

**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO E pH NO COMPOR-  
TAMENTO CINÉTICO DE ANTOCIANINAS DE PLANTAS DO  
GÊNERO *HIBISCUS* POR MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS.**

**Tese de Doutorado**

**Autor: Paulo Henrique Março**

**Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi**

**CAMPINAS – SP, MARÇO DE 2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP

M347e Março, Paulo Henrique.  
Estudo da influência da radiação e pH no comportamento cinético de antocianinas de plantas do gênero *hibiscus* por métodos quimiométricos / Paulo Henrique Março. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.

Orientador: Ronei Jesus Poppi.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Antocianinas. 2. Quimiometria. 3. MCR-ALS.  
4. Cinética I. Poppi, Ronei Jesus. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** Study on the influence of radiation and pH at the kinetic behavior of anthocyanins from plants of *hibiscus* gender by chemometrics methods

**Palavras-chaves em inglês:** Anthocyanins, Chemometrics, MCR-ALS, Kinetic

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Ronei Jesus Poppi (orientador), Ieda Spacino Scarmínio (DQ-UEL), Marcos Flôres Ferrão (UNISC-RS), Jarbas José Rodrigues Rohwedder (IQ-UNICAMP), Adriana Vitorino Rossi (IQ-UNICAMP)

**Data de defesa:** 13/03/2009

*Dedico este trabalho aos meus amados pais, Rubens Março e Josefa Alzira de Sousa Março, pela dedicação incansável, suporte, amor, carinho e tudo que me foi necessário para que eu pudesse realizar este sonho. Dedico também aos meus irmãos José Ricardo Março e Julio Cesar Março por todo apoio incondicional, carinho e incentivo. Também à minha querida namorada Patrícia Valderrama por todo amor, ensinamentos e companheirismo.*

*Muito Obrigado à vocês!*

*Papai, Mamãe e Irmãos, saibam que vocês sempre estiveram aqui, durante todo o tempo. A chance e sonho de melhorar de vida nos separou, mas a presença de vocês foi sempre uma constante, e é por vocês, foi em vocês que busquei e encontrei forças para que, mesmo nos momentos mais difíceis, aqueles que me pareciam impossíveis, levantar a cabeça e seguir sempre tentando, com o máximo que eu consegui, para dar mais este passo na minha vida. É por vocês.  
Hoje e sempre.*

## AGRADECIMENTOS

- Agradecimento especial à FAPESP pelo apoio financeiro, possibilitando meu crescimento intelectual e profissional.
- Em especial ao Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi pela oportunidade para realizar este trabalho, pelos ensinamentos, paciência, confiança e amizade.
- Aos meus pais, Rubens Março e Josefa Alzira de Sousa Março, por todos os conselhos, todo o suporte, amor, carinho incentivo e dedicação.
- Aos meus irmãos José Ricardo Março e Julio Cesar Março, por todo carinho, apoio e incentivo.
- À minha namorada Patrícia Valderrama, pelo carinho, apoio, incentivo, dedicação, compreensão, companheirismo e ensinamentos, participando efetivamente deste trabalho.
- À Prof. Dra Ieda Spacino Scarminio e ao Prof. Dr. Roy Edward Bruns por todo apoio e carinho, e pelas idéias que deram origem ao trabalho.
- À UNICAMP e ao Instituto de Química e todo o corpo docente e funcionários pelo apoio incondicional e pela oportunidade oferecida para a realização deste curso e deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Romà Tauler pelos ensinamentos e valiosas sugestões na realização deste trabalho.
- Aos companheiros do grupo LAQQA: Patrícia Valderrama, Marcelo G. Trevisan, Jez Willian B. Braga, Alessandra Borin, Gilmare A. da Silva, Waldomiro B. Neto, Luiz C. M. Pataca, Luciana Viviane, Renato L. Carneiro, Thiago P. Araújo, Wericson F. C. Fortunato, Diorgenes B. M. Ribeiro, Danilo A. Maretto, Joana G. Aguiar, Ingrid K. de Oliveira. Obri-

gado pela colaboração no trabalho, amizade, companheirismo e ensinamentos.

- A toda a minha família, Março e Sousa Nascimento, pelo incentivo e carinho, doando força e fazendo-se sempre presente, mesmo na distância.
- Ao Banco Santander pela Bolsa de Mobilidade Internacional, permitindo o aprimoramento de meus conhecimentos junto ao “Consejo Superior de Investigaciones Científicas”, do qual agradeço imensamente por tudo o que me foi oferecido.
- Aos meus amigos do pensionato, dona Cláudia, Senhor Carlos, Nicóla, Gustavo, Thomas e Andréa. Obrigado pela família que vocês se tornaram para mim.
- Aos meus amigos de longa data, Carlos H. Mazetti, Rodrigo B. Tabata, João Paulo Rodrigues, Douglas S. Rodrigues, Leandro Scaliante, Daniel Cardelíqueo pelo eterno incentivo e apoio
- Aos meus amigos Fausto N. Silva, Cleber Gonçalves, Josy Osajima, Rafael Urso, Nelson Leão, André Menoncin, Thomas Eilkaer, Ezequiel, Okano, Kátia, Zeine, Bruno Lomba, Kaio, Taciano Camilo Silva, Jackson Yoshiura, Carlos Solsona, Marisol Salcedo Guille Mantequera, Guilherme Carniel, Juan Pablo Seguel, Eduardo Fontes, Julio Quezada Marcelo Souza, Luciano Vidal, Mario Killner, Aloísio Virgulino, Jorge, Fábio Uechi, Tatiane, Felipe Biancardi, Peterson Foca, Thiago Coser, Stefan Platikanov, Silvia Mas, Marta Cerrado y Marta Obiol. Muito obrigado a todos vocês.
- À técnica Cláudia Martelli pela confiança e ajuda para a realização dos experimentos.

- A todos aqueles que, mesmo não citados nominalmente, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e para esta etapa da minha vida, com exemplos e ações.

## RESUMO

A influência da radiação UV e pH no equilíbrio de espécies de antocianinas de plantas do gênero *Hibiscus* foi estudada por métodos quimiométricos. Antocianinas provenientes de extratos de 3 diferentes flores da família *Malvaceae* (*Hibiscus Sabdariffa*, *Hibiscus Acetosella* e *Malvaviscus Penduliflorus*) foram utilizadas no estudo. Análises espectrofotométricas nas regiões UV-Vis foram realizadas, comparando-se os espectros e a cinética resultante de análises realizadas com e sem exposição à radiação UV em soluções tampão com valores de pH variando de 1,5 até 12,7 e Análise por Injeção em Fluxo (FIA) para o cálculo das constantes de equilíbrio dos compostos encontrados. Para isso, foram utilizados métodos quimiométricos de Análise de Componentes Principais (PCA), PCA multi-modo (MPCA), Pure, Decomposição de Valores Singulares (SVD) e Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternados (MCR-ALS). Com o objetivo de encontrar com maior confiabilidade o número de espécies presentes assim como caracterizá-las, o método MCR-ALS foi aplicado utilizando-se matrizes individuais e também com matrizes aumentadas. A partir dos resultados obtidos pela aplicação dos métodos quimiométricos foi sugerido um sistema de equilíbrio entre as diferentes formas químicas encontradas nos diferentes valores de pH, e a partir dos resultados obtidos por FIA, foram calculadas as constantes de equilíbrio para algumas das espécies encontradas.

## ABSTRACT

The influence of UV radiation and pH at the anthocyanin species equilibria, extracted from plants of *Hibiscus* genus was studied with chemometric methods. Anthocyanins from different extracts of 3 different flowers of Malvaceae family (*Hibiscus Sabdariffa*, *Hibiscus Acetosella* and *Malvaviscus Penduliflorus*) were used at this investigation. Spectrophotometric analysis at UV-Visible range were performed, comparing spectra and kinetic behavior from analysis with and without UV radiation exposure by using buffer solutions with pH varying from 1.5 to 12.7 and Flow Injection Analysis (FIA) to calculate the equilibria constants to the compounds found in the samples. Chemometric methods as Principal Components Analysis (PCA), Multi-Way PCA, Pure, Singular Value Decomposition (SVD), Multivariate Curve Resolution with Alternating Least Squares (MCR-ALS) were applied. Aiming to find out the number of species, as well as, to characterize them, the MCR-ALS method was applied by using individual and augmented matrix strategy. From the results of the chemometric methods application it was proposed an equilibria system to the species found at different pH values and from FIA results, the equilibria constants were calculated to some of the species.

# Sumário

Índice de Figuras.....	xix
Índice de Tabelas .....	xxvii
1. Prefácio.....	1
2. Objetivos.....	7
3. Antocianinas .....	11
4. Métodos Quimiométricos .....	35
4.1 – Análise de Componentes Principais – PCA.....	39
4.2 – Decomposição em Valores Singulares – SVD .....	41
4.3 – Análise de Componentes Principais Multi-modo – MPCA .....	42
4.4 – PURE .....	44
4.5 – Resolução Multivariada de Curvas (MCR) .....	46
4.5.1 –Análise Exploratória em MCR .....	51
4.5.2 – Aproximações Não-Iterativas .....	54
4.5.3 – Aproximações Iterativas .....	56
4.5.4 – Matrizes aumentadas .....	61
4.5.5 – Ambiguidades no MCR .....	62
4.5.6 – Aplicações.....	65
5. Efeito da Radiação Ultravioleta.....	69
5.1 – Plantas .....	71
5.1.1- Características das Plantas .....	71
5.1.1.1- <i>Hibiscus Acetosella</i> .....	71
5.1.1.2- <i>Hibiscus Sabdariffa</i> .....	72
5.1.1.3- <i>Malvaviscus penduliflorus DC</i> .....	73
5.1.2 – Coleta.....	74
5.2 – Extração .....	74
5.3 - Limpeza das amostras .....	74
5.4 – Reagentes .....	75
5.5 – Preparo das Soluções Tampão .....	75
5.6 - Equipamentos.....	76
5.7 – Medidas Espectrais na região UV-Vis .....	77
5.7.1 – Aparato para radiação ultravioleta .....	77
5.8 – Programa Computacional.....	79

5.9 – Resultados e Discussão.....	80
5.9.1 – Análises de Matrizes individuais.....	81
5.9.1.1 – Influência de radiação UV em amostras de <i>Hibiscus Acetosella</i> .....	82
5.9.1.2 – Influência de radiação UV em amostras de <i>Hibiscus Sabdariffa</i> .....	105
5.9.1.3 – Influência de radiação UV em amostras de <i>Malvaviscus Penduliflorus</i> .....	125
5.9.2 – Análises de Matrizes Aumentadas.....	144
5.9.2.1 – Análises de Matrizes Aumentadas para <i>Hibiscus acetosella</i> .....	145
5.9.2.2 – Análises de Matrizes Aumentadas para <i>Hibiscus sabdariffa</i> .....	153
5.9.2.3 – Análises de Matrizes Aumentadas para <i>Malvaviscus penduliflorus</i> .....	160
6. Cálculo de Constantes Aparentes de equilíbrio por MCR-ALS em Dados de Análise por Injeção em Fluxo .....	169
6.1 – Procedimento experimental.....	171
6.1.2 - Calibração do sistema FIA .....	174
6.2 – Resultados e discussão: .....	176
7. Conclusões.....	189
8. Bibliografia.....	193

# Índice de Figuras

<i>Figura 1</i> - Estrutura química dos principais tipos de flavonóides. ....	13
<i>Figura 2</i> - (A) Estrutura do cátion flavílico e (B) estrutura da antocianidina cianidina....	14
<i>Figura 3</i> - Estrutura da antocianina cianidina 3-glucosídeo. ....	15
<i>Figura 4</i> - Possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH. ....	17
<i>Figura 5</i> – Decomposição em componentes principais por PCA. ....	40
<i>Figura 6</i> – Arranjo de dados tridimensional e sua decomposição por MPCA. ....	43
<i>Figura 7</i> – Modelo de medidas para um sistema de dois componentes: .....	49
(a) Descrito como um modelo de somatória de contribuições de sinais puros;.....	49
(b) Descrito como um modelo de somatória de díades de perfil puro de concentração e espectro; .....	49
(c) Descrito como um modelo bilinear de perfis de concentração e espectros. ....	49
<i>Figura 8</i> – Restrições comumente utilizadas em aproximações iterativas. ....	57
<i>Figura 9</i> – Modelo bilinear de MCR aumentado (a) pelas linhas, (b) pelas colunas e (c) pelas linhas e pelas colunas ao mesmo tempo. ....	59
<i>Figura 10</i> – Fotos de plantas da espécie <i>Hibiscus acetosella</i> . ....	71
<i>Figura 11</i> – Fotos de plantas da espécie <i>Hibiscus sabdariffa</i> . ....	72
<i>Figura 12</i> – Fotos de plantas da espécie <i>Malvaviscus penduliflorus</i> . ....	73
<i>Figura 13</i> – Espectro da lâmpada utilizada como fonte de radiação UV. ....	78
<i>Figura 14</i> – Esquema montado para incidir radiação UV sobre a amostra durante o monitoramento .....	78
<i>Figura 15</i> - Principais estruturas das antocianinas em meio aquoso: cátion flavílico (AH <sup>+</sup> ), anidrobases quinoidais (A), quinoidal ionizada (A <sup>-</sup> ), pseudobase carbinol (B), cis-chalcona (C <sub>C</sub> ), cis-chalcona ionizada (C <sub>C</sub> <sup>-</sup> ), trans-chalcona (C <sub>t</sub> ), trans-chalcona ionizada (C <sub>t</sub> <sup>-</sup> ). R1 e R2 são usualmente H, OH ou OCH <sub>3</sub> . ....	80
<i>Figura 16</i> – MPCA para as amostras de <i>Hibiscus acetosella</i> em diferentes valores de pH não expostas à radiação UV.....	84
<i>Figura 17</i> – MPCA para as amostras de <i>Hibiscus acetosella</i> em diferentes valores de pH expostas à radiação UV.....	85
<i>Figura 18</i> – MPCA para as amostras de <i>Hibiscus acetosella</i> em diferentes valores de pH sem exposição (sX) e com exposição à radiação UV (dX).....	86
<i>Figura 19</i> – a - Espectro presente na amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> não exposta à radiação UV (condição S) em pH 2,50. b Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de <i>Hibiscus acetosella</i> com exposição à radiação UV (condição D) em pH 2,42. ....	89
<i>Figura 20</i> – a- Espectro representante da espécie presente na amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> sob condição S em pH 3,98. b - Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de <i>Hibiscus acetosella</i> sob condição D em pH 4,08.....	90
<i>Figura 21</i> – a- Espectro representante da espécie presente na amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> sob condição S em pH 5,12. b - Espectros e perfil Cinético recuperados pela	

aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de <i>Hibiscus acetosella</i> sob condição D em pH 5,12.....	91
<i>Figura 22</i> – Possíveis transformações ocorridas em pH 5,12 para antocianinas de <i>Hibiscus Acetosella</i> : sugestão baseada em informações da literatura e observação dos espectros recuperados pela aplicação de MCR-ALS.....	92
<i>Figura 23</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus acetosella</i> referentes ao pH 6,12 nas condições - <i>a</i> - <i>S</i> e <i>b</i> - <i>D</i> .....	93
<i>Figura 24</i> – Possíveis transformações ocorridas em pH 6,12 para antocianinas de <i>Hibiscus Acetosella</i> : sugestão baseada em informações da literatura e observação dos espectros recuperados pela aplicação de MCR-ALS.....	94
<i>Figura 25</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus acetosella</i> referentes <i>a</i> - ao pH 7,22 na condição <i>S</i> e <i>b</i> - pH 7,12 na condição <i>D</i> .....	95
<i>Figura 26</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus acetosella</i> referentes <i>a</i> - ao pH 8,12 na condição <i>S</i> e <i>b</i> - pH 8,16 na condição <i>D</i> .....	96
<i>Figura 27</i> – Possíveis transformações ocorridas em pH 8,1 para antocianinas de <i>Hibiscus Acetosella</i> : sugestão baseada em informações da literatura e observação dos espectros recuperados pela aplicação de MCR-ALS.....	96
<i>Figura 28</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus acetosella</i> referentes <i>a</i> - ao pH 8,67 na condição <i>S</i> e <i>b</i> - pH 8,47 na condição <i>D</i> .....	97
<i>Figura 29</i> – <i>a</i> -Espectro representante da espécie presente na amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> sob condição <i>S</i> em pH 9,32. <i>b</i> Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de <i>Hibiscus acetosella</i> sob condição <i>D</i> em pH 9,32.....	98
<i>Figura 30</i> – <i>a</i> - Espectro representante da espécie presente na amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> sob condição <i>S</i> em pH 9,88. <i>b</i> Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de <i>Hibiscus acetosella</i> sob condição <i>D</i> em pH 9,75.....	99
<i>Figura 31</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus acetosella</i> referentes <i>a</i> - ao pH 10,80 na condição <i>S</i> e <i>b</i> - pH 10,93 na condição <i>D</i> .....	101
<i>Figura 32</i> – Possíveis transformações ocorridas a partir de pH 10 para antocianinas de <i>Hibiscus Acetosella</i> : sugestão baseada em informações dos espectros recuperados pela aplicação de MCR-ALS.....	101
<i>Figura 33</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus acetosella</i> referentes <i>a</i> - ao pH 11,83 na condição <i>S</i> e <i>b</i> - pH 11,70 na condição <i>D</i> .....	102
<i>Figura 34</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus acetosella</i> referentes ao meio com pH acima de 12 nas condições - <i>a</i> - <i>S</i> e <i>b</i> - <i>D</i> .....	103
<i>Figura 35</i> – Possíveis transformações ocorridas em pH acima de 12 para antocianinas de <i>Hibiscus Acetosella</i> : sugestão baseada em informações dos espectros recuperados pela aplicação de MCR-ALS.....	104

<i>Figura 36</i> – MPCA para a amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> não exposta à radiação UV.	106
<i>Figura 37</i> – MPCA para a amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> exposta à radiação.	107
<i>Figura 38</i> – MPCA para as amostras de <i>Hibiscus sabdariffa</i> na condição S (x) e D (x).	109
<i>Figura 39</i> – a- Espectro presente na amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> sob condição S em pH 2,50. b Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de <i>Hibiscus sabdariffa</i> sob condição D em pH 2,42.	110
<i>Figura 40</i> – a- Espectro presente na amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> sob condição S em pH 3,98. b Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de <i>Hibiscus sabdariffa</i> sob condição D em pH 4,08.	111
<i>Figura 41</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus sabdariffa</i> referentes ao pH 5,12 nas condições: a - S e b - D.	112
<i>Figura 42</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus sabdariffa</i> referentes ao pH aproximadamente 6,1 nas condições - a - S e b - D.	113
<i>Figura 43</i> – Possíveis transformações ocorridas em pH aproximadamente 6,1 para antocianinas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> : sugestão baseada na observação dos espectros recuperados pela aplicação de MCR-ALS.	114
<i>Figura 44</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus sabdariffa</i> referentes a - ao pH 7,22 na condição S e b - pH 7,12 na condição D.	115
<i>Figura 45</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus sabdariffa</i> referentes ao pH aproximadamente 8,1 nas condições - a - S e b - D.	116
<i>Figura 46</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus sabdariffa</i> referentes a - ao pH 8,67 na condição S e b - pH 8,47 na condição D.	118
<i>Figura 47</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus sabdariffa</i> referentes ao pH 9,32 nas condições - a - S e b - D.	119
<i>Figura 48</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus sabdariffa</i> referentes a - ao pH 9,88 na condição S e b - pH 9,75 na condição D.	120
<i>Figura 49</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus sabdariffa</i> referentes a - ao pH 10,80 na condição S e b - pH 10,93 na condição D.	121
<i>Figura 50</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus sabdariffa</i> referentes a - ao pH 11,83 na condição S e b - pH 11,70 na condição D.	123
<i>Figura 51</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Hibiscus sabdariffa</i> referentes ao meio com pH acima de 12 nas condições - a - S e b - D.	124
<i>Figura 52</i> – MPCA para a amostra de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> não exposta à radiação UV.	126

<i>Figura 53</i> – MPCA para a amostra de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> sob radiação UV.....	128
<i>Figura 54</i> – MPCA para as amostras de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> na condição S (n) e na condição D (n).....	129
<i>Figura 55</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> referentes <i>a</i> - ao pH 2,50 na condição S e <i>b</i> – pH 2,42 na condição D.....	131
<i>Figura 56</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> referentes ao pH aproximadamente 4 nas condições S ( <i>a</i> ) e D ( <i>b</i> ). .....	132
<i>Figura 57</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> referentes ao pH 5,12 nas condições - <i>a</i> - S e <i>b</i> –D.....	133
<i>Figura 58</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> referentes ao pH aproximadamente 6,1 nas condições - <i>a</i> - S e <i>b</i> –D.....	134
<i>Figura 59</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> referentes <i>a</i> - ao pH 7,22 na condição S e <i>b</i> – pH 7,12 na condição D.....	135
<i>Figura 60</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> referentes ao pH aproximadamente 8,1 nas condições - <i>a</i> - S e <i>b</i> –D.....	136
<i>Figura 61</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> referentes <i>a</i> - ao pH 8,67 na condição S e <i>b</i> – pH 8,47 na condição D.....	137
<i>Figura 62</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> referentes ao pH 9,32 nas condições - <i>a</i> - S e <i>b</i> –D.....	139
<i>Figura 63</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> referentes <i>a</i> - ao pH 9,88 na condição S e <i>b</i> – pH 9,75 na condição D.....	140
<i>Figura 64</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> referentes <i>a</i> - ao pH 10,80 na condição S e <i>b</i> – pH 10,93 na condição D.....	141
<i>Figura 65</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> referentes <i>a</i> - ao pH 11,83 na condição S e <i>b</i> – pH 11,70 na condição D.....	142
<i>Figura 66</i> – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> referentes ao meio com pH acima de 12 nas condições - <i>a</i> - S e <i>b</i> - D. ....	143
<i>Figura 67</i> - Forma de aumento das matrizes utilizadas para a aplicação de MCR-ALS	145
<i>Figura 68</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para o cátion flavílico (AH <sup>+</sup> ) presente na amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> com exposição (linha pontilhada) e sem exposição à radiação UV (linha contínua). .....	146
<i>Figura 69</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para um intermediário presente em meio ácido na amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	147

<i>Figura 70</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para o Carbinol (B) presente na amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	148
<i>Figura 71</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável Chalcona (C), presente na amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	149
<i>Figura 72</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para a forma Quinoidal (A), presente na amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	150
<i>Figura 73</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma forma de chalcona (C), presente na amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	151
<i>Figura 74</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma forma de chalcona ionizada (C <sup>-</sup> ), presente na amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	152
<i>Figura 75</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para formas de anidrobases ionizadas (A <sup>-</sup> ), presentes na amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	152
<i>Figura 76</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para forma de anidrobases ionizadas (A <sup>2-</sup> ), presente na amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> na condição D. ....	153
<i>Figura 77</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para o cátion flavílico (AH <sup>+</sup> ) presente na amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	154
<i>Figura 78</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para o Carbinol (B) presente na amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	155
<i>Figura 79</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável Chalcona (C), presente na amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	156
<i>Figura 80</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma substância presente na amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> na condição D. ....	156
<i>Figura 81</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma anidrobases Quinoidal (A), presente na amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	157
<i>Figura 82</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma anidrobases Quinoidal ionizada (A <sup>-</sup> ), presente na amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	158
<i>Figura 83</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma anidrobases Quinoidal ionizada (A <sup>2-</sup> ), presente na amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	158
<i>Figura 84</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma forma de chalcona (C), presente na amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	159
<i>Figura 85</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma substância presente na amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> na condição D. ....	160

<i>Figura 86</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para o cátion flavílico (AH <sup>+</sup> ) presente na amostra de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	161
<i>Figura 87</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para o Carbinol (B) presente na amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	162
<i>Figura 88</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável Chalcona (C), presente na amostra de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	163
<i>Figura 89</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável anidrobases quinoidal ionizada (A <sup>-</sup> ) presente na amostra de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> na condição D. ....	163
<i>Figura 90</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável anidrobases quinoidal ionizada (A <sup>2-</sup> ) presente na amostra de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	164
<i>Figura 91</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável anidrobases quinoidal ionizada presente na amostra de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	165
<i>Figura 92</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável chalcona ionizada (C <sup>-</sup> ) presente na amostra de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> na condição D. ....	166
<i>Figura 93</i> – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável anidrobases quinoidal ionizada (A <sup>2-</sup> ) presente na amostra de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada). .....	167
<i>Figura 94</i> - Esquema do sistema FIA a ser utilizado. L e D indicam saída do fluxo com as válvulas ligadas ou desligadas, respectivamente. ....	172
<i>Figura 95</i> - Ilustração do fenômeno de dispersão que ocorre em um sistema FIA. ....	173
<i>Figura 96</i> – Ajuste do modelo PLS para previsão de valores de pH em Análise por Injeção em Fluxo. ....	175
<i>Figura 97</i> – Valores de gradiente de pH previstos pelo modelo PLS para Análise por Injeção em Fluxo. ....	176
<i>Figura 98</i> – Espectros recuperados por MCR-ALS para análise FIA da amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> . ....	178
<i>Figura 99</i> – Perfis de concentração recuperados por MCR-ALS para análise FIA da amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> . ....	179
<i>Figura 100</i> – Intervalo contendo perfis de concentração variando com o pH recuperados por MCR-ALS para análise FIA da amostra de <i>Hibiscus acetosella</i> . ....	181
<i>Figura 101</i> – Espectros recuperados por MCR-ALS para análise FIA da amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> . ....	183
<i>Figura 102</i> – Perfis de concentração recuperados por MCR-ALS para análise FIA da amostra de <i>Hibiscus sabdariffa</i> . ....	184
<i>Figura 103</i> – Espectros recuperados por MCR-ALS para análise FIA da amostra de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> . ....	185
<i>Figura 104</i> – Perfis de concentração recuperados por MCR-ALS para análise FIA da amostra de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> . ....	185

*Figura 105* – Possíveis transformações estruturais sugeridas para antocianinas em meio aquoso em função do pH..... 187

# Índice de Tabelas

<i>Tabela 1</i> - Valores de pH das soluções tampão .....	76
<i>Tabela 2</i> – Número de componentes principais em seus respectivos valores de pH para as amostras de <i>Hibiscus acetosella</i> sem e com exposição à radiação Ultravioleta. ....	83
<i>Tabela 3</i> – Número de componentes principais em seus respectivos valores de pH para as amostras de <i>Hibiscus Sabdariffa</i> sem e com radiação Ultravioleta. ....	105
<i>Tabela 4</i> – Número de componentes principais em seus respectivos valores de pH para as amostras de <i>Malvaviscus Penduliflorus</i> sem e com exposição à radiação Ultravioleta. ....	125
<i>Tabela 5</i> – Constantes aparentes de equilíbrio encontradas após a aplicação de MCR-ALS nos dados de <i>Hibiscus acetosella</i> . ....	182
<i>Tabela 6</i> – Constantes aparentes de equilíbrio encontradas após a aplicação de MCR-ALS nos dados de <i>Hibiscus sabdariffa</i> . ....	184
<i>Tabela 7</i> – Constantes aparentes de equilíbrio encontradas após a aplicação de MCR-ALS nos dados de <i>Malvaviscus penduliflorus</i> . ....	186

# 1. Prefácio

Com o avanço tecnológico em todos os campos da química analítica uma grande quantidade de dados vem sendo gerados, possibilitando a aquisição de informação de forma mais eficiente, o que exige alternativas para lidar com esse fato. Com intuito de solucionar este problema, técnicas estatísticas multivariadas têm sido utilizadas para se encontrar a melhor metodologia para extrair informação destes sistemas, ajudando na identificação das espécies presentes e na determinação qualitativa e quantitativa. O método de Resolução de Curvas Multivariadas (MCR – do inglês *Multivariate Curve Resolution*) faz parte de um grupo de técnicas adequadas para o estudo de misturas não resolvidas, quando não se tem disponível nenhuma informação *a priori* sobre a natureza e a composição dessas misturas. Embora os objetivos do MCR sejam diferentes dos objetivos dos métodos da calibração multivariada, existe uma relação clara entre os dois tipos de métodos. Na resolução de curvas, o interesse é focado na determinação de informação qualitativa e na resolução e recuperação dos perfis de resposta (por exemplo tempo e perfis espectrais) dos componentes presentes na mistura. O principal objetivo dos métodos de calibração multivariada é a estimativa da relação quantitativa entre as amostras e os padrões, e não é dada muita atenção à recuperação das respostas verdadeiras puras dos componentes ou analitos contidos nas misturas. Obviamente, o método ideal seria aquele que resolvesse os dois problemas, ou seja, que determinasse a informação quantitativa e recuperasse os perfis multivariados de respostas verdadeiras para as mudanças na concentração e nos espectros.

O MCR decompõe um conjunto de matrizes de dados bidimensionais em um produto de duas matrizes menores que são relacionadas a uma das duas ordens da matriz de dados original (por exemplo espectral e temporal). A resolução de curvas foca para as decomposições que possuem significado

físico e químico e tenta encontrar as verdadeiras causas subjacentes à variação dos dados.

Esta Tese de Doutorado apresenta o estudo da influência da radiação ultravioleta e da variação do pH em extratos de três espécies de flores diferentes, analisados com o auxílio dos métodos quimiométricos de Resolução de Curvas Multivariadas com Mínimos Quadrados Alternantes (MCR-ALS) e análise de fatores (PCA, MPCA e SVD). São apresentadas diferentes estratégias de aplicações envolvendo o MCR-ALS em matrizes individuais e em matrizes aumentadas, além da aplicação em dados obtidos por análise por injeção em fluxo (FIA), os quais possibilitaram o cálculo de algumas constantes de equilíbrio.

A tese está dividida em oito capítulos. O *primeiro capítulo* traz um prefácio do trabalho, resumindo e explicando os interesses do trabalho. O *segundo capítulo* apresenta os objetivos do trabalho. O *terceiro capítulo* aborda o assunto antocianinas, explicando sua importância e mostrando as metodologias analíticas normalmente empregadas no seu estudo. O *quarto capítulo* apresenta os métodos quimiométricos utilizados neste trabalho, como PCA, SVD, MPCA, Pure e MCR-ALS, explicando os fundamentos das metodologias, assim como, mostrando algumas das aplicações existentes. O *quinto capítulo* trata do efeito da radiação ultravioleta nos extratos das plantas analisadas em diferentes valores de pH, com as amostras analisadas com e sem exposição à radiação UV. Neste capítulo são apresentadas diferentes estratégias quimiométricas de aplicação do MCR-ALS: matrizes individuais e matrizes aumentadas. O *sexto capítulo* apresenta a aplicação do MCR em dados de análise por injeção em fluxo com geração de um gradiente de pH, na tentativa de encontrar as constantes aparentes para os equilíbrios propostos a partir das informações inferidas do *quinto capítulo*. Algumas constan-

tes foram calculadas e com as informações adquiridas, um esquema de equilíbrio é proposto no final do capítulo. Finalmente são apresentadas no *capítulo 7* as conclusões obtidas no estudo, e as referências bibliográficas utilizadas no trabalho estão apresentadas na sequência, no *capítulo 8*.

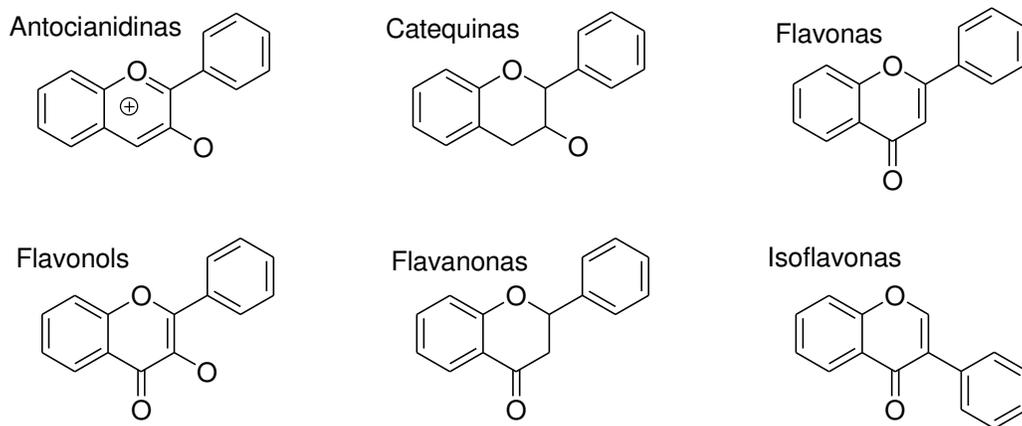
## 2. Objetivos

Esta tese tem como objetivos principais:

- 1) Investigar o efeito da variação de pH e radiação UV na degradação das antocianinas com o auxílio do método de resolução de curvas MCR;
- 2) Para as antocianinas estudadas, determinar o número, o perfil espectral, as concentrações relativas e identificar as espécies presentes, bem como calcular as constantes para os equilíbrios identificados;
- 3) Estudar o comportamento cinético das antocianinas nas diferentes condições experimentais propostas, tendo em vista contribuir para a elucidação dos diferentes aspectos das transformações estruturais das antocianinas.

### **3. Antocianinas**

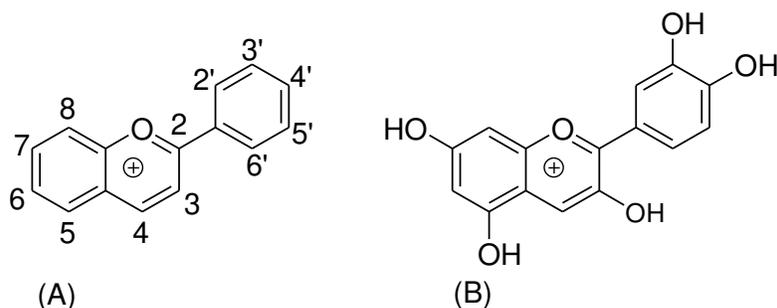
A cor é um dos mais importantes atributos de qualidade de um alimento, exercendo uma enorme influência em seu valor estético e servindo de base para a aceitação de uma grande variedade de produtos alimentícios por parte dos consumidores<sup>1</sup>. Em produtos naturais, a maioria das substâncias responsáveis pela coloração pertence a classe dos flavonóides. Os flavonóides possuem uma estrutura marcada pela presença de um esqueleto com 15 átomos de carbono na forma C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, e são divididos em classes dependendo do estado de oxidação do anel central de pirano<sup>2</sup>. A **Figura 1** apresenta a estrutura química dos principais tipos de flavonóides<sup>3</sup>.



**Figura 1-** Estrutura química dos principais tipos de flavonóides<sup>3</sup>.

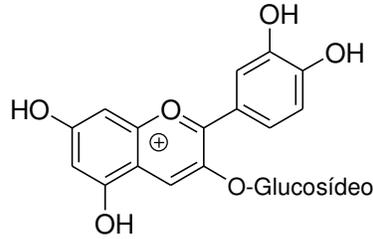
A classificação do tipo de flavonóide presente em um extrato de planta baseia-se inicialmente no estudo das propriedades de solubilidade e reações de coloração. Este procedimento é seguido por análise cromatográfica do extrato da planta. Os flavonóides podem ser separados por procedimentos cromatográficos e os componentes individuais identificados, quando possível, por comparação com padrões.

Duas das classes de flavonóides de importância destacada são os flavonóis e as antocianidinas<sup>4</sup>. As antocianidinas apresentam como estrutura fundamental o cátion flavílico<sup>5</sup> (2-fenilbenzopirilium), representado na **Figura 2- A**. A **Figura 2- B** apresenta a estrutura de um exemplo de antocianidina, conhecida como cianidina.



**Figura 2-** (A) Estrutura do cátion flavílico e (B) estrutura da antocianidina cianidina.

Os pigmentos ocorrem geralmente na forma de antocianinas<sup>6</sup>, que são derivadas das antocianidinas. As antocianidinas não possuem grupos glicosídeos e a maioria é hidroxilada nas posições 3, 5 e 7. Já nas antocianinas, uma ou mais destas hidroxilas estão ligadas a açúcares, sendo os mais comuns a glicose, xilose, arabinose, rarnose, galactose ou dissacarídeos constituídos por esses açúcares, aos quais podem estar ligados ácidos fenólicos como: *p*-coumárico, cafêico, fenílico e vanílico. O açúcar presente nas moléculas de antocianinas confere maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos, quando comparados com as antocianidinas<sup>5</sup>. A **Figura 3** apresenta um exemplo de estrutura de antocianina presente na maioria dos vegetais, a cianidina 3-glucosídeo.



**Figura 3** - Estrutura da antocianina cianidina 3-glucosídeo.

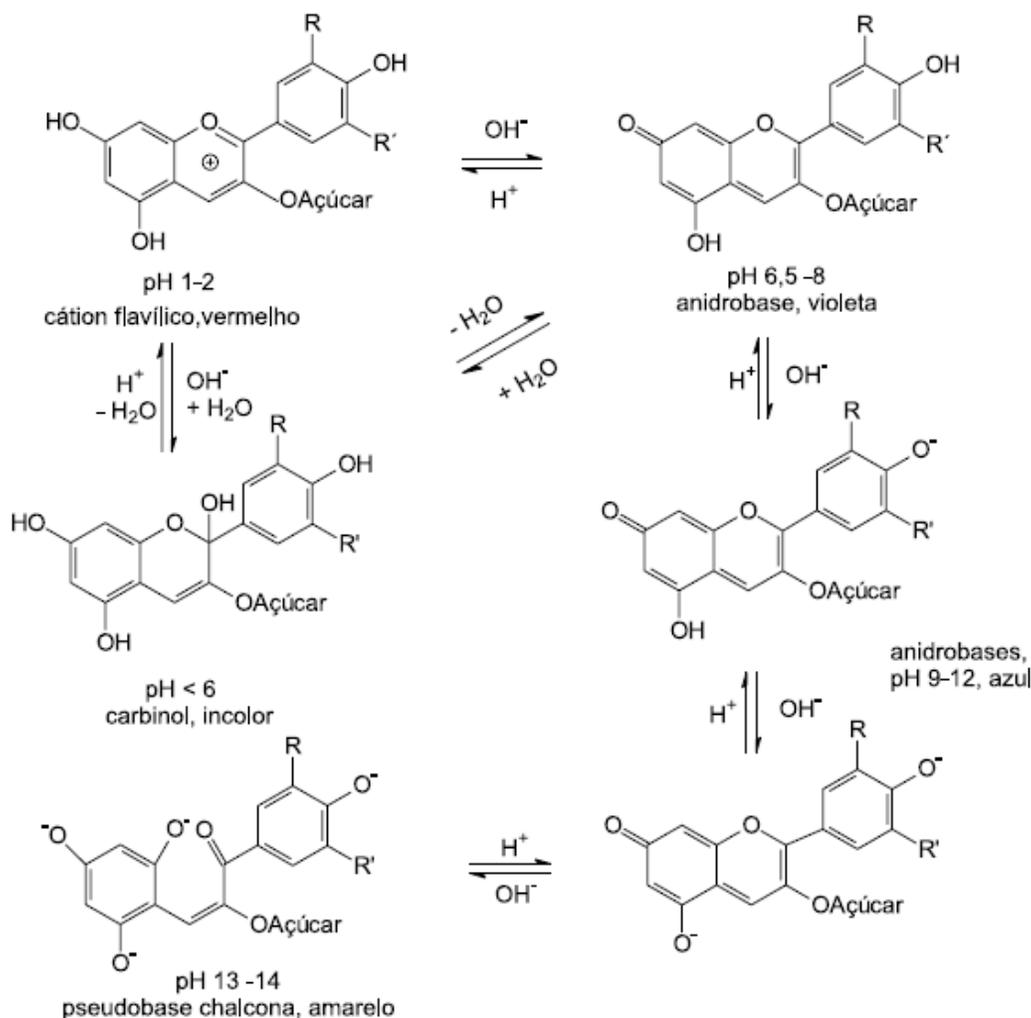
O termo antocianina, derivado do grego de flor e azul (*anthos* = flores; *kianos* = azul), foi proposto por Marquart em 1853 para se referir aos pigmentos azuis das flores. Percebeu-se mais tarde que não apenas a cor azul, mas também várias outras cores observadas em flores, frutos, folhas, caules e raízes são atribuídos a pigmentos quimicamente similares aos que deram origem ao “flor azul”<sup>7</sup>.

Com a mesma origem biosintética dos outros flavonóides naturais, as antocianinas são estruturalmente caracterizadas pela presença do esqueleto contendo 15 átomos de carbono na forma C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, porém, ao contrário dos outros flavonóides, as antocianinas absorvem fortemente na região visível do espectro, conferindo uma infinidade de cores dependendo do meio de ocorrência<sup>7</sup>.

Devido sua solubilidade em água<sup>8</sup>, as antocianinas ocorrem nos tecidos de plantas dissolvidas no fluído da célula vegetal, que geralmente apresenta pH levemente ácido<sup>6</sup>. As antocianinas mais comumente encontradas em frutas são derivadas principalmente de seis antocianidinas: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina. A nomenclatura dos pigmentos é derivada da fonte (do vegetal) em que elas foram primeiramente isoladas<sup>9</sup>. As diferenças entre as várias antocianinas estão no número de grupos hidroxílicos na molécula, no grau de metilação destes grupos, na natureza e no número de açúcares ligados à molécula e na posição dessas

ligações, bem como na natureza e no número de ácidos alifáticos e/ou aromáticos ligados ao(s) açúcar(es) na molécula de antocianina<sup>1</sup>.

Uma característica marcante das antocianinas está no fato de que em soluções aquosas, elas apresentam diferentes estruturas em função do pH. De modo geral, em meio ácido (pH entre 1-2), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada, o que corresponde ao equilíbrio entre o cátion flavílico e uma estrutura conhecida como pseudobase carbinol. Com o aumento do pH, as antocianinas vão perdendo a cor até se tornarem praticamente incolores em pH aproximadamente 6, devido a formação da pseudobase carbinol. Aumentando-se o pH para 6,5 - 8, ocorre a formação de estruturas que apresentam a cor violeta (anidrobases). Em valores de pH acima de 6,0, tanto a estrutura pseudobase carbinol quanto anidrobases quinoidais podem entrar em equilíbrio com a forma cis-chalcona. A formação da cis-chalcona a partir da anidrobases quinoidal pode acontecer por dois caminhos diferentes: de maneira direta, resultado de um aumento brusco de pH, ou com a formação das espécies anidrobases ionizadas, provavelmente provenientes de um aumento gradual de base entre os valores de pH 6,5 e 9. Em valores de pH acima de 8 começa a ocorrer a ionização das antocianinas, de forma que entre o pH 9 e 12, formam-se estruturas de anidrobases que exibem coloração azul. Para valores de pH acima de 9, pode ocorrer a ruptura do anel heterocíclico, com a formação de estruturas conhecidas como chalconas. Após a abertura do anel, as mudanças são consideradas como irreversíveis, ou seja, a observação de estruturas presentes em valores de pH abaixo de 9, como por exemplo a do cátion flavílico é bastante dificultada. A *Figura 4* apresenta as possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH<sup>10,11</sup>.



**Figura 4-** Possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH.

O aquecimento é um fator que acelera a degradação das antocianinas. Em presença de cátions de Al, Fe, Sn e outros metais, as antocianinas formam produtos insolúveis que, no caso do alumínio, encontram aplicações como corantes que apresentam estabilidade ao calor, pH e oxigênio superiores aos das antocianinas livres. Além do pH, a luz é um outro fator de grande importância na alteração da cor das antocianinas. A transformação é mais intensa quando o fator luz é combinado com o efeito do oxigênio. As antoci-

aninas também podem se combinar com  $\text{HSO}_3^-$  presente em muitos alimentos formando produtos incolores provenientes da ligação deste com o carbono 4 (ver *Figura 2-A*) da antocianina. A estabilidade das antocianinas ao descoloramento é aumentada consideravelmente pela presença de ácidos fenólicos. O mesmo efeito é observado pela presença de flavonóides não-antociânicos, especialmente os flavonols, como por exemplo a rutina. Compostos como o acetaldeído, amino ácidos, taninos, dentre alguns outros também conferem aumento na estabilidade da molécula. Esse aumento na estabilidade é atribuído à copigmentação, ou seja, associação entre a antocianina e flavonol (copigmento) por ligações de hidrogênio de modo que o flavonol venha a formar uma estrutura protetora envolvendo a antocianina<sup>11</sup>.

Existe um grande interesse no estudo das antocianinas em diversas áreas, como na saúde, devido ao seu grande potencial terapêutico, no comércio, com destaque para as aplicações na fabricação de vinhos e como corantes naturais<sup>12</sup>, e também na área de ensino em química, onde servem como indicadores de pH<sup>5,13</sup>. No entanto, a utilização de antocianinas apresenta restrições em função de limitações, como a disponibilidade de matéria-prima produtora de pigmentos na quantidade e qualidade requerida, as dificuldades envolvendo processos de obtenção (extração, purificação e isolamento), o poder corante reduzido quando comparado aos produtos sintéticos e, principalmente, a baixa estabilidade apresentada pelas antocianinas<sup>1</sup>.

O conhecimento da estrutura dos pigmentos, a influência de fatores como pH, temperatura, a presença de ácidos, de açúcares, íons metálicos e a presença de substâncias chamadas de co-pigmentos, assume importância fundamental no estudo da estabilidade de antocianinas, visando seu possível uso em alimentos<sup>1</sup>. A determinação de compostos fenólicos é de grande importância devido a relação destes compostos com as qualidades sensoriais

dos alimentos como a cor, sabor e aroma<sup>14</sup>. No entanto, os extratos de plantas apresentam misturas de diferentes substâncias, incluindo diferentes classes de flavonóides. As antocianinas, por exemplo, presentes em pétalas de flores, estão sempre acompanhadas de flavonas incolores que se apresentam como co-pigmentos, sendo essenciais para a expressão da cor e fornecendo estabilidade a antocianina<sup>15</sup>. O conhecimento do tipo de antocianina também se mostra fundamental no estudo de plantas ornamentais, onde a predominância de uma antocianina individual pode determinar a cor do produto, influenciando diretamente na aceitação e no valor comercial do mesmo<sup>16</sup>. Outra razão para a identificação de antocianinas individuais está na análise de vinhos adulterados: os tipos de antocianinas dependem da espécie do gênero *Vitis* utilizada na fabricação do vinho, e são determinantes na coloração, aroma e principalmente no sabor desta bebida<sup>17</sup>.

Como os extratos vegetais são matrizes complexas, às vezes é necessário que se purifique a amostra para realizar a identificação das substâncias presentes. Para o caso de identificação de substâncias individuais, se faz necessária a remoção de substâncias interferentes e a separação de compostos de uma mesma classe, e para estes fins a cromatografia é uma técnica indispensável, possibilitando a posterior identificação e quantificação de compostos com alta sensibilidade e eficiência<sup>18</sup>.

O estudo de antocianinas presentes em extratos vegetais é dependente do objetivo da análise: a detecção da presença de antocianinas em uma planta pode ser realizada utilizando-se a técnica de cromatografia em papel (CP) baseando-se na propriedade de mudança de cor em função do pH apresentada pelas antocianinas, e para fins de identificação de antocianinas individuais, como é o caso de estudos de plantas ornamentais onde a identificação do tipo de antocianina é de fundamental importância, podem ser empregadas

técnicas mais avançadas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrometria de massas (MS), ressonância magnética nuclear de prótons (RMN de  $^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN de  $^{13}\text{C}$ ), eletroforese capilar por zonas<sup>19</sup> (ECZ - do inglês: *Capillary Zones Electrophoresis*, CZE), além de equipamentos que combinam estas e outras técnicas (equipamentos hífenados).

Na identificação de um constituinte de uma planta, uma vez que este tenha sido isolado e purificado, é necessário primeiramente determinar a classe do composto, e então encontrar qual substância em particular está presente dentro desta classe. Para as antocianinas, a classe de compostos pode ser facilmente distinguida por testes de coloração<sup>15</sup>.

Como etapa inicial para o estudo de antocianinas, a detecção da presença do pigmento na amostra pode ser realizada utilizando-se a técnica de cromatografia em papel, onde a presença ou ausência do pigmento antocianina pode ser determinado baseando-se em uma reação que envolve mudança reversível na coloração em função do pH. Para isso, o primeiro passo está na obtenção do extrato da planta.

As antocianinas são instáveis em soluções neutras ou alcalinas, e mesmo em soluções ácidas a cor pode desaparecer gradualmente quando a solução sofre exposição à luz. Como estes pigmentos são solúveis em solventes polares, devem ser extraídos utilizando-se soluções alcoólicas de metanol ou etanol contendo ácido acético ou ácido clorídrico. O ácido empregado na solução diminui o pH, prevenindo a degradação de antocianinas não aciladas<sup>12</sup>. A maioria dos estudos emprega soluções alcoólicas de metanol acidificadas com HCl, no entanto, na análise de alimentos a solução de metanol deve ser substituída por etanol devido a toxicidade de metanol<sup>20</sup>. Após a maceração de quantidade adequada de amostra embebida na solução extra-

tora, pode-se obter um extrato suficientemente concentrado para a aplicação direta em cromatografia em papel.

No caso de necessidade de armazenamento, o extrato deve ser mantido em local escuro e preferencialmente a baixas temperaturas<sup>15</sup>.

A cromatografia em papel é uma técnica de separação por partição líquido-líquido: a celulose é constituída por várias unidades de glicose anidra ligadas por átomos de oxigênio, de modo que um líquido polar como a água tem grande afinidade pelas hidroxilas de cada glicose, formando ligações de hidrogênio, ficando retido e funcionando como fase estacionária, e os líquidos menos polares (solventes orgânicos) são repelidos e funcionam como fase móvel<sup>21</sup>. No estudo de antocianinas o solvente mais utilizado é a solução de butanol - ácido acético - água (BAW - na maioria das vezes na proporção 4 : 1 : 5)<sup>22</sup>. Como a fase estacionária é um líquido, o processo de separação ocorre por partição, baseando-se nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra na fase estacionária.

Após o desenvolvimento cromatográfico, o aparecimento de mancha(s) colorida(s) é o primeiro indício da possibilidade de existência de antocianinas no extrato<sup>23</sup>. Baseando-se na propriedade apresentada pelas antocianinas de variar a coloração de forma reversível em função do pH<sup>10,22</sup>, é possível detectar se a mancha observada é devido a presença de antocianinas ou outras substâncias, como por exemplo as betacianinas, presentes em beterrabas (planta da família *Centrospermae*). As betacianinas são pigmentos solúveis em água e apresentam coloração vermelho-escura quando em meio levemente ácido, o que pode causar grande confusão em uma tentativa inicial de classificação do tipo de pigmento. A principal betacianina é a betanina. No entanto, as antocianinas e as betaninas não ocorrem simultaneamente em uma mesma planta: algumas plantas substituem biosinteticamente as antoci-

aninas por betaninas, como é o caso de plantas da família *Centrospermae*, como *cacti*, *bougainvillea*, *pokeweed*, *Phytolacca* e *Amaranthus*<sup>15</sup>. Neste caso, baseando-se na mudança de estruturas decorrentes da variação do pH do meio (*Figura 4*), ao mudar o pH do cromatograma para levemente alcalino pela exposição a vapores de amônia, a mancha deve mudar de coloração. Deve-se tomar os devidos cuidados para não tornar o meio alcalino a ponto de causar a formação das chalconas (ruptura do anel), o que torna a reação irreversível. Caso a substância mude de cor, deve-se borrifar solução ácida, revertendo o pH para o valor inicial, e dessa forma, voltando a cor inicial. As betacianinas diferem das antocianinas por serem mais instáveis<sup>15</sup>, de modo que ao mudar o pH para valores mais elevados (de 2 para 7 por exemplo), as betaninas sofrem transformações irreversíveis em sua estrutura, enquanto que as antocianinas retomam a forma inicial.

Para estudos com finalidades apenas de detecção da presença de antocianinas em extratos vegetais, o teste de cromatografia em papel é suficiente. Em estudos com finalidade de identificação de antocianinas individuais, a cromatografia em papel deve ser encarada apenas como teste preliminar, pois neste caso, existe a necessidade de purificação, melhor separação e isolamento das antocianinas. A cromatografia em camada delgada (CCD) pode ser uma alternativa atraente para o lugar da cromatografia em papel, pois fases estacionárias diferentes podem ser empregadas, possibilitando diferentes mecanismos de separação. As principais vantagens da CCD quando comparada a CP são a versatilidade e sensibilidade<sup>24</sup>. No entanto, apesar de um custo mais elevado, as técnicas mais avançadas apresentam melhor eficiência, melhor resolução e apresentam resultados mais confiáveis na separação, como é o caso de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletrofo-

rese capilar por zonas (CZE) e cromatografia contra-corrente de alta velocidade (do inglês: *High-speed countercurrent chromatography*, HSCCC).

Vários métodos têm sido utilizados com sucesso para a purificação dos extratos brutos de antocianinas, contudo, o método mais utilizado atualmente é a extração em fase sólida (do inglês: *Solid Phase Extraction*, SPE) em cartuchos C<sub>18</sub> e Sephadex. Isto se deve a simplicidade relativa para a eliminação das impurezas tais como substâncias polares e não fenólicas. O procedimento para purificação das antocianinas envolve a aplicação do extrato antociânico bruto no cartucho contendo material sorvente, seguido da eluição dos componentes individuais com solventes apropriados. As antocianinas ficam fortemente ligadas aos adsorventes por seus grupos hidroxil não-substituídos. Desta forma, primeiramente são eluídas as substâncias mais polares que as antocianinas, tais como os açúcares, ácidos e substâncias solúveis, e posteriormente são eluídos os pigmentos antociânicos<sup>3,12,25,26</sup>.

Para a separação das antocianinas, técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia contra-corrente (CCC)<sup>18</sup> e eletroforese capilar por zonas (CZE)<sup>27</sup> tem sido as mais utilizadas. A cromatografia em papel e a cromatografia em camada delgada também podem ser utilizadas na etapa de separação, no entanto, estas técnicas não oferecem nenhuma outra vantagem além do custo quando comparadas com, por exemplo, a eficiência de separação apresentada por CLAE e CZE. Quando se trabalha com grandes quantidades de extrato, uma alternativa é a cromatografia em coluna aberta.

Atualmente, a técnica mais utilizada para a separação de antocianinas é a CLAE com fase reversa. A CLAE é considerada como um membro muito importante da família de técnicas de separação. Este tipo de cromatografia utiliza instrumentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É

um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas fechadas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída a altas pressões, apresentando a capacidade de realizar separações de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Além de permitir excelente separação, esta técnica possibilita simultaneamente separar, identificar e quantificar pigmentos antociânicos sem requerer purificação excessiva dos extratos<sup>25</sup>.

Outra técnica que pode ser empregada na separação de antocianinas é a cromatografia contra-corrente de alta velocidade (HSCCC), descrita como um processo de separação no qual uma fase líquida é retida no espiral da coluna por força centrífuga, enquanto uma segunda fase líquida imiscível passa continuamente por ela. Por se tratar de uma técnica de suporte-livre líquido-líquido, a retenção dos solutos é determinada exclusivamente pelos seus coeficientes de partição, e o problema da adsorção dos solutos na fase estacionária é excluído<sup>28</sup>. Segundo alguns autores<sup>29,30,31</sup>, as maiores vantagens desta técnica de separação quando comparadas com CLAE preparativa são as menores quantidades de fase móvel requeridas, a não adsorção dos analitos (compostos de interesse) na fase estacionária e a completa recuperação da amostra. No entanto, a CLAE apresenta melhor resolução e menor tempo de análise que a técnica de HSCCC.

Como as antocianinas encontradas na natureza são compostos iônicos, elas também são móveis em um campo elétrico. Baseando-se neste fato, a eletroforese capilar, que é uma ferramenta analítica relativamente nova, também pode ser utilizada na separação de antocianinas<sup>3</sup>. Em 2003, Sáenz-López et al<sup>27</sup> desenvolveram um método utilizando-se CZE para a determinação de antocianinas em vinho, mostrando que a técnica pode ser uma fer-

ramenta muito útil para a análise de antocianinas. Recentemente, o mesmo grupo fez uma seqüência de estudos sobre antocianinas, tais como ordem de migração de antocianinas em vinhos<sup>32</sup> e análise de vinho envelhecido<sup>33</sup> utilizando CZE. A eletroforese capilar tem como vantagens a alta sensibilidade, alta resolução, baixo consumo de amostra e geração mínima de resíduos. No entanto, quando comparada a CLAE, apresenta menor sensibilidade e menor eficiência na separação<sup>34</sup> de antocianinas em amostras complexas, o que deve ser o fator limitante, resultando na baixa quantidade de trabalhos publicados utilizando esta técnica para a separação de antocianinas.

Uma outra técnica que pode ser empregada na separação de antocianinas é a cromatografia gasosa, que apresenta sensibilidade excelente. Nesta técnica, a separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária sólida ou líquida e uma fase móvel gasosa. De acordo com o tipo de fase estacionária utilizada, a cromatografia gasosa pode ser classificada em cromatografia gás-sólido, fase ligada e cromatografia gás-líquido, sendo esta última a forma mais utilizada de cromatografia gasosa. Esta técnica é mais utilizada para a separação de gases ou substâncias voláteis<sup>21</sup>, no entanto, devido ao fato de as antocianinas não apresentarem volatilidade, existe a necessidade de derivatização dos pigmentos, processo este que dificulta o uso desta técnica.

As técnicas de hidrólise podem servir como um complemento para a identificação de antocianinas, auxiliando na separação das antocianinas de seus açúcares e ácidos ligados. A hidrólise ácida geralmente é realizada com ácido clorídrico concentrado em temperaturas relativamente altas, provocando a ruptura das ligações glicosídicas, levando ao aparecimento dos açúcares e suas antocianidinas. As antocianidinas e os açúcares podem então ser identificados por técnicas como cromatografia em papel. Para a identificação das

antocianidinas é desejável a comparação com padrões. No caso da hidrólise alcalina, é provocada a ruptura entre as ligações dos grupos acil. A análise desses grupos pode ser realizada após a extração do solvente por técnicas como espectroscopia e cromatografia<sup>25</sup>.

Uma vez separadas e purificadas, as antocianinas podem ser identificadas por várias técnicas, sendo que as mais utilizadas são a espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) e de próton ( $^1\text{H}$ ), e espectrometria de massas (MS), que, na maioria das vezes, aparece combinada com CLAE. A introdução dos sistemas de detecção de arranjo de diodos (DAD) e sua utilização quando acoplado com CLAE abriram novas perspectivas para a separação, identificação e quantificação de antocianinas devido a possibilidade de se obter espectros UV-Vis on-line durante as análises cromatográficas. Os métodos de detecção e identificação de antocianinas além das técnicas de espectrofotometria UV-Vis, podem envolver sistemas de detecção de espectrometria de massas (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN)<sup>25</sup>.

Para a identificação das antocianinas em alimentos e plantas podem ser utilizados dois procedimentos: comparação direta, quando há disponibilidade de padrões, ou comparação indireta, se não houver material padrão. Neste caso, segundo Harborne<sup>15</sup>, uma comparação cuidadosa com dados da literatura pode ser aceitável. A comparação indireta, embora seja um método sujeito a erros, é justificada pela falta de padrões e pelo longo e trabalhoso procedimento para identificação. No caso de uma nova espécie, o uso de técnicas como CLAE, RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , MS, além da combinação destas técnicas, podem fornecer informações que ajudam na caracterização do pigmento. A técnica de CLAE está na grande maioria das vezes apenas na etapa de separação, pois existe uma grande dificuldade na identificação de antoci-

aninas, não apenas em CLAE, mas em todas as outras técnicas, devido a falta de padrões de pigmentos antocianicos.

Com o intuito de minimizar a dificuldade da falta de padrões e dos trabalhosos procedimentos para a identificação de antocianinas, em 1999, Goiffon et al<sup>35</sup> propuseram um método para identificação baseado nos parâmetros que afetam a retenção da cromatografia líquida. Na metodologia proposta, os autores relacionam o tempo de retenção de várias antocianinas com o tempo de retenção de uma antocianina que está presente na maioria das frutas vermelhas: a cianidina-3-glucosídeo. Sugere-se então que essa relação dos tempos de retenção ( $\alpha$ ) seria a forma de identificar as diferentes antocianinas. Dessa forma, a identificação de antocianinas em frutas é facilitada consideravelmente, minimizando o problema da falta de padrões. Goiffon et al determinaram o valor de  $\alpha$  para 40 antocianinas e antocianidinas utilizando 2 tipos de eluentes, enquanto que na maioria dos trabalhos descritos na literatura para identificação de antocianinas cita-se apenas um tipo de fase móvel.

A espectrofotometria UV-Vis é uma ferramenta auxiliar muito importante nas análises de antocianinas, principalmente quando acopladas com técnicas como a CLAE. As antocianinas apresentam diferentes perfis espectrais dependendo do pH devido a predominância de diferentes estruturas em cada meio como pode ser observado pela **Figura 4**. Segundo alguns pesquisadores como Francis<sup>20</sup>, quando a antocianidina e o(s) açúcar(es) é(são) conhecido(s), os dados espectrais podem ser ferramentas muito úteis na determinação da posição da ligação glicosídica. Este autor afirma que quando uma antocianina possui uma molécula de açúcar ligada ao carbono da posição 5, em meio ácido, observa-se um ombro na banda de absorção em 440 nm, além da banda do cátion flavílico em 520 nm. No entanto, mesmo ser-

vindo como ferramenta complementar para as análises qualitativas quando utilizada em conjunto com análises por CLAE, a espectrofotometria UV-Vis, quando aplicada sozinha, apresenta maior utilidade em análises quantitativas.

Uma aplicação interessante da espectrofotometria UV-Vis no campo da identificação de antocianinas foi realizada em 2000 por Cabrita et al<sup>36</sup>, onde foi proposta a identificação de grupos de antocianinas. No trabalho, os autores relatam que as antocianinas podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com o perfil da curva obtida no comprimento de onda de máxima absorção de cada antocianina em função do pH. No *grupo 1*, caracterizado por curvas paralelas, observa-se um gradual efeito batocrômico acima de pH 6,0. Entre o pH 6,0 e 7,6, o efeito batocrômico aumenta significativamente, mas a coloração azulada não apresenta grandes variações acima de pH 8,0. Algumas antocianinas pertencentes a este grupo são: pelargonidina-3-glucosídeo, peonidina-3-glucosídeo e malvidina-3-glucosídeo. O *grupo 2* apresenta uma curva similar a do *grupo 1* entre o pH 1,0 e 8,1. Contudo, as antocianinas deste grupo apresentam um efeito hipsocrômico significativo entre o pH 8,1 e 8,6. Pertencem a este grupo as antocianinas: cianidina-3-glucosídeo, delphinidina-3-glucosídeo e petunidina-3-glucosídeo. As curvas características de cada grupo podem ser explicadas pelos grupos substituintes no anel B da estrutura fundamental das antocianinas (**Figura 2-A**). O número de substituintes oxigenados (hidroxi ou metoxi) no anel B causa um efeito batocrômico em valores de pH relativamente baixos, bem como para valores de pH altos. Assim, os grupos hidroxi e metoxi apresentam efeitos similares sobre as formas cromóforas azuladas presentes no equilíbrio. Neste trabalho, foram utilizadas como fontes de antocianinas morangos, arroz, *Abies koreana* e blueberries, e os mesmos passaram por processos de purifica-

ção e isolamento com CLAE de fase-reversa para posterior identificação utilizando-se ressonância magnética nuclear, o que comprovou que a espectrofotometria é uma excelente ferramenta complementar nas análises de antocianinas. Mesmo apresentando como vantagem custo relativamente baixo quando comparada com as técnicas mais avançadas, devido a grande quantidade de substâncias presentes em um extrato vegetal, não se pode confiavelmente afirmar sobre a estrutura de um pigmento apenas pela observação do espectro UV-Vis obtido.

Uma técnica que pode disponibilizar excelentes informações sobre a fórmula molecular de uma antocianina é a espectrometria de massas (MS). A espectrometria de massas, em sua essência, consiste na geração de íons pela fragmentação das moléculas da amostra, e a detecção dos fragmentos é feita de acordo com a massa<sup>15</sup>. Os íons positivamente carregados produzidos são acelerados em um campo magnético que dispersa e permite medidas relativas de íons de diferentes razões carga/raio. O resultado da medida da abundância dos íons versus a massa constitui o espectro de massas, que consiste de uma série de linhas variando em intensidade em diferentes unidades de massa. Para a análise de antocianinas, geralmente empregam-se fontes de bombardeamento rápido de átomos<sup>37</sup> (do inglês: *Fast Atom Bombardment*, FAB) e spray de elétrons (do inglês *Electrospray Ionization*; ESI). Uma característica importante da ESI está no fato de que as amostras devem ser introduzidas na forma de solução, tornando possível o acoplamento com muitas técnicas de separação como a CLAE. A vantagem da técnica de espectrometria de massas está na capacidade de indicar a fórmula molecular exata da substância sem a necessidade de grandes quantidades de amostra, pois a técnica pode trabalhar com quantidades a nível traço<sup>15</sup>. No entanto, deve-se tomar cuidado com a presença de isômeros, que provavelmente é o fator li-

mitante desta técnica. A melhor forma de prevenção contra este erro deve estar nas etapas de purificação e isolamento, após detecção da presença de antocianinas no extrato.

Com a possibilidade de utilização de equipamentos avançados que fornecem informações tais como espectro de massa e RMN de carbono e prótons, o procedimento para a elucidação da estrutura de uma antocianina, deve em sua primeira etapa, levar ao reconhecimento da fórmula molecular, pois assim se pode ter uma idéia geral da molécula (isto é, o número e o tipo de átomos). A obtenção da fórmula molecular começa com a localização do pico do íon molecular obtido pelo espectro de massas. A partir deste ponto os espectros RMN podem trazer as informações sobre a localização dos átomos de carbono e hidrogênio na estrutura da molécula. Observa-se que a confiabilidade dos resultados estará relacionada com a pureza atingida.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) pode disponibilizar informações para a determinação da estrutura de um composto orgânico através da medida dos momentos magnéticos de átomos de carbono e hidrogênio<sup>15</sup>. A espectroscopia RMN é basicamente uma outra forma de espectroscopia de absorção, onde, sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequências em uma frequência regida pelas características estruturais da molécula, sendo que a absorção é função de determinados núcleos da molécula<sup>38,39,40</sup>.

A técnica de espectroscopia de RMN mais eficiente para a elucidação estrutural é a RMN em duas dimensões. As duas dimensões referidas no espectro 2-D são os eixos de frequência, onde o experimento exige duas transformadas de Fourier perpendiculares entre si em dois eixos de tempo independentes, que levam a dois eixos de frequência ortogonais<sup>39</sup>. Uma das mai-

ores vantagens de se trabalhar com RMN em comparação com técnicas como, por exemplo, a CLAE na identificação de antocianinas está no fato da não necessidade de padrões. No entanto, as dificuldades para este método estão na complexidade dos espectros e na influência do solvente.

O acoplamento de diferentes técnicas instrumentais constituindo os instrumentos hifenados ou técnicas de segunda ordem, tais como a cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas ou detecção na região UV-Vis através de um sistema de arranjo de diodos vem sendo cada vez mais aplicados em laboratórios de química analítica por permitirem a obtenção de informações adicionais provenientes da correlação de diferentes respostas, como por exemplo, um espectro de absorção e um perfil cromatográfico obtidos simultaneamente de uma mesma amostra<sup>41,42</sup>. O uso de técnicas hifenadas, combinando separação e identificação das antocianinas é comum. Desta forma, a identificação das antocianinas fica facilitada pela quantidade de informações que pode ser disponibilizada por estes equipamentos. Isto se deve a alta seletividade, melhora no limite de determinação e redução no tempo de análise<sup>5</sup>.

O rápido e contínuo desenvolvimento na instrumentação nos últimos anos, em particular aqueles que envolvem espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, tem proporcionado considerável ímpeto para a elucidação estrutural em todos os campos da química de produtos naturais. Para as antocianinas, isto significa que estruturas extremamente complexas podem ser determinadas. Em geral, essas determinações não requerem derivatizações contínuas ou degradações, porém, o uso e a manutenção de equipamentos mais sofisticados eleva significativamente o custo, limitando desta forma seus usuários e aplicações.

Uma das maiores dificuldades da resolução espectrofotométrica de sistemas químicos é a estimativa do número, da concentração e dos espectros das espécies envolvidas no sistema. Diferentes técnicas estatísticas multivariadas têm sido utilizadas para se encontrar a melhor metodologia para extrair informação destes sistemas, com o objetivo de identificar as espécies presentes e determinar qualitativamente e quantitativamente as concentrações de algumas ou todas elas. Essas técnicas são conhecidas como métodos quimiométricos. A aplicabilidade de cada metodologia depende do conjunto de dados (informação experimental) submetidos à análise<sup>43</sup>. Em pesquisas recentes, foram utilizados métodos quimiométricos associados a dados espectrofotométricos para auxiliar na identificação de antocianinas extraídas de flores do gênero *Hibiscus*<sup>44,45,46</sup>. Nestes trabalhos, observa-se que com a aplicação de métodos quimiométricos em dados espectrofotométricos, foi possível identificar antocianinas sem a utilização de técnicas muito dispendiosas: identificaram-se equilíbrios entre diferentes formas de antocianinas, onde os valores encontrados para as constantes de equilíbrio se encontram em excelente concordância com valores sugeridos pela literatura.

No geral, observa-se que uma das maiores dificuldades na identificação das antocianinas individuais está relacionada ao custo de padrões, e que a escolha do método a ser utilizado depende do objetivo da análise. Para a detecção da presença de antocianinas em um vegetal, um simples teste utilizando-se cromatografia em papel pode ser suficiente. Métodos ópticos como UV-Vis são ferramentas complementares muito úteis para a caracterização de antocianinas. Identificações de antocianinas individuais exigem métodos mais avançados como utilização de CLAE, espectroscopia RMN e espectrometria de massas. A combinação destas técnicas pode trazer informações suficientes para a completa elucidação da estrutura de uma antocianina, no

entanto, deve-se tomar os devidos cuidados com análise de isótopos no caso da MS, na escolha do solvente em RMN, além de um cuidado especial na etapa de separação e isolamento, que pode influenciar em todo o resultado final.

De acordo com as pesquisas realizadas até hoje, fica claro que não existe um critério definido para a caracterização de novas antocianinas presentes em novas plantas.

## **4. Métodos Quimiométricos**

Hoje em dia, a química analítica oferece um vasto número de exemplos de sistemas multicomponentes. Dessa forma, as amostras se apresentam cada vez mais complexas e freqüentemente contém muitas espécies a serem analisadas simultaneamente (como é o caso de áreas como genômica, proteômica, etc.) ou poucos analitos na presença de muitos interferentes (por exemplo, amostras ambientais). A necessidade de uma instrumentação mais complexa para fazer face a estes sistemas de forma eficiente exige, da mesma forma, ferramentas computacionais para manipular e interpretar as informações obtidas<sup>47</sup>.

A denominação “Análise Multivariada” corresponde a um grande número de métodos e técnicas que utilizam simultaneamente todas as variáveis na interpretação do conjunto de dados obtidos. Os objetos químicos típicos são amostras analíticas ou compostos químicos de interesse, muitas vezes nomeados como analitos. As variáveis são, muitas vezes, derivadas das quantidades de constituintes químicos nos objetos, por exemplo, concentrações de elementos mais importantes, altura de picos em perfis cromatográficos, comprimentos de onda em perfis espectroscópicos.

Do ponto de vista da química analítica, os métodos multivariados de uma forma geral podem ser classificados em diferentes categorias, dependendo da quantidade de informação que se tem sobre a amostra. A escolha do planejamento experimental a ser aplicada depende da categoria em que se classifica a amostra<sup>43</sup>. Dentre os métodos, a análise nas componentes principais e métodos similares, como a Decomposição em Valores Singulares (SVD – do inglês *Singular Value Decomposition*), são utilizados com maior freqüência na compreensão, interpretação e na extração da informação dos dados<sup>48</sup>. A Análise de Componentes Principais (PCA – do inglês *Principal Components Analysis*) é uma metodologia baseada na decomposição de um

conjunto de dados em autovalores e autovetores. Da mesma forma que PCA é aplicada a um conjunto de dados, o método de Análise de Componentes Principais Multi-modo (MPCA – do inglês *Multi-way Principal Components Analysis*<sup>49</sup>) pode ser aplicado para se analisar a similaridade entre diferentes conjuntos de matrizes de dados.

O posto (do inglês *rank*) de uma matriz de dados dentro de um estudo espectrofotométrico da cinética de uma reação, por exemplo, vai ser igual ao número de espécies espectrometricamente ativas. Já o posto de uma matriz de espectros de massas bidimensional, será igual ao número de espectros diferentes gerados a partir dos fragmentos iniciais. Se uma espécie produz 10 espectros diferentes o posto será igual a 10. No entanto, quando é analisado um conjunto de amostras ao mesmo tempo, o posto pode ser igual ou menor ao encontrado para a matriz de dados do componente puro. Métodos como a aproximação da variável pura - PURE<sup>50</sup>, podem ajudar a conseguir encontrar as estimativas de espectros e perfis cinéticos. Para isso, este método seleciona as colunas com as variáveis mais puras, de acordo com o número de fatores que se acredita existir na amostra, baseando-se no método SIMPLISMA (SIMPLE-to-use interactive mixture analysis)<sup>51</sup>. Contudo, não seria possível identificar os compostos baseando-se apenas nessas informações. Os resultados destes métodos podem ser um ponto inicial para a determinação dos perfis de concentração e espectros dos componentes puros. Técnicas de obtenção dessas informações adicionais são conhecidas como Resolução de Curvas por Auto-Modelagem (SMCR – do inglês *Self Modeling Curve Resolution*) ou Resolução Multivariada de Curvas (MCR – do inglês *Multivariate Curve Resolution*<sup>52</sup>).

No MCR deve-se inicialmente estimar o posto da matriz total de espectros, que deve ser igual ao número de espécies analisadas nas misturas. O

MCR é um método que obtém os valores de concentração das amostras, assim como os espectros puros dos componentes dentro da amostra, a partir de uma matriz de dados que contém as variáveis analíticas. A análise de dados por MCR pode ser realizada sobre uma única matriz de dados ou sobre diferentes amostras simultaneamente.

Os métodos de PCA, SVD, MPCA, Pure e MCR-ALS citados acima foram aplicados neste trabalho e serão discutidos com detalhes a seguir.

#### ***4.1 – Análise de Componentes Principais – PCA***

O método PCA encontra combinação de variáveis, ou *fatores*, que descreve a maior variabilidade nos dados. Esta técnica consiste em se fazer uma ortogonalização baseada em mudança de base vetorial. O primeiro passo para a análise de componentes principais é a formação de uma matriz de variância/covariância dos dados (**Z**) que irá isolar a fonte de variação dos dados<sup>53</sup>:

$$\mathbf{Z} = \mathbf{X}^T \mathbf{X} \quad [1]$$

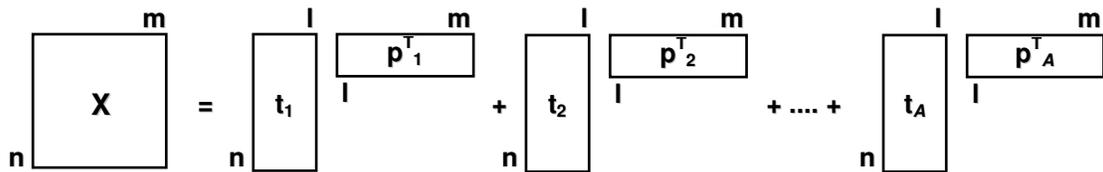
A matriz de covariância é, então, diagonalizada por uma transformação unitária:

$$\mathbf{\Lambda} = \mathbf{P}^{-1} \mathbf{Z} \mathbf{P} \quad [2]$$

em que  $\Lambda$  é uma matriz diagonal cujos elementos são autovalores de  $Z$ ;  $P$  é a matriz de autovetores, denominada “pesos” (*loadings*). Basicamente, os pesos formam uma nova base ortonormal que explica a variância dos dados de  $X$  e a projeção dos dados nessa base é denominada “escores” (*scores*), ( $T$ ). Desse modo, os dados são decompostos por um conjunto de vetores pesos e escores<sup>53</sup>:

$$X = TP^T \quad [3]$$

A combinação linear dos pesos e escores é denominada componente principal (PC). A **Figura 5** ilustra a decomposição da matriz  $X$  de dimensão  $(n \times m)$  pela análise de componentes principais até  $A$  componentes principais.



**Figura 5** – Decomposição em componentes principais por PCA.

O número máximo de componentes principais obtidos (PCs) é igual ao número de vetores de dados utilizados (posto da matriz  $X$  de dados independentes), sendo que, nem todas as PCs possuem informações úteis. Normalmente, as últimas PCs modelam ruído inerente aos dados. Sendo assim, a eliminação das PCs frequentemente aumenta a relação sinal/ruído<sup>53,54,55,56</sup>.

Idealmente, o número de PCs deveria ser igual ao número de espécies químicas presentes na amostra. Isso permite que técnicas quimiométricas que empregam PCA possam ser utilizadas em circunstâncias onde se deseja determinar apenas algumas espécies de interesse em um meio complexo.

## ***4.2 – Decomposição em Valores Singulares – SVD***

Toda matriz  $\mathbf{X} \in \mathbf{R}^{m \times n}$  pode ser escrita na forma:

$$\mathbf{A} = \mathbf{USV}^T \quad [4]$$

onde  $\mathbf{U}$  e  $\mathbf{V}$  são ortogonais e  $\mathbf{S}$  é diagonal. Os elementos de  $\mathbf{S}$  são unicamente determinados e satisfazem:

$$s_1 \geq s_2 \geq \dots \geq s_p \geq 0. \quad (\text{onde } p = \min \{m, n\}) \quad [5]$$

Os elementos diagonais de  $\mathbf{S}$  são denominados valores singulares, as colunas de  $\mathbf{U}$  são os vetores singulares à esquerda e as colunas de  $\mathbf{V}$  são os vetores singulares à direita.

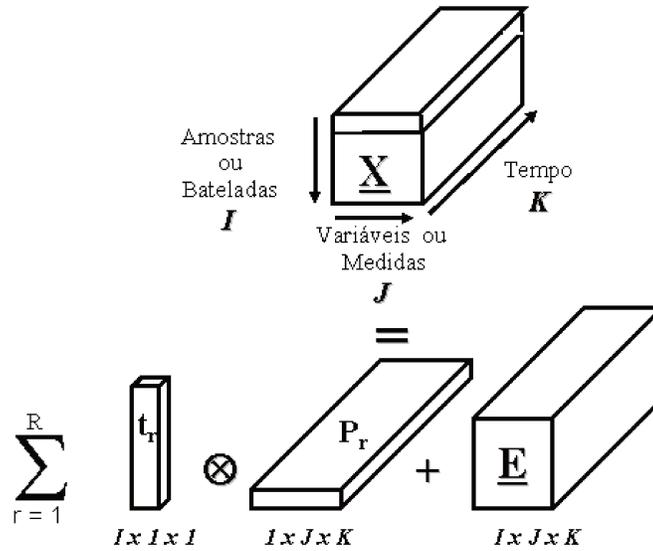
Tem-se que os valores singulares da matriz  $\mathbf{X}$  são as raízes quadradas dos autovalores da matriz  $\mathbf{X}^T \mathbf{X}$  e o posto de uma matriz pode ser dado pelo número de valores singulares não nulos, ou maiores que um dado nível de ruído.

### ***4.3 – Análise de Componentes Principais Multi-modo – MPCA***

A MPCA<sup>49</sup> é estatisticamente e algoritmicamente consistente com PCA e tem os mesmos benefícios. Em MPCA, o tensor é decomposto como uma somatória dos produtos dos vetores dos scores e matrizes dos loadings mais o arranjo residual que é minimizado no sentido dos quadrados mínimos<sup>48</sup>.

A decomposição é feita em concordância com os princípios do PCA e separa os dados da melhor forma em duas partes. O ruído ou parte residual é a menor possível e é associada com a *variação não determinística* nos dados. A parte sistemática, a soma dos vetores dos scores e das matrizes dos pesos, expressam a *variação determinística* como uma parte (scores) relacionada somente com as amostras e a segunda parte (pesos) relacionada com as variáveis e seus tempos de variação, como mostra a **Figura 6**.

MPCA é equivalente a se aplicar PCA em uma matriz bidimensional ampla, formada pelo desdobramento do arranjo tridimensional em um dos seis modos possíveis, onde somente três desses são essencialmente diferentes. Por exemplo, deve-se desdobrar um modo da matriz de forma que se coloque cada uma de suas fatias verticais ( $I \times J$ ) lado a lado, começando com a fatia correspondente ao primeiro intervalo de tempo. A matriz bidimensional resultante tem dimensões ( $I \times JK$ ), como mostra a **Figura 6**.



**Figura 6** – Arranjo de dados tridimensional e sua decomposição por MPCA.

A **equação 6** pode ser utilizada para representar a decomposição por MPCA:

$$\mathbf{X} = \sum_{r=1}^R \mathbf{t}_r \otimes \mathbf{P}_r + \mathbf{E} \quad [6]$$

Este desdobramento permite que se analise a variabilidade sobre as amostras na matriz resumindo-se a informação nos dados com respeito as variáveis e seus tempos de variação. Um outro desdobramento matemático retiraria fatias do lado da matriz e as colocaria abaixo, no eixo dos tempos, que também forma uma matriz com dimensões  $(I \times JK)$ .

## 4.4 – PURE

O método SIMPLISMA, do qual se deriva Pure, seleciona a variável mais pura com base na determinação do ângulo máximo entre as variáveis pelo cálculo do ângulo máximo gradual (*Stepwise Maximum Angle Calculations* – SMAC<sup>50</sup>).

Dessa forma, a aproximação da variável pura assume a presença de variáveis (por exemplo comprimentos de onda) que tem contribuições de apenas um componente. Como resultado, as intensidades de uma variável pura são proporcionais as concentrações desse componente. Na **equação 7** abaixo tem-se uma matriz original  $\mathbf{X}$  ( $m \times n$ ) que é uma matriz com  $m$  linhas e  $n$  colunas:

$$\mathbf{X} = \mathbf{BS}^T + \mathbf{E} \quad [7]$$

A matriz original  $\mathbf{X}$  pode ser decomposta no produto de uma matriz de perfis de concentração ( $\mathbf{B}$ ) e uma matriz de espectros ( $\mathbf{S}$ ), que melhor representa os dados experimentais. A matriz com os espectros dos componentes puros em suas colunas é representada por  $\mathbf{S}$ . O erro residual é representado por  $\mathbf{E}$ . SIMPLISMA<sup>57,58</sup> estima  $\mathbf{B}$  com as variáveis puras, que são definidas de acordo com a **Equação 8**:

$$p_{ij} = w_{ij} \times \frac{\sigma_j}{\mu_j + \alpha} \quad [8]$$

onde  $p_{ij}$  é a pureza  $j$  da variável  $i$ . O termo  $w_{ij}$  é o peso que caracteriza a independência linear da  $j$ -ésima variável candidata com respeito a variável pura previamente selecionada  $i - 1$ . O peso (da pureza  $i$  da variável  $j$ ) corrige a equação para variáveis puras previamente selecionadas e serve para evitar a divisão por zero e para evitar tendências na pureza que vão ligeiramente no sentido das variáveis com alta intensidade. A média  $\mu_j$  e desvio padrão  $\sigma_j$  são obtidos pela  $j$ -ésima variável candidata. Um valor constante  $\alpha$  minimiza a influência de colunas que não contém sinal. As intensidades para variáveis com maior pureza são utilizadas como estimativa inicial para o primeiro perfil de concentração  $\mathbf{b}_1$ . O procedimento continua até que uma matriz de perfis de concentração  $\mathbf{B}$  seja obtida. Então,  $\mathbf{S}$  é calculado de acordo com a **Equação 9**:

$$\mathbf{S} = \mathbf{X}^T \mathbf{B} (\mathbf{B}^T \mathbf{B})^{-1} \quad [9]$$

Os espectros são normalizados para um vetor de comprimento unitário. Então, uma matriz de concentração é calculada a partir de  $\mathbf{S}$  normalizado (**equação 10**):

$$\mathbf{B} = \mathbf{X} \mathbf{S} (\mathbf{S}^T \mathbf{S})^{-1} \quad [10]$$

para a qual  $\mathbf{B}$  contém os perfis de concentração provenientes dos espectros normalizados. Dessa forma, os dados originais podem ser obtidos novamente pela **equação 11**:

$$\hat{\mathbf{X}} = \mathbf{B} \mathbf{S}^T \quad [11]$$

#### ***4.5 – Resolução Multivariada de Curvas (MCR)***

Em geral, a meta do método MCR é passar as informações misturadas não-seletivas provenientes do instrumento (**D**) para as contribuições reais dos componentes puros no sistema (representados pelos perfis em **C** e **S<sup>T</sup>**) sem utilizar nenhum modelo de comportamento ou informação a priori sobre o sistema. A maneira de fazer isso de modo mais eficiente e confiável tem sido a tarefa das pesquisas de MCR nos últimos anos<sup>47</sup>.

A Resolução Multivariada de Curvas é um método quimiométrico incluído na família de técnicas de análise de fatores (*Factor Analysis – FA*<sup>59,60</sup>). Seus principais objetivos são o isolamento, resolução<sup>61</sup> (o que traz informação qualitativa)<sup>62</sup> e quantificação das fontes de variação em um determinado conjunto de dados. Para esta técnica nenhuma hipótese a priori sobre a contribuição dos diferentes fatores na resposta global é necessária. Este recurso pode ser de grande importância no estudo de problemas químicos complexos<sup>61</sup>.

Para que o método MCR possa ser aplicado, duas condições fundamentais devem ser anteriormente verificadas. A primeira delas é se o sinal analítico obedece a uma relação semelhante à lei de Beer-Lambert, ou seja, se os dados têm uma relação linear com a concentração. A segunda é a análise do posto da matriz de dados dos analitos puros e das misturas. Inicialmente o posto da matriz de dados do analito puro e das misturas deve ser calculado e comparado, assim como da matriz de dados com todas as amostras.

O posto da matriz total de espectros deve ser igual ao número de espécies analisadas nas misturas. Este número corresponde ao número de linhas ou colunas linearmente independentes, ou seja, o número de vetores que não podem ser escritos como uma combinação linear dos outros. Além desta definição, a determinação do posto é um grande problema na análise multivariada, tanto na análise de fatores quanto na calibração multivariada<sup>63</sup>.

A partir da análise do posto local e estimativas iniciais dos perfis por métodos derivados de técnicas como EFA<sup>64,65</sup> e SIMPLISMA<sup>50,51,57,58</sup>, uma otimização com mínimos quadrados alternados (ALS) é usada para recuperar fisicamente um conjunto significativo de perfis de concentrações individuais e espectros ou perfis cromatográficos de espécies que melhor explicam a variância dos dados observados. Tal como nos métodos de análise de fatores, esta recuperação é baseada na premissa de que a matriz de dados é bilinear, ou seja, que ela pode ser decomposta no produto de duas matrizes<sup>61</sup>.

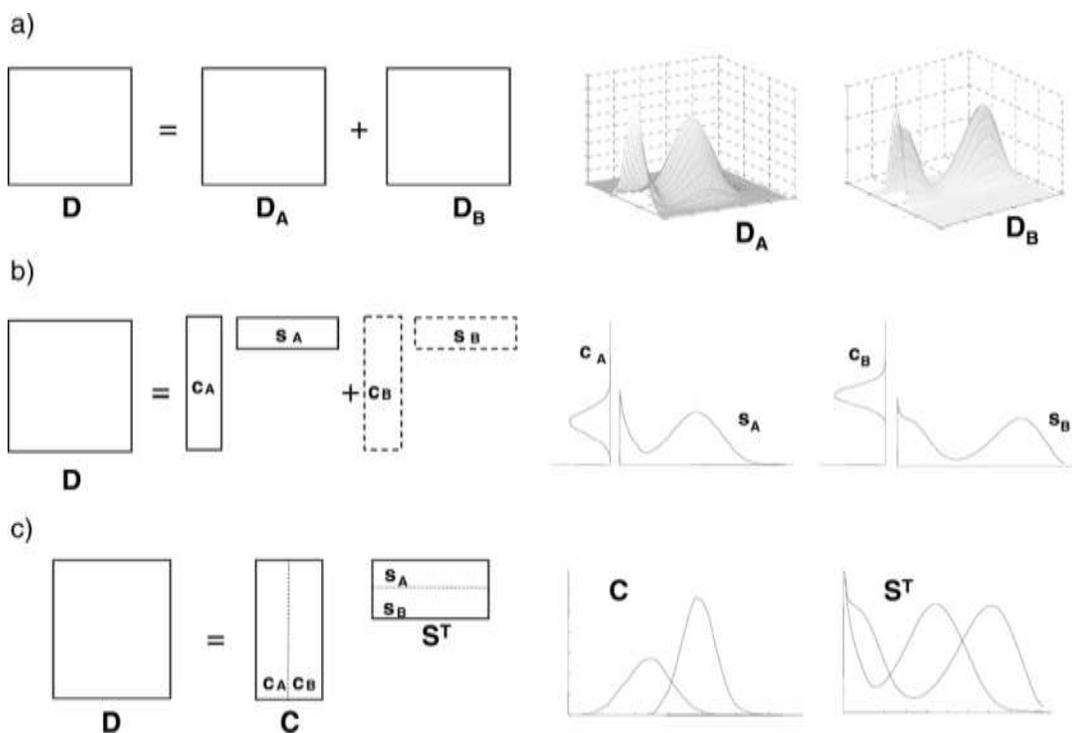
Um exemplo de aplicação seria um sistema cromatográfico constituído por dois componentes com detecção espectrofotométrica por sistema de arranjo de diodos. Os sistemas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Sistema de Arranjo de Diodos (*High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector* – HPLC-DAD) fornecem conjuntos de dados bidimensionais (uma matriz **D**) com duas respostas: uma relacionada aos perfis de eluição e a outra aos espectros. Neste exemplo, as linhas e as colunas da matriz de dados representam espectros e perfis de eluição, respectivamente. A **Figura 7** e **Equação 12 – 14** descrevem em detalhes as medidas e os modelos subjacentes das contribuições de espécies puras<sup>47</sup>:

$$\mathbf{D} = \mathbf{D}_A + \mathbf{D}_B \quad [12]$$

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}_A \mathbf{S}_A^T + \mathbf{C}_B \mathbf{S}_B^T \quad [13]$$

$$\mathbf{D} = \mathbf{C} \mathbf{S}^T \quad [14]$$

Assim, o sinal obtido pode ser decomposto em sinais relacionados a  $\mathbf{D}_A$  e  $\mathbf{D}_B$  puros (ver *Figura 7a* e **Equação [12]**). Cada um desses sinais,  $\mathbf{D}_i$ , é o produto de dois perfis  $\mathbf{D}_i = \mathbf{c}_i \mathbf{s}_i^T$ , onde  $\mathbf{s}_i^T$  é uma unidade de perfil de espectro puro e  $\mathbf{c}_i$  é um perfil de concentração (perfil de eluição em HPLC) que representa o peso (abundância) de um composto particular ao longo da direção da linha no conjunto de dados (ver *Figura 7b* e **Equação [13]**). Finalmente, o modelo somatório na **Equação [13]** pode ser expresso de uma forma mais compacta, agrupando todos os perfis de concentração e todos os espectros nas matrizes  $\mathbf{C}$  e  $\mathbf{S}^T$ , respectivamente (*Figura 7c* e **Equação [14]**). Esta última expressão é a forma mais comum para expressar a lei de Beer-Lambert em forma de matriz e, por extensão, o modelo MCR bilinear<sup>47</sup>.



**Figura 7** – Modelo de medidas para um sistema de dois componentes:  
 (a) Descrito como um modelo de somatória de contribuições de sinais puros;  
 (b) Descrito como um modelo de somatória de díades de perfil puro de concentração e espectro;  
 (c) Descrito como um modelo bilinear de perfis de concentração e espectros.

A resolução de curvas é voltada para as decomposições que possuem significado físico e químico e tenta encontrar as verdadeiras causas subjacentes à variação dos dados<sup>62</sup>. Para recuperar fisicamente um conjunto significativo de perfis de concentrações e espectros de espécies individuais que melhor explicam a variância dos dados observados, algumas restrições (como por exemplo não-negatividade para que os espectros e os perfis de concentração não assumam valores negativos) podem ser aplicadas<sup>47</sup>.

O estado da arte dos métodos de resolução de curvas mostra que a ambigüidade inerente à decomposição na análise de fatores de uma matriz de

dados simples pode ser apenas parcialmente superada pelo uso de restrições<sup>62</sup>.

Lawton e Sylvestre<sup>66</sup> foram os primeiros autores a demonstrar que, sob restrições de aditividade linear e não-negatividade, um pequeno número de soluções possíveis é estimado analisando-se uma matriz de dados simples. O método foi testado e aprovado para uma mistura de dois componentes, e mais tarde o teste foi feito para 3 componentes por Borgen e Kowalski<sup>67</sup>.

Desde os primeiros estudos em resolução de curvas, a seletividade tem sido um dos aspectos mais relevantes a serem considerados na recuperação de soluções verdadeiras. Um ponto importante no uso de seletividade está no fato de que a matriz original pode ser subdividida em duas matrizes menores, reduzindo assim a complexidade da mistura. Nos intervalos de regiões (janelas) onde o posto local da matriz está perto da unidade, a ambigüidade relacionada à decomposição na análise de fatores é completamente resolvida. Dessa forma, a detecção dessas regiões e o uso da seletividade são de grande importância para a resolução dos problemas em MCR<sup>62</sup>.

Os métodos de resolução de curvas se utilizam de aproximações que podem ser divididas em dois grupos: iterativas e não-iterativas. Exemplos de aproximações iterativas comuns são análise de fatores de alvo iterativo (*Iterative Target Factor Analysis – ITTFA*<sup>68</sup>), SIMPLISMA<sup>50,57,58</sup> e Análise de Fatores Evolucionários (*Evolving Factors Analysis – EFA*<sup>64,65</sup>). Em todos estes casos uma otimização por ALS é realizada para melhorar as estimativas iniciais em uma das duas ordens (por exemplo, tempo ou perfil espectral) e calcular a combinação dos perfis em duas ordens que melhor descrevam a variância dos dados. As duas formas de aproximações serão discutidas com mais detalhes mais adiante.

Além das restrições previamente mencionadas, dadas pela aproximação de Lawton e Sylvestre, outras restrições gerais como uni-modalidade e fechamento (*closure*) são propostas. Para o caso das aproximações não-iterativas as idéias de aniquilação de posto (solucionar a deficiência do posto: refere-se à diminuição do posto da matriz quando se extrai a contribuição um ou diversos componentes possuem) e seletividade são usadas. Exemplos de métodos de resolução de curvas não-iterativos são análise de fatores evolucionários com aniquilação de posto (do inglês *Rank Annihilation Evolving Factor Analysis* – RAEFA<sup>69</sup>), análise de fatores por janelas (*Window Factor Analysis* – WFA<sup>70,71</sup>) e Projeções Latentes Evolutivas Heurísticas (*Heuristic Evolving Latent Projections* – HELP<sup>62,72</sup>).

A utilização das informações de seletividade e das restrições diminui consideravelmente o conjunto de soluções possíveis na decomposição utilizando a resolução de curvas e eventualmente fornece solução correta. Contudo, se uma matriz de dados simples é analisada, não há garantias de que as soluções verdadeiras são obtidas para um caso geral. Em particular, quando não há seletividade nas duas ordens de nenhum dos componentes da mistura, não há garantia de que as soluções corretas serão recuperadas<sup>62</sup>.

#### **4.5.1 –Análise Exploratória em MCR<sup>47</sup>**

MCR é, por definição, um modelo-flexível (*soft-modeling*) cujo foco está na descrição da evolução das medidas experimentais multicomponentes através das contribuições dos seus componentes puros. Estes modelos baseiam-se no uso de uma família de técnicas computacionais e estatísticas para o isolamento de fontes de variação em conjuntos de dados experimentais<sup>73</sup>.

Dessa forma apenas a matriz **D** das medidas é necessária para executar a análise. Todavia, a exploração dos conjuntos de dados pode fornecer informações sobre o número e a evolução dos componentes ou na forma das estimativas iniciais de concentração ou perfis de resposta. Esta informação prévia pode servir de orientação no processo de resolução e melhorar significativamente os resultados finais obtidos. As ferramentas quimiométricas de resolução-orientada mais utilizadas pertencem à família dos métodos de análise de posto local e procedimentos para a seleção de variáveis puras.

Normalmente, os métodos para análise de posto local executam o PCA repetidamente em pequenas partes do conjunto de dados (as chamadas janelas de linhas ou colunas) com o objetivo de mostrar como o número e a distribuição dos componentes evoluem ao longo do conjunto de dados. O desenho dessas janelas, aumentando gradualmente de tamanho ou com tamanho fixo, movendo-se ao longo do conjunto de dados e a forma de apresentar os resultados obtidos em toda a janela executada com PCA determina a informação final obtida. Estes métodos são particularmente relevantes no estudo de processos, onde os perfis de concentração dos diferentes componentes evoluem de forma sutil e, freqüentemente, seguindo um padrão seqüencial, ou seja, o primeiro componente emergente é o primeiro decadente e assim por diante. Utilizando janelas que aumentam gradualmente, imitando o andamento progressivo (passo a passo) de um processo, a evolução do número de componentes significativos pode indicar o estágio do processo no qual os diferentes componentes aparecem e desaparecem. Em processos seqüenciais, o próprio uso dessa informação pode fornecer a janela de concentração, ou seja, as linhas do conjunto de dados (intervalo variável do processo) onde um componente em particular está presente, e aproximar os perfis de concentração dos diferentes componentes. A Análise de Fatores Evolu-

cionários<sup>64,65</sup> (EFA) foi o método gerador para os processos de análise de posto local, do qual se derivam vários algoritmos. As modificações realizadas são orientadas no sentido de confirmar a evolução seqüencial dos componentes nos processos desconhecidos, para melhorar a definição da janela de concentração ou para superar problemas relacionados a análises de processos com deficiência de posto.

Métodos de seleção de variáveis puras encontram os perfis da linha ou da coluna mais representativos para os diferentes componentes no conjunto de dados. A maioria desses métodos ajuda indiretamente a determinar o número de componentes no conjunto de dados e, quando as condições de seletividade são favoráveis, os perfis de linha ou coluna obtidos podem ser diretamente associados com a concentração pura ou perfis de resposta, e a resolução do sistema pode ser alcançada. Alguns desses procedimentos trabalham no espaço abstrato das componentes principais, enquanto outros usam o espaço das medidas reais. Os últimos são mais comumente utilizados e, entre eles, SIMPLISMA, a aproximação pioneira, ainda é a mais popular. Modificações recentes do SIMPLISMA implicam no uso combinado dos dados brutos e da segunda derivada para uma melhor seleção de variáveis e o uso do ângulo máximo entre os perfis como critério de seleção em metodologias derivadas, como o cálculo do ângulo máximo gradual (*Stepwise Maximum Angle Calculations – SMAC*<sup>50</sup>). Métodos de seleção de variáveis puras desempenham um papel importante em conjuntos de dados onde a direção de um processo seqüencial é perdida, uma vez que o desempenho dessas aproximações não é afetado pela falta de ordenação na direção das linhas ou colunas. Este fato explica porque o SIMPLISMA encontra uma aplicação extensiva em dados de imagens espectroscópicas<sup>74,75</sup> ou ambientais<sup>76</sup>.

#### 4.5.2 – Aproximações Não-Iterativas

A maioria dos métodos de resolução não-iterativos depende da combinação de informações de pequenas seções de conjuntos de dados (subespaços), construídos a partir de informações sobre o posto global ou local, para obter os perfis dos componentes puros. Estes subespaços podem ser janelas de concentração ou regiões da matriz de dados que detém propriedades particulares (presença ou ausência de componentes particulares). Em muitos métodos não-iterativos, os perfis de  $\mathbf{C}$  ou  $\mathbf{S}$  são recuperados um por vez e a matriz emparelhada ( $\mathbf{S}$  ou  $\mathbf{C}$ , respectivamente) é obtida posteriormente através de um passo simples de quadrados mínimos, de acordo com o modelo da *Equação 14*.

A Análise de Fatores por Janelas (WFA<sup>70,71</sup>), Análise de Fatores por Sub-janelas (*Subwindow Factor Analysis* – SFA<sup>77</sup>), ou Projeções Latentes Evolutivas Heurísticas (HELP<sup>62,72</sup>) estão entre as primeiras e mais significativas aproximações dentro desta categoria. A WFA recupera o perfil de concentração de cada componente usando o conjunto de dados originais e uma *janela de concentração zero* (zonas da matriz de dados onde concentração de um determinado componente é igual a zero, ou seja, onde não está presente o analito de interesse) do componente a ser resolvido, ou seja, todas as linhas fora a da janela de concentração. Com essa informação, um vetor representando a variação espectral do componente de interesse não correlacionado a todos os outros componentes é obtido. Este vetor, combinado apropriadamente com o conjunto de dados originais, produz o perfil de concentração procurado. A SFA recupera o perfil de resposta pura de cada componente. O conhecimento da janela de concentração é usado de uma forma que cada espectro puro é calculado como a intersecção de dois subespaços com somente o composto a ser resolvido em comum. HELP recupera, uma

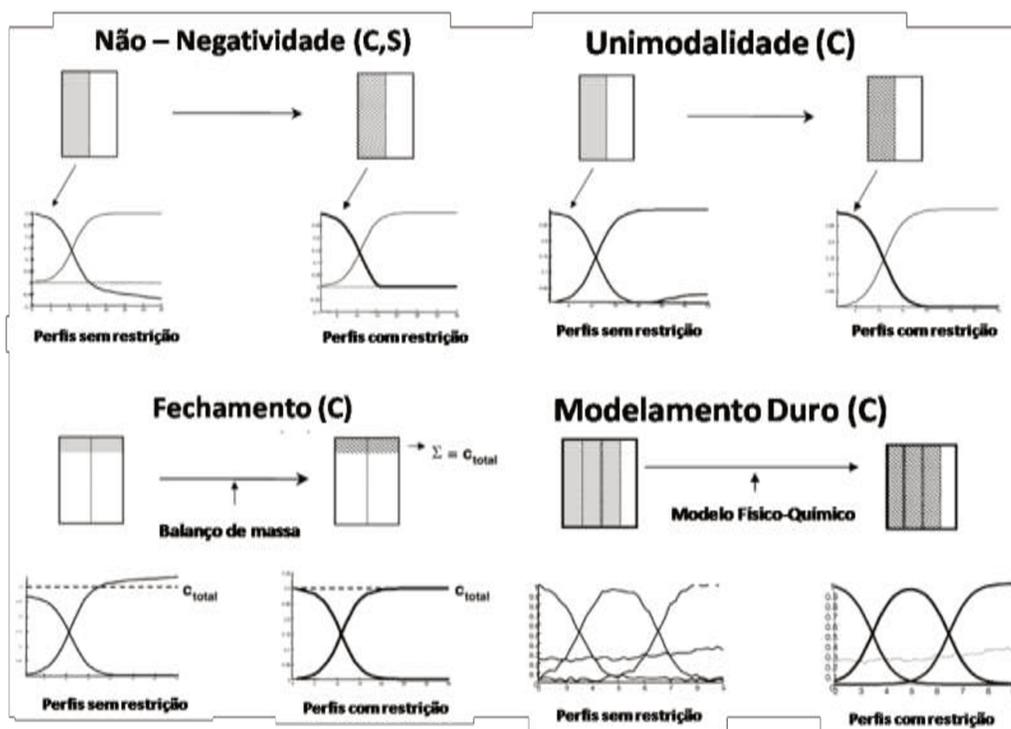
de cada vez, tanto o perfil de concentração quanto o espectro para cada componente. *O início se dá ao encontrar a região de concentração do componente a ser resolvido.* Esta região fornece diretamente o espectro do componente e o perfil de concentração pode ser recuperado utilizando-se apropriadamente a *região seletiva* e a janela de concentração zero. A matriz é reduzida pela subtração da contribuição do sinal do componente resolvido, o que ajuda a encontrar novas regiões seletivas para outros componentes na matriz reduzida que não são apresentadas no conjunto de dados originais.

Os algoritmos mais recentes são usualmente evoluções de aproximações geradoras, como Resolução de Projeções Ortogonais (*Orthogonal Projection Resolution – OPR*), derivado de WFA<sup>78</sup> ou Análise de Vetores Paralelos (*Parallel Vector Analysis – PVA*), derivada de SFA<sup>79</sup>. A partir das breves descrições dos métodos acima, nota-se facilmente que o ponto chave é a correta definição da janela de concentração. Em termos de aplicabilidade, a principal limitação destes métodos vem do fato de que os conjuntos de dados necessitam ter uma *direção seqüencial de concentração* (a concentração deve variar de forma ordenada) onde a janela de concentração possa ser razoavelmente bem estabelecida, ou seja, o campo de aplicação é restrito a análise de sistemas evolucionários (processos, cromatografia). Todavia, quando o conjunto de dados apresenta as propriedades adequadas na sobreposição tanto da concentração quanto dos espectros do componente<sup>78</sup>, estes métodos fornecem soluções únicas e corretas. Uma vantagem adicional também está relacionada com a recuperação de um perfil de concentração ou espectro de cada vez, tornando esses métodos úteis quando a meta é obter apenas informação parcial do sistema, como os espectros puros ou os perfis de concentração puros de certos componentes.

### 4.5.3 – Aproximações Iterativas

As aproximações de resolução iterativa são consideradas como os métodos de MCR mais populares devido à sua flexibilidade para lidar com vários tipos de arranjos de dados e problemas químicos, além da habilidade para acomodar informações externas no processo de resolução. Todas elas dividem um passo comum na otimização (das matrizes  $\mathbf{C}$  e/ou  $\mathbf{S}^T$ ) que inicia com as estimativas iniciais de  $\mathbf{C}$  e  $\mathbf{S}^T$  que evoluem dando perfis com formas quimicamente significativas, adaptadas de acordo com as informações químicas ou matemáticas incluídas no processo de otimização sob as formas de restrições. A análise de fatores de alvo iterativo (*Iterative Target Factor Analysis* –ITTFA<sup>80</sup>) e a Resolução Multivariada de Curvas com os Mínimos Quadrados Alternados (MCR-ALS – Multivariate Curve Resolution with Alternating Least-Squares<sup>52,81</sup>) foram as primeiras aproximações, embora outras metodologias com diferentes princípios, como a Análise de resolução de fatores (*Resolving Factor Analysis* – RFA<sup>82</sup>) tenham aparecido posteriormente. Melhoramentos gerais aplicáveis à maioria dos métodos iterativos acima estão ligados as explicações apresentadas nos próximos parágrafos.

Restrições, definidas como propriedades químicas ou matemáticas que devem manter os perfis resolvidos, continuam evoluindo e sendo pesquisadas. As melhorias obtidas até recentemente incluem a definição de novos tipos de restrições e progressos em suas implementações, em uma tentativa de modificar os perfis da forma mais harmoniosa possível. Em adição as restrições clássicas de não-negatividade, unimodalidade, fechamento (*closure*) e restrições de igualdade ligadas à seletividade ou ao uso de perfis conhecidos, a contribuição mais notável tem sido a introdução de restrições de modelagem dura (*hard-modeling*) A **Figura 8** apresenta de forma resumida o funcionamento de algumas das restrições mais utilizadas.



**Figura 8** – Restrições comumente utilizadas em aproximações iterativas.

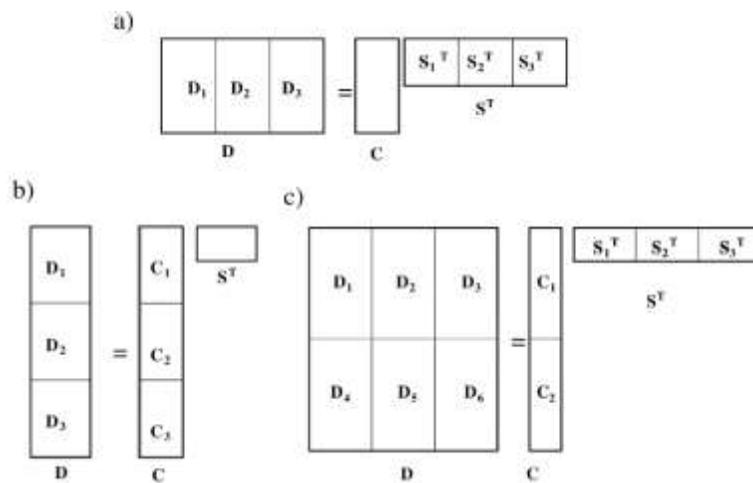
Os sistemas podem ser definidos como de modelagem dura (*hard-modeling*) ou de modelagem flexível (*soft-modeling*). Os modelos duros ajustam dados químicos de acordo com modelos rígidos construídos a partir de expressões matemáticas que podem definir um comportamento físico-químico ou, num sentido geral, a forma de um sinal ou um perfil. Para fazer isso, toda a variação do conjunto de dados deve ser descrita por aquele modelo particular. Hoje em dia, os modelos duros têm sido introduzidos em MCR como restrições para atuar de uma forma parcial ou total na concentração ou perfis de resposta. O principal benefício é que esses modelos podem ser utilizados para descrever apenas uma parte da variação do conjunto de dados (por exemplo a evolução de alguns componentes) enquanto o resto do

sistema (os componentes remanescentes) podem ser modelados por modelos flexíveis. Estas restrições permitem a modelagem dura dos processos na presença de interferentes (modelados por modelos flexíveis) além do cálculo de parâmetros físico-químicos como resultados adicionais do MCR. Devido à eficácia desse tipo de restrição, a ambigüidade nos perfis resolvidos é suprimida ou significativamente minimizada. Assim as chances para resolver perfis de concentração muito sobrepostos são substancialmente aumentadas. Exemplos de restrições de modelos duros incluem a incorporação de modelos cinéticos<sup>83</sup>, modelos enzimáticos<sup>84</sup> ou equilíbrios<sup>85</sup> nos perfis de concentração e inclusão de modelos de formas de sinais, como funções em forma de picos para medidas voltamétricas<sup>86</sup> ou decaimentos de curvas exponenciais em dados de RMN-DOSY<sup>87</sup>.

Como mostra a **Figura 8**, os perfis têm sua forma modificada pela ação das restrições. Quanto mais difícil é a modificação, mais o perfil se distancia da forma que ele tem na realidade. Quando as correções por restrições são muito abruptas, podem aparecer diferenças no processo de otimização e o efeito da restrição pode não ser tão positivo quanto se espera. A implementação das restrições deve incorporar uma forma harmoniosa para modificar a forma do perfil e permitir certa flexibilidade no preenchimento das condições para levar em consideração o ruído experimental ou para efeitos instrumentais nas medidas. Um bom ajuste tem sido alcançado pela implementação de diferentes níveis de tolerância e aplicação de funções de penalidade. Estas melhorias têm sido particularmente importantes em sistemas complexos, onde perturbações na forma natural dos perfis podem afetar mais significativamente a convergência e a aplicação de restrições de igualdade (por exemplo restrições que incorporam informações em uma forma de perfil parcial ou totalmente conhecido), devido a pequenas diferenças inevitáveis

entre a forma real do perfil e a referência conhecida. No entanto, aproximações clássicas de substituição que também permitem níveis variáveis de tolerância são interessantes pela sua tendência em permitir maior flexibilidade na combinação das restrições aplicadas e na escolha dos perfis ou direções a serem consideradas. Além disso, sua aplicação em sistemas que obedecem naturalmente as restrições impostas também levam à um melhor ajuste quando a convergência é alcançada.

Um grande marco em MCR foi a extensão desses métodos para além dos conjuntos de dados bidimensionais. Problemas clássicos de ambigüidades em MCR são reduzidos significativamente com a possibilidade de analisar estruturas mais ricas em informações (dados tridimensionais ou matrizes de dados aumentadas pelas linhas e/ou colunas – ver **Figura 9**).



**Figura 9** – Modelo bilinear de MCR aumentado (a) pelas linhas, (b) pelas colunas e (c) pelas linhas e pelas colunas ao mesmo tempo.

A fusão dos dados ou análises multi-conjuntos são nomes recentemente formulados para medidas de conjuntos provenientes de um ou mais experimentos monitorados por diferentes técnicas, porém, bem antes desses no-

mes serem apresentados, o MCR já tinha sido aplicado a estes e a outros tipos de arranjos de dados fundidos<sup>47</sup>. A fusão de dados facilita frequentemente a interpretação de dados de natureza hifenada ou multi-modo dos instrumentos atualmente disponíveis (acoplamento de vários sistemas de detecção ou a aquisição de várias respostas em um tempo). Além desses dados, outros tipos de arranjos aumentados de dados, como multi-batelas ou conjuntos de dados multi-processados, podem ser agrupados produzindo resultados igualmente interessantes. Tendo em mente a idéia básica de resolução, por exemplo, a recuperação da informação dos componentes puros a partir de um conjunto de dados não se deve esquecer que muitos métodos multi-modo, como PARAFAC<sup>88</sup>, PARAFAC2<sup>89</sup>, TUCKER<sup>90</sup>, tem sido frequentemente usados com o propósito de resolução, mesmo não possuindo a mesma denominação clássica de MCR. Quando MCR estendido ou métodos multi-modo são aplicados com propósito de resolução, podem ser obtidas informações quantitativas relacionadas ao conjunto de dados. A quantificação por MCR apresenta vantagens com respeito a aproximações clássicas de calibração multivariada, não necessitando nem do conhecimento nem da inclusão de interferentes no modelo de calibração, além da possibilidade de se utilizar um número reduzido de padrões (até mesmo um). O uso estendido de MCR com propósitos quantitativos tem promovido estudos nos parâmetros típicos de qualidade de quantificação e também a proposição de novas aproximações que usam perfis de concentração resolvidos por MCR como entrada em métodos de calibração bi ou multi-modo em vez dos conjuntos de dados brutos.

#### 4.5.4 – Matrizes aumentadas<sup>63</sup>

Os espectros muitas vezes podem ser dados ruidosos, o que dificulta a determinação do posto de uma matriz composta por este tipo de informação (espectral). Como resultado, a estimativa do posto a partir da decomposição em valores singulares (*Singular Value Decomposition* – SVD) não é uma tarefa trivial. Efetivamente, é necessário distinguir entre as componentes significativas, ou seja, os auto vetores com grande variância e aqueles correspondentes ao ruído. Na prática, uma matriz de dados é considerada de posto completo se o posto estimado for igual ao número de espécies químicas presentes, considerando-se este número conhecido. Além disso, existem diversas situações experimentais em que a matriz pode ter deficiência de posto. Isso significa que este posto estimado é diferente do número de espécies químicas presentes. Este seria o caso de um processo onde vários compostos têm sinais colineares ou perfis de concentração idênticos, como é o caso, por exemplo, de espécies em coeluição, que dificilmente podem ser distinguidas. Há mais dificuldades sutis; a deficiência de posto pode ser causada por problemas de linha de base quando os dados são centrados na média.

Matrizes aumentadas podem ser definidas como uma forma de junção entre duas ou mais matrizes de dados bilineares de sistemas diferentes, que partilham de alguns ou de todos os seus compostos em uma terceira direção, que representa a diferença qualitativa ou quantitativa entre as amostras. Analisar simultaneamente diferentes misturas dos mesmos compostos, em diferentes condições físicas ou químicas, como pH ou tempo, é uma maneira inteligente e confiável para extrair informações sobre as individualidades dos sistemas. Espectros puros, relacionados com a ordem comum do conjunto de dados aumentados pelas colunas, são considerados invariantes e a matriz desdobrada **C** permite aos perfis de cada composto na direção da concentra-

ção, serem diferentes para cada matriz (ver *Figura 9*). Como o posto pode ser diretamente estimado por SVD em matrizes aumentadas, a comparação dos resultados obtidos em diferentes matrizes permite eventualmente detectar a deficiência de posto. Além disso, escolhendo a matriz a ser acrescentada à matriz de interesse, como por exemplo a fusão desta última com padrões, fornece uma maneira de quebrar a deficiência de posto, permitindo a detecção de qualquer contribuição química no conjunto de dados aumentados. Esta aproximação deve ser coerente com outras informações prévias sobre o sistema, em especial a correspondência entre as espécies em cada matriz unitária. Naturalmente, a estimativa do posto só faz sentido se houver uma ordem inerente aos dados do sistema, normalmente uma ordem na aquisição dos espectros que compõem a matriz. A partir da estimativa confiável do número de contribuições e os perfis da concentração inicial, MCR-ALS realiza uma otimização por mínimos quadrados alternados das matrizes de concentração e espectros sob restrições, ligando fatores abstratos com fontes de variações químicas.

#### **4.5.5 – Ambiguidades no MCR**

Embora o MCR possa apresentar resultados muito satisfatórios em medidas experimentais brutas, os perfis recuperados podem ser afetados pelas intensidades das ambigüidades e ou das rotações. Voltando ao modelo de MCR:

$$\mathbf{D} = \mathbf{CS}^T$$

A equação pode ser escrita como:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{T}\mathbf{T}^{-1}\mathbf{S}^T$$

onde  $\mathbf{T}$  é uma matriz de transformação, fornecendo:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T \quad \text{onde } \mathbf{C} = \mathbf{C}\mathbf{T} \text{ e } \mathbf{S}^T = \mathbf{T}^{-1}\mathbf{S}^T$$

Esta é a formulação matemática da ambigüidade rotacional, a qual significa que podemos obter a mesma solução otimizada na descrição do conjunto de dados  $\mathbf{D}$  usando os conjuntos de perfis ( $\mathbf{C}$  e  $\mathbf{S}$ ) com formas diferentes dos verdadeiros ( $\mathbf{C}$  e  $\mathbf{S}$ ). Mesmo na ausência de ambigüidade rotacional, a *Equação 14* pode ser escrita como:

$$\mathbf{D} = \sum_{i=1}^n \left( \frac{1}{k_i} c_i \right) (k_i s_i^T) \quad [15]$$

Isso significa que a díade de perfis resolvidos ( $c_i, s_i$ ) para cada componente puro pode apresentar perfis como os procurados, no entanto  $k_i$  vezes menores,  $(1/k_i)c_i$ , ou maiores,  $k_i s_i^T$ . A extensão da ambigüidade pode ser significativamente diminuída ou até suprimida pelo uso de restrições. Quanto mais restrito é um sistema, menos possibilidades de combinações de perfis podem preencher as condições de formas e intensidade requeridas, ajustando de forma otimizada o conjunto de dados  $\mathbf{D}$ .

A ambigüidade tem sido um dos maiores problemas do MCR. Somente recentemente tem havido tentativas sólidas para avaliar a extensão desse fenômeno nos perfis resolvidos de MCR<sup>91,92</sup>. A ambigüidade é dependente dos componentes e dos perfis e, dentro do mesmo conjunto de dados, é pos-

sível encontrar componentes ou perfis com falta de ambigüidade e outros que a possuam em uma grande extensão de ambigüidade. Algumas das últimas tendências optam por determinar cada componente separadamente com os limites máximo e mínimo das bandas de soluções mais adequadas para a díade de perfis resolvidos. A idéia geral é encontrar os limites das díades dos perfis que fornecem as contribuições máximas e mínimas dos componentes do sinal global medido. Os limites máximo e mínimo devem corresponder aos perfis que respeitam as restrições e devem ser parte do conjunto global de perfis incluindo todos os componentes e reproduzindo o conjunto de dados com o ajuste ótimo. Todas essas condições são estabelecidas sob diferentes formas de problemas de otimização, e essas abordagens são válidas para conjuntos de dados com número de componentes ilimitados.

Outras metodologias questionam onde os limites mínimos e máximos realmente aproximam todos os perfis viáveis possíveis e, se definidos como máximo e mínimo da contribuição do sinal, se eles realmente representam as soluções extremas. Em lugar de limites, estas aproximações alternativas mostram as bandas ou a área somando todas as soluções viáveis usando ferramentas visuais ou conceitos de geometria para esse propósito. No entanto, sua aplicabilidade está restrita até o momento para sistemas com 2 ou 3 componentes.

De um modo geral, independente da quantidade ou da falta de ambigüidade nas soluções, uma fonte comum de incerteza nos resultados vem do erro nas medidas experimentais. Encontrar expressões analíticas que possam ajudar na avaliação da propagação do erro nos perfis resolvidos por MCR é extremamente difícil, mas existem estratégias para obter estimativas aproximadas do erro ligado aos resultados de resolução<sup>93</sup>. A maioria dessas estratégias tem como foco a obtenção das estimativas dos erros como média de

um grande número de medidas simuladas ou repetições reais. Simulações de repetições podem incluir: resoluções repetidas de matrizes de dados com algumas linhas ou colunas perdidas ou até com matrizes inteiras perdidas<sup>94</sup>, resoluções de conjuntos de dados particulares depois de terem sido adicionados ruídos às medidas (métodos de adição de ruídos)<sup>95</sup> ou construção de replicatas adicionando ruído a um conjunto de dados simulados livre de ruídos ou reproduzidos (aproximação de Monte Carlo)<sup>93</sup>. Apesar da incerteza induzida nos perfis resolvidos por ambigüidade e por efeitos de ruído surgirem a partir de fontes distintas, devendo assim ser estimados separadamente, há uma pequena diferença entre os dois quando o ruído se torna muito amplo devido à ambigüidade induzida pela definição errada da janela de espectros e concentração.

#### **4.5.6 – Aplicações**

Em geral observa-se que o MCR é uma ferramenta que pode auxiliar no tratamento e interpretação de dados provenientes de análises mais simples, tais como fotodegradações monitoradas por espectrofotometria na região UV-Vis<sup>96,97</sup>, como análises de dados mais complexos (provenientes de equipamentos hifenados).

O MCR foi inicialmente utilizado para análises de processos<sup>98,99</sup> ou, usando uma expressão mais geral, para sistemas evolutivos multicomponentes. Exemplos típicos de MCR variam desde o monitoramento de reação em escala de laboratório<sup>100</sup> ou em escala industrial<sup>98,101</sup> com muitos tipos de equipamentos hifenados<sup>99,102</sup>, como análises por cromatografia<sup>103,104</sup> e análises por injeção em fluxo<sup>105,106</sup>. Estas aplicações ainda constituem os campos mais comuns de uso de MCR. Com o progresso em instrumentação analítica

os processos tendem a ser monitorados por estratégias multitécnicas<sup>98</sup> (vindo de instrumentos multi-respostas ou de medidas separadas) obtendo-se assim conjuntos de dados multi-batelados ou de muitos experimentos. Estas estratégias têm melhorado grandemente o entendimento de processos complexos, como aqueles envolvendo biomoléculas<sup>86,107</sup>, os quais podem incluir eventos acontecendo em níveis muito diferentes e que necessitam de um monitoramento de várias técnicas específicas diferentes. O monitoramento de processos tem atualmente sido realizado por medidas bidimensionais, tais como RMN-2D<sup>108</sup>, RMN-DOSY-2D<sup>87</sup>, com diversos tipos de medidas eletroquímicas<sup>109</sup> e espectroscopias rápidas<sup>110</sup>.

A espectroscopia de imagem<sup>75,111</sup> tem emergido na última década como uma medida experimental muito poderosa devido à informação espacialmente dependente na composição da amostra. Compostos que se encontram na superfície podem ser monitorados e a meta da análise dos dados é fornecer mapas confiáveis de distribuição e caracterização dos compostos puros na imagem. Esse tipo de problema pode ser resolvido com grande êxito com a aplicação de MCR, desde que a variação dos dados da imagem responda ao modelo bilinear que descreve qualquer espectro em um pixel na imagem como combinação linear da contribuição do sinal de seus componentes. Utilizar um cubo de dados de imagem ( $x \times y \times z$ ) adequado para análise por MCR requer somente o desdobramento do cubo em uma tabela de dados que contenha todos os espectros dos pixels. Depois da análise de resolução, os espectros puros dos constituintes são recuperados bem como seus mapas de distribuição puros relacionados, uma vez que os perfis em  $\mathbf{C}$  são dobrados de volta para recuperar a estrutura espacial da imagem original. A Resolução de imagem por MCR tem ganhado relevância durante os últimos anos<sup>112,113</sup> e os esforços estão agora focados no uso da informação espacial,

vinda de métodos exploratórios baseados na análise de posto local das áreas da imagem ou da aplicação de ferramentas de classificação de pixels, sob a forma de restrições específicas para imagem.

Dados biológicos também fazem parte de um campo relevante de aplicação de MCR. Esse método tem sido aplicado para a análise e interpretação de processos biológicos, tais como o desdobramento de proteínas<sup>114,115</sup> ou interações de drogas com o DNA<sup>116</sup>. Para sistemas biológicos onde nenhum modelo físico-químico geral está disponível, o MCR encontra uma nova área de desafio no tratamento de dados ômicos (genômica, proteômica, metabolômica e afins).

## **5. Efeito da Radiação Ultravioleta**

## 5.1 – Plantas

Para os experimentos, foram utilizadas plantas da família *Malvaceae* denominadas *Hibiscus acetosella*, *Hibiscus Sabdariffa* e *Malvaviscus Penduliflorus* como fonte de antocianinas. Os hibiscos foram coletados no Jardim Experimental do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina.

### 5.1.1- Características das Plantas

#### 5.1.1.1-*Hibiscus Acetosella*



**Figura 10** – Fotos de plantas da espécie *Hibiscus acetosella*.

- Nome Popular: Falso Roselle, Hibisco
- Família: Malvaceae
- Gênero: *Hibiscus*

- Espécie: *Hibiscus acetosella* Welw. ex Ficus
- Herbário onde foi depositada a exsicata: Herbário da Universidade Estadual de Londrina (FUEL)
- Número de registro da exsicata: FUEL 33816
- Origem: Londrina
- Local da coleta: jardim da Universidade Estadual de Londrina

#### 5.1.1.2-*Hibiscus Sabdariffa*



**Figura 11** – Fotos de plantas da espécie *Hibiscus sabdariffa*.

- Nome Popular: Roselle, Vinagreiro, Azeda, Hibisco
- Família: Malvaceae
- Gênero: *Hibiscus*
- Espécie: *Hibiscus Sabdariffa* L.
- Herbário onde foi depositada a exsicata: Herbário da Universidade Estadual de Londrina (FUEL)
- Número de registro da exsicata: FUEL 37275

- Origem: Londrina
- Local da coleta: jardim da Universidade Estadual de Londrina

### 5.1.1.3- *Malvaviscus penduliflorus* DC



*Figura 12* – Fotos de plantas da espécie *Malvaviscus penduliflorus*.

- Nome Popular: Chapéu de Turco, Dormideira.
- Família: Malvaceae
- Gênero: *Malvaviscus*
- Espécie: *Malvaviscus penduliflorus* DC.
- Herbário onde foi depositada a exsicata: Herbário da Universidade Estadual de Londrina (FUEL)
- Número de registro da exsicata: FUEL 33818
- Origem: Londrina
- Local da coleta: jardim da Universidade Estadual de Londrina

### **5.1.2 – Coleta**

As plantas foram coletadas no jardim da Universidade Estadual de Londrina, armazenadas a 10° C por dois dias e trazidos a Campinas, onde os extratos foram preparados imediatamente após a entrega das amostras.

### **5.2 – Extração**

Após otimização da quantidade de amostra, foram preparadas as soluções estoque. Para a amostra de *Hibiscus acetosella* foram macerados 40g de cálices da flor em 250 mL de álcool etílico (PA) com HCl 0,1% (v/v) e filtrados em papel de filtro comum. Para as amostras de *Hibiscus Sabdariffa* e *Malvaviscus Penduliflorus* seguiu-se o mesmo procedimento, pesando-se 44g de cálices.

### **5.3 - Limpeza das amostras**

As soluções contendo o extrato de cálices das flores foram concentradas em rota-evaporador a 45 °C durante 1 h. Em seguida, o concentrado foi passado por uma coluna (50 x 4 cm) contendo adsorvente XAD-7 para a extração de açúcares e outras impurezas. A Coluna foi lavada com 2 litros de água ultra-pura. As soluções de arraste (Fase móvel) foram água ultra-pura e em seguida metanol, com a eluição das antocianinas sendo efetuada pela passagem de metanol.

## 5.4 – Reagentes

Foram utilizados água ultra pura, ácido clorídrico concentrado (Nuclear 36,5 –38%), ácido cítrico (Sigma C-0759), fosfato monobásico de potássio (Synth 99%), tetraborato de sódio (Ecibra 97%), Tris(hidroximetil)aminometano (Sigma T1378), cloreto de potássio (Synth), hidróxido de sódio (Nuclear, 95%). Para a retirada de açúcares e outros interferentes das amostras, foi utilizada resina não-iônica adsorvente polimérica Amberlite XAD-7 (Aldrich) e Metanol (Labcenter, HPLC/SPECTRO).

## 5.5 – Preparo das Soluções Tampão

As soluções tampão<sup>117</sup> em 13 valores de pH foram preparadas misturando-se diferentes volumes das soluções de HCl e NaOH em um volume fixo de “solução universal”. A *solução universal*<sup>117</sup> foi constituída de 50 mL de uma solução com 21,01 g/L de ácido cítrico, 13,61 g/L de fosfato monobásico de potássio, 19,07 g/L de tetraborato de sódio, 12,11 g/L de trishidroximetilaminometano e 7,46 g/L de cloreto de potássio, à qual é adicionada  $x$  ml de HCl  $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$  ou NaOH  $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ , seguido por uma diluição para 200 mL. Os valores de pH utilizados nos experimentos variaram de 1,90 até 12,42, adicionando-se quantidades diferentes de ácido ou base, dependendo do valor de pH desejado. O pH foi medido com um medidor de pH portátil e ajustado para os valores apresentados na **Tabela 1**.

**Tabela 1 - Valores de pH das soluções tampão<sup>117</sup>.**

Solução universal	pH	
	Adição de HCl 0,4M	Adição de NaOH 0,4M
	1,90	
	2,50	
{ Ácido Cítrico + Fosfato Monobásico de Potássio + Tetraborato de Sódio + Trishidroximetilaminometano + Cloreto de Potássio }	3,98	
		5,12
		6,13
		7,22
		8,12
		8,67
		9,32
		9,88
		10,80
		11,83
		12,42

### 5.6 - Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: balança analítica BOSCH modelo SAE200, Rotavapor, coluna cromatográfica (50 cm x 4 cm), lâmpada de Xenônio com emissão entre 200 e 750 nm *Ocean Optics*®, medidor de pH portátil Marte MB-10, espectrofotômetro ultravioleta-visível Agilent modelo 8453 de arranjo de diodos.

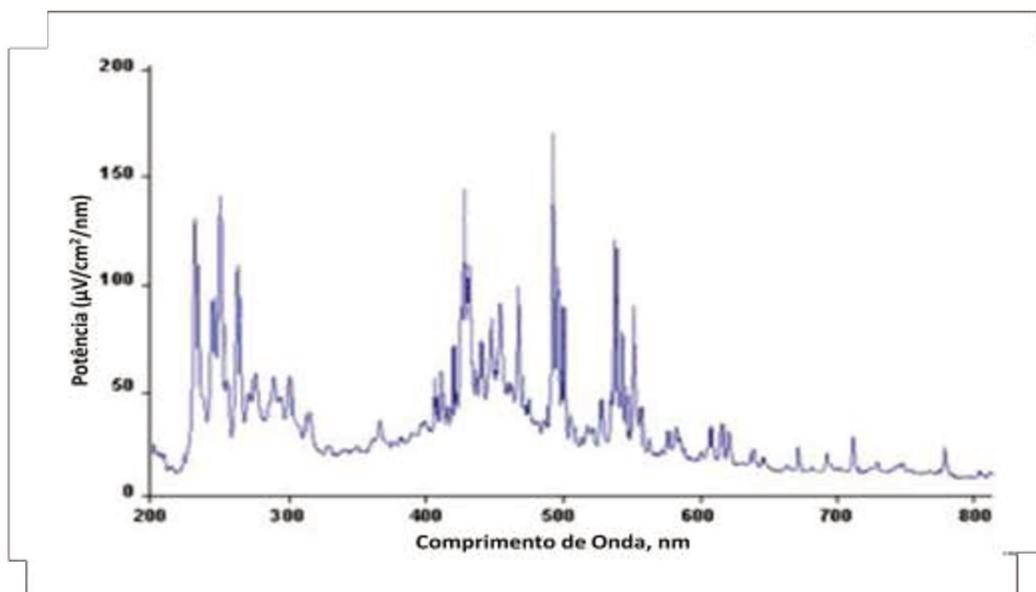
## ***5.7 – Medidas Espectrais na região UV-Vis***

Para a aquisição dos espectros do extrato de *Hibiscus acetosella*, adicionou-se 40 µL da solução estoque de hibisco em 2 mL da solução tampão dentro de uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. No caso das amostras de *Hibiscus sabdariffa*, foram adicionados 105 µL do extrato. Os volumes foram medidos com micropipetas e a solução resultante foi imediatamente monitorada após a mistura sob agitação constante.

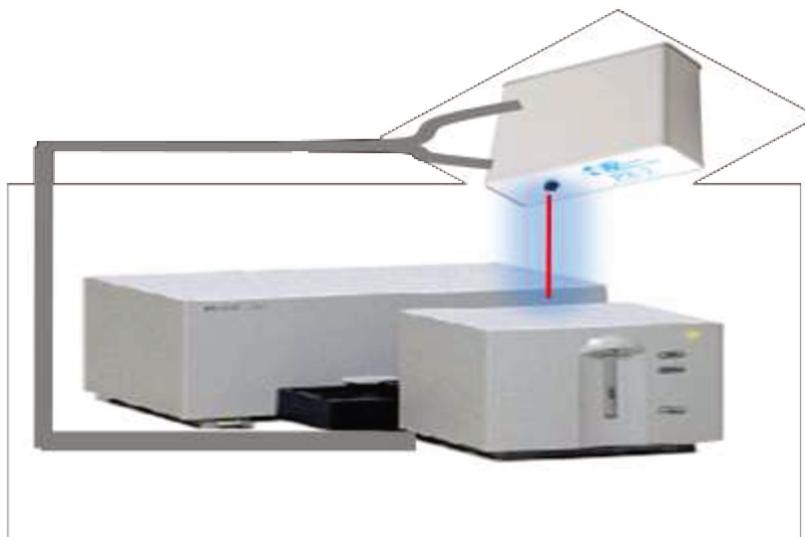
Os espectros de absorção foram registrados no intervalo de 190 a 1100 nm utilizando o espectrofotômetro Agilent UV-VIS, velocidade de agitação mantida em 800 rpm, com temperatura mantida constante em 25° C. O pH do meio foi medido no início e no final de cada análise. Este procedimento foi repetido para cada uma das soluções tampão.

### ***5.7.1 – Aparato para radiação ultravioleta***

A radiação ultravioleta foi gerada por uma lâmpada de Xenônio, emitindo radiação na região de 220 à 750 nm. A lâmpada foi utilizada como em uma fonte para emissão de radiação proveniente de um equipamento *Ocean Optics®*. O espectro da lâmpada está apresentado na **Figura 13**. O equipamento foi fixado em pedestal com garras sobre a célula contendo a amostra, de forma que a radiação incidisse diretamente sobre a solução de modo a impedir que a radiação emitida pela lâmpada não interferisse nas medidas, como mostra a **Figura 14**.



*Figura 13* – Espectro da lâmpada utilizada como fonte de radiação UV.



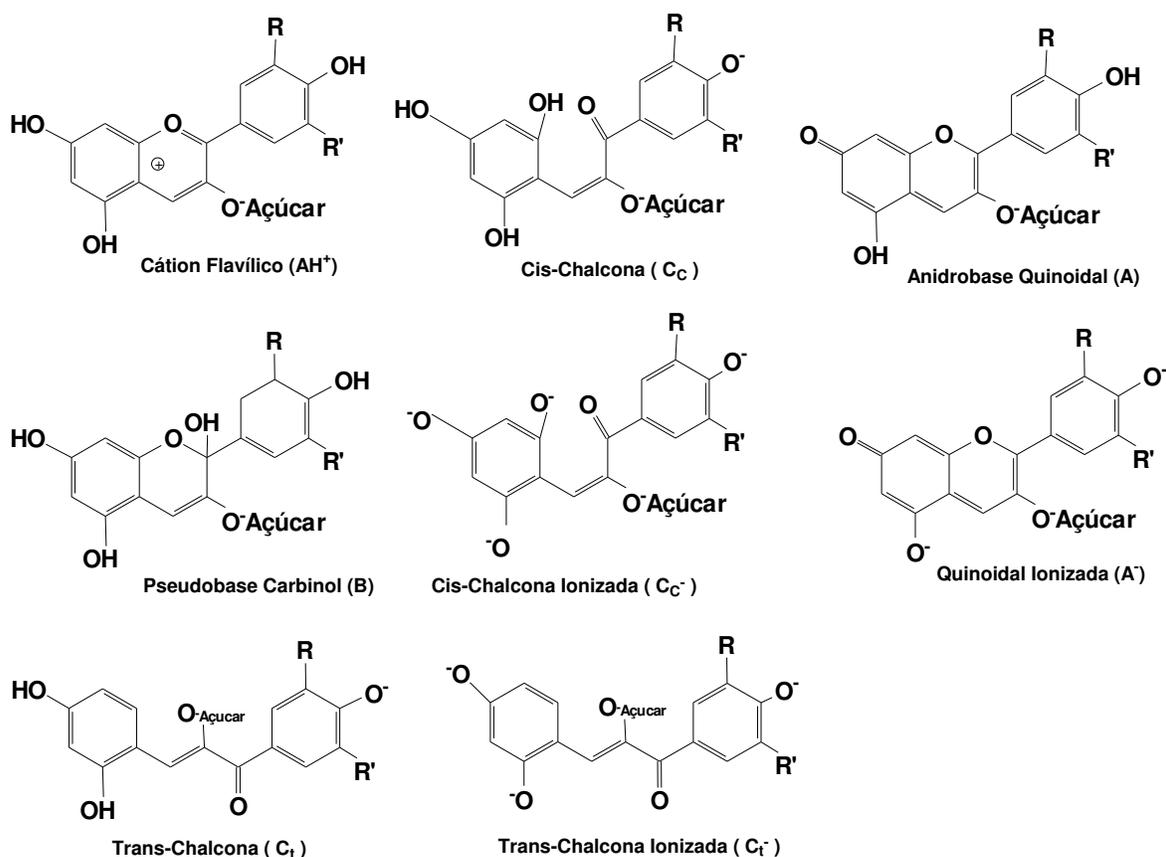
*Figura 14* – Esquema montado para incidir radiação UV sobre a amostra durante o monitoramento

## ***5.8 – Programa Computacional***

Os dados experimentais foram processados utilizando o programa MatLab 7.0 ® com aplicação das ferramentas de PLS toolbox 4.0 ® e as ferramentas para a aplicação de MCR-ALS disponibilizadas pelos Professores Doutores Romà Tauler Ferré e Anna de Juan através de sua página de internet<sup>118</sup>.

## 5.9 – Resultados e Discussão

De acordo com a literatura, as principais espécies de antocianinas encontradas desde o meio ácido até o alcalino são cátion flavílico ( $AH^+$ ), anidrobases quinoidais (A), quinoidal ionizada ( $A^-$ ), pseudobase carbinol (B), cis-chalcona ( $C_C$ ), cis-chalcona ionizada ( $C_C^-$ ), trans-chalcona ( $C_t$ ) e trans-chalcona ionizada ( $C_t^-$ ), e a forma estrutural destas espécies estão apresentadas na **Figura 15**.



**Figura 15** - Principais estruturas das antocianinas em meio aquoso: cátion flavílico ( $AH^+$ ), anidrobases quinoidais (A), quinoidal ionizada ( $A^-$ ), pseudobase carbinol (B), cis-chalcona ( $C_C$ ), cis-chalcona ionizada ( $C_C^-$ ), trans-chalcona ( $C_t$ ), trans-chalcona ionizada ( $C_t^-$ ). R1 e R2 são usualmente H, OH ou  $OCH_3$ .

### 5.9.1 – Análises de Matrizes individuais

Os extratos das plantas *Hibiscus acetosella*, *Hibiscus sabdariffa* e *Malvaviscus penduliflorus* foram monitorados no intervalo de 190 a 1100 nm. Para o tratamento quimiométrico, os conjuntos de dados foram rearranjados na forma de matrizes de 239 x 531, ou seja, 239 espectros (tempos) por 531 valores de absorvância (em diferentes comprimentos de onda), utilizando-se assim o intervalo de 220 a 750 nm. As amostras foram analisadas durante 120 minutos, medindo-se espectros a cada 30 segundos. Os espectros foram monitorados com o tempo, com e sem exposição à radiação ultravioleta. Após rearranjo dos dados, as matrizes foram comparadas utilizando-se o método MCR-ALS para a obtenção dos valores de concentração relativa, assim como os espectros dos compostos puros referentes aos componentes presentes na amostra. Para a aplicação de MCR-ALS, utilizou-se *PURE* como método de estimativa inicial dos perfis de concentração e espectro puro. No entanto, foi realizado anteriormente uma Análise de Componentes Principais (PCA) e Decomposição em Valores Singulares (SVD) para se estimar o *posto da matriz* em cada valor de pH. Os resultados obtidos para cada extrato serão discutidos a seguir. Para facilitar a leitura do texto, os dados referentes às amostras não expostas a radiação ultravioleta serão denotados com a letra S, enquanto que os referentes à exposição a esta radiação serão simbolizados pela letra D. As espécies estão relacionadas com as cores dos espectros: a presença da mesma cor em valores diferentes de pH simbolizam a presença da mesma espécie nesses diferentes meios.

### 5.9.1.1 – Influência de radiação UV em amostras de *Hibiscus Acetosella*

A *Tabela 2* apresenta o número de componentes principais necessários para explicar a variância total capturada para as matrizes relativas às amostras de *Hibiscus acetosella* sem (S) e com exposição (D) à radiação UV, em soluções tampão com diferentes valores de pH. Observou-se que, em valores de pH mais baixos, a amostra que recebeu radiação UV apresentou em média 1 componente principal a mais que a amostra monitorada sem exposição à radiação para descrever praticamente toda a variância dos dados. Em meio levemente ácido até levemente alcalino, o número de componentes principais é diferente para as amostras nas diferentes condições, indicando que a radiação deve exercer influência na composição da amostra. Em meio alcalino, a amostra apresenta aproximadamente o mesmo número de fatores na maioria dos valores de pH para as duas condições. No entanto, nem sempre o número de componentes principais de uma amostra está estritamente relacionado ao número de contribuições químicas presentes na amostra, podendo estar também relacionado ao ruído inerente às medidas, impurezas e outras causas que podem levar a necessidade de mais componentes para descrever a variância total. Isso mostra que é necessário um conhecimento químico do sistema e, em casos envolvendo matrizes de dados (sistemas químicos) mais complexas, de ferramentas computacionais que possam auxiliar na análise e interpretação do sistema em questão.

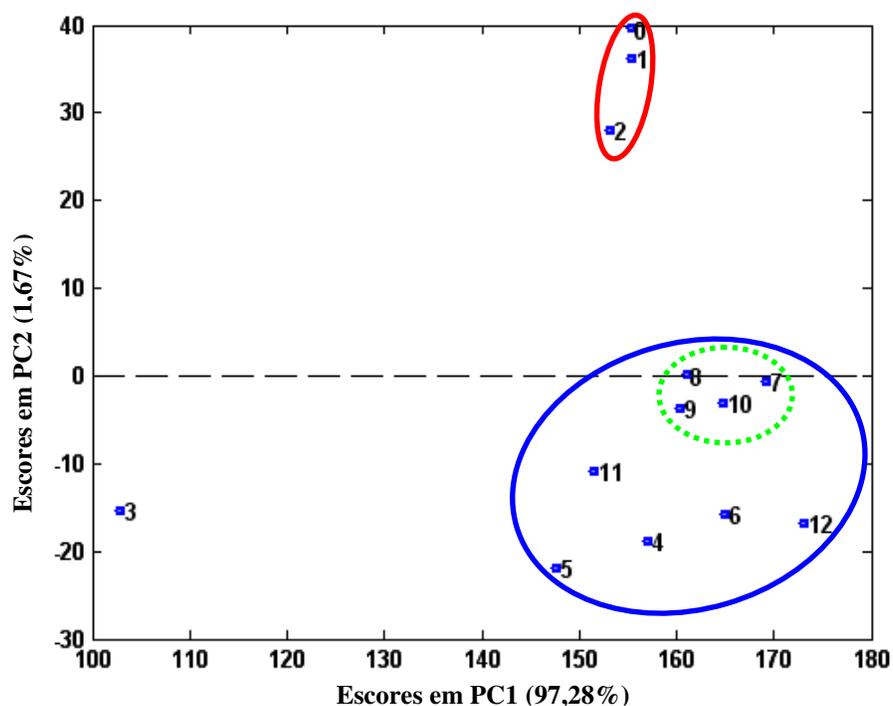
**Tabela 2** – Número de componentes principais em seus respectivos valores de pH para as amostras de *Hibiscus acetosella* sem e com exposição à radiação Ultravioleta.

Solução Tampão	<i>H. Acetosella</i> sem radiação		<i>H. Acetosella</i> com radiação UV	
	pH 25°C	Nº de PCs*	pH 25°C	Nº de PCs*
00	1,90	2	-	
01	2,50	2	2,42	3
02	3,98	2	4,08	3
03	5,12	4	5,12	4
04	6,13	2	6,12	3
05	7,22	4	7,12	3
06	8,12	4	8,16	2
07	8,67	2	8,47	2
08	9,32	2	9,32	2
09	9,88	3	9,75	3
10	10,80	2	10,93	3
11	11,83	2	11,70	3
12	12,42	3	12,72	3

\* PCs = número de componentes principais necessário para explicar 100% da variância dos dados

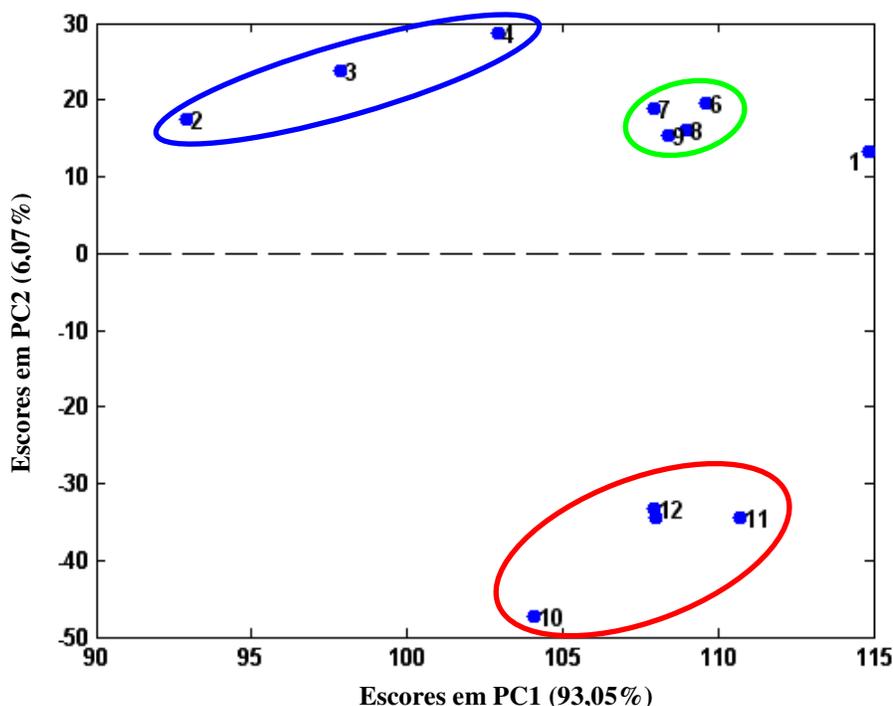
A Análise de Componentes Principais Multi-modo (MPCA) foi realizada para verificar a similaridade entre as matrizes de dados, e os resultados estão apresentados na **Figura 16**. Para a aplicação de MPCA, as matrizes foram ordenadas em forma de um arranjo tridimensional do tipo: pH x Tempo x Comprimento de onda (nm).

Para a amostra sem exposição à radiação UV, S, a primeira componente principal (PC2) explica 97,28% da variância total dos dados e separou as matrizes referentes ao meio ácido (valores de pH 1,90, 2,50 e 3,98) daquelas referentes ao meio neutro e alcalino. As amostras referentes ao meio levemente alcalino (valores de pH 8,67, 9,32, 9,88 e 10,80) apresentam maior similaridade quando comparadas as demais amostras separadas pela segunda componente principal.



**Figura 16** – MPCA para as amostras de *Hibiscus acetosella* em diferentes valores de pH não expostas radiação UV.

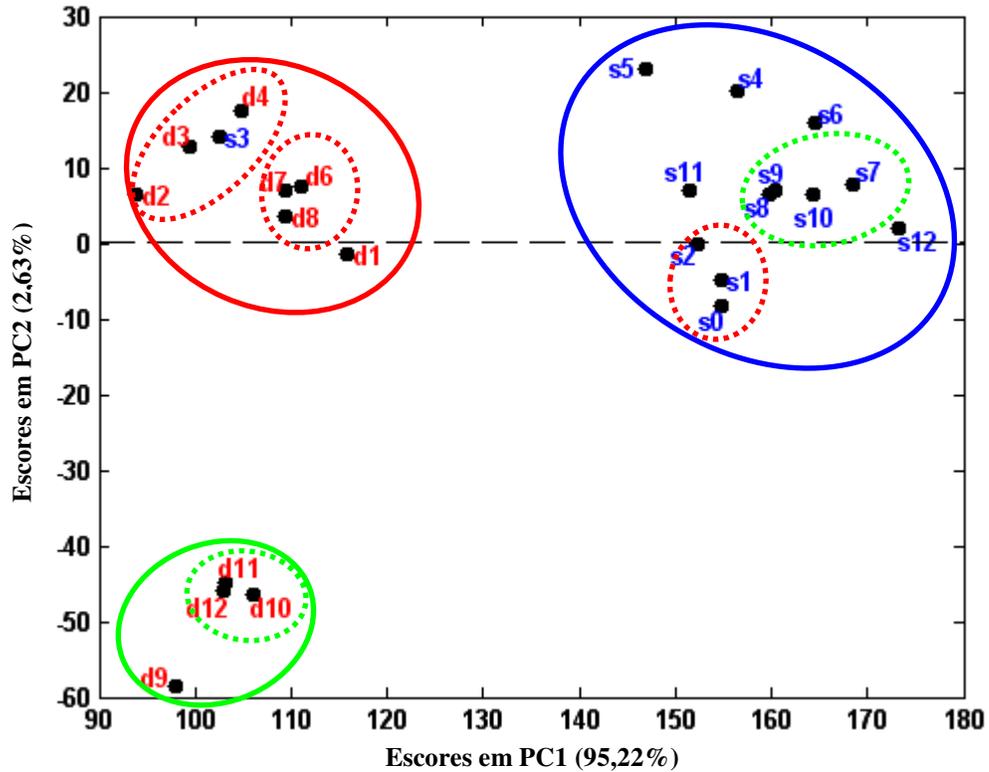
Para os dados do extrato quando exposto à radiação UV, condição D, três grupos são separados pelas duas primeiras componentes principais, como mostra a **Figura 17**. Considerando-se como primeiro grupo aquele composto pelas matrizes referentes aos valores de pH 4,08, 5,12 e 6,12, nota-se que com a diminuição da disponibilidade de prótons no meio, as matrizes começam a se assemelhar com o segundo grupo, que é composto pelas matrizes referentes aos valores de pH 8,16, 8,47, 9,32 e 9,75. Este comportamento é similar ao observado para o extrato sem influência de luz UV, no entanto, para as amostras com radiação, os grupos apresentam-se mais nitidamente separados.



**Figura 17** – MPCA para as amostras de *Hibiscus acetosella* em diferentes valores de pH expostas à radiação UV.

Analisando-se os dados das amostras sem e com exposição à radiação UV simultaneamente, é possível separar a maioria das matrizes. A **Figura 18** apresenta os resultados da aplicação de MPCA para os dados das amostras sem e com exposição à radiação UV. Os grupos similares se encontram próximos, mantendo a mesma forma de quando foram analisados (com e sem exposição à radiação UV) individualmente. No entanto, a análise das amostras sob as diferentes condições analisadas simultaneamente mostra que a matriz de dados representada pela sigla **s3** (amostra não exposta à radiação com valor de pH = 5,12) encontra-se no mesmo grupo da amostra exposta à radiação, o que representa a existência de grande similaridade entre estas matrizes, dando indícios de que neste grupo devem estar presentes as mes-

mas espécies e com comportamento bastante semelhante. Observa-se no entanto pela **Figura 16** que a mesma amostra parece ser anômala ao conjunto.



Sem UV (s)	s0	s1	s2	s3	s4	s5	s6	s7	s8	s9	s10	s11	s12
pH	1,90	2,50	3,98	5,12	6,13	7,22	8,12	8,67	9,32	9,88	10,80	11,83	12,42
Luz UV (d)	-	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12
pH		2,42	4,08	5,12	6,12	7,12	8,16	8,47	9,32	9,75	10,93	11,70	12,72

**Figura 18** – MPCA para as amostras de *Hibiscus acetosella* em diferentes valores de pH sem exposição (sX) e com exposição à radiação UV (dX).

Para entender mais sobre cada uma das amostras analisadas nos diferentes valores de pH, é necessário buscar maiores informações sobre a com-

posição (os espectros e comportamento cinético) das substâncias envolvidas. Com as informações sobre a similaridade entre as matrizes, obtidas à partir dos resultados de MPCA e com as informações obtidas sobre o *posto* (o número de contribuições químicas) da matriz (amostra) a partir das análises por PCA, foi realizada uma decomposição em valores singulares (SVD) para ajudar na escolha do número de componentes necessários para explicar a variância dos dados na amostra. Em seguida, foi aplicado o método de resolução multivariada de curvas com os quadrados mínimos alternados (MCR-ALS).

Como descrito anteriormente, para que se aplique MCR-ALS, é necessário que se tenha uma estimativa inicial dos espectros ou das concentrações dos componentes presentes. Apesar da dificuldade na determinação exata do número de contribuições químicas determinadas neste passo, o processo é facilitado quando se tem conhecimento do sistema químico em análise. No caso das antocianinas, em meio extremamente ácido (pH entre 1 e 2), segundo a literatura<sup>5,7</sup>, a espécie predominante deve ser o cátion flavílico ( $AH^+$ ). Em estudos realizados anteriormente<sup>119</sup> foi demonstrado que propriedades estruturais importantes das antocianinas podem ser obtidas a partir de dados espectrais, incluindo a natureza da antocianidina, a posição de ligação da molécula de açúcar no anel e informações sobre a acilação por ácidos orgânicos. Apesar de algumas variações, a maioria das antocianidinas mais comuns, quando em meio ácido, apresentam a banda de maior absorção na região visível próxima à de 520 nm, característica da absorção do cátion flavílico. Esta informação pode ser muito útil no monitoramento desta espécie quanto a sua transformação\equilíbrio com outra forma estrutural.

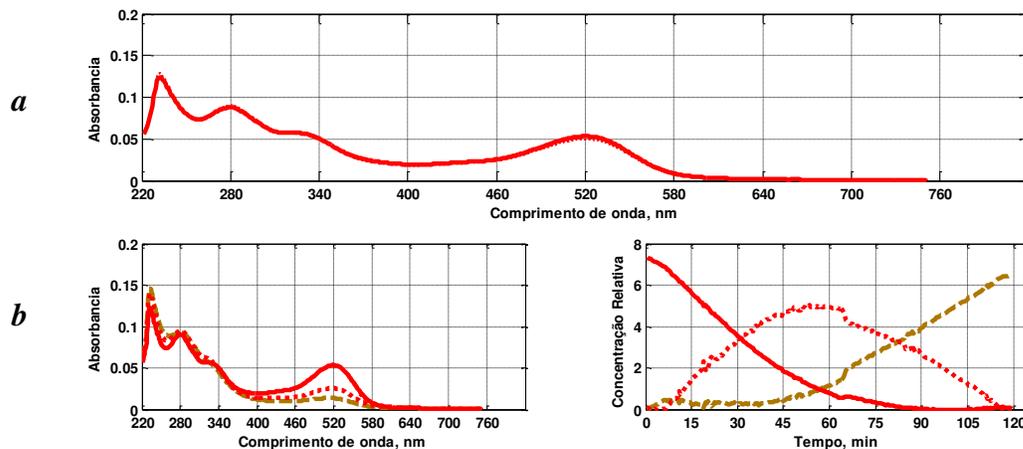
Para valores de pH ligeiramente acima de 2 as formas de antocianinas presentes devem estar em equilíbrio, e de acordo com a literatura<sup>10,11</sup> estas formas são cátion flavílico e o carbinol (B), relacionadas por uma constante de hidratação ( $K_h$ ), como mostra a *equação 14*:



Neste caso, com o conhecimento do pH do meio, a estimativa inicial para os cálculos com MCR-ALS fica facilitada. Após ter-se uma estimativa inicial do número de fatores para a matriz, MCR-ALS pode ser aplicado para a obtenção de informações sobre os espectros puros de espécies presentes e suas respectivas concentrações.

De acordo com a análise de PCA e SVD para a amostra não exposta a radiação, a primeira componente principal (PC1) explica praticamente toda a variância dos dados. Dessa forma, não foi possível a aplicação de MCR. O espectro que representa a espécie presente nesta solução está apresentado na *Figura 19 – a*, e deve ser atribuído à forma cátion flavílico.

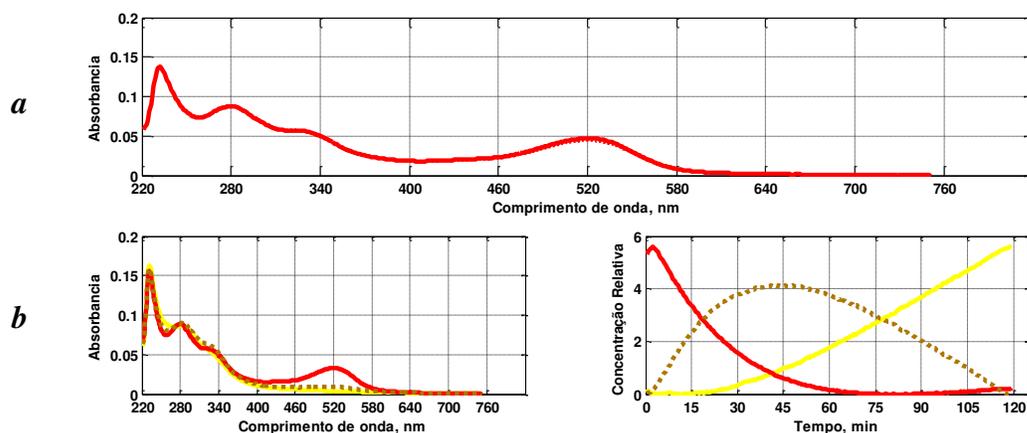
Para a amostra irradiada por luz UV, *Figura. 19 – b*, a análise por PCA e SVD sugere a presença de 3 espécies. Pela observação dos resultados da aplicação de MCR-ALS para os espectros recuperados (*Figura 19 – b*), PC3 pode ser atribuído a uma outra espécie, que pode ser um intermediário. Dessa forma, a espécie presente no início da análise ( $\text{AH}^+$  - linha vermelha sólida) se transforma em outra espécie, que de acordo com os resultados deve ser incolor (B – linha de cor bege pontilhada), passando por um produto intermediário (linha vermelha pontilhada).



**Figura 19** – *a* - Espectro presente na amostra de *Hibiscus acetosella* não exposta a radiação UV (condição S) em pH 2,50. *b* Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de *Hibiscus acetosella* com exposição à radiação UV (condição D) em pH 2,42.

Para a matriz de dados na condição S em pH 3,98, a análise dos resultados de PCA e SVD sugere também a presença de uma única espécie. As informações obtidas pela aplicação de Pure, utilizado para obtenção da estimativa inicial, confirmam a existência de apenas 1 espécie: ao considerar-se 2 espécies, observa-se que os dois espectros recuperados pela aplicação de MCR-ALS são exatamente iguais. Para este conjunto de dados o espectro que representa a espécie presente está apresentado na **Figura 20 - a**. O espectro novamente refere-se ao cátion flavílico, que se apresenta estável sob as condições impostas durante 2 horas de monitoramento.

Para a matriz de dados na condição D em pH 4,08, a análise dos resultados de PCA e SVD sugere a presença de 3 espécies. Os resultados da aplicação de MCR-ALS para esta matriz está ilustrado na **Figura 20 - b**.



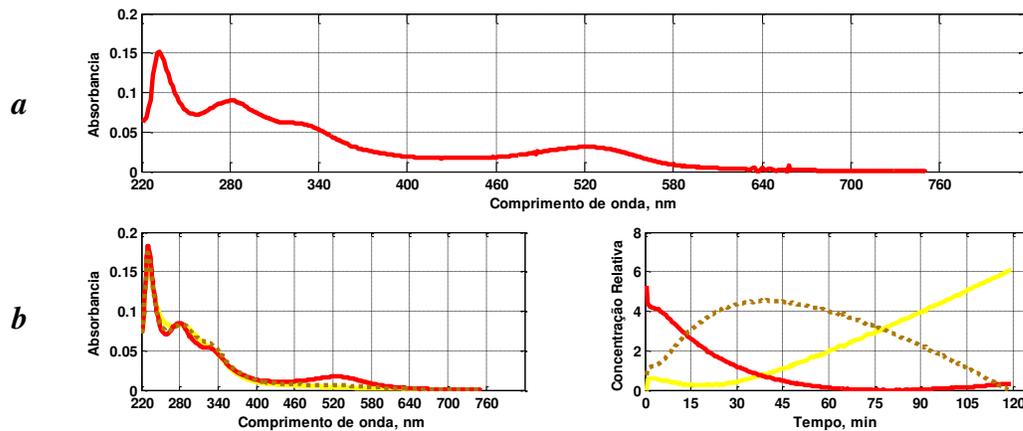
**Figura 20** – *a*- Espectro representante da espécie presente na amostra de *Hibiscus acetosella* sob condição S em pH 3,98. *b* - Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de *Hibiscus acetosella* sob condição D em pH 4,08.

Os espectros recuperados se assemelham aos encontrados no meio anterior, no entanto, a espécie intermediária neste caso, deve ter estrutura similar aquela observada para o Carbinol (espécie B), ou seja, incolor (espécie representada pela linha pontilhada em bege). A cinética da reação é similar a observada para o meio anterior tanto para a amostra S quanto para a amostra D.

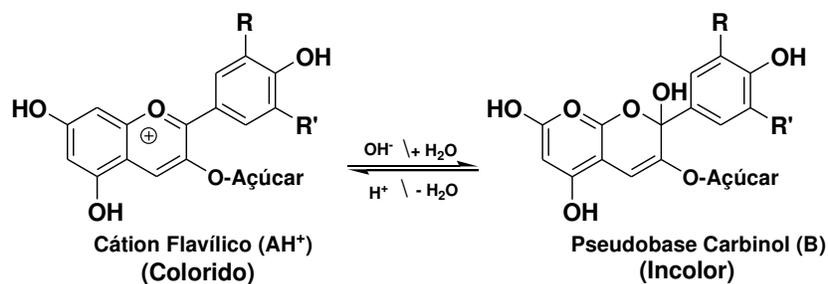
Em meio levemente ácido, pH 5,12, o comportamento apresentado foi bastante parecido ao comportamento apresentado em pH 3,98 – 4,08 ao monitorar-se a amostra principalmente na condição D. Para a amostra na condição S o cátion flavílico começa a se transformar em outra espécie, no entanto, a aplicação de PCA e SVD sugerem que apenas 1 fator é suficiente para explicar praticamente toda a variância dos dados. Para a amostra sob condição D a aplicação de PCA e SVD sugerem a presença de 3 espécies. A **Figura 21** – *a* apresenta o espectro que deve representar a espécie presente pa-

ra a amostra sob condição S, enquanto a **Figura 21 – b** apresenta os espectros e os perfis cinéticos para as espécies recuperados por MCR-ALS neste meio para a condição D.

Neste meio a intensidade de absorbância na região de 525 nm, característica da forma cátion flavílico, é reduzida em comparação aos meios analisados anteriormente (pH entre 2 e 4) enquanto a região ultravioleta tem a absorbância aumentada na mesma proporção da diminuição observada para a região visível. Os resultados apresentados pela aplicação de MCR-ALS nos dados da amostra irradiada sugerem que o equilíbrio pode ser representado pelo esquema apresentado na **Figura 22**.



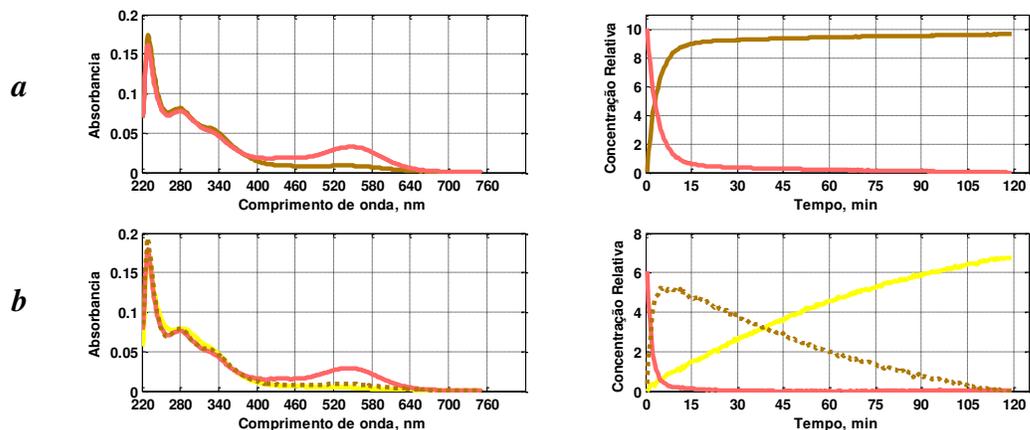
**Figura 21 – a**- Espectro representante da espécie presente na amostra de *Hibiscus acetosella* sob condição S em pH 5,12. **b** - Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de *Hibiscus acetosella* sob condição D em pH 5,12



**Figura 22** – Poss\AA}veis transforma\AA}o\AA}es ocorridas em pH 5,12 para antocianinas de *Hibiscus Acetosella*: sugest\AA}o baseada em informa\AA}o\AA}es da literatura e observa\AA}o dos espectros recuperados pela aplica\AA}o de MCR-ALS.

Com o aumento do pH, as estruturas das antocianinas v\AA}o mudando e passam a n\AA}o absorverem na regi\AA}o vis\AA}vel em pH em aproximadamente de 6 – 7. Para este meio, encontram-se presentes formas incolores que predominam sobre as formas anidrobases quinoidais (A)<sup>120</sup>. Neste valor de pH, o equil\AA}brio ocorre principalmente entre as esp\AA}cies Carbinol e Quinoidal, por\AA}m, as Chalconas come\AA}am a aparecer. Tanto a esp\AA}cie Carbinol quanto as Chalconas n\AA}o absorvem na regi\AA}o vis\AA}vel do espectro, ao contr\AA}rio da esp\AA}cie Quinoidal.

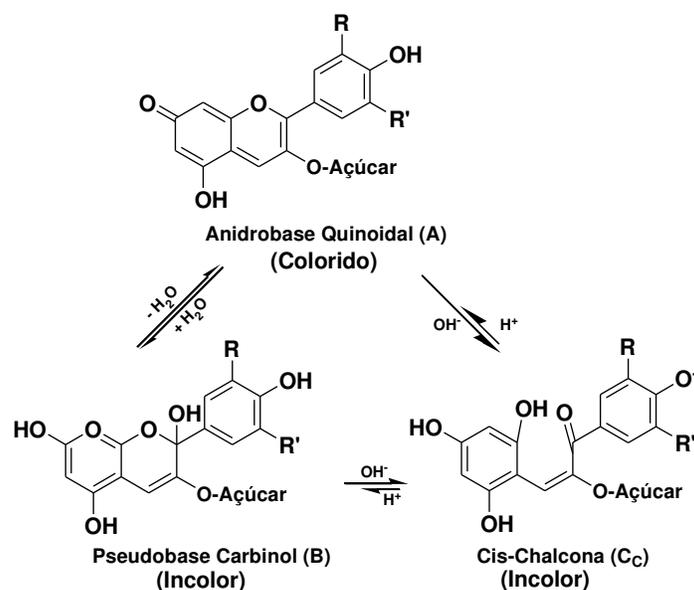
Para o meio com pH 6,1 os resultados da aplica\AA}o de PCA e SVD nos dados da amostra na condi\AA}o S sugerem a presen\AA}a de 2 esp\AA}cies. Neste mesmo meio, a aplica\AA}o de PCA e SVD para a matriz de dados na condi\AA}o D sugerem a presen\AA}a de 3 esp\AA}cies (em PCA 3 fatores explicam 100% da vari\AA}ncia dos dados). A aplica\AA}o de MCR-ALS recuperou os perfis apresentados na **Figura 23 – a** para a condi\AA}o S e **- b** para a condi\AA}o D.



**Figura 23** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus acetosella* referentes ao pH 6,12 nas condições - **a** - S e **b** - D.

O deslocamento da banda, que em meio ácido apresentava máximo (na região visível) em 525 nm, para a região entre 520 e 580 nm apresenta indícios de que ocorreu uma transformação na estrutura das moléculas do meio. Além dessa observação, os resultados de cinética recuperados pela aplicação de MCR-ALS mostram que tanto na condição S quanto na condição D a amostra perde a cor rapidamente, sendo que na amostra irradiada este processo ocorre de forma mais rápida, contando com o aparecimento de uma forma intermediária.

Para este meio, sugere-se que as transformações observadas através dos espectros e perfis cinéticos recuperados pela aplicação de MCR-ALS (**Figura 23**) possam ser representadas pelo esquema apresentado na **Figura 24**.

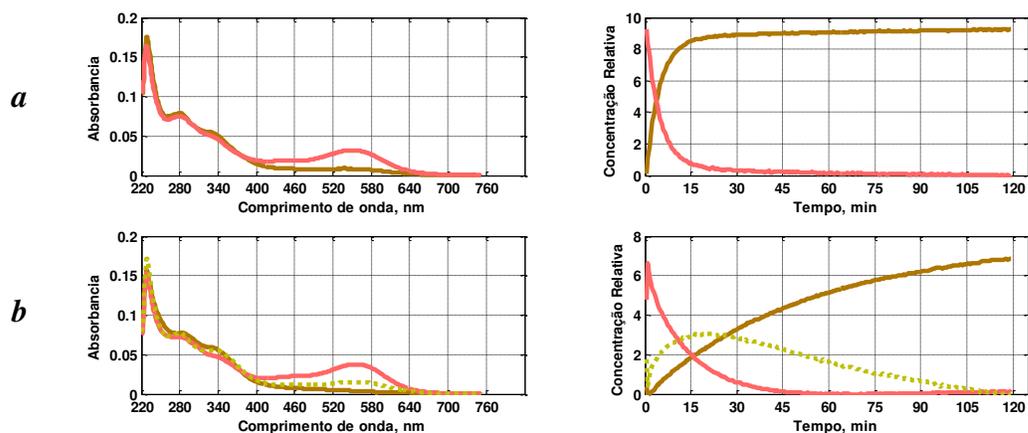


**Figura 24** – Possíveis transformações ocorridas em pH 6,12 para antocianinas de *Hibiscus Acetosella*: sugestão baseada em informações da literatura e observação dos espectros recuperados pela aplicação de MCR-ALS.

Em pH 7,22 (condição S) e 7,12 (condição D), os resultados da aplicação de PCA e SVD sugerem a presença de 4 e 3 espécies, respectivamente, para explicar a variância total dos dados. Em condição S, para se saber qual o número do *posto* (número de espécies químicas presentes) fez-se a aplicação de MCR-ALS considerando-se 2, 3 e 4 fatores. Os resultados mostraram que apenas dois fatores trazem informações químicas, e que, portanto o número de espécies presentes nestas condições deve ser 2. Os outros fatores devem estar relacionados à modelagem de ruídos. Para a amostra na condição S os resultados de MCR-ALS são similares aos observados em pH 6,22, indicando que as mesmas espécies podem estar presentes.

Na condição D a aplicação de PCA e SVD sugerem outra vez a presença de 3 espécies. Os resultados obtidos para os espectros mostraram-se

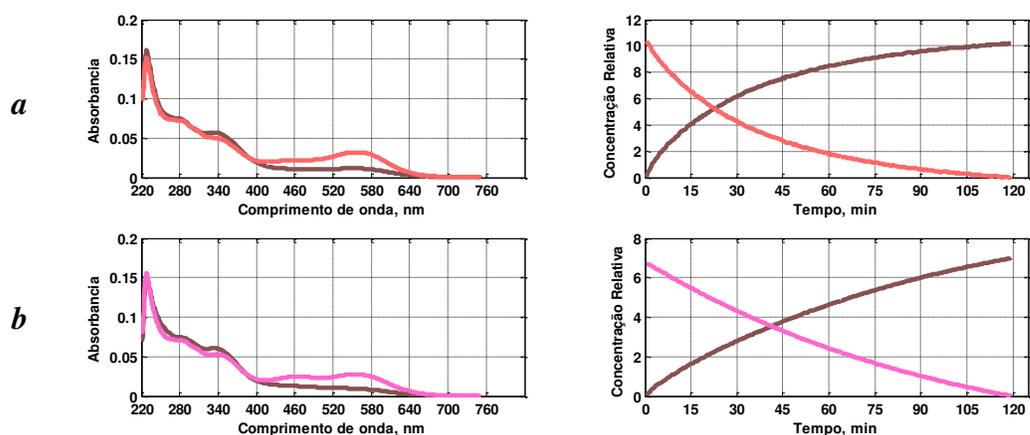
muito semelhantes aos observados para a amostra na solução tampão anterior (pH 6,12), no entanto, a cinética apresenta algumas diferenças interessantes: a substância colorida (A) transforma-se mais lentamente em substância incolor (B e/ou C<sub>C</sub>). A **Figura 25** apresenta os resultados da aplicação de MCR-ALS – **a** para a condição S e **b** para a condição D para este meio.



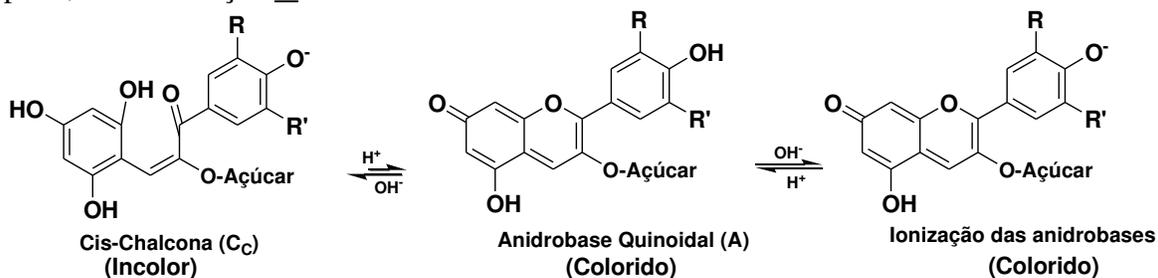
**Figura 25** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus acetosella* referentes **a** - ao pH 7,22 na condição S e **b** – pH 7,12 na condição D.

Em meio levemente básico, pH 8,12 (condição S) – 8,16 (condição D), os resultados da aplicação de PCA e SVD sugerem a presença de 2 espécies para explicar praticamente toda a variância dos dados. A partir dos resultados de MCR-ALS foi possível notar diferenças nos espectros: para a amostra na condição S a banda de máxima absorção na região visível se desloca para a região próxima a 570 nm, enquanto que para a substância incolor, a banda em 340 nm ganha intensidade. Para a amostra na condição D, também verifica-se aumento na intensidade em 340 nm, e observa-se no espectro da espécie colorida o deslocamento da banda de máxima absorção

(visível) para as proximidades da região de 570 nm. Além disso, para as duas condições observa-se o surgimento de uma banda em 460 nm. A **Figura 26** apresenta os resultados da aplicação de MCR-ALS – **a** para a condição S e **b** para a condição D. Neste meio, espera-se que estejam presentes estruturas predominantemente na forma de chalconas (incolores) e anidrobases (coloridas). A partir deste meio as anidrobases começam a aparecer em sua forma ionizada, como mostra a **Figura 27**.

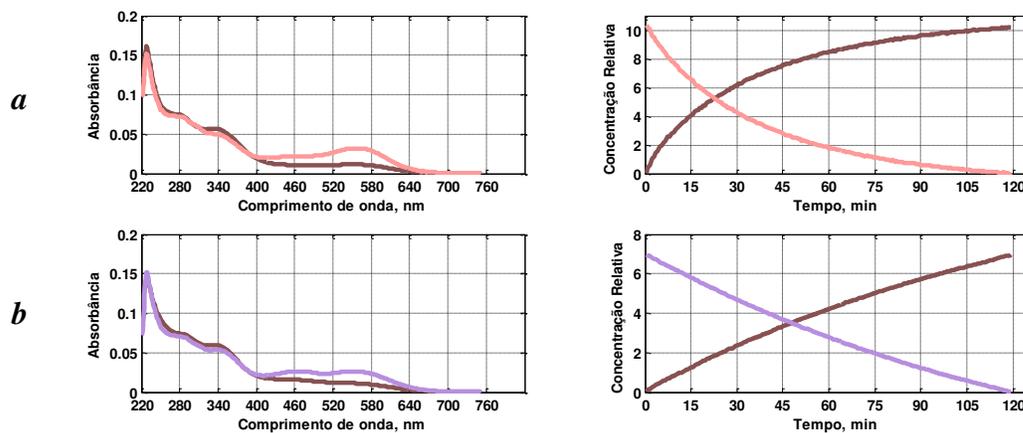


**Figura 26** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus acetosella* referentes **a** - ao pH 8,12 na condição S e **b** - pH 8,16 na condição D.



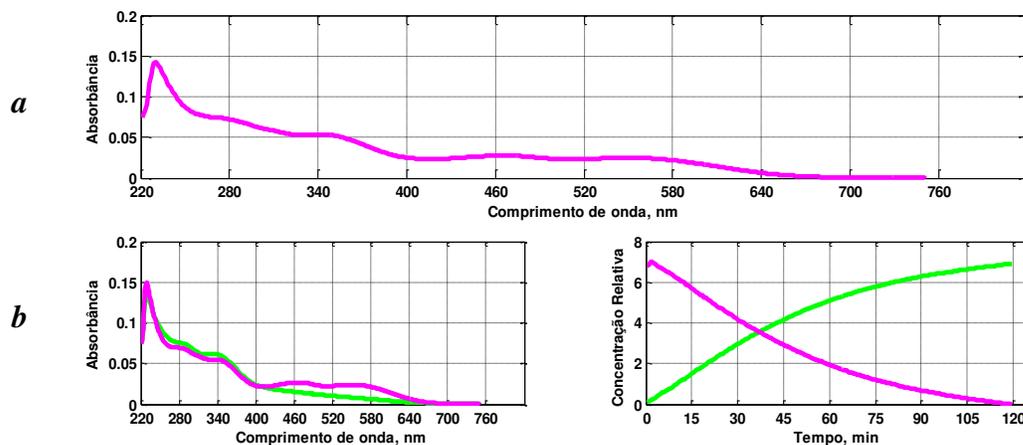
**Figura 27** – Possíveis transformações ocorridas em pH 8,1 para antocianinas de *Hibiscus Acetosella*: sugestão baseada em informações da literatura e observação dos espectros recuperados pela aplicação de MCR-ALS.

Para o pH 8,67, a aplicação de PCA e SVD sugerem a presença de 2 espécies para a amostra não irradiada (S). A análise por PCA e SVD da amostra exposta a radiação UV (D) igualmente sugere a presença de duas espécies. A aplicação de MCR-ALS recuperou os espectros e os perfis cinéticos apresentados na **Figura 28 – a** para a condição S e - **b** para a condição D. Os resultados para a amostra na condição S, **Figura 28 – a**, não apresentam nenhuma alteração em relação aos resultados observados na análise desta amostra para o meio anterior (pH 8,12), enquanto que para a condição D observa-se um incremento na banda situada em 460 nm. Esta alteração pode estar relacionada às diferentes formas de ionização das quais as anidrobases podem ser submetidas, neste caso, por influência da radiação.



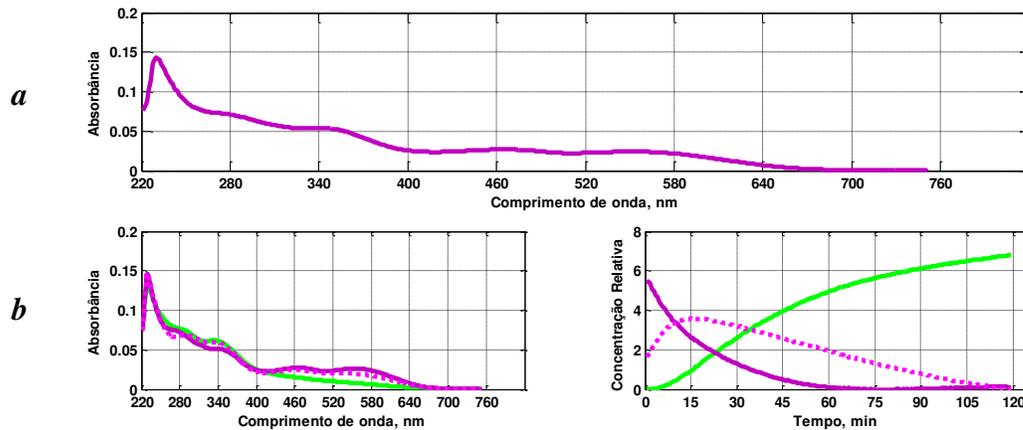
**Figura 28** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus acetosella* referentes **a** - ao pH 8,67 na condição S e **b** – pH 8,47 na condição D.

Em pH 9,32, os resultados da análise de componentes principais e da decomposição em valores singulares no conjunto de dados referente à amostra na condição S sugere que 1 componente explica praticamente toda a variância dos dados. Dessa forma, não foi possível a aplicação de MCR – ALS e o espectro que representa a espécie para este meio sob condição S está apresentado na **Figura 29 – a**. Para a condição D a aplicação de PCA e SVD sugerem que devem estar presentes 2 espécies. Os espectros e seus respectivos perfis cinéticos, recuperados por MCR – ALS para a amostra sob condição D estão apresentados na **Figura 29 – b**. Para a amostra sob efeito de radiação UV, o espectro com banda de absorção na região visível é convertido em um espectro com banda intensa apenas na região UV (substância incolor). Para este meio, sugere-se que as transformações ainda estejam relacionadas às diferentes formas de anidrobases quinoidais (coloridas) e as chalconas (incolors), como mostrado na **Figura 27**.



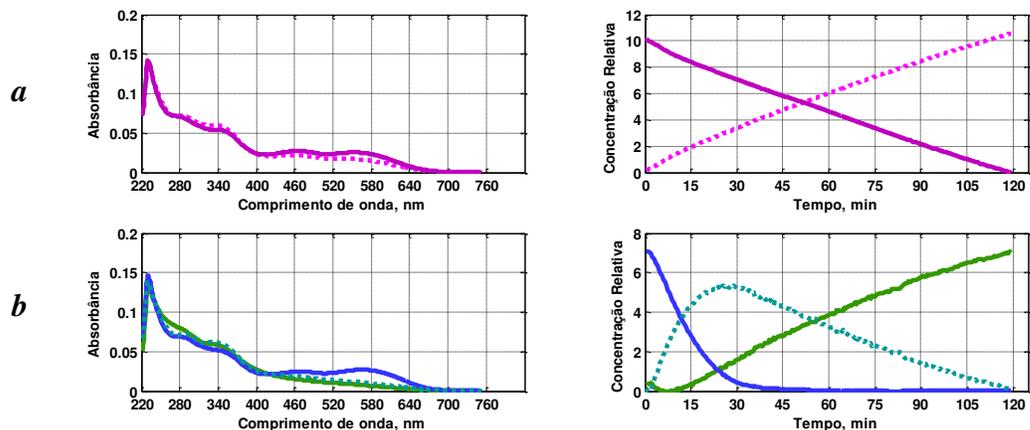
**Figura 29 – a** -Espectro representante da espécie presente na amostra de *Hibiscus acetosella* sob condição S em pH 9,32. **b** Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de *Hibiscus acetosella* sob condição D em pH 9,32.

A análise de componentes principais e SVD da amostra em condição S no valor de pH 9,88 indica que 1 componente explica praticamente toda variância dos dados. Neste meio, pH 9,75, os resultados da aplicação de PCA e SVD nos dados da amostra sob condição D sugerem a presença de 3 componentes para explicar a variância dos dados. Para a matriz na condição S o espectro que representa a espécie presente está apresentado na **Figura 30 – a**. Para a matriz na condição D, a aplicação de MCR-ALS recuperou um terceiro perfil de uma possível forma intermediária (**Figura 30 – b**). No entanto, de modo geral, nota-se que a reação é bastante similar a da **Figura 29 – b**, exceto no que diz respeito a cinética desta reação: em pH 9,75 a incidência de radiação ultravioleta acelera a reação fazendo com que a forma colorida seja convertida em forma incolor mais rapidamente do que em pH 9,32.

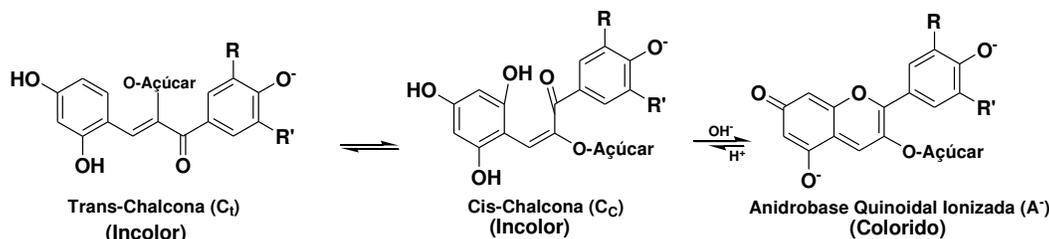


**Figura 30 – a**- Espectro representante da espécie presente na amostra de *Hibiscus acetosella* sob condição S em pH 9,88. **b** Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de *Hibiscus acetosella* sob condição D em pH 9,75.

Em pH 10,80, a aplicação de PCA e SVD nos dados da amostra em condição S mostra que são necessários 2 componentes principais para explicar toda a variância dos dados. Para a amostra na condição D a análise por PCA e SVD sugerem a presença de 3 componentes. O perfil cinético e os espectros recuperados por MCR-ALS para a amostra nas duas condições estão apresentados na **Figura 31**. Para a amostra em condição S, **Figura 31 – a**, nota-se que os espectros são ainda muito similares, dando indícios de que ambos podem estar relacionados à mesma espécie. Apesar da falta de informações para este meio, propõe-se que as substâncias começam a se apresentar de forma desprotonada a partir de valores de pH mais elevados. A amostra não irradiada aparentemente apresenta as mesmas características observadas para a amostra analisada em meio com pH 9. A amostra exposta a radiação UV, **Figura 31 – b**, apresenta diferenças em relação a mesma amostra não exposta. A primeira delas é o deslocamento batocrômico da banda de máxima absorvância na região visível para 580 nm, além de diferenças sutis na região ultravioleta do espectro representado pela linha em cor verde. Pequenas diferenças também distinguem o espectro representado pela linha azul-claro pontilhada do representado pela linha verde, no entanto, ambos não absorvem na região visível. Para este meio, sugere-se que possa estar acontecendo equilíbrios de ionização e de isomeria, como o caso da cis Chalcona ( $C_C$ ) em equilíbrio com a trans-Chalcona ( $C_T$ ), além dos equilíbrios envolvendo as anidrobases em suas possíveis formas ionizadas, como mostra a **Figura 32**.



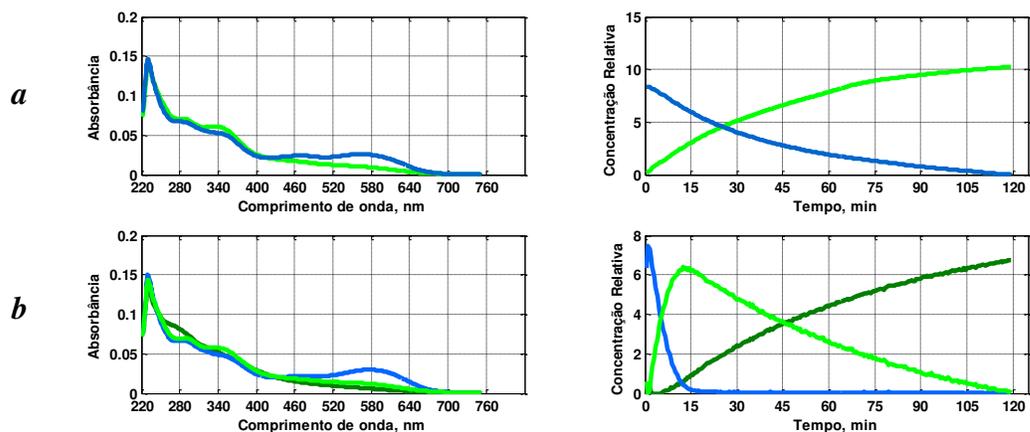
**Figura 31** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus acetosella* referentes **a** - ao pH 10,80 na condição S e **b** - pH 10,93 na condição D.



**Figura 32** – Possíveis transformações ocorridas a partir de pH 10 para antocianinas de *Hibiscus Acetosella*: sugestão baseada em informações dos espectros recuperados pela aplicação de MCR-ALS.

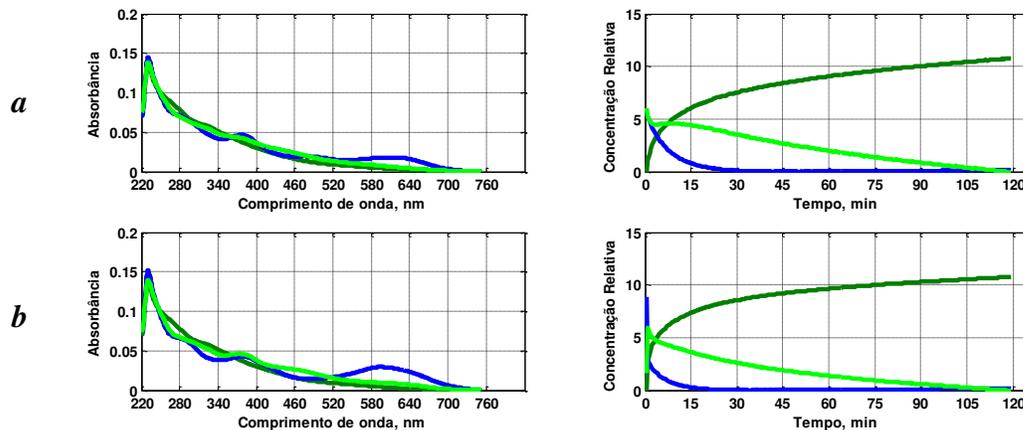
Para pH 11,83, a aplicação de PCA mostrou a necessidade de 2 fatores para explicar a variância dos dados para a amostra na condição S e 3 fatores na condição D para explicar a variância dos dados. A aplicação de SVD confirmou o número de componentes indicados por PCA. A **Figura 33** apresenta os espectros e os perfis cinéticos recuperados pela aplicação de MCR-ALS para os dados da matriz – **a** na a condição S e - **b** para a condição D. A **Figura 33** – **a**, referente a amostra não exposta a radiação UV, apresenta

perfis diferentes daqueles observados no meio anterior, com deslocamento batocrômico da banda de máxima absorvância na região visível para a região de 580 nm e o surgimento de uma espécie incolor. Esta mesma espécie incolor pode ser encontrada na **Figura 33 – b**, referente à amostra exposta a radiação. A banda de máxima absorvância na região visível sofre outro deslocamento batocrômico com diminuição da banda observada anteriormente entre 450 e 500 nm. Uma terceira espécie, representada pela linha verde, que aparece como forma intermediária, difere da espécie incolor representada pela linha em verde-clara apenas na região UV também foi recuperada por MCR-ALS. Para este meio as espécies presentes devem estar em suas formas ionizadas, portanto, os equilíbrios existentes neste meio devem estar relacionados às formas de chalconas cis e trans ionizadas, além de anidrobases, também em sua forma ionizada.



**Figura 33** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus acetosella* referentes **a** - ao pH 11,83 na condição S e **b** – pH 11,70 na condição D.

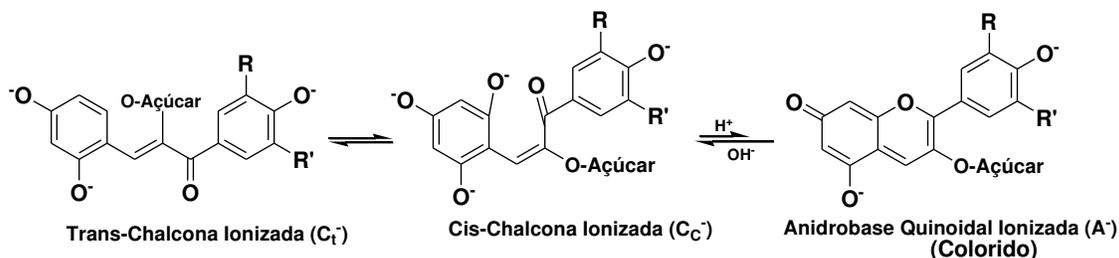
Para o meio alcalino, pH acima de 12, a aplicação de PCA na matriz de dados da amostra não exposta a radiação UV mostrou a necessidade de 3 fatores para capturar 100% da variância dos dados. Para a amostra exposta a radiação UV aplicação de PCA nos dados também mostrou a necessidade de 3 fatores para explicar 100% da variância dos dados. A aplicação de SVD está de acordo com os resultados obtidos por PCA, sugerindo a presença de 3 espécies tanto para a amostra em condição S quanto para a condição D. Aplicando-se MCR-ALS nos dados das amostras nas duas condições, foi possível recuperar os espectros e os perfis cinéticos apresentados na **Figura 34**. Observa-se que os resultados foram muito similares, no entanto, a cinética da reação exposta a radiação UV é ligeiramente mais rápida que a cinética da amostra não exposta.



**Figura 34** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus acetosella* referentes ao meio com pH acima de 12 nas condições - **a** - S e **b** - D.

Para este meio espera-se que as estruturas das antocianinas estejam presentes apenas em suas formas ionizadas, portanto, baseando-se nos resul-

tados obtidos por MCR-ALS para os espectros e pelos equilíbrios indicados nos perfis cinéticos, propõe-se que as espécies cis-chalcona ionizada, trans-chalcona ionizada e anidrobases quinoidais ionizadas estejam presentes em equilíbrio, como mostra a **Figura 35**.



**Figura 35** – Possíveis transformações ocorridas em pH acima de 12 para antocianinas de *Hibiscus Acetosella*: sugestão baseada em informações dos espectros recuperados pela aplicação de MCR-ALS.

### 5.9.1.2 – Influência de radiação UV em amostras de *Hibiscus Sabdariffa*

Para o *Hibiscus Sabdariffa*, a aplicação de PCA em cada uma das soluções tampão em diferentes valores de pH está apresentada na **Tabela 3**. Nas discussões sobre a amostra de *Hibiscus sabdariffa* serão realizadas comparações com os resultados obtidos para a amostra de *Hibiscus acetosella*.

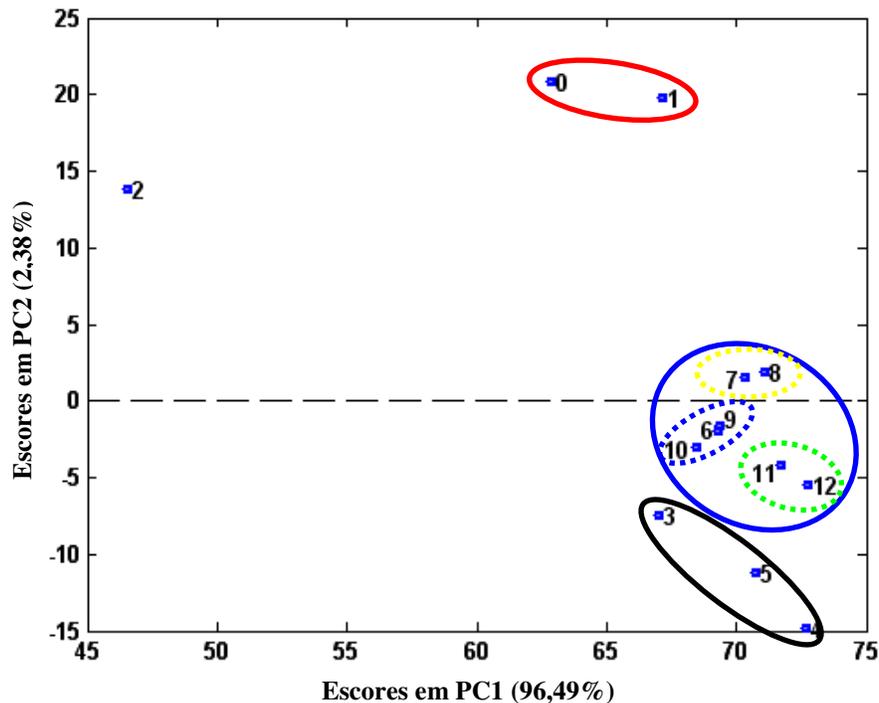
**Tabela 3** – Número de componentes principais em seus respectivos valores de pH para as amostras de *Hibiscus Sabdariffa* sem e com radiação Ultravioleta.

Solução Tampão	<i>H. Sabdariffa</i> sem radiação		<i>H. Sabdariffa</i> com radiação UV	
	pH 25°C	Nº de PCs*	pH 25°C	Nº de PCs*
00	1,90	2	-	-
01	2,50	3	2,42	2
02	3,98	2	4,08	2
03	5,12	3	5,12	2
04	6,13	3	6,12	2
05	7,22	3	7,12	3
06	8,12	2	8,16	3
07	8,67	2	8,47	3
08	9,32	2	9,32	2
09	9,88	3	9,75	2
10	10,80	2	10,93	2
11	11,83	3	11,70	3
12	12,42	3	12,72	3

\* PCs = número de componentes principais necessário para explicar 100% da variância dos dados

A Análise de Componentes Principais Multi-modo (MPCA) foi realizada para verificar a similaridade entre as matrizes de dados, e os resultados estão apresentados na **Figura 36**, para a amostra de *H. sabdariffa* sem radiação (S), e **Figura 37** para a amostra exposta a radiação UV(D).

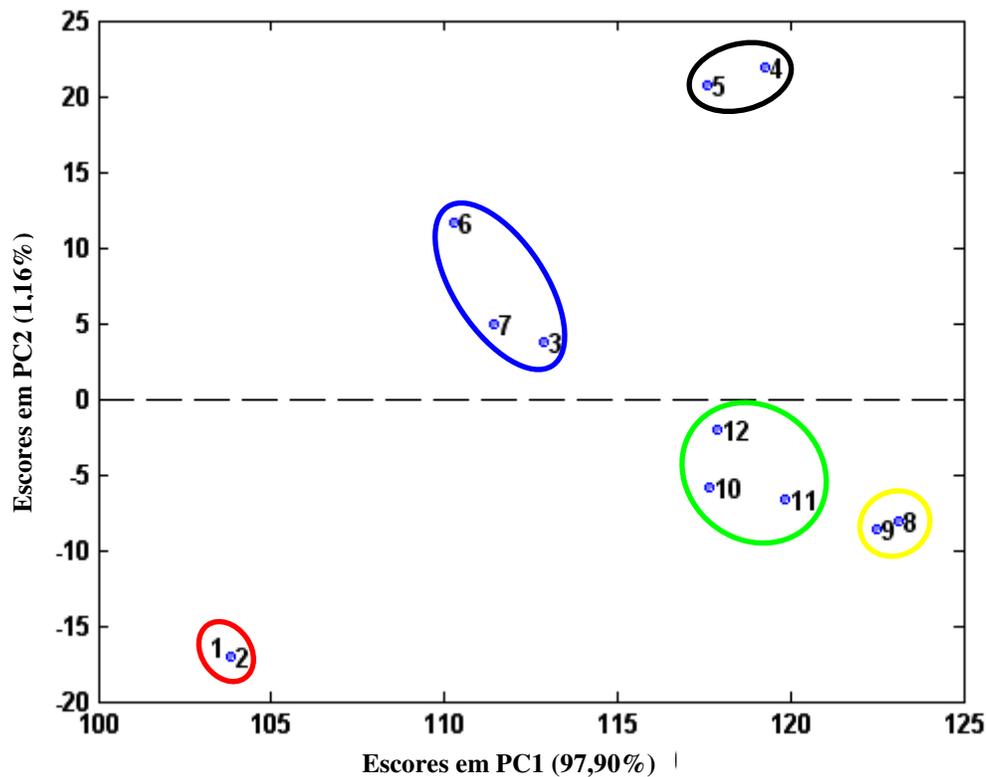
Para a amostra de *Hibiscus sabdariffa* não exposta à radiação UV, a primeira componente explica 96,49% da variância total dos dados, e separou as matrizes referentes ao meio ácido (valores de pH 1,90, 2,50 e 3,98) daquelas referentes ao meio neutro e alcalino, assim como os resultados obtidos para a planta estudada anteriormente (*Hibiscus acetosella*). Observa-se também que as amostras referentes ao meio levemente alcalino (valores de pH 8,12, 8,67, 9,32, 9,88 e 10,80) apresentam maior similaridade quando comparadas com as demais amostras, separadas pela segunda componente principal. No entanto, as amostras representadas pelos números 7 e 8 (pH 8,67 e 9,32, respectivamente) foram separadas pela PC2.



**Figura 36** – MPCA para a amostra de *Hibiscus sabdariffa* não exposta à radiação UV.

Para o extrato sob radiação UV, 5 grupos são separados pelas duas primeiras componentes principais. Observa-se que os grupos foram separa-

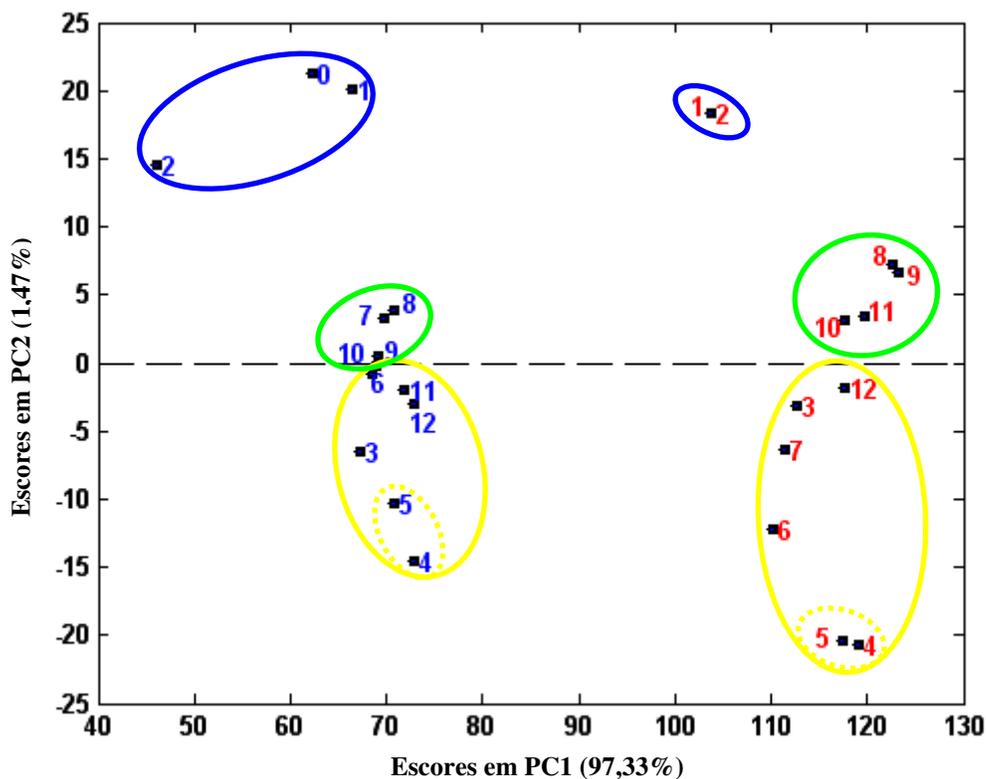
dos em mais ácidos (valores de pH 2,42 e 4,08), praticamente neutros (valores de pH 6,12 e 7,12), levemente ácido / levemente alcalino (valores de pH 5,12, 8,16 e 8,47), alcalino (valores de pH 9,32 e 9,75) e extremamente alcalinos (valores de pH 10,93, 11,70 e 12,72). Ao se analisar PC1 x PC2, foram separados os valores mais extremos, tanto para meio ácido quanto para alcalino, dos meios intermediários. Os valores de pH 2,42, 4,08, 9,32, 9,75, 10,93, 11,70 e 12,72 ficaram em quadrantes separados dos valores 5,12, 6,12, 7,12, 8,16 e 8,47. Comparando-se os resultados da aplicação de MPCA para as amostras nas condições S e D, nota-se que para as amostras D os grupos apresentam-se melhor separados.



**Figura 37** – MPCA para a amostra de *Hibiscus sabdariffa* exposta à radiação.

A **Figura 38** apresenta os resultados da aplicação de MPCA para os dados das amostras nas duas condições (S e D) analisados simultaneamente. Os dados das amostras das matrizes expostas e não expostas a radiação UV foram separadas, de modo que amostras que possuem valores de pH equivalentes apareceram nos mesmos quadrantes. Ao analisar PC1 x PC2, foram separados o meio ácido do meio intermediário (levemente ácido / neutro / levemente alcalino) e o alcalino. Os resultados da aplicação de MPCA para as amostras nas condições S e D mostram boa separação, permitindo diferenciar as amostras que sofreram exposição à radiação UV daquelas que não foram expostas.

Assim como para a amostra da planta analisada anteriormente, a partir das informações obtidas sobre a similaridade entre as matrizes, inferidas após as análises de MPCA, as informações sobre o *posto* da matriz por PCA e SVD, além do conhecimento da amostra e dos resultados obtidos para a amostra anterior, foi aplicado o MCR-ALS. Como descrito anteriormente, para antocianinas em meio extremamente ácido (pH entre 1 e 2), a espécie predominante deve ser o cátion flavílico ( $AH^+$ ). Então, após a estimativa inicial do número de fatores para cada matriz, aplicou-se MCR para a obtenção de informações sobre os espectros puros das espécies presentes e suas respectivas concentrações (os perfis cinéticos).

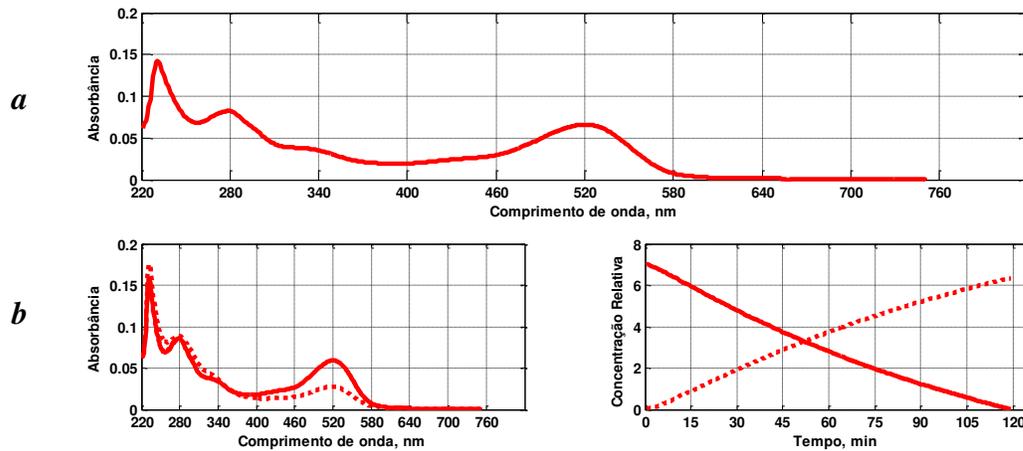


Sem UV (x)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pH	1,90	2,50	3,98	5,12	6,13	7,22	8,12	8,67	9,32	9,88	10,80	11,83	12,42
Luz UV (x)	-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pH		2,42	4,08	5,12	6,12	7,12	8,16	8,47	9,32	9,75	10,93	11,70	12,72

**Figura 38** – MPCA para as amostras de *Hibiscus sabdariffa* na condição S (x) e D (x).

Em pH 2,50, a Análise de Componentes Principais dos dados da matriz referente à amostra em condição S mostra que 1 componente explica praticamente toda a variância dos dados. A decomposição em valores singulares (SVD) apresenta resultados que igualmente sugerem que apenas 1 componente explica a maior parte da variância dos dados. Dessa forma, não foi possível a aplicação de MCR-ALS. O espectro que representa a espécie presente nesta solução está apresentado na **Figura 39 – a**.

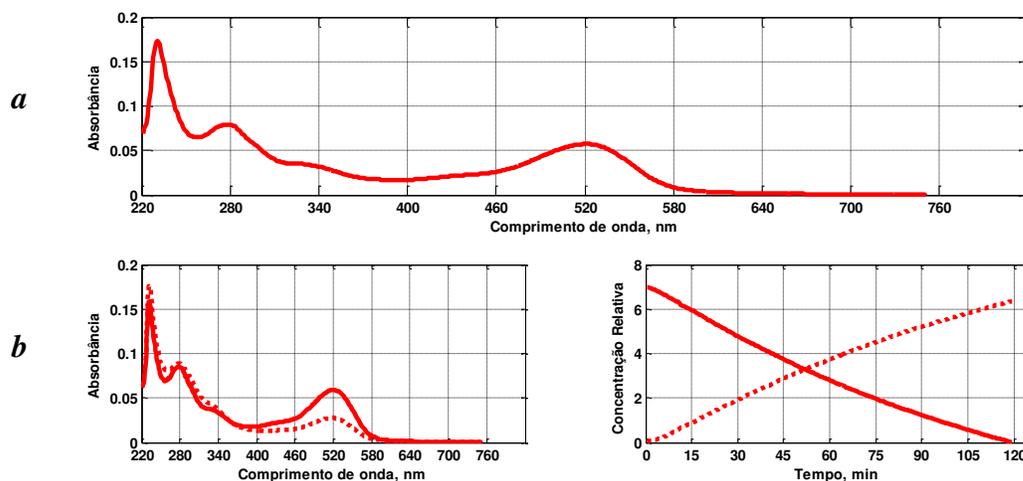
Para a amostra em condição D a aplicação de PCA mostra que são necessários 2 componentes para explicar a variância dos dados. A **Figura 39 – b** apresenta os resultados da aplicação de MCR-ALS na matriz de dados referente à condição D para o pH 2,42. Observa-se que na condição D para este meio durante 120 minutos de monitoramento, as antocianinas provenientes do *Hibisco sabdariffa* são mais estáveis que as observadas na amostra de *Hibiscus acetosella*.



**Figura 39 – a-** Espectro presente na amostra de *Hibiscus sabdariffa* sob condição S em pH 2,50. **b** Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de *Hibiscus sabdariffa* sob condição D em pH 2,42.

Aplicando-se PCA na matriz de dados da amostra não exposta à radiação UV em pH aproximadamente 4,0, foram necessários 2 PCs para explicar a variância total. A decomposição SVD igualmente sugere a presença de 2 fatores. No entanto, ao aplicar-se MCR-ALS verificou-se que apenas uma espécie pode ser recuperada, indicando que o segundo fator sugerido por PCA e SVD deve referir-se aos ruídos inerentes à análise. O perfil espectral

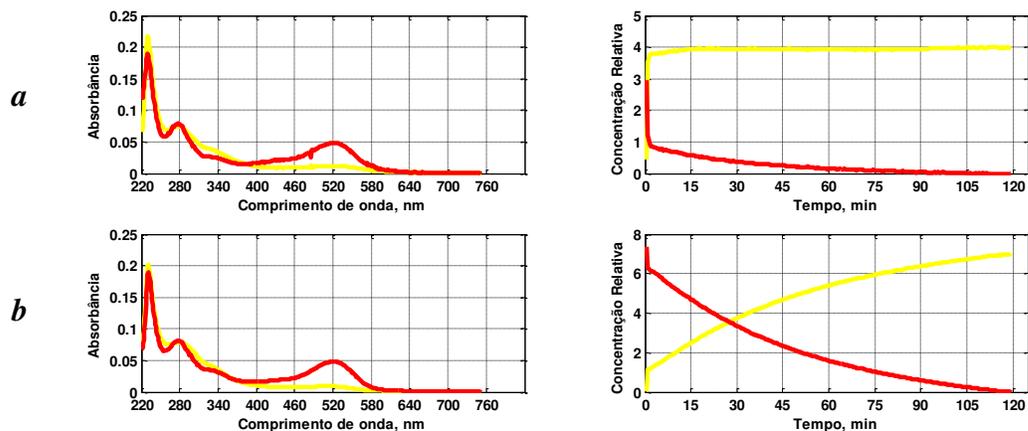
encontrado neste meio está apresentado na **Figura 40 – a**. Para a amostra exposta a radiação UV, a aplicação de PCA utilizou 2 PCs para explicar a variância dos dados, e a aplicação de SVD igualmente sugere a presença de 2 componentes. A aplicação de MCR-ALS nos dados da amostra em condição D recuperou os espectros e os perfis cinéticos apresentados na **Figura 40 – b**. Observa-se que os resultados foram bastante semelhantes aos obtidos para o *Hibiscus acetosella*. Portanto, da mesma forma que para a amostra anterior neste meio, sugere-se que o espectro pertence a forma colorida cá-tion flavílico ( $AH^+$ ).



**Figura 40 – a** - Espectro presente na amostra de *Hibiscus sabdariffa* sob condição S em pH 3,98. **b** Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de *Hibiscus sabdariffa* sob condição D em pH 4,08.

Em pH 5,12 a aplicação de MCR-ALS mostra que o comportamento cinético apresentado pelas espécies presentes neste meio foi mais rápido para a amostra na condição S que para a condição D, como mostra a **Figura 41**. As análises por PCA e SVD sugerem a utilização de 2 fatores tanto para

a amostra na condição S quanto para a condição D. Considerando o equilíbrio proposto pela **Figura 22**, ao contrário do ocorrida na planta anteriormente analisada, a amostra na condição S desloca o equilíbrio mais rapidamente da forma colorida cátion flavílico ( $AH^+$ ) para a forma incolor carbinol (B).

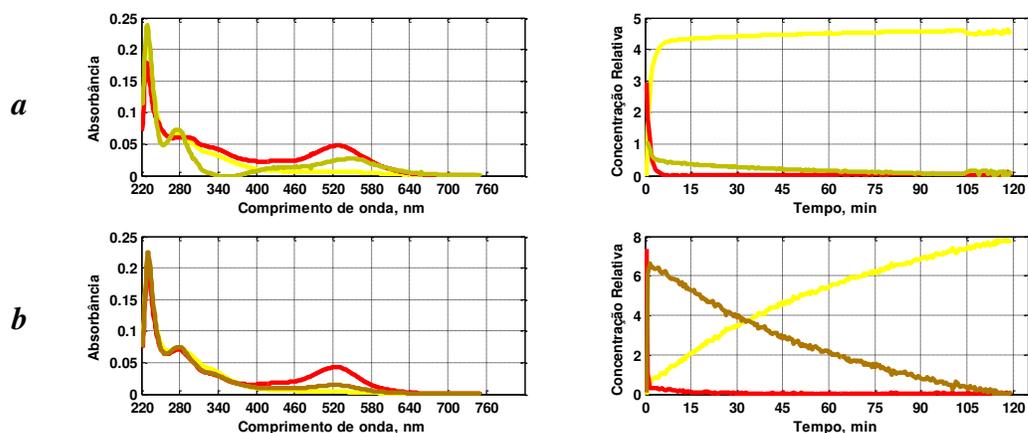


**Figura 41** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus sabdariffa* referentes ao pH 5,12 nas condições: **a** - S e **b** - D.

Como descrito anteriormente, em meio com pH entre 6 e 7 as estruturas das antocianinas mudam de forma a não absorverem na região visível. Para a amostra na condição S em pH aproximadamente 6,1 a aplicação de PCA e SVD indicam presença de 3 fatores. Para a amostra na condição D a aplicação de PCA utilizou 2 componentes para explicar a variância dos dados. No entanto a decomposição em valores singulares apontou para a presença de 3 fatores. Para comprovar o número do posto desta matriz, foi aplicado MCR-ALS utilizando-se 3 fatores na tentativa de se recuperar espectros com informação química.

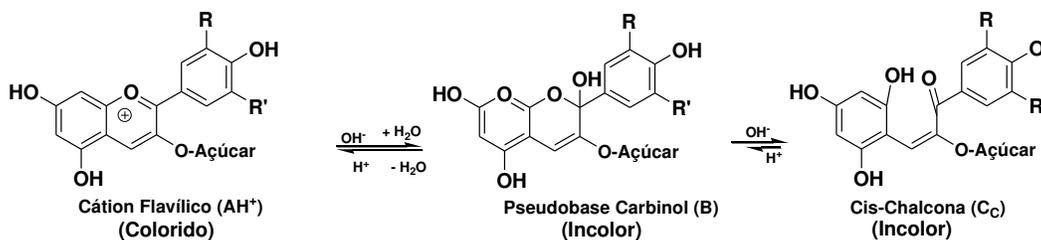
A aplicação de MCR-ALS recuperou os perfis apresentados na **Figura 42 – a** para a condição S e **- b** para a condição D. A partir dos resultados foi possível concluir que o terceiro fator apontado na decomposição por SVD também traz informações químicas. Para este meio também foi verificado que a cinética da reação é mais condizente com os resultados obtidos para este mesmo meio na análise do *Hibiscus acetosella*: a cinética da amostra exposta a radiação UV é mais rápida que para a amostra não exposta.

Como esperado para este meio, as formas estruturais se modificam rapidamente e o equilíbrio é deslocado para as formas incolores, que predominam neste valor de pH. Também é possível inferir dos resultados para os espectros recuperados que, para a amostra na condição S, o terceiro espectro (representado pela linha em cor bege) não se assemelha a nenhum espectro obtido para o hibisco anteriormente analisado, mesmo considerando outros valores de pH.



**Figura 42** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus sabdariffa* referentes ao pH aproximadamente 6,1 nas condições - **a** - S e **b** - D.

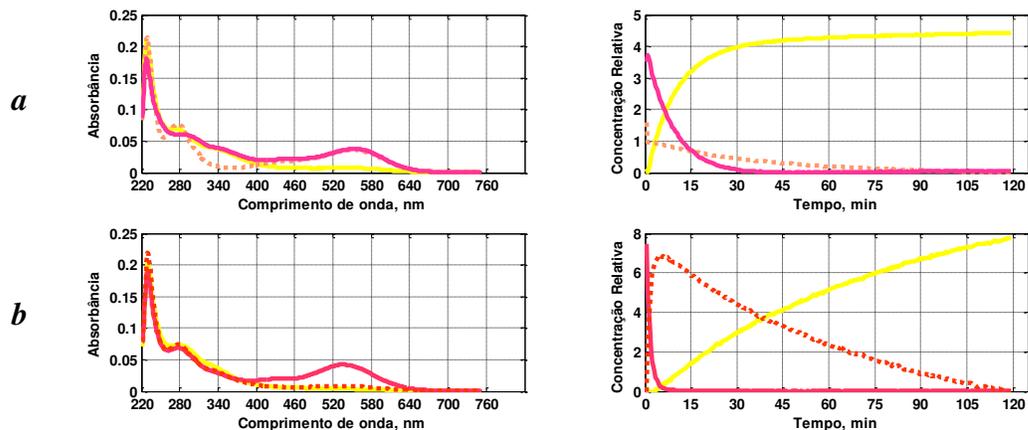
Neste valor de pH os espectros recuperados por MCR-ALS para a amostra de *Hibiscus acetosella* apresentaram um deslocamento batocrômico da banda que em meio neutro apresenta máximo (na região visível) em 525 nm, para a região entre 520 e 580 nm, o que não foi verificado para o *Hibiscus sabdariffa*. Desta forma, o equilíbrio sugerido para este meio, diferentemente daquele para o *Hibiscus acetosella* (**Figura 24**), está ilustrado na **Figura 43**.



**Figura 43** – Possíveis transformações ocorridas em pH aproximadamente 6,1 para antocianinas de *Hibiscus sabdariffa*: sugestão baseada na observação dos espectros recuperados pela aplicação de MCR-ALS.

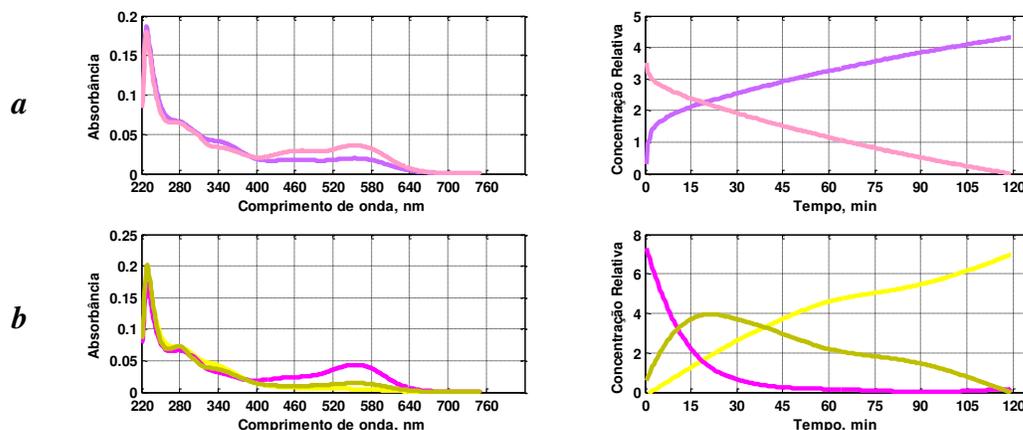
Em pH 7,22 (condição S) e 7,12 (condição D), a aplicação de PCA apresentou 3 componentes principais para explicar a variância dos dados. A decomposição em valores singulares confirmou os resultados indicados por PCA. Os espectros e os perfis cinéticos recuperados por MCR-ALS para a matriz de dados na condição S (**Figura 44 – a**) apresentam algumas diferenças em relação aos observados no meio anterior (pH 6,1). O espectro representado pela linha rosa apresenta um deslocamento batocrômico sofrido pelo espectro da região de máxima absorção para o visível (525 nm), anteriormente ilustrado em cor vermelha, para a região de aproximadamente 550 nm. Esta mudança sugere que ocorreu a transformação da forma cátion flaví-

lico ( $AH^+$ ) para a forma anidrobases quinoidal (A). Na planta analisada anteriormente, este fenômeno foi observado em pH 6,1. Nos espectros recuperados para a matriz de dados da amostra em condição D (**Figura 44 – b**) o deslocamento batocrômico é menor. Além disso, os outros dois espectros representam estruturas que não absorvem na região visível. Portanto, para a condição D, os espectros devem representar uma substância que absorve na região visível, que pode ser uma forma de anidrobases (espectro representado pela linha rosada), e duas espécies que absorvem apenas na região UV, que de acordo com o meio podem ser Carbinol (B) e Chalcona (C). A cinética apresentada para a amostra na condição D é mais rápida que para a condição S, e para a amostra de *Hibiscus acetosella*, analisada anteriormente, esse fenômeno foi verificado em pH 6,1. Com base nos resultados, sugere-se que equilíbrios observados para esse meio podem ser descritos pela **Figura 24**.



**Figura 44** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus sabdariffa* referentes **a** - ao pH 7,22 na condição S e **b** – pH 7,12 na condição D.

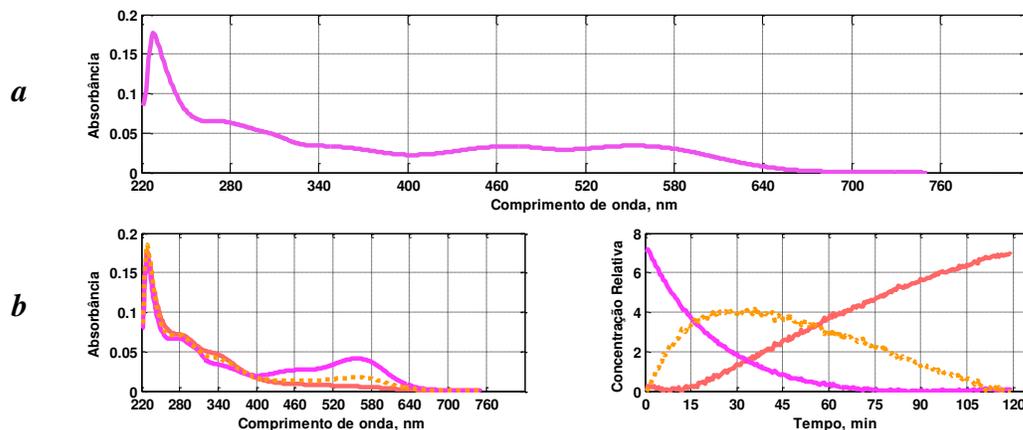
Para o meio levemente alcalino, pH 8,12 (condição S) – 8,16 (condição D), com análise por PCA foram utilizados 2 e 3 fatores, respectivamente, para explicar a variância dos dados. A utilização de SVD confirmou o número de componentes. A aplicação de MCR-ALS recuperou os espectros e os perfis cinéticos para a amostra na condição S (**Figura 45 – a**) e na condição D (**Figura 45 – b**). Os espectros recuperados para a amostra na condição D são muito semelhantes aos recuperados para a amostra em pH 7,12, sendo que a maior diferença dos resultados está na cinética: para o pH 8,16 a cinética é mais lenta que em pH 7,12. No entanto, para a amostra em condição S os espectros são bastante diferentes dos recuperados para o meio anterior: a amostra na condição S apresenta o espectro representado pela linha em rosa claro idêntico ao recuperado para a amostra de *Hibiscus acetosella* na condição D para este valor de pH. Este espectro apresenta um aumento na intensidade em 460 nm.



**Figura 45** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus sabdariffa* referentes ao pH aproximadamente 8,1 nas condições - **a** - S e **b** - D.

Neste meio, devem estar presentes estruturas na forma de chalconas (incolores) e anidrobases (coloridas), sendo que, como mostra o perfil cinético, o equilíbrio se desloca na direção da formação das chalconas.

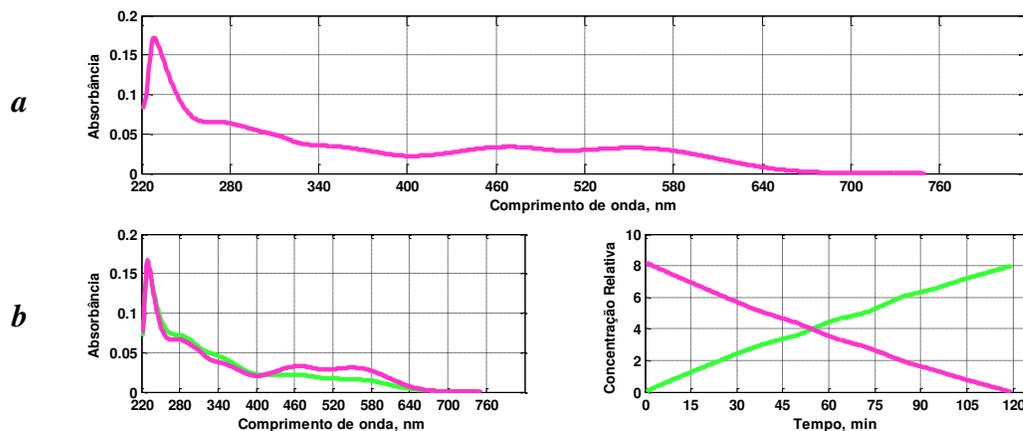
Para o pH 8,67, a aplicação de PCA mostrou que 1 PC foi suficiente para explicar praticamente toda a variância dos dados na amostra não exposta a radiação (S), enquanto a amostra exposta a radiação UV (D) utilizou 3 fatores. O número de componentes para a amostra nas duas condições foi confirmado por SVD. A aplicação de MCR-ALS não foi possível para a condição S, e por isso o espectro que representa a espécie presente neste meio está apresentado na **Figura 46 – a**. Para a condição D a aplicação de MCR-ALS recuperou os perfis cinéticos apresentados na **Figura 46 – b**. Para a amostra na condição S o espectro apresenta características semelhantes ao espectro apresentado pela amostra não irradiada em pH 8,1, representado pela linha roxa. Para a amostra na condição D o espectro apresenta além da banda próxima a 580 nm, o aparecimento de uma banda em 460 nm. De acordo com a cinética recuperada pelo método, a espécie colorida se transforma em uma espécie incolor passando por uma forma intermediária. Na amostra não exposta à radiação UV devem estar presentes apenas anidrobases, enquanto que na amostra exposta a radiação, devem estar presentes, além de anidrobases, as formas de chalcona cis e trans.



**Figura 46** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus sabdariffa* referentes **a** - ao pH 8,67 na condição S e **b** - pH 8,47 na condição D.

Em pH 9,32, a análise de componentes principais no conjuntos de dado referente à amostra na condição S necessitou de 1 fator para explicar a maior parte da variância dos dados. A aplicação de PCA nos dados da amostra em condição D utilizou 2 componentes para explicar a variância dos dados. A SVD confirmou o número de componentes sugeridos por PCA. A amostra na condição S não pode ser analisada por MCR-ALS por conter apenas uma espécie. A **Figura 47 – a** apresenta o espectro que representa a espécie presente na amostra na condição S em pH 9,32, enquanto que a **Figura 47 – b** apresenta os espectros e seus respectivos perfis cinéticos recuperados pela aplicação de MCR-ALS para a condição D.

Para a condição S a região de 220 a 400 nm do espectro é similar a do espectro ilustrado pela linha lilás da amostra na condição D, **Figura 47 – b**. Este porém não apresenta bandas definidas entre 400 e 750 nm. Os resultados para este meio foram idênticos aos obtidos para a amostra de *Hibiscus acetosella*.

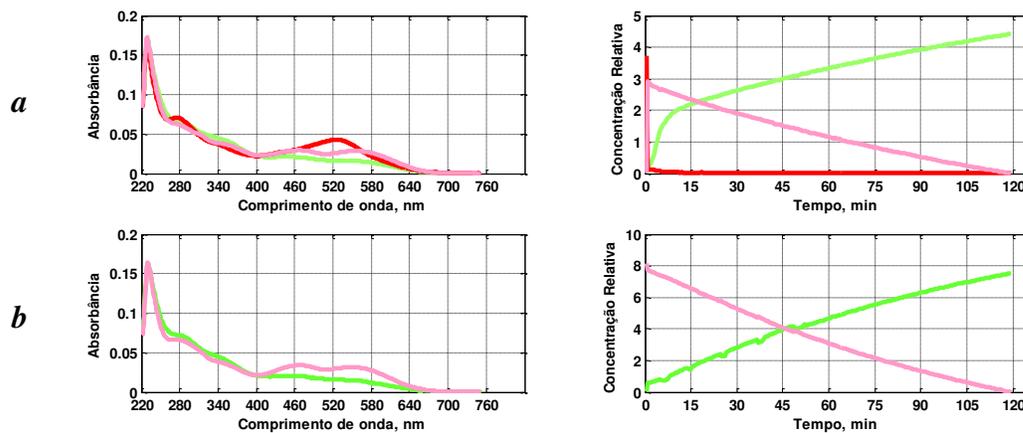


**Figura 47** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus sabdariffa* referentes ao pH 9,32 nas condições - **a** - S e **b** - D.

A análise de componentes principais da amostra em condição S no valor de pH 9,88 utilizou 3 PCs para descrever a variância dos dados. A SVD confirmou o número de componentes. Para os dados da amostra na condição D a aplicação de PCA utilizou 2 componentes para explicar a variância, e esse número de fatores foi confirmado por SVD. Para a amostra na condição S, entre os espectros recuperados por MCR-ALS, é possível observar o espectro da forma cátion flavílico ( $AH^+$ ). Devido ao pH do meio não existe a possibilidade desta espécie estar presente. No entanto, como mostra os resultados da cinética para esta forma (**Figura 48 – a**), a detecção de  $AH^+$  apenas no primeiro instante do monitoramento é devido ao fato de que a solução “mãe” (solução do extrato) está em meio ácido, com valor de pH 2, e ao adicionar a amostra no tampão foi possível detectar as formas existentes no primeiro instante provavelmente por alguma falha inicial na agitação. Os outros dois espectros observados são semelhantes aos observados para a amostra em condição D, porém, a amostra não exposta à radiação UV apresenta

cinética mais rápida, como mostra a **Figura 48 – b**. O resultado para a amostra exposta à radiação se assemelha muito ao resultado obtido para a amostra de *Hibiscus acetosella* para este meio, já em comparação com a amostra em condição S, observa-se que para a planta anterior foi detectada apenas um espectro, que durante o monitoramento de 120 minutos se apresenta mais estável.

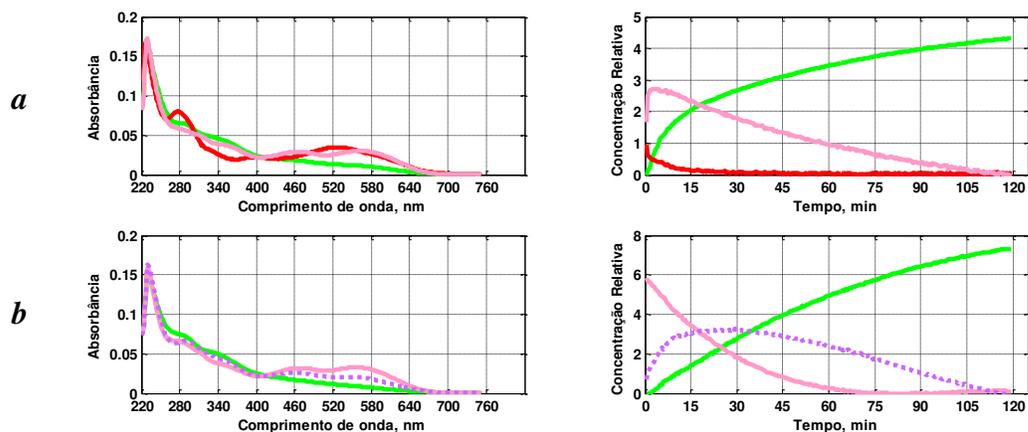
Como neste meio é possível encontrar as anidrobases em sua forma ionizada, os espectros com bandas na região visível devem estar relacionados a estas formas coloridas, enquanto que os espectros ilustrados pela linha de cor verde devem estar relacionados às chalconas.



**Figura 48** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus sabdariffa* referentes **a** - ao pH 9,88 na condição S e **b** – pH 9,75 na condição D.

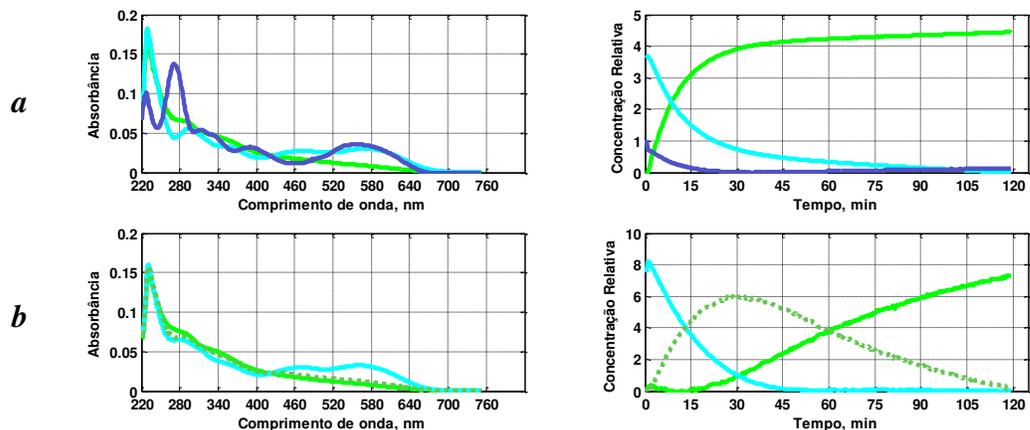
Em pH 10,80, a aplicação de PCA nos dados da amostra em condição S mostra que são necessários 2 fatores para explicar a variância dos dados. Da mesma forma, para a amostra na condição D foram necessários 2 com-

ponentes. No entanto, para as duas condições, a decomposição em valores singulares indicou a possibilidade da presença de um terceiro fator, o que levou a aplicação de MCR-ALS considerando-se 3 componentes para as duas condições. Para a amostra não exposta a radiação, **Figura 49 – a**, o resultado obtido foi idêntico ao obtido para o meio anterior, até mesmo no que diz respeito a detecção do cátion flavílico no primeiro instante do monitoramento. Para a amostra na condição D, **Figura 49 – b**, o componente detectado por SVD pode ser uma espécie intermediária. No entanto, as espécies presentes para este meio, de acordo com os resultados, devem ser as mesmas verificadas para o meio anteriormente analisado: anidrobases ionizadas e chalconas. Como as substâncias começam a se apresentar de forma desprotonada a partir de valores de pH mais elevados, a partir de pH 10 espera-se que as espécies presentes devam estar em suas formas ionizadas.



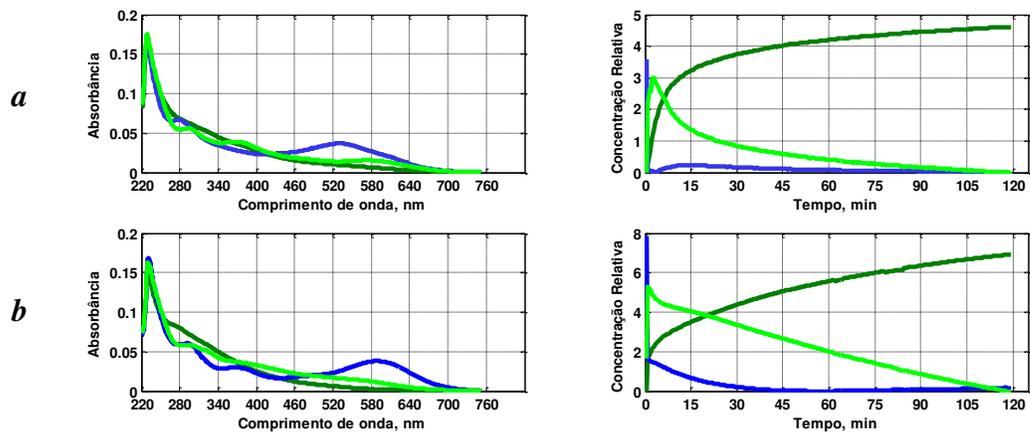
**Figura 49** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus sabdariffa* referentes **a** - ao pH 10,80 na condição S e **b** – pH 10,93 na condição D.

Para pH 11,83, a análise por PCA e SVD mostraram a necessidade de 3 fatores para explicar a variância dos dados da amostra nas condições S e D. A **Figura 50** apresenta os espectros e os perfis cinéticos recuperados pela aplicação de MCR-ALS para os dados da matriz  $\mathbf{a}$  na condição S e  $\mathbf{b}$  para a condição D. A **Figura 50 – a**, referente à amostra na condição S, apresenta perfis muito semelhantes aos observados no meio anterior, no entanto com um espectro não detectado anteriormente. Para a amostra na condição D, **Figura 50 – b**, a banda em 580 nm aumenta em intensidade enquanto que a banda em aproximadamente 480 nm diminui. O mesmo espectro detectado no meio anterior referente a uma espécie incolor foi recuperado para a amostra nas duas condições (espectro ilustrado em verde claro), e pode ser atribuído as espécies chalcona, sendo que para este meio, as estruturas devem estar em suas formas ionizadas. Para a condição D, uma terceira espécie, representada pela linha verde escura que aparece como um possível intermediário, difere da espécie incolor representada pela linha em verde claro apenas na região UV. Os equilíbrios existentes neste meio devem estar relacionados às formas de chalconas cis e trans ionizadas, além de anidrobases, também em sua forma ionizada. Os resultados observados na **Figura 50 – b**, relativos a condição D, se assemelham aos resultados obtidos para o *Hibiscus acetosella* neste mesmo valor de pH. Portanto, sugere-se que possa estar acontecendo equilíbrios de ionização e de isomeria entre a forma cis Chalcona ( $C_C$ ) e a trans-Chalcona ( $C_T$ ), além dos equilíbrios envolvendo as anidrobases em suas possíveis formas ionizadas, ilustrado anteriormente na **Figura 32**.



**Figura 50** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus sabdariffa* referentes **a** - ao pH 11,83 na condição S e **b** – pH 11,70 na condição D.

Para o meio extremamente alcalino, pH acima de 12, a aplicação de PCA na matriz de dados da amostra não exposta a radiação UV mostrou a necessidade de 3 fatores para explicar a variância dos dados. Esse número foi confirmado pela aplicação de SVD. A aplicação de PCA nos dados da amostra exposta a radiação UV também mostrou a necessidade de 3 fatores para explicar a variância dos dados. Os resultados para a aplicação de MCR-ALS nos dados das amostras nas duas condições estão apresentados na **Figura 51**. Da mesma forma que para o *Hibiscus acetosella* analisado anteriormente, os resultados foram muito similares entre as condições S e D, apresentando diferenças sutis nas bandas dos espectros.



**Figura 51** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Hibiscus sabdariffa* referentes ao meio com pH acima de 12 nas condições - **a** - S e **b** - D.

Da mesma forma que para a planta anterior, para este meio as espécies cis-chalcona ionizada, trans-chalcona ionizada e anidrobases quinoidais ionizadas devem estar presentes em equilíbrio, como mostrado na **Figura 35**.

### 5.9.1.3 – Influência de radiação UV em amostras de *Malvaviscus Penduliflorus*

A aplicação de PCA em cada uma das soluções tampão para a amostra de *Malvaviscus Penduliflorus* está apresentada na **Tabela 4**. Os resultados obtidos para esta amostra serão discutidos na forma de comparação com os resultados das amostras de *Hibiscus acetosella* e *Hibiscus sabdariffa* na condição de não exposição à radiação UV (S) e exposição a radiação UV (D).

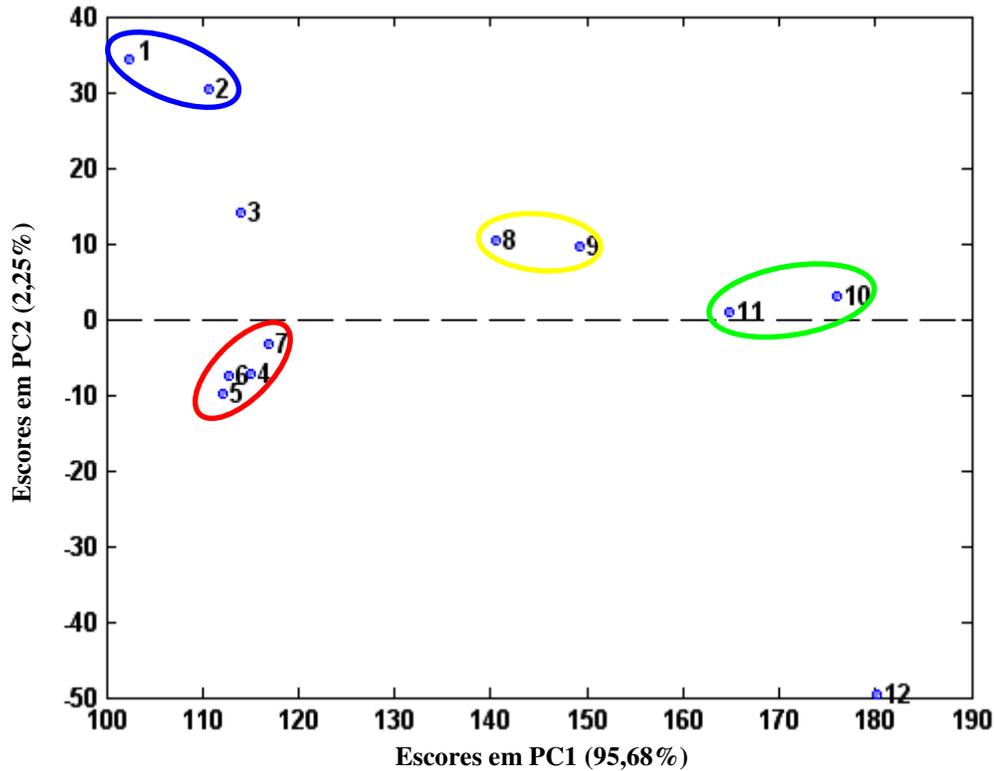
**Tabela 4** – Número de componentes principais em seus respectivos valores de pH para as amostras de *Malvaviscus Penduliflorus* sem e com exposição à radiação Ultravioleta.

Solução Tampão	<i>Malvaviscus</i> sem radiação		<i>Malvaviscus</i> com radiação UV	
	pH 25°C	Nº de PCs*	pH 25°C	Nº de PCs*
01	2,50	2	2,42	3
02	3,98	2	4,08	2
03	5,12	2	5,12	2
04	6,13	2	6,12	2
05	7,22	3	7,12	3
06	8,12	2	8,16	3
07	8,67	2	8,47	3
08	9,32	2	9,32	3
09	9,88	3	9,75	3
10	10,80	3	10,93	3
11	11,83	2	11,70	3
12	12,42	3	12,72	4

\* PCs = número de componentes principais necessário para explicar 100% da variância dos dados

A Análise de Componentes Principais Multi-modo (MPCA) foi realizada para verificar a similaridade entre os dados. Para a amostra sem exposi-

ção à radiação UV, os resultados estão apresentados na **Figura 52**, e para a amostra irradiada **Figura 53**.



**Figura 52** – MPCA para a amostra de *Malvaviscus penduliflorus* não exposta à radiação UV.

Para a amostra de *Malvaviscus* sem ação de luz UV, a primeira componente explica 95,68% da variância total dos dados, enquanto a segunda componente explica 2,25%. Ao analisar-se PC1 x PC2, são formados quatro diferentes grupos de matrizes. Considera-se que o primeiro grupo é referente ao meio ácido (valores de pH 2,50 e 3,98), o segundo ao meio intermediário (de levemente ácido até levemente alcalino: valores de pH 6,13, 7,22, 8,12 e 8,67), o terceiro grupo é formado pelos valores de pH 9,32 e 9,88, e o quarto

grupo se refere as amostras de pH 10,80 e 11,83. Nestas condições, a amostra analisada em pH 12,42 não apresenta similaridade com nenhuma outra. As amostras representadas do grupo de valores intermediários de pH e a amostra em pH 12,42 se apresentam separadas no mesmo quadrante (PC1), porém, pela distancia entre elas, nota-se que não há similaridade.

Para o extrato sob radiação UV, analisando-se PC1 x PC2, considera-se que 4 grupos são separados como sendo mais similares. Os grupos separados nestas condições se assemelham aos grupos separados pela amostra não exposta à radiação: o primeiro grupo se separou como meio ácido (valores de pH 2,42 e 4,08), o segundo como meio levemente ácido até neutro (valores de pH 5,12, 6,12 e 7,12), o terceiro grupo é formado pelos valores de pH 9,32 e 9,75, e o quarto grupo refere-se as amostras de pH 10,93 e 11,70. A amostra analisada em pH 12,72 não apresenta similaridade com nenhuma outra. Os valores de pH de 2,42 até 9,32 são separados por PC1, enquanto os valores de 9,75 até 12,72 são separados por PC2.

Comparando-se os resultados da aplicação de MPCA nos extratos das diferentes plantas em condições S e D, nota-se que a separação ocorrida nos dados da planta *Malvaviscus penduliflorus* não exposta à radiação (S) assemelha-se à observada para a espécie *Hibiscus sabdariffa* exposta à radiação (D), e o comportamento de *Malvaviscus* na condição D assemelha-se ao observado para *Hibiscus acetosella* na mesma condição (D).

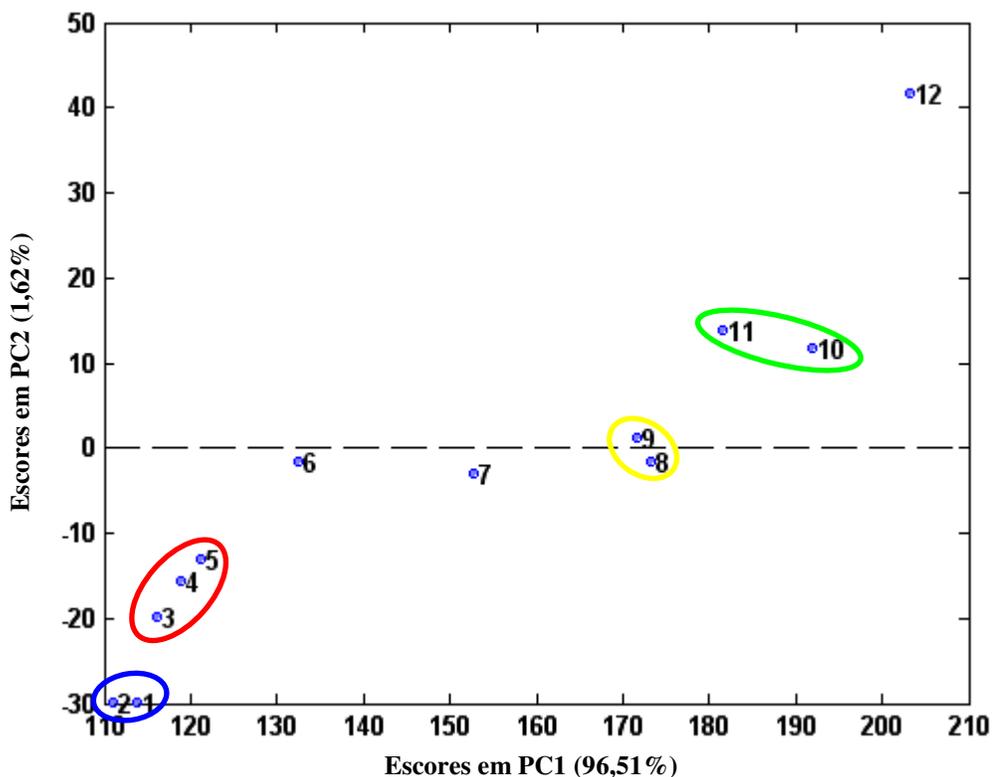
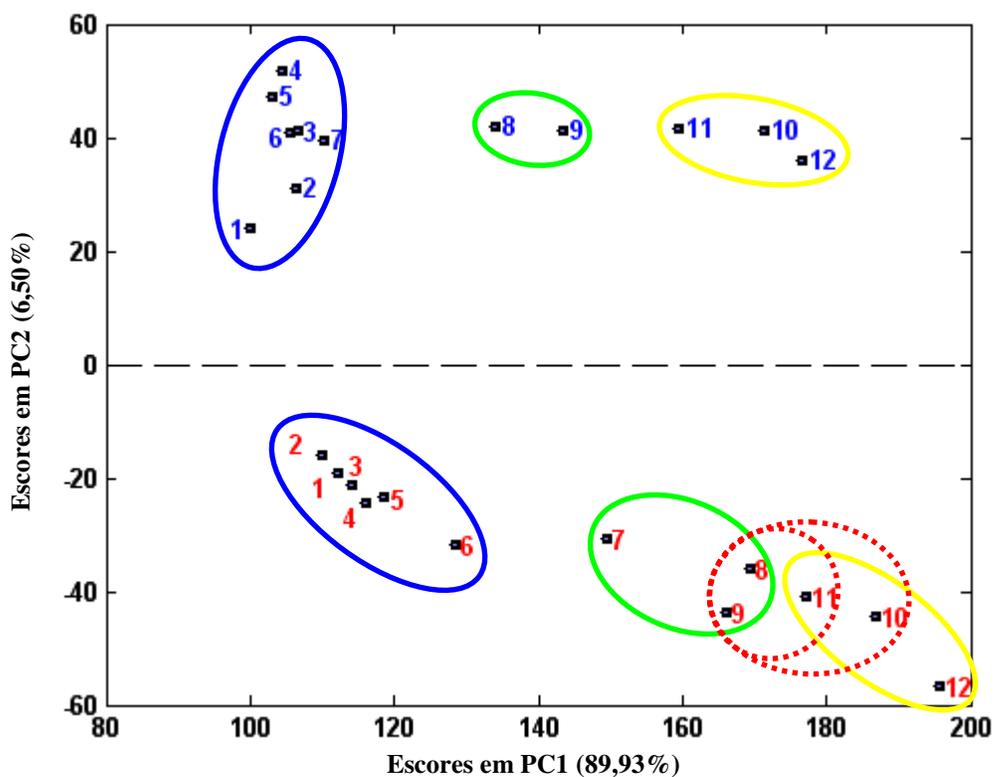


Figura 53 – MPCA para a amostra de *Malvaviscus penduliflorus* sob radiação UV.

A **Figura 54** apresenta os resultados da aplicação de MPCA para os dados das amostras sem e com exposição à radiação UV analisados simultaneamente. Ao se analisar PC1 x PC2, foram separados o meio ácido com levemente alcalino do meio alcalino e também do meio extremamente alcalino. Comparando-se os resultados da aplicação de MPCA para as amostras sem e com radiação UV, nota-se que existe uma grande semelhança na forma de separação das amostras, e possibilita visualizar que se trata de diferentes matrizes de dados. Comparando-se os resultados da aplicação de MPCA nos extratos das diferentes plantas sem e com radiação UV, nota-se que a separação ocorrida assemelha-se à observada para a espécie *Hibiscus sabdariffa*. Porém, neste caso, a PC1 separou os dados da matriz irradiada, enquanto a PC2 os dados da matriz não exposta a radiação.



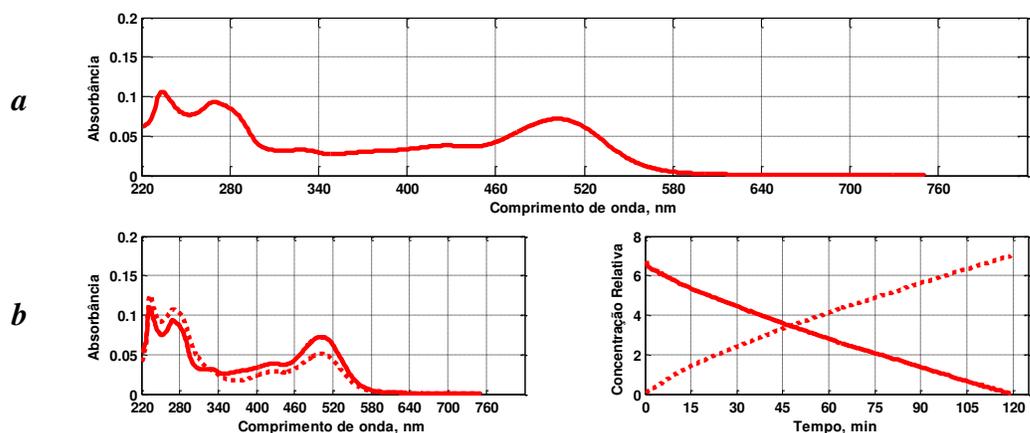
Sem UV (x)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pH	2,50	3,98	5,12	6,13	7,22	8,12	8,67	9,32	9,88	10,80	11,83	12,42
Luz UV (x)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pH	2,42	4,08	5,12	6,12	7,12	8,16	8,47	9,32	9,75	10,93	11,70	12,72

**Figura 54** – MPCA para as amostras de *Malvaviscus penduliflorus* na condição S (**n**) e na condição D (**n**).

Após a estimativa inicial do número de fatores para cada matriz foi aplicado MCR-ALS para a obtenção de informações sobre os espectros das substâncias puras e suas respectivas concentrações, assim como foi feito para as plantas analisadas anteriormente.

Em pH 2,50, a análise por PCA e SVD nos dados da amostra não exposta a radiação mostra que 1 componente é suficiente para explicar a variância dos dados. Dessa forma, não foi possível a aplicação de MCR-ALS. O espectro que representa a espécie presente neste meio está apresentado na **Figura 55 - a**. Para a amostra exposta à radiação UV, a aplicação de PCA e SVD sugerem a existência de 3 componentes. No entanto, aplicação de MCR-ALS mostrou que a 3ª componente deve servir apenas para a modelagem dos ruídos, e por isso foram considerados apenas 2 fatores, como mostra a **Figura 55 - b**. Para esta planta, o extrato mostra que o máximo de absorção na região visível está próximo a 510 nm, o que indica que deve estar presente uma antocianina diferente daquela encontrada para as plantas analisadas anteriormente.

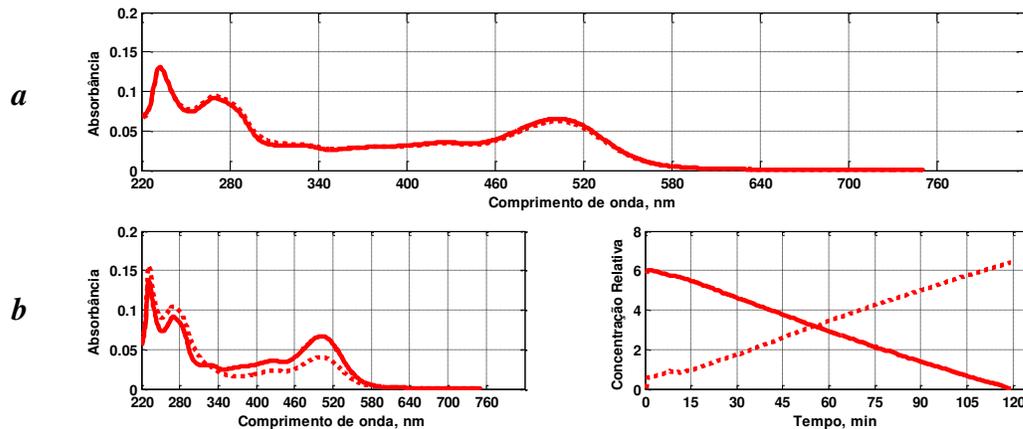
A estabilidade da forma cátion flavílico, predominante em meio ácido, na condição  $\underline{S}$  (**Figura 55 - a**) concorda com os resultados obtidos para as antocianinas das plantas anteriormente analisadas neste meio nesta mesma condição, porém, o extrato de *Malvaviscus* é aparentemente mais estável quando submetido à radiação UV. Observa-se na **Figura 55 - b**, que a diminuição da região visível é proporcional ao aumento na região ultravioleta, o que pode indicar um equilíbrio entre as formas colorida (cátion flavílico) e incolor (carbinol).



**Figura 55** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Malvaviscus penduliflorus* referentes **a** - ao pH 2,50 na condição S e **b** - pH 2,42 na condição D.

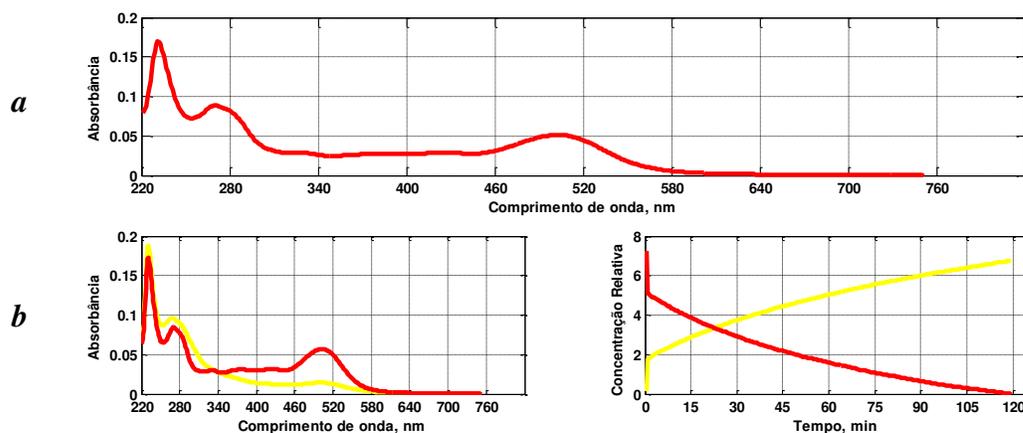
A aplicação de PCA e SVD na matriz de dados da amostra não exposta à radiação UV em pH aproximadamente 4 mostra que deve estar presente apenas uma espécie. Dessa forma, o método MCR-ALS não pode ser aplicado neste conjunto de dados. O espectro que representa a espécie presente neste meio é idêntico ao recuperado no meio anterior, e está apresentado na **Figura 56 – a**. Para esta condição, as antocianinas presentes em *Malvaviscus Penduliflorus* mostram-se tão estáveis quanto aquelas encontradas no *Hibiscus acetosella*, sendo que ambas são mais estáveis que as antocianinas monitoradas no *Hibiscus sabdariffa*. Ao aplicar-se PCA e SVD nos dados referentes à amostra sob condição D, sugere-se a presença de 2 espécies. Da mesma forma que para a amostra em condição S, os resultados obtidos com a utilização de MCR-ALS são idênticos aos obtidos para o meio anterior e estão ilustrados na **Figura 56 - b**. Para este meio, espera-se que esteja presente a forma cátion flavílico ( $AH^+$ ), e por isso sugere-se que o espectro representado pela linha contínua em cor vermelha seja da espécie cátion flaví-

lico. Como discutido anteriormente, a linha pontilhada pode sugerir o deslocamento do equilíbrio para a forma carbinol (B).



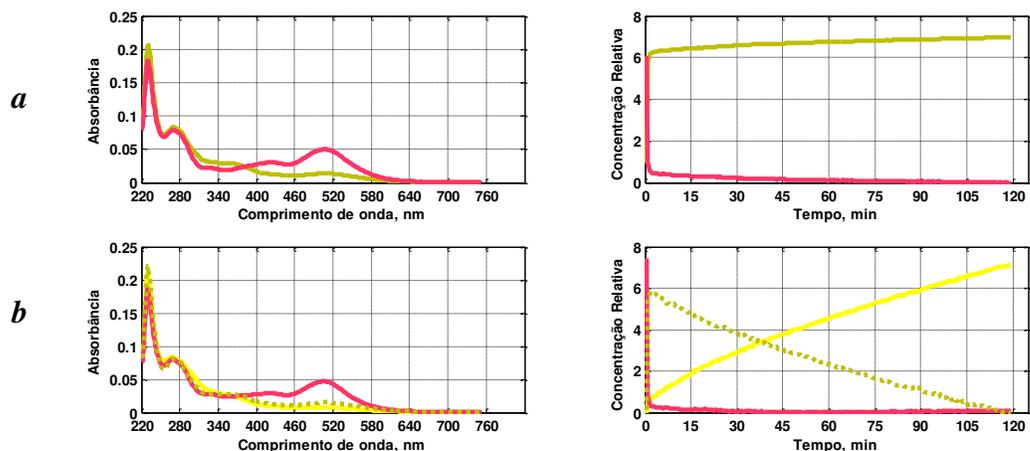
**Figura 56** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Malvaviscus penduliflorus* referentes ao pH aproximadamente 4 nas condições S (a) e D (b).

Para o meio com pH 5,12 os resultados foram bastante similares aos obtidos para o *Hibiscus acetosella*, como ilustrado na **Figura 57 – a** para a condição S e **b** para a condição D. A aplicação de PCA e SVD nas matrizes de dados sugere a presença de apenas 1 espécie para a condição S e 2 formas que para a condição D. Para este meio, a amostra sob condição S apresenta resultado similar ao observado para *Hibiscus acetosella* enquanto que para a condição D, **Figura 57 – b**, apresenta resultados parecidos aos observados para a amostra de *Hibiscus Sabdariffa*. A amostra na condição S segue estável durante o monitoramento de 120 minutos. O equilíbrio proposto para este meio deve envolver as formas cátion flavílico ( $AH^+$ ) e carbinol (B), como mostrado anteriormente no esquema apresentado na **Figura 22**.



**Figura 57** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Malvaviscus penduliflorus* referentes ao pH 5,12 nas condições - **a** - **S** e **b** - **D**.

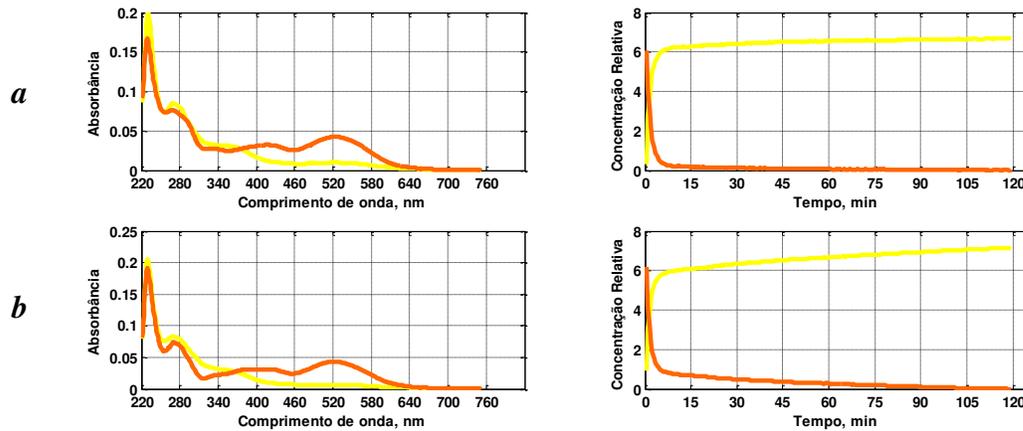
Em pH 6,1, os resultados da análise por PCA e SVD nos dados da amostra na condição **S** sugerem a presença de 2 componentes enquanto que para a condição **D** os resultados sugerem a presença de 3 componentes. A aplicação de MCR-ALS para as condições **S** e **D** estão apresentadas na **Figura 58** - **a** e **b**, respectivamente. Para este meio, encontram-se presentes algumas formas incolores que predominam sobre as formas coloridas chamadas de anidrobases quinoidais (A). Como as estruturas presentes neste meio são formadas a partir do deslocamento de equilíbrio da forma cátion flavílica ( $AH^+$ ), este mesmo também pode ser detectado neste meio. Neste valor de pH, o equilíbrio ocorre principalmente entre as espécies Carbinol (incolor) e Quinoidal (colorida), porém, as Chalconas (incolores) podem começar a aparecer. Os equilíbrios mais prováveis para este meio foram apresentados anteriormente na **Figura 24**.



**Figura 58** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Malvaviscus penduliflorus* referentes ao pH aproximadamente 6,1 nas condições - **a** - S e **b** - D.

Em pH 7,22 a aplicação de PCA nos dados da amostra em condição S mostram que 2 componentes explicam praticamente toda a variância dos dados, o que é confirmado pela aplicação de SVD. A aplicação de PCA e SVD na matriz de dados da amostra em condição D também sugere a presença de 2 componentes. Os resultados da aplicação de MCR-ALS para os dois casos estão apresentados na **Figura 59** – **a** (condição S) e **b** (condição D). Os perfis cinéticos recuperados mostram que as espécies coloridas estão presentes apenas nos primeiros instantes da reação, tanto para a amostra na condição S quanto para a condição D. Os espectros obtidos para a planta *Malvaviscus penduliflorus* apresentam perfis diferentes dos recuperados para *Hibiscus acetosella* e *Hibiscus sabdariffa* para este meio, entretanto, é possível notar o deslocamento batocômico sofrido em igual extensão entre *Malvaviscus penduliflorus* e *Hibiscus acetosella*. A principal diferença no perfil dos es-

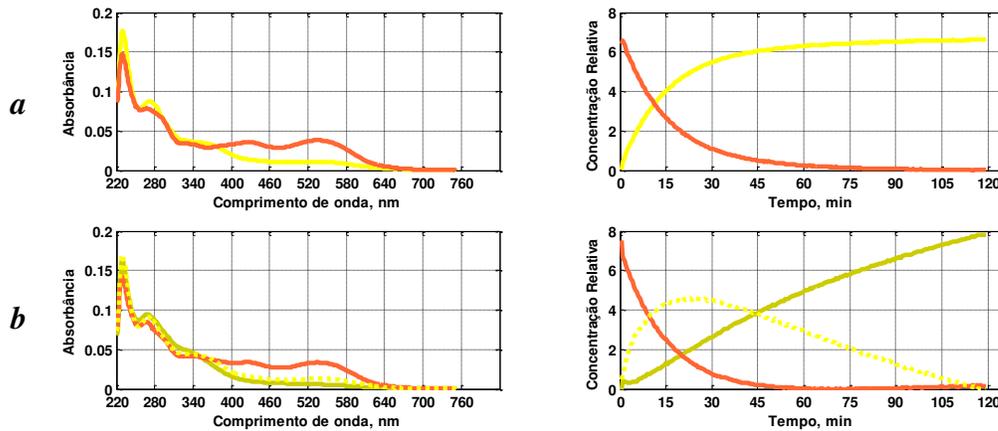
pectros obtidos está no aparecimento da banda na região próxima a 410 – 420 nm.



**Figura 59** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Malvaviscus penduliflorus* referentes **a** - ao pH 7,22 na condição S e **b** – pH 7,12 na condição D.

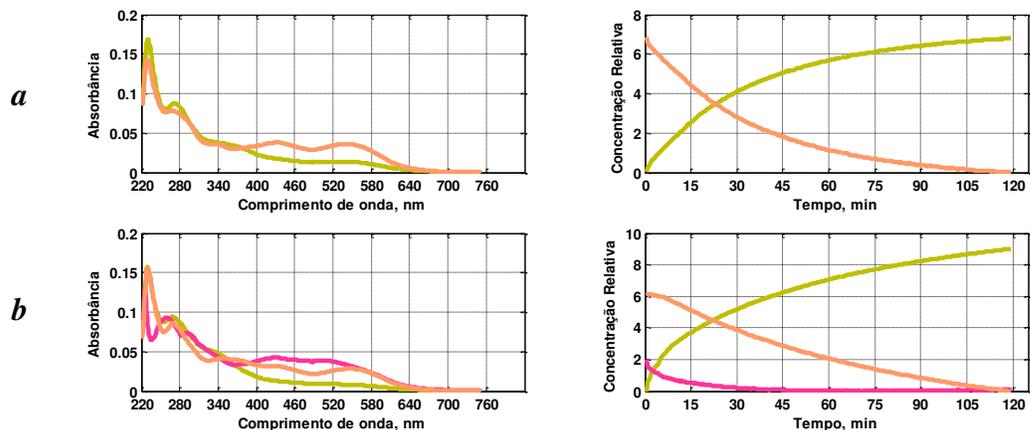
Para os valores de pH 8,12 (condição S) – 8,16 (condição D), os resultados da aplicação de PCA e SVD sugerem a presença de 2 e 3 componentes, respectivamente. Os resultados da aplicação de MCR-ALS, apresentados na **Figura 60**, mostram que para as duas condições a banda de máxima absorção na região visível sofre um efeito batocrômico, se deslocando para a região próxima a 570 nm. Os espectros recuperados para *Malvaviscus penduliflorus*, em pH 8,12, estão de acordo com os obtidos para a amostra de *Hibiscus acetosella* quando exposta a radiação UV, e com o *Hibiscus sabdariffa* para a amostra não exposta. A espécie que, na amostra em condição S aparece aumentando sua concentração com o tempo (ilustrada pela linha be-

ge), aparece como uma possível espécie intermediária na amostra em condição D.



**Figura 60** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Malvaviscus penduliflorus* referentes ao pH aproximadamente 8,1 nas condições - **a** - S e **b** - D.

Para o meio com pH 8,67, a aplicação de PCA nos dados da amostra sob condição S utilizou 2 PCs para explicar 100% da variância: PC1 99,46% e PC2 0,54%. Para a amostra exposta a radiação UV (D) foram utilizados 3 componentes. Os resultados de SVD confirmaram o número de componentes sugeridos pela aplicação de PCA. Dessa forma, aplicação de MCR-ALS recuperou os espectros e os perfis cinéticos apresentados na **Figura 61** - **a** para a condição S e - **b** para a condição D.



**Figura 61** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Malvaviscus penduliflorus* referentes **a** - ao pH 8,67 na condição S e **b** – pH 8,47 na condição D.

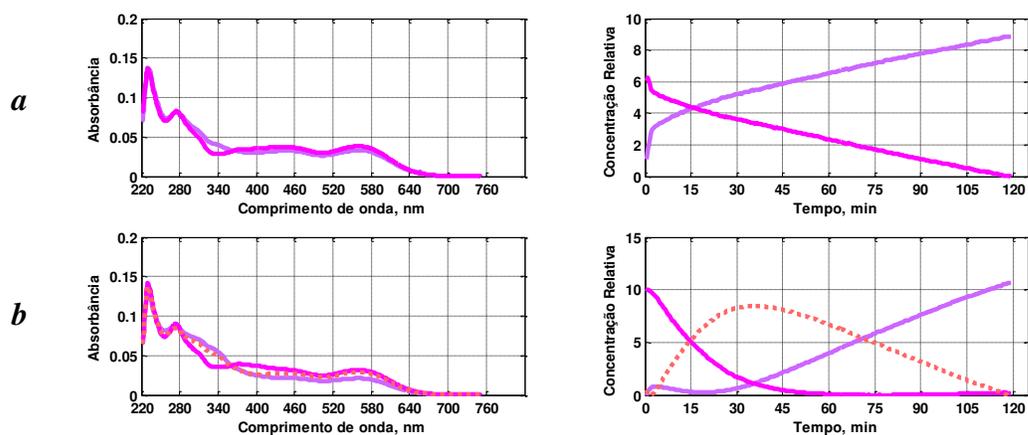
Os espectros recuperados para a amostra na condição S são bastante similares aos encontrados no meio anterior (pH 8,1). A amostra na condição D, no entanto, apresenta um espectro diferente de todos aqueles que já foram encontrados (espectro ilustrado pela linha rosada). A cinética apresentada para este espectro mostra que esta substância deve estar presente, em pequena quantidade, apenas no início do monitoramento, podendo ser uma espécie proveniente do meio ácido, que pode ser detectada no primeiro instante da mistura quando se está adicionando a amostra na solução tampão. Tanto neste meio quanto para o meio anterior, devem estar presentes estruturas predominantemente na forma de chalconas (incolores) e anidrobases (coloridas).

Valores de pH mais elevados favorecem a formação das anidrobases, que são espécies que absorvem na região visível do espectro, e nestas condições devem aparecer em suas formas ionizadas. Em pH 9,32, a análise de

componentes principais aplicada ao conjunto de dados referente à amostra na condição S necessitou de 2 PCs para explicar a variância total. Da mesma forma, a aplicação de SVD sugere a presença de 2 componentes para esta condição. Os resultados da aplicação de PCA e SVD sugerem a presença de 3 componentes na condição D. A aplicação de MCR recuperou os espectros e seus respectivos perfis cinéticos apresentados na **Figura 62 – a** para a condição S e **b** para a condição D. Observa-se no perfil cinético recuperado para a condição D um comportamento distinto: uma das espécies diminui sua concentração, aumentando em seguida. De acordo com trabalhos realizados anteriormente<sup>121</sup> esse comportamento ocorre devido uma mudança de ordem da reação decorrente de uma reação consecutiva, a qual pode ser interpretada de duas formas diferentes. A primeira considera que na solução existe uma mistura de anidrobases ionizadas ( $A^-$ ) e cis-chalcona ( $C_C$ ), sugerindo que o primeiro estágio corresponde à formação de  $C_C^-$  por  $A^-$  da mistura, enquanto que o segundo representa a formação de  $C_C^-$  por  $C_C$ . A última conversão deve proceder via  $A^-$ , desde que  $A^-$  seja convertido para  $C_C^-$ , mais rapidamente que para  $C_C$ . Se esta análise estiver correta, as absorvâncias nos estágios rápido e lento devem ser proporcionais às concentrações de  $A^-$  e  $C_C$ , respectivamente. Outra interpretação para este comportamento cinético, seria considerar a presença de uma outra espécie que absorve no mesmo comprimento de onda, uma vez que as antocianinas não foram isoladas. De acordo com Maestri<sup>120</sup>, a luz pode causar a interconversão entre espécies. Sendo assim, considerando que estes experimentos tenham sido realizados em pH fixo, e não com variação de pH como reportado por McClelland<sup>122,123</sup>, podemos inferir a princípio que esta reação consecutiva possa ser devido a interconversão das espécies por incidência de luz. Para reforçar a teoria de que a interconversão e, portanto, a mudança de ordem, deve ser causada pela incidên-

cia de radiação, Carlsen e Stapelfeldt<sup>124</sup> comprovaram a existência de processos fotoquímicos na degradação das antocianinas do extrato da *Sambucus nigra L.* pela luz ultravioleta. Eles concluíram que o rendimento quântico para a foto-degradação é dependente somente do comprimento de onda da radiação.

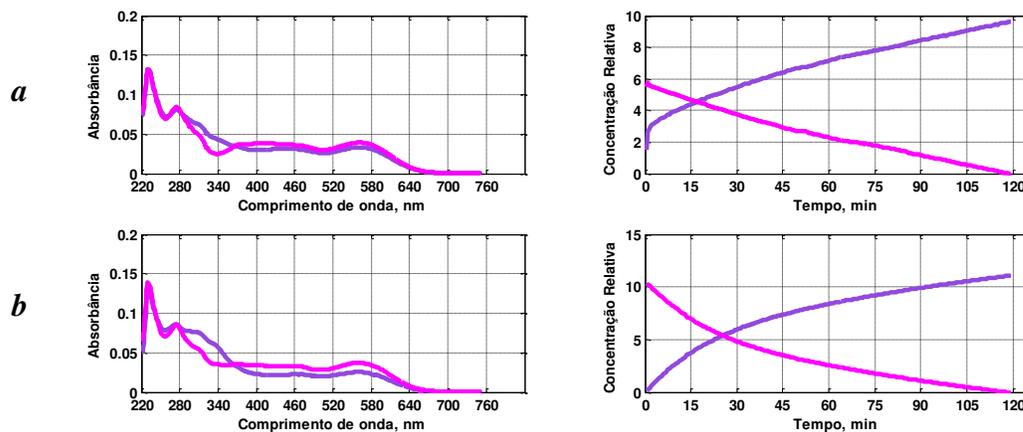
Este modelo também tem sido aplicado com sucesso no estudo cinético de vários tipos de corantes artificiais<sup>125</sup>.



**Figura 62** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Malvaviscus penduliflorus* referentes ao pH 9,32 nas condições - **a** - **S** e **b** - **D**.

Os resultados da aplicação de MCR-ALS mostram que a variação nos espectros acontece na região de 280 a 400 nm, tanto para a amostra na condição **S** quanto na condição **D**. Como todos os espectros recuperados apresentam bandas na região visível, os mesmos são atribuídos às anidrobases ionizadas.

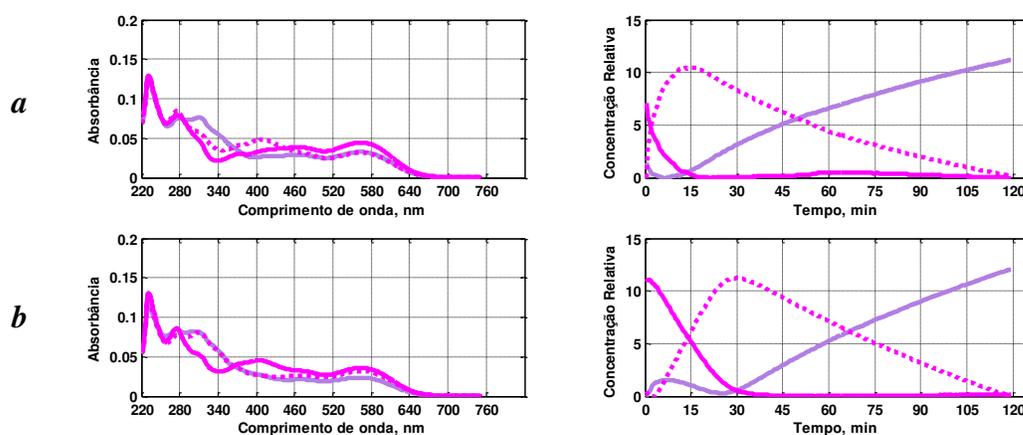
A aplicação de PCA e SVD na amostra sob condição S em pH 9,88 sugere a presença de 2 componentes. Para os dados da amostra sob condição D a análise por PCA e SVD igualmente sugerem a presença de 2 espécies. Os espectros e seus respectivos perfis cinéticos recuperados por MCR-ALS foram bastante similares aos encontrados em pH 9,32, e estão apresentados na **Figura 63 – a** para a condição S e **b** para a condição D. Devido à semelhança observada, propõe-se que os equilíbrios presentes devem envolver as mesmas anidrobases presentes no meio anterior. Um fato interessante observado neste meio é que a cinética da amostra exposta à radiação UV é mais lenta que para a amostra não exposta.



**Figura 63** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Malvaviscus penduliflorus* referentes **a** - ao pH 9,88 na condição S e **b** - pH 9,75 na condição D.

A análise de componentes principais para os dados da amostra não exposta à radiação em pH 10,8 utilizou 3 componentes para explicar a variância dos dados. A análise por SVD destes dados igualmente sugere a pre-

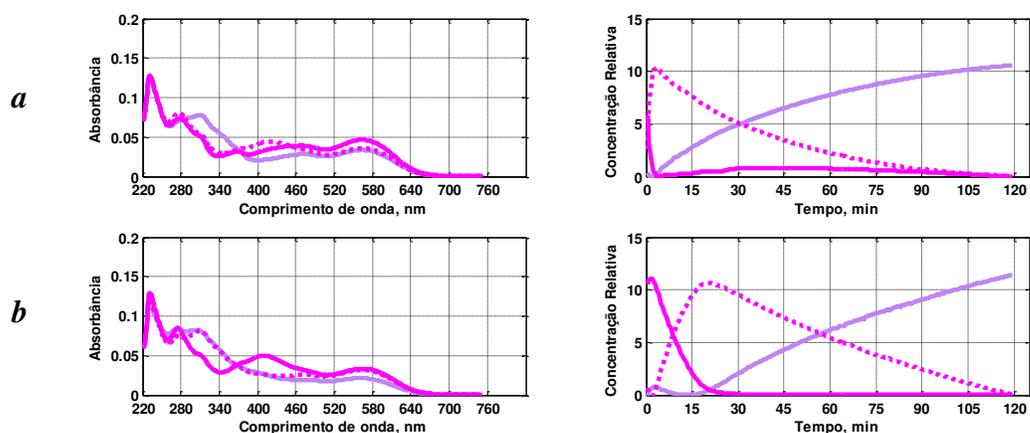
sença de 3 espécies. Para a amostra exposta à radiação a análise dos resultados de PCA e SVD também sugerem a presença de 3 componentes. Os espectros e o perfil cinético recuperados por MCR-ALS estão apresentados na **Figura 64 – a** para a condição S e **b** para a condição D. Para este meio, as principais alterações nos espectros com relação aos espectros obtidos no meio anterior acontecem na região entre aproximadamente 300 e 430 nm. A espécie que aparece como provável intermediária na amostra sob condição S (linha rosa pontilhada na **Figura 50 – a**) apresenta o mesmo perfil espectral presente desde o princípio do monitoramento na condição D (linha rosa sólida na **Figura 64 – b**). Novamente é possível verificar pelos perfis cinéticos recuperados por MCR-ALS uma possível mudança de ordem da reação.



**Figura 64** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Malvaviscus penduliflorus* referentes **a** - ao pH 10,80 na condição S e **b** – pH 10,93 na condição D.

Em pH 11,83 a análise por PCA mostrou a necessidade de 2 fatores para explicar a variância dos dados da amostra na condição S e 3 fatores na condição D. No entanto, para a amostra não exposta a radiação, a decompo-

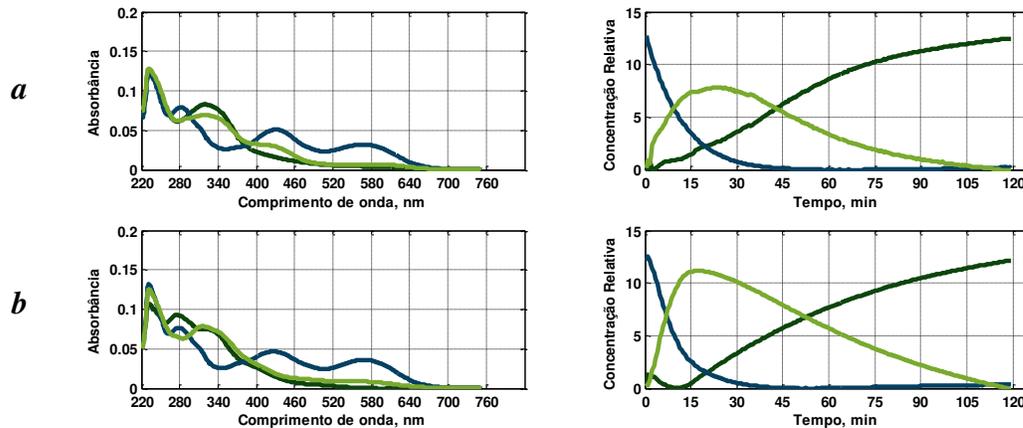
sição em valores singulares indicou a possibilidade de um terceiro fator. A **Figura 65** apresenta os espectros e suas respectivas evoluções durante o monitoramento, recuperados por MCR-ALS para as amostras na condição **a** – S e **b** D. Os espectros são idênticos aos observados em pH aproximadamente 10,9, tanto para a condição S quanto para a condição D, e novamente é possível observar uma reação com mudança de ordem<sup>121</sup>.



**Figura 65** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Malvaviscus penduliflorus* referentes **a** - ao pH 11,83 na condição S e **b** – pH 11,70 na condição D.

Em pH acima de 12 os resultados da aplicação de PCA e SVD na amostra sem exposição a radiação sugerem que 3 fatores explicam praticamente toda a variância dos dados. Sob condição D os resultados de PCA mostram a necessidade de 4 fatores para explicar praticamente toda a variância dos dados, no entanto, a aplicação de MCR-ALS mostrou que a consideração do 4º fator para a amostra em condição D gera um perfil exatamente igual ao do 3º. Dessa forma, foram considerados apenas 3 fatores. Os resul-

tados da aplicação de MCR-ALS para as duas condições estão apresentados na **Figura 66**. Os perfis dos espectros e suas respectivas cinéticas são muito parecidos, no entanto, comparando com os resultados das amostras de *Hibiscus acetosella* e *Hibiscus sabdariffa* para este valor de pH, os espectros são diferentes: a banda presente na região entre 400 e 460 nm não aparece nestas amostras, e além disso, a região ultravioleta apresenta bandas diferentes das encontradas para as amostras anteriores. De qualquer forma, devido o pH do meio, sugere-se que o equilíbrio aconteça entre as formas cis-chalcona ionizada ( $C_C^-$ ), trans chalcona ionizada ( $C_T^-$ ) e anidrobases ionizadas ( $A^{2-}$ ). Para a amostra exposta à radiação UV, a cinética apresenta novamente uma possível mudança de ordem da reação<sup>121</sup>, como explicado anteriormente.



**Figura 66** – Espectros e perfil Cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS nas matrizes de dados de *Malvaviscus penduliflorus* referentes ao meio com pH acima de 12 nas condições - **a** - S e **b** - D.

### 5.9.2 – Análises de Matrizes Aumentadas

Como se pode observar para as análises realizadas para as matrizes individuais, o problema de *deficiência de posto*, ou seja, o número de espécies presentes na mistura é um dos pontos mais difíceis de resolver. Isso se deve ao fato de que a maioria dos métodos de análise de fatores foi desenvolvida baseando-se em sistemas nos quais não existe deficiência de posto<sup>63</sup>. Por exemplo, métodos baseados na decomposição de valores singulares falham na detecção do número correto de contribuição química em uma matriz simples onde existe grande similaridade entre os espectros das espécies ou perfis de concentração que evoluem ao mesmo tempo. Para resolver esse problema, a estratégia das matrizes aumentadas pode ser uma ferramenta muito simples, versátil e poderosa. Esta técnica consiste em organizar as matrizes umas sobre as outras, formando uma nova matriz com dimensões  $(I \times K, J)$ , onde  $I$  é o número de tempos (espectros) obtidos em cada pH,  $J$  é o número de comprimentos de onda de cada espectro e  $K$  é o número de matrizes diferentes incluídas na análise simultânea. Essa forma de aumentar as matrizes permite analisar a variabilidade entre as amostras com diferentes valores de pH, resumindo a informação nos dados com respeito as variáveis e suas variações espectrais. A **Figura 67** apresenta a forma em que as matrizes foram aumentadas neste trabalho.

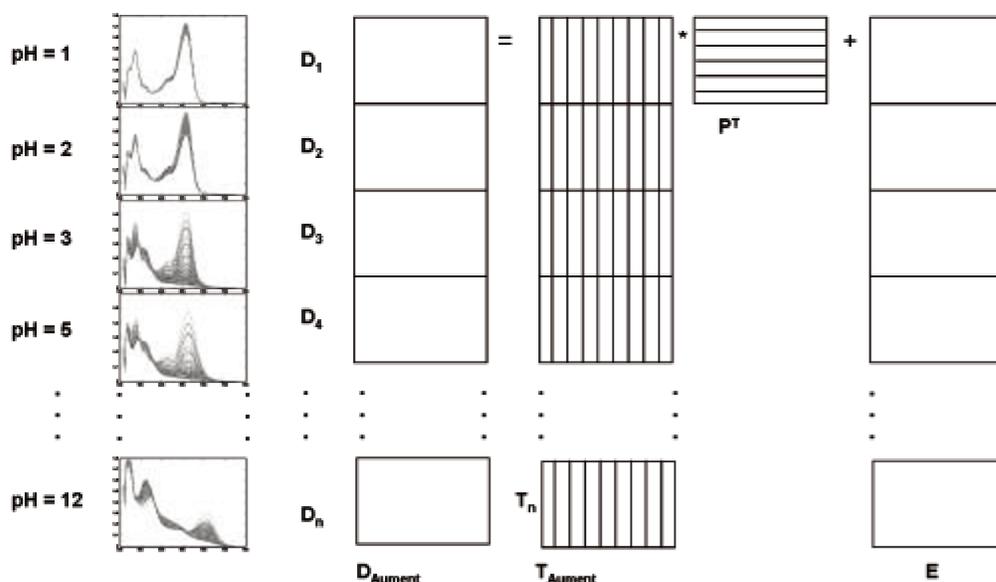


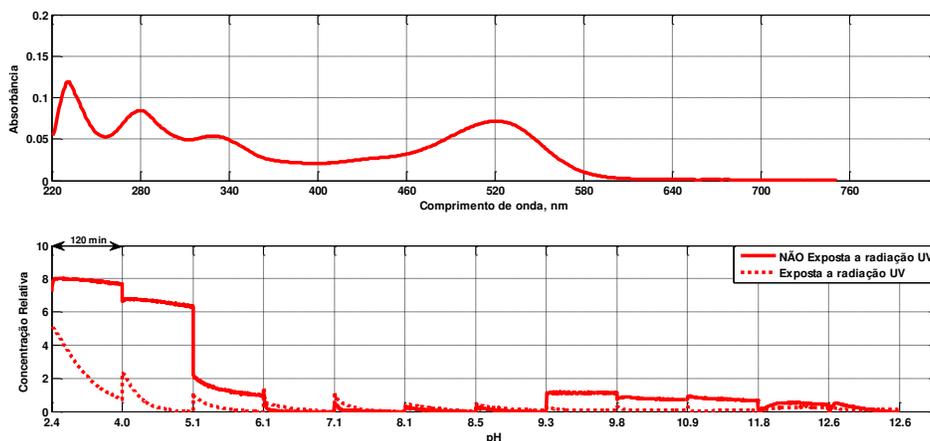
Figura 67 - Forma de aumento das matrizes utilizadas para a aplicação de MCR-ALS

### 5.9.2.1 – Análises de Matrizes Aumentadas para *Hibiscus acetosella*

A aplicação de MCR-ALS nos dados da amostra de *Hibiscus acetosella* sem exposição à radiação UV, possibilitou a detecção de 8 possíveis espécies, enquanto que para a amostra exposta foram detectadas 9. Neste caso, a maior vantagem de se aplicar a estratégia das matrizes aumentadas (capítulo 4, seção 4.5.4) está na possibilidade em detectar quais espécies são comuns em diferentes valores de pH, e como estas espécies evoluem em diferentes valores de pH, além de facilitar a observação do efeito da exposição à radiação UV. A parte superior da **Figura 68** apresenta o espectro puro resolvido por MCR-ALS para o cátion flavílico. A parte de baixo da **Figura 68** apresenta a evolução desta espécie com o tempo e pH quando a amostra foi analisada com exposição (linha pontilhada) e sem exposição (linha contínua) à radiação UV para os 24 experimentos (matrizes de dados) analisados simul-

taneamente. A evolução dos perfis cinéticos (concentração relativa) apresentado por esta espécie indica que a radiação acelera a degradação do cátion flavílico, tornando esta espécie mais instável com o aumento do pH.

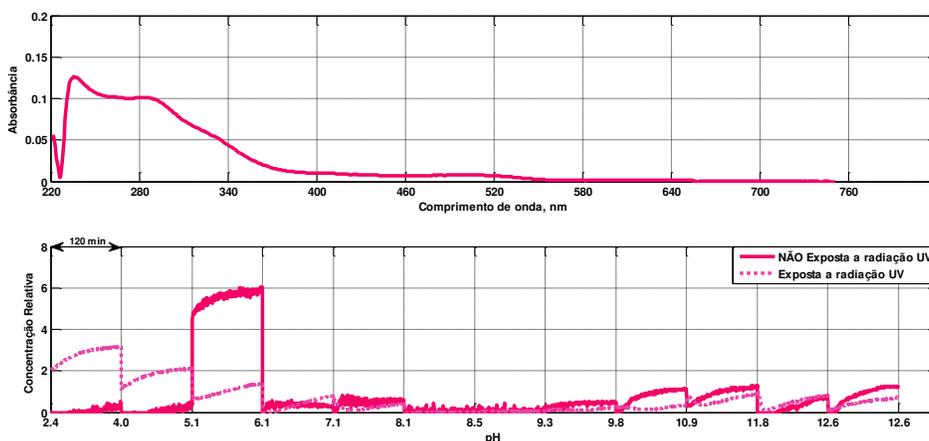
O comportamento observado está de acordo com o esperado para esta espécie, que deve estar presente somente em meio ácido. O aumento observado no perfil de concentração em meio alcalino é causado por ajustes da equação, como por exemplo o uso de restrições (nesse caso a não negatividade), pois sabe-se que o cátion não pode estar presente em valores de pH elevados.



**Figura 68** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para o cátion flavílico ( $AH^+$ ) presente na amostra de *Hibiscus acetosella* com exposição (linha pontilhada) e sem exposição à radiação UV (linha contínua).

A análise por MCR-ALS detectou a presença de uma espécie que parece ser um intermediário entre o cátion flavílico e outra estrutura, que pode ser uma forma de anidrobases ou a forma carbinol. Esta espécie está presente

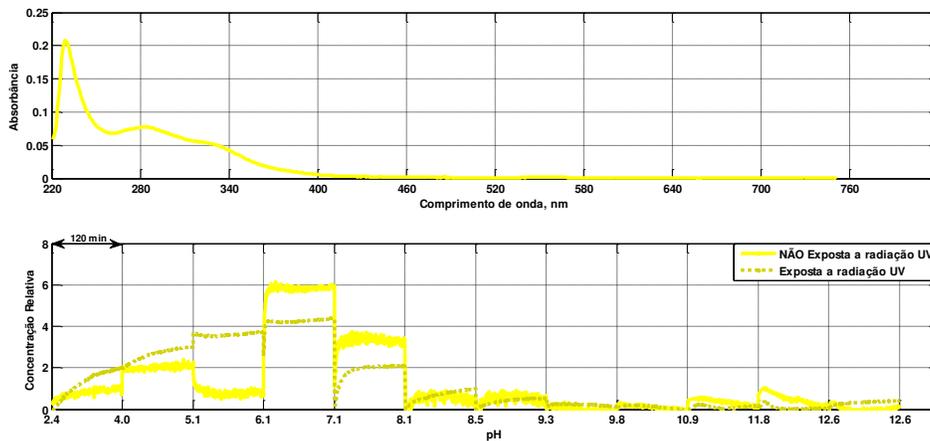
em meio ácido e aumenta sua concentração com a degradação do cátion flavílico. Sua maior estabilidade é verificada no intervalo de valores de pH que vai de 2,4 até 6,1 e para valores de pH acima disso, esta não é mais detectada. A parte superior da **Figura 69** apresenta o espectro puro resolvido por MCR-ALS e a parte inferior a evolução desta espécie com o tempo e pH quando a amostra foi analisada em condição S (linha contínua) e em condição D (linha pontilhada) para os 24 experimentos (matrizes de dados) analisados simultaneamente.



**Figura 69** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para um intermediário presente em meio ácido na amostra de *Hibiscus acetosella* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

Como em toda reação envolvendo equilíbrio químico, a diminuição na concentração do cátion flavílico em meio ácido implica no aumento da concentração de outra(s) substância(s). Neste caso, além do intermediário apresentado na **Figura 69** a aplicação de MCR-ALS mostra que acontece o aumento do carbinol (B), apresentado na **Figura 70**. Os resultados apresentados na parte inferior da figura, onde está apresentada a evolução da concen-

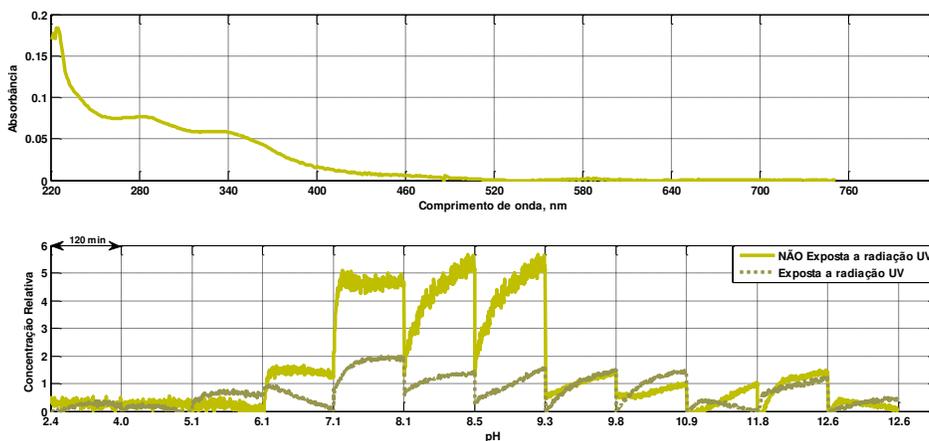
tração com o tempo e pH, mostram que a evolução do carbinol não é influenciada pela exposição a radiação, e além disso, que esta espécie deve estar presente em meio neutro com maior estabilidade: a concentração aumenta com o aumento de pH, apresentando maior estabilidade entre pH 5 e 7.



**Figura 70** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para o Carbinol (B) presente na amostra de *Hibiscus acetosella* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

Como mostrado na seção sobre análise individual de matrizes, a partir do meio neutro começam a aparecer as chalconas. A aplicação de MCR-ALS utilizando a estratégia das matrizes aumentadas recuperou o espectro e os perfis de concentração com sua evolução em relação ao tempo e pH para uma substância que aparece em meio neutro (pH 6,1), que diminui de concentração a partir do meio alcalino (pH 9,8), como mostra a **Figura 71**. Com base na literatura e nos resultados obtidos para as matrizes individuais, sugere-se que o perfil espectral, com características de uma substância que não absorve na região visível, e o comportamento apresentado por esta espécie, seja proveniente da forma cis-chalcona. A amostra exposta à radiação UV

apresenta-se menos intensa que para a amostra não exposta. Assim, a radiação parece influenciar de forma a inibir a formação destas espécies.

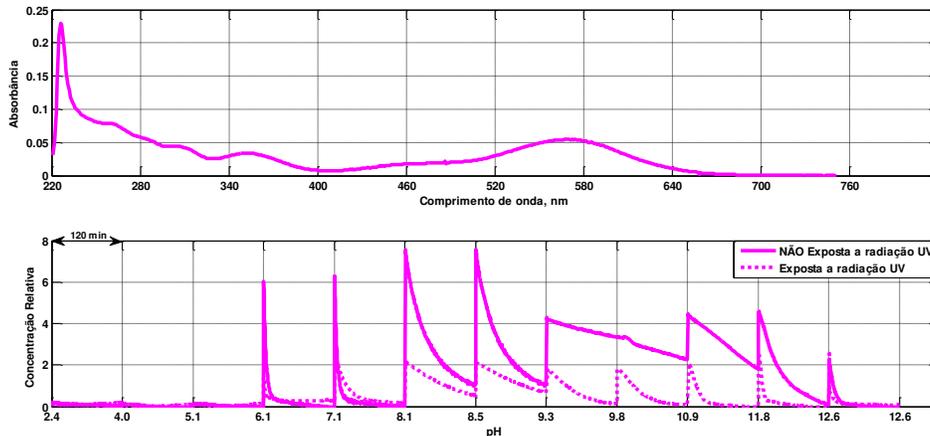


**Figura 71** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável Chalcona (C), presente na amostra de *Hibiscus acetosella* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

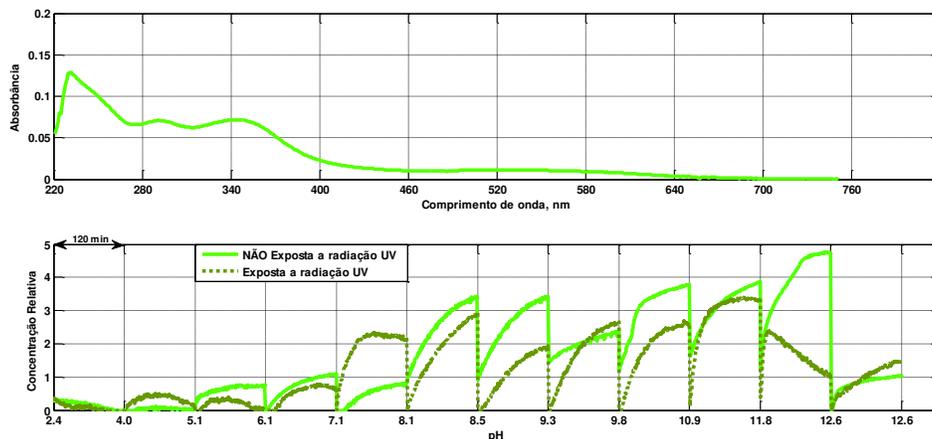
Em meio neutro podem estar presentes, além das chalconas, formas de anidrobases quinoidais (A), provenientes do cátion flavílico. De acordo com os resultados obtidos para as matrizes individuais, estas formas podem surgir em pH neutro, no entanto com baixa estabilidade. A aplicação da estratégia de matrizes aumentadas em MCR-ALS recuperou o espectro para uma espécie que absorve na região visível, com as características citadas anteriormente, sugerindo que esta espécie seja uma forma de anidrobases quinoidais (A). A parte superior da **Figura 72** apresenta o espectro puro resolvido por MCR-ALS para esta espécie. A parte inferior apresenta a evolução desta espécie com o tempo e pH quando a amostra foi analisada com exposição (linha pontilhada) e sem exposição (linha contínua) à radiação UV para os 24 experimentos (matrizes de dados) analisados simultaneamente. A espécie

detectada aparece a partir de pH 6,1 mostrando-se bastante instável até pH 9,3 tanto para a amostra na condição S quanto para a condição D. A partir deste meio, a amostra não exposta a radiação (S) é mais estável que a amostra exposta a radiação (D).

A aplicação de MCR-ALS recuperou também o espectro e sua evolução com tempo e pH para uma espécie que surge em meio neutro (pH 6,1 – 7), tendo sua intensidade aumentada gradualmente até pH 11,8, como mostra a **Figura 73**. O mesmo comportamento é observado tanto para a amostra em condição S quanto em condição D. De acordo com o perfil espectral sugerido para a espécie chalcona apresentado na **Figura 71** e pelo comportamento cinético observado, sugere-se que esta possa ser uma forma de chalcona ionizada ou um isômero (a chalcona –  $C_T$ ).



**Figura 72** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para a forma Quinoidal (A), presente na amostra de *Hibiscus acetosella* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

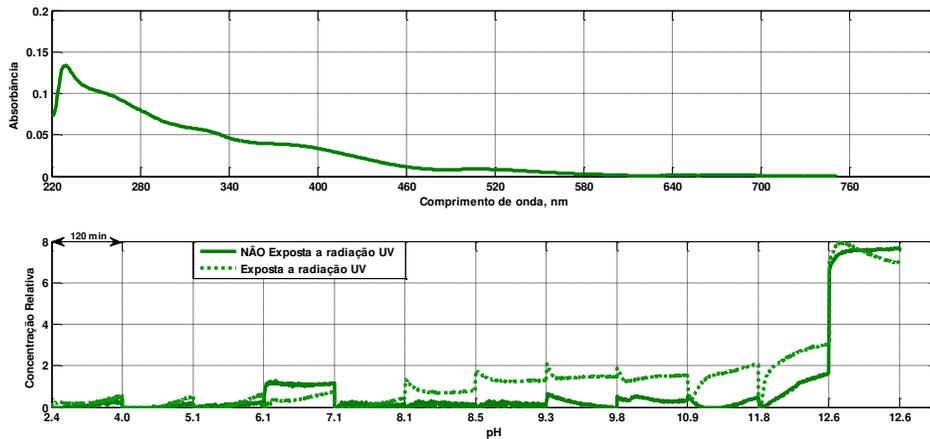


**Figura 73** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma forma de chalcona (C), presente na amostra de *Hibiscus acetosella* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

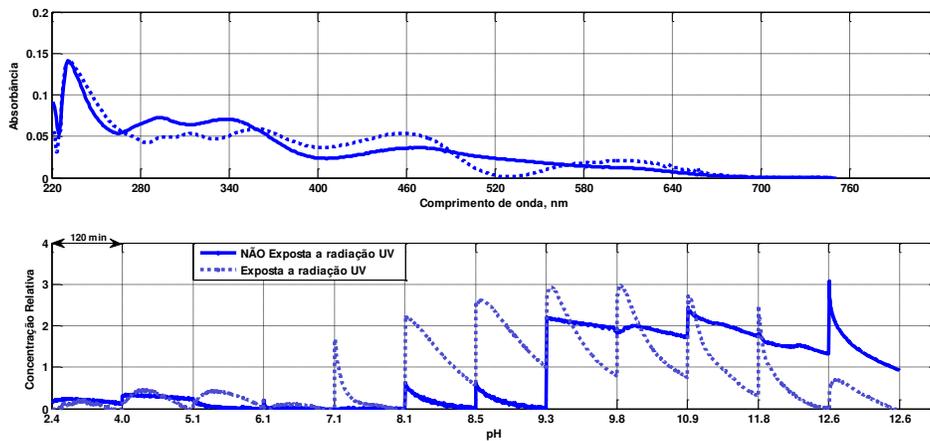
Em meio alcalino as espécies devem aparecer em suas formas ionizadas. No entanto, para este meio, não há muita informação disponível a respeito dos espectros das espécies presentes. A aplicação de MCR-ALS recuperou o espectro e o perfil cinético de uma espécie que não absorve na região visível do espectro e que aparece em meio extremamente alcalino, como mostra a **Figura 74**. Devido a estas características, sugere-se que se trata do espectro e comportamento cinético de uma forma de chalcona ionizada (C<sup>-</sup>).

Em meio extremamente alcalino a solução contendo antocianinas é colorida. Dessa forma, a aplicação de MCR-ALS recuperou perfis cinéticos e espectros diferentes para a amostra nas condições S e D. A amostra na condição S apresentou o perfil representado pela linha contínua em azul, enquanto a amostra na condição D apresentou o perfil representado pela linha pontilhada, como mostra a **Figura 75**. As referidas espécies surgem em meio levemente alcalino (pH 8,1), onde mostram estabilidade baixa. A amostra

não exposta à radiação tem sua estabilidade aumentada em meio alcalino, porém diminui sua concentração após os 120 minutos de monitoramento.

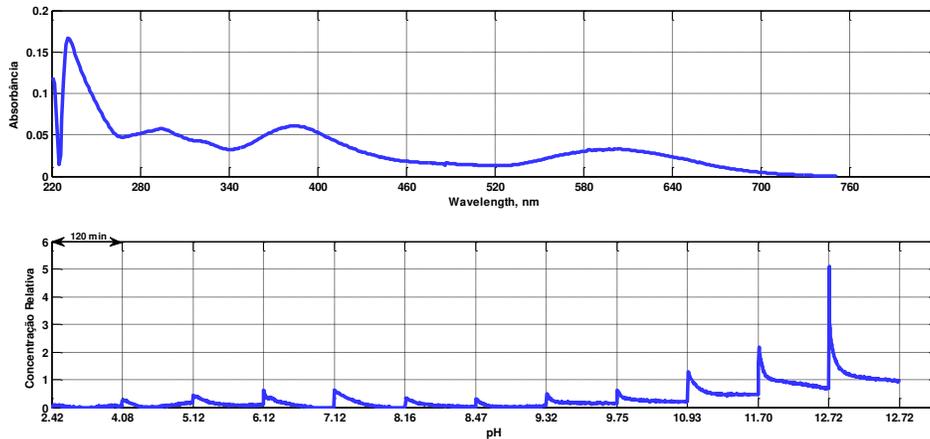


**Figura 74** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma forma de chalcona ionizada ( $C^-$ ), presente na amostra de *Hibiscus acetosella* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).



**Figura 75** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para formas de anidrobases ionizada ( $A^-$ ), presentes na amostra de *Hibiscus acetosella* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

A aplicação de MCR-ALS nos dados da amostra exposta à radiação apresentou em meio alcalino um espectro que não foi detectado para a amostra não exposta à radiação. Este espectro e sua evolução com o tempo e pH está apresentado na **Figura 76**.

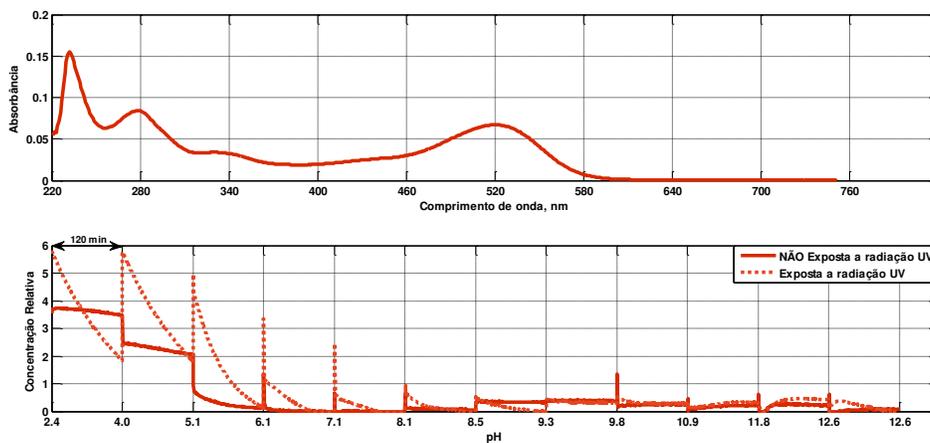


**Figura 76** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para forma de anidrobases ionizada ( $A^{2-}$ ), presente na amostra de *Hibiscus acetosella* na condição D.

### 5.9.2.2 – Análises de Matrizes Aumentadas para *Hibiscus sabdariffa*

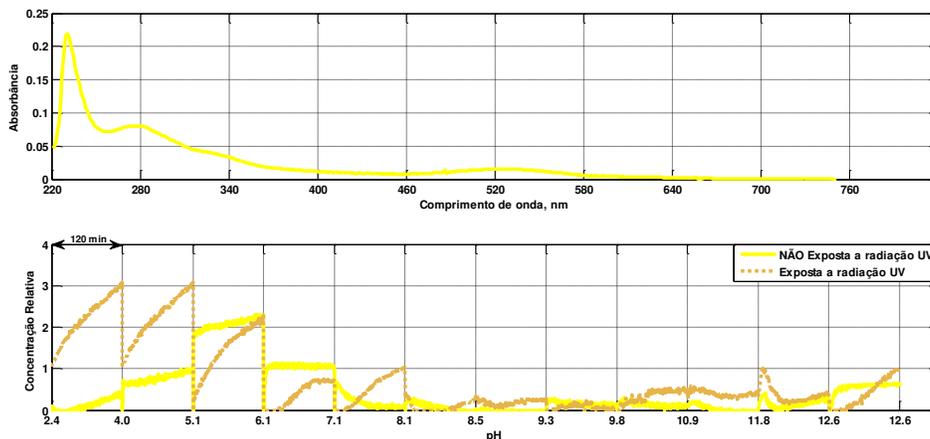
A aplicação de MCR-ALS nos dados da amostra de *Hibiscus sabdariffa* na condição S possibilitou a detecção de 7 possíveis espécies, enquanto que para a amostra exposta foram detectadas 2 espécies a mais, ou seja, 9 espécies. A parte superior da **Figura 77** apresenta o espectro puro resolvido por MCR-ALS para o cátion flavílico, enquanto que a parte inferior mostra a evolução desta espécie com o tempo e pH quando a amostra foi analisada com exposição (linha pontilhada) e sem exposição (linha contínua) a radiação UV para os 24 experimentos (matrizes de dados) analisados simultane-

amente. Da mesma forma que para o *Hibiscus acetosella*, a evolução dos perfis cinéticos (concentração relativa) apresentada por esta espécie indica que a radiação acelera a degradação do cátion flavílico, tornando esta espécie mais instável com o aumento do pH. Observa-se também sua presença em pH 9,8 devido a um possível erro na homogeneização da mistura no primeiro instante do monitoramento (como explicado na seção anterior).



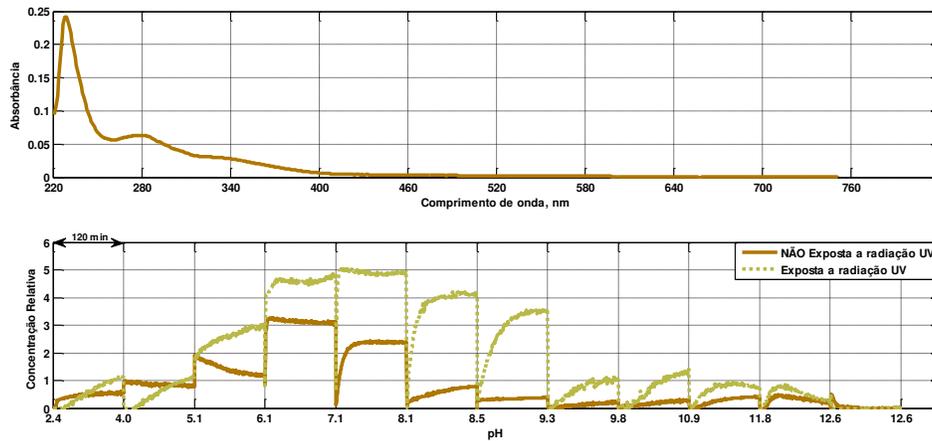
**Figura 77** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para o cátion flavílico ( $AH^+$ ) presente na amostra de *Hibiscus sabdariffa* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

O espectro e sua evolução com tempo e pH da espécie carbinol (B) também foi recuperado pela aplicação de MCR-ALS utilizando a estratégia das matrizes aumentadas, como mostra a **Figura 78**. O surgimento e desaparecimento da espécie acontece de acordo com o observado para a planta anteriormente analisada. No entanto, para a amostra na condição D o equilíbrio com a espécie cátion flavílico em meio ácido é mais evidente: enquanto o cátion flavílico tem a concentração diminuída, o carbinol aumenta.

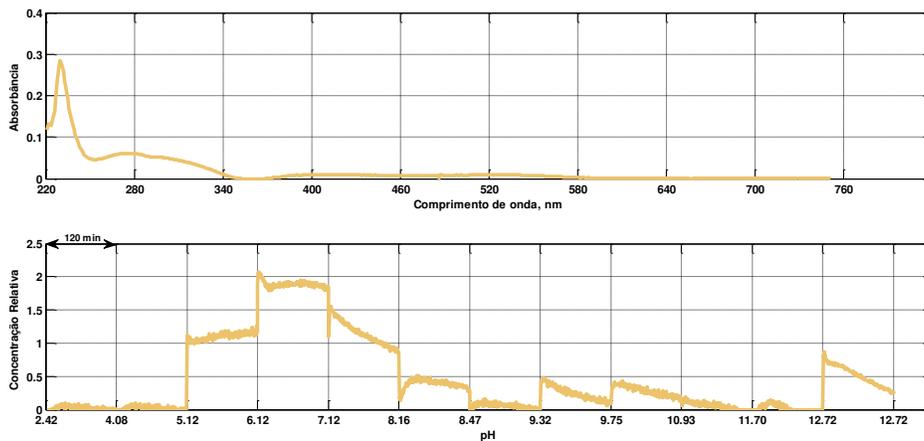


**Figura 78** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para o Carbinol (B) presente na amostra de *Hibiscus sabdariffa* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

A aplicação de MCR-ALS detectou a presença de uma espécie em meio neutro com características de uma provável chalcona: um espectro que não absorve na região visível e que está em equilíbrio com a espécie carbinol. A **Figura 79** apresenta o espectro e os perfis de concentração com sua evolução em relação ao tempo e pH para esta substância, que com base na literatura e nos resultados obtidos para as matrizes individuais, pode ser uma chalcona. A amostra exposta à radiação UV aparentemente sofre o mesmo efeito que a amostra não exposta. No entanto, foi detectado um espectro para uma espécie que aparece em meio neutro, não detectada para a amostra não exposta. Baseando-se nas características do perfil espectral e no meio em que esta substância está presente, supõe-se que esta estrutura possa ser de uma forma de chalcona. A **Figura 80** apresenta o perfil espectral e a evolução com o tempo e pH para esta substância.



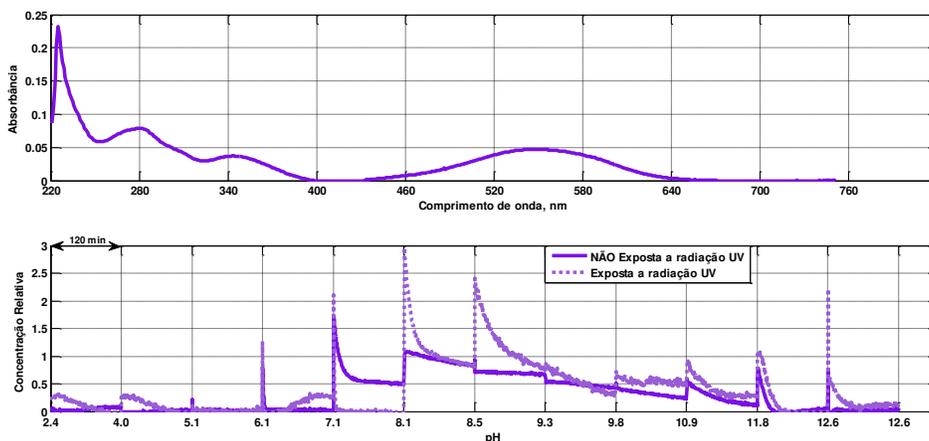
**Figura 79** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável Chalcona (C), presente na amostra de *Hibiscus sabdariffa* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).



**Figura 80** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma substância presente na amostra de *Hibiscus sabdariffa* na condição D.

Em meio neutro as anidrobases também podem ser detectadas. Estas espécies são provenientes da perda de um próton do cátion flavílico. A aplicação de MCR-ALS recuperou dois perfis espectrais diferentes, porém que surgem em meio neutro com características de substância colorida. Devido a

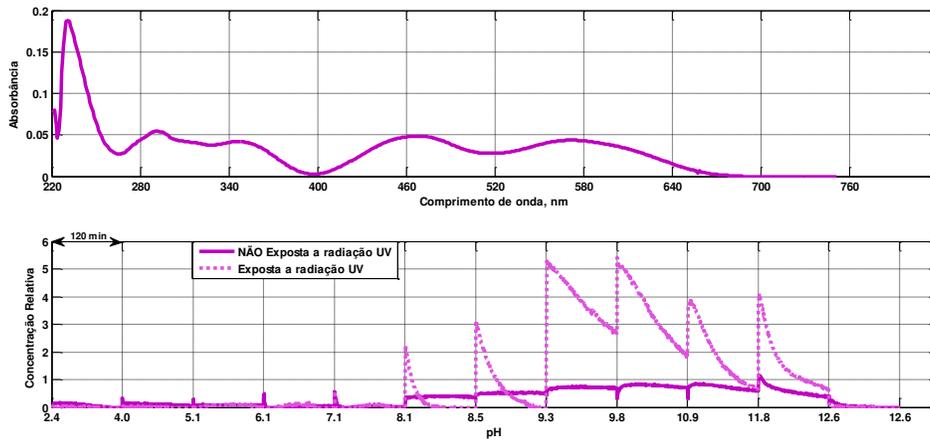
essa característica e por comparação com os resultados obtidos nas análises individuais das matrizes, sugere-se que os perfis espectrais com suas respectivas evoluções de tempo e pH apresentados nas **Figuras 81** e **82** devem ser atribuídos a diferentes formas de anidrobases quinoidais. Com base no meio em que surgem e desaparecem as espécies, a anidrobases presente na **Figura 82** deve sofrer a perda de um próton a mais que da **Figura 81**: a substância apresentada na **Figura 82** predomina em meio com pH mais elevado. Infere-se ainda da **Figura 82** que, apesar de apresentar maior intensidade, a amostra quando exposta à radiação é mais instável que a amostra não exposta.



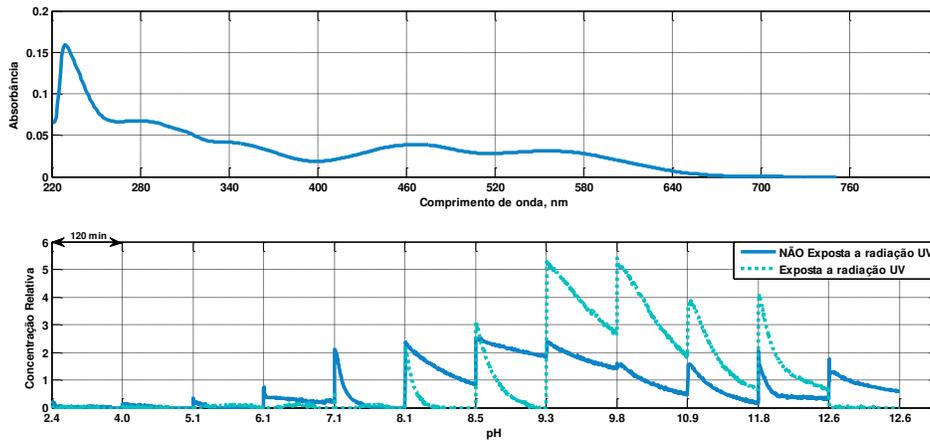
**Figura 81** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma anidrobases Quinoidal (A), presente na amostra de *Hibiscus sabdariffa* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

Além das formas de anidrobases citadas anteriormente, uma outra forma que absorve na região visível do espectro e surge em meio neutro foi detectada. De acordo com a evolução com pH e tempo recuperados pela aplicação de MCR-ALS apresentados na parte inferior da **Figura 83**, sugere-se que a substância presente seja uma anidrobases que sofre a perda de um outro

próton. Observa-se que esta forma de anidrobases tem sua degradação acelerada quando exposta a radiação UV.

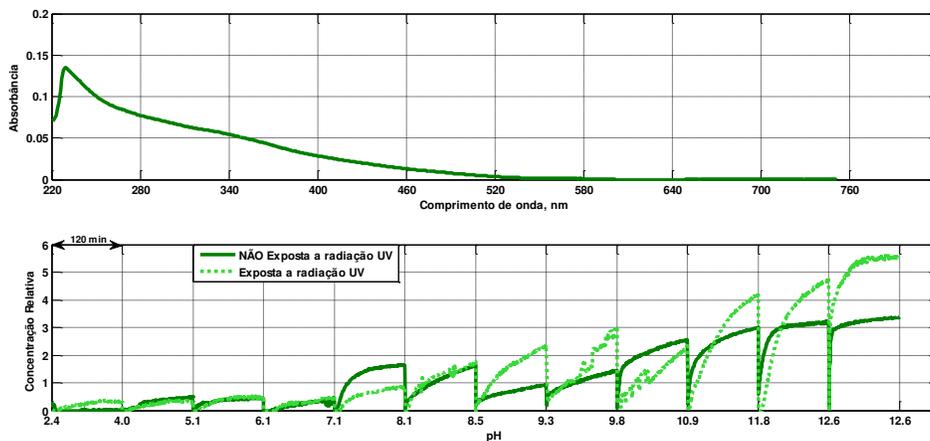


**Figura 82** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma anidrobases Quinoidal ionizada ( $A^-$ ), presente na amostra de *Hibiscus sabdariffa* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).



**Figura 83** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma anidrobases Quinoidal ionizada ( $A^{2-}$ ), presente na amostra de *Hibiscus sabdariffa* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

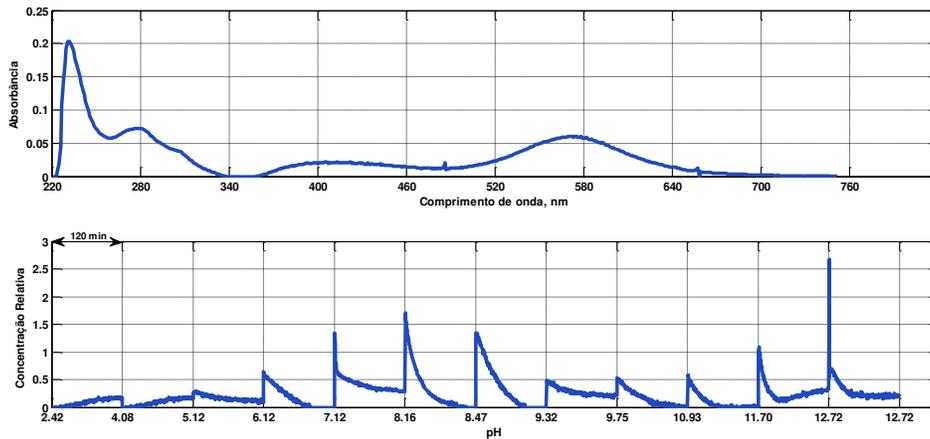
Para o meio alcalino, esta planta apresenta resultados semelhantes aos obtidos com a aplicação de MCR-ALS para o *Hibiscus acetosella*. Com a aplicação da metodologia foi possível recuperar o espectro e sua evolução com tempo e pH para uma espécie que surge em meio neutro (pH 6,1 – 7), tendo sua intensidade aumentada gradualmente até o meio mais alcalino (pH acima de 12), como mostra a **Figura 84**. O mesmo comportamento é observado tanto para a amostra na condição S quanto na condição D. Da mesma forma que para a planta anterior, sugere-se que esta espécie seja uma forma de chalcona ionizada.



**Figura 84** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma forma de chalcona (C), presente na amostra de *Hibiscus sabdariffa* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

A aplicação de MCR-ALS nos dados da amostra exposta a radiação UV foi encontrada uma outra espécie não detectada na amostra não exposta à radiação, como mostra a **Figura 85**. O espectro mostra que se trata de uma substância colorida, e o perfil cinético mostra que esta substância é bastante instável, apresentando uma estabilidade relativamente moderada em valores

de pH entre 7 e 8. Devido a essas características, supõe-se que se trata de uma anidrobases.

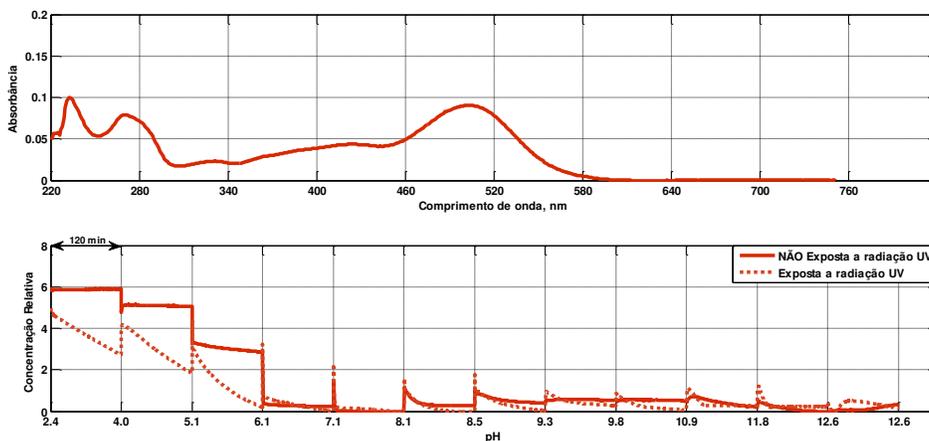


**Figura 85** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma substância presente na amostra de *Hibiscus sabdariffa* na condição D.

### 5.9.2.3 – Análises de Matrizes Aumentadas para *Malvaviscus penduliflorus*

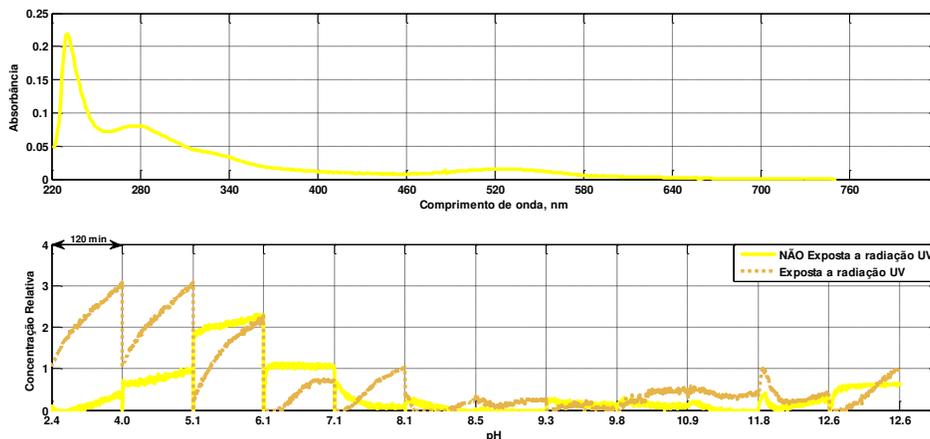
Como mostrado anteriormente nas análises realizadas para as matrizes individuais, a antocianina majoritária presente na amostra de *Malvaviscus penduliflorus* é diferente da encontrada nas outras plantas estudadas, portanto, os espectros devem ser ligeiramente diferentes dos obtidos para estes hibiscos. A aplicação de MCR-ALS nos dados da amostra de *Malvaviscus penduliflorus* na condição S possibilitou a detecção de 6 possíveis espécies, enquanto que para a amostra exposta foram detectadas 8. O espectro do cátion flavílico, presente em meio ácido, e sua evolução com tempo e pH recuperados pela aplicação de MCR-ALS está apresentado na **Figura 86**. Em

comparação com as outras plantas analisadas, a amostra de *Malvaviscus penduliflorus* apresenta maior estabilidade para a forma cátion flavílico na condição S (linha contínua). Para a condição D (linha pontilhada) a amostra apresenta-se mais instável, da mesma forma que os outros hibiscos.



**Figura 86** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para o cátion flavílico ( $AH^+$ ) presente na amostra de *Malvaviscus penduliflorus* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

Foi recuperado pela aplicação de MCR-ALS um espectro e sua respectiva evolução com tempo e pH, com características semelhantes ao encontrado para a espécie carbinol (B) nas amostras anteriores. A **Figura 87** apresenta o surgimento e desaparecimento dessa espécie que é semelhante ao observado para a planta anteriormente analisada. No entanto, para a amostra na condição D o equilíbrio com a espécie cátion flavílico em meio ácido é mais evidente: enquanto o cátion flavílico tem a concentração diminuída, o carbinol aumenta.

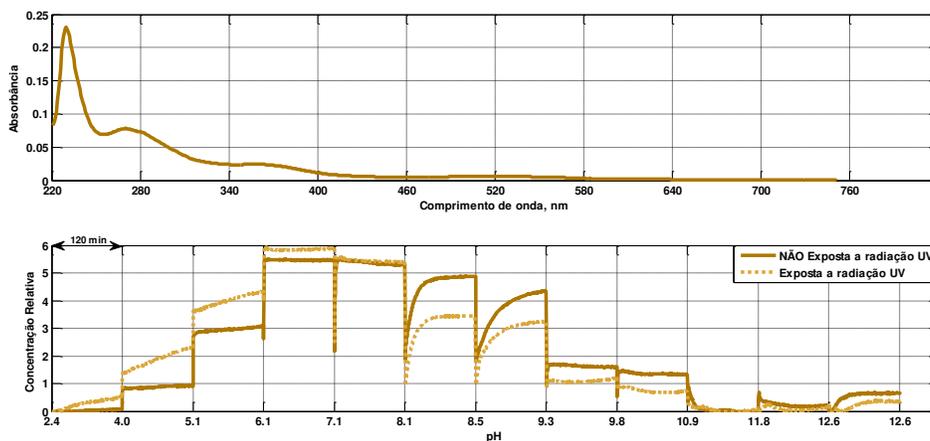


**Figura 87** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para o Carbinol (B) presente na amostra de Hibiscus sabdariffa na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

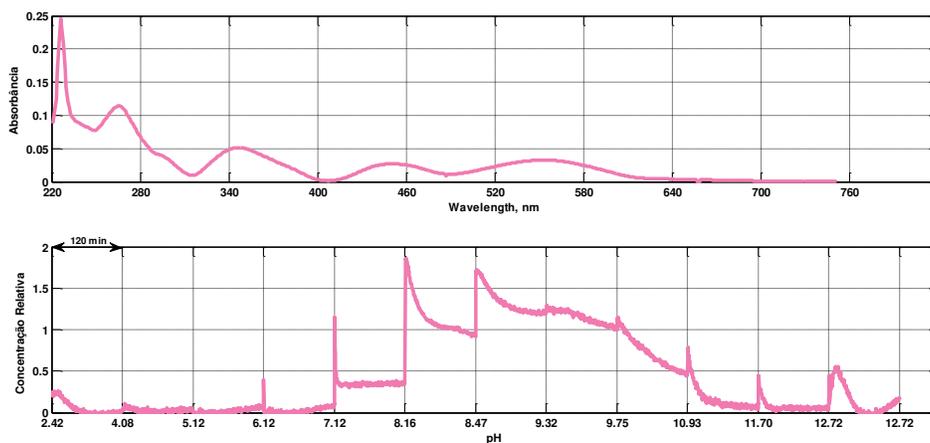
O espectro que pode ser atribuído a uma forma de chalcona para *Malvaviscus penduliflorus* foi recuperado com a aplicação de MCR-ALS, e está apresentado na **Figura 88**. A parte superior da figura, onde está apresentado o espectro dessa substância, mostra que se trata de uma espécie incolor, enquanto que a inferior da figura, que apresenta a evolução com o tempo e pH, mostra que esta espécie tem maior estabilidade em valores de pH entre 6,1 e 8,1. O perfil da evolução para esta substância é bastante similar ao observado para esta mesma espécie nas amostras dos *Hibiscus* analisados.

Uma substância que surge em meio neutro foi detectada por MCR-ALS para a amostra na condição D, e o perfil do espectro assim como sua evolução com tempo e pH estão apresentados na **Figura 89**. Pelas características apresentadas por esta substância, como bandas na região visível do espectro, e pela observação dos resultados obtidos para as análises individuais das matrizes, sugere-se que a substância seja uma anidrobases quinoidal em

uma forma ionizada ( $A^-$ ), surgindo em meio neutro, pH 6,12, e desaparecendo em meio alcalino, pH 10,93.

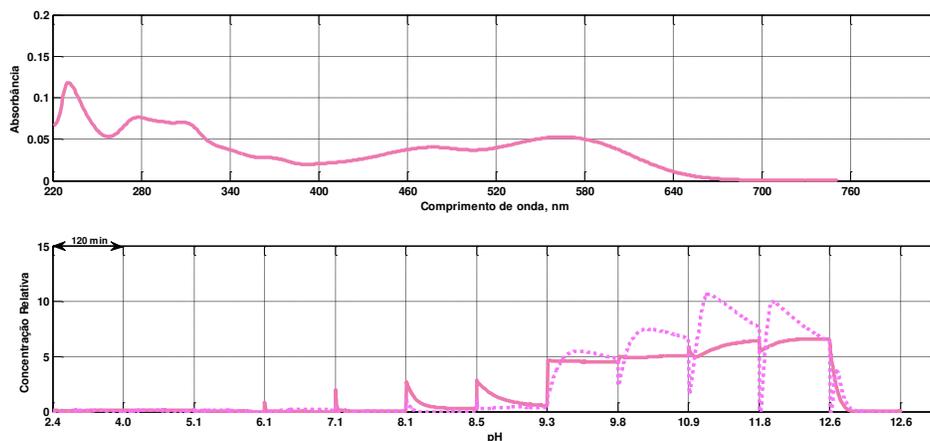


**Figura 88** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável Chalcona (C), presente na amostra de *Malvaviscus penduliflorus* na condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).



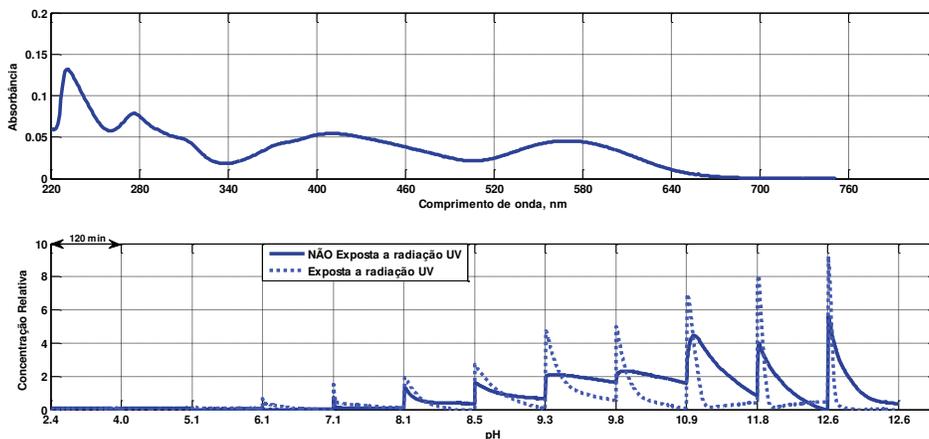
**Figura 89** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável anidrobases quinoidal ionizada ( $A^-$ ) presente na amostra de *Malvaviscus penduliflorus* na condição D.

Em meio levemente alcalino ocorre o surgimento de uma substância que possui característica de uma anidrobases. Os espectros e sua respectiva evolução com o tempo e pH, recuperados pela aplicação de MCR-ALS estão apresentados na **Figura 90**. O espectro apresentado na parte superior da figura mostra que se trata de uma substância colorida, enquanto que a evolução com tempo e pH, apresentada na parte inferior, indica que em valores de pH acima de 7 é possível detectar a presença desta espécie. Esta substância é estável em meio alcalino (em valores de pH entre 9,3 e 11,8). No entanto, quando exposta à radiação UV, esta substância torna-se instável. Nas análises individuais das matrizes, observou-se que esta espécie aparece como uma forma intermediária em matrizes expostas à radiação. Devido às características apresentadas, acredita-se que se trate de uma anidrobases quinoidal em uma de suas formas ionizadas



**Figura 90** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável anidrobases quinoidal ionizada ( $A^{2-}$ ) presente na amostra de *Malvaviscus penduliflorus* condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

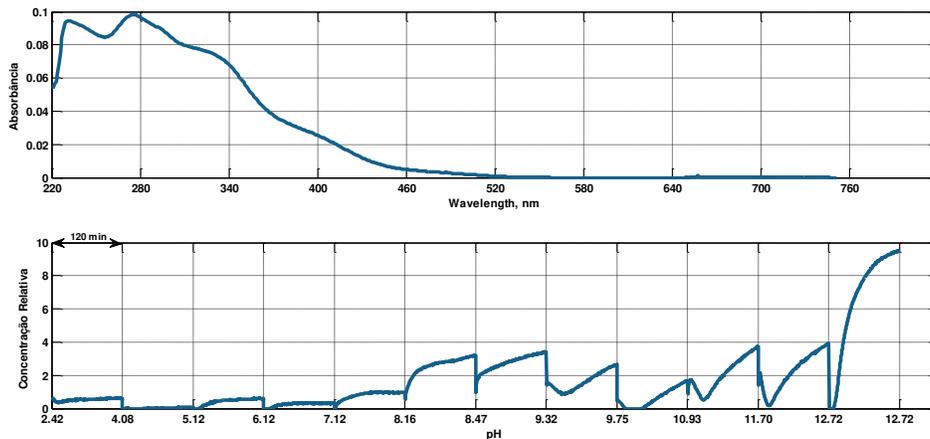
A aplicação de MCR-ALS recuperou um espectro e os perfis de concentração com sua evolução em relação ao tempo e pH para uma substância que aparece predominantemente em meio alcalino. O espectro apresentado na parte superior da **Figura 91** mostra que se trata de uma substância colorida enquanto a parte inferior, que apresenta informações sobre a evolução com tempo e pH, mostra que a substância tem estabilidade moderada entre pH 9,3 e 10,9, sendo instável em valores de pH mais elevados. Quando exposta à radiação nota-se que a estabilidade é bastante afetada, tornando a amostra bastante instável. De acordo com os valores de pH onde predomina, esta espécie deve aparecer em equilíbrio com a espécie apresentada na **Figura 90**.



**Figura 91** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável anidrobases quinoidal ionizada presente na amostra de *Malvaviscus penduliflorus* condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

Em valores de pH acima de 12, a análise individual das matrizes mostra a presença de uma espécie que aumenta em concentração com o tempo.

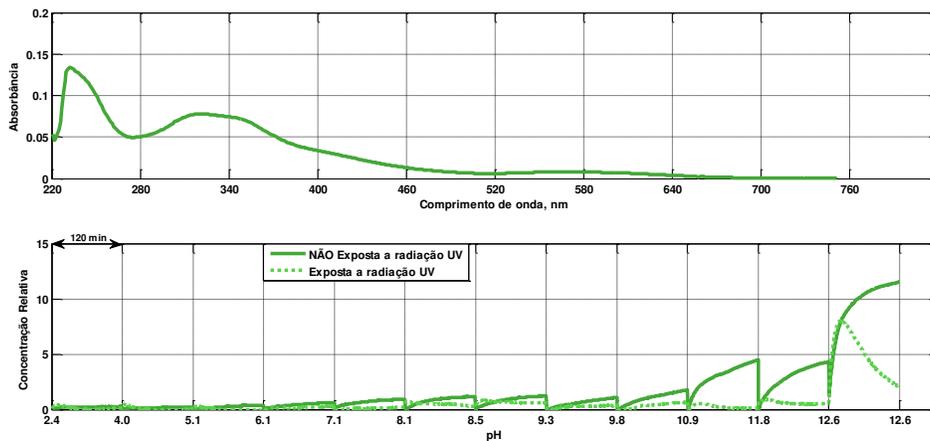
Aplicando-se a estratégia das matrizes aumentadas na amostra na condição D foi possível recuperar o espectro de uma substância com essas características, como mostra a **Figura 92**. A parte superior, que apresenta o espectro dessa substância, mostra que se trata de uma forma não colorida. A parte inferior, que representa a evolução da espécie com alteração de tempo e pH, mostra que tal espécie aparece em meio alcalino, e que aumenta exponencialmente sua concentração para o meio com pH acima de 12. Devido a essas características e com base nas análises individuais e nos resultados obtidos para as outras amostras, sugere-se que esta substância seja uma forma de chalcona ionizada.



**Figura 92** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável chalcona ionizada ( $C^-$ ) presente na amostra de *Malvaviscus penduliflorus* na condição D.

Outra espécie detectada em meio extremamente alcalino recuperada pela aplicação de MCR-ALS está apresentada na **Figura 93**. Esta espécie aparece em pH acima de 10 e aumenta sua estabilidade com o tempo, como

mostra a parte inferior da figura. Esta espécie apresenta comportamento parecido ao da espécie encontrada para a amostra na condição D apresentada na **Figura 92**, no entanto, quando esta mostra é submetida a radiação, a espécie se transforma em outra. Este fato pode ser confirmado pela análise individual da matriz de dados para esta amostra em pH acima de 12. Devido as características da substância apresentadas nesta análise, sugere-se que esta espécie seja outra forma de chalcona ionizada, podendo ser um isômero da espécie encontrada na **Figura 92**.



**Figura 93** – Espectro e respectivo comportamento cinético recuperados por MCR-ALS para uma provável anidrobases quinoidal ionizada ( $A^{2-}$ ) presente na amostra de *Malvaviscus penduliflorus* condição S (linha contínua) e D (linha pontilhada).

A análise dos resultados da aplicação de MCR-ALS nos dados das amostras das diferentes plantas sugerem que as espécies incolores são menos influenciadas pela radiação UV que as espécies coloridas. De acordo com os resultados, a maioria das espécies incolores tem sua degradação acelerada pela incidência de radiação UV.

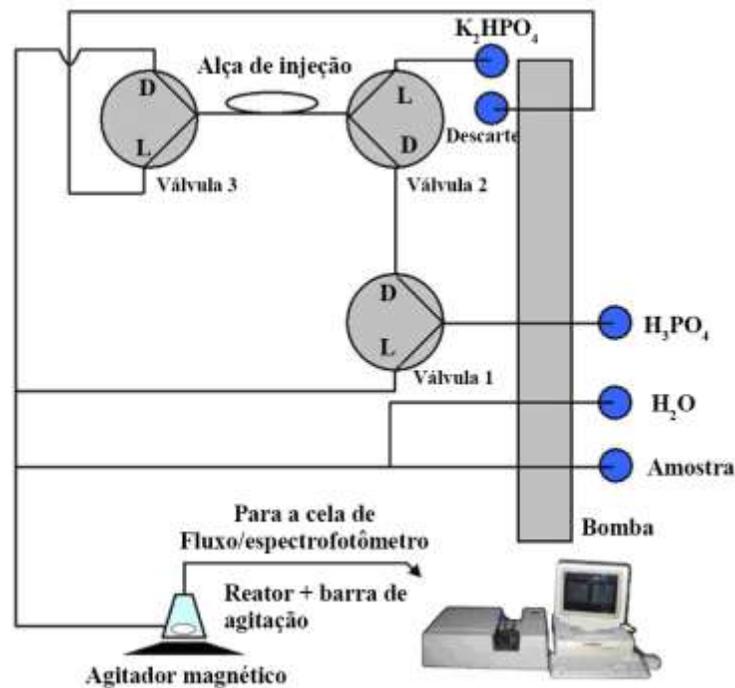
**6. Cálculo de Constantes Aparentes de  
equilíbrio por MCR-ALS em Dados de  
Análise por Injeção em Fluxo**

A utilização de MCR-ALS também foi aplicada para dados gerados por *Análise por Injeção em Fluxo (FIA, do inglês Flow Injection Analysis)* com gradiente de pH<sup>126,127</sup> nas amostras de *Hibiscus acetosella*, *Hibiscus sabdariffa* e *Malvaviscus penduliflorus*. As análises por injeção em fluxo foram realizadas com temperatura mantida à 25° C, monitorando-se durante 10 minutos, incluindo as etapas de limpeza e preenchimento do sistema com uma nova amostra.

### ***6.1 – Procedimento experimental***

Em um sistema FIA a aplicação de modelos de calibração de segunda ordem pode ser feita adquirindo espectros na região do ultravioleta - visível (UV-Vis) ao longo do tempo. Contudo, a dimensão de tempo deve apresentar informações sobre diferentes perfis. Isso pode ser feito provocando-se um gradiente de pH no qual estejam contidas as espécies que se pretende monitorar. Para a construção deste sistema, foram utilizadas 3 válvulas solenóides de três vias que operam a 12 Volts e consomem 3 Watts, uma bomba peristáltica IPC com tubos de Tygon e tubos de politetrafluoroetileno (PTFE) com 0,8 mm de diâmetro interno (1/32 polegadas), uma fonte de 12 Volts com potência de 24 Watts, um suporte, junções em “T” e uma câmara de mistura constituída de acrílico, além de um agitador magnético comum. A saída do fluxo do sistema descrito acima, representado na **Figura 94**, pode ser acoplada a uma célula de fluxo e os espectros obtidos em função do tempo em espectrofotômetro.

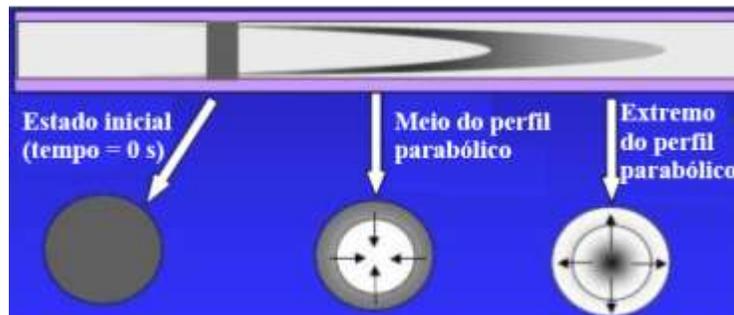
O sistema deve ser montado de modo que a amostra caminhe continuamente através da cela de fluxo, sofrendo uma diluição prévia constante. O gradiente de pH é gerado injetando-se uma solução aquosa de  $K_2HPO_4$  de concentração  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  através de uma alça de injeção de  $31,5 \text{ cm}$ , equivalente à  $160 \mu\text{L}$ , e utilização de uma solução aquosa de  $H_3PO_4$  com concentração  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , como carregador. Em uma das junções, deve haver uma confluência do ácido com a amostra diluída, e após a injeção, a amostra conflui com o seguimento que contém a solução de  $K_2HPO_4$ , gerando o gradiente de pH.



**Figura 94** - Esquema do sistema FIA a ser utilizado. L e D indicam saída do fluxo com as válvulas ligadas ou desligadas, respectivamente.

Na **Figura 94** é apresentado o esquema do sistema FIA proposto. O controle das válvulas é unificado, de forma que são ligadas ou desligadas to-

das ao mesmo tempo. Inicialmente carrega-se o sistema com os fluidos correspondentes a cada segmento do FIA. Quando as válvulas estão desligadas, a solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  está passando pela alça de injeção. Assim que as válvulas são ligadas, o fluxo da solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  é desviado pela válvula solenóide 3 e por sucção as válvulas solenóides 1 e 2 permitem o preenchimento da alça de injeção pela solução de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Após as válvulas serem desligadas, o volume de solução da alça é então injetado no sistema. A dispersão do  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  no  $\text{H}_3\text{PO}_4$  gera um gradiente de pH no fluxo. A dispersão é um fenômeno característico do FIA, e ocorre em função do escoamento laminar dos fluidos dentro do sistema e em função do reator. O fenômeno pode ser observado na **Figura 95**, onde os tons de cinza representam quantitativamente a presença do  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  injetado, e a parte branca representa o carregador (solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). A dispersão é caracterizada pelo perfil parabólico. Dentro do reator esse perfil é homogeneizado dando origem a um fluxo com concentração de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  variável, o que leva a uma variação do pH (gradiente).



**Figura 95** - Ilustração do fenômeno de dispersão que ocorre em um sistema FIA.

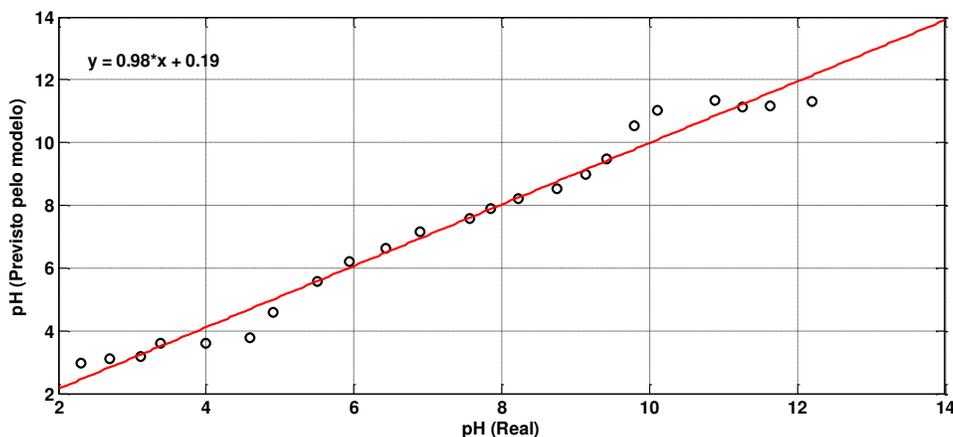
## 6.1.2 - Calibração do sistema FIA

A fim de garantir que o intervalo de pH do gradiente seja adequado para os compostos de interesse, o gradiente de pH do sistema foi calibrado utilizando-se 23 soluções tampão em uma faixa de pH de 1,9 até 12,4. Essa calibração foi realizada utilizando-se uma mistura de indicadores ácido-base. Para a calibração, as soluções tampão devem ser posicionadas para alimentar a linha com maior vazão no sistema FIA (linha de água na **Figura 94**) e uma solução de indicadores no caminho de menor vazão (a amostra), e água nos outros caminhos. As soluções tampão utilizadas devem ser constituídas como aquelas apresentadas na **Tabela 1** deste trabalho, e a solução de indicadores composta de uma solução aquosa de azul de timol  $5,36 \times 10^{-5}$  mol L, vermelho de metila  $2,33 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> azul de bromo timol  $3 \times 10^{-4}$  mol L e fenolftaleína  $1,57 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, diluídos em etanol e neutralizados com NaOH  $0,05$  mol L<sup>-1</sup>.

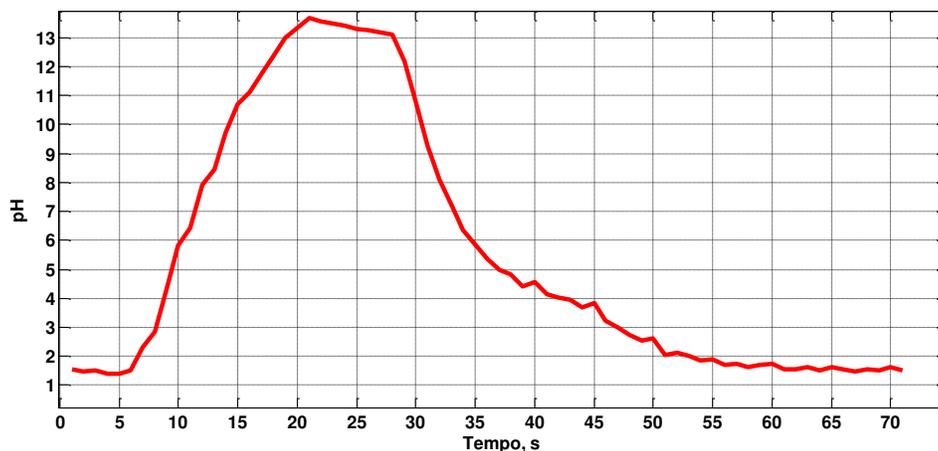
Para encontrar os valores de pH no sistema em fluxo, constrói-se um modelo de calibração multivariada baseado no método dos mínimos quadrados parciais (PLS). O conjunto de calibração do modelo PLS constitui-se dos 23 espectros das soluções tampão com seus respectivos valores de pH na saída do sistema FIA. Desta maneira, os espectros obtidos a cada segundo após a injeção do K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> foram relacionados aos valores de pH através da calibração feita utilizando PLS. Pode-se verificar o intervalo de valores de pH alcançado no gradiente (entre 1,9 e 12,4), assim como a relação “tempo de injeção”/pH.

As injeções de fluxo foram realizadas em triplicata e para a aplicação de MCR-ALS, foi utilizada a região de 220 a 750 nm e os tempos de 115 a 185 segundos.

O ajuste do modelo PLS desenvolvido, onde foram utilizadas 3 variáveis latentes com os dados centrados na média, possibilitou a previsão dos valores de pH com concordância bastante satisfatória, como mostra a **Figura 96**. A partir do modelo PLS foram previstos os valores de pH gerados pelo gradiente no sistema FIA, e os resultados estão apresentados na **Figura 97**. Após o ajuste do modelo, os dados obtidos pela análise por injeção em fluxo das diferentes amostras foram tratados com a aplicação de MCR-ALS para obtenção dos espectros das substâncias presentes e suas respectivas concentrações evoluindo com o gradiente de pH. Foram utilizados os primeiros 22 segundos de monitoramento porque além facilitar a visualização dos resultados, contém todos os valores de pH.



**Figura 96** – Ajuste do modelo PLS para previsão de valores de pH em Análise por Injeção em Fluxo.



**Figura 97** – Valores de gradiente de pH previstos pelo modelo PLS para Análise por Injeção em Fluxo.

## 6.2 – Resultados e discussão:

Para que se pudesse estimar os valores de pK para cada equilíbrio, foi considerado para um ácido fraco:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad [14]$$

Assim temos que:

$$-\log K_a = -\log[H^+] - \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad [15]$$

Que pode ser simplificada para:

$$pK_a = pH - \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad [16]$$

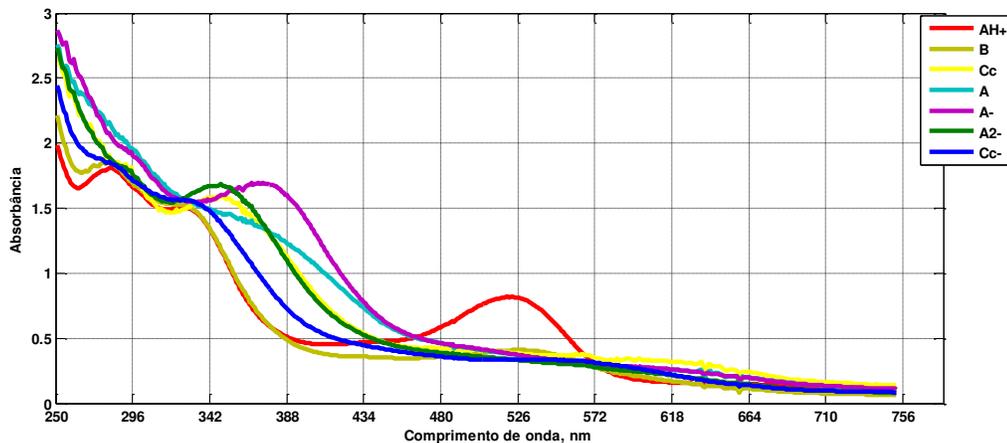
Quando a concentração das espécies é igual, temos que:

$$pK_a = pH \quad [17]$$

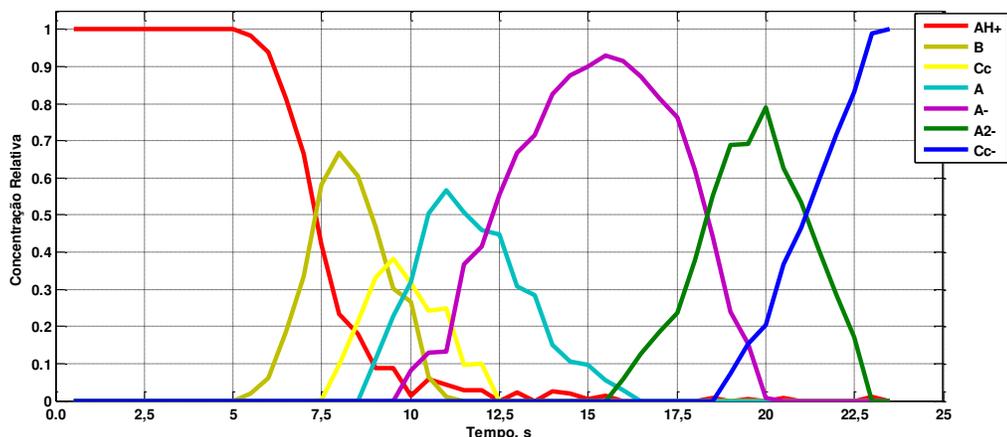
Dessa forma, os valores de pK foram estimados quando as concentrações das espécies são iguais.

Neste trabalho, não foi realizada uma separação severa das antocianinas presentes na amostra, o que impossibilita o cálculo de uma constante específica ou a identificação de uma estrutura. No entanto, de acordo com uma pesquisa realizada por Kong e colaboradores<sup>128</sup>, as antocianinas encontradas em maior abundância na natureza são os glucosídeos de cianidina, delphinidina e pelargonidina, respectivamente. Os autores<sup>128</sup> afirmam ainda que estas antocianinas estão distribuídas em 80% das folhas pigmentadas, 69% das frutas e 50% das flores. Dessa forma, os resultados obtidos devem representar o grupo ou a antocianina predominante. Com base nos resultados obtidos nas análises individuais e por matrizes aumentadas realizadas anteriormente e análises por PCA e SVD, foram considerados 8 fatores para a aplicação de MCR-ALS na amostra de *Hibiscus acetosella*. No entanto, um dos espectros não fornece nenhuma informação química. Por isso foi então considerada a presença de 7 espécies. A aplicação de MCR-ALS recuperou os espectros apresentados na **Figura 98**. Observa-se que os espectros recuperados, apesar de bastante ruidosos na região ultravioleta do espectro (abaixo de 300 nm),

coincidem com aqueles encontrados para as análises anteriores (matrizes individuais e aumentadas) das amostras. Para o cálculo das constantes de equilíbrio a partir dos resultados das análises por MCR-ALS foi utilizado o intervalo de tempo de monitoramento entre 1 e 23 segundos por conter todos os valores de pH. Nos cálculos com MCR-ALS foram utilizadas as restrições de não-negatividade e closure (fechamento). Como a região entre 220 e 250 nm se encontrava muito ruidosa, os espectros foram cortados a partir de 250 nm. Os perfis de concentração evoluindo com o tempo estão apresentados na **Figura 99**. Para facilitar o cálculo das constantes de equilíbrio, fez-se a relação entre o tempo e valores de pH. Assim, estão apresentados na **Figura 100** os perfis de concentração evoluindo com o pH.



**Figura 98** – Espectros recuperados por MCR-ALS para análise FIA da amostra de *Hibiscus acetosella*.



**Figura 99** – Perfis de concentração recuperados por MCR-ALS para análise FIA da amostra de *Hibiscus acetosella*.

Pela **Figura 100** observa-se que as espécies cátion flavílico e carbinol apresentam concentrações relativas iguais em valor de pH aproximadamente igual a 2,52. De acordo com as **equações 14** à **17**, o valor de pK pode ser estimado para o equilíbrio entre as formas cátion flavílico ( $AH^+$ ) e carbinol (B) da antocianina predominante no *Hibiscus acetosella* é 2,52. A forma carbinol é gerada a partir de uma hidrólise do cátion flavílico, e por isso esse equilíbrio é representado pela sigla  $K_h$ . Na literatura, valores próximos a este à 25°C são atribuídos a forma malvidina ligada é uma glucose (3,01 – 2,57)<sup>129</sup>. O equilíbrio ácido-base ( $K_a$ ) sofrido pela forma cátion flavílico ( $AH^+$ ) para gerar a forma anidrobases (A) da antocianina malvidina -3- glucosídeo é relatado por Raymond Brouillard e colaboradores<sup>130,131</sup> com valor de  $pK_a = 4,25$ . Os resultados da análise por MCR-ALS dos dados do *Hibiscus acetosella* apresentam para este equilíbrio um valor de  $pK_a = 4,37$ . Além dos cálculos efetuados por Brouillard, outros trabalhos realizados com o intuito de estimar constantes de equilíbrio para as transformações ocorridas nas antocianinas podem ser citados, como por exemplo Borkowski e colabo-

radores<sup>132</sup>, que calcularam faixas de valores de pK(s) para diferentes antocianinas, além de Redus e colaboradores<sup>133</sup> e Pina e colaboradores<sup>134</sup>, que além do cálculo dessas constantes realizam estudos para elucidar as transformações estruturais sofridas pelas antocianinas.

Além dos equilíbrios relatados, o sistema apresenta outros equilíbrios envolvidos. Um equilíbrio em particular pode muitas vezes não ser detectado devido a velocidade em que ele acontece: o equilíbrio entre as formas Carbinol (B) em cis-Chalcona (C<sub>C</sub>) acontece muito rapidamente. Alguns autores<sup>120</sup> acreditam que no equilíbrio entre as formas AH<sup>+</sup> e B também está presente a forma C<sub>C</sub>. Considera-se assim que na solução existe uma mistura de B e C<sub>C</sub>, como mostra a **Equação 18**. Esta reação consecutiva também pode ser interpretada de formas diferentes. A primeira considera que na solução existe uma mistura de B e C<sub>C</sub>, sugerindo que o primeiro estágio corresponde à formação de AH<sup>+</sup> por B da mistura, enquanto que o segundo representa a formação de AH<sup>+</sup> por C<sub>C</sub>. A última conversão deve proceder via B, desde que B seja convertido para AH<sup>+</sup>, mais rapidamente que para C<sub>C</sub>.

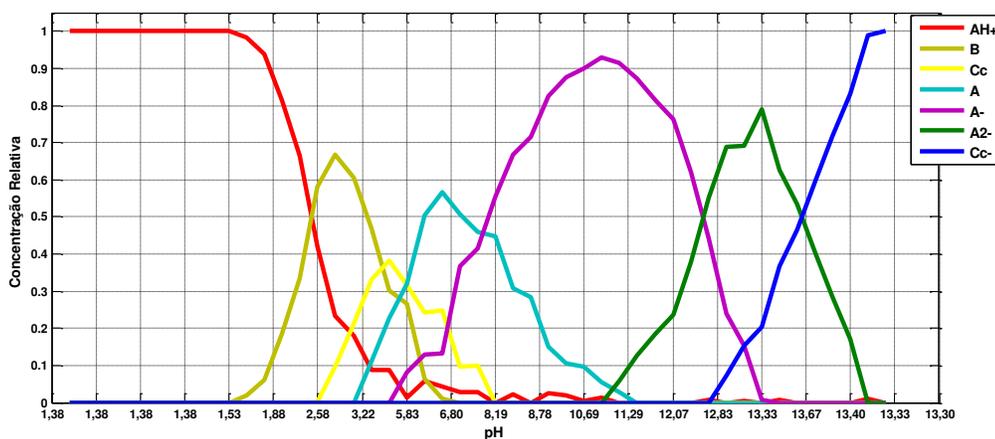


Se esta análise estiver correta, as absorvâncias nos estágios rápido e lento devem ser proporcionais às concentrações de B e C<sub>C</sub>, respectivamente. Assumindo que as duas espécies estejam em equilíbrio, podemos escrever,

$$\frac{\Delta\text{absorçãq}_{\text{lenta}}}{\Delta\text{absorçãq}_{\text{rápida}}} = \frac{[\text{C}_c]}{[\text{B}]} = K_T \quad [19]$$

Como este equilíbrio refere-se a uma reação de tautomerismo, este não pode ser calculado diretamente pela **equação 17**.

Dessa forma, valores de constantes aparentes puderam ser calculados considerando-se os resultados da aplicação MCR-ALS (**Figura 100**) para algumas espécies em regiões onde estas apresentam a mesma concentração, e em alguns casos, como em reações de tautomerismo e isomeria, pelas diferentes proporções das espécies, como explicado anteriormente para o cálculo da constante aparente de equilíbrio tautomérico entre B e C<sub>c</sub>. As constantes aparentes de equilíbrio calculadas estão apresentadas na **Tabela 5**.



**Figura 100** – Intervalo contendo perfis de concentração variando com o pH recuperados por MCR-ALS para análise FIA da amostra de *Hibiscus acetosella*.

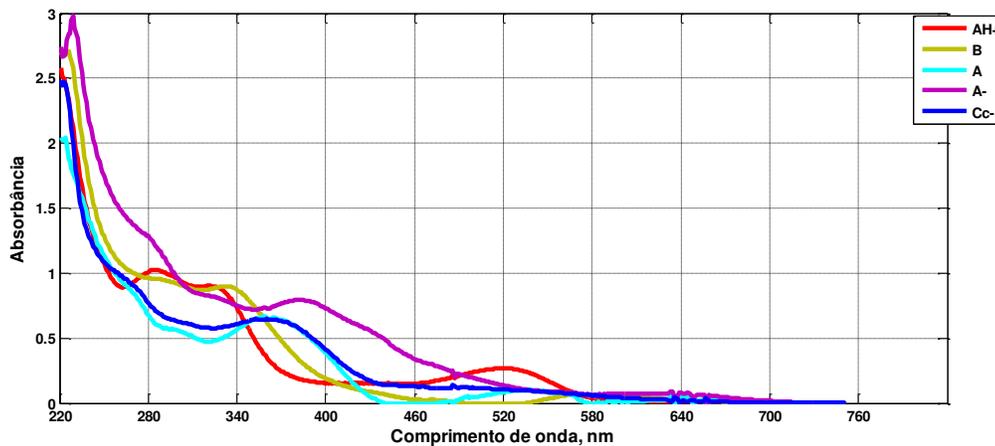
**Tabela 5 – Constantes aparentes de equilíbrio encontradas após a aplicação de MCR-ALS nos dados de *Hibiscus acetosella*.**

<b>Equilíbrio</b>	<b>pK</b>	<b>K</b> (estimado)	<b>Literatura</b>
$AH^+ \rightleftharpoons B + H^+$	2,52	$K_h = 3,02 \times 10^{-3}$	Brouillard <sup>131</sup>
$AH^+ \rightleftharpoons A + H^+$	4,37	$K_a = 4,27 \times 10^{-5}$	Brouillard <sup>131</sup>
$A \rightleftharpoons A^- + H^+$	7,975	$1,12 \times 10^{-8}$	Brouillard <sup>7</sup>
$A^{2-} \rightleftharpoons C_c^-$	13,684	$2,07 \times 10^{-14}$	Não consta

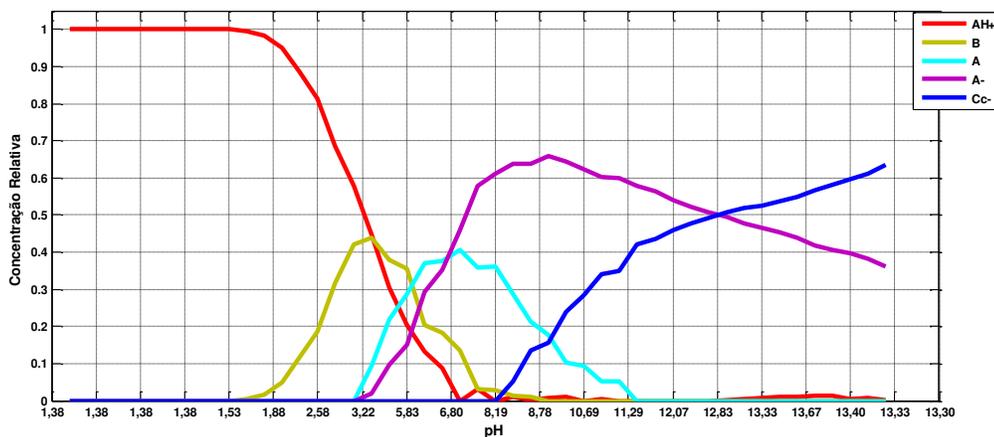
Os valores das constantes calculadas apresentam boa concordância com valores propostos pela literatura. A comparação de alguns valores, principalmente os referentes ao meio alcalino não pode ser realizada, pois estes não estão disponíveis. Sabe-se que o valor das constantes é influenciado pelos grupos ligados às hidroxilas das antocianidinas, no entanto, a partir das informações obtidas pela aplicação de MCR-ALS para a planta *Hibiscus acetosella* e da comparação com os valores para as constantes apresentados pela literatura, sugere-se que a antocianina predominante seja a malvidina.

Para a amostra de *Hibiscus sabdariffa* a decomposição em valores singulares (SVD) indicou a possibilidade de 5 fatores. Sabendo que a existência de ambigüidade entre os espectros é grande no sistema analisado, fez-se o teste para quantidades maiores e menores que os valores indicados por SVD. O aumento no número de fatores para um número acima de 5 faz com que a aplicação de MCR-ALS indique espectros idênticos, e quando se utiliza um número menor que 5, os perfis de concentração aparecem mal resolvidos. A aplicação de MCR-ALS foi realizada considerando-se 5 espécies presentes, e os espectros recuperados estão apresentados na **Figura 101** enquanto a **Figura 102** apresenta o perfil de concentrações variando com o pH.

Considerando-se que as chalconas apresentam equilíbrio rápido com a forma B além de outras formas isoméricas (devido às possíveis ionizações ou perda de prótons) foram realizadas algumas tentativas de aumento de fatores que como descrito anteriormente, resultaram em espectros iguais. Algumas formas de antocianinas somente podem ser observadas após um determinado tempo de reação, como é o caso do equilíbrio entre B e C<sub>C</sub>. De acordo com os resultados das análises individuais, observa-se que as antocianinas provenientes do *Hibiscus sabdariffa* são instáveis em comparação com as do *Hibiscus acetosella*, o que provavelmente impossibilitou a detecção de mais espécies no sistema. Da mesma forma que para a planta anterior, foram calculadas as constantes para os equilíbrios sugeridos pelos resultados da aplicação de MCR-ALS. Os valores encontrados estão apresentados na **Tabela 6**.



**Figura 101** – Espectros recuperados por MCR-ALS para análise FIA da amostra de *Hibiscus sabdariffa*.



**Figura 102** – Perfis de concentração recuperados por MCR-ALS para análise FIA da amostra de *Hibiscus sabdariffa*.

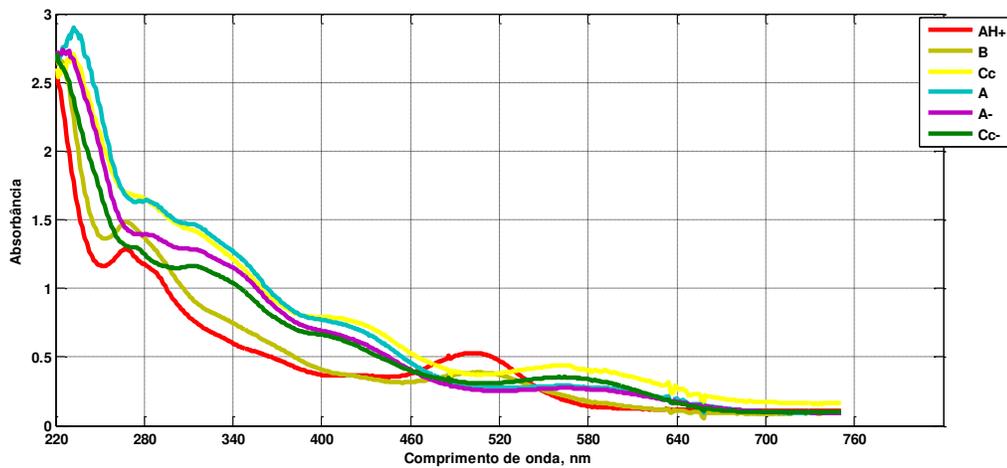
**Tabela 6** – Constantes aparentes de equilíbrio encontradas após a aplicação de MCR-ALS nos dados de *Hibiscus sabdariffa*.

Equilíbrio	pK	K
$AH^+ \rightleftharpoons B + H^+$	3,673	$2,12 \times 10^{-4}$
$AH^+ \rightleftharpoons A + H^+$	4,525	$2,99 \times 10^{-5}$
$A \rightleftharpoons A^- + H^+$	6,797	$1,60 \times 10^{-7}$
$A^- \rightleftharpoons Cc^-$	12,67	$2,14 \times 10^{-13}$

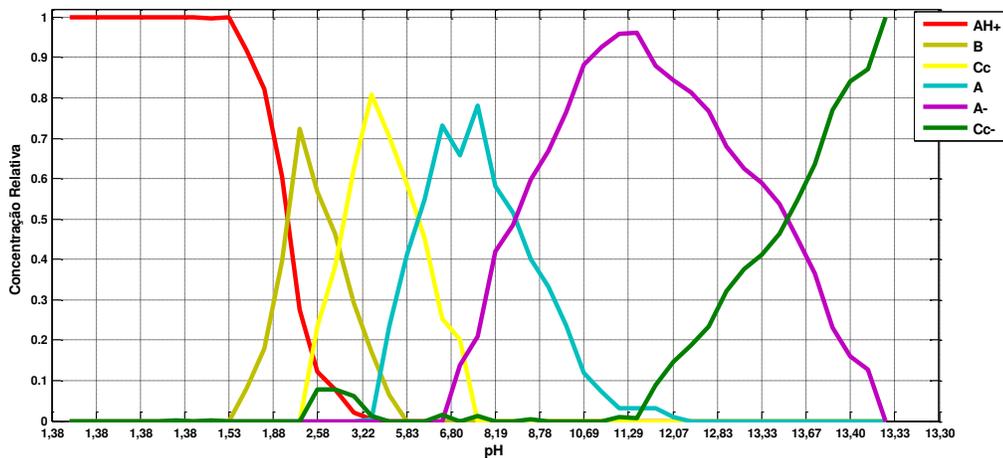
De acordo com os valores para as constantes aparentes de equilíbrio encontrados para as antocianinas do *Hibiscus sabdariffa*, supõe-se que ou se trata de uma antocianina diferente da predominante no *Hibiscus acetosella* ou os grupos ligados (açúcares, ácidos) são diferentes.

A decomposição em valores singulares da matriz de dados da amostra de *Malvaviscus penduliflorus* indica que 6 espécies devem estar presentes. Da mesma forma que para a planta anterior, não foi possível detectar todas as espécies encontradas na análise individual das matrizes, possivelmente pelo curto tempo de reação permitido pelo fluxo.

Os espectros recuperados pela aplicação de MCR-ALS nos dados da amostra de *Malvaviscus penduliflorus* estão apresentados na **Figura 103** e os perfis de concentração variando com o pH na **Figura 104**. A partir dos perfis de concentração foram calculadas as constantes para os equilíbrios sugeridos, e os valores para as constantes estão apresentados na **Tabela 7**.



**Figura 103** – Espectros recuperados por MCR-ALS para análise FIA da amostra de *Malvaviscus penduliflorus*.



**Figura 104** – Perfis de concentração recuperados por MCR-ALS para análise FIA da amostra de *Malvaviscus penduliflorus*.

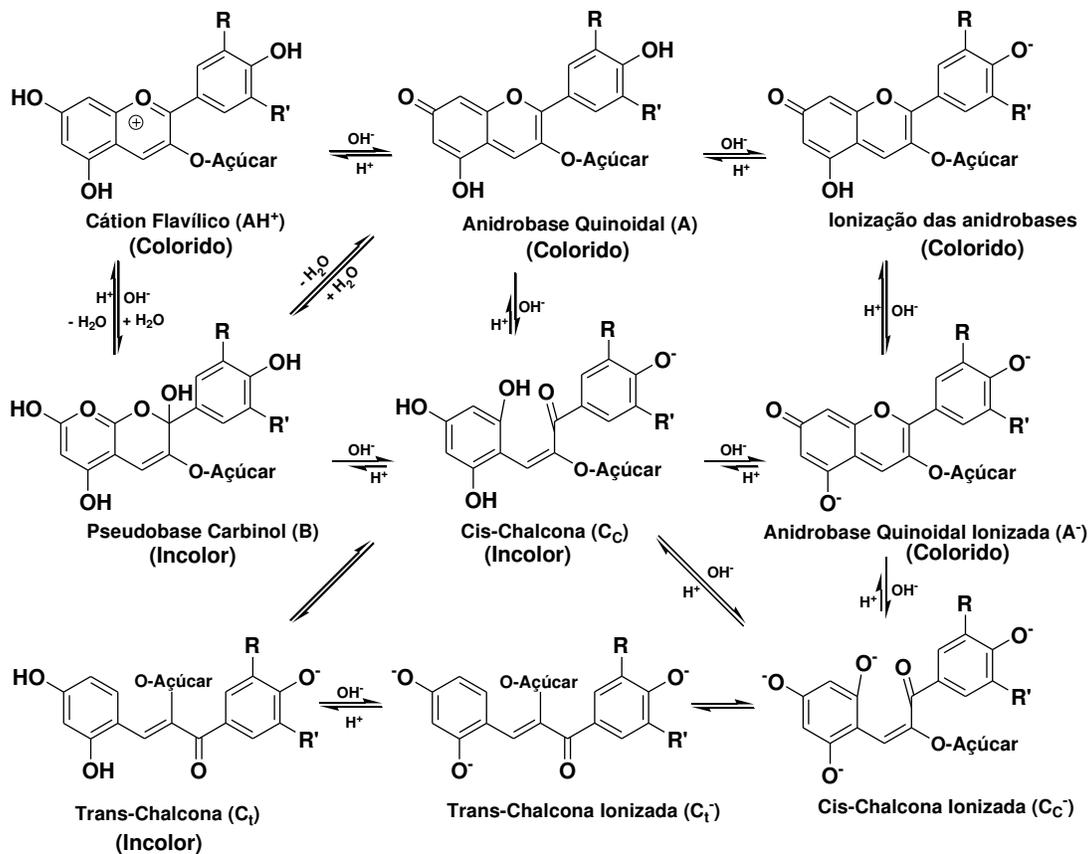
Os valores encontrados para as constantes foram similares aos obtidos para o *Hibiscus acetosella*, no entanto, percebe-se pelos espectros que se trata de outra antocianina, o que não permite concluir sobre qual é a antocianina predominante em *Malvaviscus penduliflorus*. Os resultados mostram que o método de MCR-ALS é bastante eficiente para se trabalhar com misturas de substâncias mesmo em sistemas envolvendo equilíbrios complexos, como é o caso dos equilíbrios envolvendo antocianinas.

**Tabela 7 – Constantes aparentes de equilíbrio encontradas após a aplicação de MCR-ALS nos dados de *Malvaviscus penduliflorus*.**

Equilíbrio	pK	K
$AH^+ \rightleftharpoons B + H^+$	2,06	$8,81 \times 10^{-3}$
$AH^+ \rightleftharpoons A + H^+$	4,37	$4,27 \times 10^{-5}$
$A \rightleftharpoons A^- + H^+$	8,62	$2,40 \times 10^{-9}$
$A^- \rightleftharpoons C^-$	13,50	$3,16 \times 10^{-14}$

A análise dos resultados obtidos pela aplicação de MCR-ALS para as diferentes amostras, considerando-se as análises individuais, a estratégia das matrizes aumentadas e o cálculo das constantes de equilíbrio, sugere que os equilíbrios existentes devem ocorrer a partir da espécie cátion flavílico ( $AH^+$ ), presente em meio ácido, transformando-se em carbinol (B) ou em equilíbrio com as anidrobases (A) com o aumento gradativo do pH do meio. A espécie carbinol (B) aparece em equilíbrio com formas de chalcona (C), a partir de valores de pH acima de 8, começam a aparecer espécies em suas formas ionizadas. De acordo com essas suposições, sugere-se que os equilíbrios envolvendo as antocianinas encontradas nas amostras de *Hibiscus acetosella*, *Hibiscus sabdariffa* e *Malvaviscus penduliflorus*, em meio aquoso

possam ser representadas pelas equações de equilíbrio apresentadas na **Figura 105**.



**Figura 105** – Possíveis transformações estruturais sugeridas para antocianinas em meio aquoso em função do pH.

## **7. Conclusões**

- O trabalho desenvolvido mostra que a aplicação do método quimiométrico de Resolução de Curvas Multivariadas (MCR) aplicado a dados cinéticos com monitoramento na região do ultravioleta-visível pode ser uma ferramenta muito útil no estudo de antocianinas provenientes de *Hibiscus acetosella*, *Hibiscus sabdariffa* e *Malvaviscus penduliflorus*.
- O auxílio da Análise de Componentes Principais (PCA) e Decomposição em Valores Singulares (SVD) foi fundamental na escolha do número de espécies presentes em cada situação estudada.
- O método de Análise de Componentes Principais Multi-modo (MPCA) proporcionou uma visualização global das cinéticas monitoradas, mostrando a separação de grupos de acordo com o valor do pH e exposição à radiação ultravioleta.
- Para a maior parte dos meios estudados (diferentes valores de pH), a radiação ultravioleta acelera a reação e favorece a formação de produtos intermediários, não visualizados nos extratos das plantas analisadas sem radiação.
- A estratégia das matrizes aumentadas tornou possível uma visualização geral de quando cada espécie está presente e quando ela desaparece no decorrer tempo em todos os valores de pH.
- A implantação do sistema de geração automatizada do gradiente de pH por Análise por Injeção em Fluxo tornou possível com o auxílio do

MCR-ALS a estimativa dos valores de pKa em cada equilíbrio das espécies presentes.

Foi demonstrado que com a aplicação destas metodologias conjuntas é possível:

- Investigar o comportamento cinético e as transformações estruturais das antocianinas em diferentes valores de pH.
- Determinar o perfil espectral bem como as concentrações relativas das espécies em equilíbrio em diferentes valores de pH;
- Identificar algumas das espécies envolvidas no equilíbrio químico no intervalo de pH 2-12.
- Calcular constantes aparentes de equilíbrio.
- Mostrar que a radiação influencia na cinética das antocianinas para a maioria dos meios estudados.

Além disso, a aplicação destas metodologias conjuntas permitiu extrair informações mesmo se tratando de uma mistura complexa. Isto não seria possível mediante aplicação de métodos analíticos convencionais como também não seria possível obter os valores das constantes de equilíbrio com valores muito próximos daqueles obtidos em soluções de antocianina purificada.

## 8. Bibliografia

- [1] -Stringheta, P. C.; Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv). *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1991.
- [2] -Ikan, R.; *Natural products – A laboratory guide*, Academic Press: London, 1991.
- [3] -Molnár-Perl, I.; Füzfai, Z.; Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1073*, 201.
- [4] -Harborne, J. B. Em *Phytochemistry*; Miller, L. P., ed; vol 2, Van Nostrand Reinhold Company: New York, 1973.
- [5] -Terci, D. B. L.; Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.
- [6] -Hayashi, K.; The Anthocyanins; Em *The chemistry of flavonoid compounds*, Geissman, T. A., ed; The MacMillian Company: New York, 1962, cap. 9.
- [7] -Brouillard, R.; Chemical structure of anthocyanins; Em: *Anthocyanins as food colors* Markakis, P., ed; Academic Press: New York, 1982, cap 1.
- [8] -Timberlake, C. F.; Bridle, P. Em *The flavonoides*, Harborne, J. B., ed; Academic press: New York, 1975.
- [9] -Harborne, J. B.; *The flavonoids: advances in research since 1986*, Champman and Hall: New York, 1<sup>st</sup> ed., 1994.
- [10] -Terci, D. B. L.; Rossi, A. V.; Indicadores naturais de pH: Usar papel ou solução? *Quim. Nova* **2002**, *25*, 685.
- [11] -Bobbio, P. A.; Bobbio, F. O.; *Química de processamento de alimentos*; Varela: São Paulo, 3<sup>a</sup> ed., 2001.

- [12] -Costa, C. T.; Horton, D.; Margolis, S. A.; Analysis of anthocyanins in food by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr., A* **2000**, *881*, 403.
- [13] -Soares, M. H. F. B.; Cavaleiro, E. T. G.; Aplicação de extratos brutos de flores de quaresmeira e azaléia e da casca de feijão preto em volumetria ácido-base. Um experimento para cursos de análise quantitativa. *Quim. Nova* **2001**, *24*, 408.
- [14] - Kim, D. O.; Heo, H. J.; Kim, Y. J.; Yang, H. S.; Lee, C. Y.; Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9921.
- [15] -Harborne, J. B.; *Phytochemical Methods – A guide to modern techniques of plant analysis*; Chapman and Hall: New York, 3<sup>rd</sup> ed., 1998.
- [16] -Bogs, J.; Ebadi, A.; McDavid, D.; Robinson, S. O.; Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiol.* **2006**, *140*, 279.
- [17] -Ribéreau-Gayon, P.; Em: *Anthocyanins as food colors*; Markakis, P., ed.; Academic Press: New York, 1982, cap 8.
- [18] -Zanatta, C. F.; Determinação da composição de carotenóides e antocianinas de Camu-camu (*Myrciaria dúbia*). *Dissertação de Mestrado*: Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.
- [19] -Gervasio, A. P. G.; Lavorante, A. F.; Moraes, M. C. B.; Giné, M. F. G.; Miranda, C. E. S.; Carrilho, E.; Eletroforese Capilar Acoplada à Espectrometria com Plasma: uma Ferramenta Eficiente para a Especificação *Quim. Nova* **2003**, *26-1*, 65.
- [20] -Francis, F. J.; *Analysis of anthocyanins*; Em *Anthocyanins as food colors*, Markakis, P., ed; Academic Press: New York, 1982, cap 7.
- [21] -Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; *Introdução a métodos cromatográficos* 7<sup>a</sup> ed. Editora Unicamp: Campinas, 1997.

- [22] -Seikel, M. K.; *Chromatographic methods of separation, isolation and identification of flavonoid compounds*; Em *The chemistry of flavonoid compounds*, Geissman, T. A., ed.; The MacMillian Company: New York, 1962, cap. 3.
- [23] -Seikel, M. K.; *Isolation and identification of phenolic compounds in biological materials*; Em: *Biochemistry of phenolic compounds*, Harborne, J. B., ed.; Academic Press: London, 1968, 2<sup>nd</sup> ed., 1968.
- [24] -Lee, H. S.; Hong, V.; Chromatographic analysis of anthocyanins *J. Chromatogr., A* **1992**, 624, 221.
- [25] -Escribano-Bailón, M. T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Anthocyanins in cereals. *J. Chromatogr., A* **2004**, 1054, 129.
- [26] -Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W. M. A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U. A. T.; Analytical and detection methods for flavonoids. *J. Chromatogr., A* **2006**, 1112, 31.
- [27] -Sáenz-Lopez, R.; Fernández-Zurbano, P.; Tena, M. T.; Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the quantitative determination of anthocyanins in wine. *J. Chromatogr., A* **2003**, 990, 247.
- [28] -Salas, E.; Dueñas, M.; Schwartz, M.; Winterhalter, P.; Cheynier, V.; Fulcrand H.; Characterization of pigments from different high speed countercurrent chromatography wine fractions. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4536.
- [29] -Degenhardt, A.; Knapp, H.; Winterhalter, P.; Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 338.
- [30] -Du, Q.; Jerz, G.; Winterhalter, P.; Isolation of two anthocyanin sambubiosides from bilberry (*Vaccinium mytilus*) by high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr., A* **2004**, 1045, 59.

- [31] -Zanatta, C. F.; Cuevas, E.; Bobbio, F. O.; Winterhalter, P.; Mercadante, A. Z.; Determination of anthocyanins from Camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-DAD, HPLC-MS, and NMR. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 531.
- [32] -Calvo, D.; Sáenz-Lopez, R.; Fernández-Zurbano, P.; Tena, M. T.; Migration order of wine anthocyanins in capillary zone electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *524*, 207.
- [33] -Sáenz-Lopez, R.; Fernández-Zurbano, P.; Tena, M. T.; Analysis of aged red wine pigments by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1052*, 191.
- [34] -Bridle, P.; García.Viguera, C.; Análisis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC. *Food Chem.* **1997**, *59*, 299.
- [35] -Goiffon, J. P.; Mouly, P. P.; Gaydou, E. M.; Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *382*, 39.
- [36] -Cabrita, L.; Fossen, T.; Andersen, Ø. M.; Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chem.* **2000**, *68*, 101.
- [37] -Fukui, Y.; Nomoto, K.; Iwashita, T.; Masuda, K.; Tanaka, Y.; Kusumi, T.; Two novel blue pigments with ellagitannin moiety, rosacyanins A1 and A2, isolated from the petals of *Rosa hybrida*. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9661.
- [38] -Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, 6<sup>a</sup> ed, Aguiar, P. F.; Alencastro R. B. (traduções), LTC: Rio de Janeiro, 2000.
- [39] -Agrawal, P. K.; Markham, K. R.; Em *Studies in Organic Chemistry 39: Carbon-13 NMR of flavonoids*, Agrawal, P. K., ed; Elsevier Sciences Publishers B, 1989.

- [40] -Kořir, I. J.; Lapornik, B.; Andrenšek, S.; Wondra, A. G.; Vrhovšek, U.; Kidrič, J.; Identification of anthocyanins in wines by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 277.
- [41] -Sentellas, S.; Saurina, J.; Multivariate calibration methods for quantification in strongly overlapping capillary electrophoretic peaks. *J. Chromatogr., A* **2001**, *909*, 259.
- [42] -Gui, M.; Rutan, S. C.; Agbodjan, A; Kinetic detection of overlapped amino acids in thin-layer chromatography with direct trilinear decomposition method. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3293.
- [43] -Scarminio, I. S.; Ishikawa, D. N.; Barreto, W. J., Paczkowski, E. L.; Arruda, I. C.; Calibração multivariada para sistemas com bandas sobrepostas através da Análise de Fatores do Tipo Q. *Quím. Nova* **1998**, *21*, 590.
- [44] -Levi, M. A. B.; Scarminio, I. S.; Poppi, R. J.; Trevisan, M. G.; Three-way chemometric method study and UV-Vis absorbance for the study of simultaneous degradation of anthocyanins in flowers of the *Hibiscus rosa-sinensis* species. *Talanta* **2004**, *62*, 299.
- [45] -Março, P. H.; Levi, M. A. B.; Scarminio, I. S.; Poppi, R. J.; Trevisan, M. G.; Exploratory analysis of simultaneous degradation of anthocyanins in the calyces of flowers of the *Hibiscus Sabdariffa* species by PARAFAC model. *Anal. Sci.* **2005**, *21*, 1523.
- [46] -Março, P. H.; Scarminio, I. S.; Q-mode curve resolution of UV-vis spectra for structural transformation studies of anthocyanins in acidic solutions. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *583*, 138.
- [47] -Juan, A.; Tauler, R.; Multivariate Curve Resolution (MCR) from 2000: Progress in Concepts and Applications *Crit. Rev. in Anal. Chem.* **2006**, *36*, 163
- [48] -Wise, B. M.; Gallagher, N. B.; Bro, R. Shaver, J. M.; Windig, W.; Koch, R.; *PLS\_Toolbox Version 4.0 for use with MATLAB*, Eigenvector Research.

- [49] -Pereira-Filho, E. R. ; Pérez, C. A.; Poppi, R. J.; Arruda; M. A. Z; Metals distribution and investigation of L'vov platform surface using principal component analysis, multi-way principal component analysis, micro synchrotron radiation X-ray fluorescence spectrometry and scanning electron microscopy after the determination of Al in a milk slurry sample *Spectrochim. Acta, part B* **2002**, 57, 1259.
- [50] -Windig, W.; Gallagher, N. B.; Shaver, J. M.; Wise, B. M.; A new approach for interactive self-modeling mixture analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2005**, 77, 85.
- [51] -Cao, L.; Harrington, P. B.; Liu, J.; SIMPLISMA and ALS Applied to Two-Way Nonlinear Wavelet Compressed Ion Mobility Spectra of Chemical Warfare Agent Simulants. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 2575.
- [52] -Tauler, R.; Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1995**, 30, 133
- [53] -Otto, M. *Chemometrics*. Weinheim: Wiley, 1999.
- [54] -Beebe, K. R.; Kowalski, B. R.; An introduction to multivariate calibration and analysis. *Anal. Chem.* **1987**, 59:17, A1007.
- [55] -Vandeginste, B. G. M.; Massart, D. L.; Buydens, L. M. C.; Jing, S.; Lewi, P. J.; Smeyers-Verbeke, J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*. Amsterdam: Elsevier, 1998.
- [56] -Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B. *Chemometrics: A practical guide*. Wiley, 1998.
- [57] -Windig, W.; Guilment, J.; Interactive self-modeling mixture analysis. *Anal. Chem.* **1991**, 63:14, 1425.
- [58] -Windig, W.; Antalek, B.; Lippert, J. L.; Batonneau, Y; Bremard, C.; Combined Use of Conventional and Second-Derivative Data in the SIMPLISMA Self-Modeling Mixture Analysis Approach. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 1371.
- [59] -Malinowski, E. R.; *Factor Analysis in Chemistry*, 3rd ed., Wiley, New York, 2002

- [60] -Xu, C. J.; Gourvéneq, S.; Liang, Y. Z.; Massart, D. L.; Local factor analysis of rank-deficient reaction systems. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 575:1, 1.
- [61] -Mendieta, J.; Díaz-Cruz, M. S.; Esteban, M.; Tauler, R.; A Possible Tool in the Detection of Intermediate Structures in Protein Folding. *Biophys. J.* **1998**, 74, 2876.
- [62] -Tauler, R.; Smilde, A.; Kowalski, B.; Selectivity, Local Rank, Three-Way Data Analysis and Ambiguity in Multivariate Curve Resolution. *J. Chemom.* **1995**, 9, 31.
- [63] -Ruckebusch, C.; Juan, A.; Duponchel, L.; Huvenne, J. P.; Matrix augmentation for breaking rank-deficiency: A case study. *Chemom. Intell. Lab. Syst* **2006**, 80, 209.
- [64] -Juan, A.; Navea, S.; Diewok, J.; Tauler, R.; Local rank exploratory analysis of evolving rank-deficient systems. *Chemom. Intell. Lab. Syst* **2004**, 70, 11.
- [65] -Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbühler, A. D.; Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data-IV: Model-free least-squares refinement by use of evolving factor analysis. *Talanta* **1986**, 33:12, 943.
- [66] -Lawton, W. H.; Sylvestr, E. A.; Self Modeling Curve Resolution. *Technometrics* **1971**, 13:3, 617.
- [67] -Borgen, O. S.; Kowalski, B. R.; An extension of the multivariate component-resolution method to three components. *Anal. Chim. Acta* **1985**, 174, 1.
- [68] -Gemperline, P. J.; Target transformation factor analysis with linear inequality constraints applied to spectroscopic-chromatography. *Analytical Chemistry* **1986** 58, 2656.
- [69] -Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbuehler, A. D.; Quantification of a known component in an unknown mixture. *Anal. Chim. Acta* **1987**, 193, 287.

- [70] -Schostack, K. J.; Malinowski, E. R.; Investigation of window factor analysis and matrix regression analysis in chromatography. *Chemom. Intell. Lab. Syst* **1993**, 20:2, 173.
- [71] -Darj, M. M.; Malinowski, E. R.; Complexation between copper(II) and glycine in aqueous acid solutions by window factor analysis of visible spectra. *Anal. Chem.* **1996**, 68:9, 1593.
- [72] -Kvalheim, O. M.; Liang, Y. Z.; Heuristic evolving latent projections: resolving two-way multicomponent data. 1. Selectivity, latent-projective graph, datascope, local rank, and unique resolution. *Anal. Chem.* **1992**, 64:8, 936.
- [73] -Esteban, M.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Díaz-Cruz, M. S.; Tauler, R.; Multivariate curve resolution with alternating least squares optimisation: a soft-modelling approach to metal complexation studies by voltammetric techniques. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2000**, 19:1, 49.
- [74] -Gallagher, N. B.; Shaver, J. M.; Martin, E. B.; Morris, J.; Wise, B. M.; Windig, W.; Curve resolution for multivariate images with applications to TOF-SIMS and Raman. *Chemom. Intell. Lab. Syst* **2004**, 73, 105.
- [75] -Juan, A.; Tauler, R.; Dyson, R.; Marcolli, C.; Rault, M.; Maeder, M.; Spectroscopic imaging and chemometrics: a powerful combination for global and local sample analysis. *TrAC-Trends Anal. Chem.* **2004**, 23, 70.
- [76] -Tauler, R.; Barceló, D. (ed) (2000) Interpretation of environmental data using chemometrics. *Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Techniques, Applications and Quality Assurance*. p. 689. Elsevier, Amsterdam.
- [77] -Manne, R.; Shen, H.; Liang, Y.; Subwindow factor analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst* **1999**, 45, 171.
- [78] -Xu, C. J., Liang, Y. Z.; Jiang, J. H.; Resolution of the embedded chromatographic peaks by modified orthogonal projection resolution and entropy maximization method. *Anal. Lett.* **2000**, 33, 2105.

- [79] -Malinowski, E. R.; Automatic window factor analysis. A more efficient method for determining concentration profiles from evolutionary spectra. *J. Chemom.* **1996**, 10, 273.
- [80] -Vandeginste, B. G. M.; Derks, W.; Kateman, G.; Multicomponent self-modelling curve resolution in high-performance liquid chromatography by iterative target transformation analysis. *Anal. Chim. Acta* **1985**, 173, 253.
- [81] -Jaumot, J., Gargallo, R., de Juan, A.; Tauler, R.; A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemom. Intell. Lab. Syst* **2005**, 76, 101.
- [82] -Manne, R.; Grande, B. V.; Resolution of two-way data from hyphenated chromatography by means of elementary matrix transformations. *Chemom. Intell. Lab. Syst* **2000**, 50, 35.
- [83] -Carvalho, A. R.; Wattoo, J.; Zhu, L. F.; Brereton, R. G.; Combined kinetics and iterative target transformation factor analysis for spectroscopic monitoring of reactions. *Analyst* **2006**, 131, 90.
- [84] -Amigo, J. M.; Juan, A.; Coello, J.; Maspocho, S.; Hard-soft multivariate curve resolution strategies for the quantitative determination of oxipurines and uric acid in human urine. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 567, 236.
- [85] -Díaz-Cruz, J. M.; Agulló, J.; Díaz-Cruz, M. S.; Ariño, C.; Esteban, M.; Tauler, R.; Implementation of a chemical equilibrium constraint in the multivariate curve resolution of voltammograms from systems with successive metal complexes. *Analyst* **2001**, 126, 371.
- [86] -López, M. J.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, S., Díaz-Cruz, J. M., Tauler, R.; Esteban, M.; Voltammetry assisted by multivariate analysis as a tool for speciation of metallothioneins: Competitive complexation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -metallothionein domains with cadmium and zinc. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 37, 5609.

- [87] -Huo, R., Wehrens, R.; Buydens, L. M. C.; Improved DOSY NMR data processing by data enhancement and combination of multivariate curve resolution with non-linear least square fitting. *J. Magn. Reson.* **2004**, 169, 257.
- [88] -Bro, R.; Multi-way analysis in the food industry. Amsterdam, 1988, Ph. D. Thesis, University of Amsterdam.
- [89] -Zachariassen, C. B.; Larsen, J.; Berg, F. V. D.; Bro, R.; Juan, A.; Tauler, R.; Comparison of PARAFAC2 and MCR-ALS for resolution of an analytical liquid dilution system. *Chemom. Intell. Lab. Syst* **2006**, 83, 13.
- [90] -Smilde, A. K.; Wang, Y.; Kowalski, B. R.; Theory of medium-rank second-order calibration with restricted-Tucker models *J. Chemom.* **1994**, 8:1, 21.
- [91] -Rajko, R.; Istvan, K.; Analytical solution for determining feasible regions of self-modeling curve resolution (SMCR): Method based on computational geometry. *J. Chemom.* **2005**, 19, 448.
- [92] -Leger, M. N.; Wentzell, P. D.; Dynamic Monte Carlo self-modeling curve resolution method for multicomponent mixtures. *Chemom. Intell. Lab. Syst* **2002**, 62, 171.
- [93] -Jaumot, J.; Gargallo, R.; Tauler, R.; Estimation of error propagation and prediction intervals in MCR-ALS using resampling methods. *J. Chemom.* **2004**, 18, 327.
- [94] -Bijlsma, S.; Smilde, A. K.; Estimating reaction rate constants from a two-step reaction: a comparison between two-way and three-way methods. *J. Chemom.* **2000**, 14, 541.
- [95] -Faber, K.; Comment on a recently proposed resampling method. *J. Chemom.* **2001**, 15, 169.
- [96] -Mas, S.; Juan, A.; Lacorte, S.; Tauler, R.; Photodegradation study of decabromodiphenyl ether by UV spectrophotometry and a hybrid hard- and soft-modelling approach. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 618, 18.

- [97] -Schiozer, A. L.; Março, P. H.; Barata, L. E. S.; Poppi, R. J.; Exploratory Analysis of *Arrabidaea chica* Deoxyanthocyanidins Using Chemometric Methods. *Anal. Lett.* **2008**, 41:9, 1592.
- [98] -Tauler, R.; Kowalski, B.; Fleming, S.; Multivariate Curve Resolution Applied to Spectral Data from Multiple Runs of an Industrial Process. *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2040.
- [99] -Tauler, R.; Barceló, D.; Multivariate curve resolution applied to liquid chromatography-diode array detection. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **1993**, 12, 319.
- [100] -Garrido, M.; Lázaro, I.; Larrechi, M. S.; Rius; Multivariate resolution of rank-deficient near-infrared spectroscopy data from the reaction of curing epoxy resins using the rank augmentation strategy and multivariate curve resolution alternating least squares approach. F. X.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, 515, 65.
- [101] -Van Sprang, E. N. M.; Ramaker, H. J.; Westerhuis, J. A.; Smilde, A. K.; Gurden, S. P.; Wienke, D.; Near-infrared spectroscopic monitoring of a series of industrial batch processes using a bilinear grey model. *Appl. Spectrosc.* **2003**, 57, 1007.
- [102] -Van Zomeren, P. V.; Hoogvorst, A.; Optimisation of high-performance liquid chromatography with diode array detection using an automatic peak tracking procedure based on augmented iterative target transformation factor analysis. Coenegracht, P. M. J.; Jong, G. J.; *Analyst* **2004**, 129, 241.
- [103] -Peré-Trepat, E.; Hildebrandt, A.; Barceló, D.; Lacorte, S.; Tauler, R.; Fast chromatography of complex biocide mixtures using diode array detection and multivariate curve resolution. *Chemom. Intell. Lab. Syst* **2004**, 74, 293.
- [104] -González-García, O.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M.; Possibilities of multivariate curve resolution and partial least squares in the resolution of coeluted peaks in liquid chromatography with electrochemical detection. *Chemom. Intell. Lab. Syst* **2008**, 93, 49.

- [105] -Marsili, N. R.; Lista, A.; Band, B. S. F.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C.; New method for the determination of benzoic and sorbic acids in commercial orange juices based on second-order spectrophotometric data generated by a pH gradient flow injection technique. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 2479.
- [106] -Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Quantitative determinations in conventional flow injection analysis based on different chemometric calibration strategies: a review. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 438, 335.
- [107] -Jaumot, J.; Eritja, R.; Tauler, R.; Gargallo, R.; Resolution of a structural competition involving dimeric G-quadruplex and its C-rich complementary strand. *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 206.
- [108] -Jaumot, J.; Marchan, V.; Gargallo, R.; Grandas, A.; Tauler, R.; Multivariate curve resolution applied to the analysis and resolution of two-dimensional [H-1,N-15] NMR reaction spectra. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 7094.
- [109] -Esteban, M.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Chemometrics for the analysis of voltammetric data. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2006**, 25, 86.
- [110] -Ruckebusch, C.; Duponchel, L.; Huvenne, J. P.; Saurina, J.; Multivariate curve resolution of step-scan FTIR spectral data. *Vib. Spectrosc.* **2004**, 35, 21.
- [111] -Gallagher, N. B.; Shaver, J. M.; Martin, E. B.; Morris, J.; Wise, B. M.; Windig, W.; Curve resolution for multivariate images with applications to TOF-SIMS and Raman. *Chemom. Intell. Lab. Syst* **2004**, 73, 105.
- [112] -Wang, J. H.; Hopke, P. K.; Hancewicz, T. M.; Zhang, S. L. L.; Application of modified alternating least squares regression to spectroscopic image analysis. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 476, 93.
- [113] -Timlin, J. A.; Haaland, D. M.; Sinclair, M. B.; Aragon, A. D.; Martinez, M. J.; Werner-Washburne, M.; Hyperspectral microarray scanning: impact on the accuracy and reliability of gene expression data. *BMC Genomics* **2005**, 6, 72.

- [114] -Navea, S.; Juan, A.; Tauler, R.; Detection and resolution of intermediate species in protein folding processes using fluorescence and circular dichroism spectroscopies and multivariate curve resolution. *Anal. Chem.* **2002**, 64, 6031.
- [115] -Navea, S.; Juan, A.; Tauler, R.; Modeling temperature-dependent protein structural transitions by combined near-IR and mid-IR spectroscopies and multivariate curve resolution. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 5592.
- [116] -Vives, M.; Gargallo, R.; Tauler, R.; Multivariate extension of the continuous variation and mole-ratio methods for the study of the interaction of intercalators with polynucleotides. *Anal. Chim. Acta* **2000**, 424, 105.
- [117] -Perrin, D. D.; Dempsey, B.; Buffers for pH and Metal Ion Control. New York: Chapman and Hall, 1974. cap 3, pg 48-49.
- [118] -MCR Web Page: <http://www.ub.edu/mcr/welcome.html>: acessado em 18/11/2008.
- [119] -Hong, V.; Wrolstad, R. E.; Use of HPLC Separation/Photodiode Array Detection for Characterization of Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 708.
- [120] -Maestri, M.; Pina, F.; Roque, Ana.; Passaniti, P.; Light and pH switching between the various forms of the 4'-methylflavylium cation. *J. Photochem. Photobiol. A*: **2000**, 137, 21.
- [121] -Março, P. H.; Estudo do Comportamento Cinético de Antocianinas do *Hibiscus Acetosella* por Métodos Quimiométricos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Química, Londrina – PR, 2004.
- [122] -McClelland, R. A.; Gedge, S.; Hydration of the Flavylium Ion. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5838.

- [123] -McClelland, R. A.; Devine, D. B.; Sørensen, P. E.; Hemiacetal Formation with a Phenol Nucleophile: Simple Proton Transfers as Rate-Limiting Steps. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 107, 5459.
- [124] -Carlsen, C.; Stapelfeldt, H.; Light sensitivity of elderberry extract. Quantum yields for photodegradation in aqueous solution. *Food Chem.* **1997**, 60, 3, 383.
- [125] -Yamaki, S. B.; Oliveira, M. G.; Atvars, T. D. Z.; The Effect of Dye-Polymer Interactions on the Kinetics of the Isomerization of 4-Dimethyl-Aminoazobenzene and Mercury Dithizonate. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, 15, 253.
- [126] -Poppi, R.J.; Construção de um espectrofotômetro com transformada de Hadamard e sua aplicação na Análise por Injeção em Fluxo. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas – SP, 1993.
- [127] -Carneiro, R. L.; Algoritmos genéticos para a seleção de variáveis em métodos de calibração de segunda ordem. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas – SP, 2007.
- [128] -Kong, J. M.; Chia, L. S.; Goh, N. K.; Chia, T. F.; Brouillard, R.; Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **2003**, 64, 923.
- [129] -Borkowski, T.; Szymusiak, H.; Gliszczynska-Swigio, A.; Tyrakowska, B.; The effect of 3-O- $\beta$ -glucosylation on structural transformations of anthocyanidins. *Food Res. Internat.* **2005**, 38, 1031.
- [130] -Brouillard, R.; Iacobucci, G. A.; Sweeny, J. G. Chemistry of Anthocyanin Pigments. 9.<sup>1</sup> UV-Visible Spectrophotometric Determination of the Acidity Constants of Apigeninidin and Three Related 3-Deoxyflavylium Salts. *J. Am Chem. Soc.* **1982**, 104, 7585.
- [131] -Brouillard, R.; Delaporte. B.; Chemistry of Anthocyanin Pigments. 2. Kinetic and Thermodynamic Study of Proton Transfer, Hydration, and Tautomeric Reactions of Malvidin 3-Glucoside. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99:26, 8461.

- [132] -Borkowski, T.; Szymusiak, H.; Gliszczyjska-Swigio, A.; Tyrakowska, B.; The effect of 3-*O*- $\beta$ -glucosylation on structural transformations of anthocyanidins. *Food Res. Int.* **2005**, 38, 1031.
- [133] -Redus, M.; Baker, D. C.; Dougall, D. K.; Rate and Equilibrium Constants for the Dehydration and Deprotonation Reactions of Some Monoacylated and Glycosylated Cyanidin Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 3449.
- [134] -Gomes, R.; Diniz, A. M.; Jesus, A.; Parola, A. J.; Pina, F.; The synthesis and reaction network of 2-styryl-1-benzopyrylium salts: An unexploited class of potential colorants. *Dyes and Pigments* **2009** 81, 69.