorescência a 424 nm, em unidades arbitrárias (U.A.). A equação foi ajustada com um coeficiente de correlação da regressão linear ( $r$ ) de 0,9972 para  $n=7$ . Este método permite que a determinação do ácido caféico seja feita a baixos níveis da espécie de interesse analítico, com limite de detecção (LD) de  $0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$  e de quantificação (LQ) de  $0,07 \mu\text{mol L}^{-1}$ . O limite de detecção foi calculado segundo a definição da IUPAC [59], na qual o limite de detecção, expresso como concentração (ou quantidade de substância), é derivada da menor quantidade mensurável que pode ser detectada com razoável certeza para um dado procedimento analítico. A aplicação de procedimentos estatísticos para uma dada curva analítica fornece a expressão para o cálculo do limite de detecção em função da concentração da espécie de interesse analítico:

$$LD = \frac{k s_b}{m} \quad (\text{Eq. 10})$$

onde  $m$  representa o coeficiente angular da reta obtida à partir de uma curva analítica,  $s_b$  a estimativa do desvio padrão do branco e  $k$  uma constante estatística. O uso de  $k=3$ , sugerido pela IUPAC, permite um nível de confiança de 99,8% para uma medida baseada no erro relativo do sinal do branco, assumindo uma distribuição normal.

Dessa forma, o uso da espectrofluorimetria associada às melhores condições de análise - obtidas através de otimizações por planejamentos fatoriais  $2^3$  - permitiu um aumento de sensibilidade de cerca de cinco vezes quando comparado à determinação do composto nas condições iniciais de análise antes da aplicação dos planejamentos fatoriais, sendo que a maior contribuição para esse ganho relaciona-se à otimização instrumental, como pode ser observado na Tabela 10.



**Figura 12.** Curva analítica para CA em tampão fosfato 0,025 M e pH=6.

**Tabela 10.** Comparação entre os coeficientes angulares ( $b$ ) das curvas analíticas de CA obtidas (1) previamente à otimização instrumental, (2) após a otimização instrumental e (3) após as otimizações instrumentais e das variáveis relacionadas à amostra.

	$b$ (Fluorescência $\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$ )
<b>1<sup>a</sup></b>	15( $\pm$ 1)
<b>2<sup>b</sup></b>	72( $\pm$ 5)
<b>3<sup>c</sup></b>	89( $\pm$ 3)

<sup>a</sup> sem ajuste instrumental ( $\lambda_{\text{EX}}=280$  nm,  $\lambda_{\text{EM}}=424$  nm, largura da fenda de excitação=10 nm, largura da fenda de emissão=10 nm, voltagem da fotomultiplicadora=775 mV, velocidade de varredura=755  $\text{nm min}^{-1}$ ), e sem ajuste em relação ao ambiente da amostra (solução aquosa,  $T=25^{\circ}\text{C}$ , sem remoção de oxigênio).

<sup>b</sup> após ajuste instrumental ( $\lambda_{\text{EX}}=280$  nm,  $\lambda_{\text{EM}}=424$  nm, largura da fenda de excitação=7,5 nm, largura da fenda de emissão=15 nm, voltagem da fotomultiplicadora=850 mV, velocidade de varredura=700  $\text{nm min}^{-1}$ ), e sem ajuste em relação ao ambiente da amostra (solução aquosa,  $T=25^{\circ}\text{C}$ , sem remoção de oxigênio).

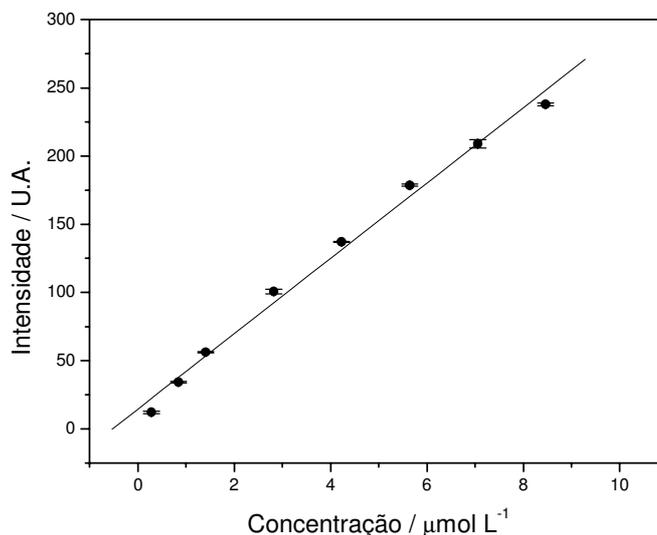
<sup>c</sup> após ajuste em relação ao ambiente da amostra (solução tampão fosfato 0,025  $\text{mol L}^{-1}$ , pH=6,  $T=25^{\circ}\text{C}$ , sem remoção de oxigênio), e também associado ao ajuste instrumental ( $\lambda_{\text{EX}}=284$  nm,  $\lambda_{\text{EM}}=424$  nm, largura da fenda de excitação=7,5 nm, largura da fenda de emissão=15 nm, voltagem da fotomultiplicadora=850 mV, velocidade de varredura=700  $\text{nm min}^{-1}$ ).

### 3.2 Ácido Clorogênico

Para o ácido clorogênico (Figura 13), o método apresentou uma faixa linear entre 0,3 e 8,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , ajustado pela equação:

$$F / \text{U.A.} = 15(\pm 5) + 28(\pm 1) \cdot C_{(\text{CGA})} / \mu\text{mol L}^{-1}$$

onde,  $F$  é a intensidade de fluorescência a 452 nm, com  $r=0,9959$  para  $n=8$ . Os limites de detecção e quantificação encontrados para o CGA foram de, respectivamente,  $0,07$  e  $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ .



**Figura 13.** Curva analítica para CGA em tampão fosfato  $0,025 \text{ M}$  e  $\text{pH}=6$ .

O uso das condições ótimas de análise permitiu, da mesma forma que para o CA, um aumento de sensibilidade de cerca de cinco vezes em relação à determinação do composto em condições prévias à otimização das variáveis relacionadas à sua determinação, com a principal contribuição relacionada à otimização instrumental, conforme pode ser observado na Tabela 11. No entanto, para o CGA a otimização das variáveis da amostra praticamente não contribuiu para esse aumento, o que confirma ao menos o reconhecimento que a técnica espectrofluorimétrica possui com relação à sua alta sensibilidade.

Além disso, pode-se observar que o limite de detecção para o CGA é cerca de três vezes e meio maior que para o CA. Uma vez que ambos os compostos estão diluídos em solventes com as mesmas características, e dessa forma possuem praticamente o mesmo “branco”, esse fato pode ser explicado pela maior

sensibilidade de CA frente ao CGA, aproximadamente na mesma proporção que a diferença entre seus limites de detecção.

**Tabela 11.** Comparação entre os coeficientes angulares (*b*) das curvas analíticas de CGA obtidas para (1) previamente à otimização instrumental, (2) após a otimização instrumental e (3) após as otimizações instrumentais e das variáveis relacionadas à amostra.

	<b><i>b</i> (Fluorescência L <math>\mu</math>mol<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	5,5( $\pm$ 0,2)
<b>2</b>	27,5( $\pm$ 0,9)
<b>3</b>	28( $\pm$ 1)

<sup>a</sup> sem ajuste instrumental ( $\lambda_{EX}$ =328 nm,  $\lambda_{EM}$ =454 nm, largura da fenda de excitação=10 nm, largura da fenda de emissão=10 nm, voltagem da fotomultiplicadora=775 mV, velocidade de varredura=755 nm min<sup>-1</sup>), e sem ajuste em relação ao ambiente da amostra (solução aquosa, T=25°C, sem remoção de oxigênio).

<sup>b</sup> após ajuste instrumental ( $\lambda_{EX}$ =328 nm,  $\lambda_{EM}$ =456 nm, largura da fenda de excitação=7,5 nm, largura da fenda de emissão=15 nm, voltagem da fotomultiplicadora=850 mV, velocidade de varredura=700 nm min<sup>-1</sup>), e sem ajuste em relação ao ambiente da amostra (solução aquosa, T=25°C, sem remoção de oxigênio).

<sup>c</sup> após ajuste em relação ao ambiente da amostra (solução tampão fosfato 0,025 mol L<sup>-1</sup>, pH=6, T=25°C, sem remoção de oxigênio), e também associado ao ajuste instrumental ( $\lambda_{EX}$ =330 nm,  $\lambda_{EM}$ =452 nm, largura da fenda de excitação=7,5 nm, largura da fenda de emissão=15 nm, voltagem da fotomultiplicadora=850 mV, velocidade de varredura=700 nm min<sup>-1</sup>).

#### 4. Determinação de uma Mistura dos Ácidos Cafêico e Clorogênico

Quando se observam os espectros da Figura 3, que mostram a excitação e a emissão de fluorescência para cada um dos ácidos em estudo - CA e CGA - individualmente, pode-se verificar a extensa sobreposição espectral presente entre o ácido cafêico e o clorogênico. Dessa maneira, a aplicação de métodos convencionais univariados pode ser desconsiderada em contraposição à aplicação de métodos de calibração multivariados, que são capazes de detectar a existência de pequenas diferenças espectrais e com isso possibilitar a determinação das espécies constituídas pela mistura de tais compostos.

## 4.1 Calibração Multivariada

O desenvolvimento de um modelo baseado na técnica multivariada PLS (*Partial Least Square*, ou Mínimos Quadrados Parciais) permite utilizar toda a informação espectral disponível melhorando a previsão, já que variações podem ocorrer não somente no pico, mas também com relação à largura de banda, por exemplo. Dessa forma, métodos de calibração multivariada têm sido cada vez mais utilizados em química, principalmente na determinação de misturas cuja informação analítica disponível não apresenta seletividade.

O método PLS é consideravelmente eficiente para lidar com ruídos experimentais, colinearidades e não linearidades nos dados. Todas as variáveis relevantes são incluídas no modelo, o que implica que a calibração pode ser realizada eficientemente mesmo na presença de interferentes (ruídos, por exemplo), não havendo necessidade do conhecimento do número nem da grandeza dos mesmos. Os métodos são robustos pois seus parâmetros praticamente não se alteram com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração. Desta forma, o método PLS tem se tornado uma ferramenta extremamente útil em muitos campos da química [60].

A base fundamental do método PLS é a PCA (*Principal Component Analysis*, ou Análise dos Componentes Principais), que consiste em uma manipulação da matriz de dados visando representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de fatores. Constrói-se um novo sistema de eixos (denominados componentes principais, variáveis latentes ou ainda autovetores) para representar as amostras, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões [60].

Dessa forma, o princípio básico da calibração multivariada relaciona-se à utilização simultânea de muitas variáveis independentes,  $x_1, x_2, \dots, x_n$ , para

quantificar uma ou mais variáveis dependentes de interesse,  $y$ . Análises de regressão por mínimos quadrados parciais representam a maioria dos métodos utilizados para esse fim, sendo baseados na decomposição da variável latente em dois blocos de variáveis, representados pelas matrizes  $X$  e  $Y$  [61], que contém dados espectrais e de concentração, respectivamente. Essas matrizes podem ser simultaneamente decompostas em uma soma de  $f$  variáveis latentes, da seguinte maneira:

$$X = T P + E = \sum t_f p_f + E \quad (\text{Eq. 11})$$

$$Y = U Q + F = \sum u_f q_f + F \quad (\text{Eq. 12})$$

onde  $T$  e  $U$  representam as matrizes dos *scores* para  $X$  e  $Y$ , respectivamente;  $P$  e  $Q$  representam as matrizes de *loadings* para  $X$  e  $Y$ , respectivamente, e  $E$  e  $F$  são as matrizes dos resíduos. As duas matrizes são correlacionadas pelos *scores*  $T$  e  $U$ , para cada variável latente, como se segue:

$$u_f = b_f t_f \quad (\text{Eq. 13})$$

onde  $b_f$  é o coeficiente de regressão para a variável latente  $f$ . A matriz  $Y$  pode ser calculada a partir de  $u_f$ , como pode ser observado pela Eq. 14, e a concentração de novas amostras pode ser estimada a partir dos novos *scores*  $T^*$ , que são substituídos na Eq. 14, resultando na Eq. 15:

$$Y = T B Q + F \quad (\text{Eq. 14})$$

$$Y_{\text{nov}} = T^* B Q \quad (\text{Eq. 15})$$

Neste processo, é necessário encontrar o melhor número de variáveis latentes, que normalmente é obtido utilizando-se a validação cruzada, baseada na determinação do erro de previsão mínimo (PRESS) [61].

A diferença entre PLS-1 e PLS-2 está relacionada ao fato de que na primeira modalidade a regressão é feita para cada variável dependente, individualmente (onde  $Y$  representa uma coluna da matriz), já utilizando PLS-2 todas as variáveis dependentes são usadas simultaneamente [61].

## 4.2 Construção e Validação do Modelo de Calibração para Misturas Sintéticas de CA e CGA

Observando-se os espectros individuais dos ácidos cafêico e clorogênico, através da Figura 3, pode-se verificar a extensão da sobreposição de seus espectros, seja os de excitação ou os de emissão, não sendo possível a boa resolução dessa mistura através do uso de métodos convencionais. No entanto, quando se aplicam métodos de calibração multivariados, pequenas diferenças espectrais existentes nesses espectros podem ser usadas na determinação quantitativa dos constituintes da mistura.

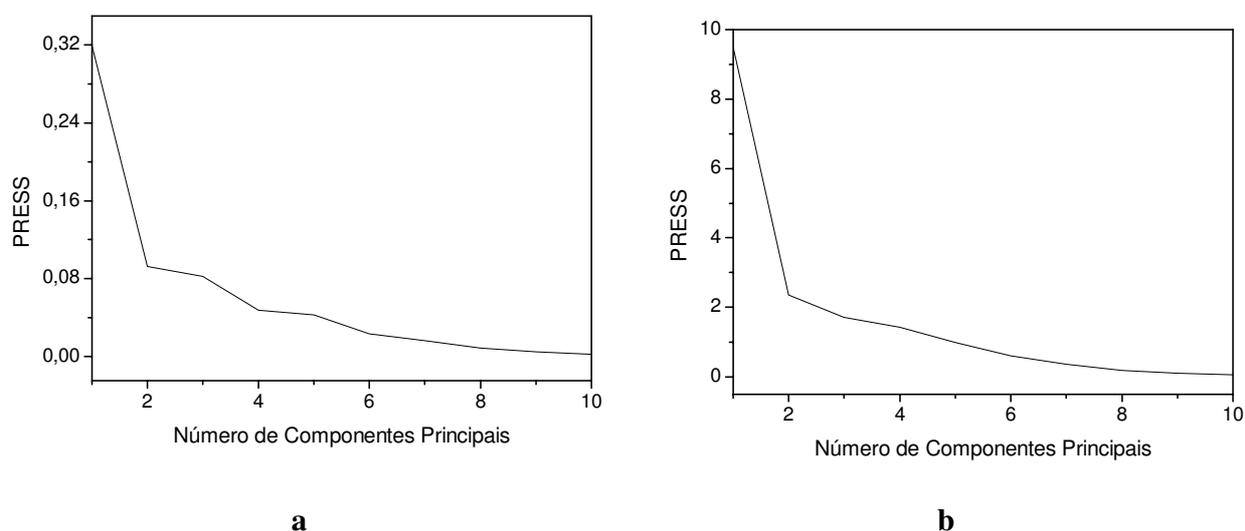
No que se refere à fluorescência, observa-se pela Figura 3 que o ácido cafêico possui uma banda mais intensa ao redor de 420 nm, enquanto que o ácido clorogênico possui uma banda menos intensa com um máximo ao redor de 450 nm. Como o CA é o composto que apresenta a menor proporção entre os constituintes dessa mistura em extratos vegetais, optou-se pela escolha de seu comprimento de onda de excitação (284 nm) para o uso na calibração da mistura. Os espectros foram obtidos na faixa espectral de 325 a 530 nm, sendo que a faixa de 380 a 500 nm foi a que apresentou melhores resultados de calibração/previsão dentre alguns modelos construídos a partir de diferentes faixas espectrais.

O método de calibração utilizado foi o de “mínimos quadrados parciais” (PLS-1), em que se constroem dois modelos de previsão: um para CA e outro para CGA. Os modelos foram construídos baseados no conjunto de treinamento, e as previsões foram realizadas utilizando-se o conjunto de validação (externa). Uma vez que o conjunto de dados foi dividido em dois subconjuntos, 48 amostras foram usadas para a calibração, e outras 12 para a validação do modelo. A faixa de

concentração utilizada foi de 0,08 a 11,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para CA e de 0,3 a 8,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para CGA.

Os dados foram primeiramente centrados na média, e a validação cruzada foi utilizada para se determinar o número ótimo de componentes principais (variáveis latentes). Alguns tipos de transformação foram avaliados, sendo que as opções de primeira e segunda derivada foram preteridas em função da opção “sem transformação derivativa”.

O número ótimo de componentes principais determinados pelo software utilizado foi de 3 para o CA e 5 para o CGA, conforme pode ser observado pela Figura 14. Geralmente os modelos de calibração são construídos no intuito de se fazer previsões. Se forem mantidas quantidades insuficientes de fatores, previsões futuras não serão confiáveis pois informações importantes a respeito do modelo serão perdidas. Por outro lado, se o modelo contiver muitos fatores, informações relevantes podem se perder quando forem feitas previsões, pois variações aleatórias peculiares ao conjunto de treinamento terão sido inseridas no modelo.



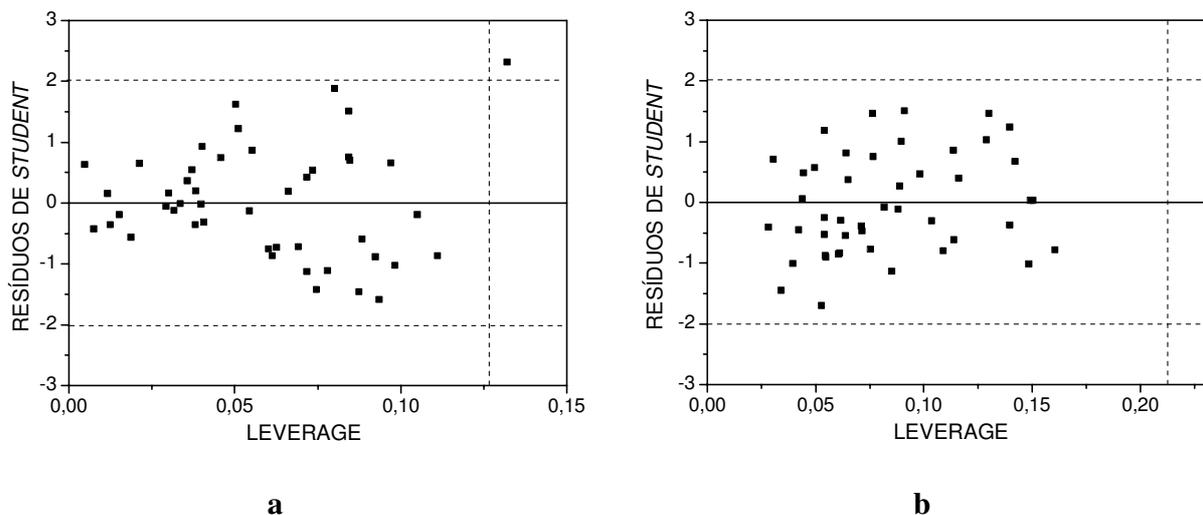
**Figura 14.** Número de componentes principais em função do PRESS para o modelo do (a) CA e (b) CGA, obtidos por PLS-1.

Dessa forma, o número ótimo de componentes principais deve ser selecionado de maneira a se evitar o superajuste do modelo (*overfitting*), ou seja, quando há inclusão de erros no modelo. Aplicando-se o método de validação cruzada descrito por Haaland e Thomas [62], a partir de um dado conjunto  $I$  de espectros usados na calibração, o modelo é construído com  $I-1$  espectros de calibração remanescentes, e a concentração dessa amostra retirada durante a calibração é prevista. Este processo é repetido um total de  $I$  vezes, até que cada uma das amostras tenham sido retiradas, uma por vez, e utilizadas como amostras de previsão. A concentração prevista para cada amostra é então comparada com a concentração conhecida dessa amostra de referência. A soma dos quadrados dos erros de previsão para todas as amostras de calibração, ou  $PRESS = \sum (c_{i, \text{experimental}} - c_{i, \text{previsto}})^2$  é calculada cada vez que um novo fator é adicionado ao modelo. O número ótimo de componentes principais é obtido de forma a se obter o menor valor de PRESS. Ainda, com um número maior de variáveis latentes, obtêm-se correlações mais altas. No entanto, o que se observa pela Figura 14 é que após 3 componentes principais para CA e 5 para CGA, não há um ganho significativo em termos de redução do PRESS, evitando dessa forma o superajuste do modelo.

Essa estimativa do número ótimo de fatores pode ser distorcida pela presença de amostras anômalas, ou *outliers*: se a amostra (anômala) possuir um padrão de variação específico, um fator extra pode ser necessário para ajustá-la. Dessa forma, *outliers* devem ser eliminados do grupo de treinamento antes do número de fatores ser escolhido definitivamente.

A Figura 15 mostra os gráficos de resíduos de *Student* em função da *leverage*, para os modelos construídos para o CA e também para o CGA utilizando-se o conjunto de treinamento. Através de uma análise mais detalhada desses gráficos pode-se avaliar a influência de *outliers* na calibração dos modelos dos referidos ácidos.

A influência de amostras com elevada *leverage* é de particular interesse quando se procura por *outliers*. Se um perfil da amostra difere muito da média dos perfis do conjunto de treinamento, ou seja, quando uma amostra possui uma grande amplitude de afastamento em relação ao restante do conjunto de dados, ela terá uma grande influência no modelo, deslocando o mesmo para um fator mais próximo à sua localização no espaço [63].



**Figura 15.** *Leverage* em função dos resíduos de *Student* para o modelo do (a) CA e (b) CGA, obtidos por PLS-1.

Amostras contendo valores de *leverage* acima de um certo limite devem ser examinadas mais de perto. Entretanto, deve-se ter em mente que tais amostras podem não ser *outliers*: se uma amostra existir a uma grande distância do centro do conjunto de treinamento por possuir uma característica importante da variável dependente, a mesma contribuirá então com informações importantes para o modelo, devendo ser mantida.

Da mesma forma, é comum examinar também os resíduos quando se procura por *outliers*. Entretanto, o resíduo da amostra por si só poderá fornecer a impressão errada devido ao efeito da *leverage*. Se uma amostra possui um valor com alta amplitude em relação à média do conjunto, ela terá uma maior influência no

modelo do que uma amostra com valor próximo à média do grupo. A amostra distante traz o modelo para próximo a ela, diminuindo a diferença entre o valor observado e o ajustado. Em contraste, uma amostra situada próxima à média, tendo pouca ou nenhuma *leverage*, não pode influenciar o modelo, então seu resíduo tende a ser maior. O resíduo “*studentizado*” leva a *leverage* em conta, fornecendo uma visão nítida das diferenças entre os resíduos. Considerando-se que os resíduos de *Student* apresentam uma distribuição normal, um teste *t* pode ser aplicado para determinar se o resíduo “*studentizado*” das amostras é muito grande, ou seja, se não pertencem a essa distribuição normal. O programa Pirouette, utilizado para modelar os dados, faz com que os gráficos da Figura 15 já se apresentem delimitados em regiões que representem níveis de 95% de confiança para resíduos normalmente distribuídos [63].

Pela Figura 15a, pode-se observar que apenas uma amostra apresentou valores de resíduo “*studentizado*” acima de 2, sugerindo a possível existência de uma amostra anômala no modelo de calibração do CA. Assim, fez-se o estudo da retirada de amostras, sendo que a referida amostra não foi incluída no conjunto de treinamento e um novo modelo foi obtido com novas previsões do conjunto de validação externa. Por não ter ocorrido mudança significativa em relação à minimização do valor de PRESS e à previsão para as amostras de validação externa, decidiu-se por mantê-la no conjunto de treinamento.

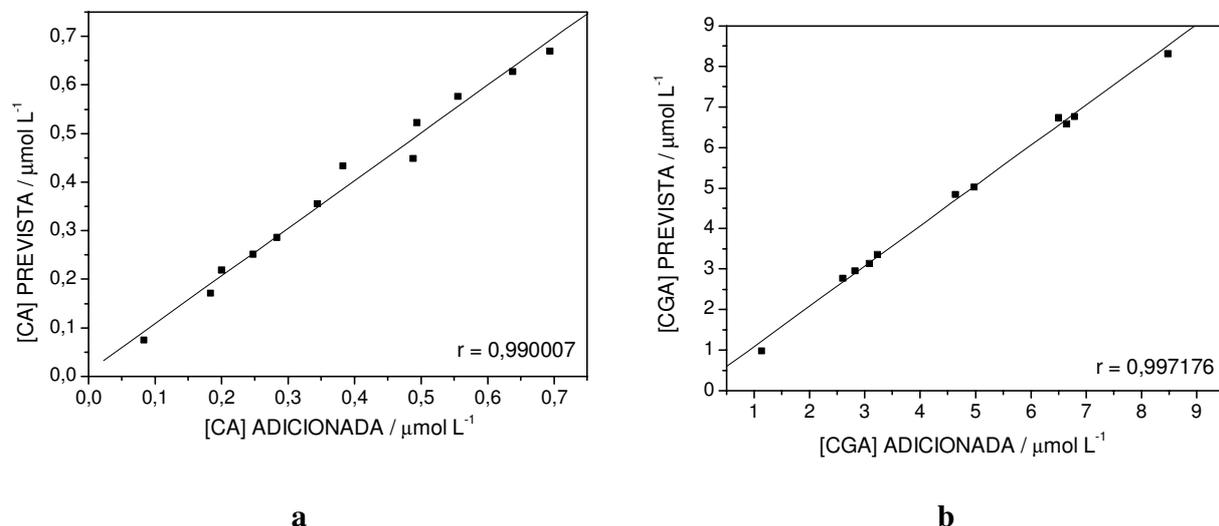
Uma vez construído os modelos de calibração, realizou-se o procedimento de validação dos mesmos através do uso de um conjunto de 12 espectros de fluorescência que não foram incluídos na construção dos modelos anteriormente descritos. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 16, com 3 componentes principais para o CA e 5 para o CGA.

Normalmente, o parâmetro utilizado para se avaliar a capacidade de previsão dos modelos de calibração baseia-se em uma comparação entre os valores previstos

pelo modelo com relação aos valores de referência. Isso é obtido através do erro padrão de previsão (SEP) [61,64]:

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \hat{C}_i)^2}{n}} \quad (\text{Eq. 16})$$

onde  $C_i$  representa a concentração real da espécie de interesse analítico,  $\hat{C}_i$  a concentração prevista pelo modelo construído, e  $n$  o número de amostras usado na construção do modelo (com valores de SEP obtidos nas mesmas unidades das concentrações utilizadas).



**Figura 16.** Resultados obtidos para os conjuntos de validação modelados com PLS-1, para (a) CA e (b) CGA ( $r$  = coeficiente de regressão entre valores reais e previstos obtidos para a etapa de validação, usando o modelo de calibração multivariado).

No entanto, quando mais de uma propriedade está sendo calibrada, pode-se calcular o SEP para cada uma dessas propriedades, ou então apenas um valor de SEP que indicará a capacidade global de previsão do modelo. Isto pode ser representado através do coeficiente de variabilidade (CV), que indica o erro global de previsão e independe da unidade [65]:

$$CV = SD_{res} \frac{100}{\bar{X}} \quad (\text{Eq. 17})$$

onde  $SD_{res}$  representa o desvio padrão dos resíduos, e  $\bar{X}$  a média das concentrações conhecidas da espécie de interesse analítico.

Na Tabela 12, observam-se os valores reais e previstos para CA e CGA, assim como seus erros relativos. Apesar da complexidade causada pela extensa sobreposição espectral, os resultados obtidos para aos conjuntos de validação demonstram bons resultados no que se refere à capacidade de previsão do modelo construído, uma vez que apenas uma amostra prevista para o CA e outra para o CGA apresentaram resíduos maiores que 10%, embora para o CA ainda tenham sido encontradas mais duas amostras com valores de resíduos muito próximos à isso. Além disso, o parâmetro relacionado ao coeficiente de variabilidade, calculado para ambos os compostos em estudo e que indica o erro global de previsão, foi considerado satisfatório, observando-se uma melhor capacidade de previsão para o CGA, confirmada pelo baixo valor do CV obtido (Tabela 12). Salienta-se ainda a excelente correlação obtida entre as concentrações prevista e real (Figura 16), para ambos os compostos.

O maior valor do coeficiente de variabilidade observado para o CA se deve ao uso de uma faixa linear mais estreita na construção do modelo de calibração, de maneira que se mantivessem as proporções utilizadas entre ambos os ácidos nas diferentes composições analisadas.

**Tabela 12.** Determinação simultânea de CA e CGA em 12 amostras referentes ao conjunto de validação externa, utilizando-se o modelo de calibração construído por PLS-1 para o grupo de calibração.

Valor Real ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		Valor Previsto ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		Erro (%)	
CA	CGA	CA	CGA	CA	CGA
0,344	2,602	0,355	2,771	3,3	6,5
0,489	4,638	0,449	4,835	-8,2	4,3
0,694	6,505	0,670	6,726	-3,5	3,4
0,247	2,828	0,251	2,951	1,7	4,4
0,555	6,505	0,576	6,736	3,8	3,6
0,083	1,131	0,075	0,980	-9,9	-13,4
0,494	6,646	0,522	6,579	5,8	-1,0
0,638	8,484	0,627	8,307	-1,7	-2,1
0,199	3,083	0,219	3,134	9,4	1,7
0,183	3,224	0,171	3,354	-6,7	4,0
0,283	4,977	0,286	5,023	1,2	0,9
0,383	6,787	0,434	6,766	13,3	-0,3
CV <sup>a</sup> =6,5		CV <sup>b</sup> =3,0			

CV<sup>a</sup> = coeficiente de variabilidade obtido para as amostras de CA

CV<sup>b</sup> = coeficiente de variabilidade obtido para as amostras de CGA

## 5. Aplicação: Determinação Simultânea de CA e CGA em Extratos Vegetais de *Ilex paraguariensis*

Uma vez construídos, otimizados e validados, os modelos de calibração desenvolvidos para CA e CGA, foram utilizados em determinações simultâneas desses compostos em amostras comerciais de extratos aquosos da planta *Ilex paraguariensis*. Para tanto, os espectros das amostras comerciais foram obtidos utilizando-se os mesmos processos empregados na preparação dos padrões utilizados nas etapas de calibração, sendo que seus espectros foram reunidos em uma matriz de dados submetida à determinação de suas concentrações empregando o modelo construído.

A planta *Ilex paraguariensis* é usada na preparação de um tipo de bebida conhecida popularmente como “mate”, muito apreciada pelos gaúchos na região sul

do Brasil. Uma vez que o objetivo dessa determinação relaciona-se com a quantificação de compostos específicos da planta que estejam presentes na ingestão dessa bebida, a etapa de extração foi feita de maneira a reproduzir a preparação da mesma, tal como ela é normalmente consumida, utilizando simplesmente água em ebulição.

Apesar de seu grande consumo na América do Sul, a maior parte da erva mate utilizada para o preparo dessa bebida ainda é obtida de maneira extrativista. A planta *I. paraguariensis* representa a maior parte das folhas utilizadas na produção do mate, entretanto pequenas porcentagens de plantas de outras espécies endógenas também são usadas. Embora seja dito que a maior parte da erva mate seja produzida a partir das folhas da planta, é comum encontrar, na erva mate brasileira, mais de 30 % de outras partes da planta, que correspondem a pequenos pedaços de caule que não são separados durante o processamento [66]. Ainda, a variabilidade genética, as condições ambientais e até mesmo diferentes espécies de mate que possam também ser incorporadas à erva mate podem afetar o conteúdo de CA e de CGA analisados. Isto porque os ácidos fenólicos não são distribuídos homogeneamente através do tecido das plantas, e também podem variar em quantidade dependendo do estágio de maturação da mesma. Condições de crescimento, tais como temperatura, também são conhecidos por afetar o conteúdo dos ácidos fenólicos [7].

**Tabela 13.** Resultados obtidos por de determinação simultânea, referentes à recuperação de CA e CGA a partir de uma amostra comercial de *I. paraguariensis*, utilizando calibração multivariada.

	<b>Conteúdo na Amostra<sup>a</sup></b>	<b>Adicionado<sup>a</sup></b>	<b>Encontrado<sup>a</sup></b>	<b>Recuperação / %</b>
CA	0,40±0,03	0,122	0,50±0,01	94±5
CGA	6,0±0,3	1,833	8,2±0,2	104±3

<sup>a</sup> Quantidades expressas em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

De acordo com o procedimento previamente descrito no item 3.6, o conteúdo de CA e de CGA em amostras comerciais de erva mate pode ser determinado quantitativamente, de maneira simultânea, aplicando-se os modelos propostos. As medidas feitas diretamente nas amostras aquosas da erva forneceram a quantidade prevista de  $9,8 \pm 0,7 \text{ mg g}^{-1}$  (CA) e  $284 \pm 13 \text{ mg g}^{-1}$  (CGA) da erva seca (média e desvio padrão de três determinações). Para a validação do procedimento, o método de adição de padrão foi aplicado, através da adição de quantidades conhecidas de ambos os analitos, sendo que boas recuperações foram obtidas, ressaltando-se a melhor precisão do modelo para CGA em relação ao do CA. Os resultados estão mostrados na Tabela 13. Observa-se dessa forma que a matriz não interfere significativamente na determinação de CA e de CGA utilizando o método proposto.

## **V. CONCLUSÕES**

## V. Conclusões

A espectroscopia de fluorescência molecular é uma técnica analítica bem estabelecida, reconhecida por sua sensibilidade tal como uma análise do tipo “impressão digital”, sendo apropriada devido à rapidez na coleta de dados e pré-tratamento mínimo da amostra. Os compostos fenólicos - incluindo-se entre eles os ácidos cafêico e clorogênico - atualmente têm recebido grande atenção devido à importância relacionada à saúde humana na prevenção de doenças, uma vez que tais compostos atuam como fatores em potencial na proteção contra danos oxidativos ao organismo.

A grande vantagem deste tipo de método proposto para a determinação de CA e de CGA por fluorescência, ainda em separado, é o ganho significativo em sensibilidade, obtido pela otimização por planejamentos fatoriais, em relação às condições iniciais de análise dos compostos, aproveitando-se da fluorescência intrínseca que o ácido cafêico e o ácido clorogênico apresentam. Ainda, os resultados obtidos permitiram a análise simultânea de soluções contendo CA e CGA por fluorescência, auxiliada pelo uso de calibrações multivariadas. A característica mais importante deste método relaciona-se ao fato de que não há necessidade de serem utilizados outros reagentes cromóforos e solventes além da água, pois os dois ácidos são compostos altamente fluorescentes, estando de acordo com os princípios pelos quais a mesma pode ser inserida na nova tendência da química analítica, a química verde. Salienta-se o fato de que nenhuma metodologia relacionada à determinação desses compostos utilizando técnicas espectrofluorimétricas foi encontrada na literatura.

# **VI. PERSPECTIVAS FUTURAS**

## VI. Perspectivas Futuras

No decorrer deste trabalho, pode-se verificar que o uso de métodos de calibração multivariados, na modalidade PLS-1, associados a medidas de fluorescência demonstraram-se eficazes na análise direta em extratos vegetais, possibilitando a quantificação dos ácidos cafêico e clorogênico em extratos da planta *Ilex paraguariensis*. Uma vez que essa quantificação permitiu inferir o consumo de tais compostos através da ingestão da erva mate, um estudo complementar ao desenvolvido neste trabalho estaria relacionado à determinação da atividade antioxidante de tais compostos no referido extrato, uma vez que os polifenóis são reconhecidos por apresentar altas atividades antioxidantes. Essas atividades tem sido avaliadas através de diversas medidas relacionadas à capacidade de capturar radicais livres utilizando-se radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila), a propriedades eletroquímicas tais como o potencial de oxidação, dentre outras.

Outros estudos interessantes, envolvendo a aplicação da espectrofluorimetria associada à calibração multivariada, relacionam-se à quantificação de diversos outros compostos fenólicos que também estejam relacionados à promoção da saúde humana, aplicados à extratos vegetais de fácil acesso ao consumo. Isto porque esses compostos são encontrados em amostras comerciais geralmente associados a outros compostos da mesma categoria.

## **VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## VII. Referências Bibliográficas

- [1] Clifford, M. N. J., *Sci. Food Agric.* 1999, 79, 362.
- [2] Friedman, M. and Jürgens, H. S. J., *Agric. Food Chem.* 2000, 48, 2101.
- [3] Maiani, G., Serafini, M., Salucci, M., Azzini, E. and Ferro-Luzzi, A. J., *Chromat: B* 1997, 692, 311.
- [4] Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J-P, Pihlaja, K., Kujala, T. S. and Heinonen, M. J., *Agric. Food Chem.* 1999, 47, 3954.
- [5] Bennett, M., Gallagher, M., Fagg, J., Bestwick, C., Paul, T., Beale, M. and Mansfield, J., *The Plant J.* 1996, 9, 851.
- [6] Tapiero, H., Tew, K. D., Ba, G. Nguyen, Mathé, G., *Biomed Pharmacother* 2002, 56, 200.
- [7] Robbins, R. J., *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2866.
- [8] Filho, D. W., da Silva, E. L., Boveris, A., Flavonóides Antioxidantes de Plantas Mediciniais e Alimentos: Importância e Perspectivas Terapêuticas, em: *Plantas Mediciniais Sob a Ótica da Moderna Química Medicinal* (Yunes, R. A. e Calixto, J. B, Orgs.), Argos, Chapecó, 2001, 320.
- [9] Olthof, M. R., Hollman, P. C. H. and Katan, M. B., *J. Nutr.* 2001, 131, 66.
- [10] Udenfriend, S., in: *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, vol. 1, Academic Press, New York, 1962, 1 e 383.
- [11] Lang, M., Stober, F. and Lichtenthaler, H. K., *Radiat. Environ. Biophys.* 1991, 30, 333.
- [12] Gao, T., Ci, Y., Jian, H. and An, C., *Vibrat. Spectrosc.* 2000, 24, 225.
- [13] Pazdzioch-Czochra, M. and Widenska, A., *Anal. Chim. Acta* 2002, 452, 177.
- [14] Laranjinha, J. A. N., Almeida, L. M. and Madeira, V. M. C., *Biochem. Pharmacol.* 1994, 48, 487.
- [15] Azuma, K., Ippoushi, K., Nakayama, M., Ito, H., Higashio, H. and Terao, J., *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 5496.
- [16] Oguri, A., Suda, M., Totsuka, Y., Sugimura, T. and Wakabayashi, K., *Mutat. Res.* 1998, 402, 237.
- [17] Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S. and Tonogai, Y., *J. Chromat.: A* 2000, 891, 183.
- [18] Zgórká, G. and Kawka, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 24, 1065.
- [19] Tsai, T. H., Chen, Y. F., Shum, A. Y. C. and Chen, C. F., *J. Chromat. A*, 2000, 870, 443.
- [20] Cremin, P., Karakas-Kasim, S. and Waterhouse, A. L., *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1747.
- [21] Zhao, Y. K., Cao, Q. E., Liu, H. T., Wang, K. T., Yan, A. X. and Hu, Z. D., *Chromatographia* 2000, 51 (7/8), 483.

- [22] Areias, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Ferreres, F. and Seabra, R., *J. Agric. Food. Chem.* 2000, 48, 6081.
- [23] Hu, C., Zhang, Y. and Kitts, D. D., *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 3170.
- [24] Filip, R., López, P., Gilberti, G., Coussio, J. and Ferraro, G., *Fitoterapia* 2001, 72, 774.
- [25] Chung, I. M., Seigler, D., Miller, D. A. and Kyung, S. H., *J. Chem. Ecol.* 2000, 26, 315.
- [26] Caniova, A. and Brandsteterova, E., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Techno.* 2001, 24, 2647.
- [27] Zidorn, C. and Stuppner, H., *Biochem. Sys. Eco.* 2001, 29, 827.
- [28] Lee, B-L and Ong, C-N, *J. Chromat.: A* 2000, 881, 439.
- [29] Janicsák, G. and Máthé, I., *Chromatographia* 1997, 46, 322.
- [30] Sheu, S-J, Chieh, C-L and Weng, W-C, *J. Chromat.: A* 2001, 911, 285.
- [31] Pomponio, R., Gotti, R., Hudaib, M. and Cavrini, V., *J. Chromat. A*, 2002, 945, 239.
- [32] Arce, L., Ríos, A. and Valcárcel, M., *J. Chromat.: A* 1998, 827, 113.
- [33] Mulinacci, M., Innocenti, M., Gallori, M., Romani, A., la Marca, G. and Vincieri F. F., *Chromatographia*, 2001, 54, 455.
- [34] Nakatani, N., Kayano, S., Kikuzaki, H., Sumino, K., Katagiri, K. and Mitani, T., *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 5512.
- [35] Exarchou, V., Troganis, A., Gerothanassis, I. P., Tsimidou, M. and Boskou, D., *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2.
- [36] Tundo, P., Anastas, P., Black, D. S., Breed, J., Collins, T., Memoli, S., Miyamoto, J., Polyakoff, M. and Tumas, W., *Pure Appl. Chem.* 2000, 72, 1207.
- [37] Sanseverino, A. M., *Quim. Nova* 2000, 23, 102.
- [38] Sanseverino, A. M., *Ciência Hoje* 2002, 31, 20.
- [39] Lenardão, E. J., Freitag, R. A., Dabdoub, M. J., Batista, A. C. F. e Silveira, C. C., *Quim. Nova* 2003, 26, 123.
- [40] Coates, J., *Applied Spectroscopy Reviews* (J. Coates, Ed.), 2001, 36 (4), 299.
- [41] Frenich, A. G., Zamora, D. P., Vidal, J. L. M. and Galera, M. M., *Anal. Chim. Acta* 2001, 449, 143.
- [42] Guilbault, G. G., *General Aspects of Luminescence Spectroscopy*, in: *Practical Fluorescence* (G. G. Guilbault, Ed.), Marcel Dekker, New York, 2<sup>nd</sup> ed., 1990, 1.
- [43] Bassani, F., *Luminescence: General Concepts and Applications to the Study of Solids*, em: *Fluorescent Biomolecules: Methodologies and Applications* (D. M. Jameson e G. D. Reinhart, Eds.), Plenum Press, New York, 1989, 2.
- [44] Lakowicz, J. R., in: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1983, 1.

- [45] Johnson, I. D., Introduction to Fluorescence Techniques, em: *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (R. P. Haugland, Ed.), Molecular Probes, 1996, 1.
- [46] Zoliner, H., Giebelmann, R., Deut. L-R 2004, 100 (7), 255.
- [47] <http://www.chaesimpatia.com.br>, em 25/01/2006.
- [48] Filip, R., Lopez, P., Coussio, J. and Ferraro, G., *Phytotherapy Res.* 1998, 12, 129.
- [49] Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H. J., *Nat. Prod.* 1983, 46, 841.
- [50] Adzet, T., Camarasa, J. and Laguna, J. C. J., *Nat. Prod.* 1987, 50, 612.
- [51] Perrin, D. D. and Dempsey, B. *Buffers for pH and Metal Ion Control*, Chapman and Hall Ltd., London, 1974, 139.
- [52] Assumpção, R. M. V. e Morita, T. em: *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes*, Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1968, 275.
- [53] Sánchez-Cortés, S. and Garcia-Ramos, J. V. J., *Colloid and Interface Sci.* 2000, 231, 98.
- [54] André, J. C., Baudot, Ph., Bouchy, M. and Niclause, M., *Anal. Chim. Acta* 1977, 92, 369.
- [55] Stevenson, C. L. and Vo-Dinh, T., *Appl. Spectrosc.* 1993, 47, 430.
- [56] Neto, B. B., Scarminio, I. S. e Bruns, R. E. em: *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*, Editora da Unicamp, Campinas, SP, 2001, 64 e 83.
- [57] Grenier, J. L., Cotelle, N., Catteau, J. P. and Cotelle, P., *J. Phys. Org. Chem.* 2000, 13, 511.
- [58] *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, 12<sup>th</sup> ed., Merck & Co., Whitehouse Station, 1996.
- [59] Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7<sup>th</sup> ed., Saunders, Philadelphia, 1996, 460.
- [60] Ferreira, M. M. C., Antunes, A. M., Melgo, M. S., Volpe, P. L. O., *Quím. Nova* 1999, 22, 35.
- [61] Martens, H., Naes, T., *Multivariate Calibration*, Wiley, New York, 1989.
- [62] Haaland, D. M. e Thomas, E. V., *Anal. Chem.* 1988, 60, 1193.
- [63] *Regression Methods: Factor Based Regression*, em: *Pirouette User Guide* (Infometrix, Inc.), version 3.11, 2003, 7.
- [64] Beebe, K. R., Pell, R. J., Seasholts, M. B. *Chemometrics: A Practical Guide*, Wiley, New York, 1998.
- [65] Williams P. C., Variables Affecting Near-Infrared Reflectance Spectroscopy Analysis em: *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries* (William, P. e Norris, K., Eds.), American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, 1990, 7<sup>th</sup> ed., 147.
- [66] Mazzafera, P., *Food Chem.* 1997, 60 (1), 67.