



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologia e Ciências
Instituto de Química

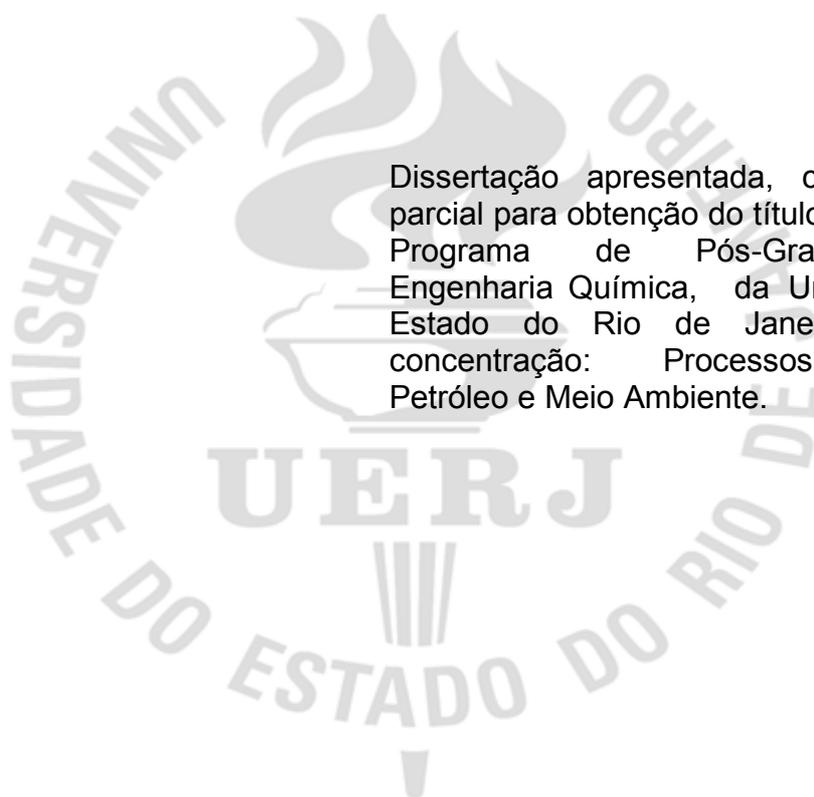
Jéssica da Silva Alves de Pinho

**Aplicações de métodos quimiométricos e de técnicas analíticas em
amostras alimentícias e farmacêuticas**

Rio de Janeiro
2012

Jéssica da Silva Alves Pinho

Aplicações de métodos quimiométricos e de técnicas analíticas em amostras alimentícias e farmacêuticas



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Aderval Severino Luna

Rio de Janeiro
2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

P654 Pinho, Jéssica da Silva Alves de.
Aplicações de métodos quimiométricos e de técnicas analíticas em amostras alimentícias e farmacêuticas / Jéssica da Silva Alves de Pinho. – 2012.
177 f.

Orientador: Aderval Severino Luna.
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Norfloxacino – Teses. 2. Quimiometria – Teses. 3. Urina - Teses. 4. Óleo de soja – Teses. 5. Óleos – Classificação. I. Luna, Aderval Severino. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU 614.35

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Jéssica da Silva Alves de Pinho

Aplicações de métodos quimiométricos e de técnicas analíticas em amostras alimentícias e farmacêuticas

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2012.

Banca Examinadora:

Professor Dr. Aderval Severino Luna (Orientador)
Instituto de Química-UERJ

Professora Dr^a. Cristiane Assumpção Henriques.
Instituto de Química-UERJ

Professora Dr^a. Deborah Vargas Cesar
Instituto de Química-UERJ

Dr. Werickson Fortunato de Carvalho Rocha
INMETRO/Diretoria de Metrologia científica e industrial

Rio de Janeiro
2012

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe, minha maior incentivadora sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades que tive até hoje e pelas que ainda terei.

Agradeço a minha mãe, a pessoa que mais me apóia e incentiva sempre. Agradeço também aos meus padrinhos, Manoel Cardeal Filho e Terezinha de Fátima Silva Cardeal, pelo apóio e por terem contribuído para minha educação.

Agradeço ao meu orientador Aderval Severino Luna, que me ensinou muito do que aprendi na faculdade, mas também que me ensinou muitas coisas além disso.

Agradeço aos amigos do laboratório pela ajuda, principalmente a Igor Campos de Almeida Lima pela ajuda durante o mestrado e também pela amizade nos momentos em que mais precisei. Agradeço também a Lívia Monteiro, Ruan Campos, Diego Barros e Camila Barros pela ajuda no laboratório e pela companhia. Agradeço ao Arnaldo Peixoto pelas análises dos óleos no FT – MIR. Agradeço também a Ana Paula Lamounier por ter me ensinado a operar o HPLC. Agradeço também as pessoas que me cederam amostras de urina para o meu trabalho. Agradeço aos amigos de um modo geral pela minha ausência em alguns eventos em virtude do mestrado.

Enfim agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

RESUMO

PINHO, Jéssica da Silva Alves. *Aplicações de métodos quimiométricos e de técnicas analíticas em amostras alimentícias e farmacêuticas*. 2012. 177 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Esse trabalho compreende dois diferentes estudos de caso: o primeiro foi a respeito de um medicamento para o qual foi desenvolvida uma metodologia para determinar norfloxacino (NOR) por espectrofluorimetria molecular e validação por HPLC. Primeiramente, foi desenvolvida uma metodologia por espectrofluorimetria onde foram feitos alguns testes preliminares a fim de estabelecer qual valor de pH iria fornecer a maior intensidade de emissão. Após fixar o pH, foi feita a determinação de NOR em padrões aquosos e soluções do medicamento usando calibração univariada. A faixa de concentração trabalhada foi de 0–500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. O limite de detecção para o medicamento foi de 6,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$ enquanto que o de quantificação foi de 24,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Além dessas, outras figuras de mérito também foram estimadas para desenvolvimento da metodologia e obtiveram resultados muito satisfatórios, como por exemplo, os testes de recuperação no qual a recuperação do analito foi de 99.5 a 103.8%. Para identificação e quantificação do NOR da urina foi necessário diluir a amostra de urina (estudada em dois diferentes níveis de diluição: 500 e 1000 x) e também uso do método da adição de padrão (na mesma faixa de concentração usada para medicamento). Após a aquisição do espectro, todos foram usados para construção do tensor que seria usado no PARAFAC. Foi possível estimar as figuras de mérito como limite de detecção de 11.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 8.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (diluição de 500 e 1000 x respectivamente) e limite de quantificação de 34 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 25.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (diluição de 500 x e 1000 x respectivamente).

O segundo estudo de caso foi na área alimentícia no qual se usou espectroscopia NIR e FT – MIR acopladas a quimiometria para discriminar óleo de soja transgênica e não transgênica. Os espectros dos óleos não mostraram diferença significativa em termos visuais, sendo necessário usar ferramentas quimiométricas capazes de fazer essa distinção. Tanto para espectroscopia NIR quanto FT – MIR foi feito o PCA a fim de identificar amostras discrepantes e que influenciariam o modelo de forma

negativa. Após efetuar o PCA, foram usadas três diferentes técnicas para discriminar os óleos: SIMCA, SVM-DA e PLS-DA, sendo que para cada técnica foram usados também diferentes pré processamento. No NIR, apenas para um pré processamento se obteve resultados satisfatórios nas três técnicas, enquanto que para FT-MIR ao se usar PLS-DA se obteve 100% de acerto na classificação para todos os pré processamentos.

Palavras – chave: Norfloxacino. PARAF. Urina. Óleo de soja. Classificação. SIMCA. PLS – DA. SVM - DA

ABSTRACT

This paper comprises two different researches: the first one was related to a medicament for which was developed a methodology to quantify Norfloxacin (NOR) by molecular spectrofluorimetry and validation by HPLC. First of all, was developed a methodology for spectrofluorimetry where were done some preliminary tests to establish which value of pH would provide the highest emission intensity. After fix pH, it was performed NOR determination in aqueous standard and medicament using univariate calibration. The concentration range was 0-500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. The limit of detection for medicament was 6,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$ while the limit of detection was 24,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Beyond that, other figures of merit were also estimated for developing methodology and offered results quite satisfactory, such as recovering tests in which analyte recovery was 99.5 - 103.8%. For identify and quantify NOR in urine was necessary to dilute the samples (studied in two different levels: 500 and 1000 X) and also standar method addition (in same concentration range used for medicament). After spectra acquisition, all of them were used to built the tensor that would be used in PARAFAC. It was possible to estimate figures of merit such as limit of detection: 11.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 8.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (dilution of 500 and 1000 X respectively) and limit of quantification: 34 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 25.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (dilution of 500 and 1000 X, respectively).

The second studied case was in food area in which was used NIR and FT-MIR spectroscopy coupled with chemometric to discriminate transgenic and no transgenic soybean oil. Oils spectra did not show significative difference in visual terms, being necessary using chemometric tools capable of perform this distinction. For NIR and FT-MIR spectroscopy it was performed PCA that aimed identify anomalous samples that would be a negative influence. After perform PCA were used three different techniques to discriminate oils samples: SIMCA, SVM-DA and PLS-DA, being used for each technique different preprocessing. In NIR, only for one preprocessing it was obtained good results for three techniques while in FT-MIR when PLS-DA was used it was achieved 100% in classification for all preprocessing.

Keywords: Norfloxacin. PARAFAC.Urine. Soybeanoil. Classification. SIMCA. PLS-DA. SVM-DA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação do estado fundamental e dos estados excitados singleto e tripleto	24
Figura 2:	Diagrama parcial de níveis de energia para um sistema fotoluminescente	25
Figura 3:	Esquema de funcionamento de um espectrofluorímetro	30
Figura 4:	Regiões do espectro eletromagnético	31
Figura 5:	Regiões do infravermelho	32
Figura 6:	Diagrama de energia potencial para os osciladores harmônico (A) e anarmônico (B)	33
Figura 7:	Tipos de vibrações moleculares. (+) - vibração para fora do plano; (-) – vibração para dentro do plano de uma molécula triatômica	35
Figura 8:	Componentes básicos de um equipamento que opera na região do infravermelho	37
Figura 9:	Modos de medida em espectroscopia NIR	38
Figura 10:	Diagrama de blocos com os componentes de um sistema para a CLAE.	42
Figura 11:	Uso da centralização na média em espectros NIR	44
Figura 12:	Aplicação do MSC em espectros NIR	45
Figura 13:	Aplicação da primeira derivada	47
Figura 14:	Matrizes do PCA	49
Figura 15:	Modelo SIMCA	51
Figura 16:	Esquema de classificação por meio do SVM	52
Figura 17:	Exemplo de classificação usando PLS – DA	54
Figura 18:	Esquema representativo da calibração multivariada	61
Figura 19:	Representação geométrica da propriedade de ortogonalidade do NAS	62
Figura 20:	Representação geométrica do modelo PARAFAC - decomposição de um arranjo de dados tridimensionais em F tríades de vetores peso	66
Figura 21:	Estrutura do ácido nalidíxico (PEREIRA, 2009)	69
Figura 22:	Estrutura do Norfloxacino	72

Figura 23:	Protonação/Desprotonação das fluorquinolonas (<i>acid</i> corresponde a meio ácido)	73
Figura 24:	Influência do pH no espectro do NOR	82
Figura 25:	Espectros das soluções de NOR (pH = 6)	83
Figura 26:	Curva analítica do padrão de NOR	84
Figura 27:	Resíduos para padrão de NOR por espectrofluorescência	84
Figura 28:	Cromatograma de uma amostra de padrão de NOR de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.	85
Figura 29:	Área do pico X concentração de NOR	86
Figura 30:	Resíduos para padrão de NOR por HPLC	86
Figura 31:	Concentração estimada X concentração predita de NOR no Medicamento	89
Figura 32:	Cromatograma de uma amostra contendo 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de medicamento contendo NOR	95
Figura 33:	Curva analítica medicamento	95
Figura 34:	Resíduos para predição de medicamento por HPLC	96
Figura 35:	Concentração predita X concentração medida pra o medicamento por HPLC	96
Figura 36:	(a) Superfície da urina diluída 500 X (b) Superfície da urina diluída 1000 X (sem cortes)	104
Figura 37:	(a) Superfície sem espalhamento da urina diluída 500 X (b) Superfície sem espalhamento da urina diluída 1000 x	104
Figura 38:	Representação da superfície de emissão-excitação para a amostra de urina diluída 500 X enriquecida com 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de padrão de NOR	105
Figura 39:	Representação da superfície de emissão-excitação para a amostra da urina diluída 1000 X enriquecida com 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de padrão de NOR	105
Figura 40:	(a) Representação da superfície sem espalhamentos de emissão-excitação para a amostra da urina diluída 500 X enriquecida com 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de padrão de NOR (b) Representação da superfície sem espalhamentos de emissão-excitação para a amostra de urina diluída 1000 X enriquecida com 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de padrão de NOR	106

Figura 41:	Loadings de excitação PARAFAC	108
Figura 42:	Sobreposição dos <i>Loadings</i> de excitação obtidos pelo PARAFAC	108
Figura 43:	<i>Loadings</i> para emissão	109
Figura 44:	Sobreposição de espectros de emissão do NOR	109
Figura 45:	Concentração x Scores PARAFAC para urina diluída 500 X	110
Figura 46:	Resíduos x Scores para urina diluída 500 X	110
Figura 47:	Concentração x Scores PARAFAC para urina diluída 1000 X	111
Figura 48:	Resíduos para urina diluída 1000 X.	111
Figura 49:	Cromatograma da solução do branco (diluição 1000 X)	114
Figura 50:	Cromatograma de uma solução de urina diluída 1000 X enriquecida com 15 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de padrão de NOR.	114
Figura 51:	Curva analítica para diluição de 500 X	115
Figura 52:	Resíduos para urina diluída 500 X para HPLC	116
Figura 53:	Curva analítica para diluição de 1000 X da amostra de urina	116
Figura 54:	Resíduos para urina diluída 500 X para HPLC	117
Figura 55:	Esquema da reação de formação do óleo vegetal	122
Figura 56:	Espectros das amostras de óleo de soja não transgênica	129
Figura 57:	Espectros (recortados) dos óleos de soja não transgênica	130
Figura 58:	Espectro de amostra de óleo de soja não transgênica (SNT) e transgênica (STR)	130
Figura 59:	Espectro de amostra de óleo de soja não transgênica (azul) e óleo de soja transgênica (verde)	131
Figura 60:	RMSECV para soja não transgênica.	132
Figura 61:	Q Residuals X Hotelling T^2 para modelo de soja não Transgênica	133
Figura 62:	Scores PC2 X Scores PC1 para modelo de óleo de soja não Transgênica	133
Figura 63:	RMSECV sem amostra 30	134
Figura 64:	Q Residuals x Hotelling T^2 para modelo sem amostra 30	135
Figura 65:	Scores PC2 X Scores PC1 para modelo de soja não transgênica se amostra 30	135
Figura 66:	RMSECV para soja transgênica	136

Figura 67:	Q Residuals X Hotelling T^2 para modelo de soja transgênica	136
Figura 68:	Scores PC2 X Scores PC1 para soja transgênica	137
Figura 69:	Classificação teórica (SNT: Soja não transgênica; STR: Soja transgênica)	138
Figura 70:	(a) Classificação obtida ao se usar MC (b) Classificação obtida ao se usar MC + MSC (c) Classificação obtida ao se usar MC + 1ª Der (d) Classificação obtida ao se usar MC + 2ª Der	139
Figura 71:	(a) Classificação obtida com MC (b) Classificação obtida com MC + MSC (c) Classificação obtida com MC + OSC	140
Figura 72:	(a) Classificação usando MC + 1ª Der (b) Classificação usando MC + 2ª Der	141
Figura 73:	(a) Classificação usando MC (b) Classificação usando MC + MSC	142
Figura 74:	(a) classificação usando MC + OSC (b) classificação usando MC + 1ª Der (c) Classificação usando MC + 2ª Der	143
Figura 75:	Espectro de uma amostra de óleo de soja não transgênica	144
Figura 76:	(a) Bandas de absorção (região I) do MIR para uma amostra de óleo de soja não transgênica (b) Bandas de absorção (região II) do MIR para uma amostra de óleo de soja não transgênica	145
Figura 77:	(a) Espectro de uma amostra de óleo de soja não transgênica e amostra de óleo de soja transgênica (b) Zoom dos espectros de óleo de soja não transgênica e transgênica.	146
Figura 78:	Espectros de amostra de soja não transgênica (SNT) e transgênica (STR)	146
Figura 79:	Valores de RMSECV para soja transgênica (MIR)	147
Figura 80:	Q Residuals X Hotelling T^2 para soja não transgênica por FT – MIR	148
Figura 81:	Scores PC2 X Scores PC1 para soja não transgênica por FT – MIR	148
Figura 82:	Valores de RMSECV para soja transgênica por FT – MIR	149
Figura 83:	Q Residuals X Hotelling T^2 para soja transgênica por FT – MIR	150
Figura 84:	Scores PC2 X Scores PC1 para soja transgênica por FT – MIR	150
Figura 85:	Valores de RMSECV para modelo sem amostra 30	151

Figura 86:	Q Residuals X Hotelling T^2 para soja não transgênica sem amostra 30 por FT – MIR	152
Figura 87:	Scores PC2 X Scores PC1 para soja transgênica sem amostra 30 por FT – MIR	152
Figura 88:	Classificação esperada (SNT: soja não transgênica; STR – soja transgênica)	153
Figura 89:	(a) Classificação obtida ao se usar MC (b) Classificação obtida ao se usar MC + MSC	154
Figura 90:	(a) Classificação obtida ao se usar MC + 1ª Der (b) Classificação obtida ao se usar MC + 2ª Der	154
Figura 91:	Classificação obtida usando SVM– DA (MC, MC + MSC, MC + OSC)	156
Figura 92:	(a) Classificação obtida usando MC + 1ª Der (b) Classificação obtida usando MC + 2ª Der	156
Figura 93:	Classificação obtida PLS – DA	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Regiões espectrais do IR	32
Tabela 2:	Gerações das quinolonas.	71
Tabela 3:	Preparo dos tampões	78
Tabela 4:	Preparo das soluções contendo urina como matriz.	80
Tabela 5:	Dados do medicamento obtidos por espectrofluorescência	88
Tabela 6:	Fator de diluição das concentrações de medicamento.	90
Tabela 7:	Cálculo do teor de NOR no medicamento	91
Tabela 8:	Dados de precisão do método	92
Tabela 9:	Dados de precisão intermediária do método	93
Tabela 10:	Dados do estudo da recuperação.	94
Tabela 11:	Fator de diluição para as concentrações de medicamento para HPLC	95
Tabela 12:	Cálculo do teor de NOR no medicamento	98
Tabela 13:	Precisão para HPLC	99
Tabela 14:	Precisão Intermediária para HPLC	100
Tabela 15:	Soluções preparadas para HPLC para testes de exatidão	101

Tabela 16:	Dados de recuperação para HPLC	101
Tabela 17:	Número de componentes obtidos pelo modelo PARAFAC	107
Tabela 18:	Dados do modelo PARAFAC obtido para quantificar NOR em urina	112
Tabela 19:	Figuras de Mérito PARAFAC	113
Tabela 20:	Resultados para análise de NOR em urina por HPLC	117
Tabela 21:	Resultados precisão para HPLC	118
Tabela 22:	Características físico-químicas do óleo de soja	124
Tabela 23:	Composição de ácidos graxos de soja	124
Tabela 24:	Modelo para três componentes principais para modelo de soja não transgênica.	132
Tabela 25:	Modelo para três componentes principais sem amostra 30 para modelo de soja não transgênica	134
Tabela 26:	Modelo para três componentes principais para modelo de soja transgênica.	137
Tabela 27:	Porcentagem de acertos da classificação SIMCA por NIR	140
Tabela 28:	Índice de acertos na classificação SVM – DA por NIR.	141
Tabela 29:	Índice de acertos na classificação por PLS – DA por NIR	143
Tabela 30:	Porcentagem de acertos para classificação de óleos por NIR	144
Tabela 31:	Modelo do PCA para soja não transgênica.	147
Tabela 32:	Modelo do PCA para soja transgênica por FT – MIR	149
Tabela 33:	Modelo PCA sem amostra 30 por FT – MIR	151
Tabela 34:	Índice de acertos no modelamento de classes usado SIMCA para FT – MIR	155
Tabela 35:	Índice de acerto na classificação SVM – DA para FT – MIR	157
Tabela 36:	Índice de Acerto na classificação usando PLS – DA para FT – MIR	158
Tabela 37:	Porcentagem de acerto na classificação FT – MIR para óleos	158

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1ª Der	Primeira derivada
2ª Der	Segunda derivada
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS	<i>American Oil Chemist's Society</i>
CC	Core Consistency
CI	Cruzamento Interno
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLS	Mínimos Quadrados Clássicos (<i>Classic Least Squares</i>)
CSI	Cruzamento Intersistemas
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EPSPS	Enolpiruvato – chiquimato – fosfato – sintase (<i>enolpiruvate shiquimate synthase</i>)
FD	Fator de Diluição
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT–MIR	Transformada de Fourier – Infravermelho Médio (<i>Fourier Transform – Mid Infrared</i>)
GC	Cromatografia Gasosa (<i>Gas cromathography</i>)
GSAM	Método da Adição de Padrão Generalizado (<i>Generalized Standard addition method</i>)
HCA	Análise Hierárquica de Agrupamentos (<i>Hierarchical cluster analysis</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance (<i>High performance liquid cromathography</i>)
HPLC–DAD	Cromatografia Líquida de Alta performance com Detector de Arranjo de diodos (<i>High performance liquid cromathography - Diode Array Detector</i>)
ICP–MS	Espectrometria de Massa por Plasma Indutivamente Acoplado (<i>Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry</i>)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IR	Infravermelho (<i>Infrared</i>)
KS	Kennard Stone
LD	Limite de Detecção
LDA	Análise Linear Discriminante (<i>Linear Discriminant Analysis</i>)

LQ	Limite de Quantificação
MC	Centralização na Média (<i>Mean centering</i>)
MIR	Infravermelho Médio (<i>Mid Infrared</i>)
MSC	Correção do Sinal Multiplicativo (<i>Multiplicative Scatter Correction</i>)
NAS	Sinal Analítico Líquido (<i>Net analyte Signal</i>)
NIR	Infravermelho Próximo (<i>Near Infrared</i>)
NIRS	Espectroscopia de Infravermelho Próximo (<i>Near Infrared Spectroscopy</i>)
NOR	Norfloxacino
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
OSC	Correção do Sinal Ortogonal (<i>Orthogonal Signal Correction</i>)
PARAFAC	Análise dos Fatores Paralelos (<i>Parallel Factor Analysis</i>)
PC	Componente Principal (<i>Principal Component</i>)
PCA	Análise do Componente Principal (<i>Principal Component Analysis</i>)
PLS	Regressão dos Mínimos Quadrados Parciais (<i>Partial Least Squares</i>)
PLS-DA	Regressão dos Mínimos Quadrados Parciais – Análise Discriminante (<i>Partial Least Squares – Discriminant Analysis</i>)
RMSECV	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Validação Cruzada (<i>Root mean square error of cross validation</i>)
RMSEP	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Predição (<i>Root mean square error of prediction</i>)
RP	Fase Reversa (<i>Reverse Phase</i>)
RSD	Desvio Padrão Residual (<i>residual standard deviation</i>)
RV	Relaxamento Vibracional
SIMCA	Modelagem Independente Flexível por Analogia de Classes (<i>Soft Independent Modeling by Class Analogy</i>)
SOSAM	Método da Adição de Padrão de Segunda Ordem (<i>Second Order Standard Addition Method</i>)
SNT	Soja Não Transgênica
STR	Soja Transgênica
SVM-DA	Vetor Máquina Suporte - Análise Discriminante (<i>Support Vector machine – discriminant analysis</i>)
USP	Farmacopéia dos Estados Unidos (<i>United States Pharmacopeia</i>)
UV-VIS	Ultra Violeta Visível

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
1. TÉCNICAS INSTRUMENTAIS	24
1.1. Luminescência molecular	24
1.1.1. <u>Fluorescência molecular</u>	26
1.1.2. <u>Fluoróforos</u>	27
1.1.3. <u>Fatores que afetam a fluorescência</u>	27
1.1.3.1. Rendimento quântico	27
1.1.3.2. Temperatura	28
1.1.3.3. Polaridade do solvente	28
1.1.3.4. Viscosidade e pH	28
1.1.3.5. Atenuação da fluorescência	29
1.1.4. <u>Instrumentação para fluorescência</u>	29
1.2. Espectroscopia de infravermelho	32
1.2.1. <u>Variações no momento dipolo</u>	33
1.2.2. <u>Transições rotacionais</u>	34
1.2.3. <u>Transições rotacionais – vibracionais</u>	34
1.2.4. <u>Tipos de transições moleculares</u>	35
1.2.5. <u>Acoplamento vibracional</u>	35
1.2.6. <u>Espectroscopia no infravermelho médio (MIR)</u>	36
1.2.7. <u>Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)</u>	37
1.2.8. <u>Instrumentação para NIR e MIR</u>	37
1.2.8.1. Espectrofotômetros dispersivos	38
1.2.8.2. Espectrofotômetros com transformada de Fourier	39
1.2.8.3. Medidas por transmitância	39
1.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	40
1.3.1. <u>Instrumentação para cromatografia</u>	41
2. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	43
2.1. Quimiometria	43
2.2. Pré processamento dos dados	44
2.2.1. <u>Centralização na média (MC)</u>	44
2.2.2. <u>Correção do sinal multiplicativo (MSC)</u>	45
2.2.3 <u>Correção do sinal ortogonal (OSC)</u>	46

2.2.4 <u>Derivação</u>	46
2.3. Aprendizagem não supervisionada	47
2.3.1. <u>Análise de componentes principais (PCA)</u>	48
2.4. Aprendizagem supervisionada	50
2.4.1. <u>Modelagem Independente Flexível por Analogia de Classes</u>	51
2.4.2. <u>Máquina de vetor de suporte</u>	52
2.4.3. <u>Regressão dos Mínimos Quadrados Parciais</u>	53
2.5. Algoritmo de Kennard Stone	54
2.6. Métodos de calibração	55
2.6.1. <u>Calibração univariada</u>	56
2.6.1.1. Figuras de Mérito para calibração univariada	57
2.6.1.1.1. Coeficiente de correlação e determinação	57
2.6.1.1.2. Linearidade	58
2.6.1.1.3. Precisão	59
2.6.1.1.4. Exatidão	60
2.6.1.1.5. Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	60
2.6.1.1.6. Robustez	60
2.6.2. <u>Calibração multivariada</u>	61
2.6.2.1. Figuras de Mérito para calibração multivariada	62
2.6.2.1.1. Sinal Analítico Líquido	62
2.6.2.1.2. Sensibilidade	63
2.6.2.1.3. Seletividade	63
2.6.2.1.4. Sensibilidade Analítica	64
2.6.2.1.5. Exatidão e Robustez	64
2.6.2.1.6. Precisão	65
2.6.2.2. Análise dos Fatores Paralelos (PARAFAC)	65
2.6.2.3. Adição de Padrão de Segunda Ordem	67
3. DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE NORFLOXACINO EM MEDICAMENTOS E FLUÍDOS BIOLÓGICOS (URINA) POR FLUORESCÊNCIA MOLECULAR E HPLC	69
3.1. Quinolonas e fluorquinolonas	69
3.1.1. <u>Norfloxacino</u>	72
3.1.2. <u>Metodologias utilizadas para determinação de norfloxacino</u>	73
3.2. Objetivos do capítulo	76

3.3. Materiais e métodos	76
3.3.1. <u>Materiais e métodos para quantificação de Norfloxacino por espectrofluorescência</u>	76
3.3.2. <u>Materiais e métodos para quantificação de Norfloxacino por HPLC</u>	77
3.4. Procedimento experimental	77
3.4.1. <u>Testes Preliminares para quantificação de Norfloxacino em padrão aquoso por espectrofluorescência</u>	77
3.4.2. <u>Quantificação de Norfloxacino em padrão aquoso</u>	78
3.4.2.1. Por espectrofluorescência	78
3.4.2.2. Por HPLC	79
3.4.3. <u>Quantificação de Norfloxacino em medicamento</u>	79
3.4.3.1. Por espectrofluorescência molecular	79
3.4.3.2. Por HPLC	79
3.4.4. <u>Quantificação de Norfloxacino em urina</u>	80
3.4.4.1. Por espectrofluorescência	80
3.4.4.2. Por HPLC	81
3.5. Resultados e discussões	81
3.5.1. <u>Testes preliminares para quantificação de Norfloxacino por espectrofluorescência</u>	81
3.5.2. <u>Quantificação de Norfloxacino em padrão aquoso</u>	82
3.5.2.1. Por espectrofluorescência	82
3.5.2.2. Por HPLC	85
3.5.3. <u>Quantificação de Norfloxacina em medicamento</u>	87
3.5.3.1. Por espectrofluorescência	87
3.5.3.2. Figuras de Mérito para espectrofluorescência	92
3.5.3.2.1. Linearidade	92
3.5.3.2.2. Precisão	92
3.5.3.2.3. Precisão Intermediária	92
3.5.3.2.4. Robustez	93
3.5.3.2.5. Exatidão	93
3.5.3.3. Para HPLC	94
3.5.3.4. Figuras de mérito para HPLC	99
3.5.3.4.1. Linearidade	99

3.5.3.4.2. Precisão	99
3.5.3.4.3. Precisão Intermediária	99
3.5.3.4.4. Exatidão	100
3.5.3.4.5. Robustez	101
3.5.4. <u>Comparação entre as técnicas utilizadas para a quantificação de Norfloxacin</u> <u>em medicamento</u>	102
3.5.5. <u>Quantificação de Norfloxacin</u> <u>em urina</u>	103
3.5.5.1. Por espectrofluorescência molecular	103
3.5.5.2. Por HPLC	113
3.5.6. <u>Comparação entre as técnicas utilizadas para a determinação</u> <u>de Norfloxacin</u> <u>em urina</u>	118
3.6. Conclusões do capítulo	119
4. CLASSIFICAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA EM TRANSGÊNICO E NÃO TRANSGÊNICO POR ESPECTROSCOPIA NIR E FTR - MIR ASSOCIADA A MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	121
4.1. Óleos vegetais	121
4.1.1. <u>Óleo de soja</u>	122
4.1.2. <u>Soja transgênica</u>	124
4.1.3. <u>Metodologias para análise de óleos vegetais</u>	126
4.2. Objetivos do capítulo	127
4.3. Experimental	128
4.3.1. <u>Análise de óleos vegetais usando NIR</u>	128
4.3.2. <u>Análise de óleos vegetais usando FT – MIR</u>	128
4.4. Resultados e Discussões	128
4.4.1. <u>Resultados para NIR</u>	128
4.4.1.1. Análise exploratória dos dados (PCA)	131
4.4.1.2. SIMCA	138
4.4.1.3. SVM - DA	140
4.4.1.4. PLS - DA	142
4.4.2. <u>Resultados para FTR - MIR</u>	144
4.4.2.1. Análise não supervisionada obtida pelo PCA	147
4.4.2.2. Análise supervisionada obtido pelo método SIMCA	153
4.4.2.3. SVM - DA	155
4.4.2.4. PLS - DA	157

4.5. Conclusões Gerais do Capítulo	159
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	160
6. SUGESTÕES	161
REFERÊNCIAS	162
ANEXO A	175
ANEXO B	177

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Atualmente, há um interesse crescente por parte das indústrias alimentícia e farmacêutica no controle de qualidade, sendo necessário recorrer a diferentes ferramentas analíticas e muitas vezes quimiométricas para tal. No que diz respeito a medicamentos, de um modo geral, há o risco de falsificação do mesmo, o que acarreta em produtos potencialmente perigosos para população, que consome determinados tipos de medicamento de forma indiscriminada. Dessa forma há uma necessidade cada vez maior de desenvolver metodologias confiáveis e que ofereçam resultados precisos, para identificação do princípio ativo em medicamentos. Já no tocante a alimentos, com o avanço da engenharia genética, há uma preocupação muito grande por parte do consumidor e até mesmo certa desconfiança com relação ao consumo de alimentos transgênicos. Também se levando em consideração que há uma obrigatoriedade por parte dos fabricantes em identificar seus produtos como sendo transgênico ou não, há a necessidade de desenvolver metodologias confiáveis que sejam capazes de fazer a discriminação de um alimento como sendo ou não transgênico.

Dessa forma, o presente trabalho foi dividido em dois estudos de casos, um voltado para indústria farmacêutica e outro para a indústria alimentícia. Sendo que no primeiro estudo de caso, o objetivo foi desenvolver uma metodologia capaz de identificar e quantificar o norfloxacino em amostras do medicamento e em urina humana por meio da espectrofluorescência molecular seguido da validação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência.

Já no segundo estudo de caso, o objetivo foi desenvolver uma metodologia capaz de discriminar o óleo de soja em não transgênica e transgênica, por meio da espectroscopia de infravermelho médio por transformada de Fourier (FT – MIR) e infravermelho próximo (NIR) associada a ferramentas quimiométricas de classificação, tais como: Modelagem Independente por Analogia de Classes (SIMCA), Máquina de Vetor de Suporte – Análise Discriminante (SVM – DA) e Regressão dos Mínimos Quadrados Parciais – Análise Discriminante (PLS – DA).

1. TÉCNICAS INSTRUMENTAIS

1.1. Luminescência molecular

A espectroscopia de luminescência é uma ferramenta analítica extremamente sensível e tem sido amplamente aplicada na resolução de problemas que requerem baixos limites de detecção, podendo ser facilmente encontrados na literatura muitos trabalhos mostrando análises ao nível de traços. (SOTOMAYOR, 2008)

A luminescência molecular é a emissão de radiação eletromagnética (na região do ultravioleta, próximo-visível) proveniente de moléculas que foram excitadas, retornando ao seu estado fundamental (**Figura 1**). (COELHO, 2004)



Figura 1: Representação do estado fundamental e dos estados excitados singleto e tripleto (COELHO, 2004)

Divide-se a luminescência molecular em fluorescência e fosforescência em função da natureza do estado excitado envolvido no processo. (COELHO, 2004)

Se este estado envolvido for o singleto, no qual o spin do elétron no orbital excitado conserva sua orientação original, tem-se a fluorescência, mas, se a orientação do spin o elétron é invertida, tem-se então a fosforescência (estado tripleto). Na fluorescência, em função da orientação original do spin do elétron ser mantida, o retorno do estado excitado para o fundamental é permitido e ocorre rapidamente. (COELHO, 2004)

A **Figura 2** é um diagrama parcial de níveis de energia, chamado de *diagrama de Jablonski*, para uma molécula fotoluminescente típica. A linha horizontal mais espessa, na parte inferior do diagrama, representa a energia do estado fundamental da molécula, que é normalmente um estado singleto, e é denominada de S_0 . À

temperatura ambiente, esse estado representa as energias da maioria das moléculas em solução. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

As linhas mais espessas na parte superior são os níveis de energia para os estados fundamentais vibracionais de três estados eletrônicos excitados. As duas linhas à esquerda representam o primeiro (S_1) e o segundo (S_n) estados eletrônicos singleto. A linha à direita (T_1) representa energia do primeiro estado eletrônico tripleto. Como normalmente ocorre, a energia do primeiro estado excitado tripleto é mais baixa que a energia do correspondente estado singleto. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

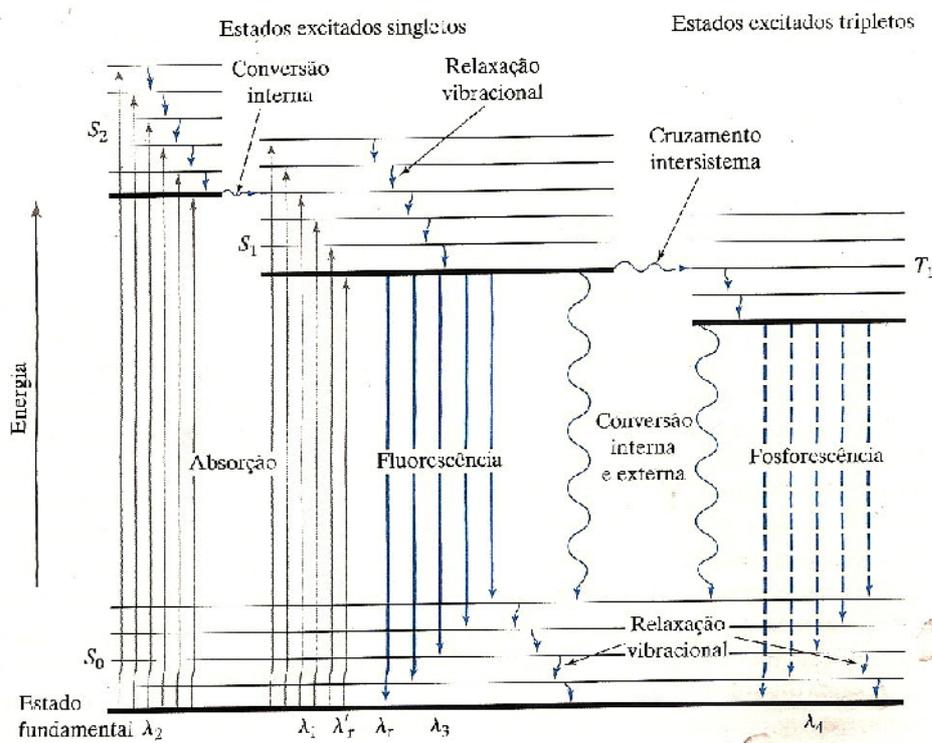


Figura 2: Diagrama parcial de níveis de energia para um sistema fotoluminescente (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

Numerosos níveis de energia vibracional estão associados a cada um dos quatro estados eletrônicos, conforme sugerido pelas linhas horizontais mais estreitas na Figura 2. Como mostrado na mesma, as transições de absorção podem ocorrer do estado eletrônico fundamental singleto (S_0) para vários níveis vibracionais dos estados eletrônicos excitados singleto (S_1 e S_2). A transição para o estado tripleto não é mostrada, uma vez que essa transição envolve uma mudança na multiplicidade, há uma probabilidade muito pequena da sua ocorrência. Uma

transição de baixa probabilidade desse tipo é chamada de *transição proibida*. As moléculas excitadas para os estados eletrônicos S_1 e S_2 perdem rapidamente qualquer excesso de energia vibracional e relaxam para o nível vibracional fundamental daquele estado eletrônico. Esse processo não radiante é denominado de *relaxação vibracional* (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A conversão interna é uma transição entre dois estados de mesma multiplicidade (singleto-singleto ou tripleto-tripletto). É particularmente eficiente quando dois níveis eletrônicos de energia estão suficientemente próximos para que ocorra uma superposição nos níveis de energia vibracionais. A conversão interna também pode ocorrer entre o estado S_1 e o estado eletrônico fundamental S_0 . A conversão interna através de níveis vibracionais superpostos é geralmente mais provável que a perda de energia por fluorescência, a partir de um estado excitado mais alto. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

A desativação de um estado eletrônico excitado pode envolver interação e transferência de energia entre a molécula excitada e o solvente ou outros solutos. Esse processo é chamado de conversão externa. A evidência para a conversão externa inclui um forte efeito exercido pelo solvente na intensidade de fluorescência da maioria das espécies. Além disso, as condições que tendem a reduzir o número de colisões entre partículas (baixa temperatura e alta viscosidade) geralmente levam a um aumento da fluorescência. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

O *cruzamento intersistema* é um processo no qual há uma conversão entre estados eletrônicos de diferentes multiplicidades. O processo mais comum é do estado singleto para o estado tripleto ($S_1 \rightarrow T_1$). Assim como na conversão interna, a probabilidade de ocorrer um cruzamento intersistema aumenta se os níveis vibracionais dos dois estados se superpõem. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

1.1.1. Fluorescência molecular

Tanto a fluorescência como a fosforescência recebem a denominação generalista de fotoluminescência. A diferença entre estes dois fenômenos pode ser vista no intervalo de tempo entre a captação do fóton e a emissão da energia captada. Na fluorescência esse tempo é muito curto ($< 10^{-5}$ podendo ser até 10^{-12} s), já na fosforescência esse tempo é maior chegando a segundos ou mais. Esse tempo maior na fosforescência ocorre porque a molécula entrou em um estado excitado

triplete, onde há um desemparelhamento nos orbitais, de forma que os spins dos elétrons ficam paralelos. (SANTOS; GIL, 2010)

Na fluorescência, devido ao fato de a molécula estar em um estado excitado singleto, no qual os elétrons estão emparelhados e em função disso os spins dos elétrons em direções opostas, a energia é emitida mais rapidamente. (SANTOS; GIL, 2010)

1.1.2. Fluoróforos

Substâncias moleculares que apresentam ligações insaturadas conjugadas (têm elétrons π deslocalizados) e que apresentam rigidez estrutural são denominadas de fluoróforos. Estruturas moleculares rígidas (com restrições de liberdade vibracional) não perdem energia vibracional, portanto têm uma redução do processo de desativação não – radiativo por conversão interna, acarretando em um aumento da eficiência quântica luminescente. (COSTA, 2009)

Grupos doadores de elétrons aumentam a fluorescência, enquanto grupos aceptores de elétrons diminuem a fluorescência. (COSTA, 2009)

Dois tipos de fluoróforos são usados em análise de fluorescência de macromoléculas – fluoróforos intrínsecos (contidos nas macromoléculas) e fluoróforos extrínsecos (adicionados ao sistema, normalmente ligados a um de seus componentes). (FILHO, 2005)

1.1.3. Fatores que afetam a fluorescência

1.1.3.1. Rendimento quântico

Para que ocorra a fluorescência, uma molécula precisa ter estrutura apropriada e estar em um meio que favoreça a desativação radiativa $S_1 \rightarrow S_0$, sendo esses dois fatores críticos na magnitude da eficiência ou rendimento quântico de fluorescência de uma substância. (COELHO, 2004)

O rendimento quântico de fluorescência de uma substância é a razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência (n_{em}) e o número de fótons absorvidos (n_{abs}) pela amostra (**Equação 1**). Uma molécula será significativamente fluorescente

se sua eficiência quântica tiver magnitude considerável (entre 0,1 e 1). (COELHO, 2004)

$$\phi = \frac{\eta_{em}}{\eta_{abs}} \quad (1)$$

1.1.3.2. Temperatura

Os fluoróforos podem ter variação na sua intensidade devido a temperatura. O aumento da temperatura acarreta na diminuição da intensidade da fluorescência. As colisões moleculares ocasionadas pelo aumento da temperatura diminuem a energia do estado excitado que resulta na fluorescência. (LIMA, 2008)

1.1.3.3. Polaridade do solvente

Quando um fluoróforo é transferido para um ambiente menos polar, ocorre um deslocamento do comprimento de onda para um valor menor (*'blue shift'* – deslocamento hipsocrômico). Caso o contrário ocorra, ou seja, haja a transferência para um ambiente mais polar, o fluoróforo estará mais exposto, o que acarreta em um deslocamento de um comprimento de onda para um valor maior (*'red shift'* – deslocamento batocrômico) (LIMA, 2008)

Isso explica o porquê de algumas substâncias não fluorescerem ou apresentarem fraca fluorescência em solventes apolares ou não próticos enquanto fluorescem intensamente em solventes polares e próticos. (FILHO, 2005)

1.1.3.4. Viscosidade e pH

Além da polaridade e caráter prótico, a viscosidade do solvente também pode afetar a fluorescência. A viscosidade diminui as taxas de colisões desativadoras (*quenching*) pela diminuição da difusão de espécies desativadoras e do oxigênio no meio. No caso da fluorescência, a presença do oxigênio não é crítica, pois o mesmo é apenas desativador do estado tripleto (COELHO, 2004)

O pH também é uma variável importante, já que alterações do pH causadas pelas diferentes espécies ionizáveis acarretam em variações de fluorescência (LIMA, 2008)

O efeito do pH nos sistemas de solventes próticos é relevante na fluorescência em moléculas aromáticas contendo grupos funcionais básicos ou ácidos, sendo muito comum observar significativa diferença entre as propriedades luminescentes de moléculas protonadas e não protonadas. (COELHO, 2004)

1.1.3.5. Atenuação da Fluorescência

Qualquer processo que resulte na redução da intensidade da fluorescência de uma substância é denominado de atenuação ou '*quenching*' da fluorescência. Na atenuação colisional (dinâmica), o fluoróforo e o atenuador entram em colisão. Quando ocorre o contato, o fluoróforo retorna ao estado fundamental sem emitir o fóton. A outra atenuação que pode ocorrer é a estática. Assim como no dinâmico, o contato entre o fluoróforo e o atenuador é necessário. Nesse contato ocorre a formação, no estado fundamental, de um complexo que não é fluorescente, mas essa formação resulta em perturbação do espectro de absorção do fluoróforo, algo que não ocorre na atenuação dinâmica, já que a mesma só afeta o estado excitado do fluoróforo (LIMA, 2008)

1.1.4. Instrumentação para fluorescência

Um espectrofluorímetro é, em geral, composto por dois monocromadores, um de excitação e um de emissão, uma fonte de excitação (que normalmente é uma lâmpada de mercúrio ou xenônio) e um sistema de detecção (que normalmente é um tubo fotomultiplicador). Um monocromador é composto por um arranjo ótico no qual uma fonte de luz policromática incidente se decompõe em seus diferentes comprimentos de onda através de uma grade de difração. Os comprimentos de onda para excitação da amostra são selecionados pelo monocromador de excitação, e a radiação emitida é analisada pelo monocromador de emissão, sendo a intensidade da radiação emitida determinada pelo tubo fotomultiplicador. A **Figura 3** mostra o esquema de um espectrofluorímetro. (BERNARDES, 2009)

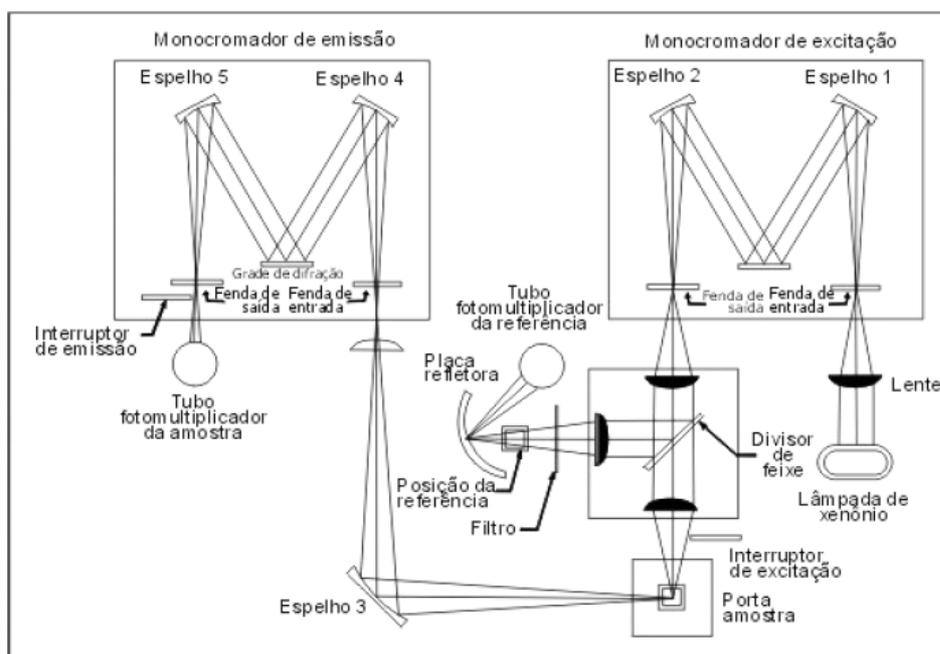


Figura 3: Esquema de funcionamento de um espectrofluorímetro (BERNARDES, 2009)

A vantagem do espectrofluorímetro é que ele permite uma varredura espectral na excitação e emissão ampla ⁽¹⁾

A lâmpada ou fonte de luz provém energia que excita a substância de interesse para fluorescer. Lâmpadas de Xenônio são muito versáteis e poderosas, provendo fluorescência numa faixa de 190 – 1200 nm. Já as células onde ficam a amostra têm de ser feitas de um material que permita a passagem de luz ⁽¹⁾

O detector de radiação é mais frequentemente um tubo fotomultiplicador ou com arranjo de diodos. A luz passa pelo filtro de emissão sendo detectada pelo fotomultiplicador. A intensidade da luz, a qual é diretamente proporcional (linear) a concentração do analito é registrada no computador. ⁽¹⁾

(1) Retirado de <http://www.comm-tec.com/library/Tutorials/CTD/Fluorescence.pdf>

(2) www.torretitan.blogspot.com

1.2. Espectroscopia de infravermelho

A origem, da espectroscopia no infravermelho (IR), data do início do século 19 com o trabalho pioneiro do músico e astrônomo alemão Frederick William Herschel. O experimento realizado por Herschel foi importante, não somente pela descoberta da radiação infravermelha, mas, também, por demonstrar que existem formas de luz que não podem ser observadas pelo olho humano. A partir de seus estudos, outros trabalhos foram desenvolvidos utilizando faixas espectrais como o infravermelho próximo, médio e distante e também a região do ultravioleta (**Figura 4**). (VALDERRAMA, 2009)

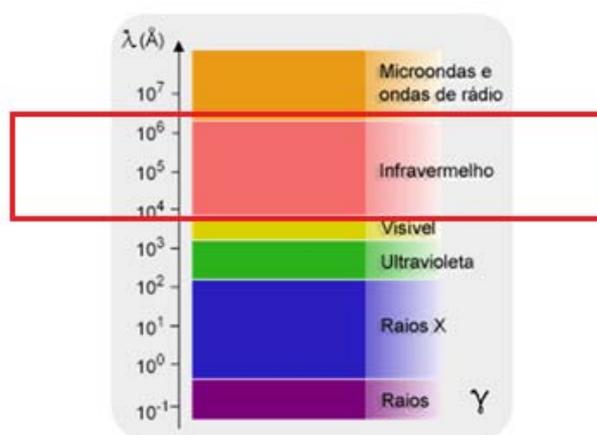


Figura 4: Regiões do espectro eletromagnético ⁽²⁾

Em função da potencialidade que a técnica apresentou na caracterização e quantificação de diferentes espécies químicas, a espectroscopia na região do infravermelho alcançou grande desenvolvimento. Com o desenvolvimento de equipamentos mecânicos e ópticos mais precisos, as aplicações dessa técnica foram ampliadas. (VALDERRAMA, 2009)

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas. As transições eletrônicas estão situadas na região do ultravioleta ou visível, já as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região de microondas e, em casos particulares, também na região do infravermelho distante. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

(2) www.torretitan.blogspot.com

Em uma molécula, o número de vibrações, a descrição dos modos vibracionais e sua atividade em cada tipo de espectroscopia vibracional (Infravermelho e Raman) podem ser previstas a partir da simetria da molécula. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

A espectroscopia no IR engloba os fenômenos associados à absorção e à emissão de energia radiante que ocorre em três regiões (**Figura 5**) do espectro eletromagnético (**Tabela 1**). (PEREIRA, 2007)

Tabela 1: Regiões espectrais do IR (PEREIRA, 2007)

Região	Comprimento de onda (μm)	Número de onda (cm^{-1})	Frequência (Hz)
<i>Próximo</i>	0,78 a 2,5	12.800 a 4.000	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
<i>Médio</i>	2,5 a 50	4.000 a 200	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
<i>Distante</i>	50 a 1000	200 a 10	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$
<i>Mais usada</i>	2,5 a 15	4.000 a 670	$1,2 \times 10^{14}$ a $2,0 \times 10^{13}$

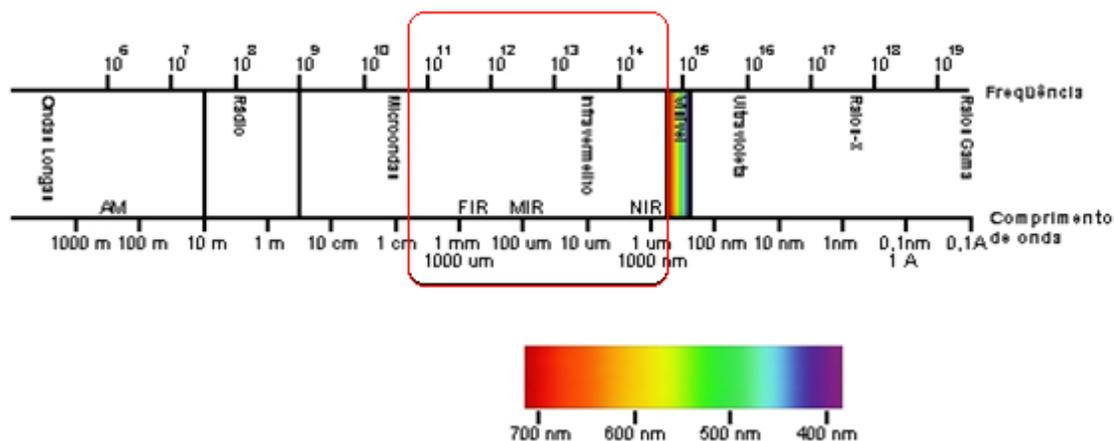


Figura 5: Regiões do infravermelho ⁽³⁾

(3) www.chasqueweb.ufrgs.br

1.2.1. Variações no momento dipolo

Uma molécula deve sofrer uma variação no momento de dipolo durante seu momento rotacional ou vibracional, para absorver a radiação infravermelha. Quando isso ocorre, o campo elétrico alternado de radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de um dos seus movimentos. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

Quando uma molécula absorve radiação infravermelha, seus átomos vibram com maior amplitude. Esse comportamento é similar ao de um oscilador harmônico (**Figura 6**) que, pela mecânica quântica, apresenta os níveis de energia vibracional entre dois átomos de uma molécula quantizados, conforme a **Equação 2** a seguir: (PEREIRA, 2007)

$$E_{vib} = h\nu(\eta + 1/2) \quad (2)$$

Onde E_{vib} é a energia vibracional, h é a constante de Planck, ν é a frequência vibracional clássica e η é o número quântico vibracional.

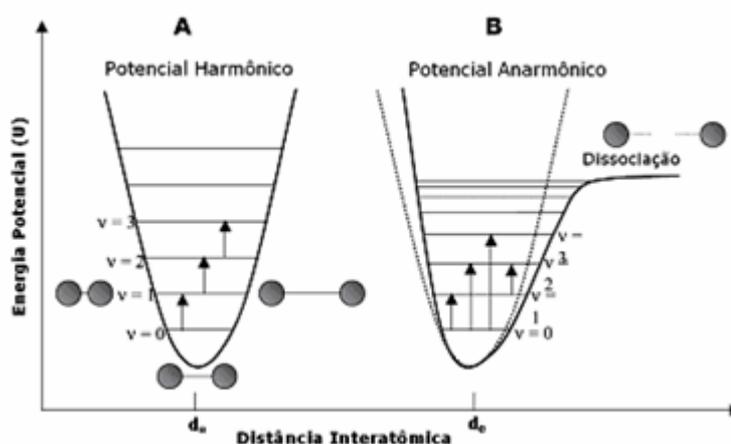


Figura 6: Diagrama de energia potencial para os osciladores harmônico (A) e anarmônico (B) (PEREIRA, 2007)

O comportamento das moléculas desvia da idealidade, ou seja, o modelo do oscilador harmônico não pode explicar o comportamento de moléculas reais, já que o mesmo não considera a interação coulômbica entre átomos ou rompimento

das ligações. Consequentemente, os níveis de energia quantizados não são igualmente espaçados. O modelo que explica esse comportamento é o do oscilador anarmônico, onde a diferença dos níveis de energia diminui com o aumento de n , como mostrado na **Equação 3** a seguir (PEREIRA, 2007)

$$E_{vib} = h\nu[1 - (2n + \Delta n + 1)y] \quad (3)$$

Onde y é o fator de anarmonicidade.

A anarmonicidade pode resultar em transições entre estados de energia vibracional (onde $\Delta n = \pm 2, \pm 3, \dots$). Tais transições produzem bandas de absorção conhecidas como sobretons (transições vibracionais mais fracas) e são muito pouco prováveis de ocorrer se comparadas às transições vibracionais fundamentais. (PEREIRA, 2007)

1.2.2. Transições rotacionais

A energia necessária para causar uma mudança no nível vibracional é muito pequena (corresponde à radiação de $\bar{\nu} \leq 100 \text{ cm}^{-1}$ ou $\lambda > 100 \text{ }\mu\text{m}$). Em função dos níveis rotacionais serem quantizados, a absorção de radiação por gases, na região do infravermelho distante, é caracterizado por linhas discretas bem definidas. Nos líquidos e sólidos, as colisões e interações intermoleculares causam o alargamento das linhas produzindo um espectro contínuo. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

1.2.3. Transições rotacionais - vibracionais

Os níveis de energia vibracionais são também quantizados e, para a maioria das moléculas, as diferenças de energia entre estados quânticos correspondem à região IR - médio. O espectro IR de um gás geralmente consiste de uma série de linhas muito próximas, pois existem vários níveis de energia rotacionais para cada nível vibracional. Por outro lado, a rotação é fortemente reduzida em líquidos e sólidos; em tais amostras, as linhas rotacionais – vibracionais discretas desaparecem, aparecendo apenas bandas vibracionais um pouco alargadas. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

1.2.4. Tipos de transições moleculares

As posições dos átomos em uma molécula não são fixas, ou seja, oscilam continuamente em função de vibrações e rotações de diferentes tipos. As vibrações podem ser classificadas nas categorias de *estiramento*, que envolve uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos e *deformação* que são caracterizadas pela variação no ângulo entre duas ligações e são de quatro tipos (simétrica no plano – *tesoura*; assimétrica no plano – *balanço*; simétrica fora do plano – *sacudida*; assimétrica fora do plano – *torção*) que podem ser observados na **Figura 7**. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

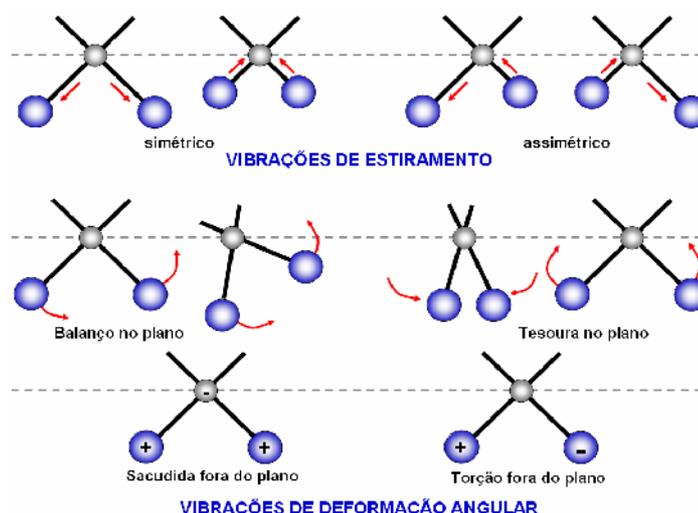


Figura 7: Tipos de vibrações moleculares. (+) - vibração para fora do plano; (-) – vibração para dentro do plano de uma molécula triatômica (NASCIMENTO, 2008)

1.2.5. Acoplamento vibracional

A energia de uma vibração e, portanto, o comprimento de onda do máximo de absorção correspondente pode ser influenciado por (ou acoplada com) outras vibrações na molécula. Um número de fatores afeta a extensão deste acoplamento. Tais fatores são: quando um há um átomo comum as duas vibrações, ocorre um forte acoplamento entre as vibrações de estiramento; a interação entre vibrações de deformação angular requer uma ligação comum entre os grupos; se a ligação estirada forma um lado do ângulo que varia no modo vibracional de deformação, o

acoplamento entre uma vibração de estiramento e uma vibração de deformação angular pode ocorrer; a interação máxima ocorre quando os grupos acoplados possuem energias individuais aproximadamente iguais; quando os grupos são separados por duas ou mais ligações se observa pouca ou nenhuma interação; o acoplamento requer que as vibrações sejam da mesma espécie de simetria (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

1.2.6. Espectroscopia no infravermelho médio (MIR)

A importância histórica da espectroscopia de infravermelho na elucidação da estrutura molecular de lipídeos e o atual interesse na análise de infravermelho de óleos e gorduras comestíveis derivam ambos do alto teor de informação contido no espectro de infravermelho e na habilidade de associar bandas específicas de absorção a grupos funcionais em particular. (DOBSON, 2001)

O uso da espectroscopia MIR em análises de óleos tem sido reportado desde 1955. Ambas as regiões NIR (infravermelho próximo) e MIR têm sido exploradas para esse tipo de análise. (CHRISTY *et al*, 2004)

A grande maioria das pesquisas desenvolvidas e o maior número de aplicações ocorrem na região do MIR. No final dos anos 50, essa região começou a ser usada para análise qualitativa de substâncias orgânicas em função da grande quantidade de informação que pode ser obtida para se caracterizar substâncias orgânicas. (VALDERRAMA, 2009)

A região do MIR onde aparecem as vibrações fundamentais dos grupos funcionais tem sido usada por um longo tempo para estudar amostras de alimentos. (CHRISTY; EGEBERG, 2005)

Para a região do MIR, até o início dos anos 80, a maioria dos instrumentos era do tipo dispersivo baseados em redes de difração. Posteriormente, com o surgimento dos equipamentos interferométricos, boa parte dos instrumentos atuais é baseada na Transformada de Fourier. (VALDERRAMA, 2009)

Em função disso, houve um aumento significativo do número de aplicações do MIR, tanto qualitativa quanto quantitativamente. Mas, ainda hoje, a maioria das aplicações do MIR se baseia na identificação de substâncias orgânicas, já que nessa região ocorrem essencialmente transições fundamentais e há uma faixa espectral conhecida como região das impressões digitais ($1200 - 700 \text{ cm}^{-1}$). Em tal

região, pequenas alterações na estrutura e constituição de uma molécula culminam em mudanças na distribuição das bandas de absorção do espectro que são relacionados com a estrutura da molécula. (VALDERRAMA, 2009)

1.2.7. Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)

A absorção de radiação no NIR (12.800 a 4.000 cm^{-1}) está associada a grupos funcionais que apresentam ligações muito polarizadas (C—H, N—H e O—H). Os espectros de absorção na região NIR são caracterizados pela presença de sobretons de transições vibracionais fundamentais e por sobretons de combinações dessas transições fundamentais que aparecem normalmente na região do MIR. (PEREIRA, 2007)

A baixa absorvância do sobreton e combinação das bandas de NIR possibilitam usar a espectroscopia NIR para análises das amostras. Geralmente, um espectro NIR possui certo número de sobreposições, o que pode vir a dificultar a análise quantitativa. (CHRISTY *et al*, 2004).

Além de fornecer informações químicas das amostras, os espectros NIR fornecem também informações físicas, tais como densidade, viscosidade, índice de refração, por meio de ferramentas quimiométricas. As bandas de absorção na região NIR são de intensidades fracas (em torno de 10 a 1000 vezes menos intensas). (PEREIRA, 2007)

1.2.8. Instrumentação para NIR e MIR

A **Figura 8** mostra um esquema básico dos componentes principais de um equipamento de infravermelho. (VALDERRAMA, 2009)

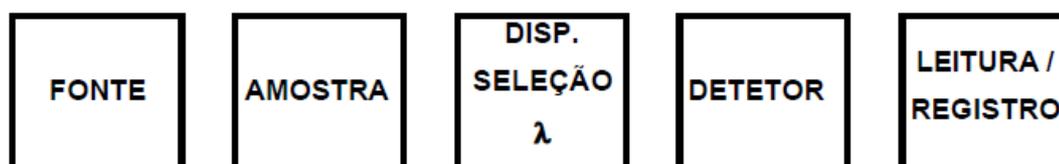


Figura 8: Componentes básicos de um equipamento que opera na região do infravermelho (HENRIQUES, 2008)

As fontes de infravermelho consistem em um sólido inerte como a fonte de Nernst, que é composta de óxido de terras raras, a fonte Global, que consiste em uma barra de carbeto de silício, a fonte de filamento incandescente que é representada através de um espiral de níquel – cromo, o arco de mercúrio, a lâmpada de filamento de tungstênio, o laser de dióxido de carbono, são exemplos de fontes para região do infravermelho que encontram aplicações de acordo com o interesse específico. (VALDERRAMA, 2009)

Os instrumentos para a região do infravermelho próximo são semelhantes aos utilizados para a espectroscopia de absorção no UV/VIS. Lâmpadas de tungstênio/halogênio com janelas de quartzo servem como fontes, as células para medidas de absorção são normalmente de quartzo ou sílica fundida, transparentes até 3000 nm. O caminho óptico varia de 0,1 a 10 cm. Os detectores são, em geral, fotocondutores de sulfeto de chumbo. (VALDERRAMA, 2009)

Os registros das absorções na região do NIR podem ser obtidos nos modos de reflectância, transmitância ou transflectância. A diferença básica entre estes modos de medidas é a posição da amostra no instrumento, como mostra a **Figura 9** a seguir. (NUNES, 2008)

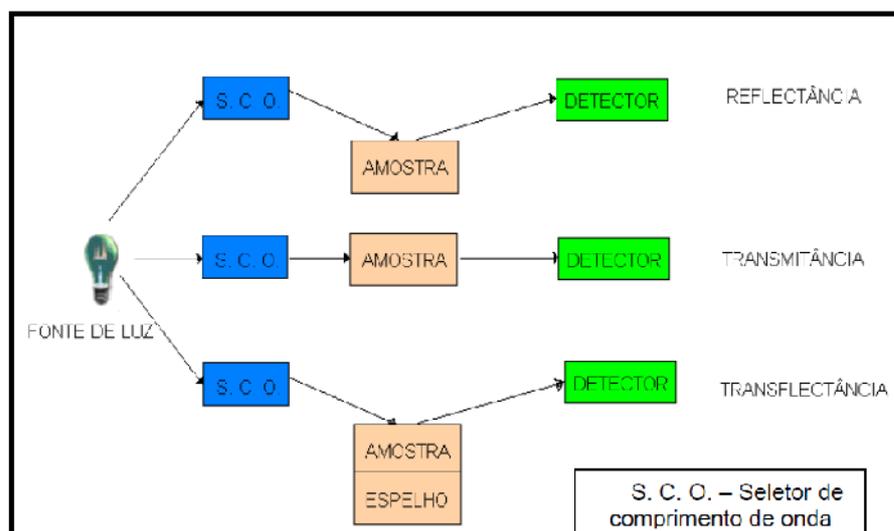


Figura 9: Modos de medida em espectroscopia NIR (NUNES, 2008)

1.2.8.1. Espectrofotômetros dispersivos

Os espectrofotômetros dispersivos no infravermelho são instrumentos registradores de feixe duplo, que usam redes de difração para dispersar a radiação. Em geral, a óptica dos instrumentos dispersivos é muito parecida com a de equipamentos no UV – VIS, exceto que os compartimentos de amostra e referência estão sempre localizados entre a fonte e monocromador nos instrumentos no infravermelho. Essa disposição é possível porque a radiação infravermelha, em contraste com a UV – VIS, não é energética o suficiente para causar decomposição fotoquímica da amostra. Colocando a amostra e a referência antes do monocromador tem – se a vantagem de que a maior parte da radiação espalhada, gerada no compartimento da célula, é efetivamente removida pelo monocromador e não atinge o transdutor. (VALDERRAMA, 2009)

1.2.8.2. Espectrofotômetro com transformada de Fourier

Esse tipo de equipamento utiliza um interferômetro. Espectrofotômetros com Transformada de Fourier apresentam algumas vantagens, como a grande eficiência no transporte da radiação até o detector, o que melhora a relação sinal/ruído, apresenta um alto poder de resolução e reprodutibilidade do comprimento de onda, todos os elementos de resolução para um espectro são medidos simultaneamente o que possibilita a aquisição de dados de um espectro inteiro em cerca de um segundo ou menos. (VALDERRAMA, 2009)

1.2.8.3. Medidas por transmitância

A absorção da radiação NIR/MIR segue a lei de Beer (**Equação 4**) e, portanto, a absorvância é definida como: (NUNES, 2008)

$$A = \log I / I_0 = -\log T \quad (4)$$

Onde I_0 é a intensidade de energia incidente e I a intensidade da radiação detectada após passar pela amostra. Desvios da Lei de Beer também podem ocorrer aqui, em virtude de ligações por ligação de hidrogênio, complexação ou processos químicos. (NUNES, 2008)

1.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (*CLAE* ou *High Performance Liquid Chromatography - HPLC*) é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel (líquida) e fase estacionária, a qual se encontra em uma coluna. A cromatografia líquida é o tipo mais versátil e mais amplamente empregado de cromatografia por eluição. Essa técnica é utilizada para separar e determinar uma grande variedade de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos. Vários fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica. São eles: a natureza química das substâncias a serem separadas, composição e o fluxo da fase móvel e a composição e área superficial da fase estacionária. (MENDES, 2011)

A fase móvel deve ser um solvente que dissolva completamente a amostra sem qualquer interação química entre ambas. Essa fase deve ter um alto grau de pureza ou ser de fácil purificação, a fim de que seja possível realizar análises de alta sensibilidade, visto que as impurezas podem interferir na detecção do analito por UV. A fase móvel deve ser compatível com o tipo de detector utilizado e deve possuir também polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra. Os solventes mais utilizados são: água, metanol e acetonitrila.⁽⁴⁾

Na fase estacionária faz-se uso de sólidos rígidos ou semi-rígidos, cujas partículas porosas esféricas ou irregulares apresentam diferentes diâmetros e suportam pressão até 350 bar.⁽⁴⁾

Essa é uma das técnicas mais empregadas em laboratórios analíticos para fins qualitativos e quantitativos. A grande vantagem dessa técnica está na possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, permitindo sua aplicação em diversas áreas, destacando-se a indústria farmacêutica e alimentícia, assim como na medicina e química ambiental. (GORZALKA, 2008)

(4) <http://pfarma.com.br/farmaceutico-industrial/130-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-.html>

Na indústria farmacêutica, a técnica é indispensável no controle de qualidade desde a matéria prima até o produto final. Já em laboratórios de controle ambiental, a técnica é utilizada para monitorar e analisar pesticidas e outros contaminantes em água e solo. ~~Na indústria alimentícia é utilizada para controle e determinação de~~ toxinas e quantificação de nutrientes mesmo na presença de aditivos. Isto sem contar as suas aplicações na área médica, investigações forenses e também na área *antidopping*. (LOURENÇO, 2005)

Esse tipo de cromatografia possui uma maior variedade de mecanismos de separação possíveis, desta forma podendo ser aplicada tanto para compostos orgânicos e inorgânicos. A única exigência para essa técnica é que a amostra seja solúvel na fase móvel, assim sendo, amostras líquidas ou sólidas, iônicas ou covalentes, como também sólidos de alta ou baixa massa molecular podem ser separados (ANAZAWA, 1996).

No entanto, a técnica usa instrumentos sofisticados e caros e também não é desprezível o custo elevado das fases móveis, que devem ser de alto grau de pureza, das fases estacionárias ou das colunas e da reposição periódica de componentes diversos da coluna ou do aparelho que se constituem em despesas contínuas. (ANAZAWA, 1996)

1.3.1. Instrumentação para cromatografia

Os componentes (**Figura 10**) de um cromatógrafo líquido são: a bomba, a coluna cromatográfica, um detector e o registrador. É um método utilizado para a separação de espécies iônicas ou macromoléculas e substâncias termolábeis. ⁽⁴⁾

⁽⁴⁾ <http://pfarma.com.br/farmaceutico-industrial/130-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-.html>

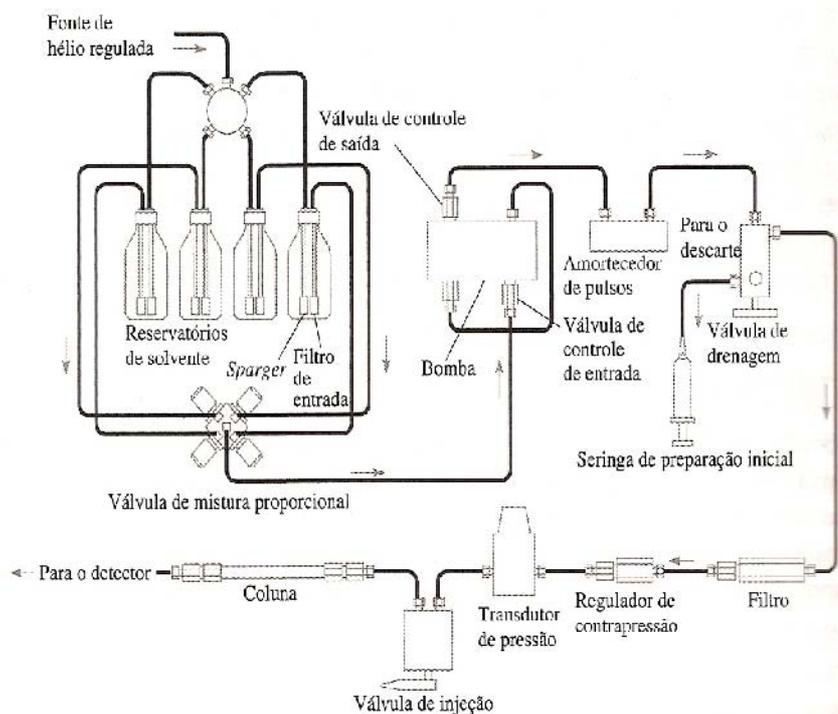


Figura 10: Diagrama de blocos com os componentes de um sistema para a CLAE.
(HOOLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

A instrumentação requer pressões de bombeamento de muitas atmosferas a fim de se obterem vazões razoáveis com recheios na faixa de 3 a 10 μ m, que é comum na cromatografia líquida moderna. Em conseqüência dessas altas pressões, o equipamento para a CLAE tende a ser consideravelmente mais complexo e, por conseguinte muito mais caro do que aquele encontrado nos outros tipos de cromatografia. (HOOLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

O aparelho da CLAE consiste de uma coluna, uma válvula de injeção da amostra, um reservatório de solvente, uma bomba de ar, um detector e um registrador (ou computador). Algumas colunas utilizam como fase estacionária, sílica gel ou alumina, que são mais polares que o eluente, o que culmina em uma eluição mais rápida dos componentes apolares em detrimento dos polares. Essas colunas são chamadas de fase normal, sendo que algumas têm sua polaridade aumentada pela introdução de grupos polares, como $-(CH_2)_3NH_2$ ou $-(CH_2)_3CN$ às partículas de

sílica gel. Já quando a eluição de componentes polares é mais rápida em detrimento das apolares sem tem coluna de fase reversa.

2. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

2.1. Quimiometria

A quimiometria geralmente é definida como sendo a disciplina que aplica os métodos estatísticos e matemáticos à química. A definição dada por Massart é a mais aceita pela maioria dos autores. O mesmo define a quimiometria como uma disciplina química que usa a matemática, estatística e lógica formal para delinear e selecionar procedimentos experimentais, bem como para extrair a máxima informação química relevante através da análise dos dados químicos e obter o conhecimento dos sistemas químicos. (LEITÃO, 2005)

A química analítica é provavelmente a área da química que mais se beneficia com a quimiometria. As áreas principais de aplicação da quimiometria passam pelo planejamento ou seleção de métodos analíticos e procedimentos ótimos assim como pela extração da máxima informação possível pela análise dos dados. (LEITÃO, 2005)

A quimiometria forneceu aos espectroscopistas diferentes formas de resolver o problema da calibração para análises de dados espectrais. Modelos clássicos de quantificação, tal como o de regressão linear simples, se tornaram insuficientes para sistemas complexos, frente à quantidade de dados que podem ser obtidos a partir de um espectro. Para que estes modelos apresentem bons resultados é necessário que sejam utilizadas apenas amostras simples: substâncias puras ou misturas binárias e que a banda espectral selecionada não sofra outra influência, a não ser do próprio analito, garantindo uma relação linear entre a concentração e o sinal. Portanto, o uso de modelos de calibração multivariada para a obtenção de dados quantitativos apresenta uma série de vantagens, pois podem ser utilizados em sistemas complexos apresentando bons resultados. (OLIVEIRA, 2006)

As principais vantagens do uso da quimiometria incluem a redução do ruído, por usar mais medidas para um mesmo fenômeno, manipulação dos interferentes, análise exploratória e possibilidade de controle ou detecção de *outliers* (BRO, 2003)

A pesquisa contínua, o desenvolvimento e a verificação de métodos continuam a enfatizar o potencial significativo da quimiometria na prática química moderna e análises farmacêuticas (NI; KOKOT, 2006)

2.2. Pré Processamento dos dados

Em geral, as matrizes de dados de natureza multivariada necessitam de manipulações matemáticas que possibilitem contornar ou reduzir fontes de variação não informativas para futuras modelagens. Essas manipulações são conhecidas como pré – processamento ou pré – tratamento dos dados. (PEREIRA, 2007)

Essa etapa de pré - processamento consiste na aplicação de métodos que visam corrigir interferências causadoras de variação na aquisição dos espectros para que desse modo possa se extrair informações úteis dos dados. Há diversos tipos de pré – processamentos que produzem diferentes transformações nos dados. (SANTOS, 2007)

A escolha do pré – processamento será em função daquele que fornecer a melhora do modelo de calibração. (OLIVEIRA, 2006)

2.2.1. Centralização na média (MC)

Envolve a subtração da resposta de cada variável sobre a resposta média dessa variável nos dados em todas as amostras. Essa operação consiste em remover a intensidade absoluta da informação de cada variável, tornando-se possível focar-se nas variações da resposta. O objetivo deste pré – processamento é revelar as flutuações dos dados em torno do valor médio (SANTOS, 2007)

A seguir é possível observar um esquema representativo da aplicação da centralização na média em espectros NIR (**Figura 11**).

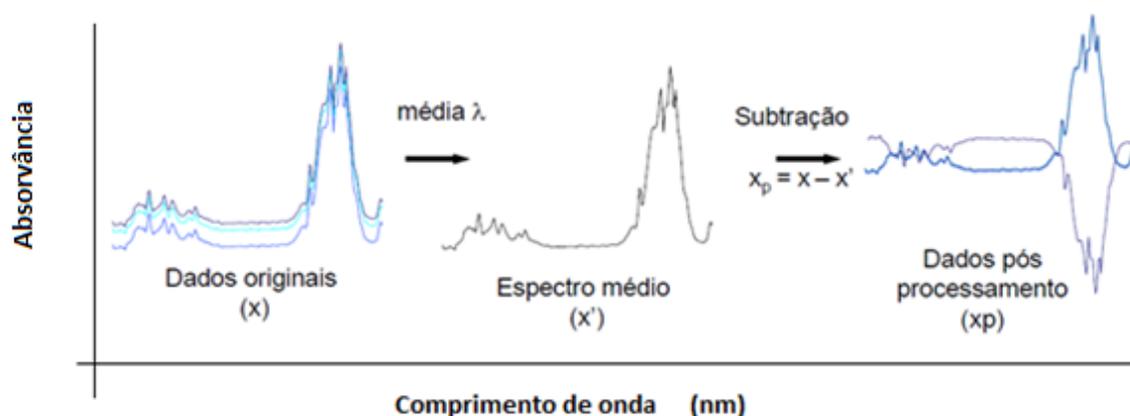


Figura 11: Uso da centralização na média em espectros NIR (SAUER, 2007)

2.2.2. Correção do Sinal Multiplicativo (MSC)

É utilizado para corrigir efeitos aditivos e multiplicativos na região espectral. Seu mecanismo consiste em duas abordagens: a primeira diz que o espectro da amostra é o resultado da adição de dois espectros, sendo um de espalhamento d e o outro das absorvâncias das espécies químicas c . Dessa forma, o MSC pode corrigir o espectro de difusão d . Já a segunda abordagem consiste no fato de admitir que o coeficiente d é o mesmo para todas as amostras em todos os comprimentos de onda, sendo possível de ser modelado através de regressão linear sobre um comprimento de onda livre de efeitos químicos usando um espectro de referência X_{ref} . (Zeaiter, Rutledge, 2009)

Matematicamente, a correção é feita da seguinte forma: a partir do conjunto total de espectros de reflectância difusa, calcula-se o espectro médio; faz-se a regressão linear para cada um dos espectros do conjunto total de espectros. O método MSC, quando bem aplicado é capaz de reduzir significativamente os efeitos relativos ao espalhamento de luz. (GURGEL, 2006)

A MSC é uma técnica que pode ser generalizada como uma correção de sinal multiplicativa. Foi desenvolvida para corrigir as variações devidas ao espalhamento da luz para as medidas NIR de reflectância difusa. Mesmo com o uso da técnica, o espectro pré – processado continua a assemelhar-se ao espectro original não prejudicando a sua interpretação. (SANCHES, 2009)

Na **Figura 12** pode ser observado um esquema representativo da aplicação do MSC em espectros NIR.

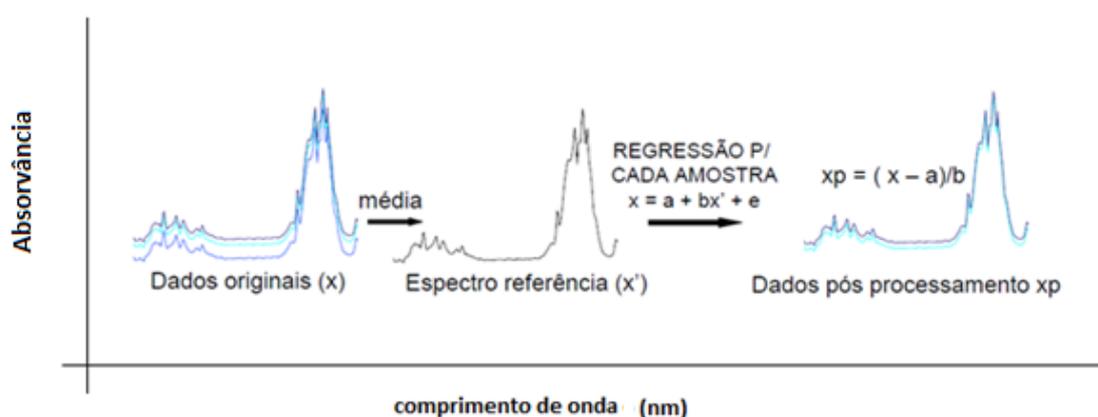


Figura 12: Aplicação do MSC em espectros NIR (SAUER, 2007)

2.2.3. Correção do Sinal Ortogonal (OSC)

O objetivo do método é reduzir a variação em \mathbf{X} (matriz das respostas instrumentais) que não esteja relacionada, ou seja, que é ortogonal, a \mathbf{Y} (matriz dos parâmetros a serem preditos pelo modelo) e dessa forma simplificar o modelo. Quando usada na calibração multivariada o método OSC é calculado apenas com amostras de calibração. (HONORATO et al., 2007)

2.2.4. Derivação

Um dos pré-processamentos mais usados é a derivação. A primeira derivada remove os deslocamentos sistemáticos da linha de base (*offsets*), já a segunda derivada pode eliminar uma variação linear da linha de base, normalmente devida a efeitos de espalhamento. Como o cálculo das derivadas é feito a partir de diferenças entre valores de pontos adjacentes, a relação sinal-ruído torna-se pior com esse tipo de pré-processamento. Por isto, antes da diferenciação é comum aplicar-se aos dados algum tipo de suavização. O algoritmo mais usado para tal fim é o de Savitzky-Golay. (HONORATO et al., 2007)

Os filtros de Savitzky – Golay têm como principais objetivos aumentar a porcentagem do sinal em função do ruído existente nos dados originais e a derivação dos sinais pela subtração da linha de base com conseqüente melhoria da resolução visual. Esta operação envolve a derivação matemática de uma função, sendo a função o espectro de uma amostra em vários comprimentos de onda. Esses

filtros são funções locais que são aplicadas a cada espectro sendo em seguida aplicada a derivada. Em aplicações espectroscópicas, a primeira derivada remove as variações aditivas de linha de base do espectro nos perfis. (SANTOS, 2007)

O uso da derivada como pré – processamento apresenta como vantagem remover os efeitos das linhas de base dos espectros que variam dependendo das condições de obtenção do espectro, tal como variação de temperatura, etc. (OLIVEIRA, 2006)

A primeira derivada mede a inclinação da curva e não é afetada pelos efeitos provocados pela mudança da linha de base. A forma como o cálculo da primeira derivada é realizado depende do algoritmo utilizado. (OLIVEIRA, 2006)

No método *Savitzky – Golay*, um polinômio de baixa ordem, pré – definido, é ajustado, por mínimos quadrados, aos pontos de uma janela. Tanto a ordem do polinômio, como o tamanho da janela, são estabelecidos por um usuário. O uso do método *Savitzky – Golay* resulta na eliminação de $(\text{tamanho da janela} - 1) / 2$ pontos em cada extremidade do vetor. A escolha do número de pontos é uma etapa crítica, uma vez que ao se escolher um número elevado de pontos pode-se remover informações relevantes e ao se escolher um número pequeno de pontos, o ruído pode ainda permanecer nos dados espectrais. (SANCHES, 2009).

Na **Figura 13** pode-se observar um esquema representativo da aplicação do pré – processamento de cálculo da primeira derivada em espectros NIR.

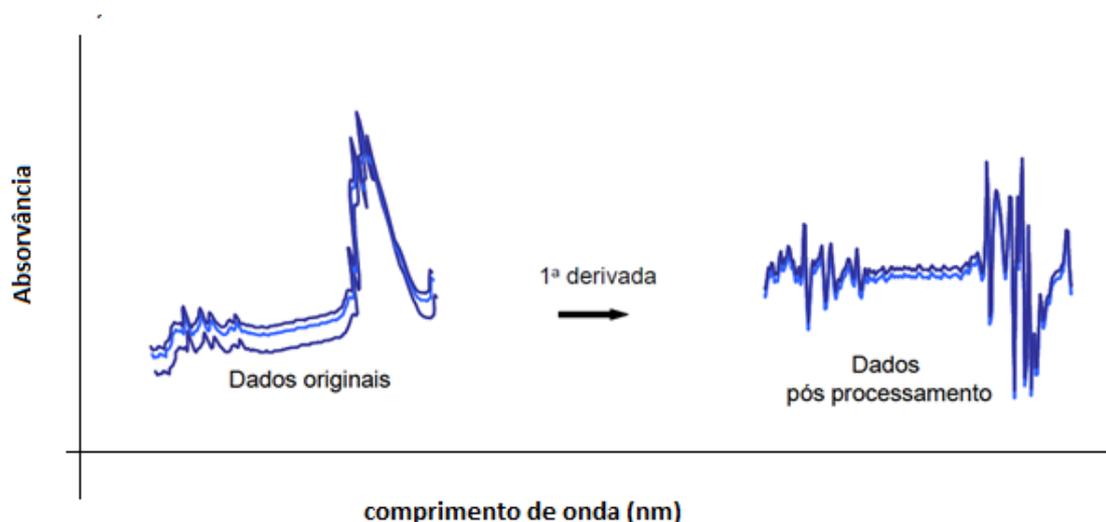


Figura 13: Aplicação da primeira derivada (SAUER, 2007)

2.3. Aprendizagem não supervisionada

Não existe supervisão, já que não se conhece a priori a que classes pertencem os objetos (ou pelo menos essa informação não é usada na construção do modelo). É a situação mais comum em Quimiometria. Exemplos: Análise de Componente Principal (PCA), Análise de Fatores, Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA). (LUNA, 2010)

2.3.1 Análise de componentes principais (PCA)

A análise exploratória não supervisionada baseada em métodos de reconhecimento de padrões visa evidenciar similaridades ou diferenças entre amostras de um determinado conjunto de dados. O PCA é a base principal de diversos métodos de análise multivariada e seu grande objetivo é comprimir a quantidade de informação de um conjunto de dados iniciais para um novo sistema de eixos, denominados componentes principais (PC). Estes PCs representam as amostras, possibilitando visualizar características multivariadas dos dados em poucas dimensões, através de uma projeção de dados sobre um subespaço dimensional menor maximizando a variância, sem perda de informação relevante. (BORTOLETO, 2007)

A análise de componentes principais consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados. Em outras palavras, as 'n' variáveis originais geram através de suas combinações lineares, 'n' componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, o componente principal 1 detém mais informação estatística que o componente principal 2, que por sua vez tem mais informação estatística que o componente principal 3 e assim por diante. Este método permite a redução da dimensionalidade dos pontos representativos das amostras, pois, embora a informação estatística presente nas 'n' variáveis originais seja a mesma dos 'n' componentes principais, é comum obter em apenas 2 ou 3 dos primeiros componentes principais mais que 90% da informação. (NETO; MOITA, 1998).

Um componente principal é definido por um par de *loadings* (pesos) e *scores* (escores). (Figura 14). Os componentes principais descrevem o máximo da variância e são calculados em ordem de importância. (Luna, 2010)

$$\begin{aligned}
 X &= \begin{matrix} \text{loadings} \\ \hline \end{matrix} \begin{matrix} \text{scores} \\ \hline \end{matrix} + \underbrace{\begin{matrix} \text{loadings} \\ \hline \end{matrix}}_{\text{componente principal}} \dots + \begin{matrix} \text{loadings} \\ \hline \end{matrix} \\
 &= \begin{matrix} \text{vetor Scores (T)} \\ \hline \end{matrix} \begin{matrix} \text{vetor Loadings (P}^T\text{)} \\ \hline \end{matrix} + \begin{matrix} \text{Matrix do Erro} \\ \hline \end{matrix} E
 \end{aligned}$$

Figura 14: Matrizes do PCA (Luna, 2010)

O gráfico do componente principal 1 *versus* o componente principal 2 fornece uma janela privilegiada (estatisticamente) para observação dos pontos no espaço 'n' dimensional. A análise de componentes principais também pode ser usada para julgar a importância das próprias variáveis originais escolhidas, ou seja, as variáveis originais com maior *loading* (peso) na combinação linear dos primeiros componentes principais são as mais importantes do ponto de vista estatístico. Portanto, a tarefa do químico que trabalha com estatística multivariada consiste em interpretar a distribuição dos pontos no gráfico de componentes principais e identificar as variáveis originais com maior peso na combinação linear das componentes principais mais importantes. (NETO; MOITA, 1998)

Normalmente após o PCA, o tamanho de cada componente pode ser medido. Essa medida é frequentemente chamada de autovalor (*eigenvalue*) e nesse caso quanto mais significativo for o componente maior é o seu tamanho. Frequentemente esses autovalores são apresentados na forma de porcentagem. A porcentagem acumulativa é frequentemente usada para determinar aproximadamente a proporção dos dados modelados pelo PCA. Quanto mais próximo de 100% melhor é o modelo. Essa porcentagem pode ser colocada em um gráfico contra o número de

autovalores no modelo. Usando o tamanho dos autovalores pode-se estimar o número de componentes significantes no conjunto de dados. Uma regra que às vezes é considerada é rejeitar um determinado número de componentes principais (PCs) quando a porcentagem acumulada dos autovalores for inferior a 5% (BRERETON, 2003)

Quanto maior a correlação entre as medidas, maior será a parcela de variação explicada pelos primeiros eixos. ⁽⁵⁾

Uma série de métodos para determinar o número de fatores significantes é baseada na validação cruzada que é uma ferramenta quimiométrica muito importante. Um dos métodos da validação cruzada é a opção “deixar um de fora” (*leave one out*) que consiste em retirar uma das amostras do conjunto de dados e fazer a modelagem com as demais amostras e tal procedimento é repetido em função do número total de amostras do conjunto. (BRERETON, 2003)

Ao se trabalhar com validação cruzada um dos métodos para se avaliar o número de componentes significantes em um modelo é através da raiz quadrada do erro médio quadrático da validação cruzada (*Root Mean Square Error of Cross Validation* – RMSECV), que serve para fornecer a incerteza na estimativa da concentração dos analitos nas amostras do conjunto de validação cruzada. (SILVA, 2011)

Após efetuar o PCA, um método para se avaliar se há amostras discrepantes no modelo é fazer uso do teste Hotelling T^2 que é usado para testar a igualdade dos vetores médios de duas populações multivariadas. Trata-se nada mais do que um teste derivado a partir do princípio geral de construção de procedimentos de teste denominado Método da Razão de Verossimilhança e é apropriado para comparar duas populações representadas por amostras independentes. (STEINER, 1995)

2.4 **Aprendizagem supervisionada**

Diferentemente das técnicas de reconhecimento de padrão não supervisionadas, as técnicas supervisionadas utilizam uma informação adicional sobre os membros das classes em estudos. Deste modo é necessário um conjunto de treinamento com objetos de categorias conhecidas para elaboração de modelos capazes de identificar amostras desconhecidas. (PONTES, 2009)

2.4.1. Modelagem Independente Flexível por Analogia de Classes (SIMCA)

É um método de reconhecimento de padrão supervisionado, utilizado para discriminação de amostras futuras. O método SIMCA usa PCA para modelar a forma e a posição do objeto formado pelas amostras no espaço linha para definição de uma classe. No SIMCA um modelo multidimensional é construído para cada classe e a classificação de amostras de predição é efetuada determinando dentro de qual classe a amostra está situada. Para isso, um número ótimo de componentes principais é determinado independentemente para cada classe e o modelo final é obtido através da definição da fronteira entre cada PCA modelado. Como consequência, uma hipercaixa com tantas dimensões quantas forem o número de PC mais adequados para cada classe é obtida. (SANCHES, 2009)

Para modelar ou delimitar as fronteiras onde estão localizadas as amostras, é utilizado um conjunto de treinamento contendo amostras de todas as classes e cuja identidade de cada amostra deste conjunto é conhecida a priori. As fronteiras de cada classe são modeladas ou delimitadas usando apenas amostras daquela classe conhecida no conjunto de treinamento. Uma vez definidas as hipercaixas é importante verificar se existem classes com sobreposição. A **Figura 15** apresenta uma simples exemplificação de modelos SIMCA hipotéticos, para duas classes de amostras distintas. (SANCHES, 2009)

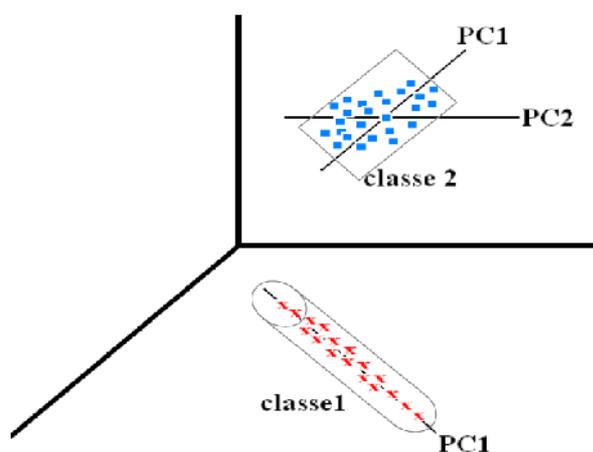


Figura 15: Modelo SIMCA

O poder de discriminação dos modelos SIMCA se baseia na não existência de sobreposição entre duas classes diferentes, bem como na maior distância interclasses possível. (SANCHES, 2009)

Se uma amostra é classificada em mais de uma classe, as medidas ou os modelos SIMCA não são potencialmente discriminantes. As amostras anômalas podem ocorrer devido a um erro nas medidas, ou devido ao surgimento de uma ou mais amostras que sofreram um fenômeno químico anômalo ou desconhecido. (SANCHES, 2009)

2.4.2. Máquina de Vetor Suporte (SVM – DA)

A técnica é usada para classificação binária (duas classes), mas que também suporta a regressão e problemas de classificação de múltiplas classes. De uma maneira geral, o funcionamento dessa técnica consiste no fato de que dadas duas classes e um conjunto de pontos pertencentes a essas classes, a técnica determina o hiperplano (**Figura 16**) que separa os pontos de forma a colocar o maior número possível de pontos da mesma classe do mesmo lado e ao mesmo tempo maximiza a distância de cada classe a esse hiperplano. (ALMEIDA, 2007)

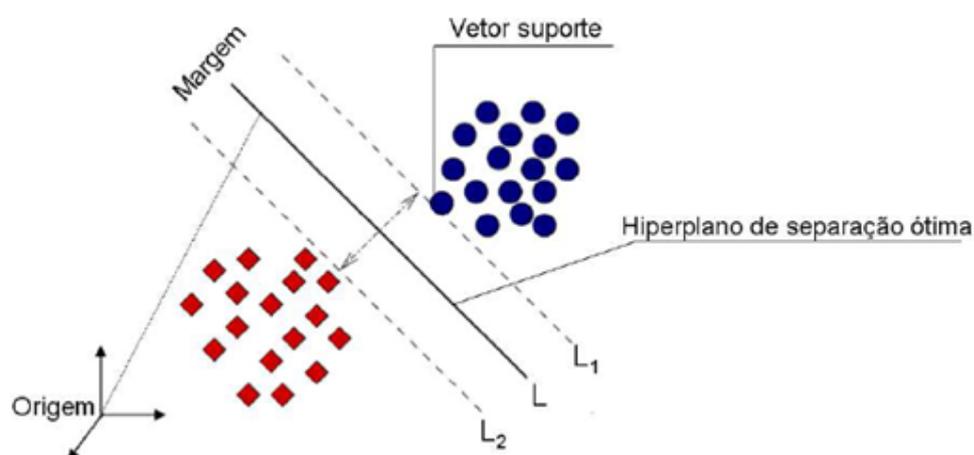


Figura 16: Esquema de classificação por meio do SVM (NASCIMENTO *et al*, 2009)

Fundamentada na Teoria da Aprendizagem Estatística, a Máquina de Vetores Suporte, do inglês Support Vector Machine - SVM foi desenvolvida com o intuito de resolver problemas de classificação de padrões. A máquina de vetores suporte é

outra categoria das redes neurais. Devido a sua eficiência em trabalhar com dados de alta dimensionalidade é reportada na literatura como uma técnica altamente robusta, muitas vezes comparada as Redes Neurais. ⁽⁶⁾

Sendo assim um SVM linear busca encontrar um hiperplano que separe perfeitamente os dados de cada classe e cuja margem de separação seja máxima, sendo este hiperplano denominado de hiperplano ótimo. Assumindo-se que o conjunto de treinamento é linearmente separável, o hiperplano ótimo é o hiperplano de separação com maior margem. ⁽⁶⁾

As máquinas de vetores suporte foram propostas inicialmente como ferramenta de classificação binária. Porém, muitos dos problemas reais possuem características multiclases. Para que fosse possível a utilização da SVM neste tipo de aplicação, foram propostos alguns procedimentos para estender a SVM binária. A proposta inicial da SVM foi a aplicação em problemas de classificação, sendo este o principal enfoque desta técnica. Pode ainda ser aplicado em problemas de regressão. ⁽⁶⁾

2.4.3. Regressão dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS – DA)

A técnica é uma regressão PLS de uma matriz binária Y que descreve categorias (ou classes) para uma matriz X . (PÉREZ – ENCISO; TENENHAUS, 2003)

Essa técnica serve para melhorar a separação entre dois grupos de amostras (**Figura 17**), de modo que se tenha a maior separação possível, entre elas. ⁽⁷⁾

A predição de um modelo PLS – DA, normalmente, pode ser um valor nominal normalmente de zero ou um. Desse modo, um valor próximo ao zero indica que a amostra não está em uma determinada classe, enquanto que um valor de um indica que determinada amostra está modelada em uma classe. ⁽⁸⁾

(6) <http://www.dca.fee.unicamp.br/~andrerio/arquivos/pdfs/svm.pdf>

(7) <http://www.camo.com/resources/pls-da.html>

(8) <http://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Plsda>

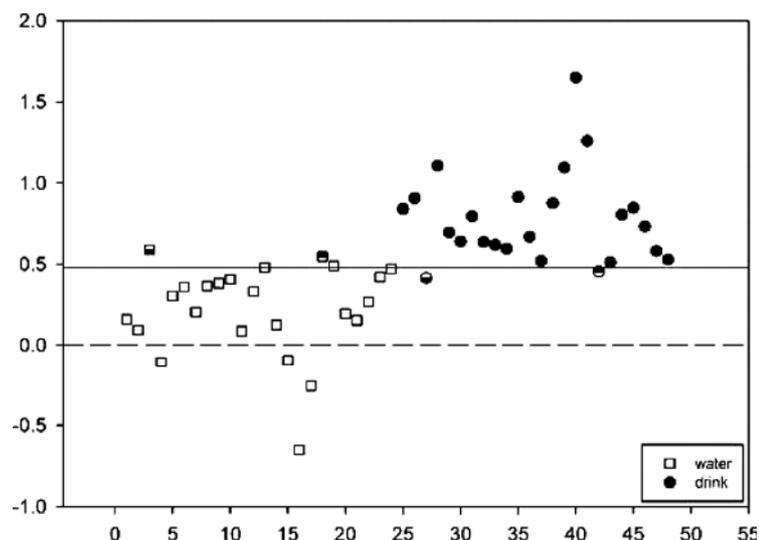


Figura 17: Exemplo de classificação usando PLS – DA (MICHELI *et al*, 2009)

Este método de classificação supervisionada que usa o modelo de regressão PLS para classificação de amostras, relaciona a matriz \mathbf{X} de espectros com uma matriz \mathbf{Y} de classes, sendo a classe observada por meio da **equação 5**. (LIMA, 2011)

$$\hat{C} = T \cdot q \quad (5)$$

Sendo \mathbf{T} a matriz de *scores* do modelo PLS obtidos a partir dos dados originais, \mathbf{q} é o vetor de comprimento dos componentes significantes do PLS e \hat{C} é a classe predita. (LIMA, 2011)

2.5 Algoritmo de Kennard Stone (KS)

O algoritmo KS busca selecionar um subconjunto significativo em um conjunto de N amostras. Para assegurar a uniformidade de distribuição de cada subconjunto ao longo do espaço de dados \mathbf{X} (respostas instrumentais), o algoritmo KS segue o procedimento por etapas de modo que uma nova seleção é feita nas regiões do espaço longe das amostras já selecionadas. Para este propósito, o algoritmo emprega a distância Euclidiana (SANCHES, 2009)

Para dados espectrais, $\mathbf{X}_a(j)$ a $\mathbf{X}_b(j)$ são as respostas instrumentais no j -ésimo comprimento de onda para as amostras a e b respectivamente, e J denota o

número de comprimentos de onda no espectro. A seleção começa tomando o par (a_1, a_2) de amostras nas quais a distância $d_x(a_1, a_2)$ é maior. Subsequentemente, o algoritmo seleciona a amostra que exibe a maior distância em relação a uma amostra já selecionada. O procedimento é repetido até que o número de amostras requerido seja encontrado. (SANCHES, 2009)

2.6 Métodos de calibração

O processo geral de calibração consiste de duas etapas: modelagem, que estabelece uma relação matemática entre as matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} , durante a calibração, e a validação do modelo, que otimiza a descrição do analito de interesse (FERREIRA *et al*, 1999)

A calibração é o procedimento que relaciona a medição instrumental com a concentração do analito de interesse envolvendo normalmente uma fase de calibração e uma de previsão. Habitualmente, na fase de calibração, o sinal instrumental é obtido para um determinado número de amostras em que a concentração do analito é conhecida (padrões) e o modelo matemático relaciona a quantidade física medida com a correspondente quantidade química. (LEITÃO, 2005)

Em seguida, na fase de previsão, o sinal instrumental da amostra de concentração desconhecida é obtido e, através do modelo matemático definido na fase de calibração, é calculada a correspondente quantidade química. (LEITÃO, 2005)

Os métodos de calibração podem ainda ser classificados como métodos lineares ou não lineares, métodos diretos ou indiretos e métodos clássicos ou inversos e são definidos como os processos matemáticos ou estatísticos de extração de informação, usualmente concentração do analito, a partir do sinal instrumental. (LEITÃO, 2005)

As técnicas de calibração usadas em química analítica podem ser classificadas, em univariada ou multivariadas, em função da ordem dos dados. Dessa forma pode se ter:

- A) *Métodos univariados ou de ordem zero* que são usados para tratar dados univariados: são gerados por instrumentos como eletrodos íon seletivos, pHmetros e colorímetros. Dessa forma, a resposta medida para cada amostra é um escalar e, como esses métodos demandam total seletividade para o analito de interesse, não podem ser feitos na presença de interferentes (BROOKSH; KOWALSKI, 1994).
- B) *Métodos multivariados de primeira ordem*: usados para dados multivariados que foram gerados por instrumentos tais como espectrômetros e cromatógrafos. A resposta consiste em um vetor de dados para cada amostra. Nesse caso, já é possível fazer a calibração na presença de interferentes, desde que os mesmos também estejam presentes no conjunto de calibração usado para construir o modelo (BROOKSH; KOWALSKI, 1994).
- C) *Métodos multivariados de segunda ordem*: os dados gerados por instrumentos fornecem como resposta uma matriz (tensor de segunda ordem) de dados para cada amostra, o que no final irá gerar um tensor de dados. Alguns exemplos são as técnicas hífenadas, tais como cromatografia acoplada à espectrometria de massa (GC – MS) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC – DAD), espectrofluorimetria, análise de injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica ou análise de imagens. Uma das vantagens da segunda ordem é a possibilidade de obtenção de espectros puros de cada componente do sistema, tendo também a possibilidade de calibração, sob certas condições na presença de interferentes desconhecidos que não precisam estar presentes no conjunto de calibração (BROOKSH; KOWALSKI, 1994)

2.6.1. Calibração univariada

Denomina-se calibração univariada quando se mede um determinado sinal analítico instrumental em função de apenas uma única variável controlada. Nesse caso, há a construção de uma relação entre duas variáveis, como, por exemplo, concentração e medição do sinal do analito, de modo que a variável dependente (sinal do analito) seja empregada para prever a concentração, que nesse caso é a variável independente. (GÍRON, 2007)

Na calibração univariada ou de ordem zero, a resposta instrumental do analito r é função da concentração C levando-se em conta o erro (e) experimental (**equação 6**) (LEITÃO, 2005)

$$R = f(C) + e \quad (6)$$

Esse método de calibração normalmente é linear, sendo dessa forma a equação do modelo obtida é um polinômio de primeiro grau, onde os coeficientes normalmente podem ser calculados pelo método de regressão dos mínimos quadrados de modo que o erro do modelo seja minimizado (LEITÃO, 2005).

2.6.1.1. Figuras de Mérito da calibração univariada

2.6.1.1.1. Coeficiente de correlação e de determinação

O R^2 (coeficiente de determinação) pode ser determinado pela **equação 7** (GEMPERLINE, 2006) a seguir:

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} = \frac{SS_{tot} - SS_{resid}}{SS_{tot}} \quad (7)$$

Onde SS_{tot} é a soma quadrática total do modelo e SS_{resid} é a soma quadrática dos resíduos. Já \hat{y} é referente ao valor predito enquanto que y é referente ao valor médio e y_i é referente a valor estimado.

O coeficiente de determinação (R^2) indica qual a porcentagem da variação explicada pela regressão representa a variação total. ⁽⁹⁾

(9) <http://pt.scribd.com/doc/17910359/36/Coeficiente-de-determinacao>

O valor de R^2 pode variar de zero a um dependendo do modelo, sendo que a magnitude do valor desse coeficiente pode indicar a proporção da variação total em y explicada pelo modelo de calibração. Quando esse coeficiente é exatamente igual a 1, existe uma perfeita correlação e os erros residuais são igual a zero. Já quando o coeficiente é igual a zero, significa que o modelo não é capaz de prever y . Desse modo quanto mais próximo de 1 melhor será o modelo. A raiz quadrada do coeficiente de determinação fornece o coeficiente de correlação (R). (GEMPERLINE, 2006)

O coeficiente de correlação r de Pearson mede o grau de associação linear entre duas variáveis. Ele possui duas propriedades importantes: o sinal que quando positivo indica correlação linear positiva, ou seja, à medida que uma variável cresce a outra cresce também. Já quando o sinal é negativo indica uma correlação linear negativa, ou seja, à medida que uma variável aumenta a outra diminui. Já outra propriedade importante é a grandeza que indica o quão próximo da reta estão os pontos individuais caso fosse ajustada uma reta de regressão. O valor desse coeficiente pode variar entre -1 a 1. ⁽⁹⁾

2.6.1.1.2. Linearidade

Consiste no intervalo no qual os sinais instrumentais e a concentração de um determinado analito podem ser relacionadas entre si de um modo diretamente proporcional dentro de um intervalo de concentrações onde o método será aplicado. (FINETE, 2005; VALDERRAMA, BRAGA, POPPI, 2009)

Recomenda-se que seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. ⁽¹⁰⁾

Normalmente a linearidade pode ser inferida pela observação de parâmetros como podem ser observados na **Equação 8** assim como o coeficiente de correlação (R), sendo que a ANVISA recomenda um $R = 0,99$ e o INMETRO um valor de $R > 0,90$. (FINETE, 2005; VALDERRAMA, BRAGA, POPPI, 2009)

$$Y = ax + b \quad (8)$$

(9) <http://pt.scribd.com/doc/17910359/36/Coeficiente-de-determinacao>

(10) http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm

Onde y é a resposta instrumental, a é o coeficiente angular, b é o coeficiente linear e x é a variável independente, normalmente concentração.

2.6.1.1.3. Precisão

Pode ser expressa como o desvio padrão (coeficiente de correlação) ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. A **Equação 9**, que demonstra o cálculo do desvio padrão (s) é a medida mais usada para se estimar a precisão e a variabilidade do método. (VALDERRAMA, BRAGA, POPPI, 2009)

$$s = \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n-1} - \frac{(\sum x_i)^2}{n^2}} \quad (9)$$

Onde \bar{x} é a média aritmética dos resultados e n é igual ao número de amostras.

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de múltipla amostragem de uma mesma amostra. Para determinação dos níveis de precisão é necessário testar a repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade (precisão intracorrída) se traduz na concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Verifica-se, por no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações com três réplicas cada uma ou no mínimo de seis determinações a 100% da concentração nominal do teste. ⁽¹⁰⁾

Já a precisão intermediária é a concordância dos resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes. A avaliação da precisão pode ser efetuada pelo cálculo do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação, sendo o valor admitido pela ANVISA de 5%. ⁽¹⁰⁾

(10) http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm

2.6.1.1.4. Exatidão

Indica o quanto um valor estimado ou medido e o valor de referência concordam. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação entre métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão. (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009)

2.6.1.1.5. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O LD equivale à menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (**Equação 10**), sendo s o desvio padrão e S o coeficiente angular da curva analítica. (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009)

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (10)$$

Já o LQ representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser medida com uma incerteza máxima de 10% (**Equação 11**). (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009)

$$LQ = 10 \frac{s}{S} \quad (11)$$

2.6.1.1.6. Robustez

A robustez de um método é a sua capacidade de resistir a pequenas variações de determinados fatores a que o método pode estar sujeito, tais como temperatura, umidade, analista, etc. O método é tido como robusto quando não é afetado por essas pequenas variações. ⁽¹⁰⁾

(10) http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm

2.6.2. Calibração multivariada

Na calibração multivariada há a medição de duas ou mais variáveis controladas, em função disso, as informações que podem ser extraídas de sinais univariados é bastante limitada quando comparada a dados multivariados (**Figura 18**). (GÍRON, 2007)

Quando uma amostra produz um vetor de dados, como por exemplo, um espectro de J comprimentos de onda de emissão, o conjunto de calibração é uma matriz (tensor de ordem dois, $I \times J$). Para analisar esses dados é necessário se recorrer à calibração multivariada de primeira ordem. (GÍRON, 2007)

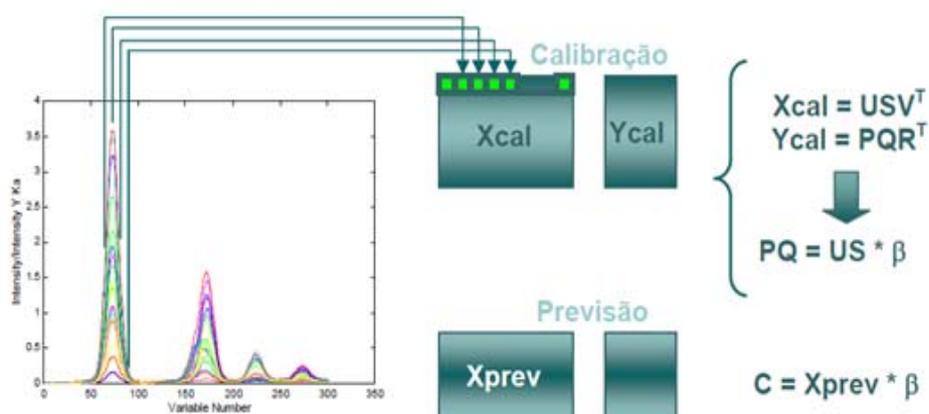


Figura 18: Esquema representativo da calibração multivariada (MALUF, 2008)

Em muitos casos, a separação química e/ou pré-concentração é o procedimento mais adequado para execução de determinados tipos de análises, por mais simples que essas sejam. Mas ao se combinar com métodos quimiométricos de ordem superior com determinadas técnicas analíticas, algumas destas etapas podem vir a ser reduzidas ou até mesmo eliminadas. Isso ocorre quando se emprega os métodos de calibração multivariada, onde várias espécies em um único sistema podem ser identificadas e até mesmo quantificadas sem que haja de fato uma separação química. (TREVISAN, 2003)

Dados de segunda ordem, de um modo geral, são gerados por técnicas hífenadas, tais como espectrômetro de massas seqüencial (MS – MS), cromatografia líquida com detector espectrofotométrico de arranjo de diodos (HPLC – DAD) (TREVISAN, 2003)

Quando se trabalha com fluorescência molecular, um problema que se tem é a sobreposição espectral, principalmente quando se tem matrizes biológicas, visto que as mesmas apresentam um rico espectro natural de fluorescência de fundo, sendo assim necessário se recorrer a ferramentas quimiométricas de calibração multivariada de segunda ordem para que possa ser desenvolvido um modelo adequado. (TREVISAN, 2003)

2.6.2.1. Figuras de Mérito para calibração multivariada

2.6.2.1.1. Sinal Analítico Líquido

O conceito de sinal analítico líquido (NAS – *net analyte signal*) é importante na determinação de algumas figuras de mérito para calibrações multivariadas, tais como cálculo de seletividade e razão sinal/ruído requer o cálculo do NAS de interesse, que é a fração do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos demais compostos que estão presentes na amostra (**Figura 19**). (LORBER, 1986)

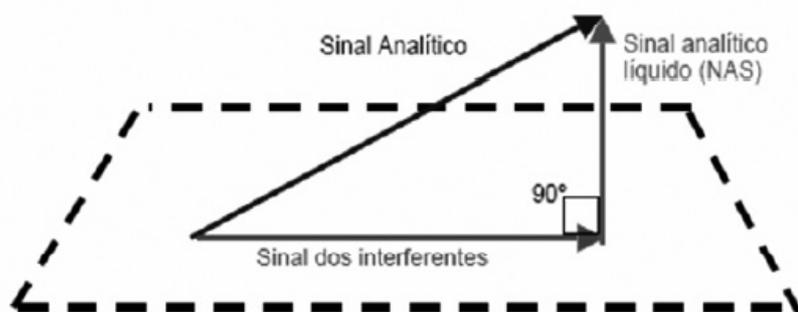


Figura 19: Representação geométrica da propriedade de ortogonalidade do NAS (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009)

Para calcular o NAS podem ser usados diferentes algoritmos de regressão de modo que o NAS seja proporcional a concentração do analito de interesse. Levando-se em conta que o NAS é a única parte do espectro que é utilizada para previsão, nenhuma informação é perdida ao transformar o vetor NAS em um escalar (**equação 12**). (OLIVIERI, 2006)

$$NAS = \|X_{NAS}\| \quad (12)$$

Onde X_{NAS} corresponde ao vetor NAS do analito de interesse X e $\|.\|$ representa a norma Euclidiana (OLIVIERI; FABER, 2009)

O método original proposto por Lorber em 1986 foi desenvolvido para modelos de calibração direta ou baseada em mínimos quadrados clássicos (CLS – *Classical Least Squares*). (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009)

Já em 1997, Wentzel, Andrews e Kowalski propuseram um método para calcular do NAS que implicava no conhecimento do espectro puro do analito de interesse tendo, portanto uma aplicabilidade não muito boa.

O NAS para dados de segunda ordem é análogo ao de dados de primeira ordem no sentido de que buscam informação da parte do sinal que é relacionado à propriedade de interesse, mas o cálculo é diferente. (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009)

Para métodos multivariados, por meio do NAS, pode se obter a sensibilidade, a seletividade, o limite de detecção e a sensibilidade analítica.

2.6.2.1.2. Sensibilidade

Corresponde a fração do sinal responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração à propriedade de interesse (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

Olivieri e Faber (2009) propuseram uma equação geral (**equação 13**), para que fosse possível calcular a sensibilidade de modelos de calibração de segunda ordem independentemente do método utilizado para calcular o NAS.

$$SEN = 1/b \quad (13)$$

Onde b é vetor dos coeficientes de regressão.

2.6.2.1.3. Seletividade

É a medida do grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e os interferentes presentes na amostra indicando, também, a parte do sinal que é

perdida por essa sobreposição, podendo ser definida pela **equação 14** (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

$$SEL = \frac{n\hat{s}_{k,i}}{\|x_{k,i}\|} \quad (14)$$

Onde $\hat{s}_{k,i}$ é o valor escalar do sinal analítico líquido para a amostra i , enquanto que $x_{k,i}$ é o vetor de resposta instrumental para a amostra i .

2.6.2.1.4. Sensibilidade Analítica

Apresenta a sensibilidade do método em termos de unidade de concentração que é utilizada, sendo definida como a razão entre a sensibilidade e o desvio padrão do sinal de referência de acordo com a **equação 15**. (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

$$\gamma = SEN / \varepsilon = SEN / \|\delta k\| \quad (15)$$

Onde δk é referente ao desvio padrão do sinal de referencia estimado

Já o inverso desse parâmetro permite estabelecer a menor diferença de concentração entre amostras, a qual pode ser distinguida pelo método (ROCHA, 2007).

2.6.2.1.5. Exatidão e Robustez

Indica o quanto um valor estimado ou medido e o valor de referência concordam (**Equação 16**). Comumente aplicado em calibração multivariada, é calculada como a raiz quadrática do erro médio quadrático de predição (RMSEP) (BRAGA; POPPI, 2004)

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (16)$$

Na qual y é o valor estimado e \hat{y} é o valor predito e n é o número de amostras de validação.

Consiste em testar a performance do modelo de calibração multivariada frente a alguns tipos de variações e verificar se são ou não significativas (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009)

2.6.2.1.6. Precisão

Da mesma forma que na calibração univariada, os ensaios de precisão também servem para expressar o grau de concordância entre os resultados de uma série de medidas, sendo usados três níveis de concentrações diferentes sendo três replicatas de cada, tendo-se o cuidado de se trabalhar dentro da faixa de concentração do modelo usado. (SENA *et al*, 2007)

2.6.2.2. Análise dos Fatores Paralelos (PARAFAC)

É um método de decomposição que pode ser comparado com o modelo PCA. Foi proposto de forma independente em 1970 por Harshamn, por Carroll e Chang, os quais renomearam esse modelo como Decomposição Canônica. Inicialmente surge como um método de análise multivariada no campo da psicometria. (GIL, 2005)

O método de calibração multivariada PARAFAC é um método de decomposição para estruturas de três ou mais dimensões e pode ser visto como uma generalização da análise dos componentes principais a estruturas de ordem superior (LEITÃO, 2005)

Para o caso da análise de dados de três vias (ou dados de segunda ordem), a decomposição de dados se faz em tríades ou componentes trilineares (**Figura 20**). Em lugar de um vetor *loading* e um *score*, como no PCA, cada componente consiste em um vetor *score* e dois vetores *loading* (GIRÓN, 2007)

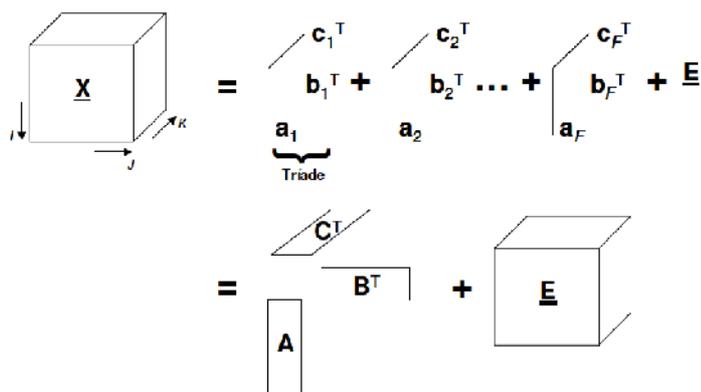


Figura 20: Representação geométrica do modelo PARAFAC - decomposição de um arranjo de dados tridimensionais em F triades de vetores peso (BERNARDES, 2009)

No modelo de PARAFAC se define um elemento genérico X_{ijk} para o tensor \underline{X} como (**Equação 17**): (GIRÓN, 2007)

$$\underline{X}_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{ni} b_{nj} c_{nk} + E_{ijk} \quad (17)$$

Onde N é o número total de componentes químicos que produz a resposta ou sinal; E_{ijk} , é um elemento de erro residual do tensor \underline{E} (com as mesmas dimensões que \underline{X}), a_{ni} , b_{nj} e c_{nk} são os elementos dos vetores coluna a_n , b_n e c_n . Os quais correspondem a: concentrações relativas [(I + 1)x1], os perfis de emissão (Jx1) e os perfis temporais (Kx1), para cada um dos N componentes, respectivamente. Os vetores coluna a_n , b_n e c_n se recorrem na matriz dos *scores* **A** (contendo as concentrações relativas dos componentes) e as matrizes dos *loadings* **B** e **C** (com as colunas normalizadas a uma unidade). (GIRÓN, 2007)

Um dos principais inconvenientes que se podem encontrar no PARAFAC é a seleção do número adequado de componentes. De maneira que a aplicação do PARAFAC não é simples. Existem diversos métodos para efetuar essa seleção, mas, devido à complexidade do problema, nenhum deles pode garantir os resultados em todas as circunstâncias. (GIRÓN, 2007)

Um dos métodos é denominado *diagnóstico da consistência do modelo* ou como é mais conhecido *Core Consistency (CC)*, que se aplica a análise multivariada

de três vias, especialmente o PARAFAC. A expressão desse parâmetro (**equação 18**) (GIRÓN, 2007)

$$CC = 100 \left(1 - \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K (c_{i,j,k} - s_{i,j,k})^2}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K (c_{i,j,k})^2} \right) \quad (18)$$

Onde $C_{i,j,k}$ é o elemento da matriz e \mathbf{S} é a matriz superdiagonal contendo valores igual a unidade na diagonal e zero nas demais posições para ajuste do PARAFAC

2.6.2.3. Adição de padrão de segunda ordem

O método da adição de padrão é aplicado a dados univariados a fim de superar o efeito da matriz que afeta a maneira pela qual o instrumento responde ao analito. Para que o método seja bem sucedido, o instrumento deve responder linearmente ao aumento da concentração do analito e quando a concentração do mesmo for zero, o sinal instrumental também deve ser. Desse modo, a estimativa da concentração é obtida através da relação entre resposta instrumental (sinal) X quantidade de padrão adicionada. (BERNARDES, 2009)

O método da adição de padrão é aplicado a dados univariados como um meio de superar o efeito de matriz, que afeta a maneira pela qual o instrumento responde ao analito. Esse método requer duas condições para o sucesso da calibração: o primeiro seria que o instrumento deve responder linearmente ao aumento da concentração do analito; quando a concentração do analito for zero, a resposta instrumental também deve ser igual a zero. A estimativa então do analito na amostra é obtida através de um gráfico de resposta instrumental em função da quantidade de padrão adicionada (SENA; TREVISAN; POPPI, 2005).

Em 1979, Saxberg e Kowalski propuseram uma extensão do método de adição de padrão a dados multivariados, o método da adição de padrão generalizada (GSAM – *Generalized Standard Addition Method*). O GSAM requer que tanto o analito quanto os interferentes sejam adicionados à amostra de forma seqüencial. Isto faz com que a restrição que o método analítico seja inteiramente

seletivo para o analito de interesse seja atenuada. Entretanto resultados adequados não são obtidos se houver alguma fonte de sinal instrumental não calibrada.

Já em 1995, Booksh *et al* propuseram uma extensão do método da adição de padrão só que para dados multidimensionais que ficou conhecido como método da adição de padrão de segunda ordem (SOSAM – *second order standard addition method*). Tal método usa a decomposição direta trilinear (DTD) como meio de decompor os dados.

3 DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE NORFLOXACINO EM MEDICAMENTOS E FLUÍDOS BIOLÓGICOS (URINA) POR ESPECTROFLUORESCÊNCIA MOLECULAR E HPLC

3.1 Quinolonas e fluorquinolonas

A história dos antibióticos tem início com uma observação de Alexander Fleming, em 1921, de meios de cultura antigos esquecidos no seu laboratório. Quando regressou de férias, constatou que estes tinham fungos e que, na sua proximidade, as bactérias não se desenvolviam. Fleming isolou estes fungos (da família do *Penicillium*), de onde nasceu o primeiro antibiótico da História: a penicilina, tendo sido premiado por esta descoberta com o Prêmio Nobel de Medicina em 1945. Fleming rapidamente se apercebeu que esta substância não era eficaz contra todas as bactérias. Além disso, se fosse usada em doses baixas ou durante um curto período de tempo, fazia com as bactérias adquirissem resistências. Por esta razão, preconizou o uso da penicilina apenas quando houvesse razão evidente para tal e nunca em baixas quantidades ou num curto período de tempo. Em 1962, George Lesher descobre o ácido nalidíxico (**Figura 21**), precursor de todas as quinolonas, durante a síntese de cloroquina. (PEREIRA, 2009)

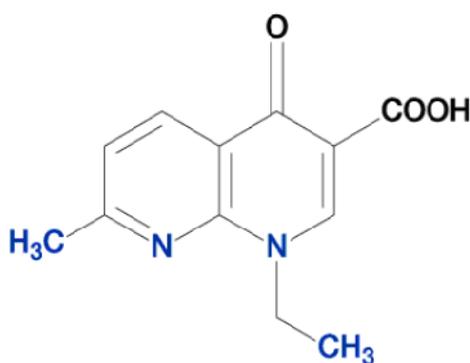


Figura 21: Estrutura do ácido nalidíxico (PEREIRA, 2009)

A princípio o ácido nalidíxico foi usado para infecções renais, já que havia uma forte ligação entre ele e as proteínas plasmáticas e a fraca distribuição por todos os tecidos era um impedimento para outros usos do medicamento que não fossem infecções do trato urinário causadas por bactérias Gram – negativas. (PEREIRA, 2009)

Quinolonas compreendem um interessante grupo de antibacterianos cuja ação é baseada na atividade do seu anti-DNA. Todos eles possuem um grupo carboxílico na posição 3 e uma carbonila na posição 4, tanto que são chamadas como 4-quinolonas. (SALEM, 2005)

Nos anos 70 são descobertas quatro novas quinolonas, entre elas, o ácido pipemídico, o ácido oxolínico e a cinoxacina. (PEREIRA, 2009)

Em função das limitações no que diz respeito a sua absorção e distribuição e por ter um espectro de ação limitado, este fármaco (ácido nalidíxico) somente é eficaz em doenças do trato urinário, mas em 1980, a adição de um átomo de flúor na posição 6 e a adição de um anel piperazina na posição 7 da estrutura da quinolona básica proporcionou um aumento na capacidade absorção e distribuição nos tecidos, tornando-se também eficaz contra organismos *Pseudomonas aeruginosa* e cocos Gram positivos. Essas quinolonas ao receberem um átomo de flúor passam a ser chamadas de fluorquinolonas. (CARRILLO, 2008)

As fluorquinolonas são fármacos antimicrobianos bactericidas com excelente atividade frente a um amplo espectro de bactérias aeróbias. Devido a sua baixa porcentagem de união a proteínas plasmáticas têm volume de distribuição elevado e apresentam boa penetração em células e tecidos. São agentes valiosos no tratamento de infecções causadas por bactérias intracelulares. São úteis no tratamento de infecções do aparelho respiratório e urinário. Há um grande interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novas fluorquinolonas. (CARRILLO, 2008)

Na **Tabela 2** pode-se observar a divisão das quinolonas de uso humano nas suas quatro gerações.

Tabela 2: Gerações das quinolonas. (PEREIRA, 2009)

Quinolonas	Fluorquinolonas	1 ^a Geração	Cinoxacino; Flumequino; Ácido Nalidíxico; Ácido Oxolínico; Ácido Pipemídico; Ácido Piromídico; Rosoxacino
		2 ^a Geração	Ciprofloxacino; Enoxacino; Fleroxacino; Lomefloxacino; Nadifloxacino; Ofloxacino; Norfloxacino ; Pefloxacino; Rufloxacino
		3 ^a Geração	Balofloxacino; Grepafloxacino; Levofloxacino; Pazufloxacino; Sparfloxacino; Temafloxacino; Tosufloxacino;
		4 ^a Geração	Clinafloxacino; Garenoxacino; Gemifloxacino; Moxifloxacino; Gatifloxacino; Sitafloxacino; Trovafloxacino; Alatrofloxacino; Prulifloxacino

1^a Geração (antigas quinolonas): são utilizadas exclusivamente como antisépticos urinários porque não alcançam níveis séricos suficientes e são eliminadas pela urina na forma ativa. Todas elas são administradas somente por via oral. (GÓMEZ, 2005)

2^a Geração: são fluorquinolonas monofluoradas. Comparadas com as anteriores têm uma atividade mais potente, um maior espectro antibacteriano, uma semi vida maior e, com exceção do norfloxacino e enoxacino, alcançam bons níveis séricos, com o que é possível tratar infecções sistêmicas. (GÓMEZ, 2005)

3^a Geração: são as fluorquinolonas bi ou trifluoradas. Comparadas com as anteriores, algumas apresentam uma semi vida maior e outras um maior espectro antibacteriano, que em alguns casos inclui bactérias Gram positivas e anaeróbias. (GÓMEZ, 2005)

4ª Geração: Apontam uma melhora na atividade frente à Gram positivas e boa atividade frente a anaeróbias. (GÓMEZ, 2005)

3.1.1. Norfloxacino

O Norfloxacino (NOR), cuja massa molecular é de 319,24 g/mol ($C_{16}H_{18}FN_3O_3$), é uma fluorquinolona que exibe alta atividade antimicrobiana in vitro contra uma larga variedade de bactérias Gram negativas e positivas. (SHAO *et al*, 2007)

O NOR (**Figura 22**) é muito utilizada tanto no tratamento de humanos quanto de animais, sendo a urina seu principal meio de excreção tendo sido encontradas pequenas quantidades encontradas no plasma após uma dose oral única (400 mg). (BORREGO; DÍAZ, M.; DÍAZ, D., 1997)

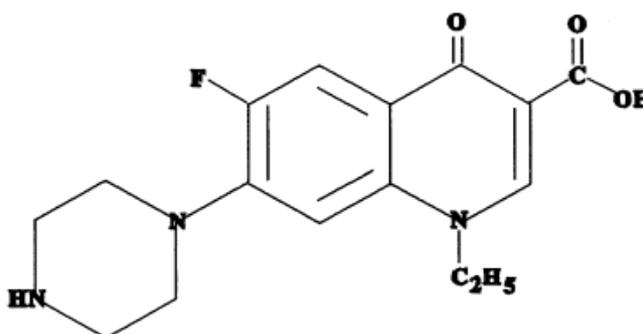


Figura 22: Estrutura do Norfloxacino (BORREGO; DÍAZ, M.; DÍAZ, D., 1997)

O NOR é uma fluorquinolona zwitteriônica em pH neutro e possui ação antibacteriana e antitumoral e a sua complexação com metais pode acarretar no aumento de sua atividade. Na sua estrutura química, há dois grupos funcionais correspondentes a dois equilíbrios químicos de ionização; o grupo carboxílico (na posição 3) e o grupo amina. Por possuir esses grupos ionizáveis, a NOR é positivamente carregada em pH ácido e negativamente carregada em pH básico. (LACHTER *et al*, 2009)

De acordo com Barbosa *et al* (1999), as fluorquinolonas podem ser encontradas nas formas: protonada (quando em meio ácido), zwitteriônica (quando em meio fracamente ácido ou neutro) e aniônica (quando em meio básico). As constantes de ionização do NOR são referente a grupo 3 – carboxil e ao 7 –

piperazina. O esquema de protonação/desprotonação do NOR pode ser observado a seguir (**Figura 23**). Os valores de pK_A do NOR são respectivamente 6,3 (pK_A do grupo carboxílico) e 8,38 (pK_A do grupo piperazina).

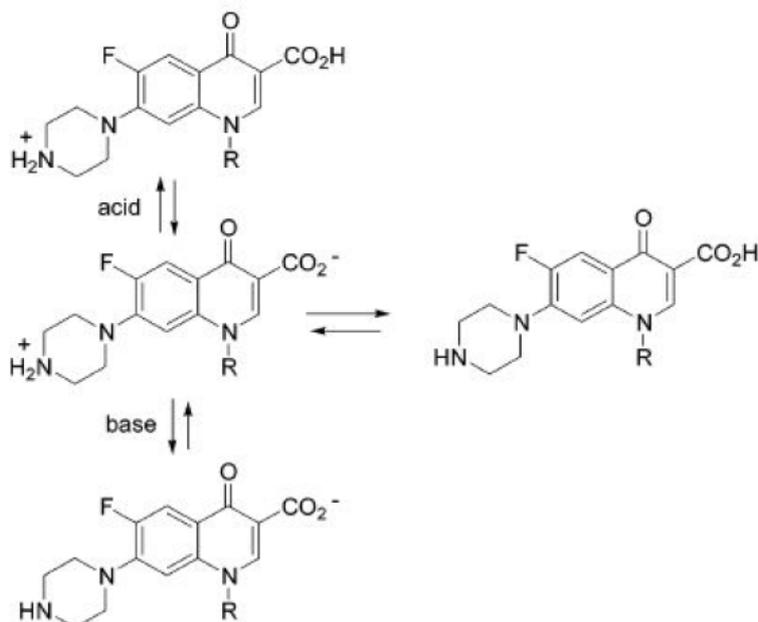


Figura 23: Protonação/Desprotonação das fluorquinolonas (*acid* corresponde a meio ácido)

Dessa forma, em meio ácido, com pH em torno de 4, por exemplo, o grupo carboxílico ainda não sofre dissociação, o que só ocorre em meio fracamente ácido (pH em torno de 6 – próximo do pK_A). Do mesmo modo, que em meio alcalino, ocorre a desprotonação da piperazina, visto que o pK_A da mesma é 8,38. Desse modo em valores muito altos de pH (acima de 9), o NOR se encontra na forma aniônica e a fluorescência do NOR praticamente se extingue.

3.1.2. Metodologias utilizadas para determinação de norfloxacin

Diversos métodos são empregados para determinar o NOR em cápsulas ou amostras biológicas por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC, fluorimetria, espectrometria de massas e espectroscopia de absorção atômica. (SHAO *et al*, 2007)

Os maiores benefícios da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) são a especificidade, rapidez e sensibilidade. Em função do curto tempo requerido para

a análise usando HPLC e do seu grande potencial para a separação e/ou detecção de antibióticos, muitas pesquisas focaram na técnica para determinação em vários fluidos biológicos de algumas fluorquinolonas tais como norfloxacino, ofloxacino, ciprofloxacino, pefloxacino, amifloxacino, fleroxacino, difloxacino, lomefloxacino e rufloxacino (CARLUCCI, 1998)

Kassab *et al* (2005) desenvolveram uma metodologia para determinação de ciprofloxacino e norfloxacino em amostras farmacêuticas fazendo uso da técnica HPLC.

Já Bedor *et al* (2007) desenvolveram e validaram um método para quantificação de norfloxacino por HPLC e posteriormente aplicaram a estudos de farmacocinética comparada em voluntários humanos.

Foi publicada uma extensa revisão contendo 270 referências sobre os métodos analíticos para a determinação de quinolonas e fluorquinolonas, até o ano de 1999, incluindo o Norfloxacino. Segundo ele, a determinação de NOR é abordada na Farmacopéia dos Estados Unidos da América (U.S.P.) sendo esses métodos oficiais baseados na espectrofotometria de absorção no UV – VIS ou por titulação potenciométrica no caso de determinação de NOR em preparações farmacêuticas. (SOUZA, 2008)

O progresso na análise de quimiluminescência por injeção de fluxo tem recebido muita atenção na análise farmacêutica graças a alta sensibilidade agilidade e simplicidade do método. Para determinação de norfloxacino, diferentes sistema quimiluminescentes têm sido propostos, incluído Ce(IV) – Na₂SO₃, Tb (III) – nitrato e H₂O₂ – luminol. (SHAO *et al*, 2007)

Eletroforese capilar é muito usada na determinação de fármacos, mas os estudos têm usualmente sido limitados a separação de apenas algumas quinolonas e fluorquinolonas. Um estudo foi feito para a determinação de ciprofloxacino. Em 1997, foi otimizada a separação eletroforética capilar de 14 quinolonas. (FIERENS; HILLAERT; VAN DEN BOSSCHE, 2000)

A fim de isolar uma substância dentre muitas presentes na complexa mistura que é a urina é necessário recorrer a processos lentos e dispendiosos (isolamento, purificação e modificação química). Uma definição gráfica da composição da urina por meio de técnicas fluorescentes representa uma nova filosofia na análise bioquímica da urina. (DUBAYOVÁ; KUSNÍR; PODRACKÁ, 2003)

Alguns componentes da urina fluorescem, podendo ser a mesma descrita graficamente por meio de uma matriz de emissão e excitação ou então por um espectro de fluorescência sincronizada. (DUBAYOVÁ; KUSNÍR; PODRACKÁ, 2003)

Pauliukonis *et al* (1984) descreveram uma técnica de HPLC de fase reversa para quantificação de NOR em plasma humano e urina usando o ácido pipemídico como padrão interno. Já Gutzel *et al* (1984) descreveram um método para determinação de NOR em plasma humano e urina usado extração de fase sólida para uma preparação da amostra seguida de HPLC com detecção de fluorescência, obtendo um limite de detecção de NOR de $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ no plasma e de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ na urina.

Houve também um método usando HPLC utilizado para determinação de NOR em fluidos biológicos desenvolvida por Morton *et al* (1986). Já Forchetti *et al* (1984) criaram um método no HPLC para determinação de NOR em soro, urina ou tecido onde não havia a inclusão de um padrão interno, mas requeria múltiplas extrações com diclorometano e NaOH antes da análise.

Com relação às amostras analisadas, verifica-se que na análise química farmacêutica, diversas substâncias terapeuticamente ativas são analisadas na matéria prima, formulações farmacêuticas, amostras sintéticas e amostras biológicas (soro sanguíneo e urina). Normalmente em matrizes biológicas é feita uma diluição e/ou fortificação da amostra. (LEITÃO, 2005)

São encontradas na literatura algumas referências que focam especificamente a modelagem por PARAFAC e algumas referências sobre aspectos gerais da modelagem como a determinação do número de componentes e o pré – processamento das matrizes. Outras citações são a respeito do uso da modelagem por PARAFAC de dados tridimensionais obtidos por fluorescência. (LEITÃO, 2005)

Quando se trabalha com fluorescência molecular, um problema que aparece é a sobreposição espectral, principalmente quando matrizes biológicas estão envolvidas, pois as mesmas possuem um rico espectro de fluorescência de fundo, com diversos interferentes. Para isso, é necessário recorrer à ferramentas quimiométricas (calibração multivariada) onde se emprega todo o espectro para desenvolvimento do modelo. (TREVISAN, 2003)

A fluorescência associada à quimiometria facilita a criação de metodologias alternativas, onde talvez se possa descartar as etapas de separação física e/ou pré-concentração. (TREVISAN, 2003)

3.2 Objetivos do capítulo

- Quantificar o fármaco Norfloxacino no medicamento e em urina humana através de espectrofluorescência com auxílio de calibração multivariada de 2ª ordem
- Validação da metodologia desenvolvida por cromatografia líquida de alta eficiência

3.3 Materiais e métodos

3.3.1. Materiais e métodos para quantificação de NOR por espectrofluorescência

O padrão de Norfloxacino usado no trabalho foi da SIGMA – ALDRICH (STEINHEIM, ALEMANHA). E o medicamento usado foi o antibiótico Norfloxacino (EMS) com teor de 400 mg. Para todos os ensaios onde foi necessário, se usou água purificada (Gehaka – osmose reversa). Para dissolver tanto o padrão como o medicamento foi necessário o uso de etanol 95% UV/HPLC Grau Espectroscópico (VETEC) em uma solução 1:1 com água purificada. Para fazer a medição da massa tanto para preparar a solução estoque do padrão quanto para pesagem do medicamento se usou uma balança analítica (Mettler Toledo AL204).

Para o preparo das soluções tampão foram usados os seguintes reagentes: Ácido clorídrico (VETEC), Ftalato Ácido de Potássio (May & Baker LTDA), Dihidrogenofosfato de Potássio (May & Baker LTDA), Hidróxido de Sódio P.A (VETEC) e Tetraborato de Sódio Decahidratado (VETEC).

Para melhor dissolução do analito das soluções estoque foi feito uso do ultrassom (Ultrasonic Clear Branson 2000) e para proteger a solução da luz, já que o Norfloxacino é fotossensível, revestiu-se o balão volumétrico com papel alumínio. No caso do medicamento, devido aos excipientes do mesmo, foi necessário efetuar uma filtração da solução sendo necessário para tal um filtro milipore de acetato de celulose de 0,75 µm.

Para os ensaios com urina foram usadas amostras de urina de oito pessoas diferentes (de ambos os sexos) sendo que todas eram saudáveis e não faziam uso de quaisquer medicamentos.

Para efetuar as análises tanto dos padrões aquosos, quanto do medicamento e da urina foi usado um espectrofotômetro modelo Fluorat 02 da Panorama (Lumex,

Rússia), tendo sido a solução a ser analisada colocada em uma cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm.

3.3.2. Materiais e métodos para quantificação de NOR por HPLC

Para efetuar também a análise dos padrões aquosos bem como do medicamento para fins de comparação foi usado também um cromatógrafo modelo HPLC *Agilent Technologies 1260 Infinity*. A coluna usada foi uma modelo RP18 S 250 x 4,6 mm (5 μ m) – *Microsorb 100*. A fase móvel era constituída de água, metanol (Grau HPLC/Espectroscópico, Tedia, Brasil) e trietilamina (Sigma – Aldrich). O pH final da mistura foi ajustado para 3,3 com ácido fosfórico (VETEC). A vazão da fase móvel era de 1 mL/min e o volume de injeção foi de 20 μ L. A temperatura usada para efetuar as análises foi de 30° C (\pm 2) Todas as soluções antes de serem utilizadas foram filtradas, usando-se filtro para solvente aquoso (filtro de nitrato de celulose de 0,45 μ m, *Sartorius Stedim Biotech*) ou filtro para solvente orgânico (Durapore PVDF de 0,45 μ m de poro – hidrofóbica) com auxílio de uma bomba de vácuo (modelo *Quimis*) e sonicadas em um ultrasom (Ultrasonic Clear Branson 2000). A detecção UV/Vis foi feita em 279 nm.

3.4 Procedimento experimental

3.4.1. Testes preliminares para quantificação de NOR por espectrofluorescência

Para preparar a solução estoque de NOR de 100 mg.L⁻¹ foi feita uma medição de 10 mg na balança analítica e, posteriormente, essa massa foi solubilizada em uma mistura 1:1 de água e etanol (100 mL). Para isso, foi necessário usar um ultrasom. Posteriormente, foi feita uma diluição a fim de atingir uma solução de 1 mg.L⁻¹ (1000 μ g. L⁻¹). A fim de verificar qual era o valor de pH que fornecia os melhores valores de intensidade de emissão, foi feito um estudo preliminar preparando amostras contendo 50 μ g. L⁻¹ de NOR com diferentes tampões (com valores de pH = 4, 6, 8 e 10). Os tampões foram preparados a partir das soluções estoque de Cloreto de Potássio (0,2 mol.L⁻¹), Ácido Clorídrico (0,2 mol.L⁻¹), Ftalato Ácido de Potássio (0,1 mol.L⁻¹), Dihidrogenofosfato de Potássio (0,1 mol.L⁻¹), Hidróxido de Sódio (0,1 mol.L⁻¹), Ácido Clorídrico (0,1 mol.L⁻¹) e Tetraborato de

Sódio Decahidratado ($0,025 \text{ mol.L}^{-1}$). O preparo dos mesmos pode ser observado a seguir na **Tabela 3**. Todas as soluções foram avolumadas para 100 mL.

Tabela 3: Preparo dos tampões

pH da solução	Modo de preparo
4	50 mL de ftalato ácido de potássio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ + 0,1 mL de HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$
6	50 mL de ftalato ácido de potássio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ + 5,6 mL de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$
8	50 mL de dihidrogenofosfato de potássio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ + 46,1 mL de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$
10	50 mL de tetraborato de sódio decahidratado $0,025 \text{ mol.L}^{-1}$ + 18,3 mL de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$

3.4.2. Quantificação de NOR em padrão aquoso

3.4.2.1. Por espectrofluorescência

Após fixar o valor ótimo de pH, foram preparadas soluções (a partir da solução estoque de $1000 \mu\text{g. L}^{-1}$) com concentrações de 50, 100 (A e B), 150, 200 (A e B), 250, 300 e $500 \mu\text{g. L}^{-1}$ e adicionadas a todas as soluções um volume de 2 mL do tampão. O procedimento para preparação dessas soluções foi o mesmo utilizado para teste de pH, variando-se apenas a quantidade da alíquota da solução estoque de NOR adicionada para o preparo do tampão (a quantidade de tampão adicionada bem como o volume final da solução foi o mesmo). Todas as concentrações foram preparadas em triplicata para análise. O branco utilizado foi o tampão.

Com isso foi possível proceder com as análises dessas soluções no espectrofluorímetro (usando sensibilidade baixa). Para isso, foi feita uma varredura de 240 – 370 nm (com intervalo de 2 nm – 240:2:370) para excitação e 380 – 500 nm para emissão (com intervalo de 1 nm – 380:1:500) .

3.4.2.2. Por HPLC

Para preparar a solução estoque do padrão de NOR foi medida uma massa de 10 mg na mesma balança utilizada para a espectrofluorescência e foi dissolvida em 100 mL de metanol tendo – se uma solução estoque de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Essa solução foi posteriormente diluída para $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a partir dessa solução foram preparadas as soluções utilizadas para construção da curva analítica. Foram preparadas soluções de concentrações de 1, 5, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Cada solução foi preparada em triplicata. O pH da fase móvel foi igual a 3,3 tendo sido ajustado para tal valor com ácido fosfórico $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

3.4.3. Quantificação de NOR em medicamento

3.4.3.1. Por espectrofluorescência

Para preparar a solução estoque, foram triturados 10 comprimidos, a fim de garantir a homogeneidade, e em seguida foi medida na mesma balança utilizada para preparar a solução com o padrão de NOR, uma massa equivalente à massa média dos comprimidos que foi solubilizada da mesma forma que o padrão aquoso. Levando-se em consideração que o teor de NOR no medicamento era de 400 mg e o volume final da solução era de 100 mL, a concentração da solução estoque era de $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Dessa forma, com as diluições apropriadas, foram preparadas soluções com concentrações de 50, 100 (A e B), 150, 200 (A e B), 250, 300 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ nas quais também foi fixado o valor do pH (valor ótimo) e então foi feita a análise das soluções no espectrofluorímetro.

3.4.3.2. Por HPLC

Para preparar a solução estoque de medicamento, foi utilizado o mesmo procedimento utilizado para a espectrofluorescência, mas a solubilização do medicamento foi feita usando apenas metanol. A partir da solução preparada inicialmente ($4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi preparada uma solução estoque de concentração igual a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a partir dessa solução foram preparadas as soluções para construção da curva analítica do medicamento. As concentrações utilizadas foram 5,

10, 15, 20 e 25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, todas com seis réplicas. Novamente, o pH da fase móvel foi ajustado para 3,3 com ácido fosfórico 0,1 $\text{mol}.\text{L}^{-1}$.

3.4.4. Quantificação de NOR em urina

3.4.4.1. Por espectrofluorescência

Após a determinação de NOR em medicamento foi realizado um procedimento para determinação de NOR em fluidos biológicos (urina). Para realizar tal procedimento, foram coletadas oito amostras de urina (quatro amostras do sexo masculino e quatro amostras do sexo feminino) de pessoas saudáveis e que não faziam uso de qualquer tipo de medicamento. Usando o método de adição de padrão foi adicionado um determinado teor de NOR para cada amostra. A faixa de concentração trabalhada foi de 0 – 500 $\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$.

Para cada amostra foi feita uma curva analítica e todas as análises foram feitas em triplicata. Foram investigados dois tipos de diluição para a urina (500X e 1000X). A solução final era constituída de um determinado volume de urina (em função da sua diluição), diferentes teores de NOR (exceto para o branco), acrescidos de 2 mL da solução tampão do pH escolhido previamente, sendo a solução avolumada para 10 mL com água purificada. Na **Tabela 4**.

Tabela 4: Preparo das soluções contendo urina como matriz.

Paciente	Faixa de concentração ($\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$)
1	0 – 150
2	50 – 200
3	100 – 250
4	150 – 300
5	200 – 350
6	250 – 400
7	300 – 450
8	350 – 500

Para todos os pacientes além da análise das soluções incrementadas com NOR também foi feita a leitura do branco (urina + solução tampão). A sensibilidade usada para fazer as determinações foi a mesma utilizada nas análises das soluções de padrão de NOR e medicamento (sensibilidade baixa) e todas as análises foram feitas em triplicata.

3.4.4.2. Por HPLC

Para se realizar a determinação de NOR em urina, se usou a mesma metodologia adotada para análise de medicamento, no tocante a fase móvel (vazão, composição, pH), temperatura e comprimento de onda para leitura.

Foram recolhidas amostras de urina de oito pessoas saudáveis que não faziam uso de quaisquer medicamentos. Cada amostra foi diluída em dois níveis diferentes (500 e 1000 X) assim como foi feito na determinação de NOR em urina por espectrofluorescência. A cada amostra diluída foi acrescentado um teor diferente de padrão de NOR (enriquecimento da amostra). Todas as análises foram feitas em quintuplicata assim como a análise do branco (urina sem adição de padrão de NOR)

3.5 Resultados e discussões

3.5.1. Testes preliminares para quantificação de NOR por espectrofluorescência

Com base nos resultados obtidos das medições das soluções contendo padrão de NOR foi possível observar que o pH que fornecia o melhor resultado era o de pH = 6, o que pode ser observado na **Figura 24**.

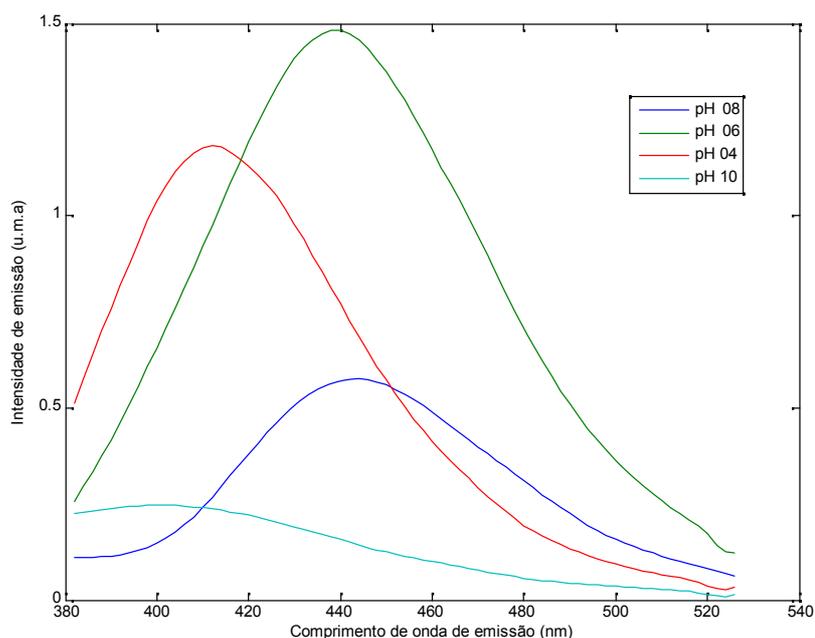


Figura 24: Influência do pH no espectro da NOR

Em função disso, o valor do pH foi fixado em 6 para o preparo das soluções utilizadas para construção da curva analítica do padrão de NOR. E, embora em pH = 4 a intensidade de emissão seja relativamente alta, foi no pH = 6 que ela atingiu um valor máximo. Da mesma forma que para valores muito básicos de pH (no caso do estudo realizado, pH 10), a fluorescência do NOR praticamente se extingue, indicando que para valores muito altos de pH se tem uma espécie praticamente não fluorescente.

3.5.2. Quantificação de NOR em padrão aquoso

3.5.2.1. Por espectrofluorescência

Na **Figura 25** a seguir, é possível observar os espectros de emissão do padrão de NOR nas diferentes concentrações medidas.

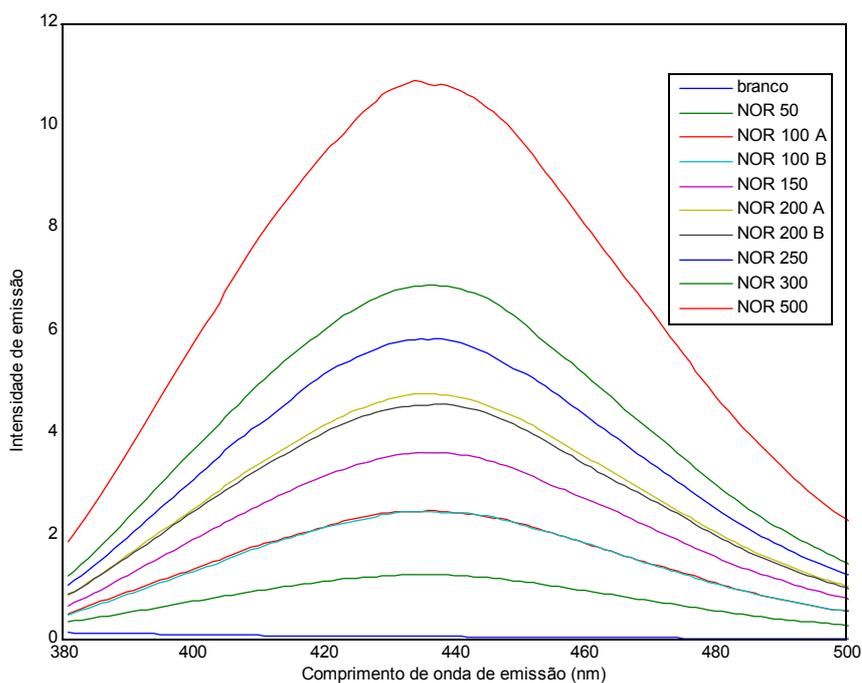


Figura 25: Espectros das soluções de NOR (pH = 6)

É possível observar o aumento da intensidade de emissão à medida que se tem um aumento da concentração do padrão de NOR, o que já era esperado, visto que a concentração do analito, no caso o NOR irá influenciar na intensidade de fluorescência.

Com base nos resultados obtidos foi possível construir a curva analítica do padrão de NOR (**Figura 26**). Foram feitas análises em triplicata de cada amostra e dez medidas do branco (tampão diluído em água sem NOR) a fim de calcular os limites de detecção e quantificação.

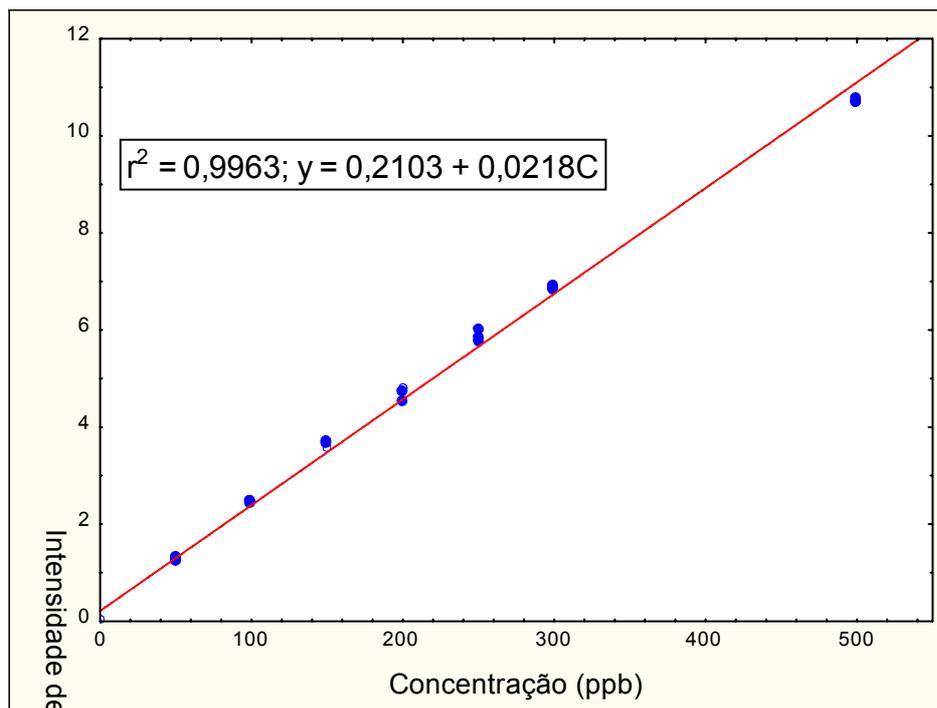


Figura 26: Curva analítica do padrão de NOR

Já no Figura 27 é possível observar os resíduos gerados pelo modelo. Com base no gráfico obtido pode-se concluir que os resíduos não apresentam tendência, sendo portanto o modelo obtido adequado.

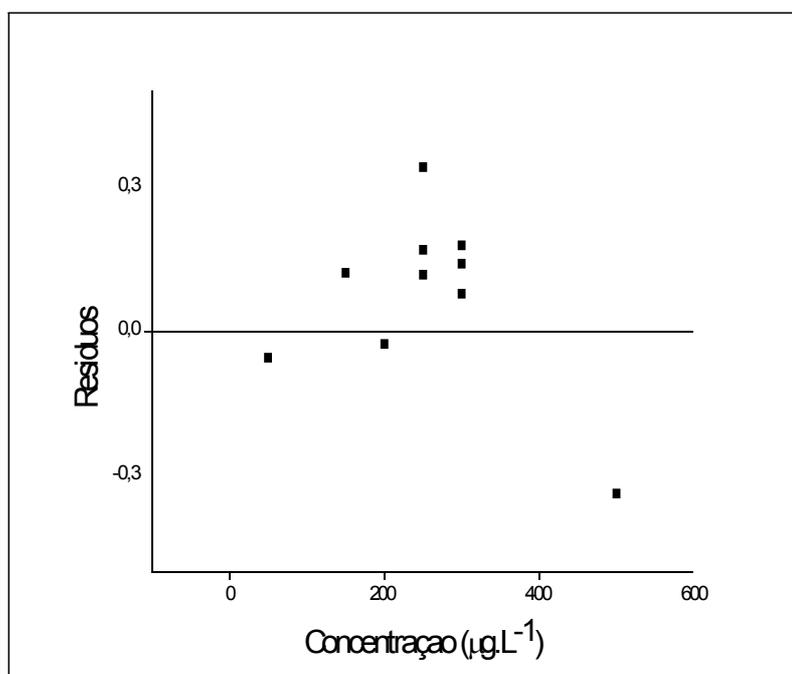


Figura 27: Resíduos para padrão de NOR por espectrofluorescência

De acordo com os dados usados para construção do gráfico, obteve-se um coeficiente correlação $R = 0,9981$, o que mostra que o modelo é linear na faixa de trabalho escolhida ($0 - 500 \mu\text{g.L}^{-1}$). Dessa forma, foram realizados os estudos na mesma faixa para o medicamento.

3.5.2.2. Por HPLC

Na **Figura 28** é possível observar um cromatograma de uma amostra de NOR cuja concentração era de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

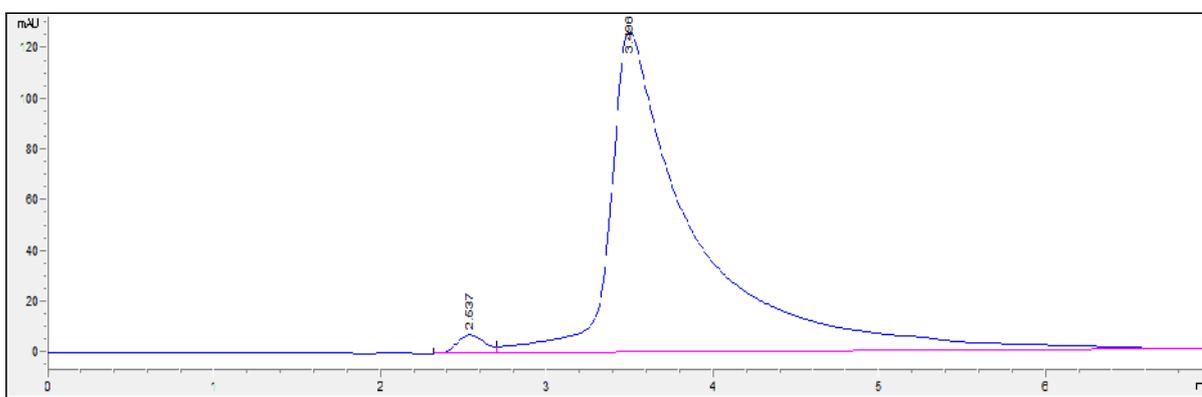


Figura 28: Cromatograma de uma amostra de padrão de NOR de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O primeiro pico que aparece no cromatograma é referente à fase móvel utilizada e o segundo pico referente ao NOR. Para ter certeza que o segundo pico era referente à NOR foi feita uma corrida usando somente a fase móvel.

Com base nos dados obtidos foi possível construir uma curva analítica (**Figura 29**) relacionando a área do pico com a concentração de NOR.

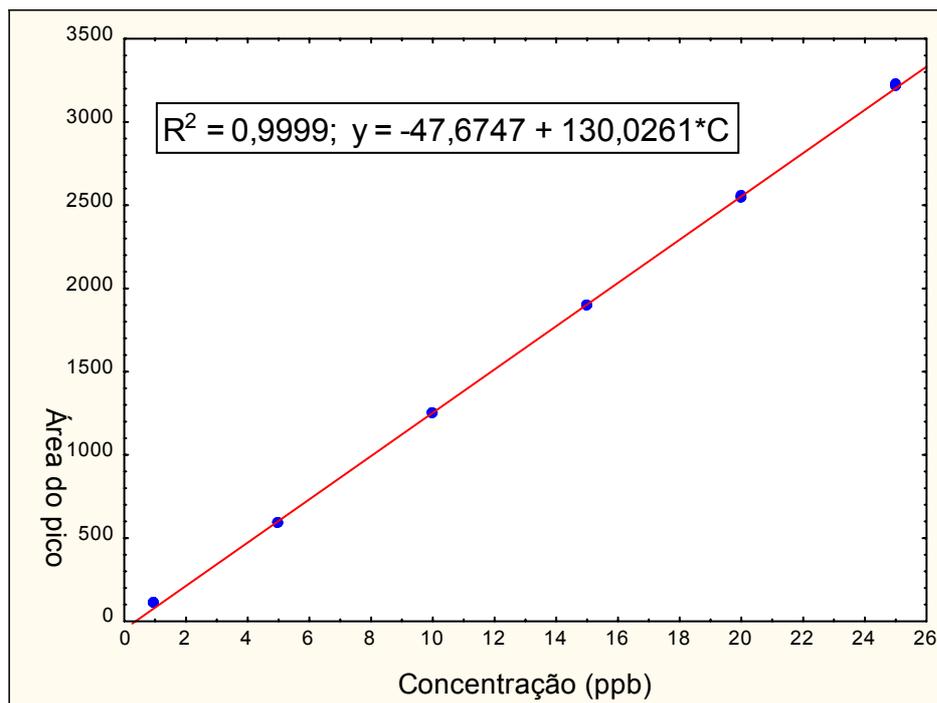


Figura 29: Área do pico X concentração de NOR

Já no **Figura 30** é possível observar o gráfico dos resíduos gerados pelo modelo

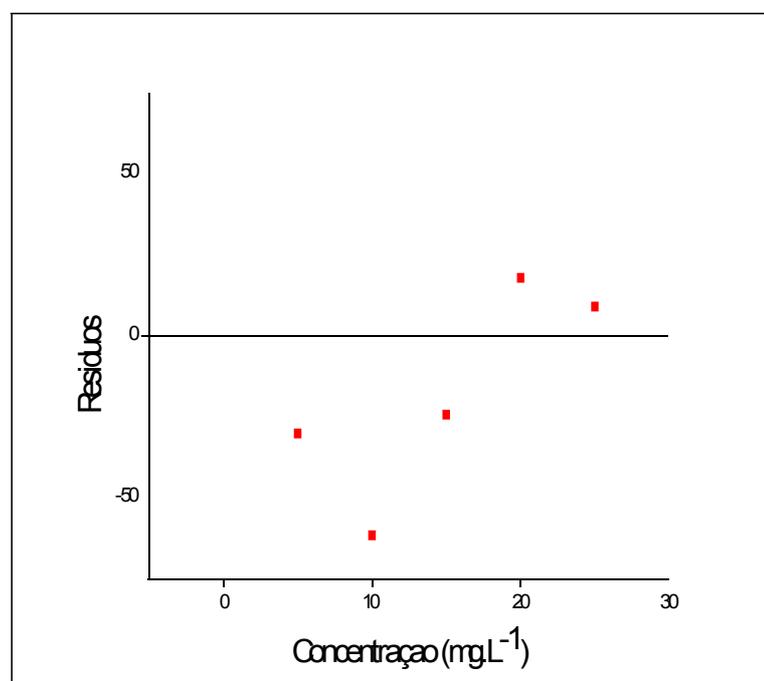


Figura 30: Resíduos para padrão de NOR por HPLC

Mais uma vez, os resíduos não mostraram tendência sendo, portanto o modelo adotado adequado. Como é possível observar, em função do coeficiente de

correlação $r = 0.9995$, o método se mostrou linear na faixa de concentração trabalhada ($1-25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e, portanto adequado então para a quantificação de NOR em medicamento por HPLC.

3.5.3. Quantificação de NOR em medicamento

3.5.3.1. Por espectrofluorescência

Com os parâmetros estabelecidos foi possível quantificar NOR em medicamento. As concentrações preditas e medidas, bem como o erro nas medições podem ser observadas a seguir (**Tabela 5**)

Tabela 5: Dados do medicamento obtidos por espectrofluorescência

Concentração Predita ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Concentração Medida ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Erro Absoluto	Erro Relativo (%)
50	51,4	1,4	2,8
50	51,4	1,4	2,8
100 A	104,6	4,6	4,6
100 A	101,2	1,2	1,2
100 A	104,4	4,4	4,4
100 B	99,2	- 0,8	- 0,8
100 B	96,3	- 3,7	- 3,7
100 B	99,6	- 0,4	- 0,4
150	154,2	4,2	2,8
150	144,9	- 5,1	- 3,4
150	150,7	0,7	0,5
200 A	200,6	0,6	0,3
200 A	207,4	7,4	3,7
200 A	203,3	3,3	1,6
200 B	206,3	6,3	3,2
200 B	201,8	1,8	0,9
250	251,6	1,6	0,6
250	258,6	8,6	3,4
250	255,2	5,2	2,1
300	297,7	- 2,3	0,8
300	309,8	9,8	3,3
300	294,6	- 5,4	1,8
500	503,7	3,7	0,7
500	511,9	11,9	2,4
500	500,2	0,2	0,1

Por meio dos resultados obtidos pode-se observar que é possível quantificar NOR no medicamento de forma satisfatória, tendo-se resultados muito próximos do esperado. Na **Figura 31** é possível observar a concentração predita versus concentração medida.

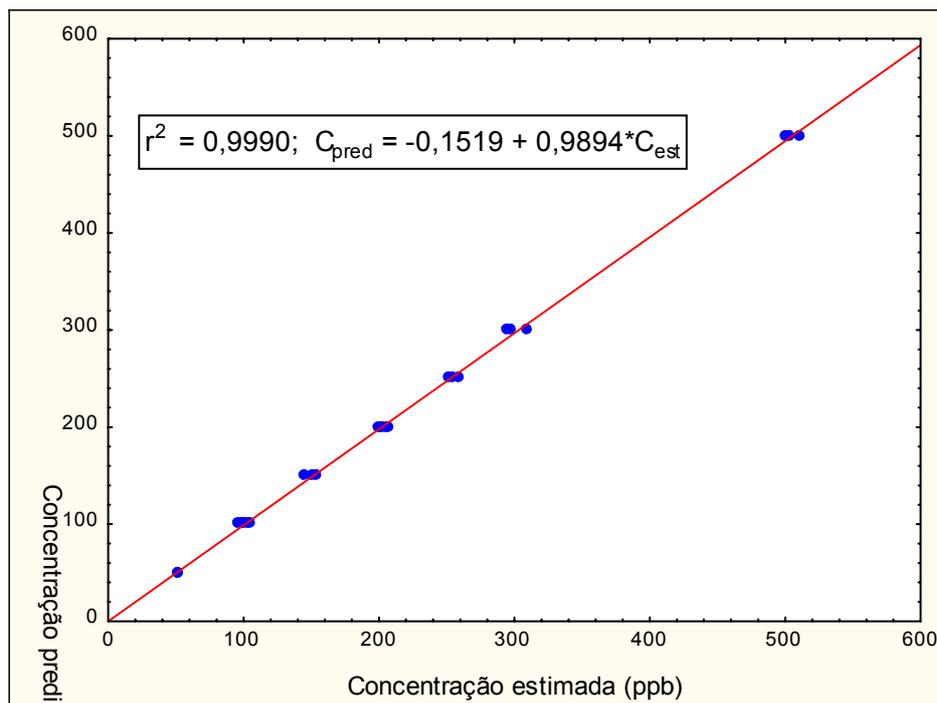


Figura 31: Concentração estimada X concentração predita de NOR no medicamento

Na equação obtida no gráfico anterior, C_{est} representa a concentração estimada e C_{pred} representa a concentração predita (de referência). Com base no valor do $r = 0,9995$, há uma forte correlação entre as concentrações medida e predita indicando que o modelo construído é satisfatório na quantificação de NOR com valores de erro relativo menores que 5%.

Para cada solução preparada de medicamento calculou-se o teor de NOR a partir do fator de diluição para cada nível de concentração estudado. Como no medicamento se tem uma quantidade equivalente a 400 mg de NOR e a solução inicial preparada foi de 4000 mg.L^{-1} foram feitos os respectivos cálculos para saber o fator de diluição (FD) referente a cada concentração (**Tabela 6**), para que assim, a partir das concentrações medidas pudéssemos calcular o teor de NOR no medicamento.

Tabela 6: Fator de diluição das concentrações de medicamento.

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Fator de diluição
50	80000 X
100	4000 X
150	26666,7 X
200	20000 X
250	16000 X
300	13333,3 X
500	8000 X

Já na **Tabela 7** é possível observar os resultados obtidos bem como o erro absoluto e relativo associado a cada medição.

Tabela 7: Cálculo do teor de NOR no medicamento

Concentração Medida (mg.L⁻¹)	Erro Absoluto	Erro Relativo (%)	Teor de NOR no medicamento (mg)
4114	114	2,8	411
4113	113	2,8	411
4183	183	4,6	418
4048	48	1,2	405
4178	178	4,4	418
3967	- 33	- 0,8	397
3854	- 146	- 3,6	385
3986	- 14	- 0,4	399
4111	111	2,8	411
3864	- 136	- 3,4	386
4019	19	0,5	402
4013	13	0,3	401
4148	148	3,7	415
4066	66	1,6	407
4126	126	3,2	413
4037	37	0,9	404
4026	26	0,6	403
4137	137	3,4	414
4082	82	2,0	408
3969	- 31	- 0,8	397
4131	131	3,3	413
3928	- 72	- 1,8	393
4029	29	0,7	403
4095	95	2,4	409
4002	2	0,05	400
Média ± desvio padrão	4049 ± 89		404,9 ± 8, 9

Todos os valores encontrados ficaram dentro da faixa do valor médio ± desvio padrão, e que se obteve um erro relativo em alguns casos superior a 2%,

demonstrando que o método utilizado foi eficaz para quantificar NOR em medicamento.

3.5.3.2. Figuras de mérito para espectrofluorescência

3.5.3.2.1. Linearidade

A linearidade do método pode ser comprovada por meio da curva analítica que forneceu um valor de $R^2 > 0,90$. A partir da curva analítica foi possível calcular os limites de detecção e quantificação. Com base no gráfico obtido e a partir do cálculo do desvio padrão do branco, foi possível se calcular o limite de detecção do método, bem como o limite de quantificação. O Limite de detecção calculado para esse método foi de $6,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ enquanto que o limite de quantificação calculado foi igual a $24,6 \mu\text{g.L}^{-1}$.

3.5.3.2.2. Precisão

Para realizar os estudos de precisão trabalhou com três níveis de concentração diferentes. Na **Tabela 8**, é possível observar os resultados obtidos assim como o desvio padrão e o RSD (desvio padrão relativo). O valor médio foi obtido através de 10 medidas.

Tabela 8: Dados de precisão do método

Concentração	Valor médio \pm desvio padrão	RSD (%)
200	200,4 \pm 1,2	0,6
250	251,2 \pm 1,3	0,5
300	300,4 \pm 0,4	0,1

Como pode ser observado, na tabela anterior, a metodologia empregada é bem precisa, visto que forneceu resultados bastante satisfatórios, com valores de RSD inferiores a 1%.

3.5.3.2.3. Precisão Intermediária

Para verificar a precisão intermediária mais uma vez foram escolhidos três níveis diferentes de concentração (os mesmos usados para testar a precisão do método), tendo sido feitas cinco medidas de cada concentração em dois dias consecutivos (**Tabela 9**).

Tabela 9: Dados de precisão intermediária do método

Concentração	Valor médio \pm desvio padrão	RSD (%)
200	200,9 \pm 1,7	0,8
250	252,5 \pm 0,7	0,3
300	301,5 \pm 1,2	0,4

Mais uma vez mesmo as análises tendo sido realizadas em dias diferentes, não houve variação significativa dos valores das concentrações estimadas, conforme pode ser observado pelos valores de RSD que são todos menores que 1%

3.5.3.2.4. Robustez

De acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que o método é robusto, pois ao fazer pequenas variações no pH do tampão utilizado, os resultados não sofreram alterações significativas. Mudanças muito bruscas de pH não podem ser realizadas visto que dependendo do pH utilizado pode se obter uma intensidade de sinal maior ou menor em função do pH. Mas mudanças ligeiramente pequenas no pH (na ordem de décimos na medida do pH otimizado – pH = 6) não afetam o método de modo significativo, o que demonstra sua robustez e atende a proposta inicial que é a de quantificar NOR em medicamento.

3.5.3.2.5. Exatidão

Para os ensaios de exatidão foram preparadas em triplicata soluções com a mesma concentração de medicamento onde se variou apenas o teor de padrão de

NOR adicionado a amostra, sendo posteriormente calculado o teor de NOR recuperado. Os resultados obtidos podem ser observados a seguir (**Tabela 10**)

Tabela 10: Dados do estudo da recuperação.

Solução	CA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	CE ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Rec. (%)	MR (%)	DP
Solução B	50	50,9	101,8	101,9	0,4
	50	50,8	101,6		
	50	51,2	102,4		
Solução C	100	102,9	102,9	103,9	5,4
	100	109,8	109,8		
	100	99,1	99,1		
Solução D	150	152,3	101,5	99,5	2,6
	150	150,8	100,5		
	150	144,9	96,6		
Solução E	200	201,0	100,5	100,4	0,2
	200	200,4	100,2		
Solução F	250	259,6	103,8	102,0	2,6
	250	258,0	103,2		
	250	247,7	99,1		

(CA = Concentração adicionada; CE = concentração encontrada; Rec. = recuperação; MR = média de recuperação; DP = desvio padrão)

Todas as amostras de medicamento enriquecidas com padrão de NOR forneceram resultados bastante satisfatórios de recuperação da quantidade adicionada de padrão, tendo uma porcentagem de recuperação média na faixa de 99,5 – 103,9%.

3.5.3.3. Por HPLC

Na **Figura 32** é possível observar o cromatograma de uma amostra de medicamento contendo $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de NOR.

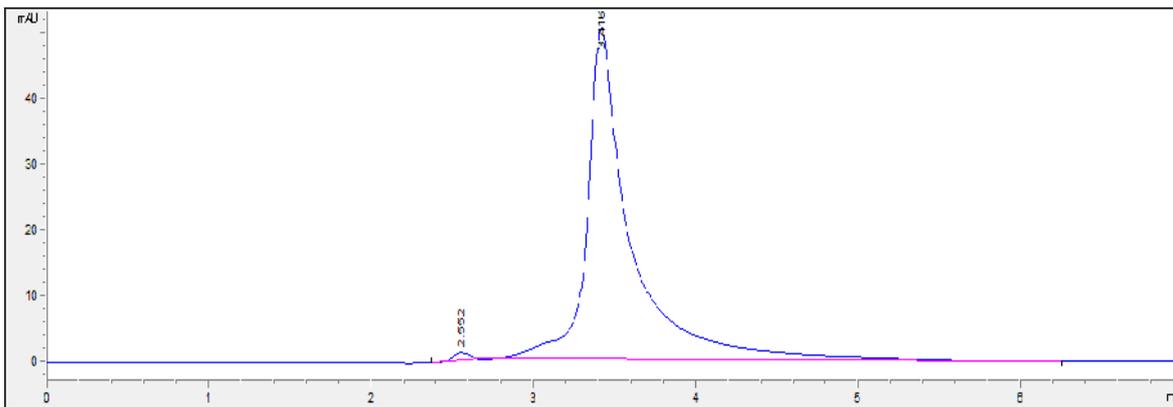


Figura 32: Cromatograma de uma amostra contendo $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de medicamento contendo NOR.

O primeiro pico é referente à fase móvel, que foi a mesma utilizada para as determinações em padrão aquoso enquanto que o segundo pico é referente ao NOR. Mais uma vez para ter certeza de que o segundo pico era referente ao NOR foi feita uma corrida apenas com a fase móvel.

Com base nos dados obtidos foi possível construir uma curva analítica (**Figura 33**) para a faixa de concentração trabalhada.

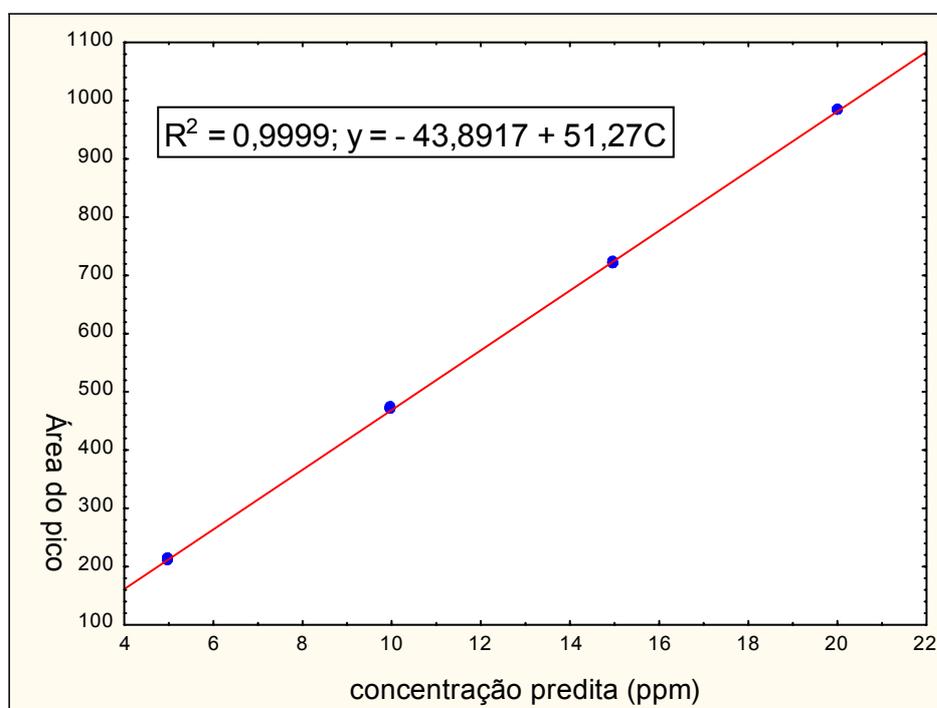


Figura 33: Curva analítica medicamento

Assim como com padrões aquosos, a curva de calibração para o medicamento também se mostrou linear ($R = 0,99995$) na faixa trabalhada. Novamente o Gráfico dos resíduos (**Figura 34**) não mostrou tendências, mostrando que o modelo estava adequado. Posteriormente, foi possível se obter o gráfico da concentração predita X concentração medida (**Figura 35**).

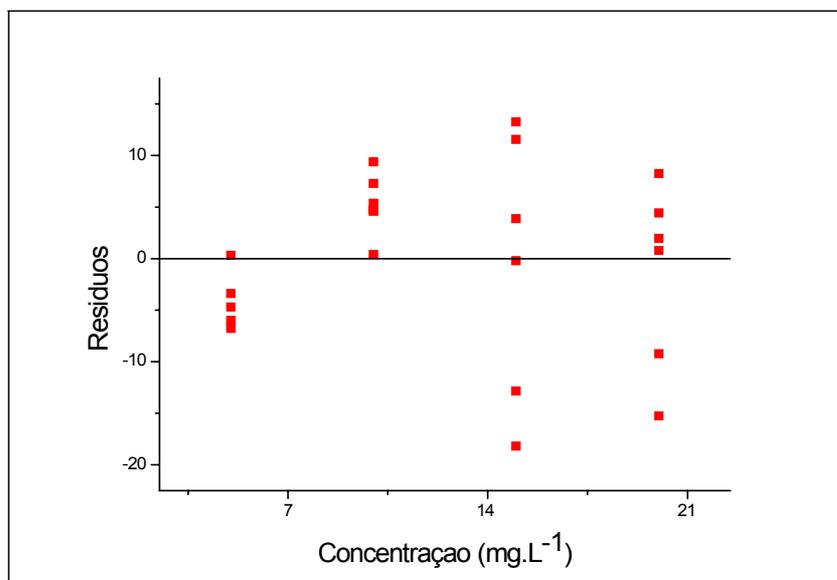


Figura 34: Resíduos para predição de medicamento por HPLC

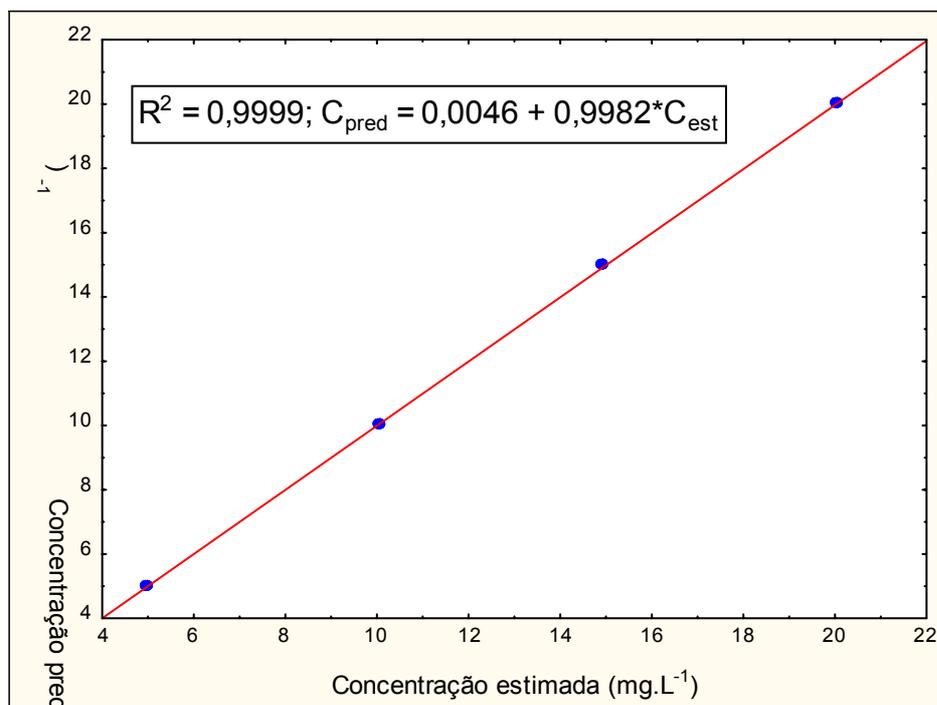


Figura 35: Concentração predita X concentração medida pra o medicamento por HPLC

No gráfico anterior, C_{est} equivale a concentração estimada e C_{pred} a concentração predita. Dessa forma, em função do $R = 0,99995$ obtido, é possível ver que o método fornece resultados bastante satisfatórios para quantificar NOR em medicamento. Foi possível calcular para cada solução o teor de NOR a partir do fator de diluição para cada nível de concentração estudado. Como no medicamento se tem uma quantidade equivalente a 400 mg de NOR e a solução inicial preparada foi de 4000 mg.L^{-1} foram feitos os respectivos cálculos para saber o fator de diluição (FD) referente a cada concentração (**Tabela 11**).

Tabela 11: Fator de diluição para as concentrações de medicamento para HPLC

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Fator de diluição
5	800 X
10	400 X
15	266,7 X
20	200 X

Dessa forma, foi possível calcular as concentrações estimadas e posteriormente, calcular o teor de NOR no medicamento para cada amostra analisada. Já na **Tabela 12** é possível observar os resultados obtidos bem como o erro absoluto e relativo associado a cada medição.

Tabela 12: Cálculo do teor de NOR no medicamento

Concentração Medida (mg.L⁻¹)	Erro Absoluto	Erro Relativo (%)	Teor de NOR no medicamento (mg)
3984	-16	- 0,4	398
4011	11	0,3	401
3998	- 2	- 0,05	399
3999	- 1	- 0,02	400
4015	15	0,4	402
3989	- 11	- 0,3	399
4028	28	0,7	403
4026	26	0,7	403
4029	29	0,7	403
4026	26	0,7	403
4041	41	1,0	404
4028	28	0,7	403
3982	- 18	- 0,4	398
3980	- 20	- 0,5	398
3984	- 16	- 0,4	398
3982	- 18	- 0,4	398
3990	- 10	- 0,2	399
4009	9	0,2	401
4010	10	0,2	401
4019	19	0,5	402
4017	17	0,4	402
4019	19	0,5	402
4013	13,0	0,3	401
Média ± desvio padrão	4008 ± 19		400,8 ± 1,9

O RSD obtido foi igual a 4,67%. De acordo com os valores apresentados na Tabela anterior, pôde-se comprovar a eficácia do método na quantificação de NOR em medicamento.

3.5.3.4. Figuras de Mérito para HPLC

3.5.3.4.1. Linearidade

Como pôde ser observado anteriormente o modelo se mostrou linear na faixa trabalhada, fornecendo assim resultados extremamente satisfatórios na quantificação de NOR em medicamento. O limite de detecção calculado para esse modelo foi de $0,47 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($470 \mu\text{g.L}^{-1}$) e o limite de quantificação calculado foi de $1,57 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($1570 \mu\text{g.L}^{-1}$).

3.5.3.4.2. Precisão

A fim de verificar a precisão do método foram feitas 10 medidas no mesmo dia de soluções de medicamento contendo 5, 10, 15 e $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de NOR. Na **Tabela 13** que pode ser observada a seguir é possível observar que o método é preciso dentro da faixa trabalhada.

Tabela 13: Precisão para HPLC

Concentração predita	Concentração medida	RSD (%)
5	$4,9 \pm 0,01$	0,20
10	$10,1 \pm 0,004$	0,04
15	$14,9 \pm 0,009$	0,06
20	$20,0 \pm 0,002$	0,10

Na tabela anterior a concentração medida é a média das dez medidas realizadas.

3.5.3.4.3. Precisão Intermediária

Para verificar a precisão intermediária do modelo foram feitas em dois dias consecutivos cinco medidas (em cada dia) das soluções do medicamento contendo 5, 10, 15 e $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A **Tabela 14** com os valores de desvio e RSD % podem ser observados a seguir.

Tabela 14: Precisão Intermediária para HPLC

Concentração predita	Concentração medida	RSD (%)
5	5,0 ± 0,05	1,00
10	10,1 ± 0,04	0,40
15	14,9 ± 0,04	0,27
20	20,0 ± 0,03	0,15

Mais uma vez, a precisão do método, mesmo quando a análise é realizada em dias distintos, foi comprovada com base nos resultados satisfatórios obtidos.

3.5.3.4.4. Exatidão

Para verificar a exatidão do modelo, foram preparadas diferentes soluções com a mesma concentração de medicamento enriquecidas com diferentes concentrações de padrão de NOR, como pode ser observado na **Tabela 15** a seguir:

Tabela 15: Soluções preparadas para HPLC para testes de exatidão

Solução	Concentração de padrão de NOR adicionada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
A	0
B	5
C	10
D	15

Todas as soluções continham $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de medicamento e todas as soluções foram preparadas em triplicatas. Com base nos resultados obtidos para a recuperação do analito, nesse caso, o padrão de NOR foi extremamente satisfatória (**Tabela 16**).

Tabela 16: Dados de recuperação para HPLC

Solução	CA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CE ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Rec (%)	MR	DP
<i>B</i>	5	5,0	100,0	100,0	0,00
		5,0	100,0		
		5,0	100,0		
<i>C</i>	10	10,1	101,2	100,9	0,76
		10,0	100,0		
		10,1	101,4		
<i>D</i>	15	14,9	99,6	99,5	0,12
		14,9	99,6		
		14,9	99,4		

(CA = Concentração adicionada; CE = concentração encontrada; Rec. = recuperação; MR = média de recuperação; DP = desvio padrão)

Como pode ser observado, na tabela anterior, a faixa de porcentagem de recuperação ficou entre 99,5% - 100,9%, o que só corrobora a eficácia da metodologia utilizada para quantificação de NOR.

3.5.3.4.5. Robustez

Para verificar se o método utilizado era robusto foram feitas algumas alterações na proporção da fase móvel e também do pH. Como o pH limite da coluna era igual a 3, o limite inferior de variação de pH foi igual a 3 enquanto que o limite superior de variação de pH foi igual a 3,5 (lembrando que para metodologia empregada foi utilizado pH = 3,3). Quanto a fase móvel, a proporção que estava sendo trabalhada era de 50:50, logo foram feitas variações nessa proporção para 55:45; 60:40 e 45:55 inicialmente. Com essas variações não houve mudanças realmente significativas quanto à área do pico para os níveis de concentração estudados. A única diferença foi quanto ao tempo de retenção do NOR no cromatograma, o que já era esperado, pois à medida que se alterava a proporção do solvente orgânico (metanol) era modificada para proporções menores que 50%, ocorria um aumento do tempo de análise. Isto se deve ao fato da amostra ficar mais tempo retida na coluna, visto que ao se diminuir o teor de metanol na fase móvel aumentava teor da parte aquosa da mesma, e levando-se em consideração que a

coluna utilizada era de fase reversa, portanto polar, o analito ficava mais tempo retido na coluna.

3.5.4. Comparação entre os métodos para quantificação de NOR em medicamento

Com os resultados obtidos na espectrofluorescência molecular é possível perceber a eficácia da técnica para quantificar NOR em medicamento. A técnica se mostrou tão eficaz quanto HPLC, mas com a vantagem de ser mais rápida em termos de tempo de análise, devendo-se ainda levar em consideração o tempo utilizado para fazer a estabilização da coluna (no mínimo uma hora) e também a sua limpeza (pelo menos uma hora e meia), o que não é necessário na espectrofluorescência, fazendo com esta última seja uma técnica visivelmente mais rápida. Vale ressaltar também que ao usar a espectrofluorescência não foi necessário trabalhar com solventes orgânicos, como o metanol, o que em termos ambientais é desejável. Há ainda a diferença na faixa de concentração trabalhada na espectrofluorescência e no HPLC; na primeira técnica foi na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto que, na segunda técnica foi na ordem de mg. mL^{-1} . Vale ressaltar ainda os limites de detecção e quantificação obtidos nas duas técnicas. Para espectrofluorescência, se obteve um LD = $6,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ e LQ = $24,6 \mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto que para HPLC se obteve um LD = $470 \mu\text{g.L}^{-1}$ e LQ = $1570 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Dessa forma embora, a HPLC seja geralmente ou normalmente usada para tal tipo de metodologia, a espectrofluorescência mostrou ser uma técnica também muito eficaz, podendo ser usada em substituição do HPLC para desenvolver metodologias de quantificação de princípio ativo em medicamentos.

De forma a confirmar que os métodos usados para quantificação de NOR em medicamento eram concordantes foi realizado o teste F. Dessa forma tanto para o numerador quanto para o denominador se considerou um grau de liberdade igual a 19, sendo nesse caso o F crítico (tabelado) = 2,12. Assim sendo levando-se em conta as variâncias para as duas técnicas empregadas, o valor de F obtido foi inferior ao F crítico, podendo então a hipótese nula ser aceita, o que significa que os métodos eram concordantes entre si, de acordo com a **Equação 19**.

$$F_{\text{calculado}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{20,67^2}{107,07^2} = 0,037 \quad (19)$$

3.5.5. Quantificação de NOR em urina

3.5.5.1. Por espectrofluorescência

Devido ao fato da urina ser uma matriz bastante complexa para trabalhar, foi necessário o uso de uma ferramenta quimiométrica para que fosse possível trabalhar com os dados obtidos nas medidas feitas no espectrofluorímetro. A fim de diminuir o efeito de matriz da urina, foi feita uma diluição da mesma em dois níveis diferentes (500 e 1000 X) para investigar em qual nível de diluição os melhores resultados seriam obtidos, ou seja, onde seria possível quantificar a NOR mesmo se tendo uma matriz tão complexa. Após proceder a todas as análises das amostras de urina dos 8 pacientes no espectrofluorímetro, foi feito uso do software *Solo versão 6.5 da Eigenvector* onde a ferramenta quimiométrica utilizada para trabalhar os dados foi o PARAFAC. Porém, antes disso, foi verificado se os espectros possuíam espalhamentos que deveriam ser removidos.

A seguir, na **Figura 36a**, é possível observar o espectro da urina diluída 500 X, enquanto que na **Figura 36b** é possível observar o espectro da urina diluída 1000 X. Como era esperado ao diluir a urina 1000 X ocorre uma diminuição da intensidade de emissão que para urina diluída 500 X é igual a 1,5 enquanto que para urina diluída 1000 X cai praticamente a metade (em torno de 0,8).

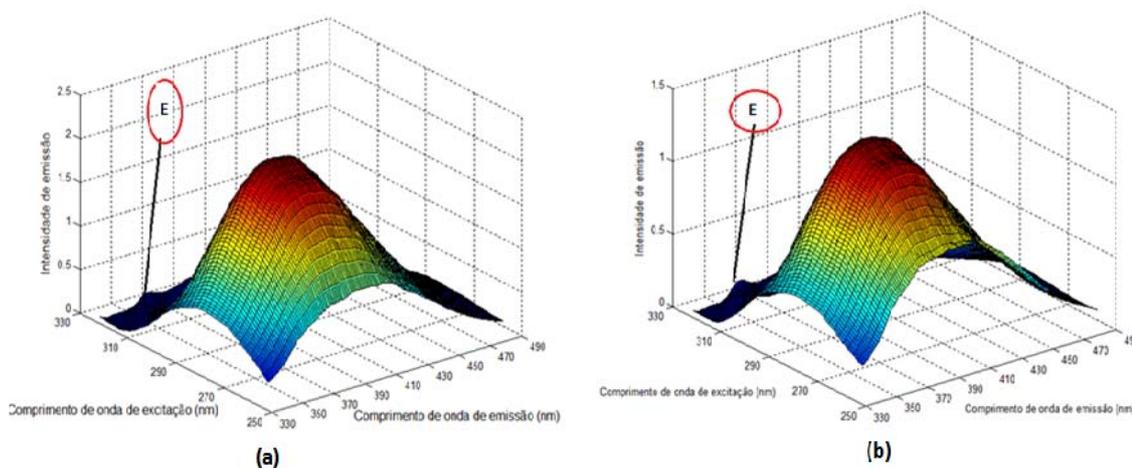


Figura 36: (a) Superfície da urina diluída 500 X (b) Superfície da urina diluída 1000 X (sem cortes)

Tanto na amostra de urina diluída 500 X quanto na diluída 1000 X há a presença de espalhamento (indicado pela letra E nas duas figuras anteriores), que foi removido, visto que tal espalhamento poderia influenciar o modelo gerado pelo PARAFAC de forma negativa, levando a resultados discrepantes da realidade, pois o espalhamento, que é uma interferência, estaria sendo modelado junto com o que realmente é relevante no espectro. Dessa forma nas **Figuras 37a e 37b** é possível observar os espectros da urina diluída 500 X e 1000 X espalhamentos, respectivamente.

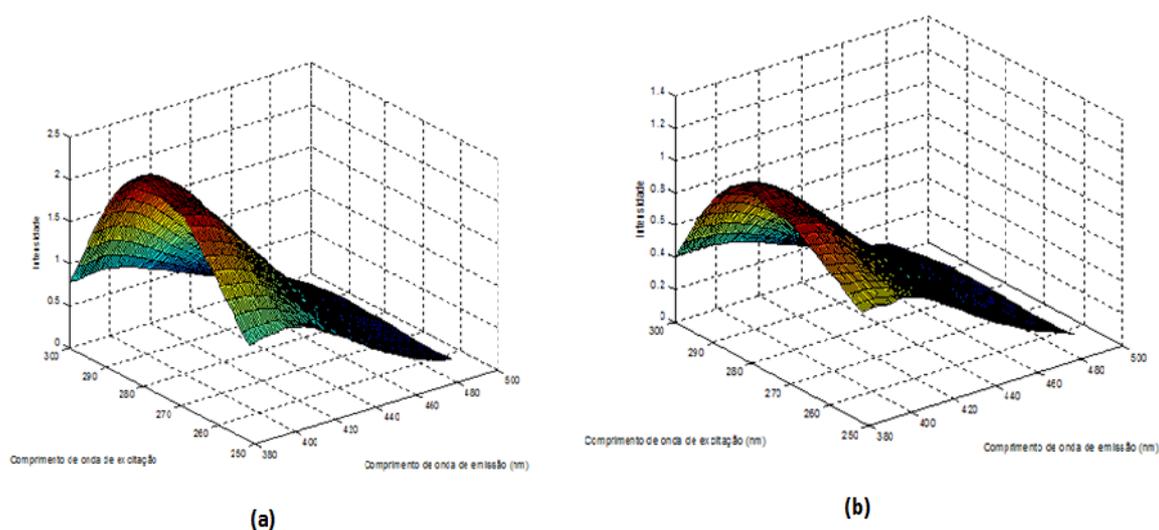


Figura 37: (a) Superfície sem espalhamento da urina diluída 500 X (b) Superfície sem espalhamento da urina diluída 1000 x

Já na **Figura 38** é possível observar a superfície de uma amostra de urina diluída 500 X enriquecida com $300 \mu\text{g. L}^{-1}$.

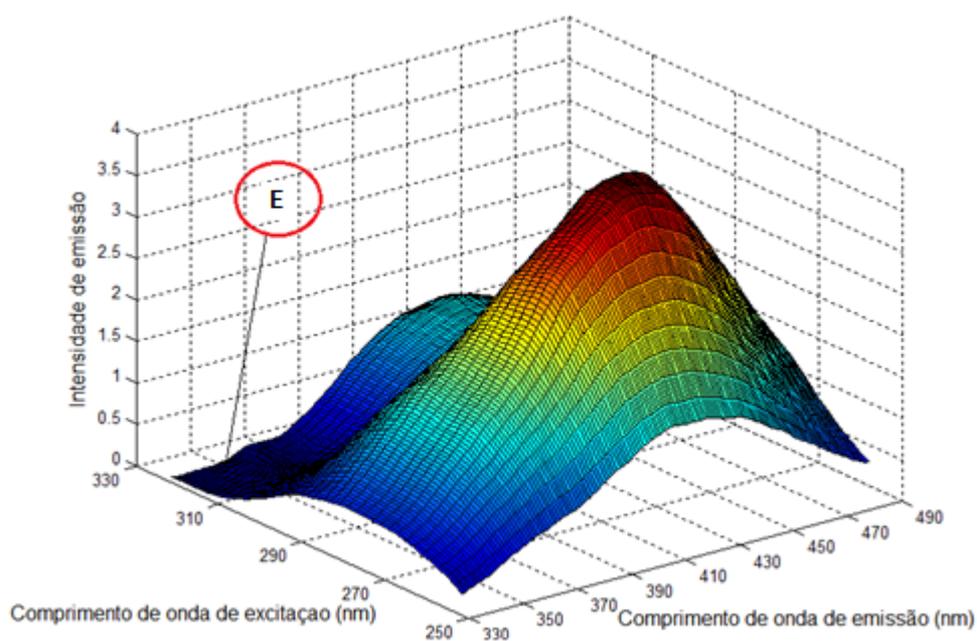


Figura 38: Representação da superfície de emissão-excitação para a amostra de urina diluída 500 X enriquecida com $300 \mu\text{g.L}^{-1}$ de padrão de NOR

Na **Figura 39** é possível se observar o espectro sem cortes da urina diluída 1000 X enriquecida com $300 \mu\text{g.L}^{-1}$ de padrão de NOR

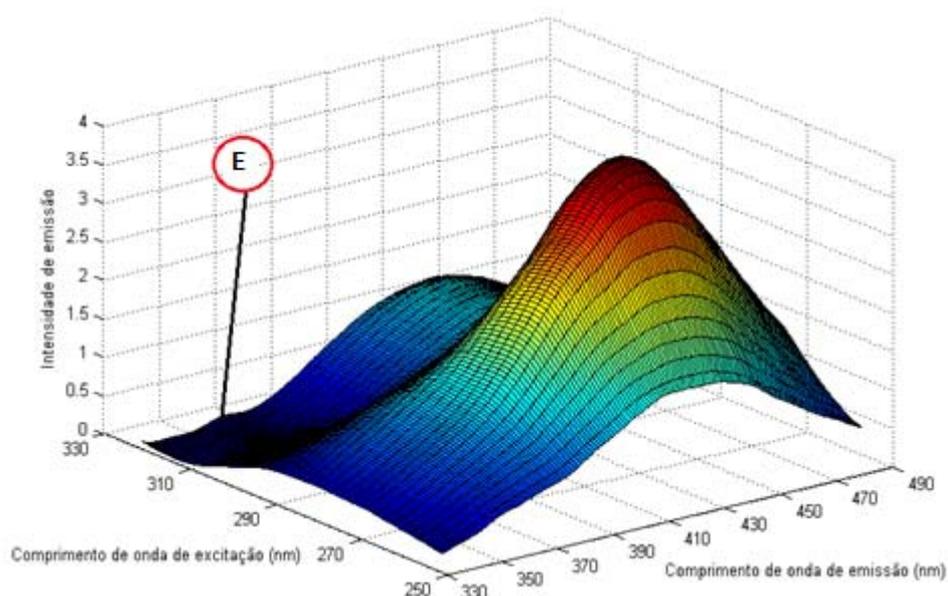


Figura 39: Representação da superfície de emissão-excitação para a amostra da urina diluída 1000 X enriquecida com $300 \mu\text{g.L}^{-1}$ de padrão de NOR

Da mesma forma que no espectro da urina, o espectro da mesma enriquecida com $300 \mu\text{g.L}^{-1}$ de padrão de NOR também apresentou espalhamento (novamente

indicado pela letra E nas duas figuras anteriores). Desta forma os espectros foram cortados (**Figuras 40**) a fim de eliminar tal interferência.

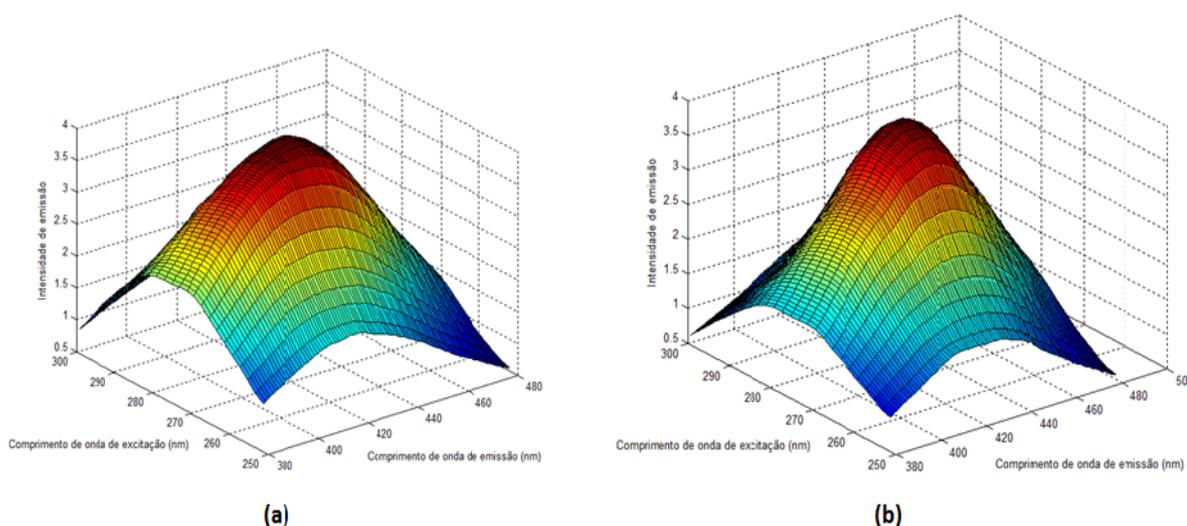


Figura 40: (a) Representação da superfície sem espalhamentos de emissão-excitação para a amostra da urina diluída 500 X enriquecida com $300 \mu\text{g.L}^{-1}$ de padrão de NOR (b) Representação da superfície sem espalhamentos de emissão-excitação para a amostra de urina diluída 1000 X enriquecida com $300 \mu\text{g.L}^{-1}$ de padrão de NOR

Todos os espectros, incluindo os espectros dos brancos (urina sem adição de NOR) foram recortados tanto na excitação quanto na emissão e passaram de 250 – 320 nm na excitação para 250 – 300 nm e de 330 – 480 na emissão para 380 – 480. Dessa forma a matriz gerada para cada amostra que inicialmente seria de 36×151 (medida para excitação era de um intervalo de 2 nm) passou a ser de 25×101 , o que reduziu o tempo de análise das amostras. Após a remoção dos espalhamentos em função dos “recortes” de todos os espectros, foi efetuada deconvolução dos espectros com o auxílio do PARAFAC de forma a verificar qual dos espectros gerados pelo mesmo era referente ao NOR que havia sido adicionada à urina e qual era referente a alguma outra substância também presente na urina. Nos dois fatores de diluição usados, ao usar o PARAFAC sempre se escolheu trabalhar com três componentes, baseados nos resultados gerados pelo mesmo (baseados no Core Consistency) que podem ser observados na **Tabela 17**.

Tabela 17: Número de componentes obtidos pelo modelo PARAFAC

<i>Fator de diluição</i>	<i>Nº de componentes</i>	<i>Variância (%)</i>	<i>Core Consistency</i>
500	2	99,685	95
	3	99,947	81
	4	99,976	<0
1000	2	99,69	91
	3	99,962	62
	4	99,983	23

Com base nos valores de Core Consistency da tabela anterior, foi escolhido trabalhar com três componentes, visto que até valores superiores a 50% de variância explicada, ainda é aceitável trabalhar com o modelo. Dessa forma para trabalhar com o mesmo número de componentes nos dois níveis de diluição da urina, foram escolhidos três componentes. Além disso, com esse número de componentes foi possível obter uma separação melhor dos espectros. Com quatro componentes já seria inviável de trabalhar, pois em ambos os casos, se obteve um Core Consistency inferior a 50, sendo que no caso da urina diluída 500 X, esse valor foi inferior a zero, fazendo com que o modelo gerado nessa situação fosse totalmente inapropriado, provavelmente devido à perda da trilinearidade, para o propósito que era identificar e, posteriormente, quantificar o NOR em urina.

Na **Figura 41**, é possível observar os *loadings* gerados pelo PARAFAC para urina diluída 1000 x.

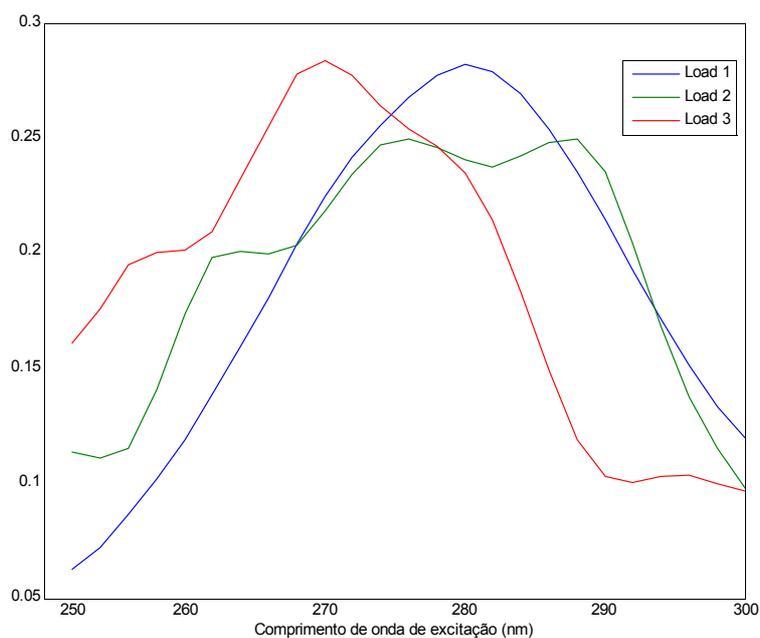


Figura 41: Loadings de excitação PARAFAC

A fim de verificar qual dos espectros da figura anterior era referente ao padrão de NOR adicionado a urina, foi feita uma sobreposição de um espectro de padrão de NOR puro (sem urina), o que pode ser observado na **Figura 42**.

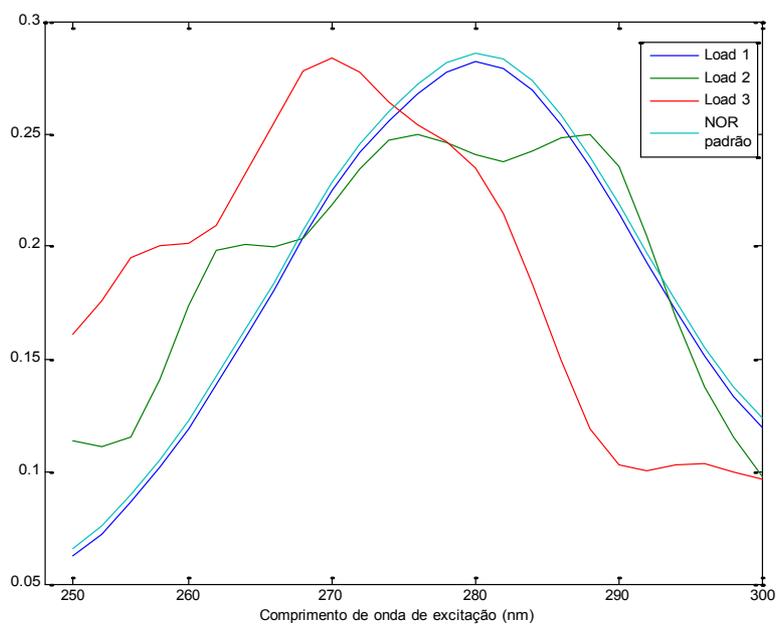


Figura 42: Sobreposição dos *Loadings* de excitação obtidos pelo PARAFAC

Dessa forma o espectro referente ao NOR na urina é o espectro na cor azul escura, os outros dois espectros são de outras substâncias presentes na urina. Também com o auxílio do PARAFAC se obteve os *loadings* de emissão (**Figura 43**)

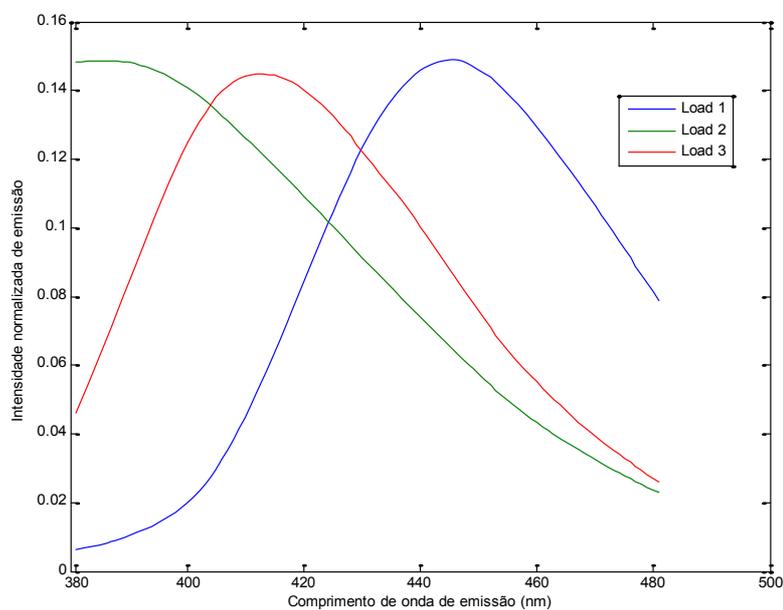


Figura 43: Loadings para emissão

A fim de verificar qual dos *loadings* era referente ao NOR adicionada a urina foi feita uma sobreposição dos espectros de um padrão de NOR (**Figura 44**).

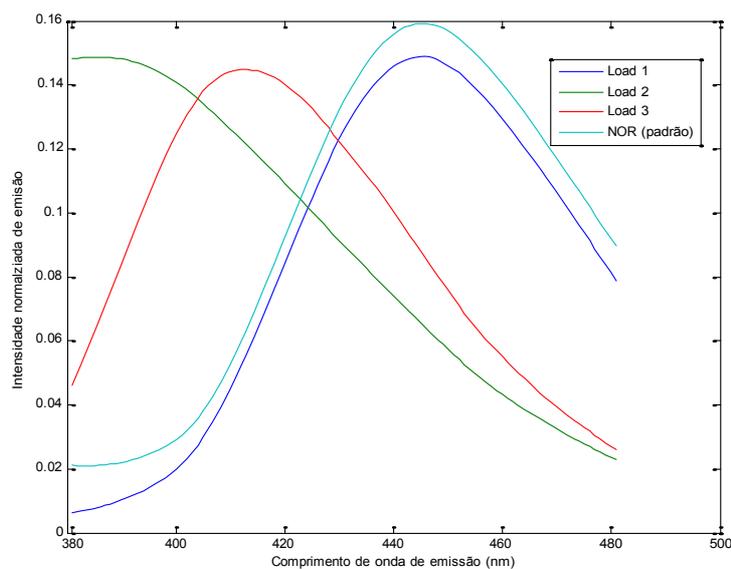


Figura 44: Sobreposição de espectros de emissão do NOR

Na figura anterior é possível observar a sobreposição do espectro azul escuro que foi gerado pelo PARAFAC com o espectro azul claro oriundo de um padrão de NOR aquoso.

De posse dos *scores*, fornecidos pelo PARAFAC, foi possível relacioná-los com a concentração de NOR (**Figura 45**).

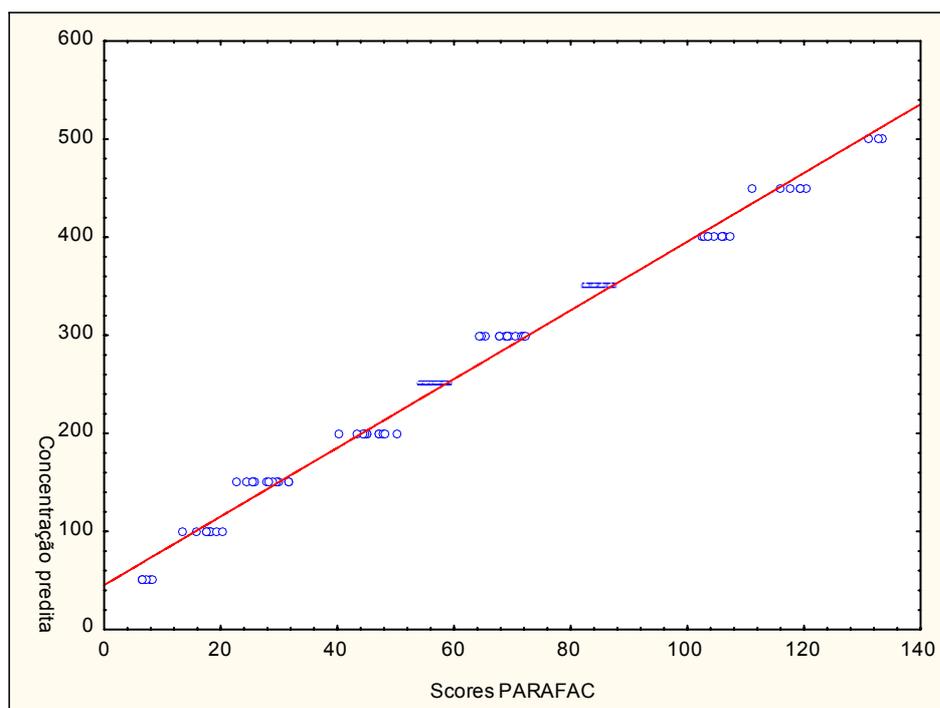


Figura 45: Concentração x Scores PARAFAC para urina diluída 500 X

Já na **Figura 46** a seguir é possível observar o gráfico de resíduos.

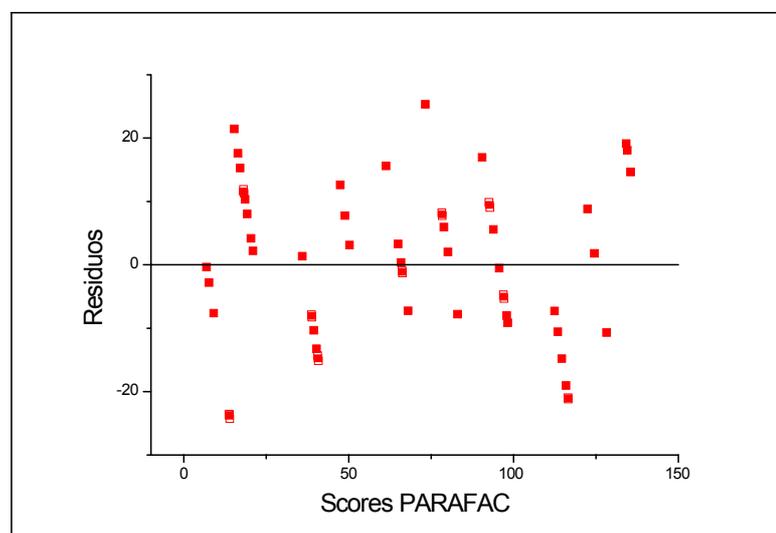


Figura 46: Resíduos x Scores para urina diluída 500 X

Já na **Figura 47** é possível observar a relação entre os scores e a concentração de NOR para urina diluída 1000 X.

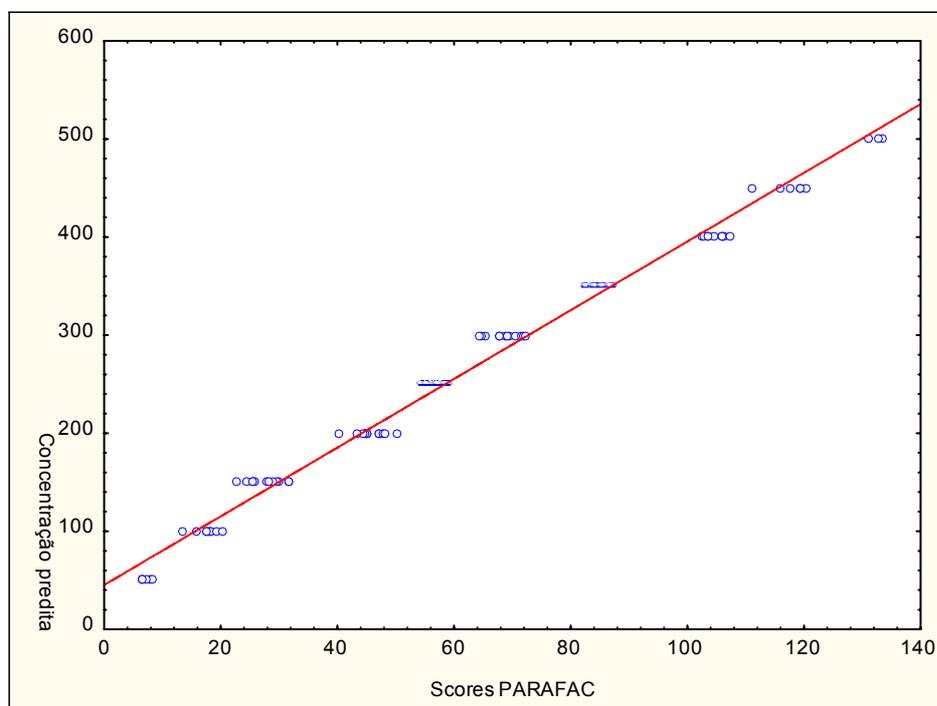


Figura 47: Concentração x Scores PARAFAC para urina diluída 1000 X

Já na **Figura 48** é possível observar os resíduos do modelo para urina diluída 1000 X.

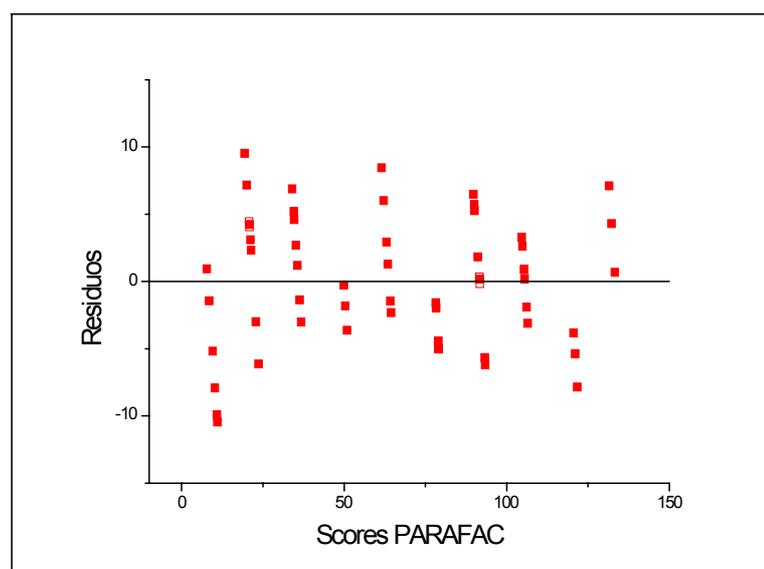


Figura 48: Resíduos para urina diluída 1000 X.

Como é possível observar nos gráficos anteriores há uma forte correlação tanto para urina diluída 500 x (**Tabela 18**) quanto para urina diluída 1000 X entre os Scores gerados pelo PARAFAC e as concentrações de NOR adicionadas a urina diluída.

Tabela 18: Dados do modelo PARAFAC obtido para quantificar NOR em urina

<i>Fator de diluição</i>	<i>Equação do modelo</i>	<i>R²</i>	<i>R</i>
500	$Y = 3,872x + 49,774$	0,9852	0,9926
1000	$Y = 3,502x + 45,139$	0,9995	0,9947

Com base nesses resultados a urina diluída 1000 x apresentou um resultado ligeiramente melhor que a urina de 500 X, visto que a diluição diminuía o efeito de matriz da urina o que faria com que fosse possível quantificar, de uma maneira mais satisfatória, o NOR adicionado à amostra de urina por meio do método de adição de padrão.

Também foi possível observar que independente do fator de diluição da urina, sempre se tinha uma resposta satisfatória do modelo, visto que os valores de $R > 0,99$, o que demonstra uma forte correlação entre a intensidade de emissão e a concentração de NOR adicionada à urina previamente diluída. Mesmo com uma matriz fosse extremamente complexa foi possível obter resultados extremamente satisfatórios no tocante a quantificação de NOR. As Figuras de mérito podem ser observadas na **Tabela 19** a seguir

Tabela 19: Figuras de Mérito PARAFAC

	<i>Urina diluída 500 X</i>	<i>Urina diluída 1000 X</i>
RMSEC (%)	67,86	59,85
REP (%)	16,30	12,60
Yun	12,6	7,6
SE_un	68,33	60,05
Leverage_un	$2,14 \times 10^{-5}$	$7,57 \times 10^{-6}$
SEM	0,020	0,022
SEL	0,087	0,088
SENA	0,288	0,391
LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	11,4	8,4
LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	34,7	25,6

Com base nos valores encontrados na Tabela 18 é possível perceber que ocorre uma melhora do modelo com o aumento da diluição. Isso pode ser observado pelos valores de RMSEC (raiz quadrada do erro médio quadrático) e REP (erro médio relativo de predição) assim como o erro padrão da estimativa da concentração (SE_uni). Também houve diminuição do valor de yun (concentrações estimadas das amostras), o que indica um aumento da exatidão do método quando a urina está mais diluída. Já o pequeno valor de leverage_un tanto para urina diluída 500 X quanto para urina diluída 1000 X indica que não há amostras discrepantes (*outliers*) no modelo. O modelo quando a urina está mais diluída forneceu valores de Limite de detecção e quantificação menores. A faixa de trabalho poderia ser aumentada para valores menores que $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (limite inferior da faixa de trabalho) respeitando-se, é claro, o limite de quantificação do modelo.

3.5.5.2. Por HPLC

Para determinar urina em HPLC foi usada a mesma metodologia que foi usada para o medicamento, em termos de pH, temperatura e fase móvel. Para reduzir o efeito da matriz a urina foi diluída em dois níveis distintos (500 e 1000 X) e a essa urina diluída foram adicionados diferentes teores de NOR (5, 10, 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). O branco foi a própria urina diluída. Foram usadas amostras de urina de oito

pessoas diferentes, saudáveis, que não faziam uso de quaisquer medicamentos. Todas as análises foram feitas em quintuplicata.

Conforme esperado a urina ao ser diluída 1000 X teve o efeito de matriz diminuído oferecendo melhores resultados no tocante a quantificação de NOR. Na **Figura 49** pode ser observado um cromatograma de uma solução do branco (urina diluída sem adição de NOR).

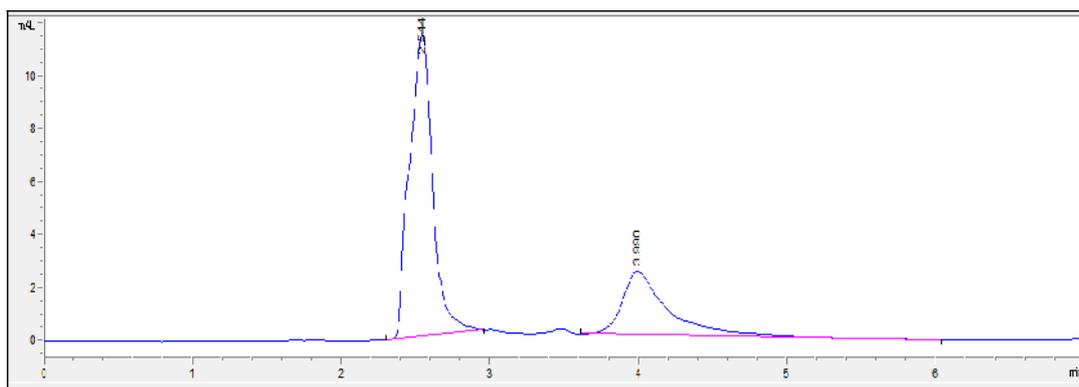


Figura 49: Cromatograma da solução do branco (diluição 1000 X)

O primeiro pico é referente a fase móvel (área do pico: 123.9; tempo: 2.544 minutos) do mesmo modo que nas leituras anteriores (padrão e medicamento) já segundo pico é referente a alguma substância presente na urina (área do pico: 53.7; tempo: 3.99 minutos). Em função desse segundo pico que aparece em torno de 3.9 minutos, foi feita uma pequena alteração na composição da fase móvel (que passou de 50:50 para 55:45) de modo a retardar ligeiramente o aparecimento do pico referente a NOR, visto que o esperado era que o pico de NOR aparecesse em torno de 3.5 minutos. Já na **Figura 50** é possível observar um cromatograma de uma solução de urina diluída 1000 X contendo $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de padrão de NOR.

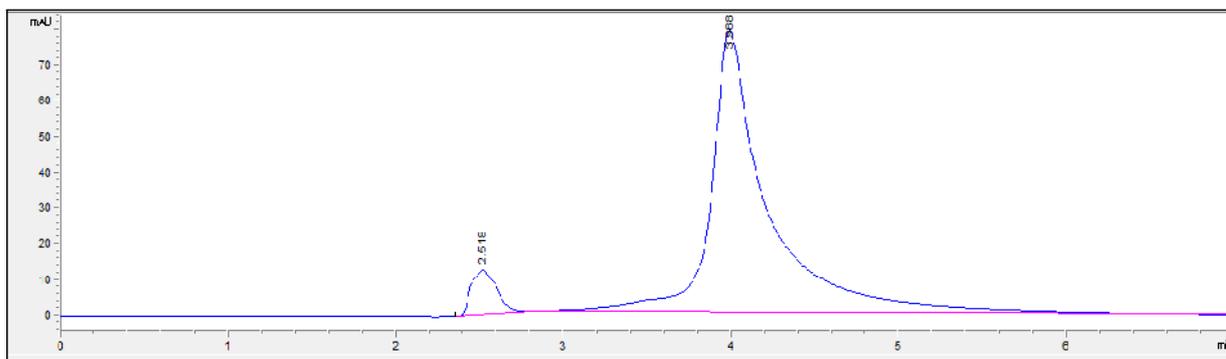


Figura 50: Cromatograma de uma solução de urina diluída 1000 X enriquecida com $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de padrão de NOR.

Novamente, o primeiro pico que aparece é referente à fase móvel utilizada (área: 129.7; tempo: 2.518), já o segundo pico é referente ao NOR (tempo: 3.988; área: 1890.6). O pico que aparecia no branco foi mascarado pelo pico de NOR, visto que o pico de NOR apareceu em torno de 4 minutos. A partir das leituras das soluções preparadas para cada paciente foi possível construir uma curva de calibração para cada paciente, levando-se em conta, é claro, o fator de diluição da urina. Na **Figura 51** pode ser observada a curva analítica para o paciente 1 (diluição 500 x).

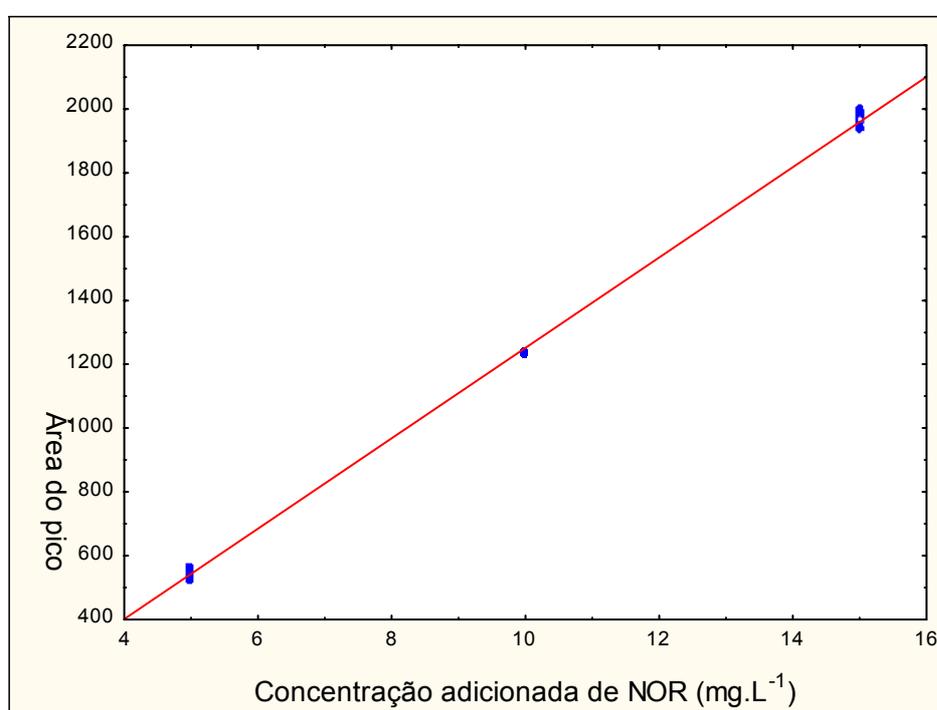


Figura 51: Curva analítica para diluição de 500 X

Como é possível observar no gráfico anterior, para a faixa de concentração estudada, é possível observar que o método se mostra linear ($R = 0.9995$), mesmo que a matriz trabalhada seja tão complexa como a urina. A diluição da mesma ajudou a atenuar o efeito da matriz, fazendo com que fosse possível se quantificar NOR mesmo em urina de uma maneira confiável. Já na **Figura 52** os resíduos obtidos mostram que o modelo é adequado.

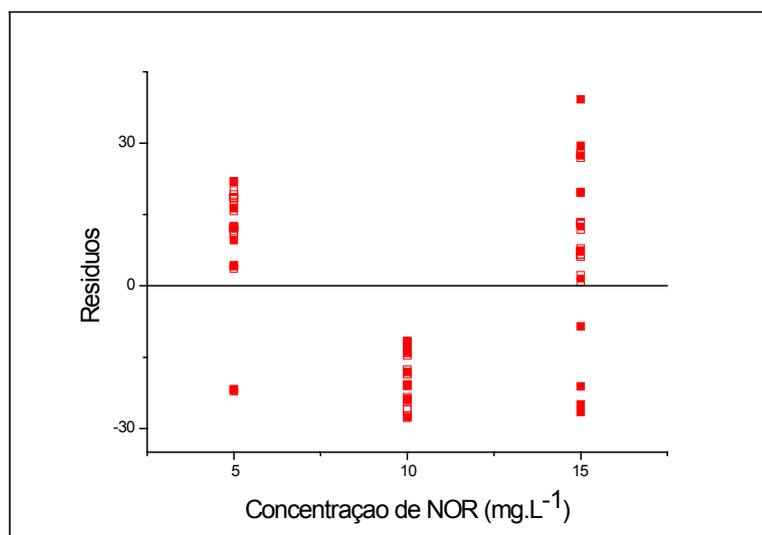


Figura 52: Resíduos para urina diluída 500 X para HPLC

Já na **Figura 53** pode ser observada a curva analítica para o paciente 1 (diluição 1000 x).

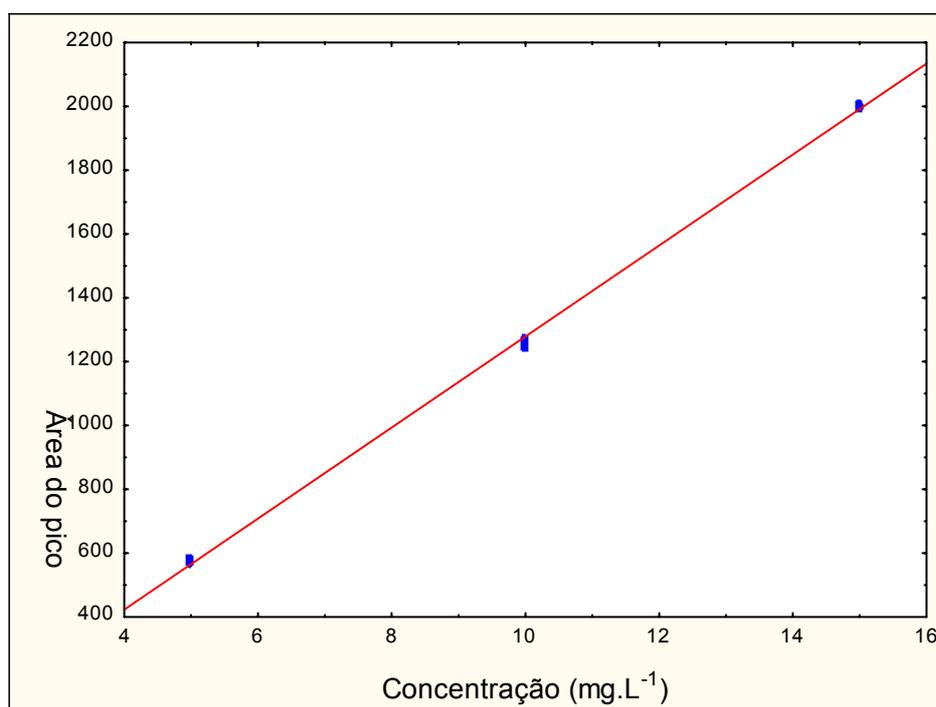


Figura 53: Curva analítica para diluição de 1000 X da amostra de urina

Ao comparar os dois gráficos anteriores observa-se claramente que a diluição de 1000 x colaborou de uma maneira significativa ($R = 0,9999$) para a melhoria dos resultados no tocante à quantificação de NOR ainda que em urina, visto que a diluição em um nível maior da urina reduziu de forma mais significativa o efeito de

matriz da mesma. Na **Figura 54** é possível observar que os resíduos não seguem tendências.

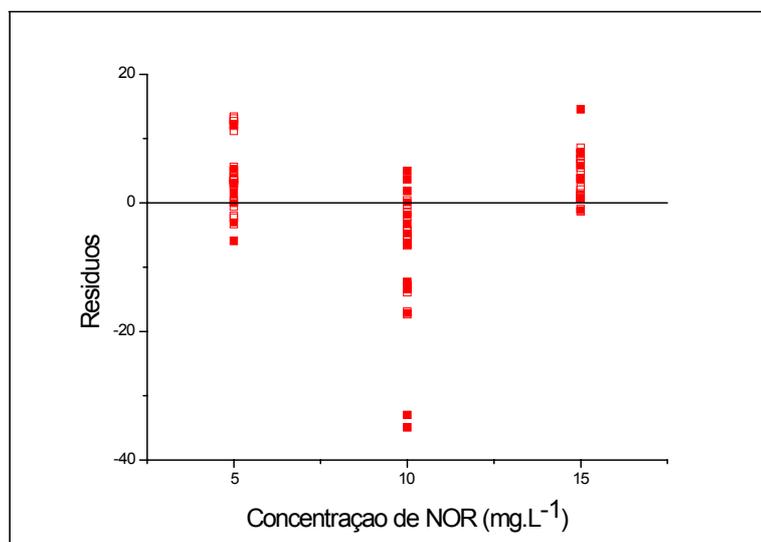


Figura 54: Resíduos para urina diluída 500 X para HPLC

Na **Tabela 20** a seguir é possível observar as equações dos modelos para cada nível de diluição, bem como os coeficientes de determinação e correlação.

Tabela 20: Resultados para análise de NOR em urina por HPLC

Nível de diluição	Equação da reta	R²	R
500	$Y = 141,5612C - 164,3486$	0,9990	0,9995
1000	$Y = 142,585C - 147,2139$	0,9998	0,9999

Como pode ser observada na tabela anterior, a metodologia utilizada para quantificação de NOR em urina é eficaz visto que para todos os pacientes $R > 0,999$. Nota-se novamente que o fator de diluição influencia nos resultados, pois ao se ter a urina diluída 1000 X, os resultados foram melhores do que com a urina diluída 500 X. O método se mostrou preciso, conforme pode ser observado na **Tabela 20** que ilustra os resultados obtidos de precisão para urina diluída 1000 x (que forneceu melhores resultados). O método também se mostrou robusto, visto que ligeiras alterações no pH da fase móvel não influenciaram na área do pico referente ao NOR. As mesmas alterações feitas para o medicamento, tiveram resultados similares ao da urina, no tocante ao aumento do tempo de análise, visto que a

proporção da fase móvel influencia no tempo de retenção do analito na coluna, levando-se em consideração ainda o fato de estar usando uma coluna de fase reversa.

Tabela 21: Resultados precisão para HPLC

Concentração esperada (mg.L ⁻¹)	Concentração predita (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão relativo (RSD)
5	5,0 ± 0,07	1,40
10	9,9 ± 0,01	1,39
15	15,8 ± 0,72	4,56

3.5.6. Comparação entres os métodos para quantificação de NOR em urina

Do mesmo modo que foi observado no medicamento, a espectrofluorescência se mostrou um método bastante eficaz para quantificação de NOR ainda que em urina, que é uma matriz complexa. Com o auxílio da calibração multivariada, é possível separar o espectro do analito de interesse, no caso, ao NOR e posteriormente, realizar os procedimentos necessários para quantificá-la na urina. Dessa forma, a espectrofluorescência pode ser uma técnica que pode ser uma substituta em potencial do método clássico para esse tipo de análise que seria HPLC.

3.6 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO

Foi possível concluir a eficácia no tocante a quantificação de NOR ao se usar espectrofluorescência associada à calibração multivariada. Como já foi mencionado anteriormente, embora a técnica mais empregada para esse tipo de estudo seja HPLC, a espectrofluorescência apresentou resultados extremamente satisfatórios, após ter sido feito a deconvolução dos espectros por meio do PARAFAC, tendo sido possível se ter uma metodologia precisa e robusta para se quantificar NOR. Para padrão aquoso, a curva analítica por espectrofluorescência obteve um $R^2 = 0,9963$ e $R = 0,9981$, valores altamente satisfatórios. Já para medicamento, a curva analítica por espectrofluorescência obteve um $R^2 = 0,9990$ e $R = 0,9995$, o que demonstrou uma forte relação entre a intensidade de emissão obtida e a concentração esperada de medicamento nas amostras. Os parâmetros de mérito estimados para medicamento, também demonstraram que a técnica de espectrofluorescência é capaz de fornecer resultados bastante satisfatórios ao ser comparada com HPLC, podendo ser uma possível substituta a segunda técnica que é conhecidamente mais cara e requer maior tempo de análise e preparo da coluna que vai ser utilizada, bem como uso de solventes prejudiciais ao meio ambiente. O método para análise em medicamento forneceu $LD = 6,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $LQ = 24,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ e no tocante aos testes de exatidão do mesmo houve uma recuperação de NOR na faixa de 99,5 – 103,8%, valores extremamente satisfatórios.

Também vale mais uma vez ressaltar que a espectrofluorescência oferece um tempo de análise muito menor e também vale ressaltar a faixa trabalhada que no HPLC foi na faixa de mg.mL^{-1} , enquanto que na espectrofluorescência foi possível obter resultados extremamente satisfatórios na faixa de $\mu\text{g. L}^{-1}$, o que mostra que a espectrofluorescência realmente pode ser uma técnica em potencial para substituir o HPLC, já que mostrou ser uma técnica precisa, robusta e rápida. Mas também vale ressaltar que para se ter tal metodologia em escala industrial é necessário que se tenha um analista experiente na técnica e que saiba interpretar os resultados obtidos.

Mesmo para urina, que é uma matriz extremamente complexa, ao usar calibração multivariada, foi possível fazer a deconvolução dos espectros para identificar qual espectro era referente ao NOR e posteriormente, se quantificar a NOR em urina, tendo ainda a vantagem de não ter sido necessário nenhum pré

tratamento da amostra, a não ser a diluição da urina, para reduzir sua intensidade de emissão. Entre os métodos utilizados PARAFAC ofereceu resultados bastante satisfatórios no tocante a deconvolução dos espectros e posterior quantificação. Dessa forma, para matrizes complexas como a urina, são duas técnicas que podem ser empregadas para quantificação do analito. Para os dois níveis de diluição estudados, a urina diluída 1000 X apresentou resultados ligeiramente melhores que a mesma diluída 500 X no tocante a figuras de mérito. Ao se trabalhar com a urina diluída 1000 X obteve-se um RMSEC E REP (erro de predição) menores que para urina diluída 500 X. Também mostrou ser ligeiramente mais seletiva e forneceu limites de detecção e quantificação menores: $8,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $25,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectivamente, enquanto que para diluição de 500 X os limites foram de $11,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $34,7 \mu\text{g.L}^{-1}$.

4. CLASSIFICAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA EM TRANSGÊNICO E NÃO TRANSGÊNICO POR ESPECTROSCOPIA NIR E FTR - MIR ASSOCIADA A MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

4.1. Óleos vegetais

Óleos vegetais são muito importantes para a saúde porque desempenham funções fisiológicas que são essenciais para os seres vivos. A qualidade dos óleos depende de muitos fatores, desde a escolha das sementes até a etapa de produção. Desta forma, muitos parâmetros físicos e químicos são monitorados e os métodos da AOCS (American Oil Chemist's Society) são comumente utilizados para esse propósito devido à simplicidade de operação. Entretanto, estes métodos são lentos, trabalhosos e, em alguns casos, por exemplo, em medidas de acidez, carecem de precisão. (PEREIRA, 2007)

Entende-se por óleos vegetais, um conjunto de substâncias que compreendem o glicerol, ácidos graxos (principais componentes) e substâncias resultantes da condensação destes, os ésteres. Estes ésteres, denominados triglicerídeos ou triacilgliceróis, possuem cadeias de átomos de carbono com diferentes graus de insaturação. (PEREIRA, 2007)

Além de possuírem ácidos graxos e glicerídeos em sua composição, os óleos vegetais também são constituídos de algumas substâncias como esteróis, tocoferóis, fenóis, flavonóides, substâncias voláteis, vitaminas, pigmentos, etc. São hidrofóbicos, ou seja, insolúveis em água, pois suas moléculas apolares são incapazes de formar ligações intermoleculares fortes com as moléculas de água. Possuem estabilidade oxidativa em diversas aplicações, como na fritura, por exemplo, pois contêm altos níveis de antioxidantes naturais (como tocoferóis, constituintes da vitamina E), tornando-os mais resistentes a rancidez. A formação do óleo vegetal pode ser observada na **Figura 55** a seguir: (PEREIRA, 2007)

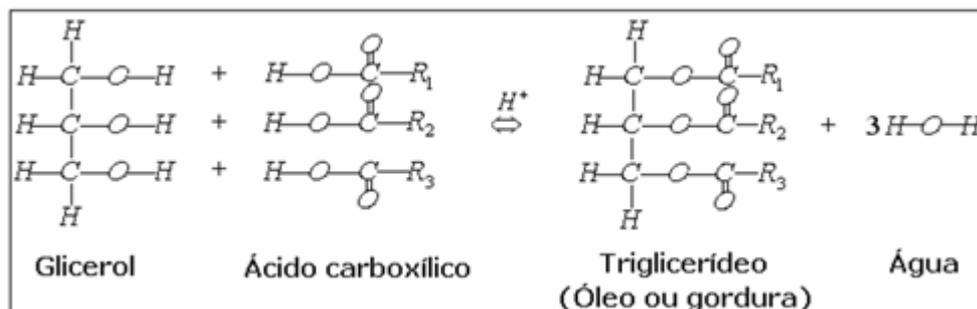


Figura 55: Esquema da reação de formação do óleo vegetal (PEREIRA, 2007)

A qualidade dos óleos, no setor de alimentos, depende de uma série de fatores associados aos estágios de produção. Assim sendo, deve-se ter um controle rigoroso sendo necessário o monitoramento de determinados parâmetros físicos e químicos, tais como: acidez, densidade, cor, índice de refração, viscosidade, umidade, volatilidade, índice de peróxido e de iodo, entre outros. (PEREIRA, 2007)

4.1.1. Óleo de soja

De acordo com a IMCOPA⁽¹¹⁾, a soja surgiu na China há cerca de cinco mil anos. Por séculos, os chineses – e outros povos orientais, como japoneses e coreanos – têm feito seu uso na alimentação. Posteriormente, a produção de soja encontrou terras mais férteis nas Américas e hoje a grande maioria é cultivada nos EUA, Brasil e Argentina, que juntos produzem cerca de 85% da soja do mundo.

Segundo o IBGE, a soja (*glycine max* L.) é a oleaginosa mais cultivada no Brasil, pois pode ser plantada em qualquer região. O Brasil ocupa a 2^a posição do ranking da produção mundial, perdendo apenas para os EUA. Em 2007, a cultura dessa semente chegou a ocupar cerca de 20,7 milhões de hectares plantados no país. (PEREIRA, 2007)

(11) Retirado de <http://www.imcopa.com.br/?p=empresa/asoja>

Novamente de acordo com a IMCOPA⁽¹¹⁾ alguns dos benefícios do uso da soja na alimentação humana são: diminuição e controle dos níveis de colesterol e triglicerídeos, redução da pressão sanguínea e das doenças cardiovasculares, e prevenção de vários tipos de câncer, osteoporose e mal de Alzheimer. Vários destes benefícios são consequência da concentração de isoflavonas no grão de soja – substâncias bioativas que possuem funções terapêuticas.

Em média, a soja possui 40% de proteínas, 20% de lipídios, 5% de minerais e 34% de carboidratos (açúcares como a glicose, frutose e sacarose, fibras e os oligossacarídeos como a rafinose e estaquiose). Devido a essas características, a produção do óleo de soja predomina no mercado brasileiro tornando-o mais consumido não só no Brasil, mas em todo mundo. (PEREIRA, 2007)

O óleo de soja pode ser produzido como bruto, refinado comestível, refinado industrial e lecitina. Dentre os óleos, é o que apresenta o maior teor de gorduras saturadas, possui bom percentual de gorduras monoinsaturadas e poliinsaturadas, sendo por isso, indicado para frituras. (PEREIRA, 2007)

As **Tabelas 22⁽¹²⁾** e **23⁽¹²⁾** apresentam as características físico-químicas e a composição de ácidos graxos, respectivamente, presentes no óleo de soja.

(11) Retirado de <http://www.imcopa.com.br/?p=empresa/asoja>

(12) Retirado de http://www.campestre.com.br/especificacao_soja.shtml

Tabela 22: Características físico-químicas do óleo de soja

Propriedades Físico-Químicas	Unidades	Faixa de aceitação para consumo
Densidade relativa (25°C)	-	0,916 – 0,922
Índice de refração (25°C)	--	1,465 – 1,475
Índice de Iodo	g I ₂ / 100g	120 – 141
Índice de saponificação	mg KOH/g	180 – 200
Matéria Insaponificável	%	< 1,0%
Acidez, óleo refinado	g ácido oléico / 100g	< 0,3
Acidez, óleo bruto	g ácido oléico / 100g	< 2,0
Índice de peróxido	meq / Kg	< 10,0

Tabela 23: Composição de ácidos graxos de soja

Ácido Graxo	Estrutura	(g/100g)
--	C < 14	< 0,1
Mirístico	C 14:0*	< 0,5
Palmítico	C 16:0	7 – 14
Palmitoléico	C 16:1	< 0,5
Estearico	C 18:0	1,4 – 5,5
Oléico (ω – 9)	C 18:1	19 – 30
Linoléico (ω – 6)	C 18:2	44 – 62
A – linolênico	C 18:3	4 – 11
Araquídico	C 20:0	< 1,0
Eicosenóico	C 20:1	< 1,0
Behênico	C 22:0	< 0,5

* O primeiro valor corresponde ao número de átomos de carbono e o segundo, o número de insaturações.

4.1.2. Soja transgênica

A biotecnologia é a ciência que visa o desenvolvimento de produtos e serviços por processos biológicos, em geral, utilizando a tecnologia de DNA recombinante, também conhecida como engenharia genética que surgiu a partir da década de 60. Esta tecnologia permite a transferência de genes de um organismo para outro. (GURGEL, 2006)

Mundialmente, há um debate sobre o impacto dos Organismos Geneticamente Modificados (OGM) na saúde humana e animal e no meio ambiente, essa polêmica se torna ainda maior por falta de dados científicos que permitam uma avaliação conclusiva para liberação comercial. A transgenia é uma técnica que pode contribuir de forma significativa para o melhoramento genético de plantas, visando à produção de alimentos, fibras e óleos. Como por exemplo, o óleo de soja existente no Canadá e nos EUA em que a quantidade de tocoferol de vitamina E pode ser aumentado em até 80 vezes. (GURGEL, 2006)

A soja transgênica é o cruzamento de soja com bactérias, arroz e vírus. A soja transgênica já existe há 10 anos no Brasil. ⁽¹³⁾

De acordo com a IMCOPA ⁽¹¹⁾, a soja transgênica se difere da soja convencional (não transgênica), pela introdução de DNA, tornando-a resistente ao herbicida Roundup®, cujo princípio ativo é o glifosato. O gene foi retirado de *Agrobacterium* estirpe CP4 e produz enzima 5' – enolpiruvato – chiquimato – 3 – fosfato – sintase (EPSPS). Contudo, o transgente completo contém seqüências de bactérias, de vírus e da petúnia cujos produtos não fazem parte da nossa alimentação.

A liberação para cultivo comercial de plantas transgênicas deve ser precedida por estudos nutricionais e toxicológicos de longa duração, mas esses estudos não existem nem mesmo nos EUA. (GURGEL, 2006)

Cientistas da FDA (Food and Drug Administration) advertem que pode haver aumento dos níveis de toxinas que ocorrem naturalmente, assim como o aparecimento de novas, não previamente identificadas. Há um aumento da tendência em absorver substâncias tóxicas do meio ambiente. ⁽¹³⁾

(11) Retirado de <http://www.imcopa.com.br/?p=empresa/asoja>

(13) Retirado de <http://xa.yimg.com/kq/groups/10690760/1514772972/name/Kit-Transg%C3%AAAnico.pdf>

4.1.3. Metodologias para análise de óleos vegetais

No tocante a óleos vegetais, algumas características (parâmetros físicos e químicos) indicam a qualidade do produto. Estes parâmetros de qualidade podem ser determinados por métodos de referência como aqueles que são estabelecidos pela AOCS (*American Oil Chemist's Society*) e têm sido muito usados em laboratórios e indústrias. (PEREIRA, 2007)

Muitas metodologias analíticas têm sido propostas para a determinação, caracterização e autenticação de óleos comestíveis, dentre elas, a Cromatografia em fase Gasosa (GC), Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (NMR), Espectrometria de emissão por plasma indutivamente acoplado associado a espectrometria de massas (ICP – MS) e Espectrometria no Infravermelho Próximo (NIR). (PEREIRA, 2007)

No tocante a determinação dos parâmetros de qualidade dos óleos, os métodos da AOCS são muito usados em função da simplicidade de operação, mas, estes métodos são lentos, trabalhosos e, em alguns casos, como por exemplo, para determinar medidas de acidez, carecem de precisão. Para tal é necessária grande quantidade de amostra e reagente e ainda há dificuldade de visualização do ponto de viragem do indicador utilizado. (PEREIRA, 2007)

Pode-se encontrar na literatura diversos estudos que tiveram como objetivo classificar e/ou autenticar óleos vegetais pela análise de alguns parâmetros ou para determinar alguns constituintes presentes nos óleos. Em função da complexidade das matrizes dos óleos, recorre-se ao uso de ferramentas quimiométricas. Algumas delas são: a análise hierárquica de agrupamentos (HCA), análise dos componentes principais (PCA), modelagem independente flexível por analogia de classe (SIMCA), análise discriminante linear (LDA) e mínimos quadrados parciais (PLS). (PEREIRA, 2007)

Dahlberg *et al* (1997) por meio da espectrometria MIR e calibração multivariada (PLS) foram capazes de determinar índice de refração e viscosidade em 27 marcas diferentes de óleos vegetais e margarinas.

Lee *et al* (1998) a fim de classificar oito tipos de óleos vegetais de acordo com a sua composição de ácidos graxos fizeram uso do PCA e LDA. A primeira técnica quimiométrica selecionou as amostras dividindo-as em grupos distintos, podendo

distingui-las claramente enquanto que a LDA identificou as amostras desconhecidas em um desses grupos. Os resultados cromatográficos obtidos mostraram adulteração em um dos tipos de óleo analisado.

Já Martin *et al* (1999) empregaram LDA para classificar óleos vegetais por meio de um arranjo de sensores de gás denominado '*Electronic Nose*'. Os resultados obtidos demonstraram que a combinação deste método com a técnica LDA permitiu classificar de forma correta todos os óleos vegetais.

Por meio da espectrometria Raman e do PLS, Barthus *et al* (2001) conseguiram determinar o índice de iodo em 24 amostras de óleos vegetais e compararam seus resultados com os métodos de referência adotados pela AOCS.

A cromatografia em fase gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) são muito usadas para a determinação do teor de ácidos graxos e esteróis em óleos, assim como na identificação, controle de qualidade e detecção de adulteração em óleos comestíveis. Nos últimos anos, a aplicação da NIR para análise de óleos tem sido muito popular para estudo de qualidade e de composição. (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2007)

Nos últimos anos, o interesse na espectroscopia NIR para análises rápidas de comida e produtos agrícolas tem crescido consideravelmente (PEREIRA *et al*, 2008)

Recentemente, Armenta, Garrigues e Guardia (2007) desenvolveram um novo método para determinar acidez e índice de peróxido em diferentes tipos de óleos comestíveis usando NIR.

A combinação de espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) e técnicas quimiométricas fornecem uma ferramenta poderosa para monitorar uma variedade de processos e devido a isso, está crescendo o interesse em propostas de controle de qualidade, por exemplo. (BLANCO; PAGÈS, 2002)

4.2 **Objetivos do capítulo**

Diferenciar óleo de soja transgênica da não transgênica com o auxílio de ferramentas quimiométricas associadas à espectroscopia NIR e FT – MIR.

4.3 Experimental

4.3.1. Análise dos óleos vegetais usando NIR

Foi feito o espectro de 80 amostras de óleo de soja de diferentes marcas, sendo 40 de óleo de soja não transgênica e 40 de óleo de soja transgênica. Para fazer as análises foi usado um espectrofotômetro de infravermelho próximo modelo 900 PLS da Femto (SP, Brasil). As amostras analisadas no espectrofotômetro foram colocadas em cubetas de vidro com 2 mm de caminho ótico e as medidas de absorvância foram feitas em uma faixa de 1100 – 2500 nm, com resolução nominal de 1 nm e usou-se o ar como referência, produzindo, portanto, um espectro com 1401 variáveis. Uma nova calibração da linha de base foi feita a cada 15 minutos e os espectros foram feitos em quintuplicatas e posteriormente obteve-se o espectro médio.

4.3.2. Análise do óleos vegetais usando o FT - MIR

Foi feito o espectro de 45 amostras de óleo de soja, sendo 30 de óleo de soja transgênica e 15 de óleo de soja não transgênica. Para aquisição dos espectros foi usado um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier modelo Spectrum 100 da Perkin Elmer. As medidas foram realizadas fazendo uso de uma célula de KBr (0,59 mm de caminho ótico) em uma faixa de 4000 – 450 cm^{-1} , com uma resolução nominal de 4 cm^{-1} , dando origem a um espectro com 3551 comprimentos de onda. Cada espectro foi alinhado pela linha de base com o auxílio do software do equipamento antes de se converter os dados espectrais obtidos para o formato ASCII.

4.4 Resultados e discussões

4.4.1. Resultados para o NIR

O espectro NIR dos óleos de soja mostrou uma região de variabilidade que afetou de uma maneira negativa o PCA que foi realizado, bem como a posterior classificação dos óleos de soja em não transgênica e transgênica. Em função disso,

essa região de variabilidade foi removida do espectro e o PCA, bem como as técnicas de classificação, foi feito usando esse espectro recortado (como essa região de variabilidade também aparecia no conjunto de amostras de óleo de soja transgênica, o mesmo procedimento de recortar o espectro foi feito). Na **Figura 56** pode ser observado o espectro NIR de todas as amostras de óleo de soja não transgênica e as respectivas bandas de absorção no NIR. A banda de 1200 nm corresponde a combinação do 3º sobreton da ligação C – H. Já a banda de 1400 nm é o sobreton de estiramento e deformação da ligação C – H. Já a banda de 1720 nm corresponde ao sobreton do estiramento assimétrico da ligação C – H. E por fim a banda de 2130 nm é referente a combinação do estiramento das ligações O–H e C–O.

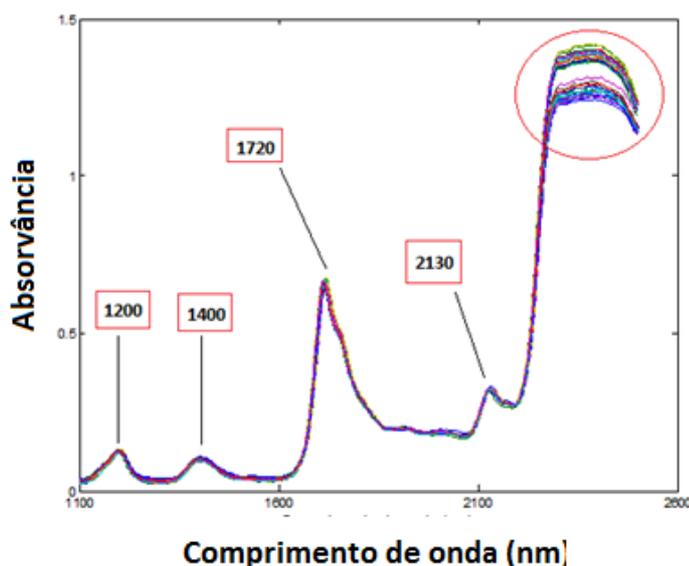


Figura 56: Espectros das amostras de óleo de soja não transgênica.

A área circunscrita em vermelho é a região de variabilidade mencionada anteriormente e que foi removida. Dessa forma, o espectro inicial que foi feito na faixa de 1100 – 2500 nm, passou a ficar na faixa de 1100 – 2201 nm (**Figura 57**).

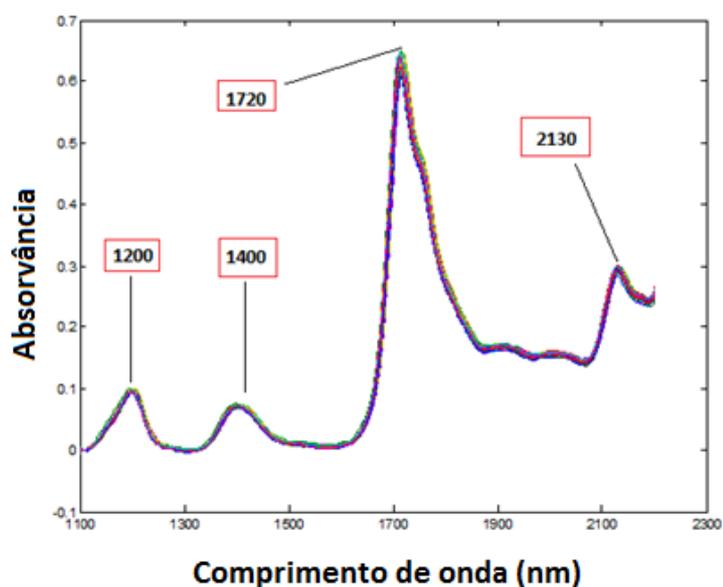


Figura 57: Espectros (recortados) dos óleos de soja não transgênicos.

Na **Figura 58** é possível observar duas amostras, uma de óleo de soja não transgênica e outra de óleo de soja transgênica. A diferença entre as amostras é praticamente imperceptível já que há uma diferença muito tênue na absorvância de óleo de soja transgênica. Daí a necessidade de se usar ferramentas quimiométricas que fossem capazes de distinguir as amostras de óleo de soja em transgênica e não transgênica.

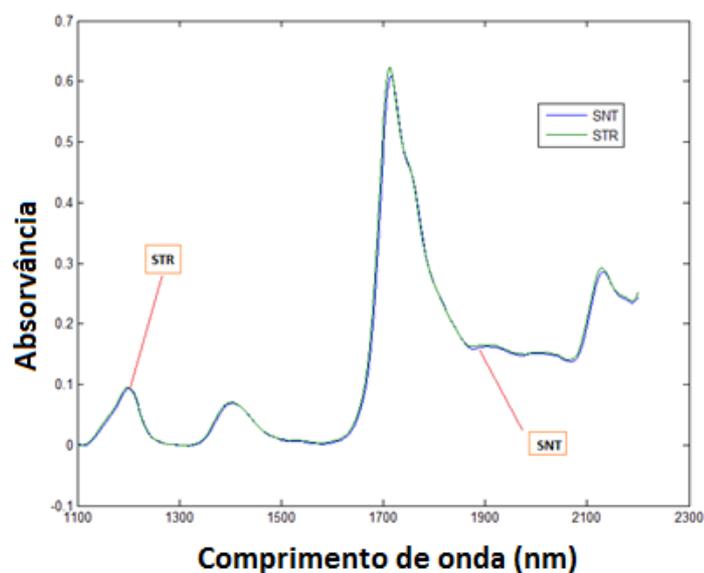


Figura 58: Espectro de amostra de óleo de soja não transgênica (SNT) e transgênica (STR)

Na **Figura 59** é possível se observar de forma distinta a amostra de óleo de soja não transgênica e transgênica. Para que isso fosse possível foi feita uma mudança de escala com relação à amostra de óleo de soja transgênica no tocante a absorvância (foi somada ao valor originado uma unidade para cada amostra do conjunto).

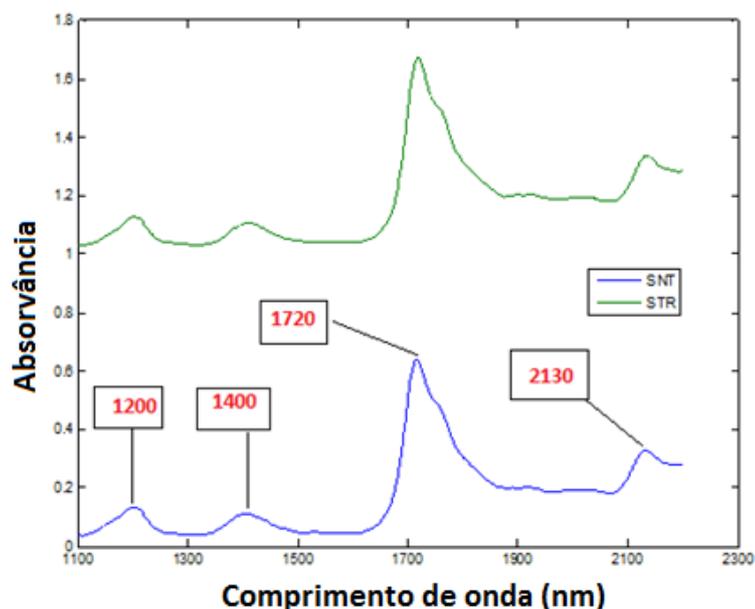


Figura 59: Espectro de amostra de óleo de soja não transgênica (azul) e óleo de soja transgênica (verde)

4.4.1.1. Análise exploratória dos dados (PCA)

Antes de dar início às técnicas de classificação dos óleos, foi feita PCA a fim de excluir amostras discrepantes. Para usar essa técnica fez-se uso do software Matlab. A seguir é possível observar os resultados obtidos bem como as amostras excluídas. Na **Figura 60** é possível observar o RMSECV (*Root Mean Square Error of Cross Validation ou Raiz quadrada do Erro médio quadrático da validação cruzada*) do PCA realizado para a soja não transgênica.

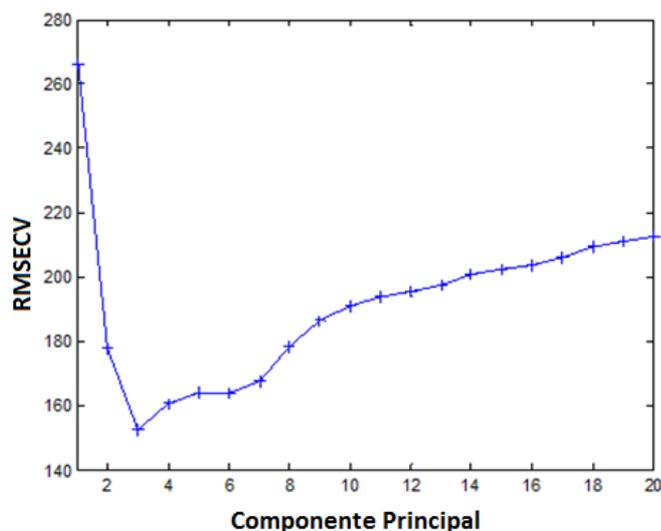


Figura 60: RMSECV para soja não transgênica.

Com base nos valores de RMSECV, se escolheu trabalhar com três componentes principais. Na **Tabela 24** se tem o modelo obtido.

Tabela 24: Modelo para três componentes principais para modelo de soja não transgênica.

Número de PCs*	Autovalores da Covariância (x)	% Variância Capturada por este PC	% Variância Capturada Total
1	$5,86 \times 10^2$	53,31	53,31
2	$3,19 \times 10^2$	28,99	82,30
3	$9,23 \times 10^1$	8,39	90,69

* PCs: Principal component (componentes principais)

A partir dos resultados de Resíduos X *Hotelling* bem como Scores (**Figura 61** e **Figura 62**) pode-se avaliar qual (is) amostra (s) tinha (m) uma influência negativa no modelo. Pôde-se concluir que a amostra 30 influenciava o modelo de forma negativa.

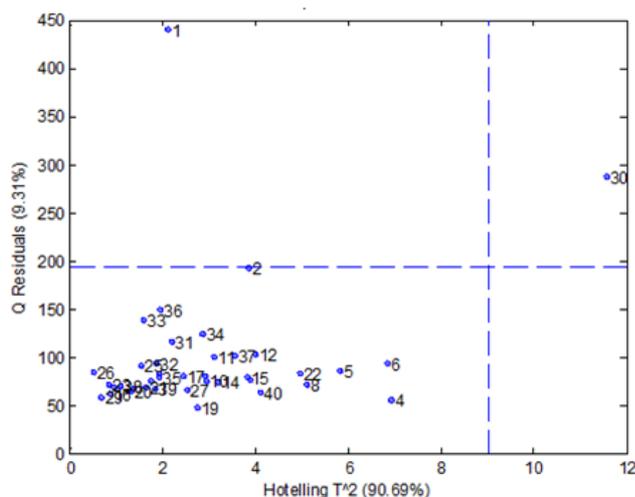


Figura 61: Q Residuals X Hotelling T^2 para modelo de soja não transgênica

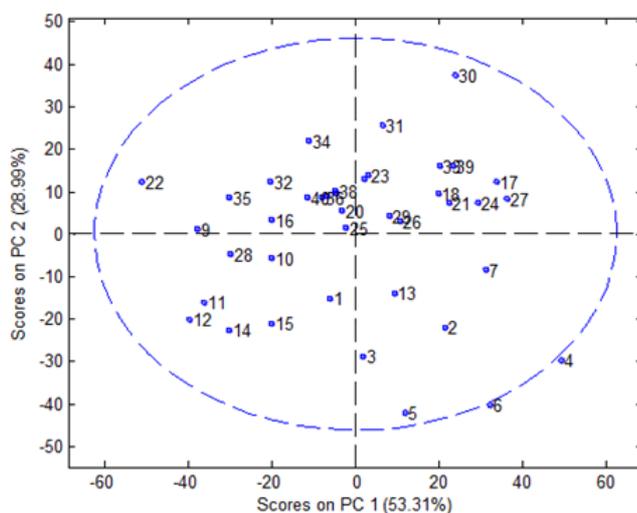


Figura 62: Scores PC2 X Scores PC1 para modelo de óleo de soja não transgênica

Com base no gráfico de resíduos X Hotelling, é possível perceber que a amostra 30 deve ser retirada do modelo, pois ela possui um resíduo consideravelmente alto e um Hotelling também alto, o que faz com que ela tenha uma alta influência no modelo, que no caso seria negativa devido ao seu alto resíduo. Embora as amostras 4 e 6 estejam praticamente fora do intervalo de confiança, elas não possuem um Hotelling e alto resíduo, portanto, inicialmente, não foram retiradas do modelo. Após a retirada da amostra 30 o modelo foi novamente calculado a fim de se verificar a necessidade da retirada de mais alguma amostra discrepante. Com base na **Figura 63** e na **tabela 25** a seguir pode-se perceber que mais uma vez se escolheu trabalhar com 3 componentes principais.

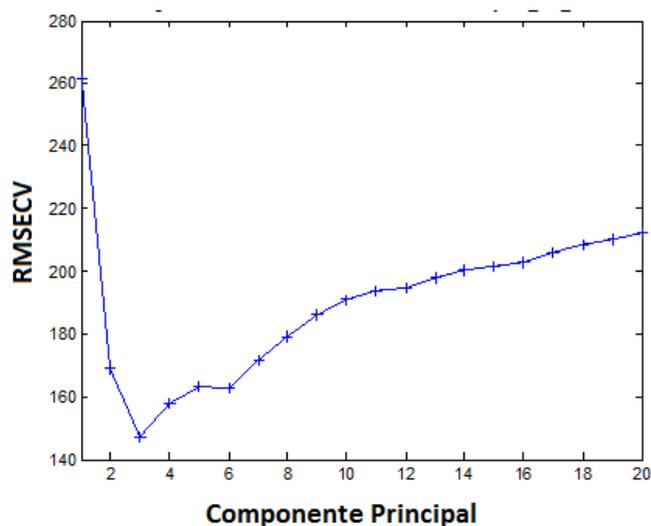


Figura 63: RMSECV sem amostra 30

Tabela 25: Modelo para três componentes principais sem amostra 30 para modelo de soja não transgênica

Número de PCs*	Autovalores da Covariância (x)	% Variância Capturada por este PC	% Variância Capturada Total
1	$6,00 \times 10^2$	54,58	54,58
2	$3,19 \times 10^2$	29,00	83,58
3	$1,90 \times 10^1$	7,46	91,04

* PCs: Principal component (componentes principais)

A seguir (**Figura 64 e 65**) é possível observar como ficou o modelo após a retirada dessa amostra.

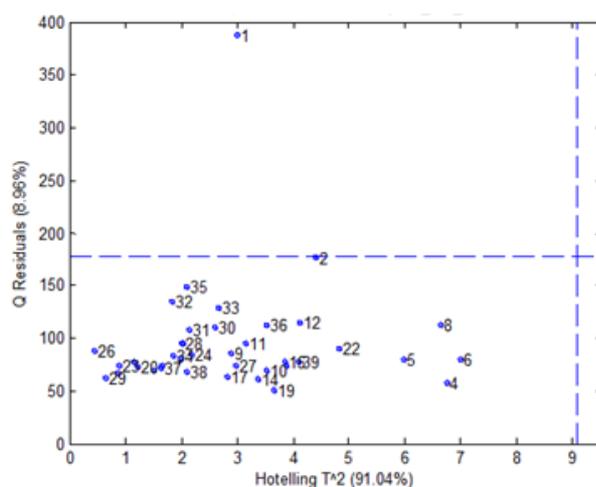


Figura 64: Q Residuals x Hotelling T^2 para modelo sem amostra 30

A amostra 1, embora tenha um resíduo alto, não possui um Hotelling muito alto, por isso mantida no modelo

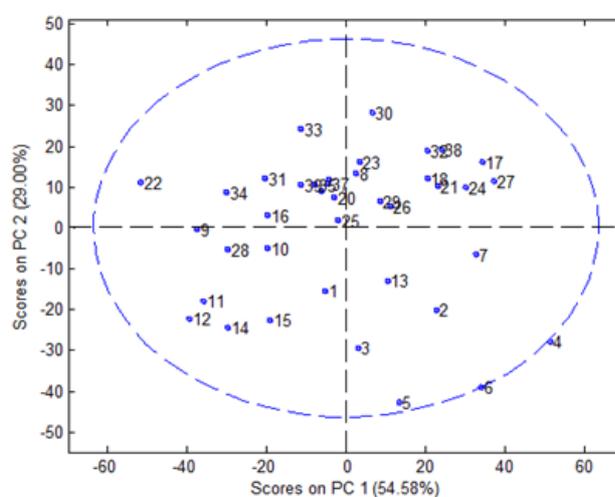


Figura 65: Scores PC2 X Scores PC1 para modelo de soja não transgênica se amostra 30

Com base no modelo recalculado, não houve necessidade de retirar mais nenhuma amostra, ficando o grupo de soja não transgênica com 39 amostras.

O mesmo procedimento foi feito para o conjunto de amostras da soja transgênica. A seguir é possível observar os valores de RMSECV (**Figura 66**).

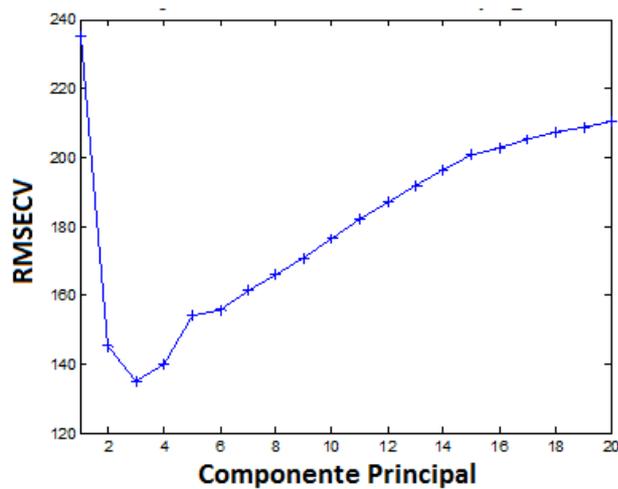


Figura 66: RMSECV para soja transgênica

Com base nos valores de RMSECV o número de componentes principais usado no modelo foi de três. Nas **Figuras 67 e 68** podem-se observar os resíduos e os scores.

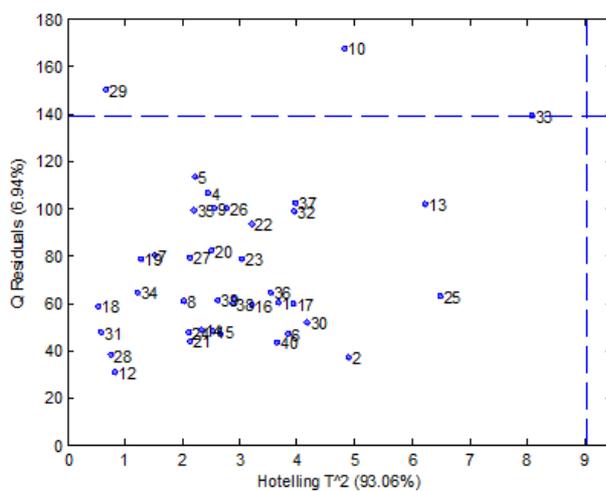


Figura 67: Q Residuals X Hotelling T² para modelo de soja transgênica

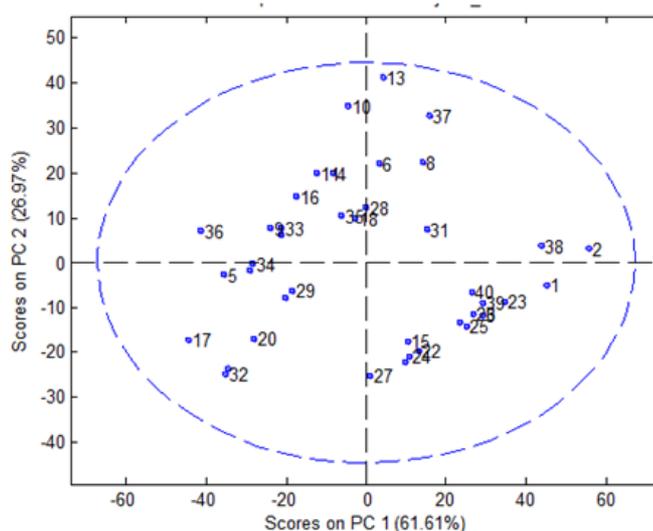


Figura 68: Scores PC2 X Scores PC1 para soja transgênica

Com base nos gráficos anteriores não houve necessidade de retirar nenhuma amostra do modelo, visto que nenhuma delas possuía um resíduo e um valor de Hotelling alto o suficiente, de forma a influenciar negativamente o modelo. Na **Tabela 26** pode-se observar o modelo obtido.

Tabela 26: Modelo para três componentes principais para modelo de soja transgênica.

Número de PCs*	Autovalores para Covariância (x)	% Variância Capturada por este PC	% Variância Capturada Total
1	$6,78 \times 10^2$	61,61	61,61
2	$2,97 \times 10^2$	26,97	88,58
3	$4,93 \times 10^1$	4,98	93,06

*PC: Principal Component (Componentes Principais)

Com base nos resultados obtidos, não foi retirada nenhuma amostra do conjunto de óleo de soja transgênica. De posse desses resultados, partiu-se para a classificação dos óleos de soja, fazendo uso das técnicas de classificação supervisionada: SIMCA, SVM – DA e PLS – DA. Para tal foi feito uso do software *Solo versão 6.5 da Eigenvector*.

4.4.1.2. SIMCA

A fim de se classificar as amostras de óleo foram criados dois conjuntos: um de calibração e outro de validação. Para a escolha das amostras do grupo da soja não transgênica e do grupo de soja transgênica que iriam compor o conjunto de calibração foi usado o algoritmo Kennard Stone. Com isso, o conjunto de calibração possuía 40 amostras (20 amostras de cada tipo de óleo) e o conjunto de validação possuía no total 39 amostras (19 de soja não transgênica e 20 de soja transgênica).

Com isso a partir dos conjuntos montados fez-se a classificação usando o SIMCA. A classificação esperada (**Figura 69**) era que para o conjunto de calibração as amostras de 1 até 20 fossem classificadas como soja não transgênica e as amostras 21 até 40 classificadas como soja transgênica. Para o conjunto de validação o esperado era que as amostras 41 até 59 fossem classificadas como soja não transgênica e as amostras 60 até 79 fossem classificadas como soja transgênica.

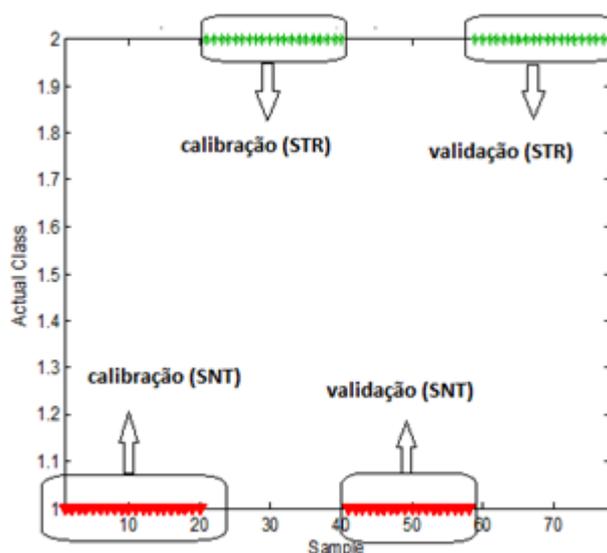


Figura 69: Classificação teórica (SNT: Soja não transgênica; STR: Soja transgênica)

A classificação obtida quando se usou cada um dos pré-processamentos foi diferente da esperada (**Figura 70**)

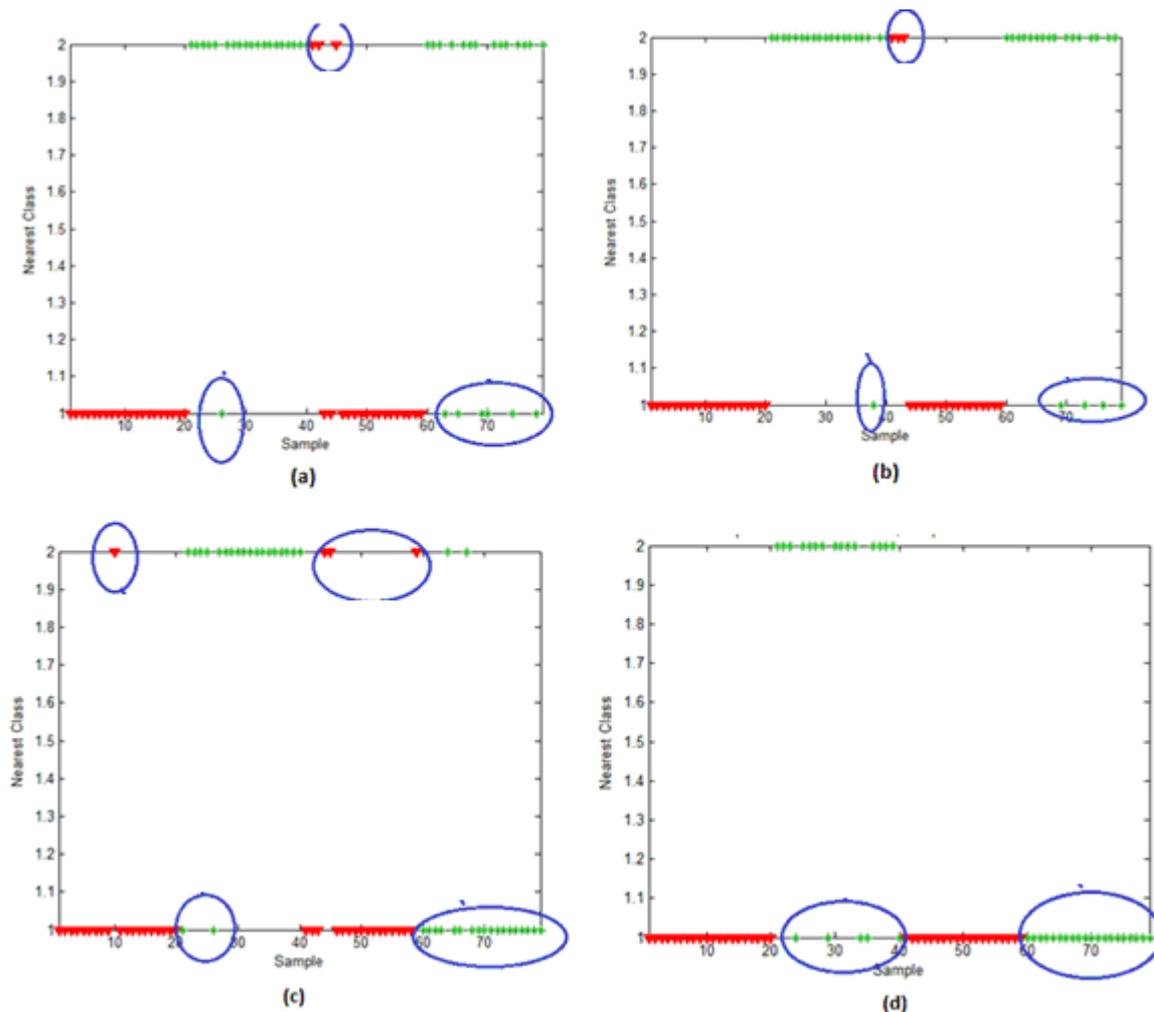


Figura 70: (a) Classificação obtida ao se usar MC (b) Classificação obtida ao se usar MC + MSC (c) Classificação obtida ao se usar MC + 1ª Der (d) Classificação obtida ao se usar MC + 2ª Der

As regiões circuladas em azul são referentes às amostras que não foram modeladas nas classes 1 e 2 (Soja não transgênica e transgênica respectivamente). Como é possível observar ao usar a primeira e segunda derivada os resultados foram bem ruins quando comparados aos obtidos no uso da centralização da média e também de MC + MSC. A seguir, na **Tabela 27** é possível observar um resumo dos resultados obtidos para SIMCA. Para cada tipo de pré – processamento utilizado foi obtido um índice de acertos.

Tabela 27: Porcentagem de acertos da classificação SIMCA por NIR

Pré – processamento	SNT		STR	
	Calibração	Validação	Calibração	Validação
MC	100%	84%	95%	70%
MC + MSC	100%	84%	95%	80%
MC + 1ª der	95%	84%	90%	10%
MC + 2ª der	100%	100%	75%	0%

O pré-processamento que forneceu os melhores resultados foi a combinação de MC + MSC.

4.4.1.3. SVM – DA

A classificação esperada era a mesma que para o SIMCA. A classificação obtida pode ser observada nas **Figura 71 e 72**.

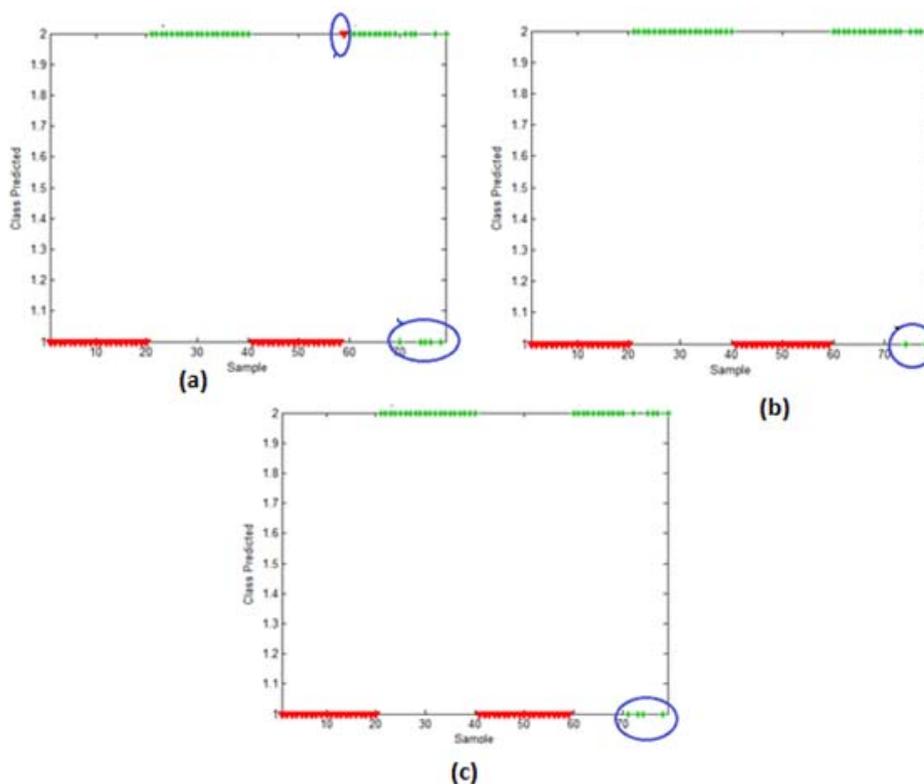


Figura 71: (a) Classificação obtida com MC (b) Classificação obtida com MC + MSC (c) Classificação obtida com MC + OSC

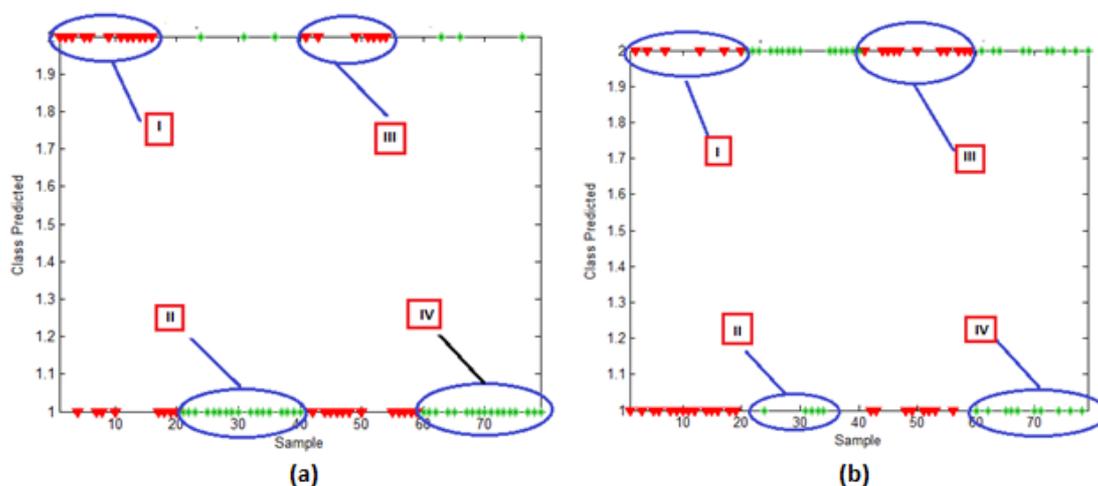


Figura 72: (a) Classificação usando MC + 1ª Der (b) Classificação usando MC + 2ª Der

Mais uma vez as amostras circuladas em azul não puderam ser classificadas. No caso da **Figura 71a** apenas uma amostra de óleo de soja não transgênica e algumas de óleo de soja transgênica não foram classificadas corretamente. É possível observar uma melhora na classificação ao se usar MC + MSC. Novamente nota-se uma piora na classificação ao se usar a primeira e segunda derivada. Na **Tabela 28** é possível se observar um resumo dos resultados obtidos para SVM-DA

Tabela 28: Índice de acertos na classificação SVM – DA por NIR.

Pré – processamento	SNT		STR	
	Calibração	Validação	Calibração	Validação
MC	100%	95%	100%	75%
MC + MSC	100%	100%	100%	90%
MC + OSC	100%	100%	100%	80%
MC + 1ª der	40%	63%	15%	15%
MC + 2ª der	70%	42%	75%	50%

De acordo com a **Tabela 28** pode-se concluir que tanto o pré-processamento MC + MSC quanto MC + OSC forneceram bons resultados, mas aquele que forneceu os melhores resultados foi a combinação de MC + MSC.

4.4.1.4. PLS – DA

A seguir na **Figura 73** é possível observar a classificação quando se usou MC e MC + MSC. É possível perceber uma melhora na classificação das amostras ao se usar MC + MSC. Já na **Figura 74** é possível observar a classificação ao se usar MC + OSC, MC + 1ª der e MC + 2ª der.

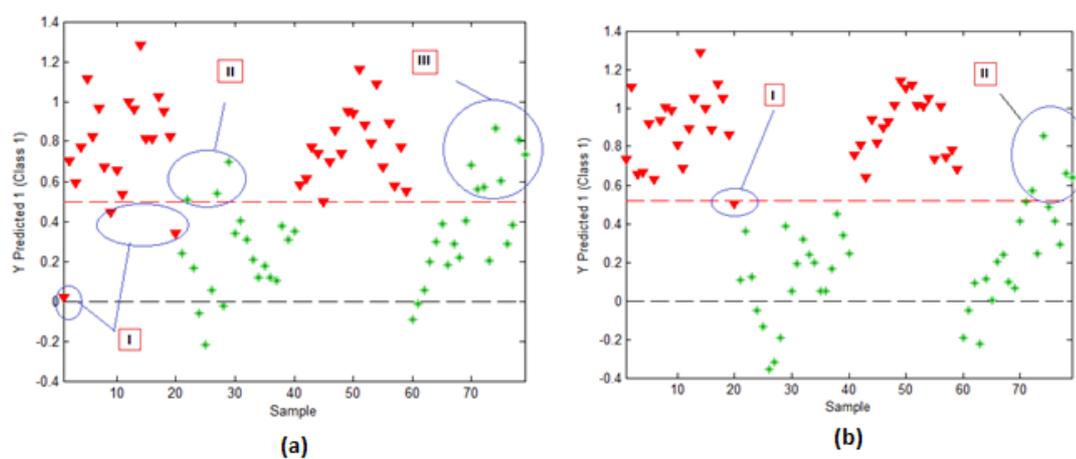


Figura 73: (a) Classificação usando MC (b) Classificação usando MC + MSC

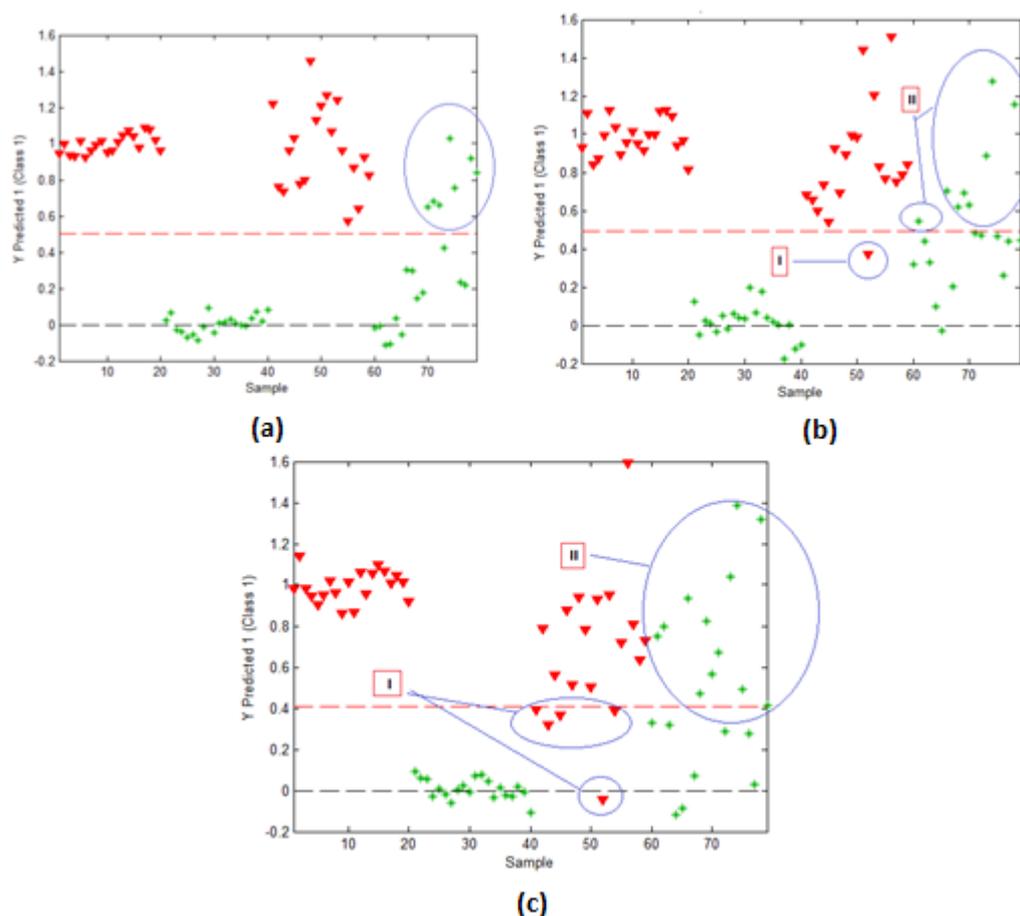


Figura 74: (a) classificação usando MC + OSC (b) classificação usando MC + 1ª Der (c) Classificação usando MC + 2ª Der

Na **Tabela 29** pode-se observar um resumo dos resultados obtidos para PLS –DA, onde se tem os acertos obtidos para cada pré-processamento utilizado.

Tabela 29: Índice de acertos na classificação por PLS – DA por NIR.

Pré – processamento	SNT		STR	
	Calibração	Validação	Calibração	Validação
MC	85%	100%	85%	65%
MC + MSC	95%	100%	100%	80%
MC + OSC	100%	100%	100%	65%
MC + 1ª der	100%	95%	100%	60%
MC + 2ª der	100%	74%	100%	40%

Com base nos resultados obtidos, o melhor pré-processamento nesse caso foi a combinação de MC + MSC.

Com base nos resultados obtidos é possível perceber que a técnica NIR associada a ferramentas quimiométricas de classificação se mostrou uma boa ferramenta na discriminação dos tipos de óleo de soja. Na **Tabela 30** a seguir é possível observar os melhores resultados para cada técnica.

Tabela 30: Porcentagem de acertos para classificação de óleos por NIR

PP**	Técnica	SNT		STR	
		CAL**	VAL**	CAL**	VAL**
MC + MSC	SIMCA	100%	84%	95%	80%
	SVM-DA	100%	100%	100%	90%
	PLS-DA	95%	100%	100%	80%
MC + OSC	SVM-DA	100%	100%	100%	80%

**PP = pré processamento; CAL = calibração; VAL = validação

4.4.2. Resultados para o FT - MIR

A seguir é possível observar um espectro MIR para uma amostra de óleo de soja não transgênica (**Figura 75**)

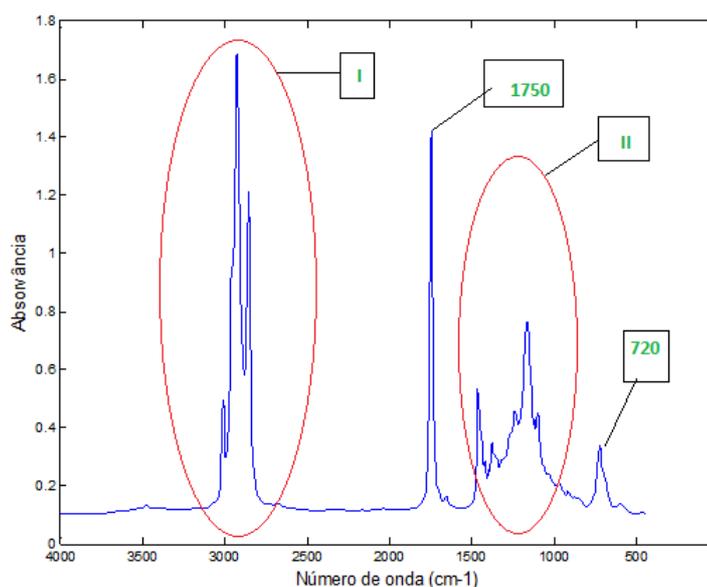


Figura 75: Espectro de uma amostra de óleo de soja não transgênica

A região de 1750 cm^{-1} indica a presença de estiramento de ligação C=O. Já a região de 720 cm^{-1} indica associação de bandas: $-(\text{CH}_2)_n$. As regiões circuladas em vermelho (I e II) podem ser melhor observadas na **Figura 76**, respectivamente, a seguir.

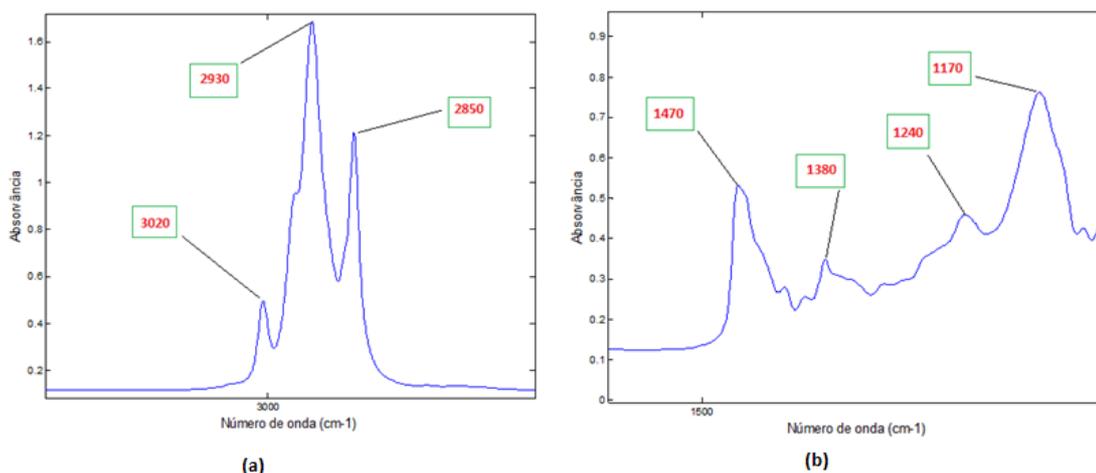


Figura 76: (a) Bandas de absorção (região I) do MIR para uma amostra de óleo de soja não transgênica (b) Bandas de absorção (região II) do MIR para uma amostra de óleo de soja não transgênica

A região I na **figura 76a** representa as bandas de absorvância na região de 3020 , 2930 e 2850 cm^{-1} (que representam estiramento simétrico e assimétrico da ligação C – H). Já a região II na **figura 76b** representa as bandas de absorvância na região de 1470 (deformação angular da ligação C – H; CH_3 e/ou CH_2), 1380 (deformação angular da ligação C – H; CH_2), 1240 e 1170 cm^{-1} (estiramento da ligação C – O de éster).

Na **Figura 77a** a seguir é possível observar um espectro de óleo de soja não transgênica (em azul) e um espectro de óleo de soja transgênica (em verde). Visualmente a diferença entre os dois tipos de óleo de soja é praticamente imperceptível, mas há um ligeiro aumento na absorvância do óleo de soja transgênica, que foi possível de ser observado (**Figura 77b**) ao ser dado um zoom na **figura 77a**.

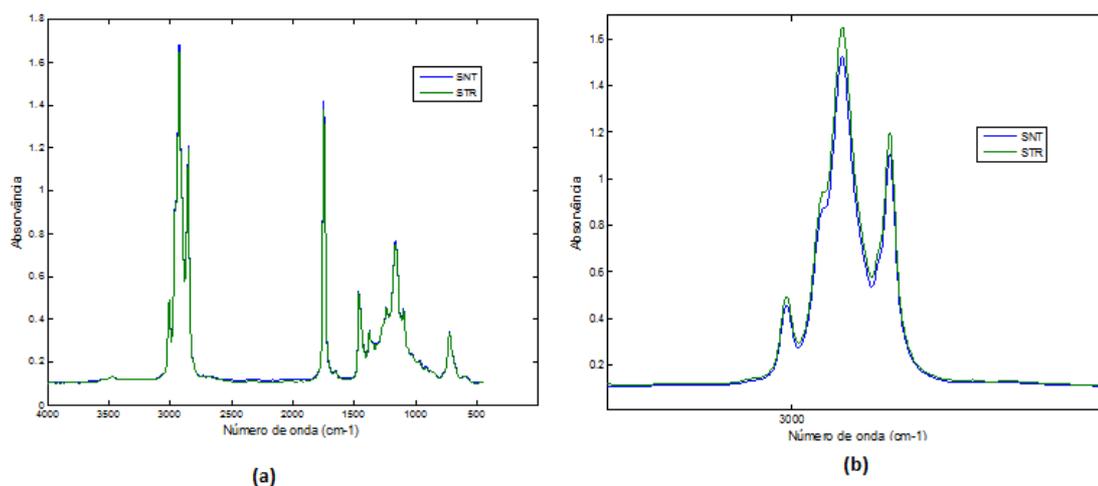


Figura 77: (a) Espectro de uma amostra de óleo de soja não transgênica e amostra de óleo de soja transgênica (b) Zoom dos espectros de óleo de soja não transgênica e transgênica.

Já na **figura 78** é possível observar os dois espectros de forma bem distinta. Isso foi possível, pois foi somada uma unidade a absorvância do espectro da amostra de óleo de soja transgênica.

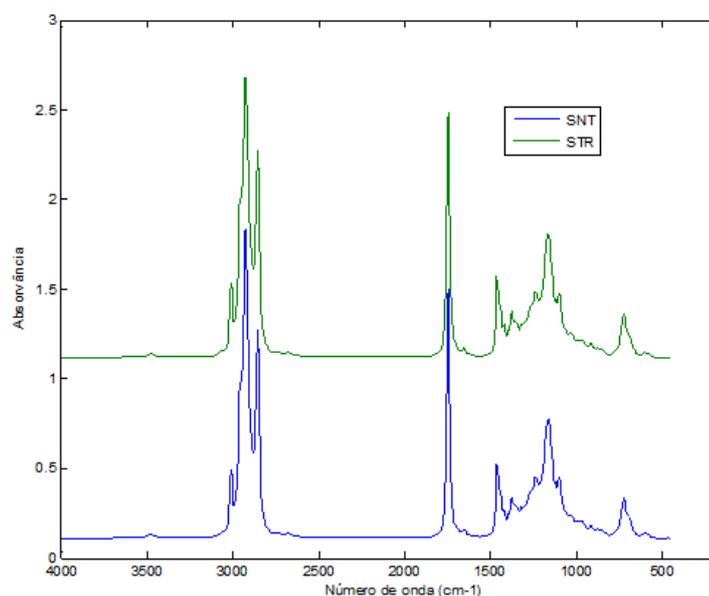


Figura 78: Espectros de amostra de soja não transgênica (SNT) e transgênica (STR)

Dessa forma, devido ao fato de as diferenças visualmente serem praticamente imperceptíveis é necessário o uso de ferramentas quimiométricas para

que seja possível classificar as amostras em óleo de soja não transgênica e transgênica.

4.4.2.1. Análise não supervisionada obtida pelo PCA

Baseado nos valores de RMSECV (**figura 79**) foram escolhidos 2 PCs para se trabalhar. Os *eigenvalues* (autovalores) podem ser observados na **Tabela 31**.

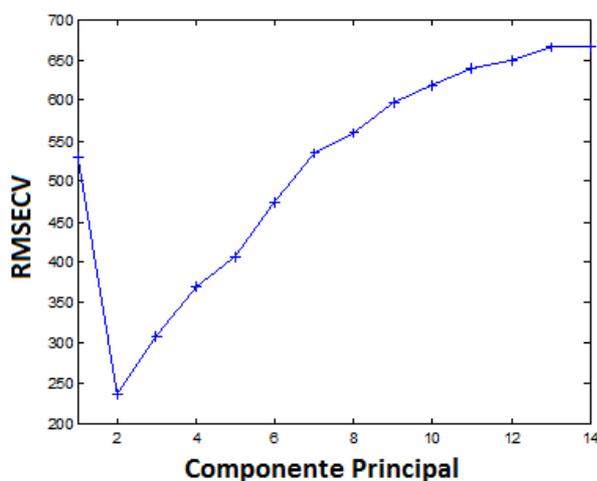


Figura 79: Valores de RMSECV para soja transgênica (MIR)

Tabela 31: Modelo do PCA para soja não transgênica.

Número de PCs*	Autovalores da Covariância (x)	% Variância Capturada por este PC	% Variância Capturada total
1	$3,00 \times 10^3$	84,45	84,45
2	$5,34 \times 10^2$	15,04	99,49

*PCs: Principal Component (Componentes Principais)

De acordo com a **Figura 80** e **81** não houve necessidade de se retirar nenhuma amostra do modelo.

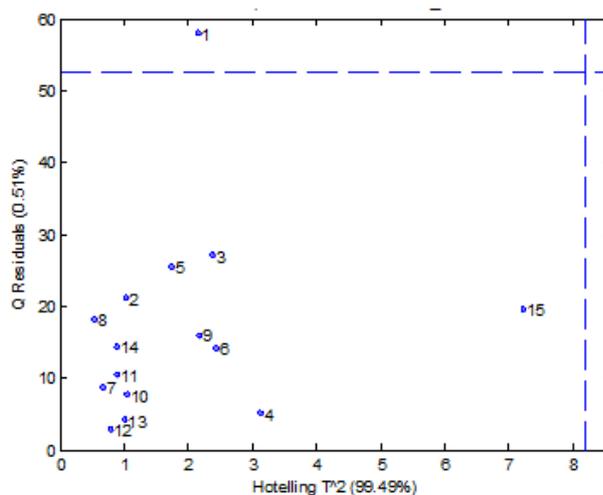


Figura 80: Q Residuals X Hotelling T^2 para soja não transgênica por FT - MIR

A amostra 15 embora tenha um Hotelling alto não possui um alto resíduo não tendo sido, portanto, necessário retirá-la do modelo. Já a amostra 1 embora possua um alto resíduo não possui um Hotelling alto, não influenciando então o modelo de forma significativa, não havendo, portanto, a necessidade de se retirá-la.

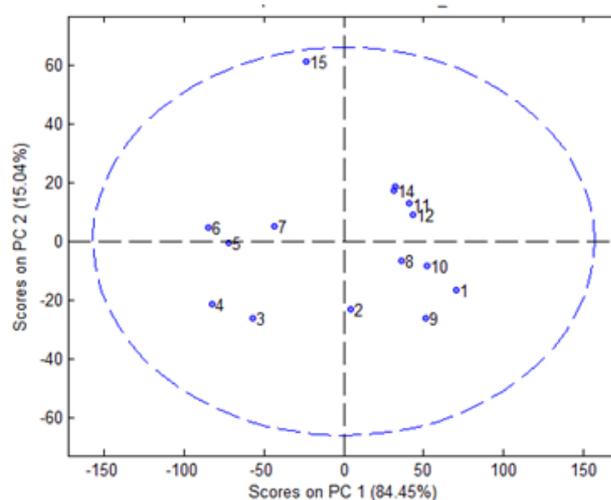


Figura 81: Scores PC2 X Scores PC1 para soja não transgênica por FT - MIR

O mesmo procedimento foi feito com as amostras de óleo de soja transgênica a fim de verificar se havia alguma amostra que tivesse uma influencia negativa no modelo e que deveria, portanto ser retirada. Com base na **Figura 82** o modelo foi calculado usando-se 3 PCs.

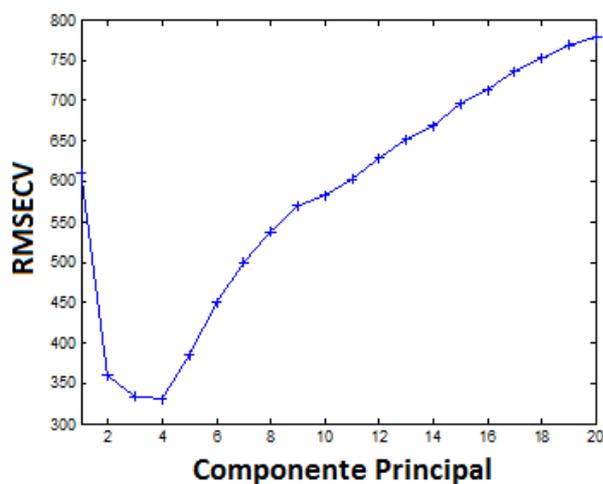


Figura 82: Valores de RMSECV para soja transgênica por FT - MIR

Na **Tabela 32** podem-se observar os *eigenvalues* (autovalores) para o modelo calculado.

Tabela 32: Modelo do PCA para soja transgênica por FT – MIR

Número de PCs*	Autovalores da Covariância (x)	% Variância Capturada por este PC	% Variância Capturada total
1	$2,78 \times 10^3$	78,28	78,28
2	$6,34 \times 10^2$	17,85	96,13
3	$9,52 \times 10^1$	2,68	98,81

*PCs: Principal Component (Componentes Principais)

As **Figuras 83 e 84** mostraram que a amostra 30 deveria ser retirada do modelo.

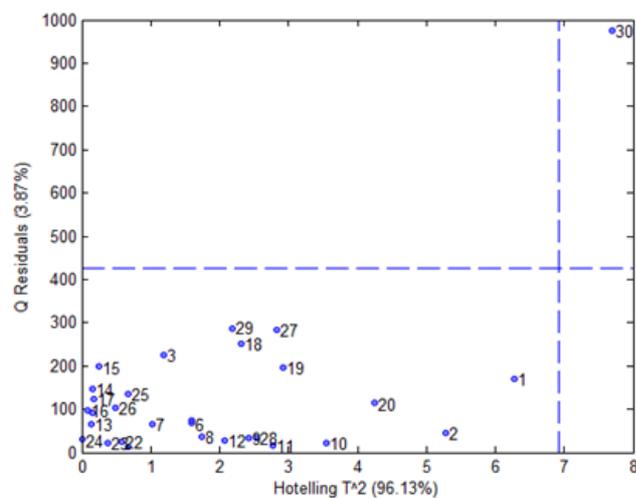


Figura 83: Q Residuals X Hotelling T^2 para soja transgênica por FT - MIR

Ao observar o gráfico anterior, pode-se perceber que a amostra 30 possui um alto Hotelling tendo uma influência significativa no modelo, associada ao fato de possuir um alto resíduo, o que fez com que fosse necessário retirá-la e recalculer o modelo.

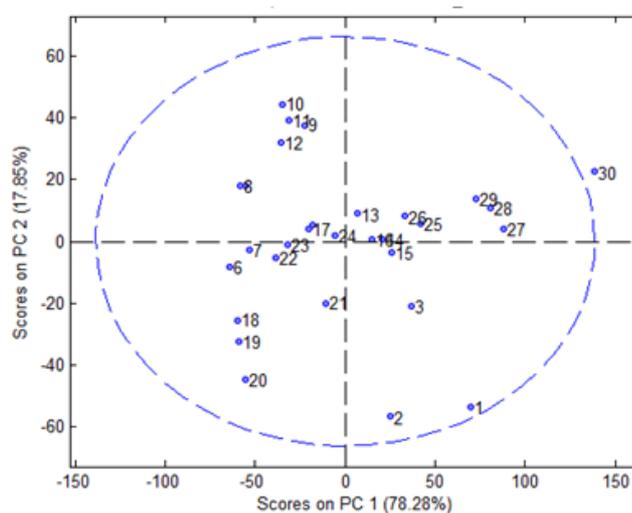


Figura 84: Scores PC2 X Scores PC1 para soja transgênica por FT - MIR

Com a retirada da amostra 30, houve a necessidade de recalculer o modelo. Se trabalhou com 2 PCs, baseado nos valores de RMSECV (**Figura 85**).

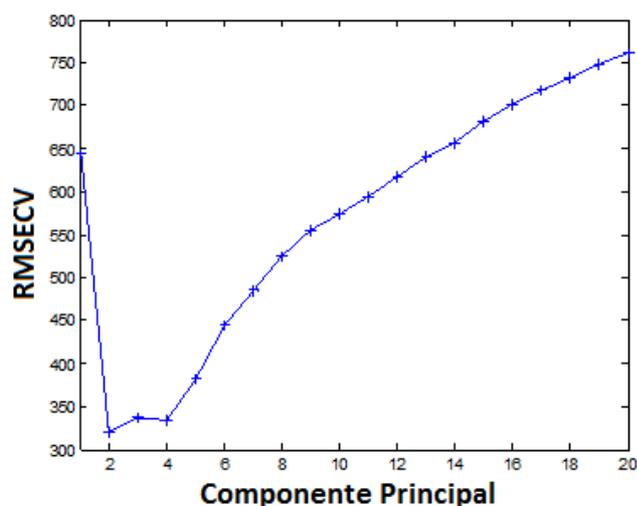


Figura 85: Valores de RMSECV para modelo sem amostra 30

Os *eigenvalues* (autovalores) referentes aos 2 PCs (modelo recalculado sem a amostra 30) podem ser observados na **Tabela 33**.

Tabela 33: Modelo PCA sem amostra 30 por FT - MIR

Número de PCs*	Autovalores da Covariância (x)	% Variância Capturada por este PC	% Variância Capturada total
1	$2,67 \times 10^3$	75,13	75,13
2	$7,69 \times 10^2$	21,65	96,78

*PCs: Principal Component (Componentes Principais)

As **Figuras 86 e 87** demonstraram não haver necessidade de se retirar mais nenhuma amostra do conjunto de óleo de soja transgênica.

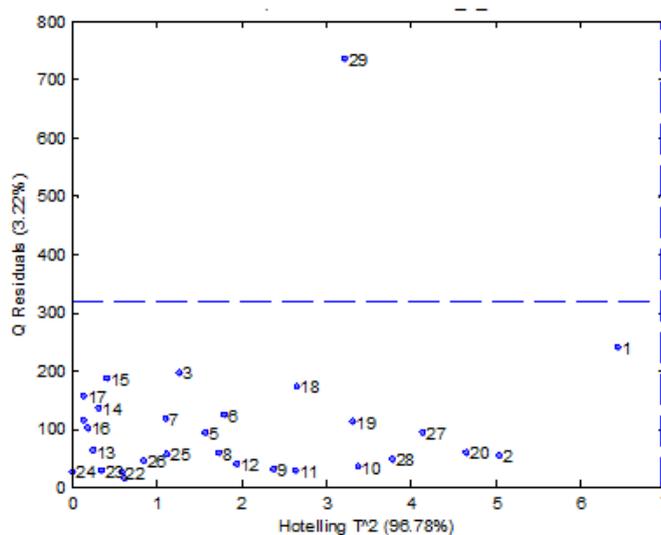


Figura 86: Q Residuals X Hotelling T^2 para soja não transgênica sem amostra 30 por FT - MIR

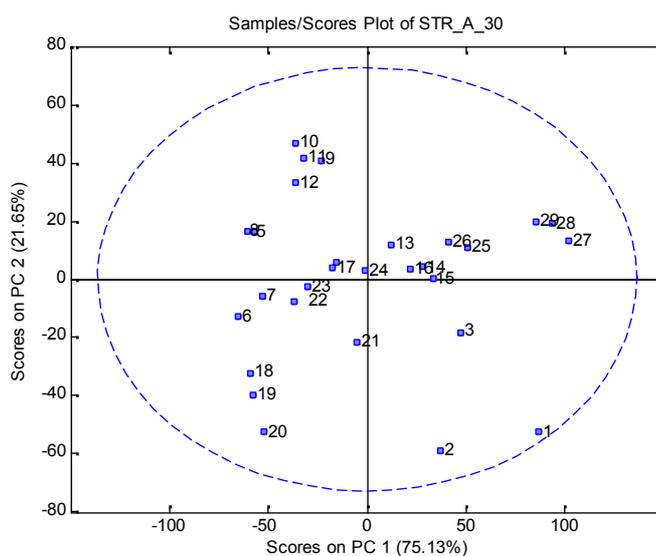


Figura 87: Scores PC2 X Scores PC1 para soja transgênica sem amostra 30 por FT - MIR

A partir dos resultados do PCA foi retirada uma amostra do conjunto do óleo de soja transgênica. Desse modo, o conjunto inicial dos óleos que possuía 45 amostras (15 de óleo de soja não transgênica e 30 de óleo de soja transgênica), o mesmo passou a ter 44 amostras (15 de óleo de soja não transgênica e 29 de óleo de soja transgênica). A partir desse conjunto foi usado o algoritmo KS para selecionar as amostras que iriam compor o conjunto de calibração. Desse modo o conjunto de calibração possuía 23 amostras e o de validação possuía 21 amostras.

Sendo que no conjunto de calibração das 23 amostras 8 eram de óleo de soja não transgênica e 15 de óleo de soja transgênica. Já no conjunto de validação, das 21 amostras, 7 eram de óleo de soja não transgênica e 14 de óleo de soja transgênica.

4.4.2.2. Análise supervisionada obtida pelo método SIMCA

Nessa técnica de classificação foram usados diferentes pré-processamentos para verificar qual deles fornecia o melhor resultado. Em todos eles o esperado (**Figura 88**) era que as amostras 1 – 8 fossem classificadas como óleo de soja não transgênica (conjunto de calibração), as amostras 9 – 23 fossem classificadas como óleo de soja transgênica (conjunto de calibração), as amostras 24 – 30 fossem classificadas como óleo de soja não transgênica (conjunto de validação) e as amostras 31 – 44 fossem classificadas como óleo de soja transgênica (conjunto de validação).

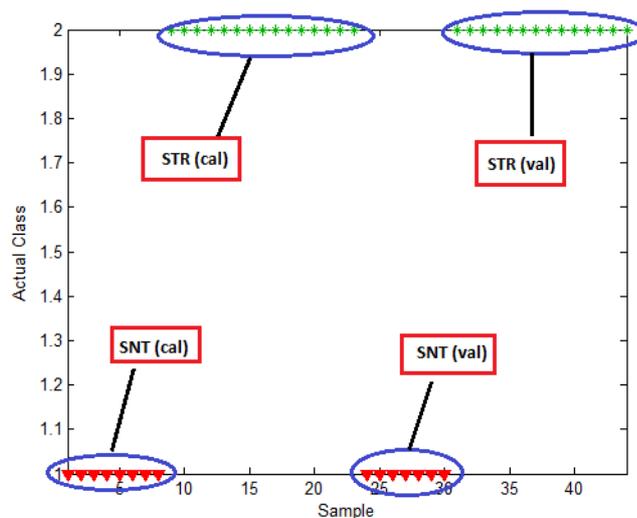


Figura 88: Classificação esperada (SNT: soja não transgênica; STR – soja transgênica)

Nas **Figuras 89** e **90** é possível observar a classificação obtida ao usar a centralização na média como pré processamento.

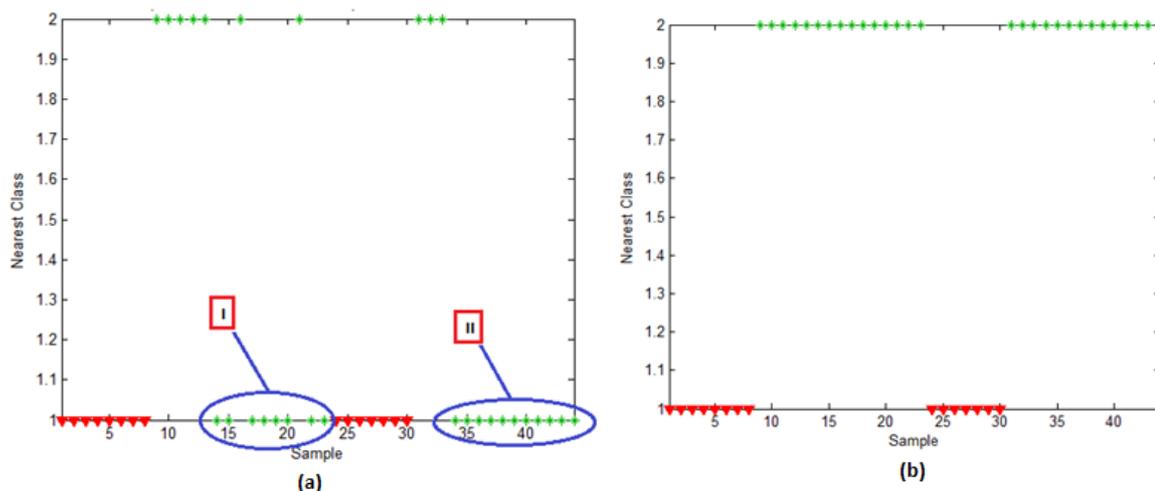


Figura 89: (a) Classificação obtida ao se usar MC **(b)** Classificação obtida ao se usar MC + MSC

Como é possível observar na **Figura 89a** as amostras do conjunto I (conjunto de calibração) foram erroneamente classificadas como soja não transgênica. O mesmo ocorreu com as amostras do conjunto II (conjunto de validação). Ao usar a combinação MC + MSC para o pré-processamento, o resultado obtido foi igual ao esperado. Quando se usou a combinação MC + MSC houve 100% de acerto. Já na **Figura 90** é possível observar a classificação ao se usar MC + primeira derivada e MC + segunda derivada.

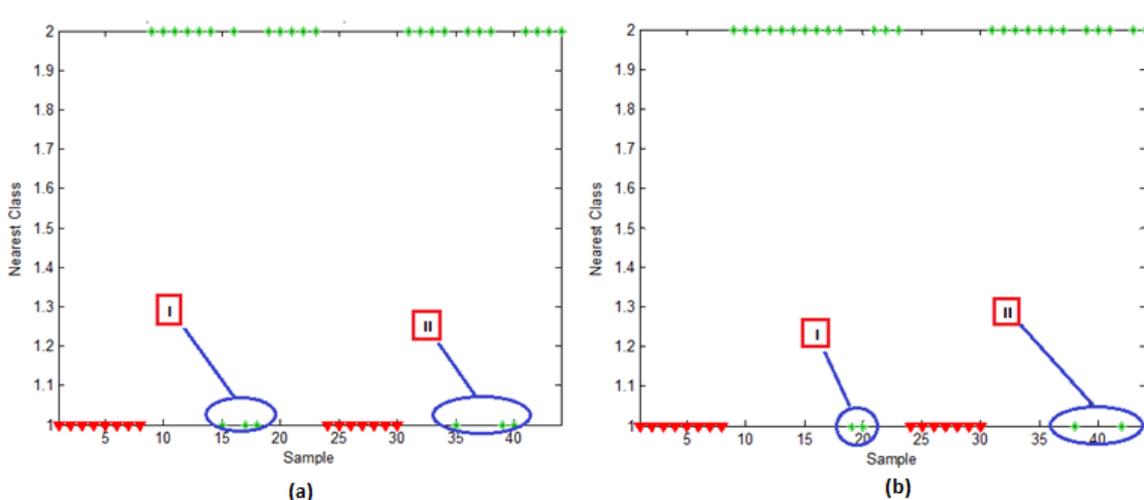


Figura 90: (a) Classificação obtida ao se usar MC + 1ª Der **(b)** Classificação obtida ao se usar MC + 2ª Der

Como é possível observar as amostras do conjunto I (conjunto de calibração) foram erroneamente classificadas como óleo de soja não transgênica. O mesmo aconteceu com as amostras do conjunto II (conjunto de validação) tanto no uso da primeira derivada quanto da segunda derivada.

Com base nos resultados obtidos foi possível verificar (**Tabela 34**) qual pré-processamento oferecia o melhor resultado.

Tabela 34: Índice de acertos no modelamento de classes usado SIMCA para FT - MIR

Pré – processamento	SNT		STR	
	Calibração	Validação	Calibração	Validação
MC	100%	60%	100%	21%
MC + MSC	100%	100%	100%	100%
MC + 1ª der	100%	80%	100%	79%
MC + 2ª der	100%	87%	100%	86%

Com base na **Tabela 34** é possível observar que o pré-processamento que ofereceu o melhor resultado foi quando se usou a centralização na média + correção multiplicativa do sinal. Onde se obteve um resultado de 100% na classificação para as amostras do grupo de calibração e também de 100% para as amostra de óleo de soja não transgênica do grupo de validação.

4.4.2.3. SVM – DA

Ao se usar essa técnica, a classificação esperada era exatamente a mesma que era esperada para SIMCA. Novamente se trabalhou com diferentes pré-processamentos para verificar qual deles era o mais adequado.

Ao usar MC, MC + MSC e MC + OSC como pré-processamento a classificação obtida foi exatamente a esperada (**Figura 91**)

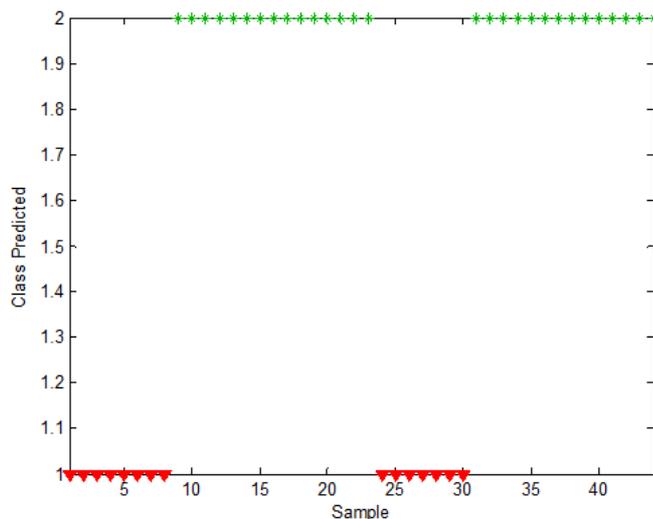


Figura 91: Classificação obtida usando SVM– DA (MC, MC + MSC, MC + OSC)

Ao usar MC + primeira derivada e MC +segunda derivada se obteve uma classificação diferente da esperada (**Figura 92**)

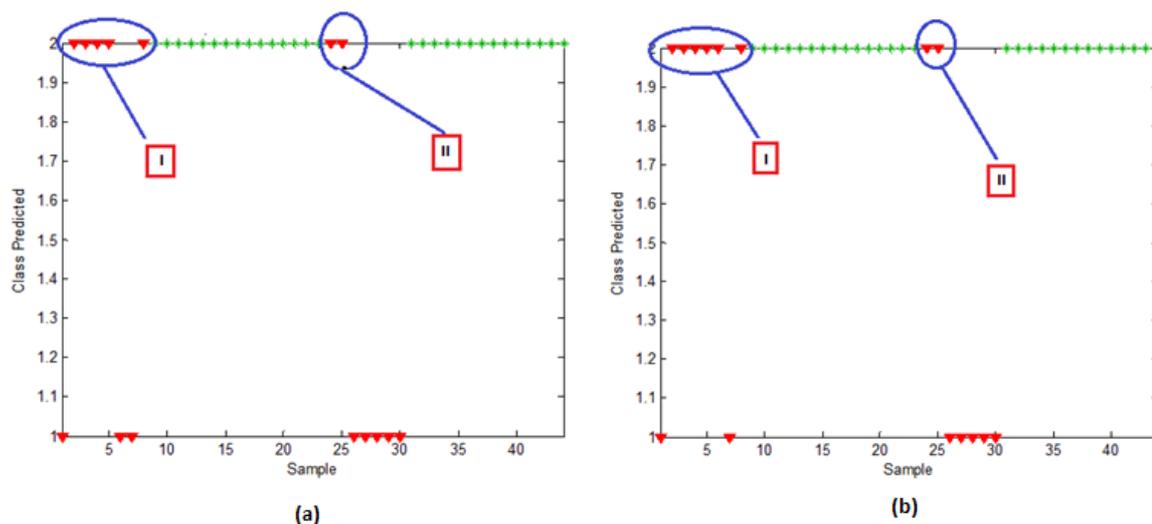


Figura 92: (a) Classificação obtida usando MC + 1ª Der (b) Classificação obtida usando MC + 2ª Der

Nesse caso as amostras do conjunto I (conjunto de calibração) e as amostras do conjunto II (conjunto de validação) foram erroneamente classificadas como óleo de soja transgênica.

Na **Tabela 35** é possível observar o índice de acertos na classificação dos óleos ao usar SVM – DA como técnica de classificação.

Tabela 35: Índice de acerto na classificação SVM – DA para FT - MIR

Pré – processamento	SNT		STR	
	Calibração	Validação	Calibração	Validação
MC	100%	100%	100%	100%
MC + MSC	100%	100%	100%	100%
MC + OSC	100%	100%	100%	100%
MC + 1ª der	38%	100%	71%	100%
MC + 2ª der	100%	100%	71%	100%

É possível observar que ao usar MC, MC + MSC e MC + OSC se obteve 100% de acerto na classificação dos óleos. Já o uso da primeira e segunda derivadas como pré-processamento demonstraram resultados não muito eficazes.

4.4.2.4. PLS – DA

Mais uma vez a classificação esperada era a mesma que para as técnicas anteriores utilizadas. Com essa técnica para todos os pré-processamentos (**Tabela 36**) se obteve um índice de 100% de acerto (**Figura 93**).

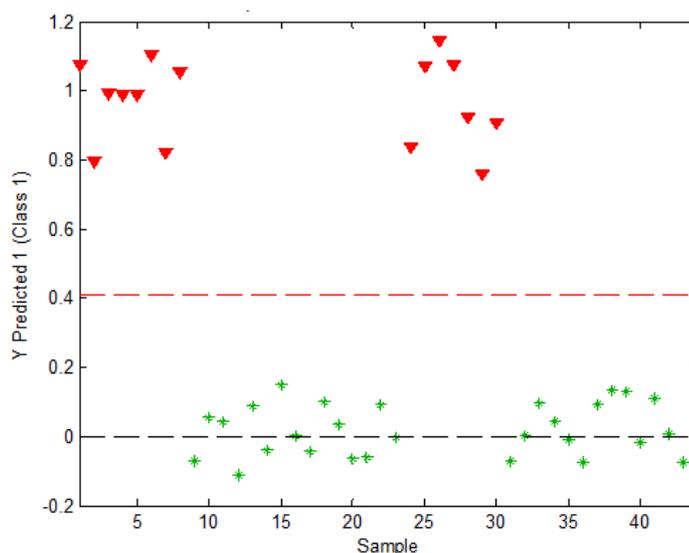
**Figura 93:** Classificação obtida PLS – DA

Tabela 36: Índice de Acerto na classificação usando PLS – DA para FT - MIR

Pré – processamento	SNT		STR	
	Calibração	Validação	Calibração	Validação
MC	100%	100%	100%	100%
MC + MSC	100%	100%	100%	100%
MC + OSC	100%	100%	100%	100%
MC + 1ª der	100%	100%	100%	100%
MC + 2ª der	100%	100%	100%	100%

Ao se usar espectroscopia FT – MIR os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, o que já era esperado visto que a técnica MIR é mais robusta que a NIR. Na **Tabela 37** a seguir é possível observar as melhores porcentagens de acerto na classificação.

Tabela 37: Porcentagem de acerto na classificação FT – MIR para óleos

PP	Técnica	SNT		STR	
		CAL	VAL	CAL	VAL
MC	SVM-DA	100%	100%	100%	100%
	PLS-DA				
MC + MSC	SIMCA	100%	100%	100%	100%
	SVM-DA				
MC + OSC	PLS-DA	100%	100%	100%	100%
	SVM-DA				
MC + 1ª DER	PLS-DA	100%	100%	100%	100%
	PLS-DA				
MC + 2ª DER					

4.5 Conclusões Gerais do capítulo

As duas técnicas analíticas aliadas a ferramentas quimiométricas permitiram distinguir de forma satisfatória os óleos de soja. Das três técnicas utilizadas (SIMCA, SVMDA e PLSDA) as duas últimas oferecem ótimos resultados, independente de serem amostras oriundas de espectro NIR ou FT- MIR. De uma maneira geral, embora a FT – MIR seja uma técnica mais comumente empregada para esse tipo de finalidade, a espectroscopia NIR também se mostrou uma técnica eficaz. Na espectroscopia NIR, tanto a SVMDA e PLSDA forneceram resultados bastante satisfatórios para distinguir os óleos de soja. Nessas duas técnicas quimiométricas, o melhor pré - processamento (aquele que forneceu os melhores resultados comparados com os demais) foi a combinação MC + MSC, sendo que para SVMDA se obteve uma porcentagem de acerto de 100% na classificação tanto para a calibração quanto para a validação de óleo de soja não transgênica enquanto que para a soja transgênica, a porcentagem de acerto foi de 100% na calibração e 90% na validação. Já a SIMCA não teve um êxito muito satisfatório comparado com as técnicas anteriormente citadas. Dessa forma, para se distinguir óleo de soja ao se usar espectroscopia NIR tanto SVMDA quanto PLSDA podem fornecer resultados satisfatórios, embora SVMDA ofereça resultados ligeiramente melhores que PLSDA.

Já na FT – MIR, as três técnicas quimiométricas também ofereceram bons resultados, mas mais uma vez a SVMDA e PLSDA se destacaram comparadas a SIMCA. Ao se usar SVMDA, se obteve uma porcentagem de 100% na distinção dos tipos de óleo de soja em praticamente todos os pré – processamentos (tanto para o conjunto de calibração quanto de validação), exceto ao se usar primeira e segunda derivada associada à centralização na média. Mas ao se usar PLSDA, se obteve uma porcentagem de 100% de acerto para todos os pré – processamentos utilizados tanto para o conjunto de calibração quanto de validação. Assim sendo, ao se usar FTR – MIR, para se distinguir os óleos de soja a melhor ferramenta quimiométrica é PLS-DA.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No 1º estudo de caso, a proposta era desenvolver uma metodologia por espectrofluorescência que fosse capaz de identificar e quantificar NOR tanto em medicamento quanto em urina. No caso da urina, devido ao fato da mesma ser uma matriz extremamente complexa, com diversas substâncias que também emitem fluorescência era necessário o uso de alguma técnica quimiométrica capaz de isolar o espectro referente ao NOR em urina. Para isso se recorreu ao uso do PARAFAC que demonstrou ser uma técnica extremamente satisfatória. Dessa forma, com base nos resultados obtidos, e que foram mostrados ao longo dessa dissertação, a espectrofluorescência aliada à calibração multivariada, mostrou ser uma técnica rápida, de baixo custo e que forneceu resultados extremamente satisfatórios quando comparadas ao método clássico para esse tipo de análise (HPLC), podendo ser inclusive uma opção em potencial para esse tipo de análise levando-se em consideração as suas vantagens, tais como tempo de análise ser menor, o custo também, aliado ao fato de não precisar usar solventes, tais como acetonitrila e metanol, o que em termos ambientais é altamente desejável.

Quanto ao 2º estudo de caso, se comparou duas técnicas de infravermelho (NIR e FT- MIR) aliadas a ferramentas quimiométricas de análise exploratória para ver qual delas forneceria resultados melhores no tocante a diferenciar óleo de soja transgênica de não transgênica. No caso do NIR, a técnica SIMCA quando comparada a SVM-DA e PLS-DA não forneceu resultados muito satisfatórios. Ao se comparar as duas últimas técnicas citadas, elas forneceram resultados semelhantes quanto a conseguir distinguir as amostras de óleo de soja. Já ao se usar MIR, a técnica que ofereceu o melhor resultado foi PLS-DA, na qual 100% das amostras foram corretamente classificadas, tanto na calibração quanto na validação. A diferença nos resultados entre NIR e FT-MIR é compreensível devido ao tipo de informação e técnica empregada nos dois tipos de espectroscopia de IR. A FT-MIR fornece um ganho significativo em termos de sinal/ruído, o que torna a técnica mais precisa e, conseqüentemente, ao se usar quimiometria os resultados encontrados são melhores. Mas o uso do NIR também forneceu resultados satisfatórios, sendo talvez o caso de se usar um FT-NIR para aquisição dos dados espectrais para prover uma melhora nos resultados finais.

6 SUGESTÕES

- Para o 1º estudo de caso, uso de um ambiente micelar para intensificar o sinal luminescente.
- Desenvolvimento de metodologia para eletroforese capilar.
- Aplicação de outras técnicas de calibração multivariada para outros fármacos (mistura) para determinação e quantificação dos mesmos em fluidos corporais (urina).
- Para o 2º estudo de caso, usar FT-NIR a fim de comparar os resultados com os obtidos por FT- MIR.
- Uso do algoritmo das projeções sucessivas (SPA) para selecionar os comprimentos de onda para fazer a discriminação de óleo de soja transgênica e não transgênica.
- Aplicar a metodologia usada para outros produtos transgênicos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Francisco Fabian de Macedo. Relatório Técnico – Support Vector Machine. Universidade Federal de Campina Grande. 16 f. 2007
- ANAZAWA, Tânia Akiko. Preparação, caracterização e avaliação de diferentes fases estacionárias reversas, tipo C8, para CLAE. 1996. 160 f. Tese (Doutorado em Química Analítica). Universidade de Campinas. 1996.
- ANTUNES, M.C.G.; SILVA, J.C.G.E.da S. Multivariate curve resolution analysis excitation – emissio matrices of fluorescence of humis substances. *Analytica Chimica Acta* v. 546, p. 52 – 59, 2005
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Determination of edible oils parameters by near infrared spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. V. 596, p. 330 – 337, 2007.
- BARBOSA, J.; BARRÓN, D.; LOZANO, E.; JIMÉNEZ, J. Electrophoretic behaviour of quinolones in capillary electrophoresis: Effect of pH and evaluation of ionization constants. *Journal of Chromatography A*, v. 839 (1), p. 183 – 192, 1999
- BARTHUS, R. C.; POPPI, R. J. Determination of the total unsaturation in vegetable oils by Fourier transform Raman spectroscopy and multivariate calibration. *Vibration Spectroscopy*. V. 29, p. 99 – 105, 2001.
- BEDOR, Danilo César Galindo; GONÇALVES, Talita Mota; BASTOS, Leila Leal; SOUSA, Carlos Eduardo Miranda de; ABREU, Luís Renato Pires de; OLIVEIRA, Eduardo de Jesus; SANTANA, Davi Pereira de. Desenvolvimento e validação de um método para quantificação de norfloxacino por cromatografia líquida de alta eficiência e aplicação a estudo de farmacocinética comparada em voluntários humanos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. V. 43(2). SP. 2007
- BERNARDES, Cristina Donizeti. Determinação direta de trans- Resveratrol em Plasma Humano usando espectrofluorimetria e Adição de padrão de 2ª ordem. 2009.

72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) – Universidade Estadual de Goiás, outubro/2009.

BLANCO, M; PAGÈS, J. Classification and quantitation of finishing oils by near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 463, p.295 – 303, maio 2002.

BOOKSH, K.S.; HENSHAW, J.M.; BURGESS, L.W.; KOWALSKI, B.R. A second order standard addition method with application to calibration of a kinetics – spectroscopic sensor for quantitation of trichloroethylene. *Journal Chemometrics*. V. 9, p. 263, 1995.

BORREGO, M. Córdoba; DÍAZ, M. Córdoba; DÍAZ, D. Córdoba. Validation of high performance liquid chromatographic method for the determination of norfloxacin and its application to stability studies (photo – stability study of norfloxacin). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18 (1999) p. 919 – 926. 1997.

BORTOLETO, Gisele Gonçalves. Desenvolvimento de métodos analíticos usando espectrometria de raios X e quimiometria. 2007. 96 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), maio/2007.

BRAGA, J.W.B., POPPI, R.J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. *Química Nova* v. 27, p. 1004 – 1011, 2004

BRERETON, Richard G. *Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant*. John Wiley & Sons. 2003. 497 f.

BRO, R. Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemist ? *Analytica Chimica Acta* (500), p. 185 – 194, 2003.

CARLUCCI, Giuseppe. Analysis of fluorquinolones in biological fluids by high – performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 812, p. 343 – 367. 1998

CARRILLO, Pedro Marin. Aplicación de fluoroquinolonas em medicina veterinária: critérios farmacocinéticos y farmacocinéticos /farmacodinâmicos (PK /PD). 2008. 172 f. Tese (Doutorado em veterinária) – Universidad de Murcia. 2008

COELHO, Anete L. Desenvolvimento de processos de derivatização fotoquímica para dois glicocorticóides sintéticos (prednisolona triancinolona acetinado) visando à análise espectrofluorimétrica de formulações farmacêuticas. 2004. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Pontifícia Universidade Católica. RJ. Set/2004.

COSTA, Thais Malcher dos Santos. Aplicação da calibração multivariada de ordem superior na resolução de espectros de fluorescência molecular para quantificação de levofloxacino. 2009. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, 2009.

CHRISTY, Alfred A.; KASEMSUMRAN, Sumaporn; DU, Yiping; OZAKI, Yukihiro. The detection and quantification of adulteration in olive oil by near infrared spectroscopy and chemometrics. Analytical Sciences, vol. 20, p. 935 – 940, jun 2004.

CHRISTY, Alfred A.; EGEBERG, Per K.; Quantitative determination of saturated and unsaturated fatty acids in edible oils by infrared spectroscopy and chemometrics. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. Vol. 82, p. 130 – 136. out 2005.

DAHLBERG, D. B.; LEE, S.M.; WENGER, S. J.; VARGO, J. A. Classification of vegetable oils by FT – IR. Applied Chemometrics. V. 51,p. 1118 – 1124, 1997.

Disponível em <http://www.comm-tec.com/library/Tutorials/CTD/Fluorescence.pdf> (acessado em 27 de dezembro de 2011)

Disponível em <http://www.dca.fee.unicamp.br/~andreric/arquivos/pdfs/svm.pdf> (acessado em 07 de março de 2012)

Disponível em <http://www.imcopa.com.br/?p=empresa/asoja> (acessado em 27 de dezembro de 2011).

Disponível em http://www.campestre.com.br/especificacao_soja.shtml (acessado em 27 de dezembro de 2011)

Disponível em <http://xa.yimg.com/kq/groups/10690760/1514772972/name/Kit-Transg%C3%AAnico.pdf> (acessado em 27 de dezembro de 2011).

Disponível em <http://pfarma.com.br/farmaceutico-industrial/130-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-.html> (acessado em 29 de setembro de 2011)

Disponível em www.torretian.blogspot.com (acessado em 29 de setembro de 2011)

Disponível em www.chasqueweb.ufrgs.br (acessado em 29 de setembro de 2011)

Disponível em <http://www.cfh.ufsc.br/gcn3506/documents/Aula6PCA.pdf> (acessado em 29 de setembro de 2011)

Disponível em <http://www.camo.com/resources/pls-da.html> (acessado em 29 de setembro de 2011)

Disponível em <http://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Plsda> (acessado em 29 de setembro de 2011).

Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/889_03re.htm (acessado em 29 de setembro de 2011)

Disponível em <http://pt.scribd.com/doc/17910359/36/Coeficiente-de-determinacao> (acessado em 18 de março de 2012)

DOBSON, Gary. Spectroscopy and Spectrometry of Lipids – part I. European Journal of Science and Technology. vol. 103, p. 815 – 840, 2001.

DUBAYOVÁ, Katarína; KUSNIR, Jaroslav.; PODRACKÁ, Ludmila. Diagnostic monitoring of urine by means of synchronous fluorescence spectrum. Journal Biochem. Biophys. Methods v. 55, p. 111 – 119, 2003.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. Química Nova, v. 22 (5), p. 724 – 731, 1999.

FIERENS, C.; HILLAERT, S.; VAN DEN BOSSCHE, W. The qualitative and quantitative determination of quinolonas of first and second generation by capillary electrophoresis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. V. 22, p. 763 – 773, 2000.

FILHO, Arlindo Rodrigues Galvão. Calibração Multivariada empregando o algoritmo das projeções sucessivas com reamostragem e combinação de modelos. 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências no Curso de Engenharia Eletrônica e Computação). – Instituto Tecnológico da Aeronáutica. São José dos Campos, 2010.

FILHO, Luiz da Silva Góes. Caracterização e estudos cinéticos de albumina tratada com espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio: espectroscopia de absorção e fluorescência. 2005. 85 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Pontifícia Universidade Católica. RJ. Setembro/2005.

FINETE, V.L.M. Desenvolvimento de métodos espectrofluorimétricos para a determinação de enritromicina e canamicina e aplicabilidade na vacina contra febre amarela. 2005. 111 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. RJ. 2005

FORCHETI, C.; CARLUCCI, G.; BOLOGNA, C.M. High Performance Liquid Chromatographic procedure for the quantitation of norfloxacin in urine, serum and tissues. Journal of Chromatography B, v. 309, p. 177 - 182, 1984

GEMPERLINI, Paul. Practical Guide to chemometrics. 2 ed. Taylor & Francis Group. 2006

GIL, Diego Bohoyo. Nuevos métodos de determinación de antibióticos y otros principios activos em alimentos, formulaciones zoonosanitarias y fluidos biológicos. 2005. 574 f. Tese (Doutorado em Ciências Químicas) – Universidade de Extremadura, Badajoz, 2005.

GIRÓN, Ana Maria Jiménez. Aplicaciones analíticas de métodos basados em luminescencia molecular em combinácion com metodologias dinâmicas. 2007. 556 f. Tese (Doutorado em química) – Universidad de Extremadura, Badajoz, 2007.

GÓMEZ, David González. Utilización de señales de primer y segundo orden para el análisis de fluoroquinolonas y carbamacepinas em fluidos biológicos. 2005. 498 f. Tese (Doutorado em química) – Universidad de Extremadura. Badajoz, jan/2005.

GORZALKA, Thais Proença. Polibutadieno sobre sílica para uso com fase estacionária em cromatografia líquida de alta eficiência e como sorvente para extração em fase sólida. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade de Campinas, SP, 2008.

GURGEL, Sofia Mesquita de Lima. O uso da espectroscopia Raman para diferenciar soja convencional de soja transgênica. 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca, SP, 2006.

HENRIQUES, C.A. Análise Instrumental. Rio de Janeiro: Instituto de Química da UERJ, 2008. Notas de Aula.

HO, C.N.; CHRISTIAN, G.D.; DAVIDSON, E.R. Application of the method of rank annihilation to fluorescent multicomponent mixtures of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Analytical Chemistry*, v. 52 (7), p.1071 – 1079, 1980

HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanky R. Princípios de Análise Instrumental. 6 ed. Porto Alegre, RS. Ed. BOOKMAN. 2009. 1076 f.

HONORATO, Fernanda Araújo; NETO, Benício de Barros; MARTINS, Marcelo Nascimento; GALVÃO, Roberto Kawakami Harrop; PIMENTEL, Maria Fernanda. Transferência de Calibração em Métodos Multivariados. *Química Nova* v. 30 (5), p. 1301 – 1312, 2007

KASSAB, Nájla Mohamed; SINGH, Anil Kumar; KEDOR – HACKMAM, Erika Rosa Maria; SANTORO, Maria Inês Rocha Miritello. Determinação quantitativa do

ciprofloxacino e do norfloxacino em preparações farmacêuticas por cromatografia líquida de alta eficiência. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. V. 41 (4). SP, 2005.

LACHTER, Daniela R.; GARCIA, Luciene S.; CASAJEROS, Fabrício; LOURO, Sonia R. W.; TEIXEIRA, Letícia R.; Estudo do antibiótico Norfloxacin e do seu complexo com Au (III) através da técnica de fluorescência estacionária e resolvida no tempo. 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2009

LEE, Dae Sung; PARK, Joan Moon; VANROLLEGHEM, Peter A. Adaptive multiscale principal component analysis for on- line monitoring of a sequencing batch reactor. Journal of Biotechnology (116), p. 195 – 210, 2005

LEE, DONG – SUN; NOH, BONG – SOO; BAE, SUN – YOUNG; KIM, K. Characterization of fatty acids compositions in vegetables oils by gas chromatography and chemometrics. Analytica Chimica Acta. V. 358, p. 163 – 175, 1998.

LEITÃO, João Manuel Martins. Técnicas quimiométricas de calibração acopladas a metodologias de análise espectrofotométrica de formulações farmacêuticas. 2005. 500 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade de Coimbra, 2005.

LIMA, Maria Meire de. Propriedades termodinâmicas da Prolil oligopeptidase de *Trypanosoma brucei*. 2008. 112 f. Tese (Doutorado em Patologia Clínica) – Universidade de Brasília, 2008.

LIMA, I.C. de A. Aplicação de métodos de classificação e calibração multivariada acopladas com técnicas espectrométricas em amostras ambientais e alimentos. 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), 2011

LIU, Fei; JIANG, Yihong; HE, Yong. Variable selection in visible/near infrared spectra for linear and nonlinear calibrations: A case of study to determine soluble solids content of beer. Analytica Chimica Acta. V. 635, p. 45 – 52, 2009.

LORBER, Avraham. Error propagation and figures of merit for quantification by solving matrix equations. *Analytical Chemistry* v. 58 (6), p. 1167 – 1172, 1986

LOURENÇO, Josimara. Preparação e caracterização de fases estacionárias de dimetil-metil-fenil siloxano sobre sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em química analítica). 2005.

LUNA, A.S. Introdução à Quimiometria. Rio de Janeiro: Instituto de Química da UERJ, 2010. Notas de Aula.

MALUF, Daniela Florêncio. Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos para determinação de Sibutramina em forma farmacêutica e estudo de dissolução *in vitro*. 2008. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MARTÍN, Yolanda G.; PAVÓN, José L. P.; CORDERO, Bernardo M.; PINTO, Carmelo G. Classification of edible oils by linear discriminant analysis of Electronic Nose data. *Analytica Chimica Acta*. V. 384, p. 83 – 94, 1999.

MENDES, Isequiel dos Santos. Avaliação de extratos das folhas e sementes de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) como bioerbicidas pós emergentes e identificação de aleloquímicos via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de química analítica). Universidade de São Paulo (USP), SP, janeiro de 2011.

MICCHELI, A.; MARINI, F.; CAPUANI, G.; MICCHELI, A.T.; DELFINI, M.; COCCO, M.E.Di; PUCCHETTI, C.; PACI, M.; RIZZO, M.; SPATARO, A. The influence of a sports drink on the postexercise metabolims of elite athletes as investigated by NMR based metabolomics. *Journal of the American College of Nutrition* v. 28 (5), p. 553 – 564, 2009

MORTON, S.J.; SHULL, V.H.; DICK, J.D. Determination of Norfloxacin and Ciprofloxacin concentrations in serum and urine by High Pressure Liquid

Chromatography. Antimicrobial Agents and chemotherapy. V. 30 (2), p. 325 – 327, 1986

NASCIMENTO, Elaine Cristina Lima do. Um fotômetro microcontrolado LED – NIR, portátil e de baixo custo para análise screening de gasolinas tipo C. 2008. 110 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, abril/2008.

NASCIMENTO, Renata Fernandes Figueira; ALCÂNTARA, Enner Herenio; KAMPEL, Milton; STECH, José Luiz; NOVO, Evlyn Márcia Leão de Moraes; FONSECA, Leila Maria Garcia. O algoritmo Support Vector Machines (SVM): avaliação da separação ótima de classes em imagens CCD – CBERS – 2. Anais do XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. Natal. RN. 2009.

NETO, José M.; MOITA, Graziella C. Uma introdução a análise exploratória de dados multivariados. Química Nova 21 (4), p. 467 – 469, 1998

NI, Y.; QI, Z.; KOKOT, S. Simultaneous ultraviolet spectrophotometric determination of sulfonamides by multivariate calibration approaches. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems (82), p. 241 – 247, 2006.

NUNES, Pedro Germano Antonino. Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada às espectrometrias UV/Vis e NIR. 2008. 121 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, março/2008.

OLIVEIRA, Flávia Carneiro da Cunha. Modelos de calibração multivariada associados à espectroscopia vibracional vibracional para análise de misturas diesel – óleos vegetais. 2006. 120 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Brasília, 2006.

OLIVIERI, A.C. Analytical Advantages of Multivariate Data Processing. One, Two, Three, Infinity? Analytical Chemistry v. 80, p. 5713 – 5720, 2006

OLIVIERI, A.C.; FABER, N.K.M. A closed –form expression for computing the sensitivity in second order calibration. Journal Chemometrics (19), p.583, 2009

PAULIUKONIS, L.T.; MUSSON, D.G.; BAYNE, W.F. Quantitation of norfloxacin, a new antibacterial agent in human plasma and urine by ion – pair reverse – phase chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences* v. 73, p.99, 1984

PEREIRA, Alessandra Felix da Costa. Determinação simultânea de acidez, índice de refração e viscosidade em óleos vegetais usando espectrometria NIR, calibração multivariada e seleção de variáveis. 2007. 75 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, PB, março/2007

PEREIRA, ALESSANDRA F. C.; PONTES, MÁRCIO J. C; NETO, FRANCISCO F. G.; SANTOS, SÉRGIO R. B.; GALVÃO, ROBERTO K. H.; ARAÚJO, MÁRIO C. U. NIR spectrometric determination of quality parameters in vegetable oils using iPLS and variable selection. *Food Research International* V. 41, p. 341 – 348, 2008.

PEREIRA, André Monteiro Pais Teixeira. Determinação de resíduos de fluorquinolonas em amostras de tecido muscular de frangos e respectivo impacto na saúde. 2009. 129 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2009.

PÉREZ – ENCISO, M.; TENENHAUS, M. Prediction of clinical outcome with microarray data: a partial least squares discriminant analysis (PLS – DA) approach. *Biomedical and Life Sciences: Human Genetics*. V. 112 (5-6), p. 581 – 592, 2003

PONTES, Márcio José Coelho de. Algoritmo das projeções sucessivas para seleção de variáveis espectrais em problemas de classificação. 2009. 144 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal da Paraíba, PB, 2009.

RESOLUÇÃO RE Nº 899/2003 (ANVISA). Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm (acessado em 17 de novembro de 2011)

ROCHA, W.F. de C. Utilização do sinal analítico líquido para validação de modelos de calibração multivariada através do cálculo de figuras de mérito e de cartas de

controle. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), 2007.

SALEM, Hesham. Spectrofluorimetric, Atomic Absorption Spectrometric and Spectrophotometric determination of some fluoroquinolones. *American Journal of Applied Sciences* 2 (3), p. 719 – 729, 2005

SANCHES, Fátima Aparecida Castriani. Desenvolvimento de uma metodologia para o controle de qualidade de medicamento injetável, sem violação da ampola, usando Espectroscopia NIR e Técnicas quimiométricas. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, 2009.

SANTOS, Diego Ives de Vilasboas e; GIL, Eric de Souza. Fluorimetria na análise farmacêutica: uma revisão. *Revista Eletrônica de Farmácia*. Vol 7 (1), 24-38, 2010

SANTOS, Maria de Fátima da Paixão. Desenvolvimento e Validação de Métodos de Espectroscopia no Infravermelho Próximo e Médio para caracterização de lamas de ETAR para uso agrícola. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) – Instituto Superior Técnico (Universidade Técnica de Lisboa), 2007.

SAUER, Elenise. Desenvolvimento de metodologias multivariadas para análise de queijos por espectroscopia DRIFT. 2007. 157 f. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SAURINA, J.; LEAL, C.; COMPAÑO, R.; GRANADOS, M.; DOLORS PRAT, M. ; TAULER, R. Estimation of figures of merit using univariate statistics for quantitative second order multivariate curve resolution *Analytical Chimica Acta*, v. 432, p. 241, 2001

SAXBERG, B.E.H.; KOWALSKI, B.R.. Generalized standard addition method. *Analytical Chemistry*, v. 51, p. 1031, 1979.

SENA, M.M.; FREITAS, C.B.; SILVA, L.C.; PÉREZ, C.N.; PAULA, Y.O. Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em

formulações farmacêuticas usando calibração multivariada. *Química Nova*, v.30 (1), p.75 – 79, 2007.

SENA, M.M.; TREVISAN, M.G.; POPPI, R.J. PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria. *Química Nova*, v. 28 (5), p. 910 – 920.

SHAO, X. D.; LIU, H. Y.; GAO, X. F.; CHEN, W. Q.; SONG, Z.H. Determination of norfloxacin in pharmaceuticals, human serum and urine using a luminol – dissolved oxygen chemiluminescence system. *Chemical Paper* 61 (5) p. 353 – 358, 2007.

SILVA, Arnaldo P. da. Acoplamento de técnicas espectrofotométricas com métodos quimiométricos de classificação e calibração multivariada em alimentos. 2011. 148 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, 2011.

SOTOMAYOR, Maria D. P. T.; DIAS, Iara Lúcia T.; LANZE, Marcos R. V.; MOREIRA, Altair B.; KUBOTA, Lauro T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Química Nova*, v.31. n°7, p. 1755 – 1774, 2008.

SOUZA, Cabrini Ferraz de. Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos de picoxistrobina e piraclostrobrina por cromatografia eletrocínética capilar micelar e de enrofloxacina por fosforimetria em temperatura ambiente. 2008. 172 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, RJ, agosto de 2008.

STEINER, Maria Teresinha Arns. Uma metodologia para o reconhecimento de padrões multivariados com resposta dicotômica. 1995. Tese (Doutorado e Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 1995

TREVISAN, Marcello Garcia. Aplicação de métodos quimiométricos de ordem superior e fluorescência molecular na análise em matrizes biológicas. 2003. 101 f. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), julho/2003.

VALDERRAMA, Patrícia. Avaliação das figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústrias alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo. 2005. 135 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, julho\2005

VALDERRAMA, P., BRAGA, J.W., POPPI, R.J. Estudo da Arte de Figuras de Mérito em Calibração Multivariada. *Química Nova* v.32, p. 1278 – 1287, 2009.

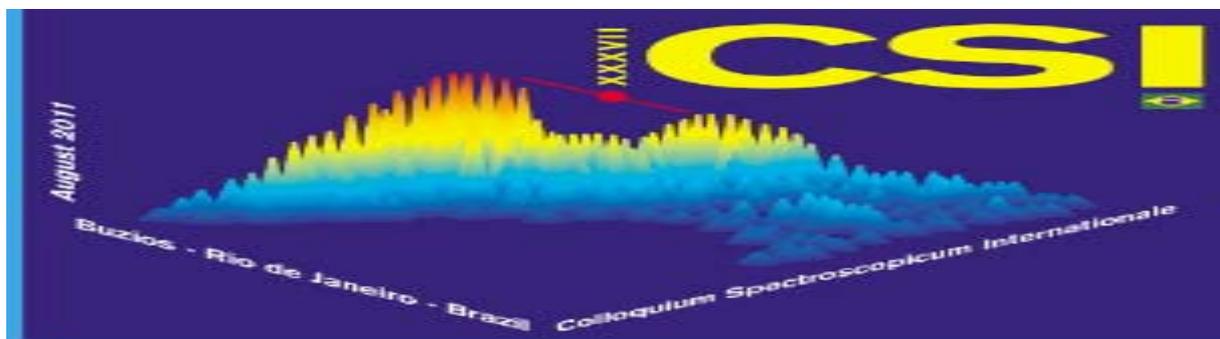
XIAOBO, Zou; JIEWEN, Zhao; POVEY, Malcolm J. W.; HOLMES, Mel; HANPIN, Mao. Variables selection methods in near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. V. 667, p. 14 – 32, 2010.

WANG, Y.; BORGAN, O.S.; KOWALSKI, B.R.; GU, M.; TURECEK, F. Advances in second order calibration. *Journal of Chemometrics*, v. 7 (2), p. 117, 1993.

WENTZELL, Peter D.; ANDREWS, Darren T.; KOWALSKI, Bruce R.; Maximum Likelihood Multivariate Calibration. *Analytical Chemistry* v.69 p. 2299, 1997.

ZEAITER, M. RUTLEDGE, D. Preprocessing Methods. In: *Comprehensive chemometrics – chemical and biochemical data analysis*, v. 3, Elsevier, 2009.

ANEXO A – Resumo do trabalho aceito para apresentação oral no XXXVII Colloquium Spectroscopicum Internationale (XXXVII CSI)



Rapid characterization of transgenic and non transgenic soybean oils by using chemometrics methods using NIR spectroscopy

Aderval S. Luna^{*(a)}, Arnaldo P. da Silva^(a), Jessica S.A. Pinho^(a), Joan B. Ferré^(b) and Ricard B. Martí^(b)

^(a) *Rio de Janeiro State University, Rua São Francisco Xavier, 524 – Maracanã – Rio de Janeiro,*

*Brazil, e-mail:
asluna@uerj.br*

^(b) *Universitat Rovira I Virgili, Tarragona,
Spain.*

The near infrared spectroscopy (NIRS) has been target of interest of many researches in food field because it is a quick technique and it has no need of sample pre treatment. But in some cases the complexity of samples matrix requires some chemometrics tools. This try to get better results has been very effective and therefore it is very used to predict some physical properties and/or classification of edible oils samples. This paper aims to classify two types of soybean oil: transgenic (TR) and non transgenic (NT) that were analyzed by NIRS by using chemometrics classification tools. The range used to perform analysis was 1100 – 2500 nm. Before perform classification it was used PCA (*Principal Component Analysis*) in order to exclude results that were too distinct from the majority. After this, SIMCA (*Supervised Independent Modeling of Class Analogy*) and SVM – DA (*Support Vector Machine – Discriminant Analysis*) were used to classify soybean oils samples.

It was used the Kennard Stone (KS) algorithm to choose samples for calibration group. In both oil groups twenty samples were chosen for calibration. For validation group sixteen samples of NT soybean oil and twenty samples of soybean oil were used. In both techniques were used different types of preprocessing in order to verify which one of them would provide the best result.

For SIMCA analysis were used four types of preprocessing: mean center, mean center + MSC, mean center + first derivate and mean center + second derivate. For SVM –

DA were used five types of preprocessing: all four types used for SIMCA including mean center + OSC. The spectrum was cut and the portion removed was from 2201 – 2500 nm. It was done because this portion of spectrum had a bad influence in results.

For SIMCA analysis the ratio of successful in classification with mean center (best result) was: in calibration group was 90% (NT) and 87,5% (TR) and in validation group was 100% for both types of soybean oil. For SVM – DA analysis the ratio of successful in classification with Mean

center + MSC (best result) was: in calibration was 100% (NT) and 93,75% (TR) and in validation group these values were 100% for both types of soybean oils.

SVM – DA provides better results than SIMCA. Therefore it can be a useful tool to distinguish non transgenic and transgenic soybean oils samples.

OBS: O trabalho foi aceito para publicação na Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

ANEXO B – Resumo do trabalho aceito para apresentação COBEQ 2012**COMPARAÇÃO DO PARAFAC E MCR NA DECONVOLUÇÃO DO ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA MOLECULAR E QUANTIFICAÇÃO DA NORFLOXACINO EM AMOSTRA DE URINA HUMANA**A.S. LUNA¹, J.S.A. PINHO¹¹ DQA – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

O Norfloxacinó é uma fluorquinolona de segunda geração, usada como antibiótico para tratar infecções urinárias e do trato superior. Sua presença em urina não pode ser detectada e quantificada de forma simples, sendo necessário uso de calibração multivariada para tal. O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma metodologia que fosse capaz de identificar e quantificar a Norfloxacinó aliando a espectrofluorescência com calibração multivariada. Dessa forma, neste trabalho, foram recolhidas amostras de urina, oriundas de pessoas saudáveis e que não faziam uso de quaisquer medicamentos e que foram incrementadas com diferentes teores de Norfloxacinó, sendo também tais amostras diluídas em dois níveis diferentes a fim de se averiguar também se a diluição ajudaria a diminuir o efeito da matriz, visto que na urina há componentes que também emitem fluorescência. De tal forma, os espectros de urina foram obtidos na faixa de 250 a 320 nm (intervalo de 2 nm), enquanto que para emissão foi feita na faixa de 330 a 480 nm (intervalo de 1 nm). Após a obtenção dos espectros e a remoção dos devidos espalhamentos, foram utilizadas duas técnicas distintas (PARAFAC e MCR) para deconvolução dos espectros, a fim de se identificar e, posteriormente, quantificar a Norfloxacinó em urina de uma forma precisa. Tal metodologia se mostrou bastante eficaz na quantificação de Norfloxacinó, mesmo em uma matriz tão complexa como a urina.