

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
LAQQA – Laboratório de Quimiometria em Química Analítica



UNICAMP

**“Aplicação de Métodos Quimiométricos de
Ordem Superior e Fluorescência Molecular na
Análise em Matrizes Biológicas”**

- Dissertação de Mestrado -

Marcello Garcia Trevisan

Orientador: Prof. Dr. Ronei J. Poppi

Campinas
Julho de 2003

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

T729a Trevisan, Marcello Garcia.
Aplicação de métodos quimiométricos de ordem superior e fluorescência molecular na análise em matrizes biológicas / Marcello Garcia Trevisan. -- Campinas, SP: [s.n], 2003.

Orientador: Ronei Jesus Poppi

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Quimiometria. 2. Fluorescência molecular.
3. Leite bovino. 4. Sangue humano. I. Poppi, Ronei Jesus. II. Universidade Estadual de Campinas.
III. Título.

*Dedico este trabalho ao Senhor do Universo,
por me dotar de razão e inteligência para nunca crer,
mas sempre tentar ENTENDER!*

*"A fé é, com frequência, a vaidade do homem que é muito preguiçoso para investigar".
F. M. Knowles*
*"They say about me that I am the strangest person, always making people confused".
Sócrates*

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Ronei J. Poppi pela oportunidade de executar este trabalho, pela orientação, apoio e, sobretudo, pela amizade e companheirismo;
- A todos os Professores, Funcionários e Colegas do Instituto de Química da Unicamp, pelo exemplo e apoio na realização deste trabalho;
- Aos Professores Félix Reyes e Susanne Rath e ao Luis Severo pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho;
- Aos colegas do LAQQA: Chiquinho, Caixa d'água, Eduardo, Waldomiro, Jez, Juliana, Alessandra, Gilmore, Fernando, Sílvia e Rose; e aos colegas do LEEDS e aos alunos do Prof. Bertran;
- Aos Professores Ieda Scarmínio, Francisco Pessine e Márcia Ferreira pelas construtivas críticas realizadas a este trabalho;
- Aos Professores Paulo do Nascimento e Denise Bohrer e aos colegas do LACHem: Joselito, Jean, Regina, Marieli, Leandro, Adrian e Luciana, da UFSM, pela amizade e apoio;
- À minha mãe Zilda, aos meus avós Adão e Iolanda, aos tios Álvaro e Marcelo, aos meus irmãos Lelinho e Otávio, ao Aurélio e aos velhos amigos e amigas, pelo carinho, incentivo e suporte durante estes longos anos;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento;
- Ao estado de São Paulo e à Unicamp por conceder a base intelectual e tecnológica para este trabalho e, finalmente,
- A todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho, e para o meu crescimento e maturação física e intelectual, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS DE ORDEM SUPERIOR E FLUORESCÊNCIA MOLECULAR NA ANÁLISE EM MATRIZES BIOLÓGICAS

Autor: Marcello Garcia Trevisan
Orientador: Dr. Ronei J. Poppi

Este trabalho trata da aplicação de métodos quimiométricos de ordem superior e fluorescência molecular no desenvolvimento de novas metodologias analíticas, sem o auxílio de métodos de separação ou pré-concentração, na análise direta de espécies moleculares em amostras biológicas. Para tanto, foram empregados a técnica de fluorimetria (EEM-MF) e os métodos quimiométricos PARAFAC e N-PLS para a determinação direta de doxorrubicina (DXR) em plasma humano e vitamina B₂ em leite bovino.

Para a quantificação de DXR em plasma, foram obtidas 10 amostras de sangue de indivíduos sadios, sem a presença prévia de DXR. Cada amostra gerou uma matriz de dimensões 262x56 (comprimentos de onda de emissão x excitação), na faixa de 510 a 650 nm e 390 a 500 nm, respectivamente. O PARAFAC foi empregado para a decomposição espectral das EEM-MF, referente às amostras de sangue humano. Dois fatores foram obtidos, sendo que um deles foi atribuído à presença de DXR e outro à fluorescência natural do sangue devido, principalmente, à presença de riboflavina e bilirubina. A partir dos *scores* obtidos pela decomposição com PARAFAC, realizou-se a quantificação, resultando em um RMSECV de 0,060 µg mL⁻¹. O N-PLS também foi empregado para a quantificação, gerando um RMSECV de 0,045 µg mL⁻¹.

A análise de vitamina B₂ em amostras de leite desnatado e integral foi realizada com a obtenção de EEM-MF na faixa espectral de emissão 470 a 670 nm e de excitação 310 a 500 nm, produzindo uma matriz de dimensões 401x20. A partir de 10 amostras, 5 de leite integral e 5 de leite desnatado, todas com concentrações desconhecidas de vitamina B₂, o método PARAFAC foi empregado para as decomposições espectrais e, a partir de adição padrão, realizadas as quantificações. As mesmas amostras foram analisadas por HPLC, e os desvios entre os resultados das duas metodologias encontram-se abaixo de 5%.

ABSTRACT

APPLICATION OF N-WAY METHODS AND MOLECULAR FLUORESCENCE IN THE DIRECT DETERMINATION IN BIOLOGICAL MATRICES

Author: Marcello Garcia Trevisan

Adviser: Dr. Ronei J. Poppi

This work relates the application of N-way methods and molecular fluorescence in the development of new analytical procedures, without physical separation process or pre-concentration, in the direct determination in biological samples. For this, Excitation-Emission Matrix of Molecular Fluorescence (EEM-MF) was applied with chemometrics methods, such as PARAFAC and N-PLS, for direct determination of doxorubicin (DXR) in human plasma and B₂ vitamin (riboflavin) in bovine milk.

For the quantitation of DXR in human plasma, 10 samples of blood were obtained from healthy volunteers, without the previous presence of DXR. Each sample generated a matrix of dimensions 262x56 (emission wavelengths x excitation wavelengths), from 510 to 650 nm and 390 to 500 nm, respectively. PARAFAC was used for spectra deconvolution of EEM-MF and two factors were obtained, one of them was used to DXR. Other factor was related to the natural fluorescence of the plasma, due mainly to riboflavin and bilirubin. By using the scores obtained by the decomposition with PARAFAC, the quantitation was performed, resulting in a RMSECV of 0.060 $\mu\text{g mL}^{-1}$. N-PLS was also used for the quantitation, generating a RMSECV of 0.045 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

The B₂ vitamin analysis in samples of whole and skimmed milk was accomplished based on EEM-MF in the spectral range of emission 470 to 670 nm and of excitation 310 to 500 nm, resulting in a matrix of dimensions 401x20. Ten samples, 5 of whole milk and 5 of skimmed milk, with unknown concentrations of B₂ vitamin were used for to build a PARAFAC model and the concentration was estimated by standard addition method. The same samples were analyzed by HPLC and the deviations among the results of the two methodologies were below 5%.

SÚMULA CURRÍCULAR

- Informações Pessoais

Marcello Garcia Trevisan

Data de Nascimento: 09/09/1977

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Santa Maria – RS

Estado Civil: Solteiro

e-mail: mtrevisan@bol.com.br

- Formação

- Curso Superior: Graduação em Química Industrial, Universidade Federal de Santa Maria. Período: 1996-2000. Santa Maria, RS.
- Curso Militar: Patente de 2º Tenente de Infantaria, Classe R2. Núcleo Preparatório de Oficiais da Reserva. 7º Batalhão de Infantaria Blindado. Período: Jan/1996-Ago/1997. Santa Maria, RS.

- Atividades Acadêmicas

- Monitoria acadêmica – Programa de Apoio Didático do Instituto de Química/Unicamp.
Disciplina de QA-216 - Química Analítica II (Análise Quantitativa), 8/2002 a 12/2002.
- Docência orientada - Estágio de Docência Orientada – Departamento de Química/UFSM.
Curso de Farmácia de Alimentos. Disciplina de Análise Instrumental, 3/2001 a 7/2001.
- Monitoria - Monitor do Departamento de Expressão Gráfica do Centro de Tecnologia/UFSM.
Curso de Engenharia Química. Disciplina Desenho Técnico, 9/1997 a 6/1998.
- Iniciação Científica - 3/1998 a 02/1999 - Bolsa CNPq.
Orientador: Profª. Drª. Denise Bohrer do Nascimento – LACHEM – UFSM.
- Iniciação Científica - 3/1999 a 02/2000 – Bolsa FAPERGS.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento – LACHEM – UFSM.
- Iniciação Científica - 3/2000 a 02/2001 – Bolsa FAPERGS.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento – LACHEM – UFSM.

- Lista de Publicações

1. D. Bohrer, P. C. do Nascimento, M. Guterres, M. Trevisan, E. Seibert, *"Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of lead, cadmium, copper and zinc in high-salt content samples after simultaneous separation on polyethylene powder impregnated with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol: application to analysis of hemodialysis fluids"*.
The Analyst, 124 (1999) 1345-1350.
2. P. C. do Nascimento, D. Bohrer, A. Ramirez, M. G. Trevisan, J. Tramontina, A. L. B. Rohlfes, *"Voltammetric determination of volatile free sulfide and alkylthiols as contaminants in parenteral amino acid solutions."*
Talanta, 52 (2000) 1047-1054.
3. P. C. do Nascimento, D. Bohrer, M. Trevisan, M. S. Marques, M. V. Guterres, *"Quality control of dialysis fluids by micellar colorimetry and multivariate calibration."*
Analytical Letters, 34 (2001) 1967-1978.

4. M. G. Trevisan, R. J. Poppi, "Determination of doxorubicin in human plasma by excitation-emission matrix fluorescence and multi-way analysis".

Analytica Chimica Acta, Aceito para publicação.

5. M. A. B. Levi, I. S. Scarmínio, R. J. Poppi, M. G. Trevisan, "Three-way chemometric method study of simultaneous degradation of anthocyanins in flowers of the *Hibiscus rosa-sinensis* species".

Talanta. Aceito para publicação.

- Trabalhos em Congressos Internacionais

1. M. G. Trevisan, R. J. Poppi, "Determination of doxorubicin in human plasma by excitation-emission matrix fluorescence and multi-way analysis". VIII Chemometrics in Analytical Chemistry, Seattle, USA, p. 126. Período: 22 a 26 de setembro de 2002. Apresentação: Pôster.

2. D. Bohrer, P. C. do Nascimento, M. Trevisan, M. Guterres, E. Seibert, "Determination of Pb, Cd, Cu and Zn by electrothermal absorption atomic spectrophotometry in concentrates for hemodialysis after separation on polyethylene powder columns conditioned with a complexing agent". 5º Rio Symposium on Atomic Spectrometry. Cancun, Mexico, p. 137. Período: 04 a 10 de outubro de 1998. Apresentação: Oral e pôster.

- Trabalhos em Congressos Nacionais

- M. G. Trevisan, L. S. Silva Junior, S. Rath, F. G. Reyes, R. J. Poppi, "Determinação direta de vitamina B₂ em leite bovino por fluorescência molecular de excitação-emissão e análise de fatores paralelos – PARAFAC". 26ª Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas, MG. 26 a 29 de maio de 2003, QA-224.

- M. G. Trevisan, F. P. T. Pessine, R. J. Poppi, "Análise de doxorubicina em plasma sanguíneo por fluorescência molecular e métodos multidimensionais". 25ª Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas, MG. 23 a 26 de maio de 2002 QA-057.

- A. G. Ramirez, P. C. do Nascimento, D. Bohrer, A. L. B. Rohlfs, M. Trevisan, "Determinação polarográfica de sulfeto livre e combinado em soluções de nutrição parenteral". VIII Encontro de Química da Região Sul, Santa Cruz do Sul, RS. 09 a 11 de novembro de 2000.

- P. C. do Nascimento, D. Bohrer, M. G. Trevisan, "Desenvolvimento de um modelo de calibração multivariada para a quantificação on-line de cloraminas inorgânicas em água". XV Jornada Acadêmica Integrada, Santa Maria, RS. 03 a 05 de outubro de 2000.

- P. C. do Nascimento, D. Bohrer, A. L. B. Rohlfs, A. G. Ramirez, M. Trevisan, "Determinação voltamétrica simultânea de sulfeto livre e combinado em soluções de nutrição parenteral". 23ª Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas, MG. 23 a 26 de maio de 2000, QA-144.

- 21ª Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas, MG. 25 a 28 de maio de 1998.

- Participação em Congressos Nacionais

- 11º ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica. Campinas, SP. 18 a 21 de setembro de 2001.

- 10º ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica. Santa Maria, RS. 31 de agosto a 03 de setembro de 1999.

ÍNDICE

Prefácio	01
1. Fluorescência Molecular	
1.1. Introdução.....	06
1.2. Transições Eletrônicas.....	06
1.3. Intensidade de Fluorescência e Concentração.....	08
1.4. Matrizes de Fluorescência de Excitação-Emissão.....	10
1.5. Espalhamentos Rayleigh e Raman.....	13
1.6. Supressão de Fluorescência.....	14
2. Métodos Quimiométricos de Ordem Superior	
2.1. Introdução.....	18
2.2. Classificação dos Dados Experimentais.....	19
2.3. Modelos Tridimensionais de Tucker.....	21
2.4. Modelo de PARAFAC.....	23
2.4.1. Escolha do Número de Fatores.....	26
2.5. Multi-Linear PLS.....	27
2.6. Figuras de Mérito para Métodos Multidimensionais.....	28
3. Determinação de Doxorrubicina	
3.1. Introdução.....	32
3.2. Experimental	
3.2.1. Aparatos.....	35
3.2.2. Reagentes e Soluções.....	36
3.2.3. Amostras.....	36
3.2.4. Procedimento.....	36
3.3. Resultados e Discussão	
3.3.1. Fluorescência Natural do Plasma Humano.....	37
3.3.2. PARAFAC	
3.3.2.1. Seleção do Número de Fatores.....	39

3.3.2.1.1. Porcentagem de Ajuste do Modelo	40
3.3.2.1.2. Diagnóstico de Consistência do Tensor Núcleo (Corcondia)	41
3.3.2.1.3. Análise por Split-half	41
3.3.2.2. Decomposição e Calibração	43
3.3.3. Multilinear PLS (N-PLS).....	46
3.3.4. Figuras de mérito.....	47
3.4. Conclusões	48
 4. Determinação de Riboflavina	
4.1. Introdução.....	50
4.2. Experimental	
4.2.1. Aparatos.....	53
4.2.2. Reagentes e Soluções	53
4.2.3. Amostras.....	54
4.2.4. Procedimento	54
4.3. Resultados e Discussão	
4.3.1. Fluorescência Natural do Leite Bovino.....	55
4.3.2. Estudos Preliminares	56
4.3.3. Construção de um Modelo Eficiente	62
4.3.4. Validação da Metodologia	64
4.4 Conclusões	66
 5. Conclusões.....	67
6. Perspectivas Futuras.....	69
7. Referências Bibliográficas	71
8. Apêndice 1A	77
9. Apêndice 2A	81
10. Apêndice 3A	85

LISTA DE ABREVIATURAS*

ALS	<i>Alternating Least Squares</i> – (Mínimos quadrados alternados);
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i> – (Eletroforese Capilar);
CLS	<i>Classical Least Squares Regression</i> – (Regressão clássica dos mínimos quadrados);
Corcondia	<i>CORe CONSistency DIagnostic</i> – (diagnóstico de consistência da tensor núcleo);
DAD	<i>Diode Array Detector</i> – (Detector de Arranjo de Diodos);
DXR	Cloridrato de doxorubicina;
EEM-MF	<i>Excitation-Emission Matrix - Molecular Fluorescence</i> ;
ES-MS	<i>Eletro Spray - Mass Spectrometry</i> – (Espectrometria de Massa com Eletro Spray);
FAD	<i>Flavine adenine dinucleotide</i> - (Flavina dinucleotídeo);
FM	Fluorescência Molecular;
FMN	<i>Flavine mononucleotide</i> - (Flavina mononucleotídeo);
FOM	<i>Figures Of Merit</i> – (Figuras Analíticas de Mérito);
FT-IR	<i>Fourier Transform – InfraRed</i> – (Infravermelho com transformada de Fourier);
GC-GC	<i>Gas Chromatography - Gas Chromatography</i> (Cromatografia Gasosa hifenada);
GRAM	<i>Generalized Rank Annihilation Method</i> – Método da aniquilação do posto generalizado;
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> – (Cromatografia líquida de alta eficiência);
LIF	<i>Laser Induced Fluorescence</i> – (Fluorescência Induzida por Laser);
LV	<i>Latent Variable</i> – (Variável latente);
MLR	<i>Multiple Linear Regression</i> – (Regressão Linear Múltipla);
MS-MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> (Espectroscopia de Massas hifenada);
NAD	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i> – (Adenina dinucleotídeo nicotinamida);
NAS	<i>Net Analyte Signal</i> – (Sinal puro do analito);
N-PLS	<i>N-way Partial Least Squares Regression</i> - (Regressão por mínimos quadrados parciais multidimensional);
PARAFAC	<i>PARAllel FACtor analysis</i> - (Análise de Fatores Paralelos);
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> – (Análise de Componentes Principais);
PLS	<i>Partial Least Squares Regression</i> – (Regressão por mínimos quadrados parciais);
RF	Riboflavina;
RMSECV	<i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i> – (Raiz do erro médio quadrático obtido por validação cruzada);
SEL	Seletividade;
SEN	Sensibilidade;
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> - (Ácido tricloroacético);
TLD	<i>TriLinear Decomposition Method</i> – (Método de decomposição trilinear);
UHT	<i>Ultra High Temperature</i> ;

* Os termos em inglês estão em itálico.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ajuste (%) e diagnóstico de consistência (Corcondia) para 1 a 5 fatores	40
Tabela 2. Variância explicada para os blocos X e Y	46
Tabela 3. Figuras analíticas de mérito.....	47
Tabela 4. Valores de Ajuste (%) e <i>Corcondia</i> para os modelos PARAFAC usando de 1 a 5 fatores	57
Tabela 5. Concentração de riboflavina para as amostras diluídas em $\mu\text{g mL}^{-1}$	61
Tabela 6. Desvios e concentrações obtidas em $\mu\text{g mL}^{-1}$ pelo método de referência e pela metodologia desenvolvida	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos estados eletrônicos singlete e triplete e suas transições.....	7
Figura 2. Espectros de fluorescência total de amostras de urina (A), plasma (B) e leite (C)	12
Figura 3. Exemplos de técnicas hífenadas que geram dados de segunda ordem ou multidimensionais	20
Figura 4. Representação da decomposição efetuada pelo método de Tucker	23
Figura 5. Dados tridimensionais X sendo decompostos por um modelo PARAFAC com dois fatores mais um tensor residual E	24
Figura 6. Fórmula estrutural de uma molécula de doxorrubicina	32
Figura 7. Espectro típico de fluorescência de excitação/emissão do plasma humano, em indivíduos saudáveis	37
Figura 8. Espectros de fluorescência de bilirrubina (a) e riboflavina(b).....	38
Figura 9. <i>Loadings</i> do modo de emissão, gerados pelo procedimento de split-half, na faixa de 1 a 5 fatores, em valores de unidade arbitrária	42
Figura 10. Superfície recuperada dos loadings do primeiro fator do modelo PARAFAC	43
Figura 11. Espectro de fluorescência de DXR pura em água (sem espalhamento Rayleigh)	44
Figura 12. Superfície recuperada dos <i>loadings</i> do segundo fator do modelo PARAFAC.....	44
Figura 13. Curva de calibração para DXR obtida por validação cruzada com <i>leave-one-out</i>	45
Figura 14. Fórmula estrutural da molécula de Riboflavina, FMN e FAD	50
Figura 15. Superfície proveniente de uma EEM de uma amostra de leite desnatado.....	56
Figura 16. Gráficos de scores (a), loadings de excitação (b) e emissão (c) para o conjunto de diluições	58
Figura 17. Vários níveis de diluição de uma amostra de leite	59

Figura 18. Regressão linear entre os scores da calibração e a concentração de B_2	60
Figura 19. Loadings das amostras extraídas com TCA	63
Figura 20. Superfície recuperada dos loadings do primeiro fator	63
Figura 21. Superfície de loadings reconstruída a partir do segundo fator	64

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Intensidade de Fluorescência - 1	8
Equação 2. Intensidade de Fluorescência - 2	9
Equação 3. Intensidade de Fluorescência - 3	9
Equação 4. Estrutura do modelo de Tucker3	22
Equação 5. Estrutura do modelo PARAFAC - 1	24
Equação 6. Estrutura do modelo PARAFAC - 2	25
Equação 7. Corcondia.....	26
Equação 8. Fit.....	27
Equação 9. N-PLS	27
Equação 10. NAS-PARAFAC.....	29
Equação 11. NAS-NPLS	29
Equação 12. Sensibilidade.....	29
Equação 13. Seletividade.....	29
Equação 14. Limite de Detecção	29

PREFÁCIO

PREFÁCIO

Via de regra, o procedimento analítico para a análise de espécies moleculares em amostras complexas de origem biológica, tais como sangue, urina, leite e plasma, envolve o emprego de métodos de separação física, como cromatografia líquida ou eletroforese capilar. Nestes procedimentos, os analitos são separados das outras espécies interferentes presentes na matriz e quantificados através de um detector apropriado, em geral com detecção univariada. Além disso, muitas destas espécies podem estar presentes em níveis de traços, necessitando o emprego complementar de etapas de pré-concentração.

Muitas vezes, de fato, a separação química e/ou pré-concentração é realmente o procedimento mais apropriado para a execução dessas análises, por mais simples que sejam. No entanto, através da combinação entre métodos quimiométricos de ordem superior com determinadas técnicas analíticas, algumas destas etapas podem ser reduzidas ou até mesmo eliminadas do protocolo de análise. Esta possibilidade se dá com o emprego de métodos de calibração multivariada, onde várias espécies em um único sistema podem ser identificadas e/ou quantificadas sem separação química.

Nos últimos 20 anos, têm crescido o número de metodologias que empregam métodos de calibração multivariada na resolução de misturas com multicomponentes, seja em matrizes simples ou complexas. Métodos de primeira ordem como PLS, PCA e CLS¹ empregam dados vetoriais (como todos os comprimentos de onda de um espectro), com as vantagens de produzir robustez à análise, identificar a presença de interferentes e amostras com erros elevados ou ainda, os desvios de um processo. Nesses casos, a quantificação é possível, mesmo na presença de interferentes, desde que esses sejam previamente levados em consideração na construção do modelo de calibração.

No entanto, para uma boa performance destes métodos, é necessário um grande conjunto de treinamento (elevado número de amostras) e que os possíveis interferentes estejam modelados no conjunto de calibração, pois estes métodos são sensíveis a espécies não modeladas.

A fluorimetria é uma técnica analítica consagrada que fornece uma grande sensibilidade e seletividade analítica, muitas vezes empregada na análise de sistemas em que os analitos estão presentes em concentração nano ou picomolares². Em contrapartida, quando se trabalha com fluorescência molecular (FM), um grande problema é a sobreposição espectral, principalmente quando matrizes biológicas estão envolvidas, pois estas apresentam um rico espectro natural de

fluorescência de fundo, com vários compostos interferentes. Para isso, uma importante ferramenta quimiométrica que pode e deve ser empregada são as técnicas de calibração multivariada, onde se emprega todo o espectro para o desenvolvimento do modelo.

Além da possibilidade de produzir modelos multivariados de primeira ordem, a fluorimetria também pode gerar dados de segunda ordem, onde os módulos de excitação e emissão variam conjuntamente. O emprego deste tipo de técnica modulada possibilita a obtenção de uma matriz de valores de intensidades de fluorescência por amostra, sendo conhecida como fluorescência total ou fluorescência 2-D. Os fundamentos básicos desta técnica serão abordados no primeiro capítulo.

Dados de segunda ordem, tais como os gerados por fluorescência 2-D (varredura conjunta da excitação e emissão) podem ser analisados com o emprego de métodos multidimensionais, tais como o Método de Análise de Fatores Paralelos ou PARAFAC, Multilinear-PLS e os métodos generalizados de Tucker³. Além de detectar anomalias em um determinado conjunto, os métodos multidimensionais possibilitam a quantificação na presença de interferentes desconhecidos. Esta característica, conhecida como *uniqueness*, permite a análise de determinadas substâncias em matrizes que apresentam uma alta variabilidade de composição e concentração. Outra importante característica é a possibilidade de emprego de um número bastante reduzido de amostras em relação aos métodos de primeira ordem, sem apresentar perda de reprodutibilidade dos resultados ou na estabilidade da decomposição⁴. Os principais métodos multidimensionais e a teoria que envolve a decomposição e regressão de dados de segunda ordem serão abordados no segundo capítulo desta dissertação.

Desta forma, a combinação fluorimetria/quimiometria pode possibilitar a criação de metodologias alternativas, onde o emprego de etapas de separação física e/ou pré-concentração não estejam necessariamente envolvidas, tornando estas metodologias mais robustas, versáteis, rápidas e econômicas. Neste trabalho, duas novas metodologias analíticas envolvendo métodos quimiométricos de ordem superior e dados de segunda ordem obtidos por fluorimetria foram desenvolvidas. Cada aplicação envolve a determinação direta de uma espécie de interesse em uma diferente matriz biológica, como sangue humano e leite bovino,

A primeira aplicação intitulada “Determinação de doxorubicina em plasma humano por fluorescência molecular de excitação-emissão e métodos multidimensionais” visa desenvolver uma metodologia alternativa para a análise de um dos principais agentes citotóxicos empregados atualmente no combate ao câncer. A fluorescência natural da molécula de doxorubicina (DXR) é

explorada para realizar a sua análise diretamente em amostras de plasma, de modo que a sobreposição espectral devido à presença dos interferentes é separada de forma quimiométrica, como será abordado em detalhes no terceiro capítulo.

O quarto capítulo trata da segunda aplicação, onde a quantificação de riboflavina total ou vitamina B₂ é realizada em cinco diferentes marcas de leite bovino, sendo que cada marca estudada compreende os tipos desnatado e integral, totalizando dez diferentes amostras. Neste estudo, intitulado “Determinação direta de riboflavina total por fluorescência molecular e análise multidimensional”, concentrações conhecidas de riboflavina foram adicionadas em uma determinada amostra, sendo que a curva obtida foi extrapolada para as outras amostras e os resultados obtidos foram comparados com o método padrão de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Este trabalho encerra-se com as conclusões gerais obtidas através das duas aplicações desenvolvidas, perspectivas futuras e com a lista de referências bibliográficas empregada no desenvolvimento deste trabalho.

CAPÍTULO I

FLUORESCÊNCIA

MOLECULAR

1. Fluorescência Molecular

1.1 Introdução

Este capítulo trata dos fundamentos e aplicações obtidos pelo emprego de fluorescência molecular que, juntamente com a fosforescência e quimiluminescência, caracterizam o grupo de técnicas chamadas luminescentes. Estas técnicas estão fundamentadas nos fenômenos que ocorrem quando uma molécula, após sofrer excitação, retorna ao seu estado fundamental, produzindo um espectro de emissão característico. Análises qualitativa ou quantitativa podem ser realizadas com as intensidades de emissão presentes nestes espectros.

Ambas as técnicas de fluorimetria e fosforimetria baseiam-se na absorção de um fóton pelo grupo fluoróforo para promover uma molécula a um estado excitado, diferenciando-se entre si apenas quanto à natureza das transições eletrônicas, onde no caso da fluorescência, estas transições ocorrem sem envolver a alteração de spins dos elétrons. Quando o estado excitado não é obtido pela absorção de um fóton, mas no decorrer de uma reação química, gerando luminescência na desativação deste estado, então este processo caracteriza-se como um processo de quimiluminescência. Para um entendimento completo dos fundamentos de fluorescência, é necessário compreender as transições eletrônicas que podem ocorrer numa molécula, como será visto abaixo.

1.2. Transições eletrônicas¹

De acordo com princípio de exclusão de Pauli, dois elétrons em um mesmo átomo não podem possuir todos números quânticos idênticos. Este princípio determina que apenas dois elétrons sejam alocados em um mesmo orbital eletrônico, devendo obrigatoriamente possuir um número quântico diferente, ou seja, spins contrários. Sob estas circunstâncias, é dito que os spins estão emparelhados.

Um estado eletrônico molecular em que todos os elétrons estão emparelhados é chamado estado singlete, caracterizando um estado diamagnético, pois apresenta ausência de momento magnético. Quando um número ímpar de elétrons está presente em uma espécie molecular, esta é chamada paramagnética, respondendo aos 'estímulos' de um campo magnético. O estado fundamental desta molécula caracteriza um estado duplete, pois o elétron desemparelhado pode assumir duas orientações na presença de um campo magnético, enquanto que no estado triplete, os dois elétrons permanecem paralelos entre si, embora em estados quânticos diferentes (excitado e fundamental).

Quando um elétron do par de elétrons no estado singlete fundamental de uma molécula é excitado a níveis maiores de energia, os estados singlete excitado são permitidos. No estado singlete excitado, o elétron promovido ainda se mantém emparelhado com o seu par, enquanto que no estado triplete os dois elétrons se tornam desemparelhados e conseqüentemente, paralelos, conforme Figura 1.

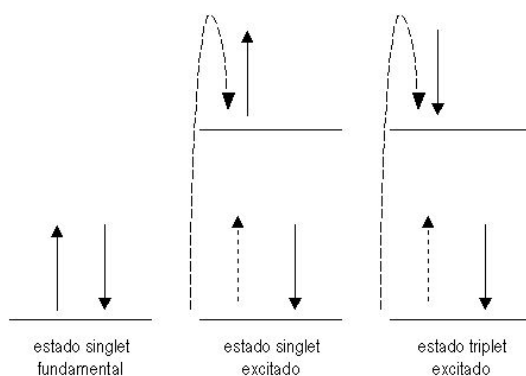


Figura 1. Representação dos estados eletrônicos singlete e triplete e suas transições.

As propriedades de uma molécula excitada no estado triplete diferem significativamente de uma no estado singlete excitado como, por exemplo, sendo paramagnética no primeiro caso e diamagnética no segundo. Os estados triplete apresentam menor energia em relação aos singletes excitados, de modo que esta certa estabilidade eletrônica eleva o tempo médio de decaimento ao estado fundamental situando-se em intervalos de tempo maiores que 10^{-5} segundo, podendo chegar até vários segundos. Estas transições caracterizam os fenômenos de fosforescência.

Em contrapartida, estados singlete excitados são bastante energéticos e instáveis, de forma que transições do tipo singlete excitado/singlete fundamental são mais rápidas e com tempos inferiores a 10^{-6} segundos. Estes dois processos geram efeitos macroscópicos diferentes, pois processos fosforescentes continuam a ocorrer mesmo com a fonte de radiação encerrada, o que não é observado em processos fluorescentes.

Uma molécula excitada pode retornar a seu estado fundamental por diversos caminhos e por processos que envolvem ou não a emissão de luz, de forma que na maioria das moléculas excitadas são encontrados processos de relaxação não radiativos, gerando uma pequena parcela de moléculas fluorescentes. Geralmente, rotas de desativação não radiativas envolvem processos de conversão interna, relaxação vibracional e interconversão. Fatores como a presença de duplas ligações conjugadas, rigidez molecular, temperatura, pH, solvente e presença de átomos pesados são importantes aspectos que influenciam na frequência com uma determinada molécula excitada percorra uma ou outra rota de desativação. Quanto maior a tendência de uma molécula percorrer caminhos radiativos, maior será o seu valor de seu rendimento quântico, parâmetro definido pela razão entre o número de moléculas excitadas que emitem luz e o número total de moléculas excitadas.

1.3. Intensidade de Fluorescência e Concentração²

A intensidade de fluorescência I_F é diretamente proporcional à intensidade do feixe de excitação (I_0), a absorvância (ϵbc , onde ϵ é a absorvidade molar, b é o comprimento percorrido pelo feixe na amostra e c , a concentração da espécie fluorescente) e o rendimento quântico (Φ_F) da espécie, definidos pela equação 1:

$$I_F = K_F I_0 \Phi_F \epsilon bc \quad (1)$$

onde a constante de proporcionalidade K_F é uma função da resposta instrumental e outros parâmetros instrumentais.

Como I_F é proporcional a I_0 , conseqüentemente, sensibilidade e limites de detecção podem ser incrementados com o aumento da intensidade da fonte (limitado pela intensidade máxima em que ocorre a fotodecomposição da amostra). Este é um importante parâmetro que difere das técnicas de espectroscopia de absorção molecular, onde o aumento da intensidade da fonte não causa variação na absorbância. Outro fator divergente é gerado pela relação direta entre a concentração do fluoróforo e a transmitância, ao contrário das técnicas de absorção molecular, em que a transmitância é um produto do logaritmo da concentração. A combinação destes parâmetros resulta em limites de detecção e faixa de linearidade muito maiores para métodos luminescentes que para métodos baseados em absorção molecular.

Para medidas consecutivas, onde a intensidade do feixe de excitação e outros parâmetros instrumentais são mantidos constantes, a equação 1 pode ser reduzida à Equação 2:

$$I_F = \Phi_F \epsilon c \quad (2)$$

onde o rendimento quântico Φ_F é um termo independente do comprimento de onda de excitação, estando apenas diretamente relacionado com o comprimento de onda de emissão.

Tomando-se o fato de que o rendimento quântico varia apenas em função do comprimento de onda de emissão, este pode ser substituído pelo termo “coeficiente de emissão relativo δ_j ”, que assume diferentes valores a cada comprimento de onda de emissão j ; desta forma, a intensidade de fluorescência I_{ij} pode ser definida através da Equação 3:

$$I_{ij} = \sum_{f=1}^F a_f \epsilon_{fi} \delta_{fj} \quad (3)$$

onde:

- I_{ij} é a intensidade total de emissão dos F fluoróforos nos comprimentos de onda de excitação i e de emissão j ;

- a_f é a concentração do f -ésimo fluoróforo;
- ε_{fi} é o coeficiente de absorção molar do f -ésimo fluoróforo no comprimento de onda de excitação i ;
- δ_{fj} é o coeficiente de emissão relativa do f -ésimo fluoróforo no comprimento de onda de emissão j ;

Dependendo dos modos como os parâmetros de excitação i e emissão j forem empregados, a Equação 3 pode assumir três diferentes formatos. No mais simples dos métodos, os parâmetros de excitação e emissão são mantidos constantes, de modo que a resposta I é um valor escalar. Este tipo de resposta é chamado de dado de ordem zero, pois se constitui em de um único escalar podendo, em uma determinação quantitativa, dar origem a uma regressão univariada. Se somente os comprimentos de onda de excitação ou de emissão variarem, I assume um perfil vetorial, sendo chamado de dado de primeira ordem e possibilita o uso de análise multivariada de primeira ordem, como a Análise de Componentes Principais (PCA) ou Métodos dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Finalmente, se ambos os parâmetros de excitação e emissão variarem conjuntamente, temos I assumindo o perfil de matriz, caracterizando dados de segunda ordem. Neste caso específico, podemos empregar o uso de métodos quimiométricos de ordem superior, pois um conjunto de várias amostras compõe um tensor tridimensional, onde cada fatia deste tensor é definida por uma matriz amostral, chamada de matriz de excitação-emissão.

1.4. Matrizes de Fluorescência de Excitação-Emissão

Matrizes de fluorescência de excitação-emissão ou do inglês *Excitation-Emission Matrix* (EEM), são geradas pela obtenção de espectros de excitação e de espectros de emissão de uma amostra. Os espectros de excitação são produzidos pela medida da intensidade de luminescência mantendo-se constante o comprimento de onda de emissão e varrendo-se o de excitação. Espectros de emissão são obtidos de forma contrária, mas através do mesmo princípio, mantendo-se a excitação constante e varrendo-se o modo de emissão.

Desta maneira, matrizes de excitação-emissão são geradas por duas dimensões independentes de comprimentos de onda, onde uma destas dimensões caracteriza-se pelos perfis de excitação e outra, possuindo informação referente ao espectro de emissão. A projeção destes espectros gera uma superfície tridimensional de fluorescência total, com a presença de todas as bandas de excitação e emissão dos fluoróforos presentes.

Quanto maior a complexidade da matriz, como o caso de amostras biológicas, maior a dificuldade de interpretação direta destas superfícies, pois ocorrem grandes superposições espectrais, embora a fluorimetria seja uma técnica bastante seletiva. Amostras de urina, sangue e leite apresentam uma grande variedade de compostos fluorescentes, produzindo diversas bandas de fluorescência, tanto na região do ultravioleta (200 a 400nm) como na região visível (400 a 700nm). A identificação dos constituintes presentes pode se dar pela comparação dos máximos de intensidade destas bandas com os dados relacionados na literatura.

A Figura 2 apresenta as superfícies de contorno geradas a partir dos espectros de fluorescência total obtidos de amostras de urina e plasma sanguíneo humanos e leite bovino. Os espectros de urina e plasma foram obtidos na região do visível, embora apresente uma maior quantidade de bandas de fluorescência na região do ultravioleta. Muitas das substâncias que contribuem para a fluorescência do plasma e urina estão presentes em outras amostras biológicas, como no leite bovino, por exemplo. O mesmo é válido para os componentes que fluorescem na região do ultravioleta, pois ocorrem basicamente devido à presença dos aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina, que estão presentes nas proteínas encontradas nos três tipos de amostras mencionadas anteriormente.

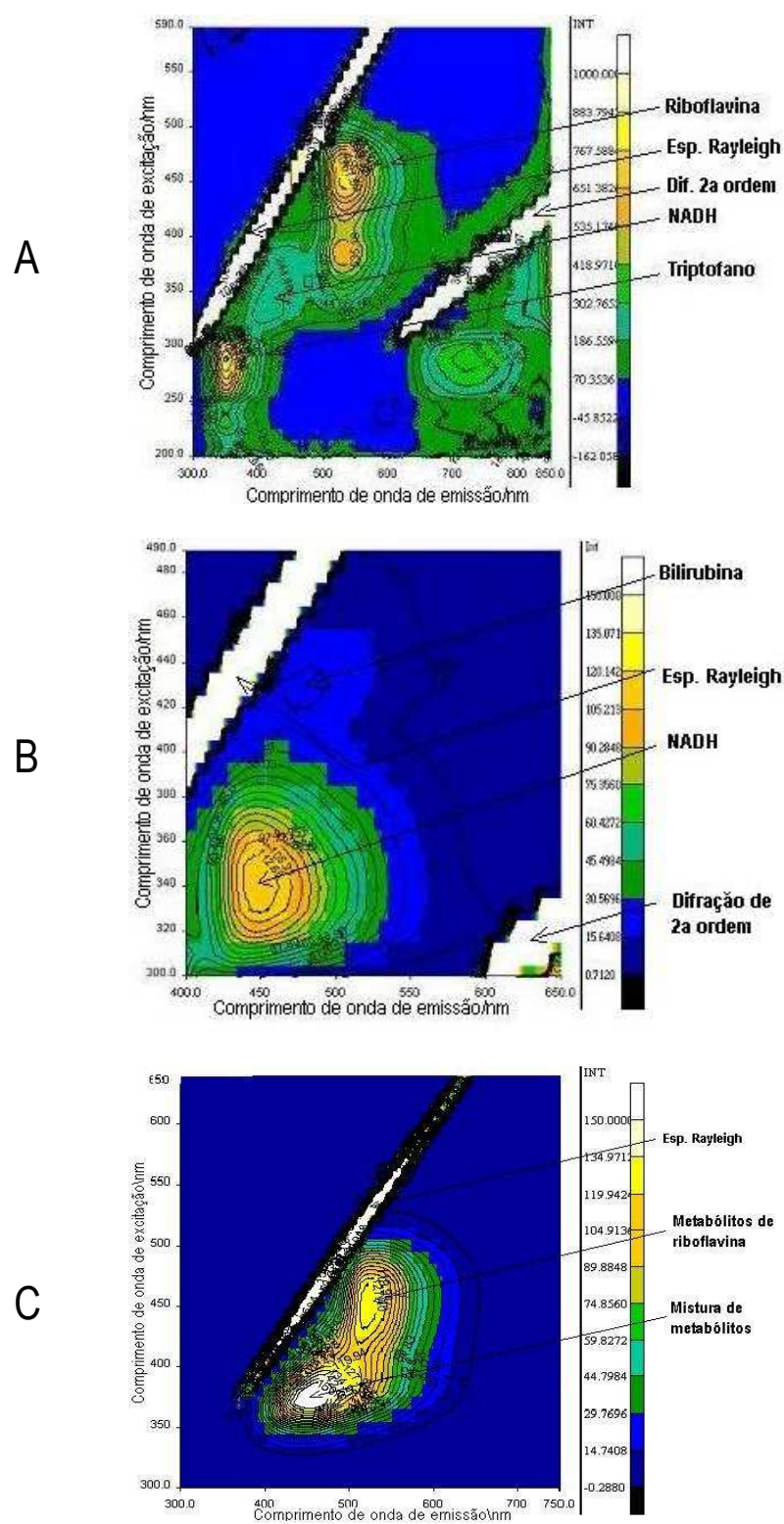


Figura 2. Espectros de fluorescência total de amostras de leite (A), plasma (B) e urina (C).

1.5. Espalhamentos Rayleigh e Difração de Segunda Ordem

Além das bandas de fluorescência decorrentes dos fluoróforos presentes nas amostras da Figura 2, é possível verificar a presença de espalhamento Rayleigh e bandas de difração de segunda ordem geradas pela grade de difração. Na análise e interpretação dos espectros de fluorescência total, a presença destas bandas não fluorescentes é encarada como interferências espectrais e devem ser evitadas ou retiradas.

Além da sobreposição gerada pelos espalhamentos, a principal desvantagem da sua presença ocorre quando as EEM são utilizadas na decomposição por métodos quimiométricos de ordem superior, como será visto no Capítulo 2 deste trabalho. Basicamente, como pode ser visto na Equação 3, a intensidade de fluorescência de uma amostra é um produto direto de três fatores independentes, constituindo um modelo trilinear, conseqüentemente, métodos quimiométricos multidimensionais trilineares mostram-se eficientes na análise destes tipos de dados. No entanto, é observado que os padrões matemáticos dos espalhamentos não obedecem nenhum modelo trilinear, causando instabilidade e falta de reprodutibilidade dos resultados, quando métodos quimiométricos de ordem superior são utilizados.

Diversas ferramentas podem ser empregadas para a redução ou eliminação destes espalhamentos, seja através de processos instrumentais, como o uso de filtros ou polarizadores do feixe de excitação, ou métodos numérico-computacionais, de modo que as regiões de espalhamento são substituídas numericamente, utilizando rotinas desenvolvidas em alguns softwares.

Neste trabalho, as regiões dos espectros de origem não fluorescentes foram substituídas pela forma numérica, em vista que o instrumento utilizado não apresenta possibilidade de atuar com filtros ou polarizadores. Desta forma, os dados gerados pela obtenção dos espectros foram carregados em um microcomputador, seguindo-se com a substituição das regiões com espalhamento por valores ausentes em ambiente Matlab® Mathworks Inc.

1.6. Supressão de Fluorescência

Outro importante fator de interferência que pode estar presente não apenas em espectros de fluorescência total, mas em qualquer medida empregando-se fluorescência molecular, é a supressão de fluorescência ou do inglês, *quenching*. A supressão refere-se a qualquer processo que causa redução do rendimento quântico de um sistema luminescente e ocorrendo devido à interação do fluoróforo com determinadas substâncias denominadas supressores ou devido a altos níveis de concentração das espécies fluorescentes.

Altas concentrações dos fluoróforos podem gerar dois “tipos” de supressão: auto-supressão (*self-quenching*) e auto-absorção (*self-absorption*), onde no primeiro caso as moléculas excitadas transferem energia às moléculas do solvente, diminuindo a intensidade das bandas de fluorescência. A auto-absorção ocorre quando existe sobreposição das bandas de excitação e emissão de fluorescência, de modo que a radiação emitida é absorvida para excitação de outras moléculas, chegando apenas parte da radiação emitida ao detector.

Matrizes biológicas apresentam grandes concentrações de proteínas, sendo que muitas destas proteínas causam supressão de fluorescência, principalmente devido à presença de aminoácidos fluorescentes como triptofano e tirosina. A supressão nestes sistemas dá-se de diversas formas, mas o principal efeito ocorre devido à auto-absorção do sistema tirosina-triptofano, bem como pelas interações peptídicas entre os fluoróforos³.

Existem alguns procedimentos utilizados para se eliminar o efeito de supressão ou reduzi-lo, minimizando a sua interferência nas análises. Em meios com elevada concentração de proteínas, a separação destas proteínas é um dos procedimentos mais empregados⁴, embora possam ocorrer consideráveis perdas na recuperação. Outra possibilidade é a diluição das amostras, o que a princípio parece ser mais interessante, pois não envolve etapas mais requintadas de preparação da amostra. No entanto, a diluição pode aumentar os limites de detecção e quantificação do método para uma margem não

desejada. Uma terceira possibilidade é se construir o modelo de calibração na presença das proteínas e, conseqüentemente, na presença do processo de supressão, baseando-se no fato que todas as amostras terão o mesmo grau de supressão. Este procedimento só é viável se a concentração das proteínas no meio não apresentar grandes variações, de forma que o sistema em estudo tenha um comportamento regular.

Neste trabalho, uma aplicação (Capítulo 3) envolve este terceiro procedimento, aplicado ao plasma sanguíneo, onde ocorre pouca variação entre as concentrações e os tipos de proteínas. Na segunda aplicação (Capítulo 4), optou-se por efetuar a separação das proteínas presentes no leite.

CAPÍTULO II

MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

DE ORDEM SUPERIOR

2. Métodos Quimiométricos de Ordem Superior

2.1. Introdução

Dentre os métodos instrumentais de análise, raros são os absolutos, de forma que a grande maioria é realizada de forma indireta, ou seja, etapas de calibração são essenciais para a interpretação dos resultados. Nestas etapas, visa-se encontrar a melhor relação possível entre respostas instrumentais, obtidas através de um determinado método, como a absorbância, e os valores de uma grandeza conhecida, como concentração, para um grupo de objetos ou amostras.

Atualmente, a maioria das calibrações envolve um modelo univariado do sistema em estudo, onde uma relação é estabelecida entre valores escalares. Embora procedimentos univariados sejam bastante freqüentes, não apresentam uma boa performance na presença de interferente, de modo que na presença destes interferentes, longas etapas de extração, pré-concentração e/ou separação são propostas na tentativa de eliminar estas espécies indesejáveis. Uma outra alternativa, talvez até mais eficaz, é a procura por procedimentos mais ‘modernos’ e instrumentos mais apropriados para a realização da análise.

Seguindo o raciocínio proposto por Kowalski¹, um fundamento importante na teoria de química analítica é a classificação de cada instrumento ou método, seja analítico ou quimiométrico, de acordo com o tipo de dado por ele gerado ou utilizado. Esse pressuposto mostra-se bastante atraente e propicia uma série de vantagens, como o melhor entendimento das possibilidades de um sistema, a partir do tipo de resposta obtida pelo uso de um ou outro instrumento ou metodologia analítica. Outra vantagem é prover um guia geral para emprego ou para otimização dos métodos existentes, conduzindo a pesquisa científica ao desenvolvimento de ferramentas mais poderosas.

2.2. Classificação dos Dados Experimentais

Utilizando uma terminologia já existente na matemática, métodos instrumentais que geram um único dado escalar por amostra, são considerados métodos de ordem zero, pois um único valor escalar pode ser considerado como um tensor de ordem zero. Instrumentos como fotômetros de filtro, pHmetros e condutivímetros são exemplos de instrumentos de ordem zero, pois a medida de uma amostra gera apenas uma resposta escalar. A estatística aplicada a estes tipos de dados já está totalmente definida, de modo que calibrações univariadas (ou de ordem zero) são os procedimentos utilizados para a calibração destas respostas. Procedimentos univariados exigem total seletividade para o analito de interesse, pois a presença de interferentes não pode ser detectada, produzindo resultados sem significância analítica.

Vetores de dados, como cromatogramas e espectros caracterizam conjuntos de primeira ordem; conseqüentemente, possibilitam o emprego de calibrações multivariadas de primeira ordem. Embora sendo mais complexa quando comparada com o caso anterior, a estatística aplicada a estes conjuntos já se encontra definida, possibilitando a identificação de interferentes e amostras anômalas (*outliers*). Estes métodos instrumentais de primeira ordem já caracterizam um grande avanço, pois apresentam a possibilidade de efetuar modelos de calibração na presença de interferentes químicos; o que outrora era inviável, eliminando desta maneira, longas etapas de separação e/ou extração, embora ainda seja necessário que os interferentes estejam presentes no modelo de calibração.

Os principais métodos quimiométricos utilizados no tratamento destes conjuntos de dados são Análise de Componentes Principais (PCA), Regressão por Componentes Principais (PCR), Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e Regressão Linear Múltipla (MLR)². Embora bastante robustos na análise simultânea de sistemas/misturas com várias espécies, estes métodos necessitam grandes conjuntos de amostras para a calibração, assim como exigem um conhecimento *à priori* da composição do sistema.

Dados de segunda ordem são gerados, de maneira geral, pelo emprego de técnicas hífenadas, como espectrômetro de massas seqüencial (MS-MS) e cromatografia líquida com detector espectrofotométrico de arranjo de diodos (HPLC-DAD), entre outras, como obtenção de imagens e dados de primeira ordem monitorados no tempo, exemplificadas na Figura 3. O significado das abreviaturas pode ser encontrado na lista de abreviaturas.

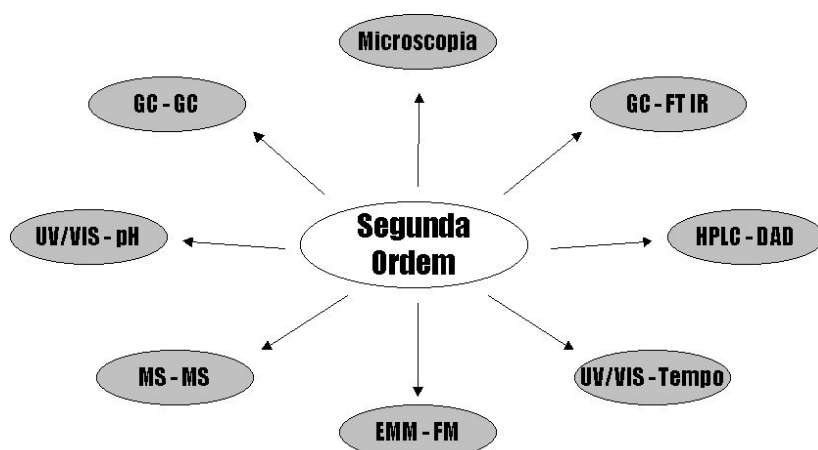


Figura 3. Exemplos de técnicas hífenadas que geram dados de segunda ordem ou multidimensionais.

Embora apresentem uma complexidade notável em relação aos outros conjuntos de dados citados anteriormente, os dados de ordens superiores apresentam um grande número de informação sobre o sistema em estudo, servindo de base para muitas vantagens, que métodos desenvolvidos especificamente para estes dados irão apresentar.

Uma destas grandes vantagens é definida como “vantagem da segunda ordem”, onde a presença de interferentes no conjunto de calibração não é necessária, além de possibilitar a recuperação dos espectros das espécies não calibradas. Esta vantagem só pode ser explorada com o emprego de métodos quimiométricos restritos, devido a inexistência de rotação entre os modos. Outra importante característica é o reduzido número de amostras para os conjuntos de calibração e validação, mesmo no caso de sistemas complexos, como matrizes biológicas, onde a presença e concentração de certas espécies atingem a variabilidade máxima.

Não existe limite aparente para o máximo de dimensões em que um dado pode ser gerado, mas é convencional denominarmos ‘dados de ordens superiores’ para todos aqueles conjuntos com ordens iguais ou maiores a dois. Um claro exemplo disto, é a obtenção de dados de terceira ordem através de técnicas instrumentais como fluorimetria de excitação-emissão com decaimento no tempo, onde neste caso as dimensões dos dados são três: comp. de onda de excitação – comp. de onda de emissão – tempo, e são denominados métodos multi-modos ou *N-way*³.

2.3. Modelos Tridimensionais de Tucker⁴

Assim como existe uma diversidade de métodos quimiométricos aplicados a conjuntos de dados de primeira ordem, para dados multi-modos ou *multi-way* ocorre o mesmo, embora em menor número. Métodos empregados para análise exploratória existem em maior número que métodos de regressão, no entanto a possibilidade de inserir restrições nestes modelos é muito grande, possibilitando criar modelos bastante específicos e com grande performance analítica. O mais importante e abrangente destes métodos são os modelos tridimensionais criados nos anos sessenta pelo psicometrista Layard R. Tucker, que possibilitam a decomposição de um tensor de dados em matrizes de *loadings*, facilitando a interpretação dos resultados⁵.

Atualmente, estes modelos são conhecidos como Tucker1, Tucker2 e Tucker3. Os modelos também podem ser coletivamente chamados de *multi-way* PCA ou como foi originalmente sugerido, de Análise de Fatores Tridimensional. O mais importante modelo é o Tucker3, sendo o Tucker2 caracterizado como um caso específico do modelo de Tucker3. O modelo Tucker1 corresponde ao simples desdobramento do tensor em uma matriz bidimensional, seguindo-se com a PCA.

A grande importância dada ao modelo de Tucker3 ocorre devido à possibilidade de inserir certas restrições ao modelo, de forma que a maioria dos métodos quimiométricos de ordem superior podem ser descritos como um modelo restrito de Tucker3. O modelo de Análise de Fatores Paralelos ou PARAFAC

do termo em inglês *Parallel Factor Analysis*, não foge a regra e também pode ser descrito como um modelo restrito de Tucker3. Desta forma, para podermos entender a lógica dos modelos multidimensionais é necessário compreender a estrutura do modelo de Tucker3.

Como foi visto anteriormente, utilizando-se a técnica de fluorescência de excitação-emissão, a medida de uma única amostra gera uma superfície ou uma matriz de intensidades de fluorescência. Extrapolando-se para um conjunto de amostras, temos a formação de um tensor tridimensional, definido por três dimensões (amostras – comprimento de onda de excitação – comprimento de onda de emissão), com a formação de um sólido tridimensional ou cubo.

Desta forma, inicialmente um tensor $\underline{\mathbf{X}}$ de dimensões $I \times J \times K$ é criado, através da medida de intensidade de fluorescência de várias amostras. Posteriormente, um modelo de Tucker3 de posto (ou *rank*) D no primeiro modo, E no segundo modo e F no terceiro modo é aplicado a este tensor. Como este conjunto de dados tem caráter trilinear, os postos D , E e F serão iguais em todas as dimensões, embora existam casos em que o posto é diferentes em cada dimensão, como os problemas de sobreposição de posto. Algebricamente, a estrutura do modelo de Tucker3 pode ser definida como:

$$\mathbf{X} = \mathbf{A}\mathbf{G}(\mathbf{C} \otimes \mathbf{B})^T + \mathbf{E} \quad (4)$$

Onde:

- $\mathbf{X}$ é matriz desdobrada de dimensões $I \times JK$ do tensor de dados ($I \times J \times K$);
- $\mathbf{G}$ é uma matriz $D \times EF$ de um tensor núcleo de dimensões ($D \times E \times F$);
- $\mathbf{A}$, $\mathbf{B}$ e $\mathbf{C}$ são as matrizes de *loadings* geradas pelo modelo;
- $\mathbf{E}$ é a matriz de erros do modelo;
- $\otimes$ é o operador de Kronecker, descrito no Apêndice A1.

Nesta estrutura, os elementos do tensor núcleo $\mathbf{G}$ definem como os vetores individuais de *loadings* irão interagir entre os modos $I \times J \times K$. Na equação 4, $\mathbf{A}$ tem dimensões $I \times D$, $\mathbf{B}$ apresenta as dimensões

$J \times E$ e $\mathbf{C}$ tem $K \times F$, sendo que estas matrizes possuem os *loadings* no primeiro, segundo e terceiro modo, respectivamente. A Equação 4 é válida somente quando $\mathbf{A}$, $\mathbf{B}$ e $\mathbf{C}$ são ortogonais, o que não é necessariamente obrigatório em um modelo de Tucker3. Graficamente, o mesmo modelo de Tucker3 pode ser descrito através da Figura 4:

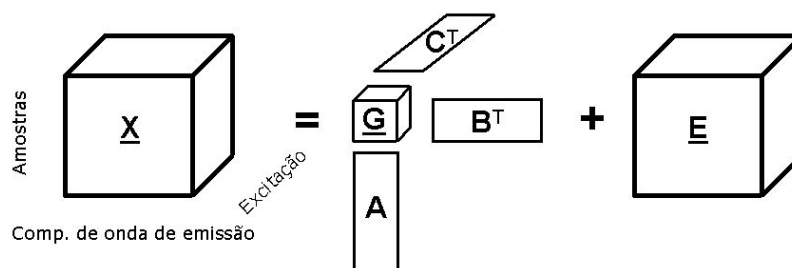


Figura 4. Representação da decomposição efetuada pelo método de Tucker.

Modelos de Tucker3 restritos são desenvolvidos utilizando-se ou regras para a decomposição, como unimodalidade e ortogonalidade, ou ainda, inserindo diferentes valores de postos no tensor $\mathbf{G}$ para a decomposição das matrizes de *loadings*. O modelo PARAFAC pode ser considerado como apenas mais um destes casos particulares de restrição.

2.4. Modelo de PARAFAC

Embora mais simples, o método de análise de fatores paralelos - PARAFAC é a mais estável e robusta forma de análise e decomposição espectral aplicado a dados multidimensionais trilineares, proposta inicialmente por psicometristas nos anos setenta, embora as primeiras aplicações realizadas pelos químicos⁶ ocorressem apenas a partir dos anos noventa.

PCA e PLS bilineares são obrigatoriamente seqüenciais, ou seja, cada novo fator adicionado ao modelo é projetado ortogonalmente ao anterior, de modo que a variância explicada total é somada em cada modelo. Assim como o modelo de Tucker3, PARAFAC pode ser considerado como “*not nested*” ou

seja, seus componentes não são obrigatoriamente ortogonais, de modo que a variância somada para cada componente não é igual à variância total do modelo.

PARAFAC pode ser considerado uma versão restrita do método geral Tucker3, sendo que a matriz do tensor núcleo $\underline{\mathbf{G}}$ desdobrado é uma matriz super-identidade. Isso torna o modelo menos flexível pois utiliza menos graus de liberdade, o que determina solução única do sistema. Se por um lado esta característica é a grande vantagem na modelagem de dados espectroscópicos, por outro se mostra desvantajosa, pois é necessário um conhecimento *à priori* do sistema, na escolha do número correto de fatores para efetuar a decomposição dos dados.

A estrutura do modelo PARAFAC é dada quando o tensor $\underline{\mathbf{G}}$ do modelo de Tucker3 (Equação 4) apresenta em sua superdiagonal somente valores unitários e nas outras posições zeros, de modo que o posto é o mesmo nos três modos A, B e C. Deste modo o tensor núcleo $\underline{\mathbf{G}}$ pode ser facilmente eliminado da estrutura matemática do modelo, pois o modelo é um produto direto das matrizes de *loadings*, descrito por:

$$\mathbf{X} = \mathbf{A}(\mathbf{C} \otimes \mathbf{B})^T + \mathbf{E} \quad (5)$$

Neste caso, as matrizes de *loadings* são mantidas constantes em relação à Equação 4, trocando-se apenas o operador de Kronecker pelo operador de Katri-Rao, descrito no Apêndice A2. Este modelo também pode ser representado graficamente através da Figura 5, onde o número de colunas das matrizes de *loadings* é igual entre si.

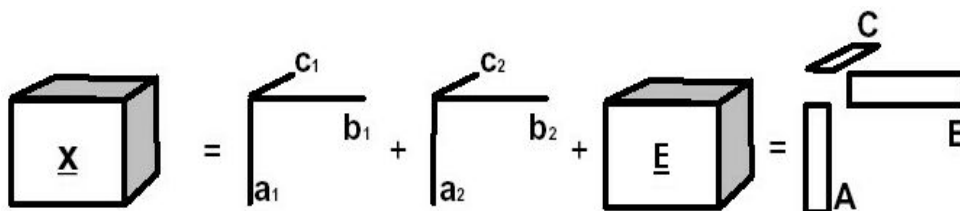


Figura 5. Dados tridimensionais $\underline{\mathbf{X}}$ sendo decompostos por um modelo PARAFAC com dois fatores mais um tensor residual $\underline{\mathbf{E}}$.

A estrutura matemática do modelo é constituída por uma matriz de *scores* ou *loadings* **A**, e duas matrizes de *loadings* **B** e **C**, descritas pelos elementos a_{if} , b_{jf} e c_{kf} (Equação 6), respectivamente. A otimização do modelo é obtida pela minimização das somas dos erros quadráticos do modelo, e_{ijk} , no modelo:

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (6)$$

Onde x_{ijk} é um elemento do tensor de dados definido pelas dimensões $I \times J \times K$.

O algoritmo usado para esta otimização do modelo PARAFAC é o *Alternating Least Squares* (ALS), que inicializa assumindo os *loadings* em dois modos e usa-os para estimar os *loadings* do próximo modo, até a minimização dos resíduos. Isto é feito para cada modo, até a convergência total gerados, ou seja, sem ocorrer mudanças significativas. Em algumas situações, certas restrições como não-negatividade, unimodalidade e ortogonalidade podem ser usadas para melhorar a convergência do algoritmo e/ou obter uma melhor interpretação física dos *loadings*, como semelhanças espectrais, perfis de pH ou tempo de retenção.

O PARAFAC também pode ser usado para a quantificação e, neste caso, os *loadings* do modo de concentração ou *scores* obtidos após a decomposição são relacionados com as concentrações conhecidas do grupo de calibração. Novas amostras de concentração desconhecida podem ser analisadas com a inserção destas amostras em um tensor contendo as amostras de calibração, de modo que tanto as amostras desconhecidas como as de calibração são usadas na decomposição. Reduzindo-se desta maneira a presença de erros sistemáticos.

2.4.1. Escolha do Número de Fatores

O principal problema enfrentado nas aplicações utilizando PARAFAC é a escolha do número ideal de fatores para a decomposição. Uma escolha errônea pode gerar interpretações falsas do sistema em estudo, inviabilizando totalmente a análise. Em certos sistemas, onde a composição da amostra é desconhecida, somente o conhecimento do analista ou técnicas de validação cruzada, como *split-half*⁵, ou ainda, a estimativa através do diagnóstico do tensor núcleo tem se mostrado eficiente. Embora existam outros métodos para sugestão do número de fatores, como análise de posto, análise de resíduos e validação cruzada, os resultados obtidos por estes métodos são mais tênues, não servindo como resposta única.

Em experimentos com *split-half*⁷, é escolhido um intervalo **a** de fatores para a decomposição e o grupo de dados é dividido em **b** sub-tensores, realizando-se o modelo PARAFAC para cada conjunto de dados **b**, resultando em um número total de **axb** diferentes modelos para análise. A escolha do número ótimo de fatores se dá pela comparação dos valores de *loadings*, onde o número ideal é aquele em que houver a menor mudança nos perfis dos *loadings* gerados, de acordo com o princípio da solução única ou *uniqueness*. Outro importante parâmetro na escolha dos fatores é o diagnóstico de consistência do tensor núcleo, ou termo em inglês *Core Consistency Diagnostic* - Corcondia⁵, como indicativo da trilinearidade do modelo, de modo que os elementos da superdiagonal da matriz núcleo de um modelo Tucker3 deverão ser o mais próximo possível do valor unitário e os elementos externos da superdiagonal, ser próximos a zero. O Corcondia é definido pela Equação 7 como:

$$\text{Corcondia} = 100 * \left(1 - \frac{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F (g_{def} - t_{def})^2}{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F t_{def}^2} \right) \quad (7)$$

Onde g_{def} é o elemento da matriz *core* calculado usando o modelo Tucker3 com os *loadings* obtidos pelo PARAFAC e definido pelas dimensões (*d-e-f*), t_{def} é o elemento de um tensor binário com zeros em todos

os elementos e uns na superdiagonal (o ideal) e F é o número de fatores do modelo. O modelo PARAFAC ideal é válido se g_{def} é próximo a t_{def} e neste caso, o valor do diagnóstico *core* deverá ser de 100%.

Um outro parâmetro que pode ser usado para a escolha do número de fatores a serem utilizados para a decomposição, é a porcentagem de variância explicada pelo modelo (*Fit*)⁸, ou seja, como os dados experimentais podem ser explicados pelo modelo criado pelo número de fatores escolhidos, sendo descrito pela seguinte função:

$$\text{Fit}\% = 100 * \left(1 - \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K \left(x_{ijk} - \hat{x}_{ijk} \right)^2}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K x_{ijk}^2} \right) \quad (8)$$

onde x_{ijk} é o ijk -ésimo elemento experimental e $\hat{x}_{ijk}$ é o ijk -ésimo elemento predito pelo modelo.

2.5. Multi-Linear PLS⁹

Multi-linear PLS ou *N-way PLS* (N-PLS) é um método quimiométrico supervisionado para construção de modelos de regressão para dados de ordens superiores, realizado entre grupos de pares: variáveis independentes (chamado de $\mathbf{X}$) e dependentes (chamado de $\mathbf{y}$). N-PLS é uma extensão do algoritmo bidimensional PLS para casos onde o grupo independente é um tensor de ordem maior que dois, que objetiva encontrar máxima covariância entre as variáveis dependentes. No caso da calibração com EEM, o grupo independente é um tensor de três dimensões formado pelas medidas de intensidade de fluorescência de várias amostras e o dependente é um vetor de concentrações. Neste caso, o modelo é descrito por:

$$\max_{w_a^J, w_a^K} \left[\text{cov}(\mathbf{t}_a, \mathbf{y}) \middle| \min \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K \left(x_{ijk} - t_{a,i} w_{a,j}^J w_{a,k}^K \right)^2 \right) \right] \quad (9)$$

onde $\mathbf{y}$ ($I \times 1$) é o vetor de concentração, $\mathbf{t}_a$ ($I \times 1$) são os scores do modelo PLS, $\mathbf{w}_a^J$ ($J \times 1$) e $\mathbf{w}_a^K$ ($K \times 1$) são os vetores de pesos do PLS para o a -ésimo fator do modelo nas dimensões J e K , respectivamente. O termo fator também pode ser denominado de variável latente (LV) no PLS bidimensional ou no N-PLS.

Diferente do PARAFAC, a escolha para o número de fatores não é diretamente proporcional ao número de espécies fluorescentes, podendo ser escolhido um número menor ou maior de fatores. Um número superior de fatores pode ser necessário para explicar certas não linearidades como supressão de fluorescência, espalhamentos Rayleigh e/ou Raman e um menor número pode ocorrer devido à presença de espectros altamente correlacionados no sistema em estudo, como é o caso deste trabalho. A escolha adequada do número de fatores deve proporcionar uma modelagem conveniente sem sobre-ajustar (*overfitting*) o modelo, encontrando um subespaço em $\mathbf{X}$ que possa ser usado para a regressão.

O método mais empregado para encontrar o número adequado de fatores é a validação cruzada com o procedimento *leave-one-out*² onde a partir das amostras de calibração, uma amostra é retirada e o modelo é desenvolvido com diferentes números de fatores. A concentração da amostra que foi retirada é prevista e por comparação com o valor esperado, a raiz quadrada da média dos erros quadráticos gerada por validação cruzada (RMSECV) é estimada para cada fator estudado. Este procedimento é repetido para todas as amostras e um erro médio é calculado, dando-se a escolha ao número de fatores que apresentar o menor RMSECV.

2.6. Figuras de Mérito para Métodos Multidimensionais

Metodologias alternativas necessitam ser validadas para comparação com metodologias estabelecidas, sendo que o mais usual processo para comparação entre métodos analíticos é a determinação das figuras analíticas de mérito (*Figures of Merit* - FOM), como sensibilidade, seletividade e limite de detecção (L_D). Em calibração multivariada, o cálculo do *Net Analyte Signal* (NAS)¹⁰ é estritamente necessário para a obtenção das FOM. A obtenção do NAS para dados multidimensionais é

análoga às obtidas para procedimentos de primeira ordem¹, que é definida como a parte do sinal analítico que é unicamente relativo ao analito de interesse. As equações 10 e 11 mostram o procedimento para o cálculo do **NAS** para os métodos PARAFAC e N-PLS.

Para dados multi-modos bilineares, o NAS é o produto de Kronecker dos *loadings* obtidos para o analito de interesse gerado pelo PARAFAC. A sensibilidade (SEN) é estimada como o valor de NAS na concentração unitária, como mostrado na Equação 12, e a seletividade (SEL) é a razão entre a sensibilidade e o sinal total, exemplificada na Equação 13.

$$\mathbf{NAS}_{\text{PARAFAC}}^i = \mathbf{a}_i (\mathbf{B}_j \otimes \mathbf{C}_k) \quad (10) \quad \|\mathbf{NAS}_{\text{N-PLS}}^i\|_F = \frac{\mathbf{a}_i}{\|\mathbf{B}\|_F} \quad (11)$$

$$\text{SEN} = \|\mathbf{NAS}\|_F \quad (12) \quad \text{SEL} = \frac{\|\mathbf{NAS}\|_F}{\|\mathbf{N}\|_F} \quad (13)$$

onde **NAS** é a matriz referente ao analito de interesse; **N** é a matriz do sinal total em uma determinada amostra; e $\|\cdot\|_F$ é a norma de Frobenius, definida no Apêndice A3.

Para o N-PLS, a sensibilidade é calculada da mesma forma que para primeira ordem, por exemplo, o inverso da norma do vetor dos coeficientes de regressão. Neste caso, a matriz dos coeficientes de regressão gerada pelo N-PLS é transformada em um vetor. Multiplicando este parâmetro com a concentração do analito, se obtém o NAS. A partir do NAS, é possível se calcular a seletividade, dada pela Equação 11.

O limite de detecção¹¹ (L_D) pode ser calculado como:

$$L_D = 3,3s_{(0)} \quad (14)$$

onde $s_{(0)}$ é o desvio padrão da concentração estimada para três amostras de branco, através dos modelos de PARAFAC e N-PLS.

CAPÍTULO III

DETERMINAÇÃO DE

DOXORRUBICINA

3. Determinação de Doxorrubicina

3.1. Introdução

Doxorrubicina (DXR) ou adriamicina é um antibiótico citotóxico antracíclico largamente empregado na prática clínica, apresentando atividade em uma larga faixa de neoplasmas humanos, incluindo uma grande variedade de tumores sólidos. Doxorrubicina foi primeiramente isolada nos anos sessenta¹, constituindo-se de uma molécula anfótera, com um núcleo naftacenodiona, ligado através do carbono C7 a uma cadeia hidrofílica aminoglicosídica, e cujo nome químico é (8S, 10S)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi- α -L-lixo-hexopiranosil) oxi]-8-glicosil-7, 8, 9, 10-tetrahidro-6, 8, 11-trihidroxi-1-metoxi-5, 12-naftacenodiona², como mostrado na Figura 6.

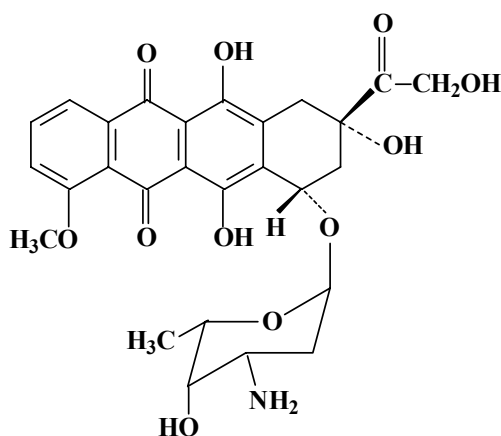


Figura 6. Fórmula estrutural de uma molécula de doxorrubicina.

O objetivo da determinação e monitoramento das antraciclina ocorre devido a seus efeitos tóxicos comumente observados depois de prolongado tratamento, como toxicidade no miocárdio, distúrbios no crescimento dos cabelos e supressão espermatogênica³. A eficácia clínica de doxorrubicina é relativa à sua concentração no tecido tumoral, no entanto, o metabolismo do fármaco e, conseqüentemente, sua concentração, variam de paciente para paciente, tendo de ser estudada

isoladamente⁴. Desta forma, várias metodologias têm sido desenvolvidas para a determinação de DXR em fluidos biológicos, na forma pura e em formulações farmacêuticas, usando cromatografia líquida de alta eficiência^{5,6,7,8}, eletroforese capilar,^{9,10,11} UV/VIS¹² e Raman¹³. Em uma recente revisão, Zagotto⁴ e coaut. reportaram os últimos desenvolvimentos na determinação de antraciclinas, usando figuras de mérito para a validação e comparação entre os vários métodos analisados. Atualmente, figuras de mérito aplicadas na análise quimiométrica em multi-modos são bastante escassas, embora seja um processo importante para a validação e comparação entre diferentes metodologias.

A determinação de DXR em fluidos biológicos tem sido somente reportada utilizando métodos de separação física, de forma que o desenvolvimento de um método não invasivo, de baixo custo e rápido, para a determinação de DXR em fluidos biológicos poderá ser vantajoso, pois passos de separação cromatográfica ou extração são relativamente demorados e complexos. A espectroscopia de fluorescência é um método instrumental de alta sensibilidade e seletividade, rápida e de baixo custo, que se mostra uma opção interessante, em vista que DXR é fluorescente.

Entretanto, um método baseado na medida direta da intensidade de fluorescência para a determinação de DXR em plasma sangüíneo, como é o caso das amostras reais, usando-se calibração univariada em um único comprimento de onda de emissão pode apresentar desvios sistemáticos (ou *bias*), devido à interferência gerada pela fluorescência natural do plasma, de forma que podem ser obtidos resultados insatisfatórios. O plasma humano é composto de uma variedade de componentes e alguns apresentam uma significativa contribuição para a fluorescência total do plasma. A fluorescência do plasma humano pode ser dividida em duas partes: uma parte compreende uma alta intensidade de fluorescência na região do ultravioleta, basicamente devido à presença de triptofano ligado as proteínas. A outra parte ocorre na região do ultravioleta próximo e parte do espectro visível, em consequência de uma série de componentes, como flavinas (FMN, FAD e vitamina B₂), NADH e bilirrubina, entre outros¹⁴. Estes componentes presentes no plasma podem mudar significativamente de indivíduo para indivíduo, e

as variações podem ocorrer devido às características intrínsecas de cada indivíduo ou pelo mau funcionamento de certos órgãos, como foi verificado por Madhuri¹⁵, que relatou as diferenças entre voluntários normais e indivíduos com doenças do fígado, através das características naturais da fluorescência do sangue.

Além disso, métodos de calibração de primeira ordem, como PLS¹⁶, também não são funcionais nestes casos, pois além de requererem que todas as espécies detectadas (analitos e interferentes) estejam presentes em ambos os conjuntos de calibração e nas amostras de composição desconhecidas, ainda é necessário o conhecimento das suas concentrações no conjunto de calibração que, neste caso é praticamente impossível. Um procedimento utilizado para evitar esta restrição é o emprego de dados de segunda ordem¹⁷, através da obtenção de matrizes de excitação-emissão (EEM), combinado com o uso de métodos quimiométricos de ordem superior. Com isto, a análise quantitativa destas espécies pode ser realizada sem o conhecimento prévio da composição das amostras, como foi visto no Capítulo 2 deste trabalho. A análise qualitativa também pode ser realizada, resultado da decomposição espectral dos dados para um melhor entendimento do sistema.

Vários métodos e algoritmos têm sido propostos para serem aplicados em grupos de dados de segunda ordem, baseados na solução algébrica direta, como TLD ou GRAM¹⁸ ou em métodos iterativos, como PARAFAC¹⁹, MCR²⁰ ou ainda N-PLS²¹. Os métodos baseados em algoritmos iterativos têm sido mais largamente empregados, pois apresentam menor propensão de sofrerem variação devido à ruído instrumental (robustez) e desvios dos dados, apresentando um grande número de aplicações práticas em HPLC-UV/VIS²², Análise em Injeção de Fluxo (FIA)²³ e Espectrometria de Massas Acoplado (MS-MS)²⁴. Também é possível encontrar várias aplicações com fluorimetria de excitação-emissão, incluindo monitoramento ambiental^{25,26,27}, análise de amostras biológicas^{28,29,30} e quantificação de fármacos³¹.

Neste trabalho, é proposto um método para a determinação de DXR em plasma humano baseado em fluorescência molecular de excitação-emissão, sendo validado através da obtenção de figuras de mérito.

O PARAFAC foi aplicado para a decomposição e quantificação de DXR, utilizando vários parâmetros para a escolha do número ideal de componentes a serem empregados na decomposição dos dados, como o método de *split-half*, o diagnóstico de consistência do tensor núcleo (Corcondia) e a análise dos resíduos. Todos os resultados obtidos pelos parâmetros utilizados convergiram para a mesma conclusão, de que dois fatores seria a melhor opção para a decomposição dos dados. Realizada a decomposição, um componente foi identificado como doxorrubicina e outro como a soma de duas espécies fluorescentes presentes no plasma. Para a quantificação, foram utilizados os *loadings* do modo das amostras (*scores*) para estabelecer uma relação univariada com as concentrações de DXR, obtendo-se um modelo com bom desempenho, em uma faixa com níveis baixos de concentração.

Também foi empregado o método de regressão multilinear N-PLS para a quantificação de DXR, sendo que o número ótimo de variáveis latentes para a regressão foi encontrado através do procedimento de validação cruzada. Utilizando dois fatores para a regressão, foram obtidos resultados um pouco melhores em relação aos obtidos pelo PARAFAC.

3.2. Experimental

3.2.1. Aparatos

Os espectros foram registrados em um espectrômetro de luminescência Perkin-Elmer LS 55, com uma cubeta de quartzo de 10 mm, a 23 ± 1 °C. O software empregado para as medidas foi o FL WinLab (Perkin-Elmer), e os espectros foram importados para o Matlab versão 6.1, utilizando uma rotina desenvolvida individualmente. O '*N-way toolbox*', desenvolvido e disponibilizado por Rasmus Bro e Claus Andersson em <http://www.models.kvl.dk/source> foi empregado para o desenvolvimento dos cálculos com

PARAFAC e N-PLS. Todos os programas foram rodados em um microcomputador IBM compatível, AMD Thunderbird 1,3 GHz com 128 Mbytes de memória RAM.

3.2.2. Reagentes e Soluções

Cloridrato de doxorrubicina foi cedido na forma de pó cristalino, pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TecPar) - Brasil. Uma solução estoque de concentração de $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi preparada pela dissolução de cloridrato de doxorrubicina em água e estocada em vidro a -20°C e protegida da luz por no máximo uma semana. Água desionizada (Millipore®) foi usada em todas as preparações experimentais. Todas as vidrarias usadas foram estocadas previamente com uma solução 10% v/v HNO_3 por pelo menos 62h e lavadas com água destilada.

3.2.3. Amostras

Dez amostras de sangue foram obtidas de voluntários saudáveis através do Hospital das Clínicas na Universidade Estadual de Campinas – Brasil. Cada amostra continha inicialmente em torno de 5 mL de sangue, de modo que no mesmo dia de coleta, foram centrifugadas por 20 minutos a 3500 rpm. Cerca de 2.5 mL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de coleta de soro e estocados a -20°C até o momento em que os ensaios foram realizados.

3.2.4. Procedimento

Doxorrubicina é usada na dosagem média de 60 a 75 mg m^{-2} de área corpórea, de modo que um adulto receberia em torno de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sangue (supondo-se que um adulto teria em torno de 4 a 5 L de sangue). Somente uma fração da concentração inicial do fármaco injetada por via parenteral estará presente no plasma, de modo que a faixa de concentração escolhida não deveria ultrapassar 50% da

dose inicial. Neste estudo, foram escolhidos 10 amostras, nas quais a concentração de doxorrubicina variou entre 0,75 e 11,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estas amostras foram obtidos pela adição apropriada de uma solução estoque de DXR em 2,00 mL de plasma, diretamente em uma cubeta de quartzo e homogeneizados por meio com uma micro barra magnética. Os espectros de EEM foram obtidos na faixa de excitação de 390,0 a 500,0 nm, em incrementos regulares de 2,0 nm e a emissão de 510,0 a 650,0 nm com incrementos regulares de 0,5 nm. As fendas de excitação e emissão permaneceram constantes a 10 nm, juntamente com a velocidade de varredura, de 900 nm min^{-1} .

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Fluorescência Natural do Plasma Humano

A Figura 7 mostra um espectro tridimensional da fluorescência de uma amostra de plasma sanguíneo humano sem diluição e sem a presença de DXR.____

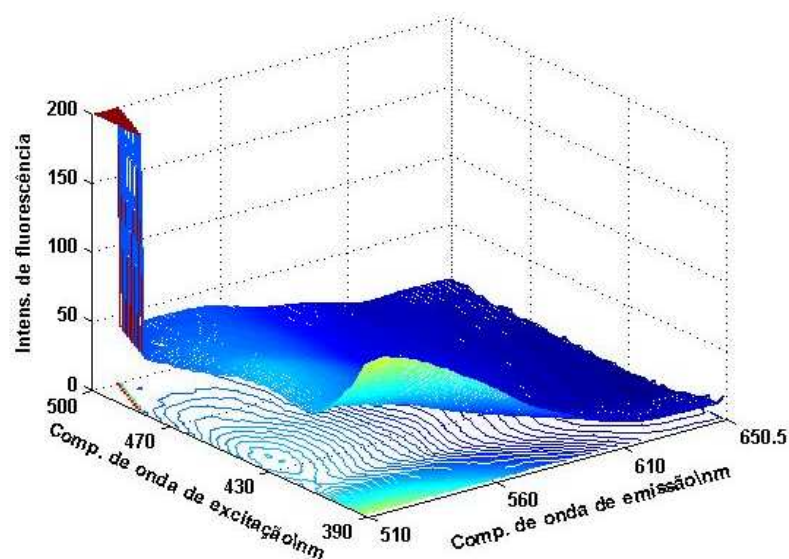


Figura 7. Espectro típico de fluorescência de excitação/emissão do plasma humano, em indivíduos saudáveis.

É possível observar que existem duas bandas, com máximos de intensidade no comprimento de onda de excitação/emissão próximo a 440/515 nm e outro próximo à 390/515 nm. Por comparação com perfis de excitação/emissão das espécies normalmente encontradas no plasma, as bandas observadas podem ser atribuídas principalmente à presença de bilirrubina (Figura 8.a) e riboflavina (Figura 8.b).

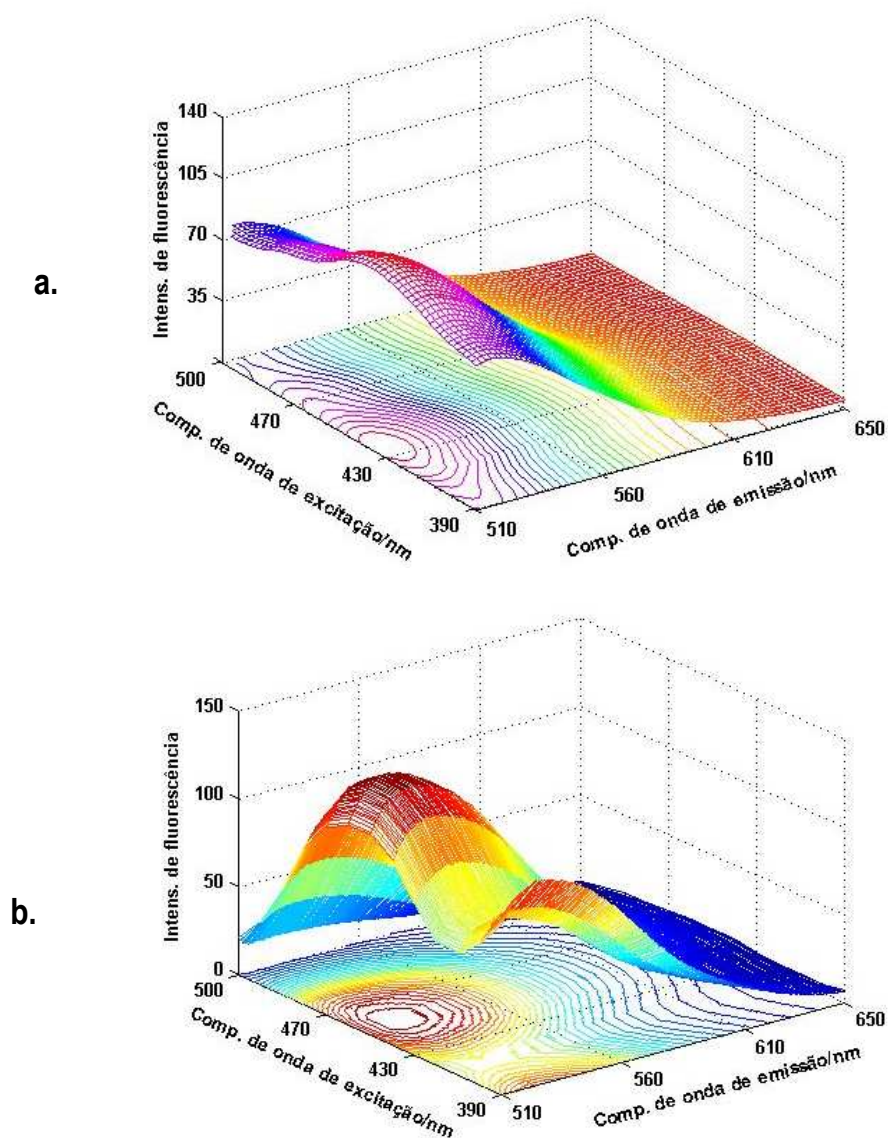


Figura 8. Espectros de fluorescência de bilirrubina (a) e riboflavina(b).

Também é possível observar a presença do espalhamento Rayleigh na faixa de 490 a 500 nm para comprimentos de excitação e 510 a 520 nm para comprimentos de emissão. O espalhamento

Rayleigh não apresenta um caráter trilinear, característico da EEM, de modo que as áreas onde este espalhamento estava presente foram trocadas por valores ausentes, em ambiente Matlab®.

Quando utilizados os algoritmos encontrados no *N-way toolbox*, os valores ausentes são inicialmente trocados por valores randômicos. Após cada interação, um novo modelo é desenvolvido e os valores ausentes são trocados com as estimativas do modelo, até a convergência. É importante salientar que os elementos desta parte triangular da figura 7 não podem ser substituídos por zeros. Embora os valores de emissão abaixo da área do espalhamento Rayleigh sejam muito próximos a zero, pois a fluorescência abaixo dos comprimentos de excitação não existe, a substituição destes números por zeros implica em perda de trilinearidade do modelo a ser obtido. Conseqüentemente, um modelo PARAFAC que utiliza dados experimentais poderá apresentar certa instabilidade na convergência dos *loadings* nesta área.

3.3.2. PARAFAC

3.3.2.1. Seleção do Número de Fatores

Quando se utiliza o método PARAFAC, é necessário primeiro definir o número de fatores necessários para a construção do modelo. Esta escolha é de fundamental importância, pois todas as conclusões obtidas sobre o perfil dos *loadings* e sobre os resultados da quantificação, estarão diretamente relacionadas com o número de fatores escolhidos para a decomposição.

No PARAFAC (*N-way toolbox*), é possível utilizar várias restrições ao modelo, como não negatividade, unimodalidade e/ou ortogonalidade. Nesta aplicação, foi preferido um modelo não restrito, pois resultados mais realísticos podem ser obtidos, em vista que a própria estrutura do efeito de fluorescência (equação 3) já apresenta uma estrutura trilinear, permitindo a obtenção de uma solução única. A ortogonalidade em dados espectrais não apresenta aplicabilidade e baseando-se em conhecimento anterior, sabe-se que os espectros de excitação e emissão não são unimodais. Desta

forma, somente a não negatividade poderia ser tentada, mas nenhum ganho na qualidade do modelo foi obtido quando aplicada, em relação a um modelo não restrito.

3.3.2.1.1. Porcentagem de Ajuste do Modelo

Vários modelos não restritos foram desenvolvidos para os dados obtidos por EEM, utilizando-se de um até cinco fatores para a decomposição e a porcentagem do ajuste (*%Fit*) foi utilizada como um fator inicial de escolha do número de componentes a serem selecionados. A % de ajuste descreve o quanto o modelo pode reproduzir os dados experimentais e é definida pela equação 8 (Capítulo 2). A equação 8 só pode ser utilizada quando valores ausentes não estão presentes nos dados experimentais, pois nenhum cálculo é possível de ser realizado com valores ausentes. Deste modo, primeiro um modelo PARAFAC foi desenvolvido com os valores ausentes e depois para a % de ajuste, os valores ausentes foram trocados por zeros. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Ajuste (%) e diagnóstico de consistência (*Corcondia*) para 1 a 5 fatores.

Número de Fatores	1	2	3	4	5
Ajuste (%)	94,77	98,75	99,39	99,68	99,86
Corcondia (%)	100	100	0,83	2,78	0,59

É possível notar que o parâmetro porcentagem de ajuste não é conclusivo para a seleção do número de fatores, desde que % de ajuste obtida é maior que 99% utilizando-se acima de 2 fatores.

3.3.2.1.2. Diagnóstico de Consistência do Tensor Núcleo (*Corcondia*)

Todo o tensor de dados (10x56x282) foi empregado para a análise da consistência do tensor núcleo, utilizando-se um até cinco fatores, com os valores calculados de acordo com a Equação 7 (Cap. 2). Os resultados podem ser verificados na Tabela 1. A análise do parâmetro *Corcondia* indica que dois fatores são necessários, pois a utilização de mais fatores conduz a um grande decaimento deste valor e, portanto, na trilinearidade dos dados modelados. Dois fatores apresentam um valor de *Corcondia* de 100%, representando um perfeito modelo trilinear, enquanto que utilizando-se três ou mais fatores, este parâmetro diminui para valores menores a 3%.

3.3.2.1.3. Análise por *Split-half*³²

Inicialmente, o tensor dos dados de fluorescência com dez amostras (dimensão 10x56x282) foi dividido em 4 grupos denominados A, B, C e D, onde cada um destes grupos apresenta cinco amostras e o mesmo número de comprimentos de onda de excitação e emissão (nova dimensão para cada grupo: 5x56x282). O grupo A consiste da primeira metade das amostras e o grupo B foi montado com as amostras da última metade. O conjunto C foi criado a partir das três primeiras amostras do grupo A, mais as duas últimas do conjunto B. O grupo D consiste das duas últimas amostras de A mais as três primeiras amostras de B.

Cada grupo original (A, B, C e D) foi dividido em 25 partes com dimensões: (5x12x57), (5x12x56), (5x11x57) ou (5x11x56), gerando 100 novos sub-tensores. No próximo passo, 100 modelos PARAFAC não restritos foram desenvolvidos para avaliar as similaridades entre os *loadings*. A Figura 9 mostra os resultados obtidos utilizando de 1 até 5 fatores para o modo referente à emissão. Somente quando se utilizam dois fatores, todos os 100 modelos dos sub-tensores, convergem para o mesmo resultado. Estes resultados confirmam que dois fatores são mais adequados, já que para um número maior de fatores os vetores de *loadings* divergem consideravelmente em relação ao subgrupo usado.

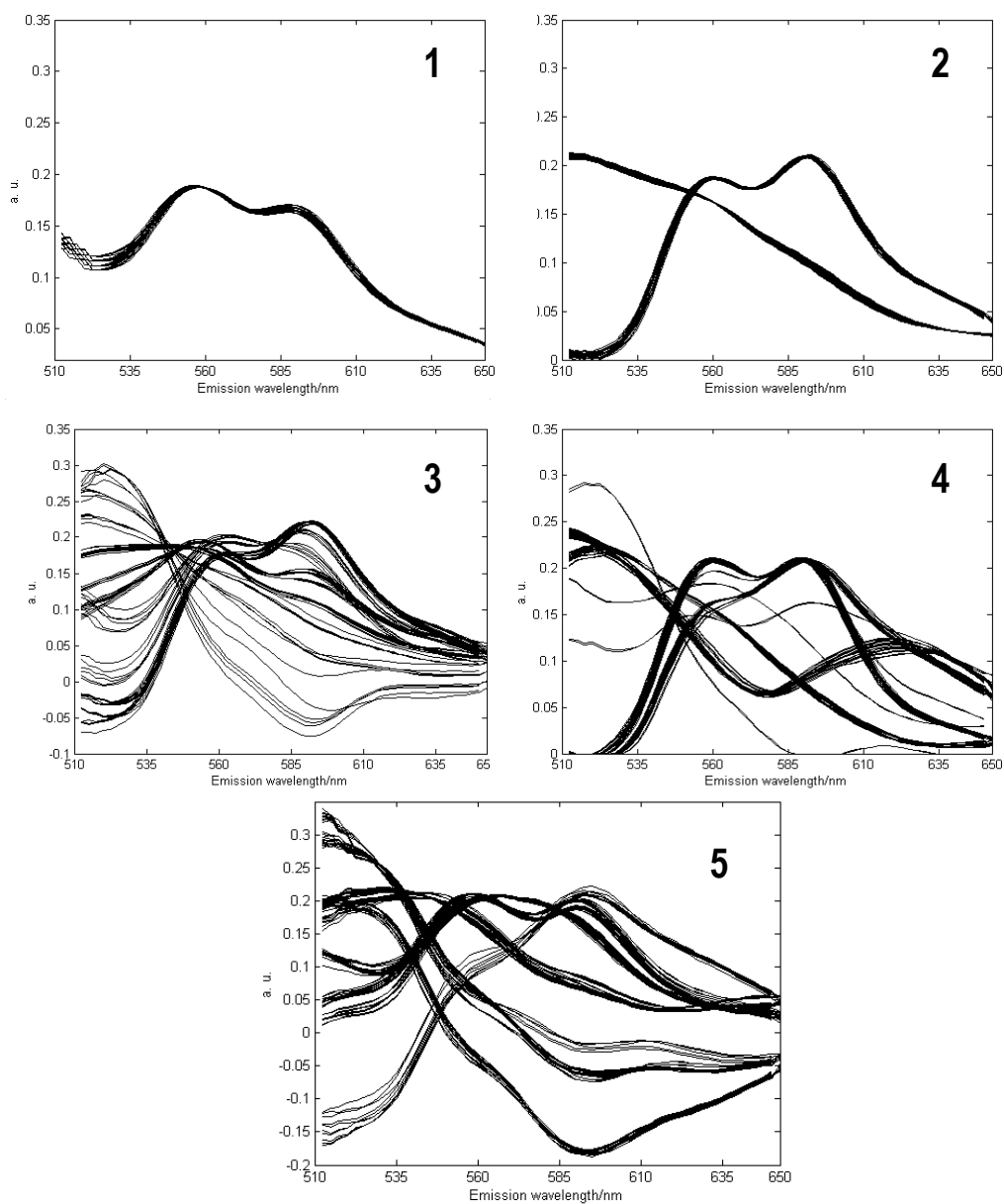


Figura 9. Loadings do modo de emissão, gerados pelo procedimento de *split-half*, na faixa de 1 a 5 fatores, em valores de unidade arbitrária.

Desta forma, a análise por *split-half* e a consistência do tensor núcleo indica o uso de dois fatores para a decomposição. Quimicamente, dois fatores são um número conveniente, pois EEM apresenta dois padrões: a fluorescência da DXR e a fluorescência natural do plasma humano. Certamente, vários

fluoróforos estão presentes no plasma, no entanto, se seus espectros forem similares, então o modelo PARAFAC não poderá interpreta-los como fatores independentes, unindo-os em um único fator.

3.3.2.2. Decomposição e Calibração

Como apresentado na seção anterior, os parâmetros *split-half*, *Corcondia* e porcentagem de ajuste revelam que dois fatores para um modelo não restrito PARAFAC fornecem o melhor resultado para a decomposição do tensor de dados. Desta forma, duas tríades de *loadings* são geradas como resultado da decomposição. Cada tríade consiste de três vetores de *loadings* ortogonais (**A**, **B** e **C**), definidos por concentração x comprimento de onda de excitação x comprimento de onda de emissão. Os dois vetores de *loadings* referentes às dimensões de excitação e emissão (neste caso **B** e **C**) para a DXR podem ser combinados, através do operador de Kronecker (Apêndice 1), para obter uma superfície de *loadings* referente ao perfil espectral de interesse. A Figura 10 mostra os resultados obtidos para este processo, onde um fator é facilmente associado a DXR, como confirmado pela comparação com o espectro de excitação/emissão do fármaco puro em água, apresentada na Figura 11.

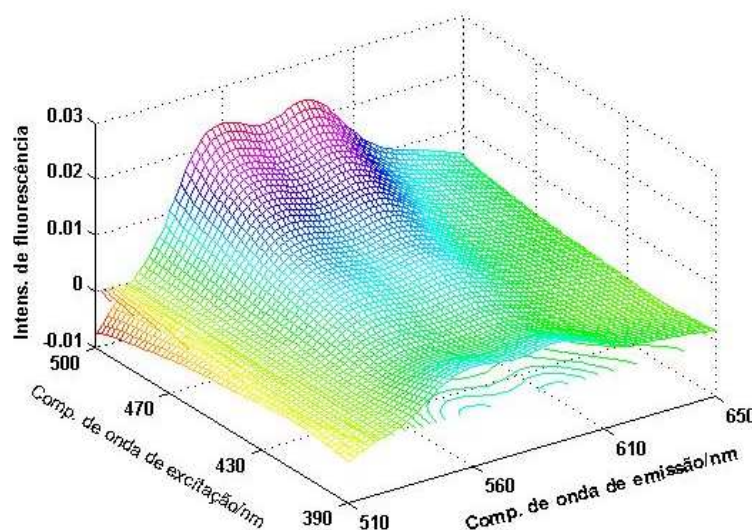


Figura 10. Superfície recuperada dos *loadings* do primeiro fator do modelo PARAFAC desenvolvido.

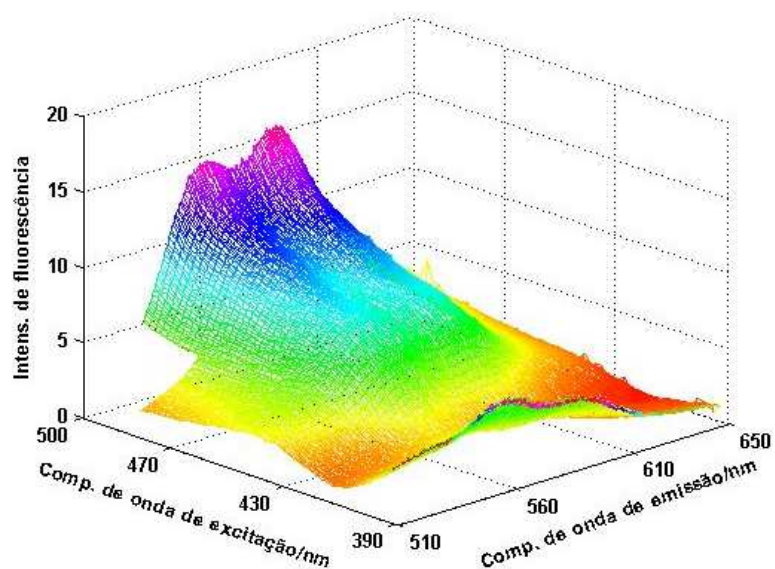


Figura 11. Espectro de fluorescência de DXR pura em água (sem espalhamento Rayleigh).

O outro fator não é considerado como uma única espécie, mas sim como uma mistura dos constituintes presentes no plasma, como bilirrubina e riboflavina (figura 12).

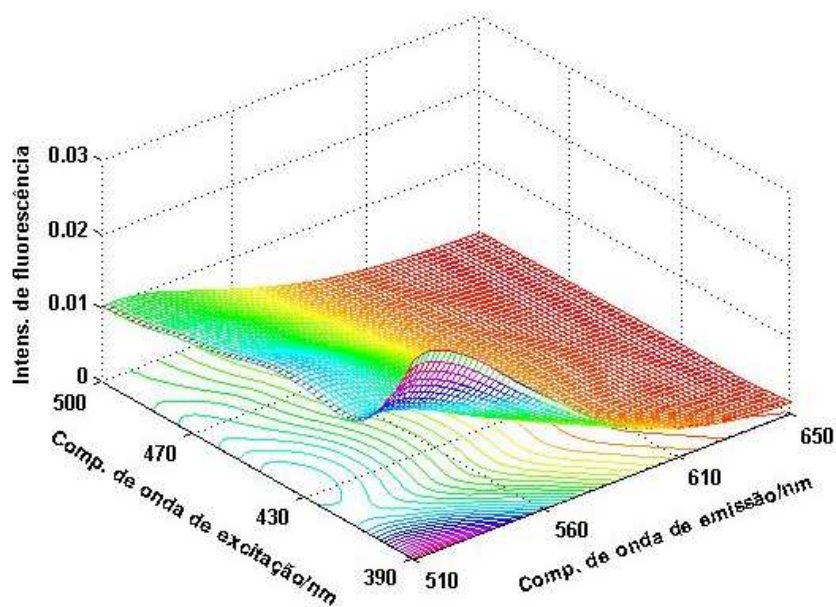


Figura 12. Superfície recuperada dos *loadings* do segundo fator do modelo PARAFAC desenvolvido.

A Figura 12 mostra o perfil de excitação/emissão deste fator. É possível observar que esta superfície é muito similar a apresentada na Figura 7 - a fluorescência natural do plasma. Uma possível explicação para estes resultados é a similaridade dos perfis de excitação/emissão das espécies presentes no plasma, de modo que o modelo PARAFAC não permitiu resolver a separação dos fatores entre estas espécies químicas.

Os *loadings* do modo das concentrações (*scores*) do primeiro fator foram usados para estabelecer uma relação linear com as concentrações de DXR, gerando um modelo de regressão univariado. Um procedimento de validação cruzada com *leave-one-out* das amostras foi realizado para verificar a viabilidade de um modelo de calibração. Neste procedimento, dez modelos foram desenvolvidos com uma diferente amostra de previsão de cada vez, obtendo como resultado uma boa curva de calibração (coeficientes de regressão maior que 0,95), conforme Figura 13. Um RMSECV de $0,060 \mu\text{g mL}^{-1}$ e um erro relativo médio de previsão de 4,4%. Estes resultados indicam que é possível quantificar DXR em plasma humano, através dos *scores* obtidos pelo PARAFAC.

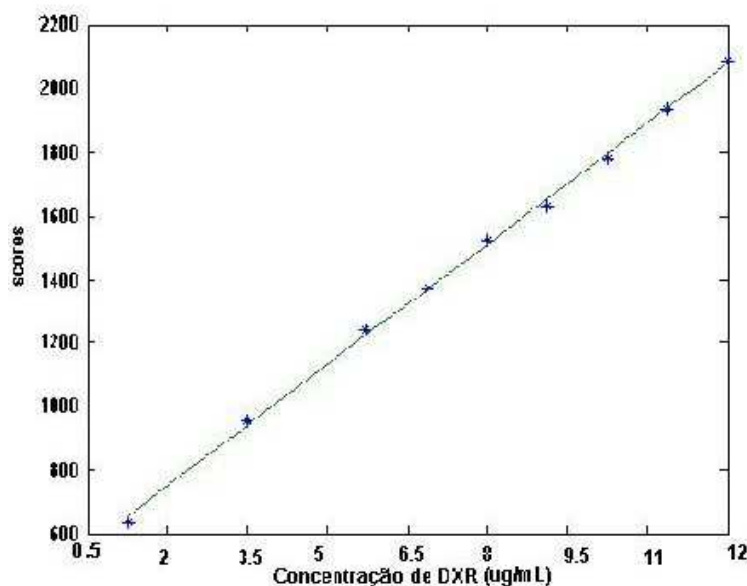


Figura 13. Curva de calibração para DXR obtida por validação cruzada com *leave-one-out*.

Nesta aplicação, foi observado que os constituintes do plasma causam supressão de emissão de fluorescência. Nossa primeira tentativa foi construir um modelo de calibração utilizando as amostras de DXR preparadas em água. Pelo uso da vantagem de segunda ordem (Cap. 2), a DXR no plasma poderia ser estimada através do modelo desenvolvido com as amostras preparadas em água. No entanto, a emissão de fluorescência de DXR em água é maior que em plasma e não foi possível realizar a quantificação. Somente utilizando-se as amostras de calibração feitas em plasma, um modelo eficiente foi desenvolvido. Uma possível alternativa poderia ser diluir as amostras de plasma para evitar os efeitos de supressão, mas este procedimento poderia produzir um aumento nos limites de detecção, por exemplo.

3.3.3. Multilinear PLS (N-PLS)

Nos cálculos envolvendo N-PLS, um procedimento de validação cruzada, com *leave-one-out* foi adotado para encontrar o melhor número de variáveis latentes (fatores) a serem usados na regressão. Na Tabela 2, os resultados da variância explicada para ambos blocos X e Y, utilizando-se de 1 até 5 fatores são mostrados.

Tabela 2. Variância explicada para os blocos X e Y.

Número de Fatores	1	2	3	4	5
Bloco X (%)	73,13	95,73	97,73	98,09	99,67
Bloco Y (%)	88,95	99,57	99,98	100,00	100,00

Baseando-se nestes resultados, foram escolhidos 2 fatores, pois eles produzem o menor erro de predição e descrevem praticamente toda a variância dos dados nos blocos X e Y. Com dois fatores, um RMSECV de 0,045 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e erro relativo médio de 2,0 % foram obtidos.

Estes resultados do N-PLS são um pouco melhores em relação ao PARAFAC, porém eles devem ser interpretados com cautela, pois somente 10 amostras foram usadas para o cálculo dos erros. Entretanto, estes resultados podem ser explicados, tendo em vista que o algoritmo do N-PLS é otimizado para estabelecer uma relação entre os espectros de fluorescência e as concentrações de DXR, e outras fontes de variação ou ruído não são incorporados no modelo.

3.3.4. Figuras de Mérito

Como mencionado nas sessões anteriores, resultados pouco melhores foram obtidos com o emprego do N-PLS. A Tabela 3 apresenta outras figuras de mérito, como sensibilidade, seletividade e limites de detecção e a precisão expressa como repetibilidade (3 concentrações/3 replicatas), calculadas a partir das equações do cap. 2. Como pode ser observado, as figuras de mérito para ambos PARAFAC e N-PLS são muito similares e somente a seletividade do N-PLS é maior que a do PARAFAC.

Tabela 3. Figuras analíticas de mérito.

Figura de mérito	PARAFAC	N-PLS
Sensibilidade (FLR ^a mL μg^{-1})	380	270
Seletividade	0,49	0,70
Limite de detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,032	0,032
Precisão (%)	2,0	2,0

^a FLR é a intensidade de fluorescência (unidade arbitrária).

Estes resultados podem ser comparados com outros métodos desenvolvidos para a determinação de DXR. Existem métodos baseados na separação por HPLC com detecção de ES-MS⁶ e baseado na eletroforese capilar com LIF⁹ que apresentam limites de detecção na ordem de 0,001 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e sensibilidade na faixa de 0,0001 a 0,0030 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Também podem ser encontrados métodos com detecção UV-VIS¹² e Raman¹³, cujos limites de detecção estão no intervalo de 0,030 a 0,060 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e

sensibilidade na ordem de $0,006 \mu\text{g mL}^{-1}$. O método EMM fluorescência/quimiometria proposto neste trabalho pode ser eficientemente comparado com estes últimos métodos. Os outros métodos que envolvem separação, apresentam limites de detecção muito baixos. Entretanto, todos eles requerem procedimentos de manuseio e pré-tratamento das amostras, bem como passos de separação para possibilitar o incremento dos limites de detecção.

3.4. Conclusões

Este trabalho demonstra que o uso de fluorimetria de excitação-emissão e análise multidimensional é uma poderosa ferramenta para a análise de fármacos em plasma, já que muitas delas apresentam fluorescência naturalmente.

A decomposição utilizando PARAFAC resultou em dois fatores, um devido a DXR e outro devido aos dois constituintes presentes no plasma. Isto demonstra que a conjunção de vários procedimentos como análise de % ajuste, Corcondia e análise por *spli-half* conduzem a uma estimativa mais realística do número de fatores em um modelo PARAFAC.

As figuras de mérito calculadas para ambos PARAFAC e N-PLS foram similares e os resultados mostram-se consideravelmente satisfatórios, baseando-se na complexidade das amostras analisadas. Eles poderiam ser empregados para muitas aplicações reais, como investigações farmacocinéticas em pacientes com câncer.

CAPÍTULO IV

DETERMINAÇÃO DE

RIBOFLAVINA

4. Determinação de Riboflavina

4.1. Introdução¹

Riboflavina (ou vitamina B₂) é uma importante vitamina do complexo B, exercendo na forma de suas coenzimas riboflavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), função intermediária na transferência de elétrons nas reações biológicas de oxi-redução dentro do citoplasma celular, apresentando o mesmo grupo fluorescente, de acordo com a Figura 14. Assim como toda vitamina do complexo B, riboflavina é sintetizada por microorganismos e vegetais superiores, mas não por animais, que devem obtê-la através dos alimentos. As melhores fontes naturais de riboflavina são os fermentos, mas estes não constituem elementos de consumo freqüente na dieta humana. Desta forma, laticínios e carnes são os maiores contribuidores de riboflavina, sendo que os derivados do leite são responsáveis por mais de 50% da fonte natural de vitamina B₂ na dieta do homem ocidental.

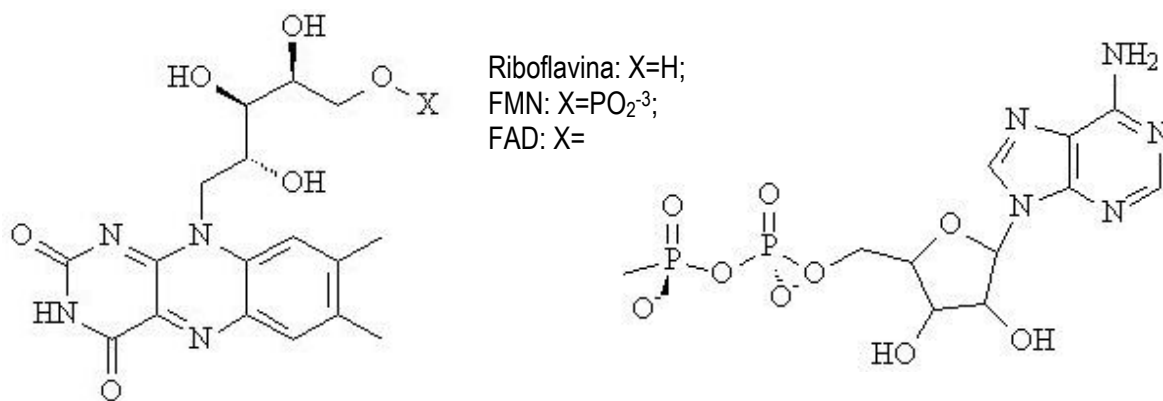


Figura 14. Fórmula estrutural da molécula de Riboflavina, FMN e FAD.

Riboflavina apresenta-se como uma substância estável perante processos de aquecimento térmico, como pasteurização, evaporação ou condensação, tendo estes processos pequenos efeitos na variação de sua concentração no leite. Em contrapartida, consideráveis perdas podem ocorrer se estas etapas estiverem expostas à luz, como por exemplo, a secagem de alimentos à luz solar, pois riboflavina

é facilmente degradada na presença de luz, perdendo a sua importância biológica. Outra importante perda de riboflavina em processos de elaboração na indústria de alimentos ocorre devido ao caráter hidrossolúvel da vitamina, podendo ser encontrada em grandes concentrações em águas de cozimento de carnes e vegetais. Desta forma, é interessante não apenas controlar a sua presença natural em alimentos, mas também estudar a influência de vários processos de manufatura e armazenamento na oscilação de sua concentração.

Em adição, estudos têm revelado que a alteração de certas características organolépticas presentes no leite² bovino e em outras bebidas, como vinhos³, estão relacionadas com a fotodegradação de riboflavina, que atua como um sensibilizador fotoquímico, provocando a degradação de determinados compostos. Em paralelo, as variações de riboflavina podem servir de indicadores de vários parâmetros citados como influentes na sua degradação, como a fonte e quantidade de luz, condições de manejo, processo de tratamento térmico e condições de armazenamento². Conseqüentemente, a determinação de riboflavina em amostras de leite bovino é tanto de interesse nutricional, como um indicativo da qualidade desses alimentos.

Além de água, carboidratos, gorduras, sais e proteínas, o leite apresenta uma grande concentração de vitaminas e aminoácidos; esse meio altamente rico de proteínas, principalmente caseína (82%), acaba gerando a supressão da fluorescência da riboflavina. Além disso, em materiais biológicos, a maior parte de riboflavina encontra-se ligada às proteínas, na forma de suas coenzimas também fluorescentes FMN e FAD, de modo que é necessária a separação destas e a conversão das coenzimas em riboflavina livre, caso seja de interesse a determinação de riboflavina total. Para contornar o problema da presença das proteínas (supressão) e realizar a conversão das flavinas em riboflavina, é usual a adição de ácido tricloroacético (TCA) às amostras, realizando a precipitação das proteínas e hidrolisando as flavoenzimas para a forma de riboflavina livre¹⁰.

Várias metodologias têm sido desenvolvidas para a quantificação de riboflavina em alimentos em geral, como leite, iogurtes, ovos, farinhas, bebidas, carnes, entre muitos outros produtos, mas também em fluidos biológicos, como sangue e urina^{4,5}. Apesar da variedade de aplicações, basicamente as mesmas técnicas analíticas são usadas, como HPLC-FLR^{6,7}, HPLC-UV^{8,9,10} e CE-LIF^{3,11,12}, que exigem demorados e custosos processos de separação e determinação. No controle de qualidade na indústria de alimentos, é de interesse métodos que possibilitem a obtenção de resposta instantânea de um sistema químico, mesmo na presença de interferentes, que seja de baixo custo e com baixa geração de resíduos; como processos robóticos automatizados¹³ para o monitoramento de certos parâmetros.

Neste trabalho é proposto um método para a determinação direta de riboflavina livre em amostras de leite bovino desnatado e integral, através de fluorimetria de excitação-emissão e o método de Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC). Parâmetros como *Corcondia*¹⁴ e porcentagem de ajuste (*Fit%*)¹⁵ foram utilizados para a escolha de número ideal de fatores a serem utilizados para a decomposição dos dados obtidos, de modo que dois fatores mostraram-se como a melhor opção. Um fator foi associado à presença de riboflavina e outro devido a outras espécies fluorescentes presentes no leite.

O método da adição padrão (*spiking*) foi empregado para a quantificação, através de várias adições de uma solução de referência de riboflavina em uma única amostra de leite. Para a construção do modelo de calibração, os *scores* referentes a estas amostras foram utilizados para estabelecer uma relação linear com as concentrações das adições, de modo que as novas amostras foram estimadas pela extrapolação da curva de calibração.

4.2. Experimental

4.2.1. Aparatos

Os espectros foram registrados em um espectrômetro de luminescência Perkin-Elmer LS 55, com uma cubeta de quartzo de 10 mm, a 23 ± 1 °C. O software empregado para as medidas foi o FL WinLab (Perkin-Elmer), e os espectros foram importados para o Matlab versão 6.1, utilizando uma rotina desenvolvida individualmente. O '*N-way toolbox*', desenvolvido e disponibilizado por Rasmus Bro e Claus Andersson em <http://www.models.kvl.dk/source> foi empregado para o desenvolvimento dos cálculos com PARAFAC. Todos os programas foram executados em um microcomputador IBM compatível, AMD Thunderbird 1,3 GHz com 128 Mbytes de memória RAM.

4.2.2. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes químicos utilizados neste estudo foram de grau analítico. Riboflavina 98% foi adquirida através da empresa Sigma-Aldrich, na forma de pó cristalino. Uma solução estoque com concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi preparada pela dissolução de riboflavina em água e estocada em vidro a -20 °C e protegida da luz. Uma solução de Ácido Tricloroacético (TCA) 20% (v/v) foi preparada a partir do reagente concentrado, adquirido através da empresa Merck. Água desionizada (Millipore®) foi usada em todas as preparações experimentais. Todas as vidrarias usadas foram estocadas previamente com uma solução 10% v/v HNO_3 por pelo menos 48h e lavadas com água destilada.

4.2.3. Amostras

Foram adquiridas dez amostras de cinco diferentes marcas comerciais de leite bovino, em estabelecimentos comerciais na região de Barão Geraldo – Campinas - SP. Todas as amostras caracterizavam a classe UHT (*Ultra High Temperature*), sendo que cada amostra era do tipo desnatado ou integral, de uma determinada marca adquirida. As marcas analisadas foram: Parmalat, Shefa, Batavo, Nilza e Leco. Depois de abertas, as amostras foram congeladas à temperatura de -20°C .

4.2.4. Procedimento

Foram pipetados 2,00 mL de cada amostra em um frasco de centrifuga com capacidade para 10 mL e adicionados 3,00 mL de TCA 20%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para uma cubeta de quartzo e registrado o espectro de fluorescência. Uma amostra foi escolhida para servir de meio para a construção de uma curva de calibração a partir do método da adição padrão, de modo que esta amostra sofreu cinco adições de uma solução padrão de riboflavina.

Os espectros de EEM foram obtidos na faixa espectral de 310 a 500 nm, em intervalos de 10 nm, e 470 a 670 nm em intervalos de 0,5 nm, para excitação e emissão, respectivamente. As larguras das fendas de excitação e emissão permaneceram constantes em todas as medidas a 10 nm, juntamente com a velocidade de varredura, de 1500 nm min^{-1} .

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Fluorescência Natural do Leite Bovino

A fluorescência do leite, assim como a do sangue e urina, apresenta uma alta sobreposição espectral, devido a uma série de compostos presentes. As flavinas são importantes contribuidores da fluorescência nestas amostras, compreendendo uma grande região no espectro total de fluorescência, que se inicia no ultravioleta e vai até o visível. Na região do ultravioleta, as principais espécies responsáveis pelas bandas de fluorescência são as proteínas, devido à presença de triptofano e outros aminoácidos, como citado no Capítulo 1. Das flavinas encontradas no leite, podemos destacar a riboflavina, FMN e FAD que estão presentes em maior quantidades no leite, e apresentam espectros similares e na mesma região. Os espectros de excitação e emissão de fluorescência de riboflavina (RF) e FMN são exatamente iguais, de forma que na mesma concentração, a intensidade é a mesma (mesmo rendimento quântico). FAD apresenta uma pequena diferença no espectro de excitação, embora o seu espectro de emissão também seja idêntico aos citados anteriormente.

Na região escolhida para as análises, o espalhamento Rayleigh e difração de segunda ordem (gerada pela grade de difração) também estão presentes, de modo que suas intensidades foram substituídas por valores ausentes, assim como no caso da aplicação anterior. Na Figura 15 é possível verificar um típico espectro de uma amostra de leite desnatado, com a presença de duas regiões de máximo: 370/530 nm e 450/530 nm (excitação/emissão), característico das flavinas (B₂, FMN e FAD). Na mesma figura também podem ser identificadas as regiões da difração de segunda ordem (1) e do espalhamento Rayleigh (2).

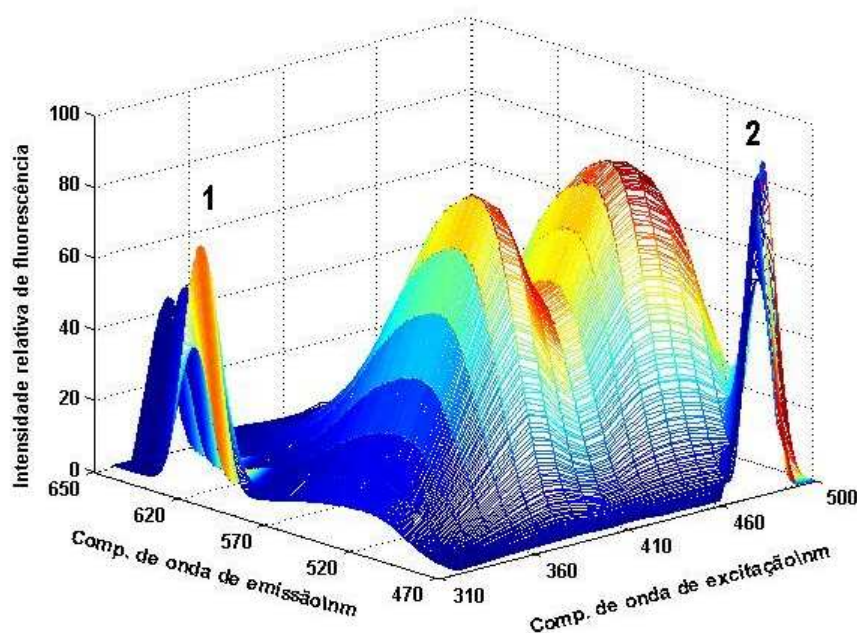


Figura 15. Superfície proveniente de uma EEM de uma amostra de leite desnatado.

4.3.2. Estudos Preliminares

Inicialmente, acreditava-se que houvesse uma considerável diferença entre os espectros de fluorescência (excitação e emissão) das flavinas presentes no leite, de modo que um modelo PARAFAC pudesse fazer a separação destas espécies, através de seus espectros de EEM de fluorescência molecular. Para se eliminar (ou reduzir) o efeito da supressão ocasionada pela presença das proteínas presentes no leite, estudou-se vários níveis de diluição, sem executar qualquer processo para a separação das proteínas.

Este estudo foi realizado a partir de uma amostra de leite desnatado, onde foram estudadas as seguintes diluições: 3:100, 5:100, 10:100, 20:100, 50:100 e 1:1, ou seja, a medida de EEM da própria amostra sem sofrer diluição. É interessante ressaltar que para esta parte do estudo, não foram utilizadas as amostras como descrito no item 4.2.4 (Procedimento), pois as mesmas sofreram apenas etapas de diluição. Os demais níveis foram obtidos pela adição de volumes apropriados da amostra: 0,30, 0,50,

1,00, 2,00 e 5,00 mL, respectivamente, em um balão de 10 mL, completando-se o volume com água destilada.

As seis amostras foram agrupadas em um tensor de dimensões 6x401x20, onde as regiões em que o espalhamento Rayleigh e da difração estavam presentes foram substituídas por valores ausentes. Para a escolha do número ideal de fatores, foram estudados de um a cinco fatores para a decomposição. Os resultados obtidos para *fit* e *Corcondia* na faixa de fatores estudados são apresentados na Tabela 4, conduzindo ao uso de dois fatores para a decomposição.

Tabela 4. Valores de Ajuste (%) e *Corcondia* para os modelos PARAFAC usando de 1 a 5 fatores.

Número de Fatores	1	2	3	4	5
Ajuste (%)	95,43	98,76	99,53	99,77	99,96
Corcondia (%)	100	100	21,52	9,08	- 0,22

Como pode ser constatado, dois fatores mostram-se razoáveis do ponto de vista analítico, em vista que um dos *loadings* do modo de excitação e emissão são semelhantes aos produzidos pela presença de riboflavina em água, conforme pode ser visto na Figura 16.

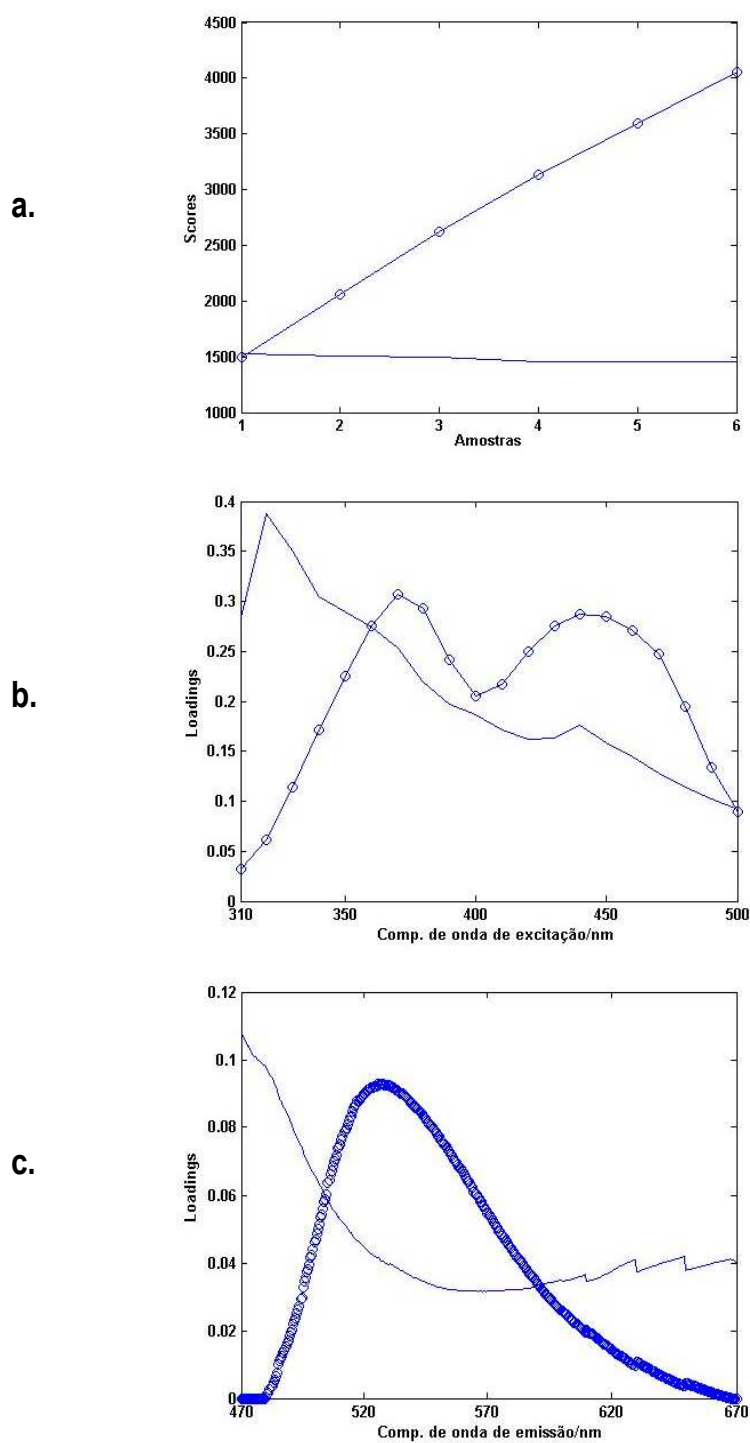


Figura 16. Gráficos de scores (a), loadings de excitação (b) e emissão (c) para o conjunto de diluições, onde os loadings destacados (o) representam à riboflavina.

Com os *scores* relacionados à presença de riboflavina realizou-se uma regressão linear entre estes e os fatores de diluição. Foi observado que para fatores de diluição superiores a 0,10 (0,20, 0,50 e 1,00), ocorre perda da linearidade da fluorescência de riboflavina, evidenciando a ocorrência de supressão, como pode ser constatado na Figura 17.

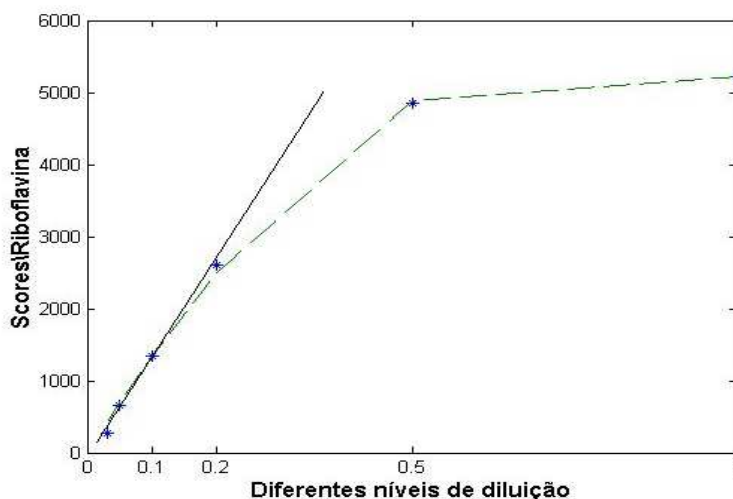


Figura 17. Vários níveis de diluição de uma amostra de leite, com o aparecimento da supressão a partir do ponto 0,10.

Desta forma, é possível observar que em diluições menores que o fator de 0,10 a supressão não se fará presente, podendo-se desenvolver uma metodologia de análise direta para a quantificação de riboflavina. Conseqüentemente, dez amostras foram diluídas até o fator 0,10, ou seja, 1,0 mL de cada amostra foi introduzida em um balão de 10,0 mL e completado o volume com água destilada. Esse procedimento foi feito em triplicata para cada amostra, totalizando 30 amostras que foram medidas de forma aleatória, totalizando um tensor de dimensões 30x401x20.

Para a calibração, foi escolhido o método de adição padrão, onde uma única amostra de leite foi selecionada para a adição de volumes constantes de uma solução padrão de RF. Foram feitas cinco adições com triplicata de cada ponto, contabilizando 18 medidas. Ambos conjuntos de calibração e das outras amostras de leite foram incorporados em um único tensor, de dimensões 48x401x20, e

decomposto utilizando-se um modelo PARAFAC com dois fatores. Esse procedimento foi adotado para evitar possíveis diferenças entre os espectros de *loadings* entre os dois conjuntos, o que poderia aumentar os desvios na calibração.

Realizando-se uma regressão entre os *scores* das amostras de calibração e o valor de concentração das adições padrão, foi possível estabelecer uma reta bastante representativa, com $r^2=0,98$, conforme mostra a Figura 18.

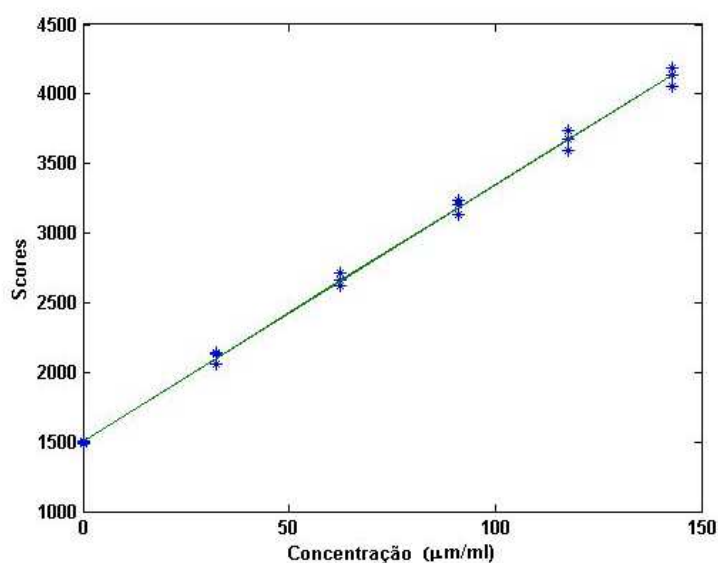


Figura 18. Regressão linear entre os *scores* da calibração e a concentração da adição padrão com pontos em triplicata.

Os *scores* das outras amostras que não sofreram adição foram inseridos na curva de calibração, de forma que alguns se localizaram acima do primeiro ponto e outras abaixo deste. As amostras com *scores* maiores que a amostra que foi usada para a adição localizaram-se acima desta, e as com *scores* menores, abaixo. Em um procedimento analítico, é conveniente que todas as amostras se localizem entre os pontos da curva, idealmente próximos ao seu centro, minimizando os erros de previsão. Neste caso isto não é possível, pois não existe nenhuma amostra que tenha ausência total de riboflavina, fazendo com que a reta não passe pela origem dos eixos.

Apesar da boa linearidade do modelo de regressão e o baixo desvio padrão das medidas, os resultados em termos de concentração inicial de riboflavina nas amostras diluídas ficaram bem acima da média encontrada em amostras de leite. O valor da concentração de riboflavina em amostras de leite desnatado e integral¹⁶ varia entre 1,50 e 2,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e em média apresenta 1,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores encontrados pelo modelo podem são apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Concentração de riboflavina para as amostras diluídas.

Marcas/ Tipo	Parmalat $\mu\text{g mL}^{-1}$	Shefa $\mu\text{g mL}^{-1}$	Batavo $\mu\text{g mL}^{-1}$	Nilza $\mu\text{g mL}^{-1}$	Leco $\mu\text{g mL}^{-1}$
Leite desnatado	4,170 $\pm 0,004$	3,404 $\pm 0,003$	3,774 $\pm 0,012$	4,084 $\pm 0,004$	4,044 $\pm 0,002$
Leite integral	3,486 $\pm 0,002$	3,271 $\pm 0,005$	3,468 $\pm 0,003$	3,720 $\pm 0,006$	3,860 $\pm 0,006$

O elevado valor de concentração de riboflavina, muito além da média neste tipo de amostra, pode ser explicado pela presença de outras flavinas associadas, como FMN e/ou FAD. Embora uma série de flavinas esteja presente nas amostras, esperava-se que adições padrão de riboflavina pudessem separar espectralmente a RF das outras flavinas presentes, de modo que os resultados pudessem ser apresentados em termos de riboflavina livre.

No entanto, isto não foi possível pois riboflavina e FMN e FAD que estão ligados às proteínas, apresentam exatamente o mesmo espectro de fluorescência, tanto em termos de excitação como emissão; como citado anteriormente. Logo, os resultados obtidos através deste procedimento não podem ser relacionados com a concentração de RF, nem tampouco com a concentração de flavinas totais, pois embora o espectro de FAD seja o mesmo das outras flavinas, a sua intensidade é menor, invalidando o modelo criado através da diluição das amostras.

4.3.3. Construção de um Modelo Eficiente

Como foi visto através do modelo anterior, para a determinação de RF livre é necessário não somente a eliminação dos efeitos da supressão de fluorescência gerada pelas proteínas presentes no leite, mas também a conversão total das flavinas ligadas as proteínas à RL livre. Assim, o meio escolhido para fazer esta separação e a conversão de FAD e FMN nas amostras de leite foi a adição de TCA na concentração de 1,5 mL deste por mL de amostra. Após centrifugar por cinco minutos a solução onde o TCA foi adicionado, o sobrenadante foi diluído 10 vezes e o espectro registrado diretamente em uma cubeta de quartzo de 10 mm. O método escolhido para efetuar um modelo de calibração foi o método da adição padrão, exatamente conforme o descrito para amostras diluídas. Desta forma, foram obtidos um conjunto de 10 amostras com cinco adições padrão em triplicata e uma única triplicata de uma amostra, constituindo um tensor de dimensões (27x401x20).

Como as novas amostras estavam sem a presença das proteínas e conseqüentemente sem FMN e FAD, foi novamente necessário realizarmos um novo estudo sobre o número de componentes a serem utilizados. Os mesmos parâmetros de Ajuste (%) e *Corcondia* foram estudados para uma faixa de 1 a 5 fatores para a decomposição dos dados através de um modelo PARAFAC. Novamente a escolha de dois fatores se mostrou aconselhável, revelando que apesar da extração das proteínas presentes no leite, ainda resta uma interferência espectral nas amostras, o que poderia inviabilizar medidas univariadas ou até mesmo multivariadas. A presença de um segundo fator pode ser vista na Figura 19, que apresenta os *loadings* da decomposição do PARAFAC nos 3 modos (amostras x emissão x excitação).

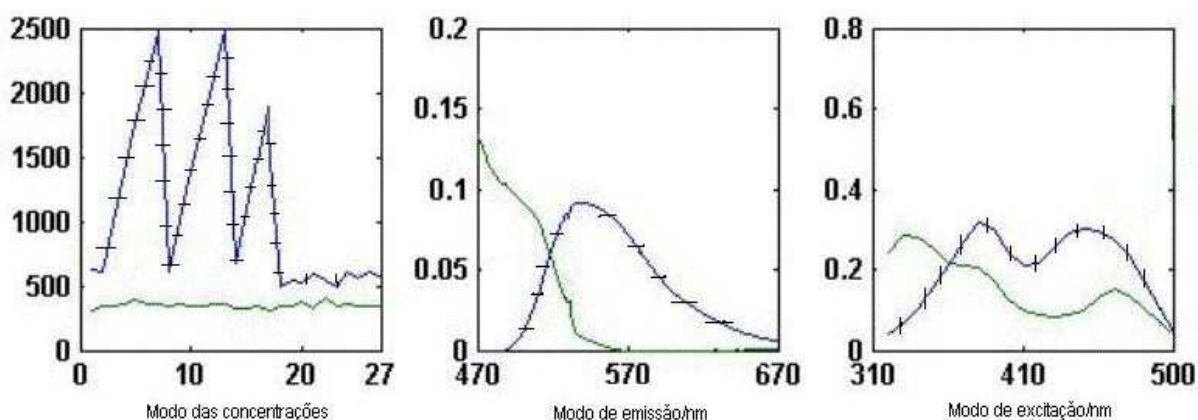


Figura 19. *Loadings* das amostras extraídas com TCA das espécies RF (em destaque) e *background*.

Os dois vetores de *loadings* referentes aos modos de excitação e emissão para a riboflavina podem ser combinados pela operação de Kronecker, gerando uma superfície de *loadings*, mostrada na Figura 20. Esta superfície é muito próxima do espectro de excitação/emissão das flavinas presentes no leite, como pode ser constatado na Figura 15.

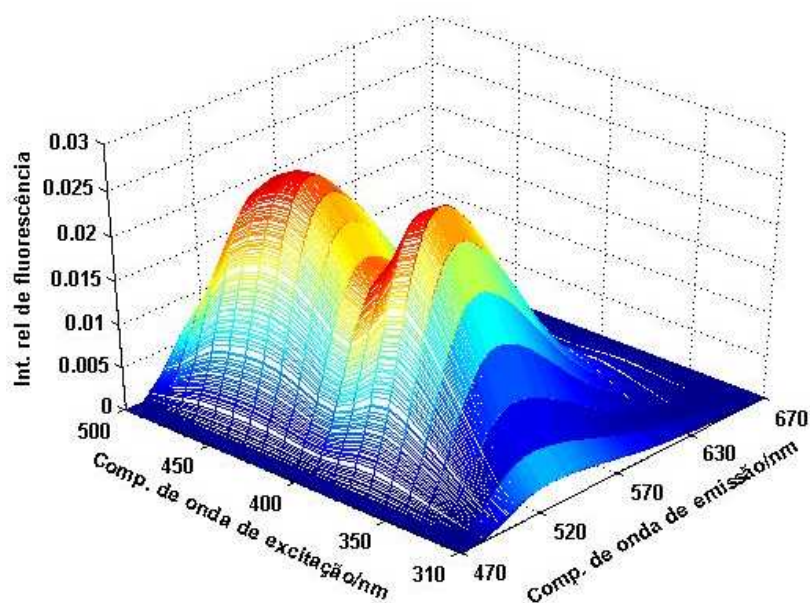


Figura 20. Superfície recuperada dos *loadings* do primeiro fator, associado à presença de riboflavina.

Embora o primeiro fator possa ser relacionado a uma espécie conhecida, a reconstrução da superfície de *loadings*, a partir do segundo componente, não apresentou similaridade com nenhuma espécie fluorescente conhecida, conforme pode ser visto na Figura 21.

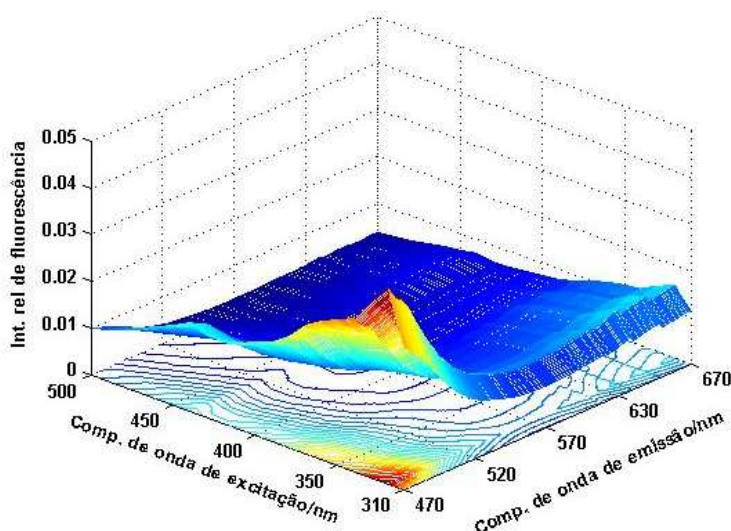


Figura 21. Superfície de *loadings* reconstruída a partir do segundo fator do modelo PARAFAC.

Relacionando os valores de *scores* obtidos com este novo procedimento, com os valores de concentração pelo método da adição padrão, pode-se constatar que os resultados de concentração de riboflavina livre estão dentro da faixa de concentração esperada para este tipo de amostra. Apesar disto, optamos pela validação da metodologia proposta, com a determinação de vitamina B₂ das amostras pelo método padrão de análise, envolvendo HPLC.

4.3.4. Validação da Metodologia

A concentração de riboflavina livre em dez amostras de leite, cinco desnatados e cinco integrais foi medida empregando-se HPLC, com detecção fluorimétrica. Inicialmente as amostras foram extraídas utilizando-se a adição de TCA para a precipitação das proteínas e outras substâncias, tornando a solução límpida. O sobrenadante foi injetado em um cromatógrafo líquido com coluna C₁₈ de sílica modificada, e

fase móvel etanol/acetonitrila/água (10%-30%-60%) (v/v), respectivamente. A detecção fluorimétrica foi feita por procedimento univariado, com excitação em 390nm e emissão em 512 nm, onde o sinal da riboflavina pode ser identificado em torno de 8 minutos após a injeção da amostra. A correlação entre os resultados obtidos por ambos os métodos podem ser visualizados na Tabela 6, mostrando desvios menores que 10%, com exceção da amostra “Shefa Integral”.

Tabela 6. Desvios e concentrações obtidas em $\mu\text{g mL}^{-1}$ pelo método de referência e pela metodologia desenvolvida.

Marcas de leite/ Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Conc. de referência (HPLC)	Conc. encontrada (EEM-PARAFAC)	Desvios relativos (%)
Parmalat [®] Integral	1,59	1,56	- 1,49
Batavo [®] Integral	1,54	1,61	4,65
Leco [®] Integral	1,74	1,82	4,91
Shefa [®] Integral	1,17	1,48	<u>26,81*</u>
Nilza [®] Integral	1,59	1,69	6,70
Parmalat [®] Desnatado	1,89	1,78	- 5,37
Batavo [®] Desnatado	1,71	1,64	- 3,90
Leco [®] Desnatado	1,77	1,68	- 4,58
Shefa [®] Desnatado	1,49	1,46	- 1,61
Nilza [®] Desnatado	1,71	1,85	8,29

Como é possível constatar nos dados fornecidos na Tabela 5, os desvios relativos são menores que 10% entre a metodologia desenvolvida e o método padrão de análise de riboflavina livre em amostra

de leite desnatado e integral, de modo que esta metodologia pode ser empregada quando essa margem de erro é aceita. A única exceção é a amostra Leite Shefa® integral, que obteve desvio próximo a 27 %. Possivelmente esta amostra seja uma anomalia para a metodologia de referência, pois estranhamente possui valor muito menor que a média de riboflavina livre.

A metodologia desenvolvida apesar de ser mais complexa em termos matemáticos pode ser justificada em vista que determinações envolvendo apenas um fator de decomposição ou ainda calibrações de primeira ordem, apresentam erros acima de 30% e 40%, respectivamente. Além disso, neste caso não são necessárias etapas de separação cromatográfica e gastos com reagentes da fase móvel.

4.4 Conclusões

Este trabalho demonstrou a eficiência da utilização conjunta dos métodos quimiométricos de ordem superior, no caso, o PARAFAC, na decomposição e calibração de dados de segunda ordem obtidos por EEM de fluorescência molecular. Embora a análise direta, sem a precipitação das proteínas contidas no leite tenha falhado, o trabalho proposto ainda apresenta importância analítica, não apenas por representar uma nova metodologia alternativa aos processos de separação física, mas também, por possibilitar um processo sem geração de resíduos, de baixo custo e com possibilidade de resposta instantânea, ideal para processos automatizados.

Embora não se tenha obtido as figuras de mérito para este trabalho, como feito na primeira aplicação, quando os resultados são comparados com cromatografia líquida, uma boa concordância é obtida, mostrando a exatidão da metodologia proposta. Com base nestes argumentos, acreditamos que este trabalho possa ser aplicado em amostras reais.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Na primeira aplicação deste trabalho foi proposta uma metodologia alternativa para a determinação direta em plasma humano, através da construção de uma curva de calibração utilizando o próprio plasma, isento de doxorrubicina. Embora existam métodos com limites de detecção mais baixos, a metodologia ainda apresenta uma faixa de trabalho em níveis aceitáveis, se mostrando possivelmente aplicável em estudos farmacocinéticos de pacientes com câncer.

Na segunda aplicação foi proposto um método para quantificação direta de vitamina B₂ em amostras de leite desnatado e integral, através de um procedimento de adição padrão. O método proposto tem caráter inovador, pois isenta a necessidade de separações cromatográficas ou outras etapas de elaboração e apresenta bons resultados quando validado por um método paralelo. Além disso, o procedimento apresenta-se rápido e sem geração de resíduos, com possibilidade de resposta instantânea, podendo vir a ser de relevante aplicação na indústria farmacêutica.

Finalmente, este trabalho mostrou a eficiência da utilização conjunta de métodos quimiométricos de ordem superior e fluorescência molecular 2-D, na determinação direta em matrizes biológicas, como leite e sangue humano. Além de se obter bons resultados em determinações quantitativas, os métodos utilizados proporcionaram um procedimento eficiente para a identificação de espécies interferentes, através de seus máximos de fluorescência, obtidos pelas superfícies de *loadings*.

PERSPECTIVAS FUTURAS

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

No decorrer deste trabalho, foi possível verificar que os métodos quimiométricos de ordem superior e fluorescência 2-D apresentam-se eficazes na análise direta em matrizes biológicas, mesmo na presença de um número grande de espécies interferentes, como o caso do sangue humano. Em vista que ainda são extremamente raras as aplicações destes métodos na análise de matrizes biológicas, surge a necessidade de estabelecer figuras analíticas de mérito eficientes para a comparação e validação destes métodos com os já estabelecidos.

Um importante parâmetro no desenvolvimento de métodos químicos, senão o mais, é a evolução da tecnologia, que vem a propiciar novas ferramentas de análise. Como foi visto no Capítulo 3 deste trabalho, os limites de detecção foram bastante altos quando comparado com os métodos envolvendo HPLC. Isto não é decorrência do processo de separação, mas sim da maior sensibilidade dos detectores em relação a espectrofluorímetro utilizado. Em vista disto, a técnica de fluorimetria poderia obter um incremento significativo não apenas na sensibilidade, mas na velocidade de obtenção de dados, se ao invés de um monocromador de emissão fosse inserido um arranjo de diodos ou uma câmera digital. No entanto, este tipo de equipamento ainda é inexistente, de modo que protótipos devem ser desenvolvidos e comparados com os modelos consagrados.

Além das vantagens dos dados de terceira ordem citados neste trabalho, dados de quarta ordem como EEM monitorada no tempo, apresentam importantes vantagens, vindo a proporcionar maiores informações sobre o sistema em estudo e possibilitando separações e quantificações mais precisas.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Prefácio

- [1] H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*. John Wiley, New York, (1989).
- [2] G. G. Guilbault, *Practical Fluorescence*. Marcel Dekker, (1990).
- [3] [R. Bro, *Multiway analysis in the food industry: models, algorithms and applications*. Doctoral Thesis, University of Amsterdam, \(1998\).](#)
- [4] [R. Bro, *PARAFAC - Tutorial and applications*. Chemom. Intell. Lab. Sys. 38 \(1997\) 149.](#)

Capítulo 1 – Fluorescência Molecular

- [1] D. A. Skoog, J. J. Leary, *Principles of Instrumental Analysis*. Saunders, New York, 4th Ed., (1991).
- [2] G. W. Ewing, *Analytical Instrumentation Handbook*. Marcel Dekker, (1990).
- [3] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum, New York, 2nd Ed., (1999).
- [4] J. M. Cooperman, R. Lopez, *Handbook of the Vitamins*, (1989) p.288.

Capítulo 2 – Métodos Quimiométricos de Ordem Superior

- [1] K. S. Booksh, B. R. Kowalski, *Anal. Chem.* 66 (1994) 782A.
- [2] H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*. John Wiley, New York, (1989).
- [3] [R. P. H. Nikolajsen, K. S. Booksh, Å.M. Hansen, R. Bro, *Anal. Chim. Acta*, 475 \(2003\) 137.](#)
- [4] P. M. Kroonenberg, *Three-Mode Principal Component Analysis*, DSWO Press, Leiden, (1989).
- [5] R. Bro, *Multiway analysis in the food industry: models, algorithms and applications*. Doctoral Thesis, University of Amsterdam, (1998).
- [6] A. K. Smilde, D. A. Doornbos, *J. Chemom.* 5 (1991) 345.
- [7] M. M. Reis, D. N. Biloti, M. M. C. Ferreira, F. B. T. Pessine, G. M. Teixeira, *Appl. Spectrosc.* 55 (2001) 7.
- [8] R. Bro, *Chemom. Intell. Lab. Sys.*, 46 (1999) 133.
- [9] R. Bro, *J. Chemom.*, 10 (1996) 47.

- [9] A. Lorber, K. Faber, B. R. Kowalski, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1620.
- [10] A. M. de la Peña, A. E. Mansilla, D. G. Gómez, A. C. Olivieri, H. C. Goicoechea, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2640.

Capítulo 3 – Determinação de Doxorrubicina

- [1] F. Arcamone, G. Cassineli, G. Fantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol, C. Spalla, *Biotechnol. Bioeng.* 11 (1969) 1101.
- [2] United States Pharmacopoeia XXI, Rockville, MD, USA, 1994, p. 357.
- [3] G. N. Hortobagyi, *Drugs* 54 (Suppl. 4) (1997) 1.
- [4] G. Zagotto, B. Gatto, S. Moro, C. Sissi, M. Palumbo, *J. Chromatogr. B* 764 (2001) 161.
- [5] S. Fogli, R. Danesi, F. Innocenti, A. Di Paolo, G. Bocci, C. Barbara, M. Del Tacca, *Ther. Drug Monit.* 21 (1999) 367.
- [6] F. Lachâtre, P. Marquet, S. Ragot, J. M. Gaulier, P. Cardot, J. L. Dupuy, *J. Chromatogr. B* 738 (2000) 281.
- [7] J. van Asperen, O. Van Tellingen, J. H. Beijnen, *J. Chromatogr. B* 712 (1998) 129.
- [8] Q. Zhou, B. Chowbay, *J. Pharm. Biom. Anal.* 30 (2002) 1063.
- [9] T. Perez Ruiz, C. Martinez Lozano, A. Sanz, E. Bravo, *Electrophor.* 22 (2001) 134.
- [10] N. J. Reinhoud, U. R. Tjaden, H. Irth, J. van der Greef, *J. Chromatogr. B* 574 (1992) 327.
- [11] A. Gavenda, J. Sevcik, J. Psotova, P. Bednar, P. Bartak, P. Adamovsky, V. Simanek, *Electrophor.* 22 (2001) 2782.
- [12] C. S. P. Sastry, J. Rao, *Talanta* 43 (1996) 1827.
- [13] A. Loren, C. Eliasson, M. Josefson, K. V. G. K. Murty, M. Käll, J. Abrahamsson, K. Abrahamsson, *J. Raman Spectrosc.* 32 (2001) 971.
- [14] O.S. Wolfbeis, M. Leiner, *Anal. Chim. Acta* 167 (1985) 203.
- [15] S. Madhuri, S. Suchitra, P. Aruna, T.G. Srinivasan, S. Ganesan, *Med. Sci. Res.* 27 (1999) 635.
- [16] H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, John Wiley, New York, (1989).
- [17] A.R. Muroski, K.S. Booksh, M.L. Myrick, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3534.

- [18] S. Li, J.C. Hamilton, P.J. Gemperline, *Anal. Chem.* 64 (1992) 599.
- [19] R. Bro, *Chemom. Intell. Lab. Sys.* 38 (1997) 149.
- [20] M. Esteban, C. Ariño, J. N. Díaz-Cruz, M. S. Díaz-Cruz, R. Tauler, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 49.
- [21] R. Bro, *J. Chemom.*, 10 (1996) 47.
- [22] H.L. Wu, M. Shibukawa, K. Oguma, *J. Chemom.* 12 (1998) 1.
- [23] J. Saurina, S. Hernandez-Cassou, R. Tauler, *Anal. Chim. Acta* 312 (1995) 189.
- [24] C.G. Zampronio, S.P. Gurden, L. A. B. Moraes, M. N. Eberlin, A.K. Smilde, R. J. Poppi, *Analyst*, 127 (2002) 1054.
- [25] J. Saurina, C. Leal, R. Compañó, M. Granados, R. Tauler, M. D. Prat, *Anal. Chim. Acta* 409 (2000) 237.
- [26] R. D. Jiji, G. G. Andersson, K. S. Booksh, *J. Chemom.* 14 (2000) 171.
- [27] R. D. Jiji, G. A. Cooper, K. S. Booksh, *Anal. Chim. Acta* 397 (1997) 72.
- [28] R. Bro., *Chemom. Intell. Lab. Sys.* 46 (1999) 133.
- [29] R. P. H. Nikolajsen, A. M. Hansen, *R. Bro. Luminescence* 16 (2001) 91.
- [30] A. M. de la Peña, A. E. Mansilla, D. G. Gómez, A. C. Olivieri, H. C. Goicoechea, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2640.
- [31] J. C.G. E. Silva, J. M.M. Leitão, F. S. Costa, J. L.A. Ribeiro, *Anal. Chim. Acta* 453 (2002) 105.
- [32] M. M. Reis, D. N. Biloti, M. M. C. Ferreira, F. B. T. Pessine, G. M. Teixeira, *Appl. Spectrosc.* 55 (2001) 7.

Capítulo 4 – Determinação de Riboflavina

- [1] J. M. Cooperman, R. Lopez, *The Vitamins*, (1989) p.288.
- [2] R. Bassette, D.Y.C. Fung, V.R. Mantha, *Crit. Rev. Food Sci.* 24 (1986) 1.
- [3] T. R. I.Cataldi, D. Nardiello, L. Scrano, A. Scopa, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 6643.
- [4] A. K. Su, C. H. Lin, *J. Chromatogr. B*, 785 (2003) 39.

- [5] W. J. Cheong, G. W. Kang, W. I. Lee, Y. S. Yoo, J. Liq. Chromatogr. R. T. 25 (2002) 1367.
- [6] N. L. Britton, K. L. Riter, R. L. Smallidge, J. Hillebrandt, J. AOAC I. 86 (2003) 197.
- [7] S. Albala-Hurtado, M. T. Veciana-Nogues, M. Izquierdo-Pulido, A. Marine-Font, J. Chromatogr. A, 778 (1997) 247.
- [8] L. Monferrer-Pons, M. E. Capella-Peiro, M. Gil-Agusti, J. Esteve-Romero, J. Chromatogr. A, 984 (2003) 23.
- [9] H. B. Li, F. Chen, Chromatographia 54 (2001) 270.
- [10] D. C. Woollard, H. E. Indyk, J. AOAC I. 85 (2002) 945.
- [11] D. Nardiello, S. A. Bufo, T. R. I. Cataldi, LC GC Eur.16 (2003) 30.
- [12] T. R. I. Cataldi, D. Nardiello, G. E. De Benedetto, S. A. Bufo, J. Chromatogr. A 968 (2002) 229.
- [13] U. Höller, C. Brodhag, A. Knöbel, P. Hofmann, V. Spitzer, J. Pharmac. Biomed. Anal., 31 (2003) 151.
- [14] R. Bro, Multiway analysis in the food industry: models, algorithms and applications, Doctoral Thesis, University of Amsterdam, (1998).
- [15] R. Bro, Parafac. Tutorial and applications. Chemom. Intell. Lab. Sys. 38 (1997) 149.
- [16] Nestlé. *Milk and Milk products*. Attinger S.A., Switzerland, (1980).

APÊNDICE

1A

1. APÊNDICE - 1A

PRODUTO DE KRONECKER¹



Leopold Kronecker

Nascimento: 07/12/1823 em Liegnitz, Prussia (atualmente Legnica, Polônia).

Falecido: 29/12/1891 em Berlin, Alemanha.

As primeiras contribuições de Leopold Kronecker foram à teoria das equações e na álgebra superior, mas suas maiores contribuições ocorreram nas funções elípticas, a teoria das equações algébricas e a teoria dos números algébricos. Além de um grande matemático, Kronecker exerceu um importante trabalho na parte de lógica dentro da filosofia da matemática, pois acreditava que os matemáticos só poderiam tratar com números e operações finitas, evitando desta forma, conclusões intuitivas em relação a números infinitos.

“God created the integers, all else is the work of man.”

Leopold Kronecker

Para expressar os modelos de Tucker³ de forma matricial, é necessária a introdução do conceito do operador de Kronecker. O produto de Kronecker, também conhecido como produto tensorial, indicado pelo símbolo “ $\otimes$ ”, foi proposto por Leopold Kronecker e caracteriza-se como um operador matricial binário, operando duas matrizes de dimensões arbitrárias em uma matriz de dimensão maior, com uma

estrutura especial de bloco. Dadas as matrizes $\mathbf{A}_{n \times m}$ de dimensões $n \times m$ e uma matriz $\mathbf{B}_{p \times q}$ de dimensões $p \times q$:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} a_{1,1} & \cdots & a_{1,m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{n,1} & \cdots & a_{n,m} \end{bmatrix}_{n \times m} \quad \mathbf{B} = \begin{bmatrix} b_{1,1} & \cdots & b_{1,q} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ b_{p,1} & \cdots & b_{p,q} \end{bmatrix}_{p \times q} \quad (1)$$

O produto de Kronecker, definido por $\mathbf{A} \otimes \mathbf{B}$, é a matriz $np \times mq$ com a estrutura de bloco dada por:

$$\mathbf{A} \otimes \mathbf{B} = \begin{bmatrix} a_{1,1}\mathbf{B} & \cdots & a_{1,m}\mathbf{B} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{n,1}\mathbf{B} & \cdots & a_{n,m}\mathbf{B} \end{bmatrix}_{np \times mq}$$

Para exemplificar, dadas duas matrizes $\mathbf{A}$ e $\mathbf{B}$:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 2 \\ 0 & -1 \end{bmatrix}_{2 \times 2} \quad \mathbf{B} = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 3 \\ 4 & 5 & 6 \end{bmatrix}_{2 \times 3}$$

então o produto de Kronecker para $\mathbf{A} \otimes \mathbf{B}$ será:

$$\mathbf{A} \otimes \mathbf{B} = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 3 & 2 & 4 & 6 \\ 4 & 5 & 6 & 8 & 10 & 12 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & -2 & -3 \\ 0 & 0 & 0 & -4 & -5 & -6 \end{bmatrix}_{4 \times 6}$$

Referência:

[1] Alexander Graham. *Kronecker Products and Matrix Calculus With Applications*. Halsted Press, John Wiley and Sons, New York, (1981).

APÊNDICE

2A

2. APÊNDICE - 2A

PRODUTO DE KHATRI-RAO²⁻⁴

O produto de Khatri-Rao foi proposto por C. G. Katri e C. R. Rao em 1968, ambos pertencentes ao *Indian Statistical Institute*, Calcutta – Índia. Assim como o operador de Kronecker, o operador de Khatri-Rao também é um operador matricial binário, representado pelo símbolo “ $\otimes$ ” ou “ $\odot$ ”, podendo vir a ser descrito como uma função seqüencial do produto de Kronecker. Para a representação matricial do modelo PARAFAC é necessário a utilização deste operador, de modo que a vantagem de se utilizar o operador de Khatri-Rao em relação ao operador de Kronecker é simplificação matemática, na multiplicação das matrizes de *loadings*.

Dada duas matrizes $\mathbf{A}_{i \times f}$ e $\mathbf{B}_{j \times f}$ com o mesmo número de colunas f e número de linhas arbitrário:

$$\mathbf{A} = (\mathbf{A}_1 \vdots \dots \vdots \mathbf{A}_f) \quad \text{e} \quad \mathbf{B} = (\mathbf{B}_1 \vdots \dots \vdots \mathbf{B}_f).$$

Uma nova matriz $\mathbf{C} = \mathbf{A} \otimes \mathbf{B}$ pode ser definida como:

$$\mathbf{A} \otimes \mathbf{B} = (\mathbf{A}_1 \otimes \mathbf{B}_1 \vdots \dots \vdots \mathbf{A}_f \otimes \mathbf{B}_f),$$

onde $\mathbf{A}_i \otimes \mathbf{B}_i$ é o produto de Kronecker de $\mathbf{A}_i$ e $\mathbf{B}_i$, descrito no Apêndice anterior.

Para exemplificarmos, tomadas duas matrizes $\mathbf{A}$ e $\mathbf{B}$ iguais a:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 2 \\ 3 & 4 \end{bmatrix} \quad \text{e} \quad \mathbf{B} = \begin{bmatrix} \alpha & \beta \\ \chi & -\delta \\ -\varepsilon & -\varphi \end{bmatrix},$$

então $\mathbf{C} = \mathbf{A} \otimes \mathbf{B}$ é descrito por:

$$\mathbf{C} = \begin{bmatrix} 1 \begin{bmatrix} \alpha \\ \chi \\ -\varepsilon \end{bmatrix} & 2 \begin{bmatrix} \beta \\ -\delta \\ -\phi \end{bmatrix} \\ 3 \begin{bmatrix} \alpha \\ \chi \\ -\varepsilon \end{bmatrix} & 4 \begin{bmatrix} \beta \\ -\delta \\ -\phi \end{bmatrix} \end{bmatrix},$$

ou:

$$\mathbf{C} = \begin{bmatrix} \alpha & 2\beta \\ \chi & 2\delta \\ -\varepsilon & 2\phi \\ 3\alpha & 4\beta \\ 3\chi & 4\delta \\ -3\phi & 4\phi \end{bmatrix}$$

Referências:

- [2] C. G. Katri, C. R. Rao, *Solutionsto to some functional equations and their applications to characterization of probability distribution*, Sankhiā – The Indian Journal of Statistical Series A 30 (1968) 167.
- [3] C. G. Katri, C. R. Rao. *Generalized inverse of matrices and its applications*, Wiley. New York (1968) p. 12
- [4] R. Bro, *Multiway analysis in the food industry: models, algorithms and applications*. Doctoral Thesis, University of Amsterdam, (1998).

APÊNDICE

3A

3. APÊNDICE - 3A

NORMA DE FROBENIUS⁵



Georg Ferdinand Frobenius

Nascimento: 1849 em Berlin, Alemanha.

Falecido: 1917 em Berlin.

Frobenius foi um matemático alemão que mostrou como construir séries matemáticas e foi um dos fundadores da teoria de grupo em álgebra. A norma de Frobenius, às vezes confundida com a norma Euclidiana (que é a norma específica para um vetor) é definida como a norma para uma matriz $\mathbf{A}_{n \times m}$ de dimensões $n \times m$, sendo a raiz quadrada da soma absoluta dos quadrados de seus elementos:

$$\|\mathbf{A}\|_F = \sqrt{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n |a_{ij}|^2},$$

ou podendo ser definida em relação ao traço da matriz:

$$\|\mathbf{A}\|_F = \sqrt{\text{tr}(\mathbf{A}\mathbf{A}^T)}$$

Exemplificando, dada uma matriz $\mathbf{A}_{m \times n}$:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 2 \\ 3 & 4 \end{bmatrix},$$

então a norma de Frobenius de $\mathbf{A}$ é definida por:

$$\|\mathbf{A}\|_F = \sqrt{\text{tr} \begin{pmatrix} 5 & 11 \\ 11 & 25 \end{pmatrix}} = \sqrt{\text{tr}(30)} = 5.4772$$

Referência:

[5] D. Hanselman, B. Littlefield. Matlab 5. Prentice Hall. (1997).

[6] <http://mathworld.wolfram.com/> (acessado em 10/julho/2003)