

IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PURAS OU EM FORMULAÇÕES POR MEIO DE ANÁLISE ESPECTRAL E QUIMIOMETRIA

Cristina M. Quintella
Marilena Meira
Edna Maura P. de Araújo
Juceni P. David
Alessandra dos S. Tanajura
Humbervânia R. G. da Silva
Alexandre K. Guimarães
Weidson L. Silva e Rodolfo R. Guarín

2.1 INTRODUÇÃO

O uso de substâncias puras ou em formulações para diversos fins, sejam extraídas de plantas e animais, sejam sintetizadas, é tão antigo quanto o próprio homem e tem servido de base para o desenvolvimento de diversos setores industriais.

Apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, o interesse pelas drogas de origem vegetal permanece e, atualmente, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas e 44% de todas as novas drogas têm envolvimento de produtos naturais. Por exemplo, de acordo com Hostettmann (2003), dos medicamentos prescritos, 56% são produtos sintéticos, 24% são derivados de produtos naturais, 9% são produtos sintéticos modelados a partir de produtos naturais, 6% são produtos naturais e 5% biológicos¹.

A adulteração de um produto, seja ele alimentar, farmacêutico, combustível ou outro, inclui a substituição do produto original por um similar mais barato. Por exemplo, no caso de um medicamento, inclui a substituição do princípio ativo mais caro por placebos, tal como ocorreu no episódio da “pílula de farinha”, em que houve a substituição do princípio ativo da pílula anticoncepcional por farinha. A adulteração pode se dar também pela redução da quantidade do princípio ativo, o que pode diminuir o efeito do medicamento, provocar o retardo do tratamento ou a morte de pessoas com problemas crônicos tratadas com remédios falsificados².

No caso de alimentos, um exemplo frequente de adulteração é a do azeite de oliva, que muitas vezes é adulterado com azeites de oliva de menor qualidade ou com outros óleos comestíveis, como de soja, milho, canola, algodão, girassol, amendoim e amêndoa.

Adulterações de combustíveis ocorrem por adição de produtos mais baratos e que possuem boa miscibilidade no diesel, tais como óleos vegetais resultantes de fritura (não transesterificado) ou solventes, como querosene ou aguarrás. Combustíveis adulterados provocam aquecimento e aceleração do motor, além de aumentarem o consumo de combustível, a emissão de material particulado e de gases de exaustão³.

Na análise química de materiais, substâncias puras ou em formulações, as principais técnicas utilizadas são as técnicas espectroscópicas, nas quais os dados físico-químicos são levantados através da transmissão, absorção ou reflexão da energia de radiação incidente em uma amostra. Fazem parte das técnicas espectroscópicas a espectrometria de massas (EM), a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), no infravermelho (IV), no UV/Visível e de fluorescência, bem como a rotação óptica específica, $[\alpha]_D$, dicroísmo circular (CD) e cristalografia de raios X, entre outras².

A identificação de substâncias por RMN, principalmente de ^1H e de ^{13}C , é uma das técnicas mais usadas para se obter informações sobre a estrutura química de compostos orgânicos conhecidos ou não. O espectro RMN ^1H é facilmente obtido, pois os núcleos de hidrogênio são abundantes e a análise

pode ser realizada em cerca de dez minutos. No entanto, a técnica de RMN ^{13}C pode exigir um tempo de medida tão grande quanto 24 horas, devido à baixa sensibilidade inerente do núcleo de ^{13}C (1,59% relativa ao ^1H) e, normalmente, a pouca quantidade de amostra disponível, frequentemente menor que 20 mg.

Além desses espectros rotineiros, muitas vezes faz-se necessário usar técnicas para obtenção de espectros em duas dimensões (2D), tais como *homonuclear correlation spectroscopy* (COSY, correlações entre hidrogênios que estão acoplados por 2-3 ligações – $J_{\text{H,H}}$), *nuclear overhauser effect spectroscopy*, (NOESY, correlação entre hidrogênios espacialmente próximos), *heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy* (HMQC/HMBC) e *heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy* (HSQC), dentre outras técnicas, para elucidar as estruturas das substâncias. Todas essas técnicas têm custo elevado, além de serem demoradas⁴.

O desenvolvimento de métodos cromatográficos, tais como o *high-performance liquid chromatography* (HPLC), para identificação de substâncias puras, medicamentos ou drogas ilícitas, além de demorar, envolve custos adicionais com solventes e problemas ambientais relacionados com a disposição de grande volume de solvente residual².

Tratando-se de substâncias desconhecidas, é imprescindível, para a determinação de suas estruturas, a utilização de técnicas avançadas e a análise integrada dos vários espectros obtidos. Entretanto, a situação mais corriqueira é a análise de substâncias com estruturas já conhecidas. Ainda assim, na maioria dos casos, a confirmação das estruturas é feita utilizando várias técnicas sofisticadas, o que resulta em gastos desnecessários de tempo e elevação dos custos⁴.

A necessidade de economicidade de tempo e aumento da eficiência indicou a conveniência de desenvolver um método para a confirmação da identidade das substâncias já conhecidas, que agregasse os requisitos de alta sensibilidade, simplicidade, baixo custo e rapidez. O método aqui descrito consiste na identificação de substâncias aromáticas por comparação de seus espectros obtidos por espectrofluorimetria e espectroscopia no UV-Vis com os espectros correspondentes de substâncias padrões e análise destes através de métodos quimiométricos, tais como a análise de componentes principais (PCA). Além disso, também é possível quantificar essas substâncias através de técnicas de calibração multivariada, como, por exemplo, mínimos quadrados parciais (PLS)⁴.

O método também pode ser aplicado com sucesso na identificação de adulteração do diesel por óleo residual por comparação de seus espectros

obtidos por Espectrofluorimetria com os espectros correspondentes de misturas preparadas e a análise destes espectros através da análise de componentes principais (PCA)². A aplicação da espectrofluorimetria associada à técnica de calibração multivariada, como, por exemplo, mínimos quadrados parciais (PLS), permite a determinação de importantes propriedades de biocombustíveis, como estabilidade oxidativa⁵, viscosidade, massa específica e concentração⁶.

2.2 PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE MÉTODOS DE ANÁLISE ESPECTROSCÓPICOS

A prospecção tecnológica é uma ferramenta essencial para que se possam decidir os rumos da pesquisa, do desenvolvimento tecnológico e da inovação de base tecnológica⁷⁻⁹ como, por exemplo, em associações como a RENORBIO, que focam o desenvolvimento de biotecnologia¹⁰, ou em estratégias de desenvolvimento regional¹¹.

Recentemente, algumas prospecções tecnológicas mostraram aspectos específicos da identificação de óleos vegetais e combustíveis de substâncias puras ou em formulações mapeando patentes e artigos, tais como uso da fluorescência da clorofila para determinar adulteração de óleos vegetais¹², análise da matéria-prima para produção de biodiesel¹³, avaliação da qualidade de óleos por fluorescência¹⁴, determinação do grau de oxidação de óleos e biocombustíveis por métodos óticos¹⁵, monitoramento do processo de transesterificação básica com ênfase em produção de biodiesel¹⁶.

2.2.1 Metodologia da prospecção

A metodologia foi desenvolvida especificamente para se analisar a evolução dos métodos analíticos baseados em propriedades óticas para determinação da qualidade de combustíveis, óleos e misturas. Foi utilizado o banco eletrônico Espacenet, do European Patent Office (EPO)*, que atualiza periodicamente a sua base, incluindo patentes depositadas em mais de 90 países, tendo boa cobertura e menos repetições que outras bases, além de permitir o livre acesso.

* Disponível em <http://www.epo.org/searching/free/espacenet.html>.

Foi utilizada a classificação europeia (*European classification system – ECLA*), por ser um sistema de classificação internacional mais detalhado e preciso, com menos repetições e melhor cobertura.

Os códigos (Tabela 2.1) foram selecionados privilegiando a especificidade e pertinência para o tema.

Foram considerados todos os pedidos de patentes, independentemente de seu exame e concessão, dado que o objetivo é avaliar o que a humanidade tem apropriado e desenvolvido nesse tema. Dessa forma, o propósito foi encontrar gargalos e oportunidades nas análises com métodos espectroscópicos para determinação da qualidade de combustíveis, óleos e misturas.

Foram identificadas 1.129 solicitações de patentes relacionadas ao tema, todas baixadas e organizadas em uma planilha do programa Excel e depois importadas pelo *software* de mineração de textos Vantage Point, sendo, em seguida, processadas.

Tabela 2.1 Principais códigos de classificação obtidos na revisão sistemática de patentes

CÓDIGOS	DESCRIÇÃO
G02B6/00	Guias de luz; detalhes estruturais de disposições, incluindo guias de luz e outros elementos óticos, p. ex., acoplamentos.
G02B6/43	Acoplamentos de guias de luz com combinações compreendendo vários elementos optoeletrônicos e interconexões óticas associadas (dispositivos semicondutores emissores de luz ou sensíveis à luz; <i>lasers</i> semicondutores monoliticamente integrados com outros componentes).
G01J3/08	Espectrometria; espectrofotometria; monocromadores; medição das cores em sistemas para comutação do feixe.
G01J3/42	Investigação do espectro (usando filtros de cor) aplicando técnicas analíticas de: espectrometria de absorção; espectrometria por raios duplos; espectrometria por cintilação; espectrometria por reflexão (disposições para a interrupção de raios).
G01N21/00	Investigação ou análise de materiais pelo uso de meios óticos, p. ex., usando raios infravermelhos, visíveis ou ultravioletas.
G01N21/17	Investigação ou análise de materiais pelo uso de meios óticos em sistemas, nos quais a luz incidente é modificada em concordância com as propriedades do material investigado (nas quais o material investigado é óticamente excitado, provocando uma modificação no comprimento de onda da luz incidente).
G01N21/39	Investigação das propriedades óticas (cor; propriedades espectrais) do material com relação a comprimentos de ondas característicos de elementos ou moléculas específicas, p. ex., espectrometria de absorção atômica usando <i>lasers</i> sintonizáveis.
G01N21/41	Investigação ou análise de materiais pelo uso de meios óticos, em sistemas nos quais a luz incidente é modificada em concordância com as propriedades do material investigado pela refatividade e propriedades que afetam as fases.

CÓDIGOS	DESCRIÇÃO
G01N21/62	Investigação ou análise de materiais pelo uso de meios óticos em sistemas nos quais o material investigado é excitado, de modo que ele emita luz ou faça com que ocorra uma modificação no comprimento de onda da luz incidente.
G01N21/63	Investigação ou análise de materiais pelo uso de meios óticos em sistemas nos quais o material investigado é excitado, de modo que ele emita luz ou faça com que ocorra uma modificação no comprimento de onda da luz incidente, óticamente excitados.
G01N21/64	Investigação ou análise de materiais pelo uso de meios óticos em sistemas nos quais o material investigado é excitado, de modo que ele emita luz ou faça com que ocorra uma modificação no comprimento de onda da luz incidente, óticamente excitados. Fluorescência; fosforescência.
C10L1	Combustíveis carbonáceos líquidos
G01N33/00	Investigação ou análise de materiais por métodos específicos não abrangidos pelos grupos G01N1/00-G01N31/00.
G01N33/03	Investigação ou análise de materiais por métodos específicos não abrangidos pelos grupos G01N1/00-G01N31/00 de óleos ou gorduras comestíveis
G01N33/18	Investigação ou análise de materiais por métodos específicos não abrangidos pelos grupos G01N1/00-G01N31/00 de água.
G01N33/28	Investigação ou análise de materiais por métodos específicos não abrangidos pelos grupos G01N1/00-G01N31/00 de óleos.
G01N33/52	Investigação ou análise de materiais por métodos específicos e análise química de material biológico com a utilização de compostos ou composições para investigação colorimétrica, espectrofotométrica ou fluorométrica.

Foram examinadas e retiradas as patentes repetidas, duplicidades e patentes pertencentes à mesma família obtidas mais de uma vez, devido aos depósitos independentes em diferentes instituições de propriedade industrial. Com este pré-tratamento, restaram 309 patentes de interesse para o controle da qualidade de combustíveis, óleos e misturas.

Avaliaram-se em cada patente, aspectos relacionados ao depósito de patentes (evolução anual, país e continente), depositantes (setor, organização, empresa, independente, instituição de pesquisa, governo), tipo da patente (método, aparato, processo, produto), método e/ou técnicas empregadas, componentes e fluidos de análises. Na análise estatística das patentes, utilizaram-se lineamentos e indicadores de reporte de desempenho, segundo os conceitos da World Intellectual Property Organization (WIPO, 2013):

- A construção de indicadores foi realizada a partir da data de depósito da patente; dessa forma, as patentes protocoladas 18 meses antes da pesquisa foram incluídas.

- Os dados de famílias de patentes foram baseados em data de prioridades (primeiro depósito).
- O país de origem foi estabelecido em relação ao país de residência do primeiro depositante.
- No caso de empresas com depósitos em vários países ou subsidiárias, os resultados das estatísticas por depositante foram somados e apresentados sob um único titular.

A estratégia da revisão sistemática de artigos científicos consistiu inicialmente na definição e classificação das palavras-chave mais pertinentes para realizar o mapeamento tecnológico e revisão sistemática de artigos relacionados a sensores espectrofluorimétricos e/ou meios óticos para controle da qualidade de combustíveis, óleos e misturas (Tabela 2.2).

A classificação dos artigos se deu em relação à invenção e/ou aperfeiçoamento de equipamentos (sensores), aos métodos empregados (infravermelho, absorção UV, fluorescência e espectrofluorimetria), materiais (combustíveis, óleos, diesel, biodiesel e biocombustíveis) e aplicações das tecnologias em função de analisar as propriedades para o controle da qualidade de combustíveis, óleos e misturas (adulteração, concentração, mistura, qualidade, determinação, detecção, mensuração, monitoramento e/ou identificação).

Tabela 2.2 Classificação das palavras-chave utilizadas na busca de artigos científicos

EQUIPAMENTOS	Sensor*	APLICAÇÕES	Adulter*
MÉTODOS	Infrared*		Concentra*
	UV Absorpt*		Mixtur*
	Fluoresc*		Qualit*
	Spectrofluor*		Determinat*
ÓLEOS	Fuel*		Detect*
	Oil*		Measurem*
	Diesel*		Monitor*
	Biodiesel*		Identific*
	Biofuel*		

* Indica que qualquer substituição é possível.

Nessa fase preliminar, foi observada uma elevada generalidade do campo tecnológico associada às palavras-chave selecionadas acima, ou

seja, encontrou-se uma extensa quantidade de registros de artigos científicos publicados por cada palavra-chave. Para evitar generalidades que não incluíssem artigos de interesse, o que tornaria o volume de informação operacionalmente inviável para a triagem, processamento e análise, realizou-se a combinação dessas palavras-chave, em função das suas classificações (equipamentos, métodos, óleos, aplicações), conforme a Tabela 2.3, excluindo aplicações médicas, microbiológicas e animais.

Tabela 2.3 Busca de artigos com combinações de palavras-chave no campo “tópico”

CAMPO	LÓGICA	PALAVRAS-CHAVE
1	–	Equipamento (Sensor*)
2	AND	Métodos (Spectrofluor*)
3	AND	Materiais (Biodiese*)
4	AND	Aplicações (Adulter*)
5	NOT	Medic* or Microb* or animal*

* Indica que qualquer substituição é possível.

Foram selecionados e exportados 4.225 artigos da base Web of Science, da ISI Web of Knowledge*. Foram examinados e retirados os artigos em duplicidade, restando 1.764 artigos de interesse.

Avaliaram-se em cada artigo aspectos relacionados à publicação (evolução anual, país e continente), às organizações (setor, empresa, independente, instituição de pesquisa, governo), ao tipo de artigo (método, aparato, processo, produto), método e/ou técnicas empregadas, componentes e fluidos de análises.

2.2.2 Resultados da prospecção

Até 1990, foram publicados sete artigos sobre o tema e solicitadas 86 patentes que se referiam essencialmente a métodos tradicionais, cujos equipamentos já se encontram em uso em escala comercial há décadas. A partir de 1990, (Figura 2.1) são identificadas duas ondas tecnológicas: uma inicial, referente a melhorias de tipos de amostras e a *lasers*; e outra mais recente, referente a novos materiais e componentes, como LEDs e fotodiodos.

* Ver <http://www.webofknowledge.com>.

Quanto aos sete artigos publicados até 1990, foram selecionados apenas aqueles que propõem o desenvolvimento de novas técnicas ou novas metodologias, excluindo os que focavam, essencialmente, no uso dos métodos tradicionais, por isso a sua contagem. A partir de 1990, o crescimento dos artigos é exponencial, sendo vários os métodos propostos e diversos os equipamentos descritos para operar com esses métodos.

A razão entre patentes e artigos mostra pouca estabilidade, típica de tecnologias que eram maduras e que estão apresentando vertentes tecnológicas emergentes. De fato, várias técnicas espectroscópicas estão sofrendo melhorias ou mudando radicalmente o tipo de componentes dos equipamentos, ou ainda sendo integradas e focando em portabilidade, uso em tempo real, técnicas não invasivas e não destrutivas.

Os vários métodos e as relações entre eles foram analisadas, tanto para patentes (Figura 2.2) como para artigos (Figura 2.3).

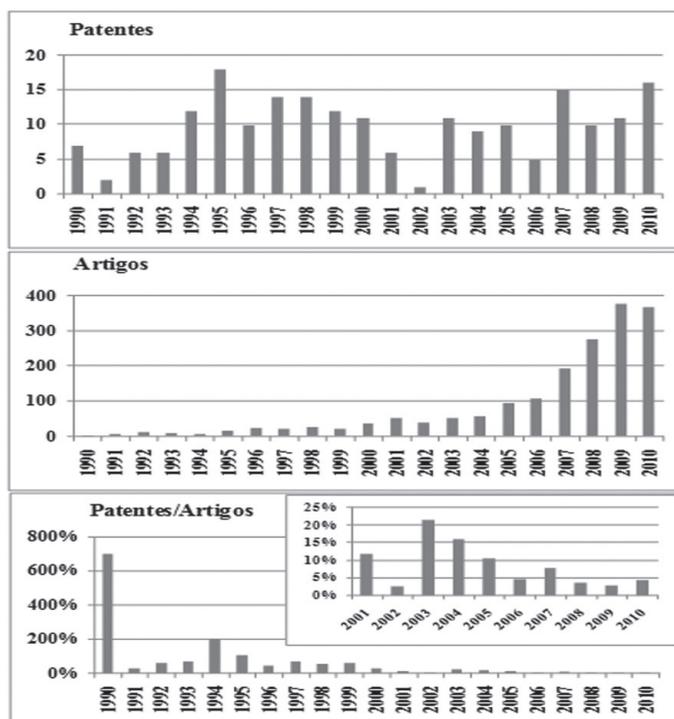


Figura 2.1 Evolução anual desde 1990 das solicitações de patentes, das publicações de artigos e da razão percentual anual entre elas.

Os métodos mais referidos nas patentes são fluorescência, absorção, infravermelho, marcadores em geral, refletância e colorimetria, sendo observada também a cromatografia. São observadas muitas patentes em associações com fluorescência e absorção, e em absorção com infravermelho. Associações de três técnicas mostram, principalmente fluorescência com marcadores e absorção. Uma patente associa colorimetria com cromatografia e marcadores. Aqui se identifica uma oportunidade em métodos de fluorescência que não estejam associados a marcadores, ou seja, que utilizem a fluorescência intrínseca das amostras.

Exemplos de patentes pertinentes ao nosso tema são poucos e ocorreram há algumas décadas, como, por exemplo, a da empresa Conoco Inc. (1980), referente a um método utilizando fluorescência para determinação da presença de hidrocarbonetos em água. Ou o exemplo da empresa Baileys Meters Controls Ltda (1977), referente a um processo e um equipamento para monitoramento por fluorescência de poluição ambiental^{17,18}.

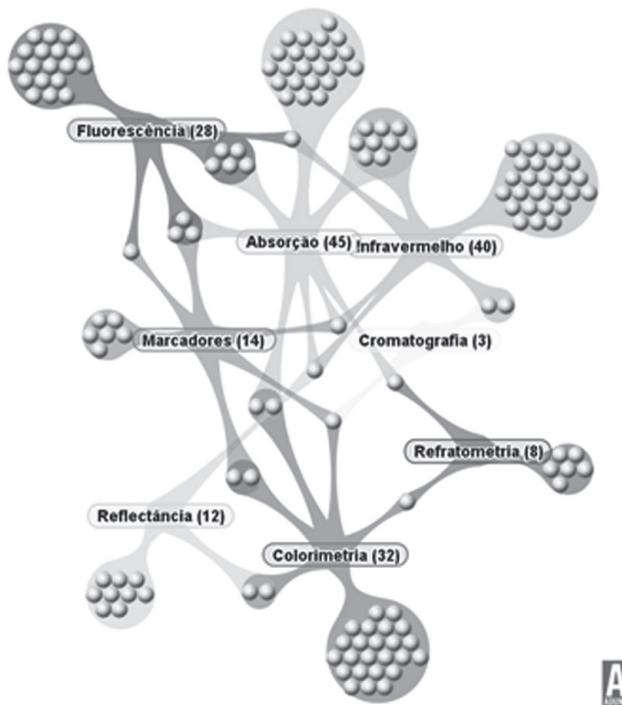


Figura 2.2 Rede de relacionamento entre patentes no que tange a tipos de técnicas (cada bolinha representa um documento).

Os artigos focam essencialmente fluorescência, infravermelho, cromatografia, absorção e marcadores, tendo ainda uma pequena contribuição de refletância e colorimetria. Ora, como os artigos são indicadores de para onde a ciência está se dirigindo e são os precursores das patentes, pode-se considerar que as tecnologias de refletância e de marcadores estão se tornando maduras, sem grandes descobertas científicas que levariam a novas patentes.

Por exemplo, Wang et al. (2009) analisaram óleos através de fluorescência, estudando os efeitos substituintes e solventes de derivados de benzotiazol¹⁹. Changchuan et al. (2010) usaram luminescência e polarização da fluorescência para determinar a presença de traços de europium (III) em óleos e sistemas micelares em terras raras²⁰. Sahiner et al. (2007) monitoraram *in situ* a síntese de micro e nanogéis a partir de derivados de acrilamida num sistema organogel de lecitina de soja²¹. Januszewicz et al. (1992) utilizaram traçadores fluorescentes no ultravioleta para monitorar a contaminação de óleos²⁰. Xu et al. (2008) determinaram a presença de antraceno

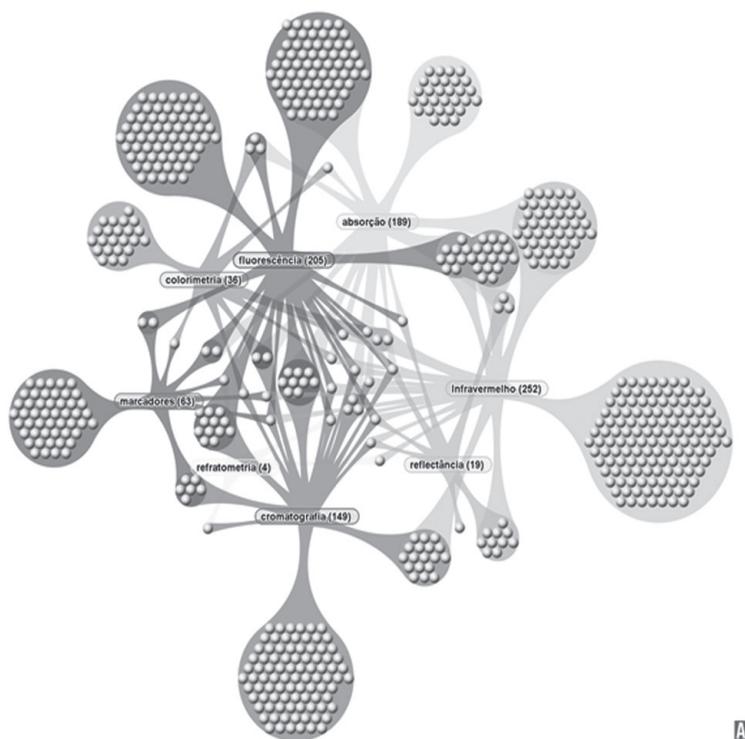


Figura 2.3 Rede de relacionamento entre artigos no que tange a tipos de técnicas.

em microemulsões SDS/álcool benzílico/água, mostrando que este tende a se localizar na membrana da interface e na fase oleosa²³.

É grande a associação entre absorção e fluorescência nos artigos, indicando uma tendência da ciência de ter as duas técnicas num mesmo método de análise de qualidade. As publicações de artigos com associações das palavras-chave “infravermelho e absorção” e “fluorescência, infravermelho e refletância” são numerosas, o que pode ser atribuído, especialmente, à espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy* – FTIR) e a espectroscopia no infravermelho próximo (*near infrared* – NIR).

Em cada documento de depósito de patentes foram mapeados os usos das técnicas de análise (Figura 2.4). A maioria delas se refere às características de compostos, sendo predominantes os hidrocarbonetos e os óleos. As aplicações em saúde de novas técnicas são também bastante referidas. São ainda relativamente poucos os documentos de patentes referentes a analitos

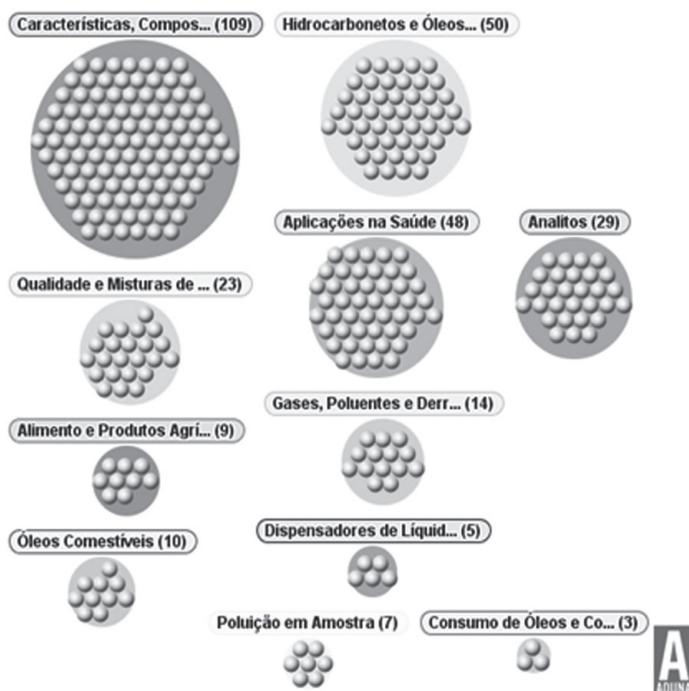


Figura 2.4 Distribuição por temas das patentes envolvendo métodos óticos de análise.

e qualidade de misturas, mostrando que ainda vale a pena investir em pesquisa e desenvolvimento neste tema. Estão também presentes alimentos, óleos comestíveis, consumo de óleos e produtos agrícolas, aspectos ambientais como gases poluentes, derramamentos e detecção de grau de poluição em amostras.

Exemplos de usos de patentes são o uso da espectroscopia de absorção no UV-vis para determinar propriedades de óleos e sua presença ou contaminação²⁴, da quimioluminescência para detectar contaminações de superfícies por micro-organismos²⁵ e para determinar o teor de óleo em sementes²⁶, da espectroscopia de absorção e reflexão para determinar o nível de estresse oxidativo utilizando os ácidos graxos de um tecido²⁷ e da fluorescência intrínseca para monitorar qualidade em processos de obtenção de combustíveis e dispositivo sensor para sua operação²⁸, para identificação de substâncias, puras ou em formulações, através de análise espectral e quimiometria² e método para prever propriedades químicas e físico-químicas de óleos através de análise multivariada associada com espectrofluorimetria²⁹.

Observou-se que a técnica de espectrofluorimetria a LED associada à quimiometria é uma oportunidade, tendo em vista o desenvolvimento de componentes nas últimas décadas que permitem desenvolver equipamentos de baixo custo, portáteis e com boa relação sinal/ruído.

2.3 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Métodos que se baseiam na detecção e análise de um feixe de radiação eletromagnética vinda de uma amostra que está sob investigação são denominados espectroscópicos. São métodos que determinam a interação dos diferentes tipos de radiação com a matéria, fundamentados na absorção ou emissão de radiação eletromagnética por muitas moléculas, quando seus elétrons movimentam-se entre níveis energéticos. Diferentes intervalos no amplo espectro da radiação eletromagnética, desde os raios X até micro-ondas, são cobertos pelos diferentes métodos ditos espectroscópicos. Considerando que as interações da radiação com a matéria podem ocorrer tanto em nível atômico como em nível molecular, os métodos instrumentais espectroscópicos compreendem (Tabela 2.4) emissão (emissão atômica), luminescência (fluorescência atômica e molecular, fosforescência), espalhamento (Raman, turbidimetria e nefelometria) e absorção (absorção atômica e molecular)⁴.

O espectro de radiações eletromagnéticas estende-se, em ordem crescente de energia, das ondas de rádio, com longos comprimentos de onda (de 10^3 m a 100 m), até radiações de altíssima energia (raios X e raios gama) com comprimentos de onda muito curtos, entre 10^{-10} m e 10^{-15} m. O espectro inclui também regiões de radiações com energias intermediárias, entre micro-ondas e o ultravioleta de vácuo. Cada uma dessas regiões tem suas formas próprias de serem produzidas e detectadas, e não existe uma interface perfeitamente definida entre regiões adjacentes, sendo o espectro contínuo do ponto de vista macroscópico³⁰.

Tabela 2.4 Faixa de comprimento de onda de cada técnica espectroscópica

TIPO DE ESPECTROSCOPIA	FAIXA DE COMPRIMENTO DE ONDA USUAL	FAIXA DE NÚMERO DE ONDA USUAL CM-1	TIPO DE TRANSIÇÃO QUÂNTICA
Emissão de raios gama	0,005 Å a 1,4 Å	–	Nuclear
Absorção, emissão, fluorescência e difração de raios X	0,1 Å a 100 Å	–	Elétrons internos
Absorção no ultravioleta a vácuo	10 nm a 180 nm	1×10^6 a 5×10^4	Elétrons ligados
Absorção, emissão e fluorescência no UV/visível	180 nm a 780 nm	5×10^4 a $1,3 \times 10^4$	Elétrons ligados
Absorção no IV e espalhamento Raman	0,78 μ m a 300 μ m	$1,3 \times 10^4$ a 33	Rotação/vibração de moléculas
Absorção de micro-ondas	0,75 mm a 375 mm	13 a 0,03	Rotação de moléculas
Ressonância de <i>spin</i> eletrônico	3 cm	0,33	<i>Spin</i> de elétrons em um campo magnético
Ressonância magnética nuclear	0,6 m a 10 m	$1,7 \times 10^2$ a 1×10^3	<i>Spin</i> de núcleos em um campo magnético

2.3.1 Espectrofluorimetria

A luminescência molecular é a emissão de radiação eletromagnética na região do ultravioleta próximo-visível, por moléculas que foram excitadas e retornaram ao seu estado fundamental. A luminescência se divide em fluorescência e fosforescência, que diferem pela natureza do estado excitado envolvido. Na fluorescência, o *spin* do elétron excitado mantém sua orientação original, sendo denominado estado excitado singleto, no qual o intervalo de tempo entre a captação do fóton e a emissão da energia captada é extremamente curto ($<10^{-5}$ s, podendo ser de até 10^{-12} s) (Figura 2.5)³¹.

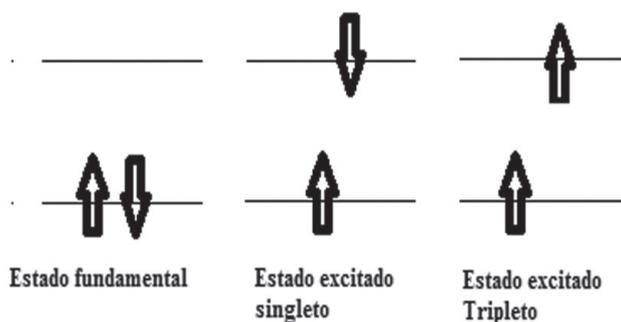


Figura 2.5 Representação do estado fundamental e dos estados excitados singleto (fluorescência) e tripleto (fosforescência).

Quando, durante a promoção do elétron ao estado excitado, ocorre inversão do *spin* eletrônico, o intervalo de tempo entre a captação e a emissão de energia é bem maior (de alguns segundos ou até mais), sendo o fenômeno chamado de fosforescência (Figura 2.5)³¹.

A espectrofluorimetria é uma técnica analítica que possui grande sensibilidade, e, por isso, tem sido amplamente aplicada para analitos que requerem baixos limites de detecção³²⁻³⁵. A sensibilidade da espectrofluorimetria é consideravelmente maior que da espectrofotometria UV/visível, apresentando limites de detecção de até três ordens de grandeza menores, geralmente na faixa de $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, em função do baixo sinal de fundo que as medidas fluorescentes apresentam³⁶.

Outra vantagem importante da espectrofluorimetria é a maior seletividade, o que pode ser explicado considerando que substâncias fluorescentes são menos comuns do que substâncias não fluorescentes. Dessa forma, as

substâncias fluorescentes apresentam espectros característicos de excitação e/ou emissão. A sensibilidade, seletividade e, adicionalmente, a simplicidade instrumental e o baixo custo de manutenção e de análise, quando comparados com os de outros métodos analíticos, fazem da espectrofluorimetria uma poderosa técnica com amplo uso na análise de diversos princípios ativos de uso farmacêutico, biológico, ambiental e industrial³⁷⁻³⁹.

A limitação da espectrofluorimetria é que somente certas classes de substâncias exibem luminescência intrínseca, como consequência dos processos de desativação que ocorrem em uma molécula. No entanto, é muitas vezes possível a derivatização de analitos não fluorescentes em compostos fluorescentes ou a detecção indireta através da fluorescência de compostos que reagem quantitativamente com o analito^{19,40-44}.

O equipamento utilizado para medir a fluorescência é o espectrofluorímetro (Figura 2.6). A maioria dos espectrofluorímetros opera no visível,

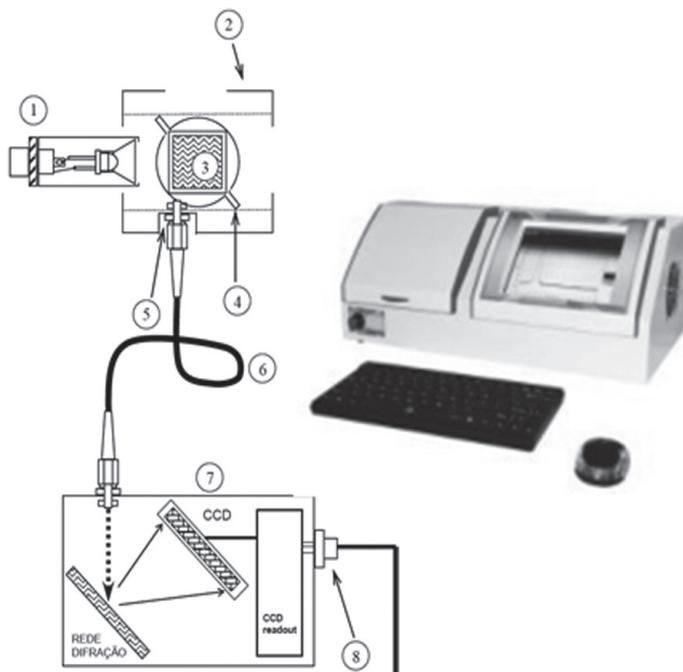


Figura 2.6 Equipamento do espectrofluorímetro Q798FILL: 1) fonte de radiação (LED); 2) bloqueio de entrada de luz; 3) amostra; 4) ajuste da amostra; 5) detector (fotodiodo); 6) fibra ótica; 7) separador de comprimentos de onda da fluorescência⁴⁵⁻⁴⁶.

estendendo-se um pouco para o infravermelho e para o ultravioleta. Um espectrofluorímetro compreende: (a) uma fonte de radiação com comprimentos de onda conhecidos, que pode ser uma lâmpada associada a um monocromador ou pode ser um arranjo de LEDs; (b) um sistema de transferência da radiação emitida até a amostra, que pode ser de fibra ótica ou um percurso envolvido por proteção para impedir a entrada de outra radiação; (c) um suporte de amostra sobre o qual a luz incide; (d) um sistema de coleta da radiação emitida pela amostra, que pode ser de fibra ótica e/ou sistema de lentes ou espelhos; (e) um sistema de detecção que pode ser de fotodiodos, por exemplo.

Nos equipamentos tradicionais, utilizam-se monocromadores para isolar uma linha de comprimento de onda (λ) oriunda da fonte de radiação policromática. Um monocromador é composto por um arranjo ótico que, através de uma grade de difração, decompõe em diferentes comprimentos de onda uma fonte de luz policromática incidente. Nos modernos, se utilizam LEDs de excitação monocromática no comprimento de onda de interesse. Nos equipamentos tradicionais, a radiação emitida é separada em comprimentos de onda por um monocromador e detectada em cada comprimento de onda por uma fotomultiplicadora. Nos dispositivos modernos se utilizam dispositivos eletrônicos que separam a radiação em seus comprimentos de onda, e a radiação é detectada integralmente e ao mesmo tempo por fotodiodos ou por arranjos de sensores.

Os espectrofluorímetros desenvolvidos no meio e final do século passado são equipamentos pesados, nos quais é difícil manter o alinhamento dos componentes óticos, motivo pelo qual não devem ser transportados para o local de análise. Usualmente a fonte de radiação é uma lâmpada de emissão contínua, que pode ser de xenônio ou mercúrio. O critério para a seleção de uma ou outra lâmpada depende da condição necessária para o procedimento analítico. Na hipótese de se precisar do maior número de comprimentos de onda possíveis para a excitação da amostra, opta-se pela lâmpada de xenônio, mas, no caso de a amostra apresentar fraca absorção, é mister uma maior intensidade nos comprimentos de onda emitidos, então a escolha deve ser pela lâmpada de mercúrio⁴⁷.

Nos espectrofluorímetros atuais, utilizam-se como fontes de radiação os LEDs, tornando os equipamentos mais versáteis, leves e passíveis de transporte para o local da análise. Neles deve-se se escolher o LED com a emissão de interesse. É comum se fazerem arranjos de dois ou mais LEDs e se escolher o mais adequado à medida de interesse utilizando análise covariante de dados.

Os espectrofluorímetros que possuem fonte de emissão contínua fornecem dois tipos de espectros: espectros de fluorescência (emissão) e espectros de excitação.

Na obtenção do espectro de fluorescência ou de emissão a amostra deve ser irradiada com um comprimento de onda fixo, e a intensidade de luz reemitida é medida em uma faixa espectral definida. A escolha do comprimento de onda de excitação ideal para o registro do espectro de emissão é feita, em geral, com base no espectro de absorção. Na espectrofluorimetria tradicional se utilizava, comumente, o comprimento de onda de máxima absorção. Hoje em dia, busca-se não o máximo da emissão fluorescente, mas sim a faixa de comprimento de onda na qual a emissão fluorescente é mais sensível à propriedade ou substância que se quer medir.

Para o registro do espectro de emissão, após a definição do comprimento de onda de excitação, este deve permanecer fixo, e passa-se então a registrar as intensidades de emissão nos diversos comprimentos de onda da banda de emissão⁴⁷. Essa técnica é mais utilizada em medidas rotineiras ou em tempo real.

Para o registro do espectro de excitação, seleciona-se o comprimento de onda de emissão correspondente ao máximo da banda de absorção e faz-se variar os comprimentos de onda de excitação sobre toda a faixa do seu espectro de absorção⁴⁷. Essa técnica é mais utilizada em laboratórios para fins puramente científicos ou didáticos.

2.3.2 Espectroscopia no UV-Vis

A espectroscopia, de forma genérica, consiste no estudo da radiação eletromagnética emitida ou absorvida por um corpo. A espectroscopia no UV-Vis permite determinar a absorção da luz numa amostra no intervalo de comprimentos de onda compreendido entre 200 nm e 800 nm. A região ultravioleta no espectro é geralmente considerada na faixa de 200 nm e 400 nm, e a região do visível entre 400 nm e 800 nm. As energias correspondentes a essas regiões são ao redor de 150 K.cal.mol⁻¹ a 72 K.cal.mol⁻¹ na região ultravioleta, e 72 K.cal.mol⁻¹ a 36 K.cal.mol⁻¹ para a região visível⁴⁸. Energias dessa magnitude correspondem, muitas vezes, à diferença entre estados eletrônicos de muitas moléculas. A absorção da região visível e ultravioleta depende, em primeiro lugar, do número e do arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes. Como consequência, o pico de absorção pode

ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está sendo estudada⁴⁸⁻⁴⁹.

Para a determinação espectrofotométrica na região ultravioleta é necessário empregar células de quartzo que não absorvem nessa zona do espectro. É um método de análise baseado na propriedade de que espécies químicas iônicas ou moleculares absorvem radiações na região do ultravioleta e visível. As radiações nessas regiões envolvem fótons com energia suficiente para provocar transições de elétrons de valência, sendo um processo específico relacionado com a estrutura molecular da espécie absorvente. A quantidade dos fótons absorvidos será sempre proporcional ao número de centros absorventes que a radiação encontra ao longo do seu percurso através da solução⁴⁷.

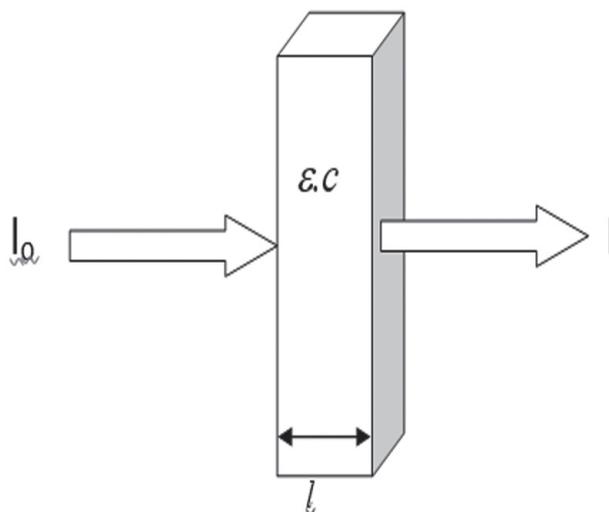


Figura 2.7 Ilustração da lei de Lambert-Beer: $\text{Log}(I_0/I) = A = \epsilon.c.l$.

O método está fundamentado nos princípios teóricos da lei de Lambert-Beer, que estabelece uma relação entre a absorbância de uma solução e a sua concentração. A absorbância é o logaritmo do quociente entre a intensidade da luz incidindo na solução (I_0) e a intensidade da luz saindo da solução (I):

$$\text{Log}(I_0/I) = A = \epsilon.c.l$$

Em que A = absorvância; ϵ = absorvidade molecular ou coeficiente de extinção; c = concentração do material absorvedor; l = espessura da amostra através da qual a luz passa.

A absorção na região visível e ultravioleta depende, em primeiro lugar, do número e do arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes. Como consequência, o pico de absorção pode ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está sendo estudada. Do ponto de vista prático, o aspecto mais importante do cálculo quântico é a determinação de quanta luz é absorvida pela amostra. Entre os compostos orgânicos, os que possuem dupla ligação absorvem fortemente no ultravioleta remoto. Os compostos que possuem ligações simples e duplas alternadamente, chamadas de ligações conjugadas, produzem absorção em comprimentos de ondas maiores. Quanto mais extenso for o sistema conjugado, mais longos serão os comprimentos de onda absorvidos, podendo chegar à região do visível⁴⁹.

O processo instrumental de medição baseado nas propriedades de absorção e emissão de energia eletromagnética em alguma região do espectro eletromagnético, ou seja, que mede a radiação eletromagnética emitida ou absorvida por um corpo, é designado espectrofotometria.

Denominam-se de espectrofotômetros os instrumentos capazes de registrar dados de absorvância ou transmitância em função do comprimento de onda. O espectro é o registro dos dados, sendo denominado espectro de absorção e espectro de transmissão, de acordo com o dado registrado, se absorvância ou transmitância, respectivamente. O espectro de absorção é característico de cada espécie química, sendo possível a identificação de uma espécie química por seu “espectro de absorção”.

Uma particularidade importante dos espectrofotômetros é a seleção de radiações monocromáticas, o que possibilita inúmeras determinações quantitativas regidas pela Lei de Beer. Quando a região espectral usada é a UV/Vis,

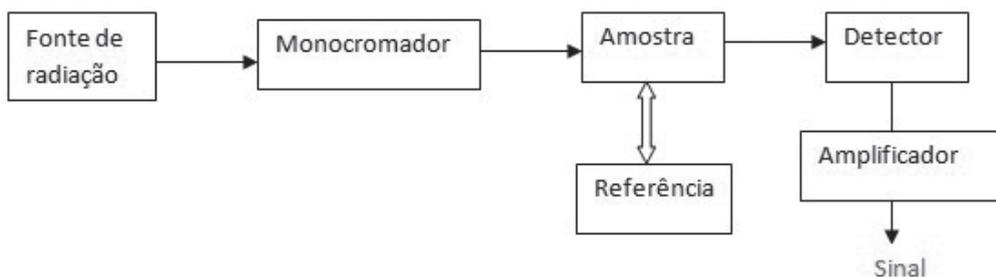


Figura 2.8 Esquema de um espectrofotômetro. Fonte própria.

são necessários componentes óticos de quartzo e detectores altamente sensíveis, capazes de detectar radiações nessa extensa faixa espectral em que atua o instrumento. Os espectrofotômetros, em geral, contêm cinco componentes principais: fontes de radiação, monocromador, recipientes para conter as soluções, detectores e indicadores de sinal (Figura 2.8)⁵⁰.

2.4 QUIMIOMETRIA

A introdução da instrumentação analítica fornecendo respostas multivariadas para cada amostra analisada associada à disponibilidade de computadores, bem como de programas estatísticos sofisticados, fez surgir a quimiometria⁵¹, que é uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada, podendo ser definida como uma área da química que visa planejar ou otimizar a seleção de procedimentos experimentais, empregando métodos matemáticos e estatísticos na análise dos dados resultantes que terminam por fornecer o máximo de informação química relevante, além de conhecimentos sobre sistemas químicos⁵²⁻⁵⁴.

A análise multivariada consiste na verificação da relação entre grupos de variáveis dependentes coletadas sobre a mesma amostra e corresponde a um grande número de métodos e técnicas que utilizam, simultaneamente, todas as variáveis na interpretação teórica do conjunto de dados obtidos⁵⁵⁻⁵⁷.

Com o crescimento da aplicação da quimiometria foram desenvolvidas novas ferramentas, não só para o planejamento de experimentos^{54,58} como para o tratamento de dados, encontrando aplicações distintas conforme o objetivo do estudo, por exemplo, a otimização de processos, a classificação de dados e as determinações qualitativas e quantitativas. Podem ser citadas como exemplos as técnicas de: análise por componentes principais (PCA), regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), regressão por componentes principais (PCR), análise paralela de fatores (PARAFAC) e Tucker. Da mesma forma, podem ser citadas técnicas fundamentadas em distâncias, como: análise hierárquica de agrupamentos (HCA), técnicas baseadas em inteligência artificial como redes neurais e algoritmo genético, técnicas de lógica como lógica *f*, entre outros métodos, que têm sido utilizadas por décadas para tratamento de dados complexos^{2,5,6,59,60}.

2.4.1 Análise de componentes principais (PCA)

Uma das ferramentas mais utilizadas da quimiometria nas mais diversas áreas de pesquisa tem sido a análise de componentes principais (PCA), que visa, principalmente, reduzir o número de variáveis, eliminar dados redundantes e facilitar a interpretação dos dados, sendo considerado um método descritivo e exploratório.

Os componentes principais resultam da transformação de um conjunto de variáveis aleatórias correlacionadas em um conjunto de variáveis não correlacionadas e ortogonais entre si. Essas variáveis são combinações lineares das variáveis originais, sendo que a primeira variável ou primeira componente principal obtida com essa transformação é responsável pela maior variância do conjunto original de dados, em sequência a segunda componente ou segunda variável é responsável pela maior variância restante, não havendo correlação com a primeira. Nessa mesma linha, a terceira componente é responsável pela maior variância restante e não é correlacionada com a primeira e com a segunda componentes, e assim por diante. Dessa forma, a importância relativa das componentes principais decresce da primeira para a última⁶¹.

No entanto, as componentes principais de interesse em cada caso devem ser escolhidas de modo que expliquem a análise da propriedade ou de substâncias de interesse em cada caso. Pode acontecer, por exemplo, de as componentes principais com maior variância explicarem a propriedade de interesse⁶² ou aspectos básicos, como variações de temperatura de tubos de aço expostos ao sol, e não a propriedade de interesse, no caso, a microdegradação estrutural desses mesmos tubos de aço⁶³.

Além de ser capaz de separar informações importantes das incertas, desnecessárias e repetidas, a PCA auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados, sendo, por conseguinte, um método exploratório⁶⁴. Neste tipo de análise, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados, mediante a geração de gráficos de *scores* e *loadings*, cujos eixos são componentes principais (CP), nos quais os dados são projetados. Os *scores* fornecem a composição das componentes principais, relativamente às amostras. Os *loadings*, por sua vez, fornecem a composição das componentes principais em relação às variáveis. Tendo em vista que as componentes principais são ortogonais, ou seja, estão todas a 90° uma em relação à outra, é possível examinar as relações entre amostras e variáveis através dos gráficos dos *scores* e dos *loadings*. O estudo do conjunto de *scores* e *loadings* permite, ainda, estimar a influência de cada variável em cada amostra^{53,65-66}.

2.4.2 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

O processo que possibilita relacionar um sinal analítico ou resposta instrumental com uma determinada propriedade da amostra é denominado de calibração. O modelo ou método de calibração é a equação matemática que irá descrever a relação sinal *versus* propriedade, podendo ser definido ainda como o processo matemático ou estatístico de extração de informação a partir do sinal instrumental. A representação gráfica da relação sinal *versus* propriedade é feita mediante construção da curva analítica ou de calibração^{57,67}. O método de calibração pode ser classificado em univariado e multivariado, linear e não linear, direto ou indireto, clássico e inverso, respectivamente, de acordo com critérios relativos ao número de variáveis, tipo de função matemática, obtenção dos parâmetros de calibração e a variável independente⁶⁸.

Denomina-se calibração univariada quando a relação matemática estabelecida ocorre entre uma única variável dependente e uma única variável independente. Na calibração multivariada a relação envolve mais de uma variável.

A calibração multivariada tem sido aplicada em estudos relacionados com os alimentos, agricultura, indústria e meio ambiente⁵⁶⁻⁵⁷. Dentre os métodos de calibração multivariada empregados com maior frequência, a regressão por mínimos quadrados parciais (do inglês, *partial least square* – PLS) é um dos métodos principais⁵⁷.

Para um modelo de calibração ser dito linear, as variáveis dependentes estão relacionadas com funções lineares das variáveis independentes; não se observando essa relação, o modelo é não linear. A calibração é direta quando os parâmetros são conhecidos diretamente a partir do sinal analítico de cada um dos analitos de forma individual, e indireta quando os parâmetros são determinados a partir dos sinais analíticos de misturas de componentes. Quando a concentração é a variável independente e o sinal analítico a variável dependente, caracteriza-se a calibração clássica; em caso reverso, a calibração é inversa^{59,68}.

O princípio básico da calibração multivariada é a quantificação de uma variável dependente, mediante a utilização concomitante de muitas variáveis independentes para quantificar. No campo das análises químicas, com o avanço da instrumentação e automação dos laboratórios gerando uma enorme quantidade de dados, tabelas e gráficos para serem identificados, classificados e interpretados de forma eficiente, a calibração multivariada passou a ser largamente empregada, principalmente nos casos em que os resultados da análise gerados pelo equipamento apresentam superposição

de sinais ou quando se deseja fazer determinações simultâneas de analitos. A calibração multivariada é uma técnica aplicada a matrizes reais complexas, em que os procedimentos de separação e tratamentos químicos necessários para aplicar a calibração usual simples são caros e demorados. Dentre os métodos de calibração multivariada, como previamente dito, destaca-se o método de regressão por mínimos quadrados parciais, por ser um dos empregados com maior frequência⁶⁹.

O método de regressão por mínimos quadrados parciais é um modelo baseado em variáveis latentes (fatores), em que cada fator é definido como uma combinação linear das variáveis originais das matrizes X (variáveis independentes) ou Y (variáveis dependentes). Assim sendo, é um método linear de calibração multivariada, pois os dados das variáveis independentes X e dependentes Y são utilizados para estabelecer um modelo de regressão linear. Esse método consiste em decompor ou modelar as matrizes originais, tanto a matriz X como a matriz Y, formando dois conjuntos de fatores lineares ou grupos de matrizes denominados de escores (*scores*) e pesos (*loadings*), sendo, por conseguinte, um método bilinear^{69,70}.

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) consiste em encontrar um conjunto de componentes principais (vetores base) para os dados espectrais e um conjunto separado de componentes principais para os dados da propriedade pesquisada, relacionando, em seguida, um conjunto com o outro, buscando encontrar uma perfeita linearidade entre os escores, ou seja, entre as projeções dos dados espectrais e dos dados da propriedade sobre seus respectivos fatores. Por exemplo, através do PLS é possível correlacionar dados espectrais de amostras com suas respectivas concentrações.

2.5 DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Recentemente, diversos artigos e patentes foram publicados associando a espectrofluorimetria a LED com a quimiometria. Alguns exemplos são listados a seguir:

- 1) Descrevem novos equipamentos^{28,46}.
- 2) Identificam substâncias puras ou em formulações^{2,4,71}.
- 3) Predizem o conteúdo de gordura animal em misturas com óleo vegetal⁶⁰.
- 4) Permitem determinar o teor de acetileno e gases combustíveis em óleos de transformadores^{62,72-73}.

- 5) Avaliam a degradação do papel isolante em transformadores de alta potência⁷⁴.
- 6) Permitem a predição das propriedades de blendas de biodiesel em diesel inclusive de massa específica e viscosidade por métodos óticos^{6,29,75}.
- 7) Fazem a identificação de adulteração de biocombustível por adição de óleo residual ao diesel por espectrofluorimetria total 3D e análise das componentes principais³.
- 8) Determinam a adulteração de óleo vegetal por monitoramento da presença da clorofila^{76,77}.
- 9) Determinam a estabilidade oxidativa de óleos e de biodiesel por espectrofluorimetria associada a quimiometria⁵.

2.5.1 Protocolo

O protocolo do método consiste nas etapas descritas a seguir.

- 1) Definição da técnica espectroscópica. As técnicas já testadas foram espectrofluorimetria e espectrofotometria no UV-Vis.
- 2) Preparação dos padrões.
- 3) Realização da análise espectroscópica. Um exemplo é a obtenção dos mapas espectrofluorimétricos onde as substâncias padrões são colocadas em cubetas de quartzo de 1 cm de percurso ótico e analisadas em espectrofluorímetro. As soluções das substâncias padrões são submetidas à radiação de fonte com amplo espectro e realizam-se as medidas. A faixa de excitação varia entre 200 nm e 900 nm, sendo preferida a faixa entre 400 nm e 600 nm. A faixa de comprimento de onda de emissão varia entre 230 nm e 950 nm, preferivelmente entre 430 nm e 650 nm. As medidas são feitas fixando o comprimento de onda de excitação no seu valor inicial e variando o comprimento de onda de emissão desde o valor inicial até ao valor final, com um passo que pode ser entre 0,01 nm e 50 nm, sendo preferido aquele entre 0,1 nm e 10 nm, e preferido ainda aquele entre 0,5 nm e 1 nm. As fendas de emissão e excitação variam entre 2,5 nm e 10 nm, preferivelmente 2,5 nm com velocidade de varredura de 1.200 nm/min. As medidas são feitas fixando o comprimento de onda de excitação inicialmente em 400 nm, com incremento de 25 nm a cada aquisição e variando os comprimentos de onda de emissão de 430 nm a 650 nm com incremento de 0,5 nm. São elaborados a seguir os mapas

de curvas de nível de fluorescência para cada amostra com o auxílio de *software* adequado, por exemplo, o Origin 8® (Figura 2.9).

- 4) Aplica-se o tratamento matemático aos dados coletados, com base em metodologias covariantes. As matrizes dos mapas espectrofluorimétricos são superpostas e organizadas sob a forma de uma matriz tridimensional em que a terceira dimensão é cada substância. Podem-se utilizar todos os dados obtidos ou apenas parte destes para se proceder à análise covariante. Os dados são processados por uma ou mais metodologia covariante. PCA e HCA podem ser utilizados para análise qualitativa como exemplos demonstrativos não restritivos. Já para a análise quantitativa empregam-se PLS e PCR.
- 5) Identificação da amostra desconhecida através da comparação com os padrões por aplicação da análise covariante de dados.

2.6 EXEMPLOS DE APLICAÇÃO DO MÉTODO

2.6.1 Análise de substâncias fenólicas por espectrofluorimetria e quimiometria

Os padrões de ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, vanilina e quercetina adquiridos de laboratório com certificação são utilizados para preparar soluções na concentração de 2 mg/mL em metanol. Cada uma dessas soluções foi analisada em seis replicatas por espectrofluorimetria e os espectros submetidos a análise covariante (PCA). Foram selecionados ácido cafeico, ácido ferúlico, vanilina, quercetina e ácido salicílico para a construção de modelos de calibração multivariada por PLS.

Os espectros de fluorescência dessas soluções são adquiridos em espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS55 equipado com lâmpada de Xenônio de 150 W e cubetas de quartzo com 1 cm de percurso ótico e operando com o *software* PerkinElmer FL Winlab (versão 4.0). A excitação é iniciada em 400 nm com incremento de 25 nm, e a emissão é obtida na faixa de 430 nm a 650 nm com incremento de 0,5 nm, sendo obtidos nove espectros de emissão para cada leitura. As fendas de emissão e de excitação são de 2,5 nm e a velocidade de *scan* ou varredura é de, aproximadamente 1.200 nm.min⁻¹.

As matrizes e mapas são geradas com auxílio do *software* Origin 8.0®. No Matlab 6.1® é construída uma matriz 3D com dimensões equivalentes a 36 (número de amostras) × 442 (comprimentos de onda de emissão) × 9

(comprimentos de onda de excitação). Na sequência, a matriz 3D é transformada em uma matriz 2D com dimensões 36 (número de amostras) \times 3.978 pelo comando *unfoldm* do Matlab[®] 6.1, centrada na média e submetida à análise covariante.

Após a retirada das leituras anômalas restaram 32 amostras para a PCA, sendo seis de ácido cafeico, seis de ácido *p*-cumárico, seis de ácido ferúlico, seis de ácido gálico, três de vanilina e cinco de quercetina. A Figura 2.9 mostra os mapas de contorno de espectrofluorimetria dos compostos fenólicos comerciais analisados: ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, vanilina e quercetina. A substância menos fluorescente é a vanilina, e sua banda de fluorescência está centrada em 400 nm de excitação e 450 nm de emissão. Provavelmente, essa substância fluoresce quando excitada em comprimentos inferiores a 400 nm.

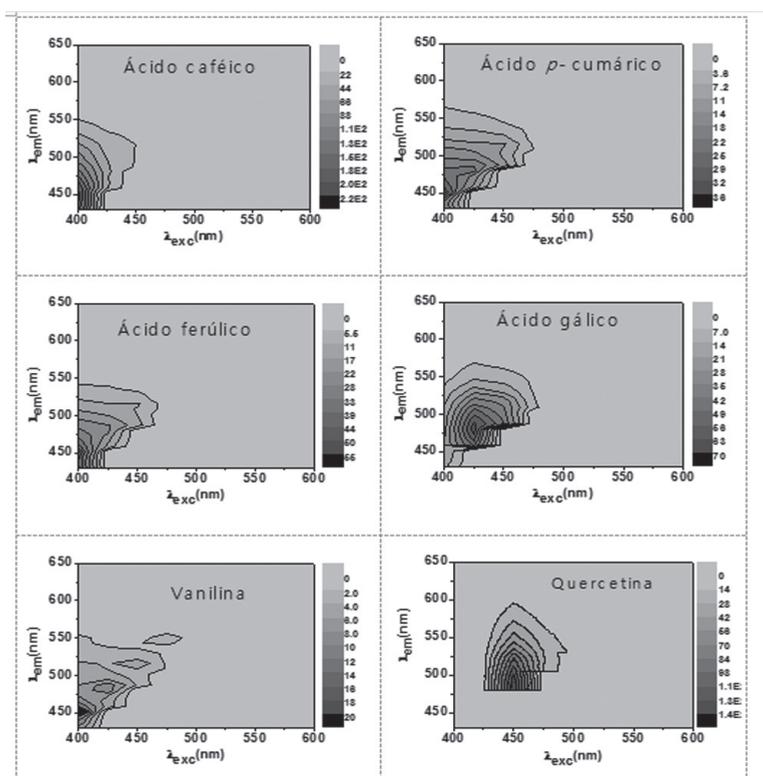


Figura 2.9 Mapas de fluorescência dos compostos fenólicos analisados.

Os ácidos cafeico, ferúlico e cumárico possuem mapas de contornos na mesma região do espectro. O pico máximo de fluorescência provavelmente está situado abaixo de 400 nm de excitação e não foi detectado na análise. O ácido gálico fluoresce quase que completamente na faixa do visível do espectro, com pico máximo de fluorescência em 425 nm de excitação e em 450 nm a 500 nm de emissão. Como esperado, em virtude de possuir cinco anéis aromáticos, a quercetina é a substância mais fluorescente, e sua banda de fluorescência se situa totalmente na região visível do espectro. Seu pico de fluorescência se situa em 450 nm de excitação e em 475 nm a 500 nm de emissão.

2.6.1.1 Análise de componentes principais (PCA)

Na PCA obtida com os espectros de fluorescência do ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, vanilina e quercetina verifica-se que, com apenas três componentes principais é possível explicar 99,87% da variância dos dados, sendo 74,42% para PC1, 20,48% para PC2 e 4,98% para PC3 (Tabela 2.5). A Figura 2.10 mostra o correspondente gráfico de

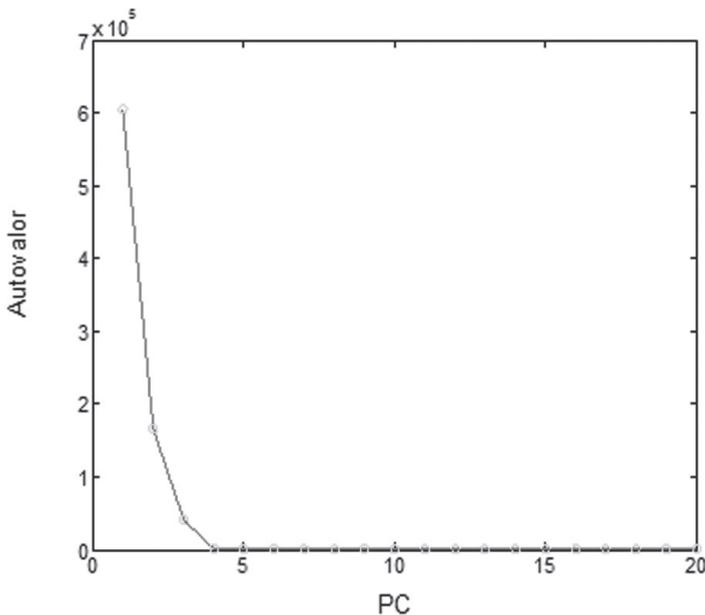


Figura 2.10 Gráfico de cotovelo (autovvalor x PC).

cotovelo (*screen plot*), que é um gráfico dos autovalores em função da ordem das componentes principais, em que se pode verificar que é possível selecionar apenas os três primeiros componentes principais, pois a partir deste ponto se encontram apenas os resíduos, ou seja, componentes principais com menores porcentagens de variância.

A Figura 2.11 mostra o gráfico dos escores de PC1 × PC2 × PC3 para as matrizes dos espectros de fluorescência centradas na média. Analisando a distribuição das amostras no gráfico de PC1 × PC2 (Figura 2.12), pode-se observar que na segunda componente principal as amostras de quercetina apresentam os valores mais negativos, separando-se das demais. Já as amostras de ácido cafeico apresentam os valores mais negativos na primeira componente principal, afastando-se também das demais. Contudo, em PC1 × PC3 (Figura 2.13) verifica-se que as amostras de ácido gálico apresentam os escores mais negativos em PC3 e se separam das demais. As amostras de ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e vanilina apresentaram-se bastante próximas.

Nos gráficos de *loadings* (pesos) os comprimentos de onda que mais influenciam são 400 nm de excitação e 448 nm de emissão para PC1 (Figura 2.14), 450 nm de excitação e 487,5 nm de emissão para PC2 (Figura 2.15) e 425 nm de excitação e 476 nm de emissão para PC3 (Figura 2.16). Com base nesses dados, para separar o ácido cafeico das demais substâncias o melhor comprimento de onda de excitação é 400 nm de excitação e 448 nm o melhor comprimento de onda de emissão, pois estes são os comprimentos de onda que mais influenciam no gráfico de *loading* para PC1 (Figura 2.14).

Do mesmo modo, para separar quercetina das demais substâncias o melhor comprimento de onda de excitação é 450 nm e o melhor comprimento de onda de emissão é 487,5 nm, pois estes são os comprimentos de onda que mais influenciam no gráfico de *loading* para PC2 (Figura 2.15).

Tabela 2.5 Percentagem de variância capturada pelo modelo PCA

PC	AUTOVALOR	% DE VARIÂNCIA CAPTURADA COM ESTE PC	% TOTAL DE VARIÂNCIA CAPTURADA
1	6,05e+005	74,42	74,42
2	1,66e+005	20,48	94,89
3	4,04e+004	4,98	99,87
4	6,90e+002	0,08	99,96

PC	AUTOVALOR	% DE VARIÂNCIA CAPTURADA COM ESTE PC	% TOTAL DE VARIÂNCIA CAPTURADA
5	1,07e+002	0,01	99,97
6	3,36e+001	0,00	99,97
7	2,62e+001	0,00	99,98
8	2,57e+001	0,00	99,98
9	1,66e+001	0,00	99,98
10	1,54e+001	0,00	99,98

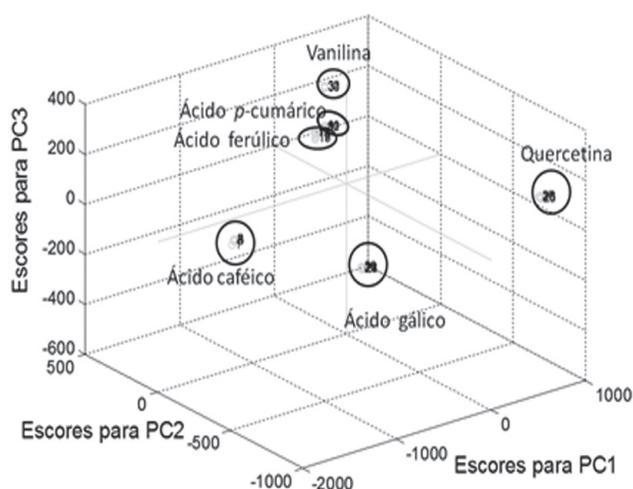


Figura 2.11 PC1 × PC2 × PC3 de espectros de fluorescência de alguns compostos fenólicos.

2.6.1.2 Calibração Multivariada por PLS

Ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido gálico, substâncias selecionadas para a construção dos modelos PLS são analisadas em solução metanólica.

As soluções estoques de ácido cafeico e ácido ferúlico são preparadas pesando-se 100 mg de cada substância separadamente e dissolvendo-se cada uma em 20 mL de metanol. Dessa forma, são obtidas soluções individuais na concentração de 5 mg/mL, respectivamente de ácido cafeico e ácido ferúlico. A seguir, de cada solução estoque são preparadas as soluções:

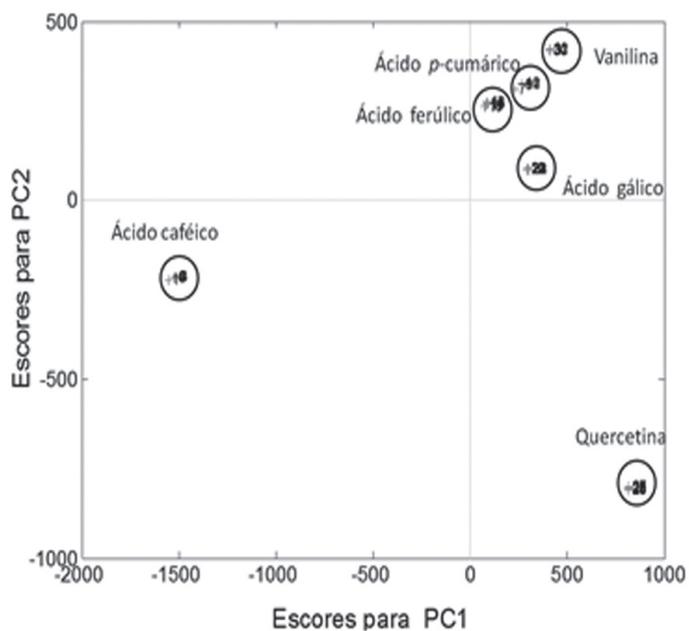


Figura 2.12 PC1 × PC2 de espectros de fluorescência de alguns compostos fenólicos.

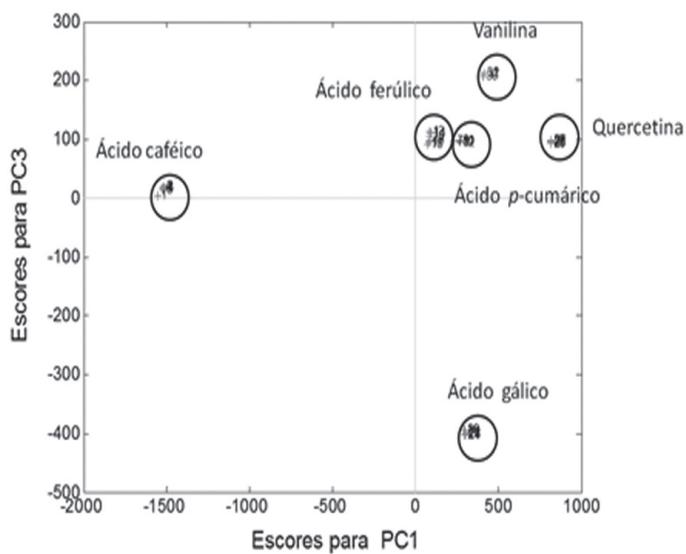


Figura 2.13 PC1 × PC3 de espectros de fluorescência de alguns compostos fenólicos.

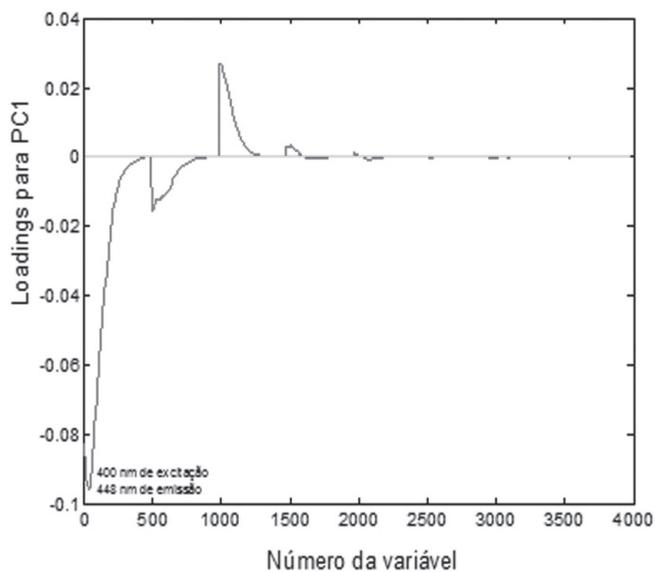


Figura 2.14 Loading para PC1.

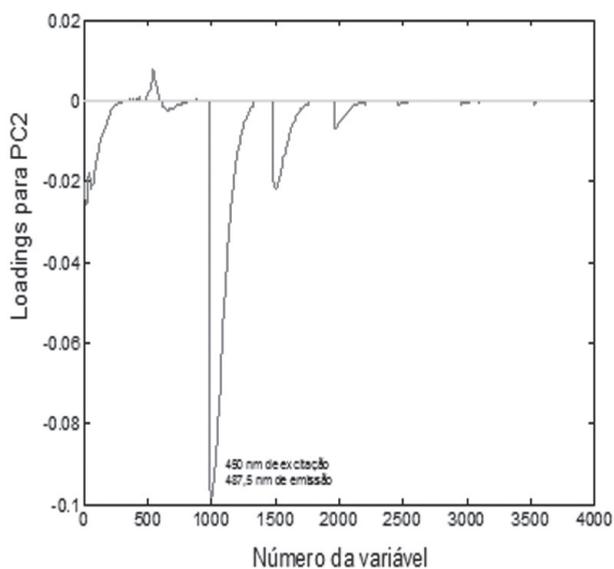


Figura 2.15 Loading para PC2.

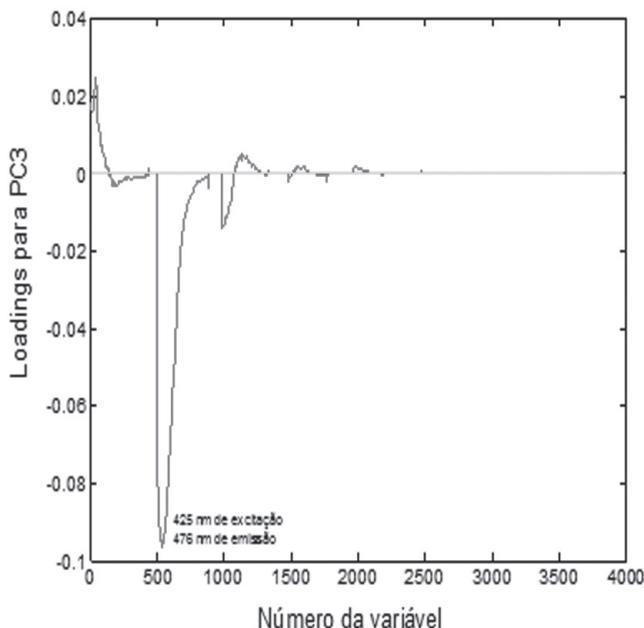


Figura 2.16 Loading para PC3.

- Solução A: pipetar 1 mL da solução estoque e completar 5 mL com metanol. Concentração da solução A = 1 mg/mL
- Solução A1: pipetar 2 mL da solução A e completar 4 mL com metanol. Concentração da solução A1 = 0,5 mg/mL
- Solução B: Pipetar 2 mL da solução estoque e completar 5 mL com metanol. Concentração da solução B = 2 mg/mL
- Solução C: Pipetar 2,5 mL da solução estoque e completar 5 mL com metanol. Concentração da solução C = 2,5 mg/mL
- Solução D: Pipetar 3 mL da solução estoque e completar 5 mL com metanol. Concentração da solução D = 3 mg/mL
- Solução D1: Pipetar 2 mL da solução D e completar 4 mL com metanol. Concentração da solução D1 = 1,5 mg/mL
- Solução E: Pipetar 3,5 mL da solução estoque e completar 5 mL com metanol. Concentração da solução E = 3,5 mg/mL
- Solução F: Pipetar 4 mL da solução estoque e completar 5 mL com metanol. Concentração da solução F = 4 mg/mL

São desenvolvidos modelos de regressão para ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido gálico. Cada modelo PLS é desenvolvido usando-se regressão por PLS através do *software* Unscrambler® 10.1. As matrizes espectrais de cada substância são organizadas em uma matriz geral centrada na média em que as amostras estão nas linhas. Na sequência por inserção de uma nova coluna para essa matriz geral são adicionados os valores de concentração da substância. Através do *software* define-se a coluna das concentrações como a variável dependente e os espectros de fluorescência como as variáveis independentes.

Através do *software* Unscrambler® 10.1 são construídos os modelos PLS relacionando os espectros de fluorescência com os valores de concentração. O PLS consiste de dois passos, denominados de calibração e validação. No passo de calibração, o *software* estima a relação entre os espectros e as concentrações do conjunto de amostras padrões. No passo de validação, o *software* avalia a capacidade do modelo de realizar determinações, isto é, a sua capacidade preditiva.

A Tabela 2.6 apresenta as concentrações usadas de ácido cafeico e de ácido ferúlico na construção dos respectivos modelos PLS, e a Tabela 2.7 apresenta as concentrações usadas de ácido gálico no seu modelo PLS. As figuras 2.17 a 2.19 apresentam as curvas dos modelos PLS para as substâncias ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido gálico.

Tabela 2.6 Concentrações usadas de ácido cafeico e de ácido ferúlico para construção dos modelos PLS

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (MG/ML)
1	0,5
2	1
3	1,5
4	2
5	2,5
6	3
7	3,5
8	4
9	5

Tabela 2.7 Concentrações usadas de ácido gálico para construção do PLS

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (MG/ML)
1	2
2	2,5
3	3
4	3,5
5	5

Cada gráfico mostra para cada substância os valores preditos *versus* os valores de referência das concentrações.

Existem várias medidas estatísticas que fornecem informações sobre o modelo PLS. As mais usadas são o coeficiente de correlação (R), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente angular e coeficiente linear.

O coeficiente de correlação linear (R) mede a grandeza da correlação linear entre variáveis intituladas. O valor da correlação varia entre $+1$ e -1 . Uma correlação próxima a zero indica que não há correlação entre as duas variáveis. Uma correlação positiva indica que as duas variáveis movem juntas, ou seja, quando uma cresce a outra também cresce, e a relação é forte quanto mais o valor do coeficiente de correlação se aproxima de $+1$. Uma correlação negativa indica que as duas variáveis movem-se em direções opostas, ou seja, quando uma variável aumenta, a outra diminui e que a relação também fica mais forte quanto mais próxima de -1 . Os coeficientes de correlação próximos a 1, nos modelos das figuras 2.17 a 2.19, respectivamente de 0,992507, 0,9940584, 0,9911911, mostram a forte correlação entre os dados da análise espectrofluorimétrica e os dados das concentrações, e indica que as variáveis dependentes e independentes estão perfeitamente correlacionadas positivamente, movendo-se essencialmente em perfeita proporção na mesma direção.

O coeficiente de determinação (R^2) indica o grau de ajuste da reta aos dados. Utiliza-se o símbolo R^2 porque é o quadrado do coeficiente de correlação amostral entre as duas variáveis. Os parâmetros da regressão são sempre estimados com algum ruído, em função do fato de que todo dado é medido com erro. R^2 mede a proporção da variabilidade em Y que é explicada por X . É uma função direta da correlação entre as variáveis. O R -quadrado indica a precisão da reta de regressão, isto é, o grau de ajuste da reta aos dados. Quanto mais próximo de $+1$ ou de -1 o valor do R -quadrado,

maior a eficiência do modelo para realizar as predições. Nos modelos das figuras 2.17 a 2.19, os valores de R-quadrado são respectivamente de 0,98507, 0,98815, 0,98246, indicando a eficiência dos modelos para realizar as predições das concentrações a partir dos espectros de fluorescência.

O coeficiente angular (*slope*) da reta do modelo PLS indica o grau de eficiência do modelo nas predições das propriedades consideradas. Quanto mais próximo de 1, maior a eficiência do modelo, pois o coeficiente angular indica a tangente do ângulo entre a reta e a abscissa. Um coeficiente angular de 1 indica que o ângulo entre a reta e a abscissa é de 45°, ou seja que os valores preditos pelo modelo são iguais aos valores de referência. Quanto mais próximo de 1 o valor do coeficiente angular, maior a eficiência do modelo nas predições das concentrações. Os coeficientes angulares dos modelos das figuras 2.17 a 2.19, respectivamente de 0,9850701, 0,9881522 e 0,9824599, estão próximos de 1, indicando modelos eficientes.

O coeficiente linear (*offset*) é a intercepção da reta no eixo das ordenadas, ou seja, o valor que Y (predito) terá quando Y (referência) é zero. Os valores dos coeficientes lineares indicam a ocorrência de erros determinados nas predições realizadas pelos modelos. Quanto mais próximo de zero os valores dos coeficientes lineares, menores são os erros determinados. Nos modelos das figuras 2.17 a 2.19, os valores dos coeficientes lineares de 0,038, 0,030 e 0,056 estão próximos de zero, demonstrando que há pouca ocorrência de erros determinados na predição dos modelos.

A linha vermelha mostra a validação do modelo através da validação cruzada feita pelo *software* Unscrambler®. A validação consiste em testar o modelo prevendo concentrações de amostras. O *software* realiza a validação cruzada, isto é, seleciona subconjuntos do conjunto de calibração que são utilizados no cálculo do modelo. Quanto mais coincidentes as retas de

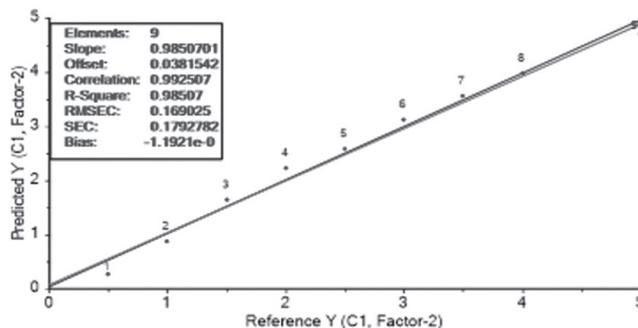


Figura 2.17 Modelo PLS para o ácido cafeico na faixa de 0,5 mg/mL a 5 mg/mL.

calibração e validação, mais eficiente o modelo PLS. Com relação ao processo de validação, a linha de validação para o modelo PLS do ácido ferúlico é pouco coincidente com a linha de calibração.

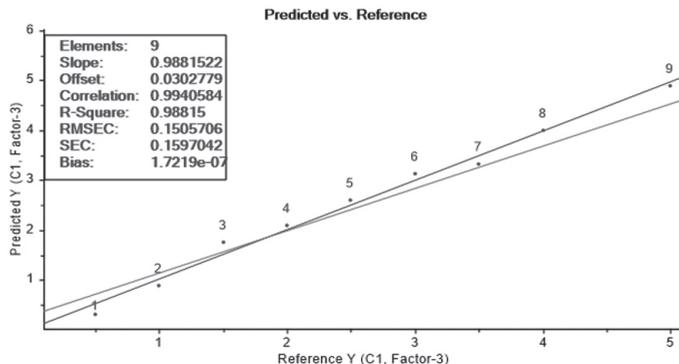


Figura 2.18 Modelo PLS para o ácido ferúlico na faixa de 0,5 mg/mL a 5 mg/mL.

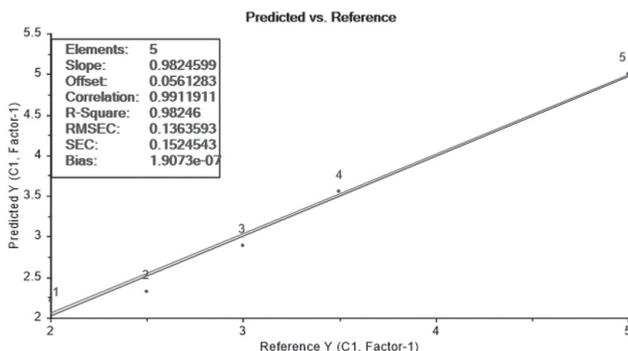


Figura 2.19 Modelo PLS para o ácido gálico na faixa de 2 mg/mL a 5 mg/mL.

2.6.2 Análise de combustíveis e suas formulações

O método foi usado para determinar simultaneamente a concentração, a viscosidade e a massa específica de misturas de biodiesel em diesel.

2.6.2.1 Amostras

O conjunto de dados foi constituído de misturas preparadas usando amostras de biodiesel e diesel fornecidas pela Petrobras. Foram utilizados dois tipos de biodiesel: o biodiesel de soja e o biodiesel de algodão. Misturas de biodiesel em diesel foram feitas nas concentrações de 0 a 100% como mostrado na Tabela 2.8.

2.6.2.2 Método de referência para medições de viscosidade

As medidas de viscosidade de misturas de biodiesel de soja em diesel e biodiesel de algodão em diesel (Tabela 2.8) foram feitas usando o MCR 501 reômetro Anton Paar a 25 °C, com taxa de cisalhamento na faixa de 10 s⁻¹ a 100 s⁻¹.

2.6.2.3 Método de referência para medições de massa específica

As densidades específicas foram determinadas por cálculo, dividindo a massa de cada amostra de um volume fixo (5 mL), medido na micropipeta pela massa do mesmo volume de água destilada à temperatura ambiente (25 °C). A medida foi realizada três vezes para cada amostra.

Tabela 2.8 Concentração, viscosidade e massa específica a 25 °C

AMOSTRA	% DE BIODIESEL EM DIESEL	VISCOSIDADE (CP) DE MISTURA DE BIODIESEL DE SOJA EM DIESEL	VISCOSIDADE (CP) DE MISTURA DE BIODIESEL DE ALGODÃO EM DIESEL	MASSA ESPECÍFICA DE MISTURAS DE BIODIESEL DE SOJA EM DIESEL	MASSA ESPECÍFICA DE MISTURAS DE BIODIESEL DE ALGODÃO EM DIESEL
1	0	3,6015	3,5915	0,821	0,823
2	5	3,6635	3,6835	0,824	0,828
3	10	3,665	3,687	0,832	0,830
4	15	3,73	3,712	0,834	0,832
5	20	3,7545	3,7785	0,836	0,834
6	25	3,7995	3,8435	0,838	0,841

AMOSTRA	% DE BIODIESEL EM DIESEL	VISCOSIDADE (CP) DE MISTURA DE BIODIESEL DE SOJA EM DIESEL	VISCOSIDADE (CP) DE MISTURA DE BIODIESEL DE ALGODÃO EM DIESEL	MASSA ESPECÍFICA DE MISTURAS DE BIODIESEL DE SOJA EM DIESEL	MASSA ESPECÍFICA DE MISTURAS DE BIODIESEL DE ALGODÃO EM DIESEL
7	30	3,858	3,8875	0,851	0,842
8	35	3,9375	3,974	0,844	0,846
9	40	3,998	4,017	0,851	0,852
10	50	4,255	4,128	0,852	0,858
11	60	4,2555	4,308	0,865	0,863
12	70	4,391	4,463	0,867	0,867
13	80	4,533	4,6655	0,876	0,875
14	90	4,6865	4,8505	0,887	0,883
15	100	4,8655	5,046	0,898	0,885

As medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro UV-Vis – Quimis modelo Q798FIL com LED (*light emitting diode*) com cubetas de quartzo e caminho ótico de 1 cm. Os espectros de fluorescência das amostras foram obtidas excitando as amostras com LED centrado em 400 nm, e a emissão captada no intervalo de 350 nm a 1.000 nm com um incremento de 1 nm (651 comprimentos de onda de emissão). Os espectros foram organizados em uma matriz geral de 15 × 651 (amostras contra comprimentos de onda de emissão), centrados na média e depois analisados por PLS.

2.6.2.4 Calibrações multivariadas

Neste estudo foram desenvolvidos três modelos de regressão: um para determinar a concentração de biodiesel em misturas com diesel, outro para determinar a massa específica e outro para estimar a viscosidade de misturas de biodiesel em diesel. Cada modelo de calibração multivariada foi desenvolvido por regressão PLS utilizando a região previamente estabelecida por PCA. Os modelos de calibração foram construídos usando o *software* Unscrambler® 10.0.1. As matrizes gerais (15 × 651) foram utilizadas para construir os modelos matemáticos por PLS pela adição de uma coluna correspondente a cada propriedade de interesse (concentração, massa específica ou viscosidade). Cada modelo PLS foi construído e calibrado utilizando os dados dos espectros de fluorescência centrados na média como variáveis

independentes e a medida dos valores da propriedade de interesse (concentração, massa específica ou viscosidade) como variáveis dependentes. Na validação do modelo os dados espectrais foram utilizados para prever os valores da concentração, viscosidade e massa específica das correspondentes misturas de biodiesel de soja em diesel ou de biodiesel de algodão em diesel (Tabela 2.8).

2.6.2.5 Resultados e discussão

O PCA construído usando como variáveis todo o espectro de fluorescência das misturas de biodiesel de soja em diesel mostrou que dois componentes principais (PC1 e PC2) foram responsáveis por capturar 99,8% da variância (Figura 2.20). Para as misturas de biodiesel de algodão em diesel, também construído com todo o espectro de fluorescência, mostraram que PC1 e PC2 foram responsáveis pela captura de 99,9% da variância (Figura 2.21).

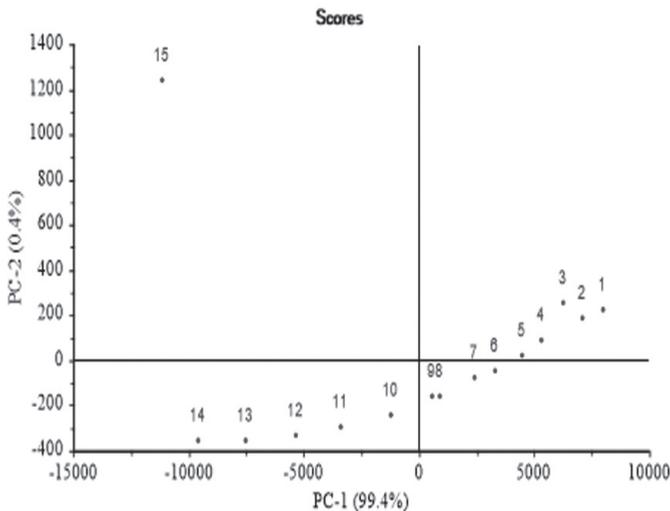


Figura 2.20 Scores PC1 × PC2 de misturas de biodiesel de soja em diesel.

Inicialmente, cada modelo PLS foi construído com todos os dados e foram avaliadas a seguir, a fim de detectar amostras anômalas. Em seguida,

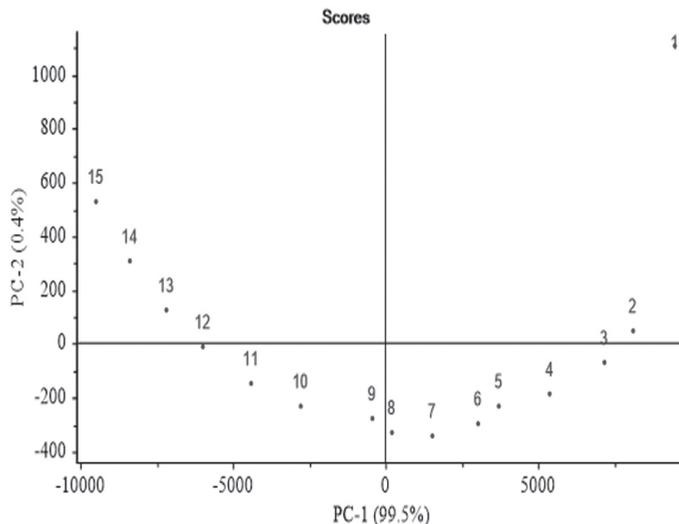


Figura 2.21 Escores PC1 × PC2 de misturas de biodiesel de algodão em diesel.

os modelos foram reconstruídos com o conjunto restante das amostras. A amostra 7, com 30% de biodiesel de soja em diesel, foi detectada como anômala e removida do conjunto de dados no desenvolvimento dos modelos PLS para a determinação da concentração, massa específica, viscosidade de misturas de biodiesel de soja em diesel (figuras 22 a 24). Do mesmo modo, a amostra 15, com 100% de biodiesel de algodão em diesel, foi detectada como anômala e removida do conjunto de dados no desenvolvimento do modelo PLS para determinar a concentração, massa específica e viscosidade de misturas de algodão de biodiesel a diesel (figuras 25 a 27).

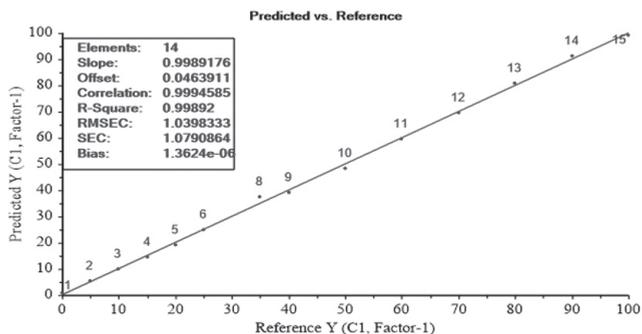


Figura 2.22 Modelo PLS para determinação da concentração de misturas de biodiesel de soja em diesel.

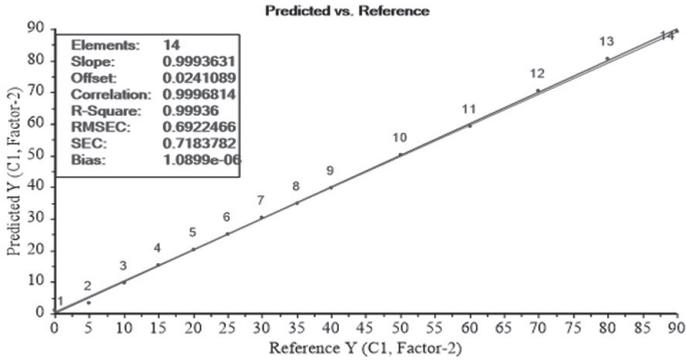


Figura 2.23 Modelo PLS para determinação da concentração de misturas de biodiesel de algodão em diesel.

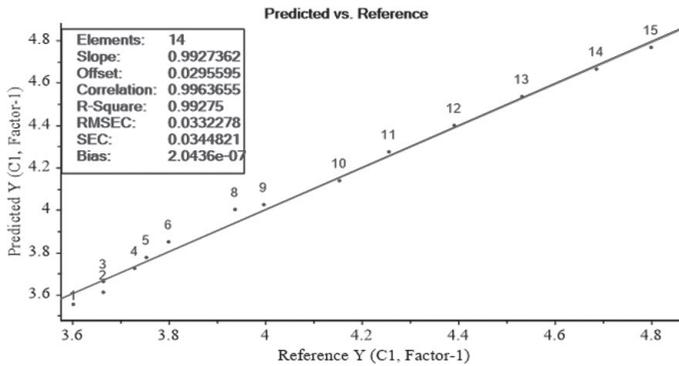


Figura 2.24 Modelo PLS para determinação da viscosidade a 25 °C de misturas de biodiesel de soja em diesel.

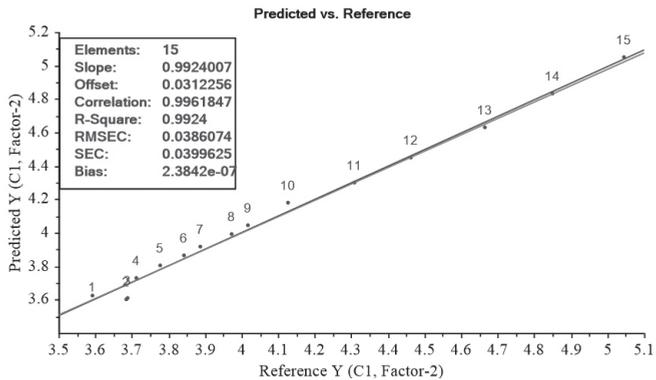


Figura 2.25 Modelo PLS para determinação da viscosidade a 25 °C de misturas de biodiesel de algodão em diesel.

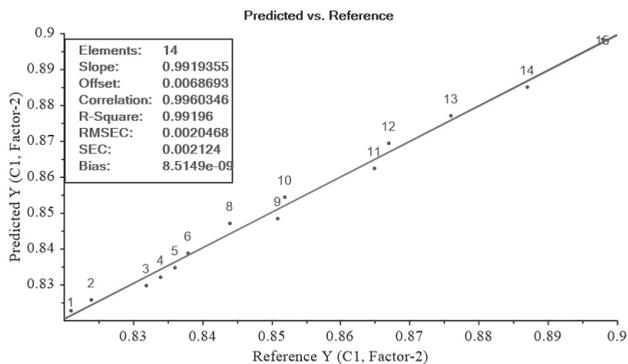


Figura 2.26 Modelo PLS para determinação da massa específica a 25 °C de misturas de biodiesel de soja em diesel.

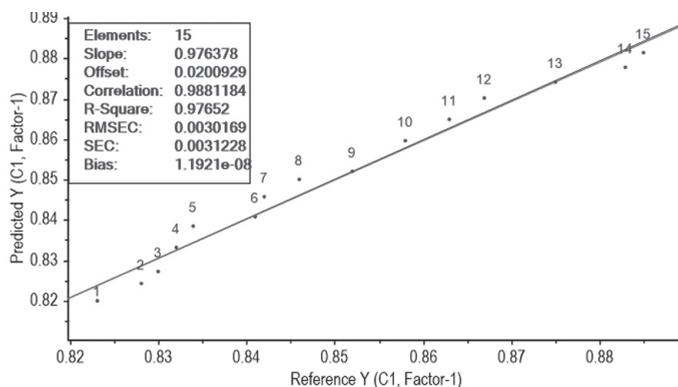


Figura 2.27 Modelo PLS para determinação massa específica a 25 °C de misturas de biodiesel de algodão em diesel.

Os modelos de calibração foram examinados a partir dos valores do coeficiente de determinação (R^2), que é definido como a percentagem de variabilidade em Y que pode ser atribuída à variabilidade em X, indicando a precisão do modelo para prever respostas a novas observações. Para misturas de biodiesel de soja e algodão em diesel, os modelos mostraram-se eficazes para prever mudanças na concentração com base em variações espectrais de fluorescência. Os valores de R^2 de 0,99892 e 0,99936 para as misturas de biodiesel de soja em diesel e biodiesel de algodão em diesel, respectivamente, demonstraram a eficácia dos modelos para prever as concentrações (figuras 2.22 e 2.23).

Os modelos de calibração multivariada (PLS) para determinação da viscosidade de misturas de biodiesel de soja em diesel e misturas de biodiesel

de algodão em diesel foram desenvolvidos usando os dados de fluorescência como as variáveis independentes para cada mistura de biodiesel e os valores de viscosidade como as variáveis dependentes (Tabela 2.8). As figuras 2.24 e 2.25 mostram que os respectivos modelos PLS foram eficazes, tendo em vista os valores de R^2 de 0,99275 e 0,9924 para as misturas de biodiesel de soja em diesel e biodiesel de algodão em diesel, respectivamente.

Modelos de calibração multivariada para a massa específica foram também desenvolvidos para as misturas de biodiesel de soja em diesel e misturas de biodiesel de algodão em diesel usando fluorescência como as variáveis independentes para cada tipo de biodiesel e os valores de massa específica como as variáveis dependentes (Tabela 2.8). As figuras 2.26 e 2.27 apresentam os modelos PLS para determinação da massa específica de misturas de biodiesel de soja em diesel ($R^2 = 0,99196$) e misturas de biodiesel de algodão ($R^2 = 0,97652$) em diesel, respectivamente. Os valores de R^2 próximos de 1 indicou a capacidade dos modelos PLS para prever com precisão a massa específica destas misturas.

2.7 POSSIBILIDADES INDUSTRIAIS

O método proposto tem as vantagens de permitir o monitoramento remoto *in loco* e em tempo real das alterações de tipo e composição de um processo de substâncias puras ou em formulações, por exemplo, a obtenção de combustíveis de um modo rápido, não destrutivo e não intrusivo. Tem ainda a vantagem competitiva de o custo analítico ser inferior ao de outras técnicas tradicionais e poder ser aplicado para identificação e determinação de propriedades físicas e químicas em substâncias puras, isoladas de produtos naturais ou sintetizadas em laboratórios, ou presentes em formulações, tais como em medicamentos ou em drogas ilícitas. Também pode ser aplicado para confirmar a identidade de substâncias utilizadas como matéria-prima na produção de biodieseis, alimentos e fármacos, assim como monitorar o respectivo processo de obtenção de substâncias e suas formulações como, por exemplo, biocombustível ou identidade de um fármaco ou de uma droga ilícita. Tem ainda a vantagem de dispensar as etapas de preparação da amostra quando medido *in situ*.

A tecnologia baseia-se em diversas patentes, e a empresa QUIMIS já está comercializando o primeiro equipamento de uma linha. Este é mais versátil e foca laboratórios de análises (QUIMIS, 2013). Estão em desenvolvimento protótipos para análises on-line e em tempo real, que devem chegar ao mercado nos próximos anos.

2.8 CONCLUSÕES

Faz parte da rotina nos laboratórios de pesquisa de produtos naturais, de síntese e na indústria farmacêutica o uso de técnicas espectroscópicas diversas para a elucidação estrutural de substâncias isoladas de produtos naturais ou resultantes de sínteses. A realização de todas as técnicas necessárias para elucidação estrutural de uma única substância resulta geralmente em consumo de tempo dos equipamentos, bem como do especialista para a interpretação dos espectros. Tratando-se de substâncias desconhecidas é imprescindível, para a determinação de suas estruturas, a utilização de técnicas espectroscópicas avançadas e a análise integrada dos vários tipos de espectros obtidos. Entretanto, a condição mais constante é o isolamento de substâncias com estruturas já conhecidas, mas, ainda assim, na maioria dos casos, a confirmação das estruturas é feita utilizando várias técnicas sofisticadas, resultando em gastos desnecessários de tempo e elevação dos custos.

Com o método proposto para a identificação e quantificação de substâncias, sejam elas puras sejam em formulações, pode-se ganhar tempo e economizar recursos financeiros, devido ao uso de técnicas mais simples e de menor custo, tais como, espectrofluorimetria e espectroscopia no UV-Vis associadas às técnicas quimiométricas.

2.9 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos dados obtidos pelo método proposto, é possível a construção de equipamentos dedicados a análises específicas e de baixo custo para determinação de qualidade de outras propriedades de interesse em misturas das indústrias farmacêutica, alimentícia e de combustíveis. Outros óleos derivados de plantas ou do petróleo, como gasolina automotiva, querosene de aviação, óleo combustível, óleo lubrificante e óleos isolantes de transformadores, que são naturalmente fluorescentes, fármaco ou ainda pode ser usado pelos órgãos reguladores para certificar se determinado medicamento vendido não está adulterado. Outra possibilidade é o uso deste método para determinar propriedades de óleos vegetais para serem construídos para identificar drogas ilícitas ou suas adulterações, como por exemplo, do azeite de oliva extra-virgem em substâncias usadas em *dopping*.

REFERÊNCIAS

1. Hostettmann K, Marston A. The search for new drugs from higher plants. *Chimia*. 2007;61(6):322-6.
2. Quintella CM, Meira M, Araújo EMP, David JP, inventores. Método de identificação de substâncias, puras ou em formulações, através de análise espectral e quimiometria. Patente brasileira, protocolo número 011100001121, 2010.
3. Meira M, Quintella CM, Ferrer TM, Silva, HRG, Guimarães AK, Santos MA, Costa Neto PR, Pepe IM. Identificação de adulteração de biocombustível por adição de óleo residual ao diesel por espectrofluorimetria total 3D e análise das componentes principais. *Química Nova*. 2011;34(4):621-4.
4. Araújo EMP. Técnicas espectroscópicas e quimiométricas como ferramentas na confirmação da estrutura de substâncias isoladas de produtos naturais ou obtidas por síntese [Tese]. Salvador: Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química; 2011.
5. Meira M, Quintella CM, Tanajura AD, da Silva HRG, Fernando JDS, Neto PRD, et al. Determination of the oxidation stability of biodiesel and oils by spectrofluorimetry and multivariate calibration. *Talanta*. 2011 Jul 15;85(1):430-4.
6. Meira M, Quintella CM, Pepe IM, Neto PRD, Tanajura AD, da Silva HRG. Prediction of properties of biodiesel-diesel blends using spectrofluorimetry and multivariate calibration. *Central European Journal of Chemistry*. 2012 Aug;10(4):1328-37.
7. Quintella CM, Meira M, Guimarães AK, Tanajura AS, Silva HRG. Prospecção tecnológica como uma ferramenta aplicada em ciência e tecnologia para se chegar à inovação. *Revista Virtual de Química*. 2011;3:406-15.
8. Quintella CM, Teixeira LSG, Korn MGA, Costa Neto PR, Torres EA, Castro MP, Jesus CAC. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. *Química Nova*. 2009; 32:793-808.
9. Jesus CAC, Korn MGA, Torres, EA, Quintella CM. Prospecção Tecnológica de Biodiesel. *Cadernos de Prospecção*. 2009; 2:21-5.
10. Sola MCR, Quintella CM. Desenvolvimento biotecnológico no âmbito da renorbio rede nordeste de biotecnologia. *Cadernos de Prospecção*. 2011;4:50-6.
11. Quintella CM, Costa Neto PR, Cruz RS, Almeida Neto JA, Miyazaki SF, Castro MP. Prospecção Tecnológica do Biodiesel no Estado da Bahia: Panorama Atual e Perspectivas na Geração e Apropriação de Conhecimento. *Bahia Análise & Dados*. 2009;18:581-91.
12. Tomazzoni G, Quintella CM, Pepe IM, Meira M, Okamura LA, Costa Neto PR. Prospecção do uso de clorofila como parâmetro de diferenciação da adição de óleo vegetal ao diesel em vez de biodiesel. *Cadernos de Prospecção*. 2013;6:199-207.
13. Luna S, Meira M, Quintella CM. Prospecção tecnológica de patentes para determinação de métodos utilizados para análise de matéria-prima na produção de biodiesel. *Cadernos de Prospecção*. 2012;5:159-67.

14. Tanajura AS, Meira M, Ribeiro EMO, Gonçalves HR, Quintella CM. Prospecção tecnológica de patentes relacionadas à avaliação da qualidade de óleos por técnicas de fluorescência. *Cadernos de Prospecção*. 2012;5:115-20.
15. Tanajura, AS, Meira M, Ribeiro EMO, Gonçalves HR, Quintella CM. Prospecção tecnológica sobre métodos para determinação da oxidação de óleos e biocombustíveis com ênfase em métodos óticos. *Cadernos de Prospecção*. 2012;5:141-51.
16. Ribeiro EMO, Quintella CM, Luna S, Braga JLS, Cerqueira GS. Prospecção tecnológica sobre processo de transesterificação com ênfase na produção de biodiesel. *Cadernos de Prospecção*. 2012;5:53-62.
17. Correa GA, Steven GJ, James BA, inventors. Conoco Inc, assignee. Method and apparatus for underwater detection of hydrocarbons. Patent PH17146, 1980 Dec 15; United States patent US 4434364, 1984 Feb 28.
18. Devial RM, Taylor PM, inventors. Bailey Meters Controls Ltd, assignee. Oil pollution monitoring and monitoring unit. United States patent US 4057721, 1977 Nov 08.
19. Wang HY, Hui QS, Xu LX, Jiang JG, Sun Y. Fluorimetric determination of dopamine in pharmaceutical products and urine using ethylene diamine as the fluorogenic reagent. *Analytica Chimica Acta*. 2003 Nov 14;497(1-2):93-9.
20. Changchuan G, Lang A, Wang L, Jiang W. The co-luminescence effect of a europium (III)-lanthanum (III)-gatifloxacin-sodium dodecylbenzene sulfonate system and its application for the determination of trace amount of europium (III). *Journal of Luminescence*. 2010;130:591-7.
21. Sahiner N, Singh M. In situ micro/nano-hydrogel synthesis from acrylamide derivatives with lecithin organogel system. *Polymer*. 2007 May 4;48(10):2827-34.
22. Januszkiewicz KR, Berkmesian G, Sulek HH. UV-fluorescence spectroscopic method for monitoring tramp oil contamination in hot rolling emulsions. II: Application of fluorescent tracers. *Annual meeting Lubrication Engineering*. 1992;48:56-61.
23. Xu H, Liu QW. Spectroscopy characterization of anthracene in SDS/BA/H₂O system. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2008 Jul;70(2):243-6.
24. Bages S, Descales B, Lambert D, Liinas J, Martens A, Osta S, Sanchez M, inventors. Bp Chem Int Ltd; Bp Oil Int, assignees. Property determination. Patent ZA9508457, 1997 Apr 07.
25. Clark D, Crockett MI, Dicesare JL, Mccaffrey JT, inventors. Neogen Corp, assignee. Apparatus and methods for chemiluminescent assays. United States patent US 2003186458, 2003.
26. Vinjamoori DV, inventor. Monsanto Technology Llc, assignee. Methods for determining oils in seeds. Patent MX PA02003063, 2002.

27. Alvarez JG, Modell M, inventors. Beth Israel Deaconess Medical Center, assignee. Method for determining a level of oxidative stress of a tissue sample. United States patent US 5912179, 1998 Jan 26.
28. Quintella CM, Guimarães AK, Musse APS, inventores. Método para monitorar qualidade em processos de obtenção de combustíveis e dispositivo sensor para sua operação. Patente BR 0900078, 2009; patente WO 2010BR00016, 2009.
29. Quintella CM, Meira M, Costa Neto PR, Gonçalves HR, Tanajura AS, inventores. Método para prever propriedades químicas e físico-químicas de óleos através de análise multivariada associada com espectrofluorimetria. Patente brasileira BR 11100001114, 2010.
30. Ito JA. Técnicas espectroscópicas em Biofísica. Caderno de Física da UEFS. 2004; 03:21-9.
31. Vogel AI. Análise Química Quantitativa. 6a ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos; 2002.
32. Feng SL, Wang J, Chen XG, Fan J. Kinetic spectrofluorimetric determination of trace ascorbic acid based on its inhibition on the oxidation of pyronine Y by nitrite. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2005 Mar;61(5):841-4.
33. Song Z, Zhang N. In vitro detecting ultra-trace novalgine in medicine and human urine by chemiluminescence. *Talanta*. 2003 May 28;60(1):161-70.
34. Chen GY, Schneider MJ, Darwish AM, Lehotay SJ, Freeman DW. Europium-sensitized luminescence determination of oxytetracycline in catfish muscle. *Talanta*. 2004 Sep 8;64(1):252-7.
35. Schneider MJ. Rapid fluorescence screening assay for enrofloxacin and tetracyclines in chicken muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004 Dec 29;52(26):7809-13.
36. Sotomayor MDPT, Dias ILT, Lanza MRV, Moreira AB, Kubota LT. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Química Nova*. 2008;31:1755-74.
37. Soper SA, McGown LB, Warner IM. Molecular fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence spectrometry. *Anal Chem*. 1994;66: 428R-444R.
38. Murata Y, Matsui H, Hirano KI, Kondo Y, Yanaka A, Nakahara A, Tanaka N, Muto H. Autofluorescence in indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. *J. Gastroenterology*. 2000;35: 510-7.
39. Arancibia JA, Escandar GM. Two different strategies for the fluorimetric determination of piroxicam in serum. *Talanta*. 2003 Aug 29;60(6):1113-21.
40. Pérez-Ruiz T, Martínez-Lozano C, Tomás V, Martín J. Flow injection determination of vitamin K3 by a photoinduced chemiluminescent reaction. *Analyst*. 1999;124:197-201.

41. Pérez-Ruiz T, Martínez-Lozano C, Tomas V, Fenol J. Fluorimetric determination of total ascorbic acid by a stopped-flow mixing technique. *Analyst*. 2001 Aug;126(8):1436-9.
42. Al-Ghannam SM, El-Brashy AM, Al-Farhan BS. Fluorimetric determination of some thiol compounds in their dosage forms. *Farmaco*. 2002 Aug;57(8):625-9.
43. Suarez-Rodriguez JL, Diaz-Garcia ME. Fluorescent competitive flow-through assay for chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. *Biosensors & Bioelectronics*. 2001 Dec;16(9-12):955-61.
44. Ramesh KC, Gowda BG, Seetharamappa J, Keshavayya J. Indirect spectrofluorimetric determination of piroxicam and propranolol hydrochloride in bulk and pharmaceutical preparations. *Journal of Analytical Chemistry*. 2003 Oct;58(10):933-6.
45. Quimis [Cited 2016 Dec 4]. Available from: <http://www.quimis.com.br/produtos.php?cat=4&sub=19&prod=319>.
46. Quintella CM, Meira M, Silva HRG Silva, Guimarães AK, Ferrer TM, Santos MA, Luna S, Cid ALD, Simões Jr LC, Tanajura AS, Filardi VL, Silva CET, Pepe IM, inventores. Protótipo de fluorímetro de LED associado a um software estatístico embarcado para classificação de amostras e predição de propriedades químicas e físico-químicas. Patente brasileira PI 011110000662, 2011.
47. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Princípios de análise instrumental*. 5a ed. Porto Alegre: Bookman; 2002. 1024p.
48. Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 7a ed. Rio de Janeiro: Editora LTC; 2006.
49. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. *Introdução à espectroscopia*. 1a ed. São Paulo: Cengage Learning; 2010. 716p.
50. Vinadé MEC, Vinadé ERC. *Métodos espectroscópicos de análise quantitativa*. 1a ed. Santa Maria: UFSM; 2005. 272p.
51. Sena MM, Poppi RJ, Frighetto RTS, Valarini PJ. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análises de solos. *Química Nova*. 2000;23:547-56.
52. Ferreira MMC, Antunes AM, Melgo MS, Volpe PLO. *Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial*. *Química Nova*. 1999;22:724-31.
53. Ferreira EC, Rodrigues SHBG, Ferreira MMC, Nóbrega JA, Nogueira ARA. Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva. *Eclética Química*. 2002;27:77-90.
54. Ferreira SLC, Bruns RE, da Silva EGP, dos Santos WNL, Quintella CM, David JM, et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*. 2007 Jul 27;1158(1-2):2-14.
55. Barros Neto B, Scarminio IS, Bruns RE. 25 anos de Quimiometria no Brasil. *Química Nova*. 2006;29:1401-6.

56. Samistraro G, Muniz GIB, Peralta-Zamora P, Cordeiro GA. Previsão das Propriedades Físicas do Papel Kraft por Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais. *Química Nova*. 2009;32:1422-5.
57. Forina M, Lanteri S, Casale M. Multivariate calibration. *Journal of Chromatography A*. 2007;1158:61-93.
58. Ferreira SLC, dos Santos WNL, Quintella CM, Neto BB, Bosque-Sendra JA. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry – Review. *Talanta*. 2004 Jul 8;63(4):1061-7.
59. Pimentel MF, Galvão RKH, Araújo MCU. Recomendações para calibração em Química Analítica parte 2: calibração multianálito. *Química Nova*. 2008;31:462-7.
60. Meira M, Quintella CM, Ribeiro EMO, Guimarães AK, Santos MA, Cerqueira GS, Cid ALD, Luna S, Silva WL. Prediction of Concentration of Animal Fat in Mixture with Vegetable Oil by Multivariate Calibration Associated with Spectrofluorimetry. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2013;4:99-103.
61. Smith AFM, Verdinelli I. Uma nota sobre Designs Bayes para Inferência utilizando um modelo hierárquico linear. *Biometrika*. 1980;67:613-9.
62. Quintella CM, Meira M, Santos MA, Luna S, Silva WL, Monte MO, Diógenes Filho RG, Araújo ALC, Silva Junior ET, Guimarães GF, inventores. Aparelho e Método para Determinação de Acetileno em Óleos por Calibração Multivariada. Patente brasileira BRPI1020120335239, 2012.
63. Castro MTPO, Bahia UF, Quintella CM, Teixeira AP, Oliveira EBS, Pepe IM, inventores. Método Para Monitorar Degradação Estrutural e Falhas em Materiais e Dispositivo Sensor. Patente WO 2011088539 A1, 2010.
64. Panero FS, da Silva HEB. Application of exploratory data analysis for the characterization of tubular wells of the North of Brazil. *Microchemical Journal*. 2008 Apr;88(2):194-200.
65. Beebe KR, Pell RJ, Seasholtz MB. *Chemometrics: a practical guide*. 1a ed. New York: John Wiley & Sons; 1997.
66. Correia PRM, Ferreira MMC. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Química Nova*. 2007;30:481-7.
67. Booksh KE, Kowalski B. Theory of analytical chemistry. *Analytical Chemistry*. 1994;66:782A-91A.
68. Barros Neto B, Pimentel MF, Araújo MCU. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Química Nova*. 2002;25:856-65.
69. Saldanha TCB, Araújo MC, Barros Neto B. Simultaneous multicomponent analysis by UV-Vis spectrophotometry. *Química Nova*. 1999;22:847-53.

70. Araújo MCU, Saldanha TCB, Galvao RKH, Yoneyama T, Chame HC, Visani V. The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2001;57:65-73.
71. Quintella CM, Pepe IM, Meira M, Gonçalves HR, Guimarães AK, Ferrer TM, Santos MA, Costa Neto PR, inventores. Método de identificação de amostras de óleos através de análise espectral e quimiometria. Patente PI221106730261, 2011.
72. Quintella CM, Meira M, Silva WL, Filho RGD, Araujo ALC, Junior ETS, et al. Development of a spectrofluorimetry-based device for determining the acetylene content in the oils of power transformers. *Talanta*. 2013 Dec 15;117:263-7.
73. Quintella CM, Meira M, Santos MA, Luna S, Silva WL, Monte MO, Diógenes Filho RG, Araújo ALC, Silva Junior ET, Guimarães GF, inventores. Dispositivo Sensor e Processo para Determinar a Soma das Concentrações dos Gases Combustíveis em Óleos Isolantes. Patente brasileira BRPI1020120335271, 2012.
74. Quintella CM, Meira M, Santos MA, Luna S, Silva WL, Monte MO, Diógenes Filho RG, Araújo ALC, Silva Junior ET, Guimarães GF, inventores. Método e Aparelho para Avaliar a Degradação de Papel Isolante em Transformadores de Potência. Patente brasileira BRPI1020120335247, 2012.
75. Gonçalves HR, Cid ALD, Tanajura AS, Miyazaki SF, Meira M, Quintella CM. Prospecção tecnológica de patentes para determinação de massa específica e viscosidade de óleos, biocombustíveis e combustíveis por métodos óticos. *Cadernos de Prospecção*. 2011;4:12-22.
76. Tomazzoni G, Meira M, Quintella CM, Zagonel GF, Costa BJ, Oliveira PR, Pepe IM, Costa Neto PR. Identification of vegetable oil or biodiesel added to diesel using fluorescence spectroscopy and principal component analysis. *Journal of the American Oil Chemistry Society*. 2014;91:215-27.
77. Costa Neto PR, Tomazzoni G, Quintella CM, Fontana JD, Pepe IM, inventores. Método para Determinação da Adulteração de Óleo Diesel por Óleos Vegetais in Natura e Alternativamente Óleos Vegetais Residuais. Patente brasileira BR 1020120320215, 2012.

