



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS**

**Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas (UnUCET)**

**MESTRADO EM CIÊNCIAS MOLECULARES**

## ***Dissertação de Mestrado***

**Determinação Direta de *trans*-Resveratrol em  
Plasma Humano usando Espectrofluorimetria  
e Adição-Padrão de Segunda Ordem**

**CRISTINA DONIZETI BERNARDES**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Martins de Sena**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi (IQ/Unicamp)**

***Anápolis***  
***Outubro de 2009***

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA  
PELA BIBLIOTECA DA UnUCET**

Catálogo na Fonte  
Biblioteca UnUCET – UEG  
Helenir Freire Batista Machado – CRB 1704

611.018.54

B 518 d Bernardes, Cristina Donizeti

Determinação direta de *Trans*- Resveratrol em plasma humano usando Espectrofluorimetria e adição-padrão de segunda ordem. / Cristina Donizeti Bernardes - Anápolis: Universidade Estadual de Goiás- Mestrado em Ciências Moleculares, 2009

72 p. ; 31 cm. – Monografia / Universidade Estadual de Goiás, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas – Mestrado Ciências Moleculares, 2009.

I. Bernardes, Cristina Donizeti

II. Título

III. Dissertação

1. *Trans*- Resveratrol .

2. Quimiometria.

3. Parafac.

DETERMINAÇÃO DIRETA DE *TRANS*-RESVERATROL EM PLASMA HUMANO  
USANDO ESPECTROFLUORIMETRIA E ADIÇÃO-PADRÃO DE SEGUNDA ORDEM

**CRISTINA DONIZETI BERNARDES**

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Mestrado em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada por:

---

Prof. Dr. Marcelo Martins de Sena

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Caridad Noda Pérez

---

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

ANÁPOLIS, GO-BRASIL  
OUTUBRO 2009

*“O que não se sabe é o mais importante na ciência”.*

Philip Hanawalt

*Aos meus pais, José e Maria:*

*Apesar de não estarem mais aqui,  
tenho certeza de que estão muito orgulhosos  
por mais essa minha conquista.  
Obrigada pelo amor que me dedicaram.  
Pela educação e pelos princípios que me transmitiram.*

*“O amor só é lindo, quando encontramos alguém que nos transforme no melhor que podemos ser”.*

*Mário Quintana*

*Marcelo,*

*Obrigada por estar ao meu lado  
em todos os momentos:  
nos bons, nos ruins,  
nas conquistas, nas dificuldades,  
nas aflições e nas alegrias.  
Que esses anos já compartilhados possam  
se multiplicar e multiplicar...  
Que sejamos ainda muito mais felizes...  
Obrigada por me tornar uma pessoa melhor...  
Obrigada por tudo!  
Te amo!*

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Marcelo Martins de Sena, pelo profissionalismo e pelos muitos conhecimentos transmitidos.
- Ao Prof. Ronei Jesus Poppi, pela grande oportunidade que me foi dada de estar em um dos mais importantes grupos de Quimiometria do país e pelo conhecimento transmitido.
- À Universidade Estadual de Goiás, pela oportunidade de formação.
- À Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Instituto de Química, por fornecer toda a estrutura física, tecnológica e humana necessárias para a realização deste trabalho.
- A todos os professores do Mestrado em Ciências Moleculares pelo conhecimento transmitido, pela competência e obstinação na construção do primeiro curso de mestrado *stricto sensu* da Universidade Estadual de Goiás.
- A todos os professores que participaram das bancas de qualificação e defesa dessa dissertação, em especial ao Prof. Dr. Jez W. B. Braga pelas muitas contribuições dadas.
- À Mariana da Silva Godinho, pela amizade, pelo incentivo e pelas longas horas de estudo durante as disciplinas de Quântica Avançada e Termodinâmica Avançada.
- À Patrícia Valderrama, pelos conhecimentos transmitidos e, principalmente, pela amizade.
- Aos colegas do Mestrado em Ciências Moleculares Marcos dos Reis Vargas e Antônio Sérgio Nakao, pela amizade e conhecimentos transmitidos. À Bruna Oliveira e Júlio Cezar Vieira Viana, pelos bons momentos compartilhados.
- Aos colegas do Laboratório de Quimiometria em Química Analítica (LAQQA) da Unicamp pelo ótimo ambiente de trabalho e pela boa convivência: Danilo, Júlio, Laura, Luiz, Paulo Henrique, Werickson, Patrícia, Marcos, Renato, Marcello, Adriano e Guilherme.
- À Cláudia Martelli, técnica do laboratório de Espectroscopia UV-Vis do Instituto de Química da Unicamp, pelo auxílio durante as medidas espectrofluorimétricas e pelos conhecimentos sobre fluorescência que me foram passados.
- Ao Hemocentro da Unicamp, pelo fornecimento das amostras de plasma humano.

- Ao Marcius P. de Castro, da Pharmanostra, pelo fornecimento do padrão do *trans-resveratrol*
- Ao Projeto CAPES/PROCAD - 1516/2007 pelo financiamento de minha estadia na Unicamp durante a parte experimental desse trabalho.
- Aos meus ex-alunos do Colégio Scala (Caconde-SP), da Escola Estadual Bruno Pieroni (Sertãozinho-SP), do Colégio Estadual Rui Brasil (Goiânia-GO), do Colégio Estadual José Honorato (Goiânia-GO) e do Colégio Estadual Juscelino Kubstichek (Goiânia-GO) pela oportunidade de aprendizado, pelo carinho, pela ótima convivência e por sempre torcerem por mim.
- Ao Prof. Miguel Luiz da Silveira por ter me incentivado a cursar Licenciatura em Química e por todos os conhecimentos transmitidos.
- A todos os meus amigos e amigas que, apesar da distância, torceram por mim, me apoiaram e me incentivaram durante esse mestrado, em especial à Ana Dalva, Maria Sílvia, Mona Line, Maria do Rosário e Sara.
- Aos meus irmãos e irmãs: Inácia, Lázaro, José Francisco (*in memoriam*), Lia, Donizetti, Valdecir, Claudete (*in memoriam*) e Ivonete. Às minhas sobrinhas e sobrinhos: Edna, Sandra, Reginaldo, Cíntia, Eliza, Denis, Jaqueline, Rosana (*in memoriam*), Glécia e Luciana. Aos meus sobrinhos de segundo grau: Maria Luiza e João Francisco. À minha cunhada e madrinha Neuza. Ao meu padrinho Daniel. A todos os meus tios, tias, primos e primas. Obrigada a todos pela torcida. "*Apenas em torno de uma mulher que ama se pode formar uma família.*" (Friedrich Von Schelegel)
- Ao meu sogro, Leonídio, pelo carinho.
- A todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desse trabalho, meu muito obrigada.



# CURRICULUM VITAE

## 1. Dados Pessoais:

Nome: Cristina Donizeti Bernardes  
Nascimento: 20/11/1980, Guaranésia/MG, Brasil  
e-mail: cristinadbernardes@yahoo.com.br

## 2. Formação Acadêmica:

Graduação em Licenciatura em Ciências, Habilitação em Química.  
Centro Universitário da Fundação Educacional Guaxupé, UNIFEG, Guaxupé,  
2002.

## 3. Atuação Profissional:

### 3.1. Secretaria de Estado da Educação de Goiás - SEE GO

Professora Concursada na área de Química.  
Período: Janeiro de 2007 a Julho de 2008.  
Nível: Ensino Médio. Carga horária: 30 h semanais.  
Locais: Colégio Estadual Rui Brasil, Goiânia/GO.  
Colégio Estadual Juscelino Kubitschek de Oliveira, Goiânia/GO.  
Colégio Estadual José Honorato, Goiânia, GO.

### 3.2. Secretaria de Estado da Educação de São Paulo - SEE SP

Professora Concursada na área de Química.  
Período: Agosto de 2004 a Julho de 2006.  
Nível: Ensino Médio. Carga horária: 40 h semanais  
Local: Escola Estadual Professor Bruno Pieroni, Sertãozinho/SP.

### 3.3. Sociedade Cacondense Entre Amigos das Letras, das Artes e das Ciências, LTDA.

Professora Celetista. Área de Química.  
Período: Janeiro de 2003 a Julho de 2004.  
Nível: Ensino Fundamental. Carga horária: 08 h semanais  
Local: Colégio SCALA, Sistema Anglo de Ensino, Caconde/SP.

## 4. Trabalhos em Eventos Nacionais

4.1. Bernardes, C.D., Poppi, R.J., Sena, M.M. *Determinação Direta de trans-Resveratrol em Plasma Humano usando Espectrofluorimetria e Adição-Padrão de Segunda Ordem*. 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza, CE.

4.2. Bernardes, C.D., Poppi, R.J., Sena, M.M. *Estimativa do pKa do trans-Resveratrol usando Espectrofluorimetria e PARAFAC*. 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador, BA.

## RESUMO

Título: DETERMINAÇÃO DIRETA DE *TRANS*-RESVERATROL EM PLASMA HUMANO USANDO ESPECTROFLUORIMETRIA E ADIÇÃO-PADRÃO DE SEGUNDA ORDEM

Autora: Cristina Donizeti Bernardes

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Martins de Sena

Co-Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi (IQ/Unicamp)

O *trans*-resveratrol é um antioxidante presente, principalmente, em uvas tintas e seus derivados. Muitos estudos têm associado a sua ingestão à redução de doenças cardiovasculares, colesterol LDL e câncer. Com isso surgiu o interesse em determiná-lo em plasma. Este trabalho desenvolveu um novo método espectrofluorimétrico para a determinação direta de *trans*-resveratrol em plasma sanguíneo humano usando a vantagem de segunda ordem, a qual permite determinar um analito na presença de interferentes desconhecidos e é propiciada pelo método quimiométrico análise de fatores paralelos (PARAFAC). Para cada medida foram obtidas superfícies espectrais nas faixas de comprimento de onda de excitação de 280 a 360 nm e de emissão de 380 a 550 nm. A estratégia adotada neste trabalho combinou o uso do PARAFAC, para a extração do sinal analítico puro, com o método da adição-padrão, para a determinação na presença de um forte efeito de matriz causado pela interação do analito com as proteínas presentes no plasma. As amostras de plasma foram diluídas 10 vezes e para cada uma foram feitas 4 adições de uma solução-padrão de *trans*-resveratrol. Todas as determinações foram feitas com amostras em triplicata. Um modelo PARAFAC específico foi obtido para cada amostra, através de um arranjo cúbico de dados formado por 5 medidas (a amostra original mais 4 adições), 17 comprimentos de onda de excitação e 86 comprimentos de onda de emissão. Os melhores modelos foram selecionados com 4 fatores e explicaram mais de 99,90 % da variância total dos dados. Os pesos (*loadings*) obtidos foram atribuídos ao *trans*-resveratrol e a três diferentes interferentes, entre eles o triptofano. Os escores obtidos para o analito foram usados em regressões lineares e todas as curvas de adição-padrão apresentaram coeficientes de correlação de no mínimo 0,99. Foram obtidos bons resultados para a faixa de concentração de 0,10 a 5,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com o grau de recuperação variando de 95,5 % a 110,0 %. O método proposto foi ainda validado através da estimativa de figuras de mérito, tais como sensibilidade, sensibilidade analítica, seletividade, precisão, limites de detecção e quantificação.

## ABSTRACT

Title: DIRECT DETERMINATION OF TRANS-RESVERATROL IN HUMAN PLASMA BY SPECTROFLUORIMETRY AND SECOND ORDER STANDARD ADDITION

Author: Cristina Donizeti Bernardes  
Advisor: Dr. Marcelo Martins de Sena  
Co-Advisor : Dr. Ronei Jesus Poppi (IQ/Unicamp)

*Trans-resveratrol* is an antioxidant found mainly in red grapes and their derivatives. Many works have recently related its intake with the reduction of cardiovascular diseases, LDL cholesterol levels and cancer incidence. This work developed a new spectrofluorimetric method for direct determination of *trans-resveratrol* in human plasma by using the second order advantage, which allows analyte determination in the presence of unexpected interferences and is provided by parallel factor analysis (PARAFAC). For each measurement, excitation-emission matrices were obtained from 280 to 360 nm (excitation) and from 380 to 550 nm (emission). The strategy adopted in this work combined the data treatment with PARAFAC, for extracting the pure analyte signal, with the standard addition method, which permits determinations in the presence of a strong matrix effect caused by plasma analyte-protein binding. Plasma samples were diluted ten times and for each one four standard additions of *trans-resveratrol* were performed, in triplicates. A specific PARAFAC model was built for each triplicate of each sample, from three-way arrays formed by 5 measurements (samples plus 4 additions), 17 excitation wavelengths and 86 emission wavelengths. The best models were selected with four factors and accounted for more than 99.90% of the data variance. The obtained loadings were related to *trans-resveratrol* and three interferences. The scores related to the analyte were used for linear regressions and all standard addition curves presented correlation coefficients equal or largest than 0.99. Good results were obtained in the concentration range from 0.10 to 5.00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , with a recovery between 95.5 and 110.0%. The proposed method was also validated through the estimates of figures of merit, such as sensitivity, analytical sensitivity, selectivity, precision, and limits of detection and quantitation.

## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>CAPÍTULO 2. ESPECTROFLUORIMETRIA.....</b>                              | <b>5</b>  |
| 2.1. Transições Eletrônicas.....  | 6         |
| 2.2. Espectrofluorímetros.....  | 9         |
| 2.3. Intensidade de Fluorescência e Concentração.....                     | 10        |
| 2.4. Matrizes de Fluorescência de Excitação-Emissão.....                  | 12        |
| 2.5. Espalhamentos da radiação.....                                       | 13        |
| 2.6. Supressão de Fluorescência.....                                      | 15        |
| <b>CAPÍTULO 3. PARAFAC.....</b>   | <b>17</b> |
| 3.1. Ordem dos Dados Analíticos.....                                      | 17        |
| 3.2. Análise de Fatores Paralelos.....                                    | 19        |
| 3.3. Adição-Padrão de Segunda Ordem.....                                  | 23        |
| 3.4. Figuras de Mérito.....   | 26        |
| <b>CAPÍTULO 4. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>                                | <b>30</b> |
| 4.1. Reagentes, soluções e amostras de plasma humano.....                 | 30        |
| 4.2. Instrumentação e análise dos dados.....                              | 31        |
| 4.3. Procedimentos.....   | 31        |
| <b>CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                            | <b>33</b> |
| 5.1. Estimativa dos perfis de concentração do RVT em função do<br>pH..... | 33        |
| 5.2. Determinação da faixa de estudo do RVT em plasma.....                | 36        |

|  |  |           |
|--|--|-----------|
| 5.3                                    | Determinação de RVT em plasma por adição-padrão..... | 37        |
| 5.4                                    | Estimativa das Figuras de Mérito.....                | 45        |
| <b>CAPÍTULO 6. CONCLUSÃO.....</b>      |  | <b>47</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b> |  | <b>48</b> |
| <b>APÊNDICE 1.....</b>                 |  | <b>55</b> |

## LISTA DE TABELAS

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Tabela 1.</b>  | Concentração de RVT em alimentos e bebidas mais comuns à dieta humana.....   | 2  |
| <b>Tabela 2 .</b> | Número de fatores e restrições dos modelos PARAFAC analisados neste trabalho e os coeficientes de correlação médios das curvas de adição-padrão obtidas..... | 42 |
| <b>Tabela 3.</b>  | Determinação de RVT em plasma usando adição-padrão.....  | 45 |
| <b>Tabela 4.</b>  | Figuras de Mérito estimadas para o método proposto.....  | 46 |

## LISTA DE FIGURAS

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Estruturas do (a) <i>trans</i> -resveratrol e (b) <i>cis</i> -resveratrol.....   | 2  |
| <b>Figura 2.</b>  | Representação dos estados eletrônicos singlete e triplete e suas transições.....   | 6  |
| <b>Figura 3.</b>  | (a) Ponteiros de relógio confeccionados com material fosforescente. (b) Algas, bactérias e vagalume: luminescentes (bioluminescência).....                               | 7  |
| <b>Figura 4.</b>  | Diagrama de Jablonski; as flechas retas verticais indicam a emissão de um fóton de radiação e as flechas sinuosas indicam os processos não radiativos.....               | 9  |
| <b>Figura 5.</b>  | Esquema de funcionamento de um espectrofluorímetro.....  | 10 |
| <b>Figura 6.</b>  | Espectro de emissão da água deionizada mostrando os espalhamentos Raman e Rayleigh.....  | 14 |
| <b>Figura 7.</b>  | Gráfico mostrando a supressão da intensidade de fluorescência em função do aumento da concentração.....  | 15 |
| <b>Figura 8.</b>  | Representação esquemática dos diferentes tipos de dados em um sistema FIA-DAD: (a) escalar (uma única medida instrumental), (b) vetor de dados, (c) matriz de dados..... | 19 |
| <b>Figura 9.</b>  | Representação geométrica do modelo PARAFAC. Decomposição de um arranjo de dados tridimensional em F tríades de vetores peso.....   | 20 |
| <b>Figura 10.</b> | Ortogonalidade do NAS.....   | 27 |
| <b>Figura 11.</b> | Espectrofluorímetro <i>Varian Cary Eclipse</i> usado na obtenção das superfícies espectrais.....   | 31 |
| <b>Figura 12.</b> | Pesos das amostras (escores) obtidos para um modelo PARAFAC em pH 10,0.....  | 34 |
| <b>Figura 13.</b> | Espectros de excitação (a) e emissão (b) obtidos para as espécies ácida e básica do RVT, através dos pesos de um modelo PARAFAC.....                                     | 35 |
| <b>Figura 14.</b> | Distribuição das espécies ácida e básica do RVT em função do pH, obtidas através dos pesos de um modelo PARAFAC.....   | 36 |

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 15.</b> | Curva de calibração para o RVT obtida através dos pesos da primeira dimensão (escores) de um modelo PARAFAC.....   | 37 |
| <b>Figura 16.</b> | Pesos das amostras (escores) obtidos para um modelo PARAFAC com cinco diferentes amostras de plasma, dopadas com concentrações diferentes de RVT.....  | 38 |
| <b>Figura 17.</b> | Superfícies de excitação-emissão de: (a) uma amostra de plasma puro e (b) uma amostra do mesmo plasma dopada com $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RVT.....  | 39 |
| <b>Figura 18.</b> | Representação da montagem dos arranjos cúbicos de dados analisados nesta aplicação. Superfície de excitação-emissão para a amostra de plasma dopada com $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RVT..... | 41 |
| <b>Figura 19.</b> | (a) Pesos das amostras no modelo PARAFAC. Espectros de fluorescência deconvoluídos, obtidos através dos pesos do modelo PARAFAC: (b) excitação, (c) emissão.....                               | 43 |
| <b>Figura 20.</b> | Reta de adição-padrão para a amostra de plasma $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RVT.....  | 44 |

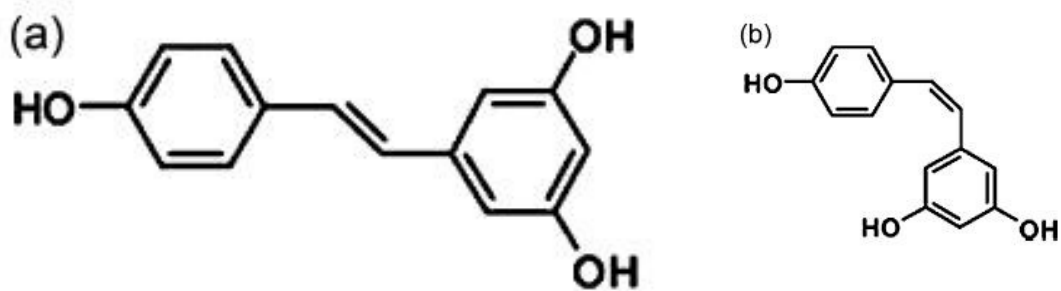


## 1. Introdução

O *trans*-resveratrol (RVT), 3,4',5 - triidroxiestilbeno, representado na Figura 1a, é um composto fitoalexino, cujas principais fontes na dieta humana são uvas tintas e seus derivados. Compostos fitoalexinos são aqueles sintetizados por algumas espécies de plantas para sua proteção, em resposta a ataques bióticos ou abióticos [1]. Além das uvas tintas, outras fontes de RVT são: amendoim, pistache, lúpulo e frutas vermelhas como a amora, o mirtilo e o arando [2], sendo que as duas últimas são raramente cultivadas no Brasil, por serem típicas de climas muito frios. As concentrações de RVT presentes nos alimentos e bebidas mais comuns à dieta humana podem ser vistas na Tabela 1 [2-4].

O RVT é um poderoso antioxidante e é sintetizado, principalmente, nas cascas das uvas, como resposta a ataques fúngicos, infecções e estresses sofridos pela videira, tais como incidência de radiação ultra-violeta (UV) e presença de metais pesados no solo [5]. Além de estar presente nas cascas das uvas, quantidades menores de RVT também são encontradas em suas folhas, sementes e polpa [6]. Além do RVT, as videiras produzem outros compostos antioxidantes importantes, tais como catequina, epicatequina, quercetina e rutina. O RVT é comercialmente extraído da planta *Polygonum cuspidatum*, utilizada na China e no Japão para tratar dermatites, gonorréia, pé-de-atleta e hiperlipemia [7].

Grande parte dos estudos sobre o resveratrol está focada no seu isômero *trans*, uma vez que a atividade fisiológica do isômero *cis*, Figura 1b, não é muito bem conhecida. Apenas sabe-se que o isômero *trans* se isomeriza em *cis* quando exposto à intensa radiação UV [8]. O *cis*-resveratrol não foi encontrado em uvas da espécie *Vitis vinifera*, mas foi detectado em vinhos produzidos com esse tipo de uva [9], pois este isômero é formado pela isomerização do *trans*-resveratrol ou pela decomposição do polímero de resveratrol durante a fermentação [10]. O isômero *trans* é termodinamicamente mais estável que o *cis*, devido à repulsão estérica existente na molécula *cis*.



**Figura 1.** Estruturas do (a) *trans*-resveratrol e (b) *cis*-resveratrol.

**Tabela 1.** Concentração de RVT em alimentos e bebidas mais comuns à dieta humana.

| Fontes de RVT na alimentação   | Concentração de RVT              |
|--------------------------------|----------------------------------|
| Uvas tintas <i>Napoleão</i>    | 0,16 – 3,54 $\mu\text{g g}^{-1}$ |
| Sucos de uvas tintas           | 0,50 $\text{mg mL}^{-1}$ (média) |
| Sucos de uvas tintas nacionais | 0,19 – 0,90 $\text{mg L}^{-1}$   |
| Sucos de uvas brancas          | 0,05 $\text{mg mL}^{-1}$ (média) |
| Vinhos tintos                  | 0,1 -14,3 $\text{mg L}^{-1}$     |
| Vinhos tintos nacionais        | 0,82 – 5,75 $\text{mg L}^{-1}$   |
| Vinhos brancos                 | < 0,1– 2,1 $\text{mg L}^{-1}$    |
| Amendoins                      | 0,02 – 1,92 $\mu\text{g g}^{-1}$ |
| Pistaches                      | 0,09 – 1,67 $\mu\text{g g}^{-1}$ |
| Lúpulo                         | 0,5 – 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$   |
| Amoras e arandos               | ~ 32 $\text{ng g}^{-1}$          |
| Mirtilos                       | ~ 16 $\text{ng g}^{-1}$          |

O RVT foi isolado pela primeira vez em 1940, das raízes de um tipo de lírio pouco conhecido no Brasil, o heléboro branco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) [11].

Nas uvas viníferas o RVT só foi descoberto em 1976, em uvas da espécie *Vitis vinifera* [1]. Estudos posteriores relataram sua ocorrência principalmente em cascas de uvas [12-15]. Porém, o RVT atraía pouco interesse até 1992, quando ele foi descoberto como sendo o principal responsável pelos efeitos cardioprotetores do vinho tinto [16]. Esses efeitos foram logo associados à menor incidência de doenças cardiovasculares e câncer na população da França, apesar de sua alimentação rica em gorduras saturadas. Como é sabido que a população francesa ingere mais vinho que outras bebidas, esse fato ficou conhecido como o “Paradoxo Francês” [17].

Desde 1992 muitos artigos [2] têm mostrado que o RVT pode prevenir ou diminuir o progresso de uma grande variedade de doenças, incluindo câncer [18], doenças cardiovasculares [19] e lesões isquêmicas [20,21]. Além disso, ele aumenta a resistência ao estresse e o tempo de vida de vários organismos: de leveduras [22] a vertebrados [23]. A atividade antioxidante do RVT dá-se através da inibição da atividade dioxigenase da lipoxigenase [24]. O RVT também pode atuar de modo similar ao estrogênio e substituí-lo parcialmente nos tratamentos pós-menopausa [25]. A atividade antiinflamatória do RVT é explicada pela inibição da transcrição e da atividade da ciclooxigenase (COX1 e COX2) [3,26], inibindo também a síntese de tromboxinas, atuando, portanto como anticoagulante [18,27,28]. O RVT atua sobre o câncer de diversas maneiras, uma delas é a inibição da cascata do ácido araquidônico. Esta rota metabólica pode induzir a gênese de tumores [26]. Outra via é pela inibição da proteína C-quinase, um mediador chave na promoção dos tumores, ação que poderia explicar o seu efeito quimiopreventivo [29]. Estudos indicam que o RVT pode induzir a apoptose, morte programada de células, atuando como um agente anti-proliferativo de alguns tipos de tumores [25,30].

Atualmente, devido a todas as propriedades atribuídas ao RVT, ele é vendido como suplemento alimentar nos Estados Unidos [31] e no Brasil [32]. Apesar disso, ainda não se conhece quais seriam os efeitos da ingestão de cápsulas de RVT, uma vez que os fabricantes desses suplementos indicam doses de até 200 miligramas do composto por dia. Um estudo de 2004 [33] indica que quando são ingeridas doses de 25 miligramas de RVT, grande parte é eliminada na urina e uma quantidade muito pequena é biologicamente disponibilizada.

Daí surge o interesse na determinação de RVT em plasma humano. A determinação quantitativa de RVT em plasma humano e de ratos tem sido feita por métodos baseados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) [8,34-41]. A maioria desses estudos determina somente o isômero *trans*. Apenas dois trabalhos determinam simultaneamente o isômero *cis* [36,40]. Todos esses métodos exigem tediosas etapas de extração e precipitação de proteínas.

A determinação espectrofluorimétrica direta de RVT em plasma não é viável devido à presença de interferentes naturais fluorescentes no sangue. Além disso, o efeito de supressão do sinal causado pelas proteínas do plasma (que varia de indivíduo para indivíduo) impede a construção de uma curva de calibração que possa ser generalizada para diferentes indivíduos.

Com base na importância que o RVT vem demonstrando e nas dificuldades existentes em sua determinação cromatográfica, já citadas, o objetivo deste trabalho foi a determinação direta de RVT em plasma humano usando a vantagem de segunda ordem, que permite determinar um analito na presença de interferentes desconhecidos, e é propiciada pelo método quimiométrico de ordem superior (multidimensional) análise de fatores paralelos (PARAFAC, *Parallel Factor Analysis*) [42]. A estratégia empregada combinou o uso do PARAFAC, para separar o sinal do analito do sinal dos interferentes, com o método da adição-padrão, para a quantificação na presença de um forte efeito de matriz. A estratégia usada nesse trabalho é semelhante à que foi usada em outras aplicações encontradas na literatura, tais como na determinação de fármacos em matrizes biológicas: salicilato em plasma humano [43], propranolol [44] e ciprofloxacina [45] em urina humana. Esse tipo de estratégia também foi usada em determinações em alimentos, tais como: resíduos do antibiótico sulfaguanidina em mel [46], aflotoxina B1 em trigo [47] e dos antibióticos danofloxacina em leite bovino [48] e tetraciclina em soro de leite bovino [49]. O método proposto foi ainda validado através da estimativa de algumas figuras de mérito, tais como sensibilidade, sensibilidade analítica, seletividade, precisão, limites de detecção e quantificação.

## 2. Espectrofluorimetria

A espectrofluorimetria [50] é uma técnica analítica consagrada, que permite a realização de determinações com grande sensibilidade (os limites de detecção típicos estão na faixa de  $\text{ng mL}^{-1}$ ) e seletividade, embora a sua aplicação seja limitada a espécies que apresentem o fenômeno da fluorescência molecular (ou que possam ser convertidas a moléculas fluorescentes, estratégia conhecida como *derivatização*). Essa técnica analítica tem sido muito usada como ferramenta quantitativa em diversas áreas, tais como, química, medicina, meio ambiente e ciência de alimentos.

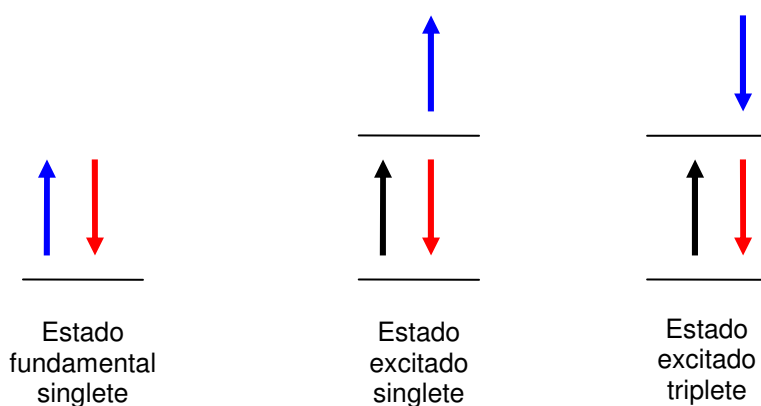
Neste capítulo serão tratados os fundamentos e as aplicações obtidas pelo emprego de fluorescência molecular que, juntamente com a fosforescência e a quimiluminescência, caracterizam o grupo de técnicas chamadas luminescentes [50]. Estas técnicas estão fundamentadas nos fenômenos que ocorrem quando uma molécula, após sofrer excitação, retorna ao seu estado fundamental, produzindo um espectro de emissão característico. Análises qualitativas ou quantitativas podem ser realizadas a partir dos perfis e das intensidades de emissão presentes nestes espectros.

Ambas as técnicas de fluorimetria e fosforimetria baseiam-se na absorção de um fóton pelo grupo fluoróforo para promover uma molécula a um estado excitado, diferenciando-se entre si apenas quanto à natureza das transições eletrônicas, sendo que no caso da fluorescência estas transições ocorrem sem envolver a alteração de *spins* dos elétrons. Quando o estado excitado não é obtido pela absorção de um fóton, mas no decorrer de uma reação química, gerando luminescência na desativação deste estado, então este processo caracteriza-se como um processo de quimiluminescência. Para um entendimento completo dos fundamentos de fluorescência, é necessário compreender as transições eletrônicas que podem ocorrer numa molécula, como será visto a seguir [50,51].

## 2.1. Transições Eletrônicas

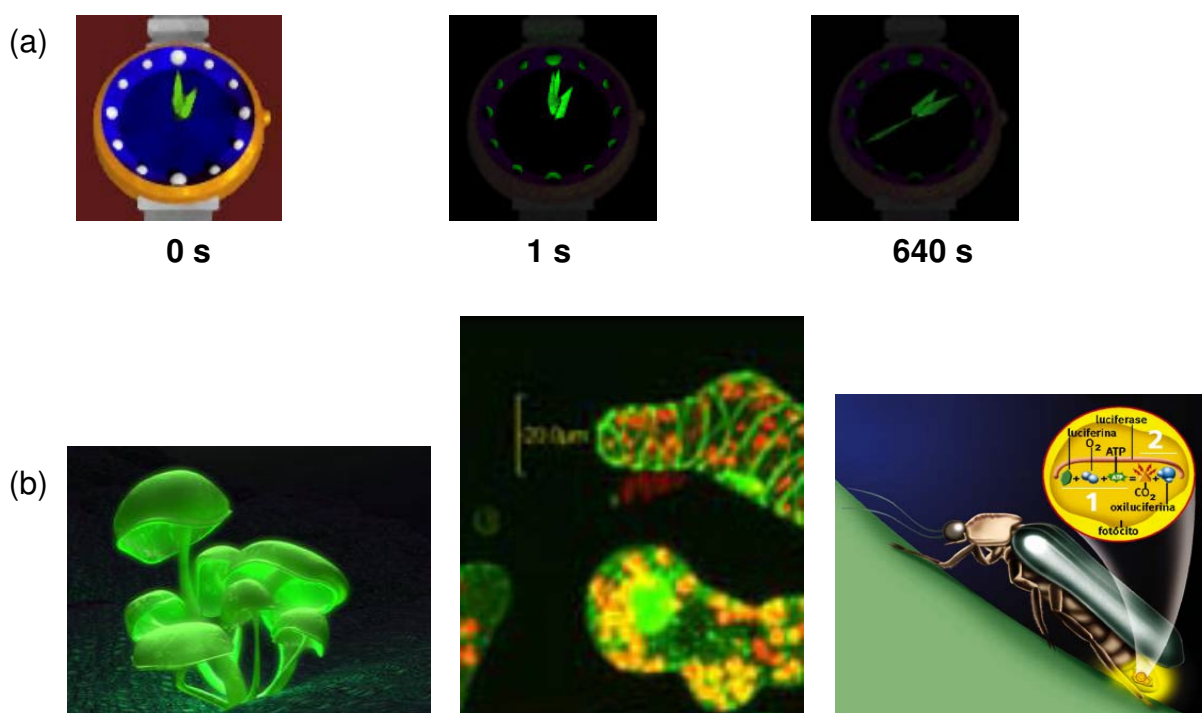
De acordo com o princípio de exclusão de Pauli, dois elétrons em um mesmo átomo não podem possuir todos os números quânticos idênticos. Este princípio determina que apenas dois elétrons sejam alocados em um mesmo orbital atômico ou molecular, os quais devem obrigatoriamente possuir um número quântico diferente, ou seja, *spins* contrários. Sob estas circunstâncias, é dito que os *spins* estão emparelhados. Um estado eletrônico molecular em que todos os elétrons estão emparelhados é chamado estado singlete, caracterizando um estado diamagnético, pois apresenta ausência de momento magnético.

Quando um número ímpar de elétrons está presente em uma espécie molecular, esta é chamada paramagnética, pois ela é sensível aos estímulos de um campo magnético. O estado fundamental desta molécula caracteriza um estado duplete, pois o elétron desemparelhado pode assumir duas orientações na presença de um campo magnético, enquanto que no estado triplete os dois elétrons permanecem paralelos entre si, embora em estados quânticos diferentes (excitado e fundamental). Quando um elétron do par de elétrons no estado singlete fundamental de uma molécula é excitado a níveis maiores de energia, os estados singlete e triplete excitados são permitidos. No estado singlete excitado, o elétron promovido ainda se mantém emparelhado com o seu par, enquanto que no estado triplete os dois elétrons se tornam desemparelhados e conseqüentemente, paralelos, conforme mostra a Figura 2.



**Figura 2.** Representação dos estados eletrônicos singlete e triplete e suas transições.

As propriedades de uma molécula excitada no estado triplete diferem significativamente de uma no estado singlete excitado como, por exemplo, sendo paramagnética no primeiro caso e diamagnética no segundo. Os estados triplete apresentam menor energia em relação aos singletes excitados, de modo que esta maior estabilidade eletrônica eleva o tempo médio de decaimento ao estado fundamental, situando-se em intervalos de tempo maiores que  $10^{-4}$  s, podendo chegar até vários minutos. Estas transições caracterizam os fenômenos de fosforescência. Em contrapartida, estados singlete excitados são bastante energéticos e instáveis, de forma que transições do tipo singlete excitado/singlete fundamental são mais rápidas e com tempo de vida médio de  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$  s. Estes dois processos geram efeitos macroscópicos diferentes, pois processos fosforescentes continuam a ocorrer mesmo com a fonte de radiação encerrada, o que não é observado em processos fluorescentes. A Figura 3 mostra um material fosforescente comumente usado como sinalizador e também animais que apresentam quimiluminescência, também conhecida por bioluminescência.

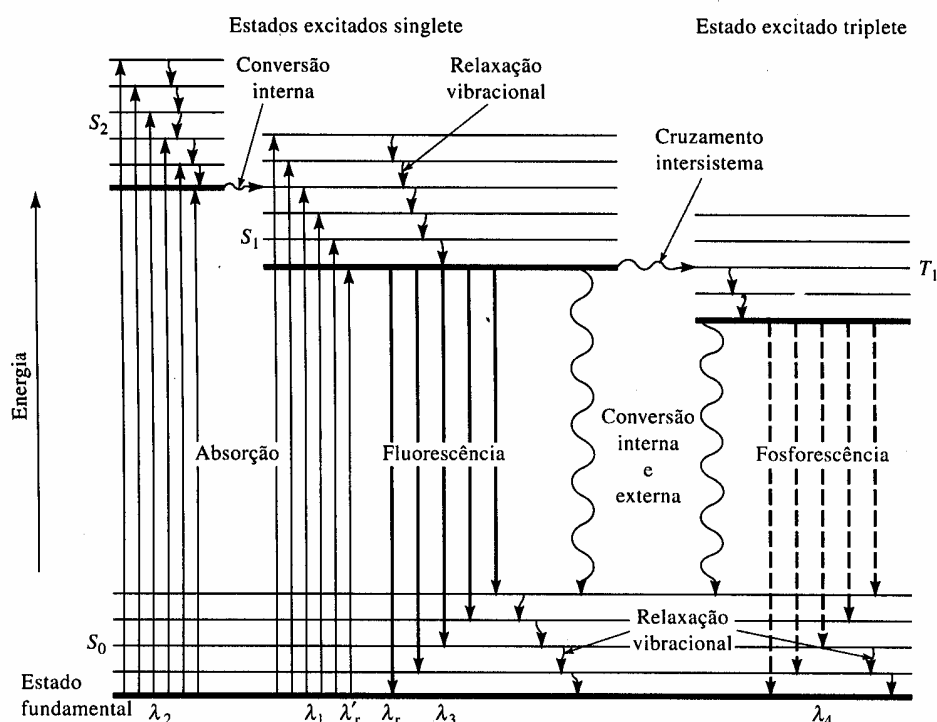


**Figura 3.** (a) Ponteiros de relógio confeccionados com material fosforescente. (b) Algas, bactérias e vagalume: luminescentes (bioluminescência).

Uma molécula excitada pode retornar ao seu estado fundamental por diversos caminhos e por processos que envolvam ou não a emissão de luz, de forma que na maioria das moléculas excitadas são encontrados processos de relaxação não radiativos, fazendo com que apenas uma pequena parcela de moléculas emita fluorescência. Geralmente, rotas de desativação não radiativas envolvem processos de relaxação vibracional, conversão interna, conversão externa e cruzamento intersistemas. A relaxação vibracional é a transferência de energia vibracional das moléculas excitadas para outras moléculas (para o solvente, por exemplo) através de colisões e não através da emissão de um fóton. A conversão interna é um processo intermolecular pelo qual uma molécula passa para um estado eletrônico de menor energia através de relaxação, sem emissão de radiação. Já a conversão externa é a interação e transferência de energia entre a molécula excitada e o solvente ou outros solutos. O cruzamento intersistemas é o processo no qual o *spin* de um elétron excitado é invertido, resultando em uma mudança de multiplicidade da molécula [52].

Fatores como a presença de duplas ligações conjugadas, rigidez molecular, temperatura, pH, solvente e presença de átomos pesados são importantes aspectos que influenciam na frequência com que uma determinada molécula excitada percorre uma ou outra rota de desativação. O caminho mais favorável para a desativação é aquele que minimiza o tempo de vida do estado excitado. Desta forma, se o processo de emissão fluorescente é rápido em relação aos processos de relaxação não emissivos, este fenômeno é observado. Por outro lado, se os processos não emissores de radiação têm constantes de velocidade maiores, a fluorescência não é observada ou ocorre de forma pouco intensa. Quanto maior a tendência de uma molécula percorrer caminhos radiativos, maior será o seu valor de seu rendimento quântico, parâmetro definido pela razão entre o número de moléculas excitadas que emitem luz e o número total de moléculas excitadas. Na Figura 4 vemos o diagrama de energia parcial mostrando transições energéticas associadas com os fenômenos de absorção, fluorescência e fosforescência, também conhecido como diagrama de Jablonski (Alexander Jablonski, 1898 –1980).

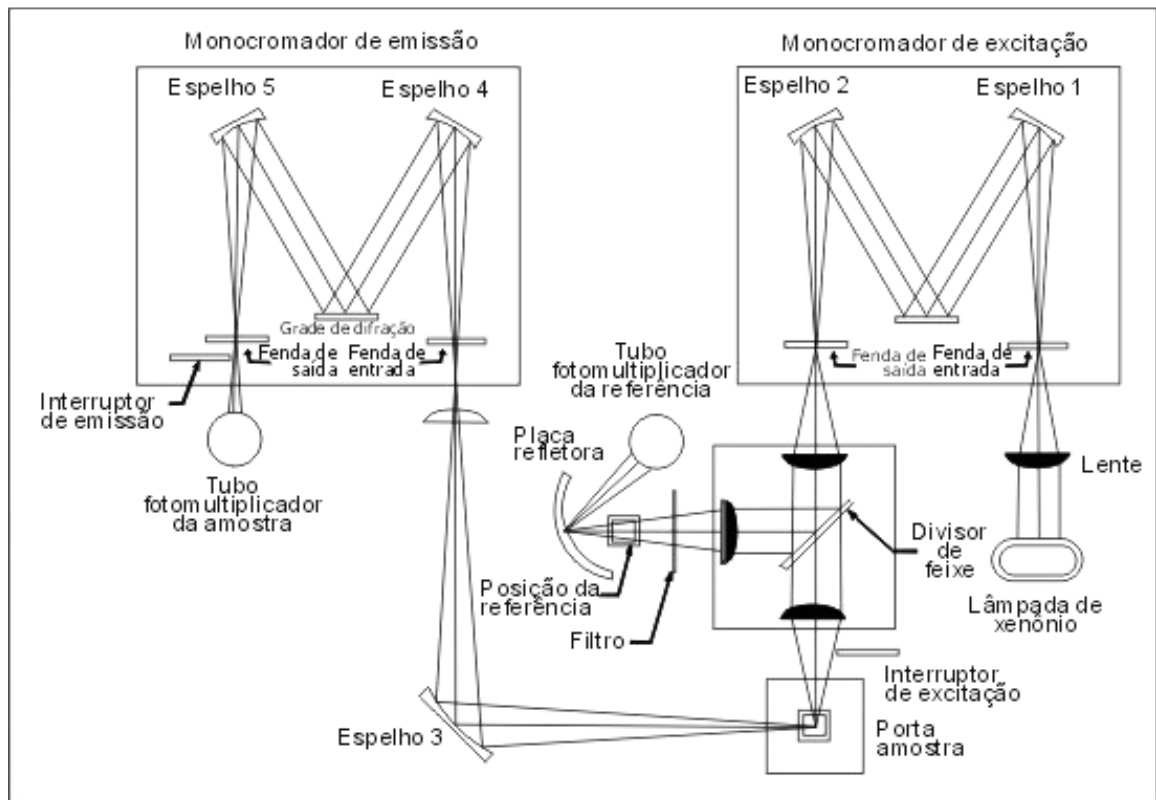




**Figura 4.** Diagrama de Jablonski; as flechas retas verticais indicam a emissão de um fóton de radiação e as flechas sinuosas indicam os processos não radiativos.

## 2.2. Espectrofluorímetros

Um espectrofluorímetro é, em geral, composto por dois monocromadores, um de excitação e um de emissão, uma fonte de excitação (que normalmente é uma lâmpada de mercúrio ou de xenônio) e um sistema de detecção (que normalmente é um tubo fotomultiplicador). Um monocromador é composto por um arranjo óptico no qual uma fonte de luz policromática incidente se decompõe em seus diferentes comprimentos de onda através de uma grade de difração. Os comprimentos de onda para a excitação da amostra são selecionados pelo monocromador de excitação, e a radiação emitida é analisada pelo monocromador de emissão, sendo a intensidade da radiação emitida determinada pelo tubo fotomultiplicador. A Figura 5 apresenta o esquema de um espectrofluorímetro [52].



**Figura 5.** Esquema de funcionamento de um espectrofluorímetro.

### 2.3. Intensidade de Fluorescência e Concentração

A intensidade de fluorescência  $I_F$  é diretamente proporcional à intensidade do feixe de excitação ( $I_0$ ), à absorvância ( $\epsilon bc$ , onde  $\epsilon$  é a absorvidade molar,  $b$  é o comprimento percorrido pelo feixe na amostra e  $c$ , a concentração da espécie fluorescente) e o rendimento quântico ( $\Phi_F$ ) da espécie, definidos pela equação a seguir,

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

onde a constante de proporcionalidade  $K_F$  é uma função da resposta do detector e de outros parâmetros instrumentais. Como  $I_F$  é proporcional a  $I_0$ , a sensibilidade e o limite de detecção podem ser incrementados com o aumento da intensidade da fonte (limitada pela intensidade máxima em que ocorre a fotodecomposição da amostra). Este é um importante parâmetro que difere a espectrofluorimetria das técnicas de espectroscopia de absorção molecular, onde o aumento da intensidade da fonte não

causa variação na absorvância. Outro fator divergente é gerado pela relação direta entre a concentração do fluoróforo e a transmitância, ao contrário do que ocorre nas técnicas de absorção molecular. A combinação destes parâmetros resulta em limites de detecção menores e sensibilidade e seletividade maiores para métodos luminescentes que para métodos baseados em absorção molecular.

Para medidas consecutivas, onde a intensidade do feixe de excitação, o caminho ótico e outros parâmetros instrumentais são mantidos constantes ( $k$ ), a equação 1 pode ser reduzida à equação 2,

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

onde o rendimento quântico ( $\Phi_F$ ) é um termo independente do comprimento de onda de excitação, estando apenas diretamente relacionado com o comprimento de onda de emissão. Tomando-se o fato de que o rendimento quântico varia apenas em função do comprimento de onda de emissão, este pode ser substituído pelo termo “coeficiente de emissão relativo,  $\delta_j$ ”, que assume diferentes valores a cada comprimento de onda de emissão  $j$ ; desta forma, a intensidade de fluorescência  $I_{ij}$  pode ser definida através da equação 3,

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

onde  $I_{ij}$  é a intensidade de fluorescência medida no comprimento de onda de emissão  $i$  e no comprimento de onda de excitação  $j$ ;  $a_f$  é a concentração do  $f$ -ésimo fluoróforo;  $\delta_{fi}$  é o coeficiente de emissão relativo ao comprimento de onda de emissão  $i$  do  $f$ -ésimo fluoróforo;  $\epsilon_{fj}$  é o coeficiente de absorção molar do comprimento de onda de excitação  $j$  do  $f$ -ésimo fluoróforo;  $F$  é o número de fluoróforos na amostra. Para várias amostras, contendo diferentes fluoróforos, a equação 3 pode ser escrita como uma matriz de produtos, de acordo com a equação a seguir,

$$\mathbf{F} = \mathbf{A}(\mathbf{C}|\otimes|\mathbf{B})^T \quad (4)$$

onde  $\mathbf{F}$  é a matriz desdobrada de um arranjo tridimensional de dados contendo todas as superfícies espectrais;  $\mathbf{A}$  é a matriz de concentração de todas as espécies fluorescentes;  $\mathbf{B}$  é a matriz dos perfis espectrais de emissão de todas as espécies fluorescentes medidos em todos os comprimentos de onda;  $\mathbf{C}$  é a matriz dos perfis espectrais de excitação (que são iguais aos perfis de absorção) de todas as espécies fluorescentes;  $|\otimes|$  é o produto de Khatri-Rao [53,54] (Apêndice 1).

Pelo fato de gerar facilmente dados de estrutura trilinear, a espectrofluorimetria é o objeto do maior número de aplicações do PARAFAC encontradas na literatura, tanto em calibração quanto na resolução de espectros [43-49].

#### 2.4. Matrizes de Fluorescência de Excitação-Emissão

Quando a fluorescência de uma amostra é medida em diversos comprimentos de onda de emissão para diversos comprimentos de onda de excitação, obtém-se uma superfície ou matriz de excitação-emissão (EEM, *Excitation-Emission Matrix*). Desta maneira, matrizes de excitação-emissão são geradas por duas dimensões independentes de comprimentos de onda, sendo que uma destas dimensões caracteriza-se pelos perfis de excitação e a outra possui informação referente ao espectro de emissão. O agrupamento destes espectros gera uma superfície tridimensional de fluorescência, com a presença de todas as bandas de excitação e emissão dos fluoróforos presentes [51]. Quando um conjunto de amostras é medido nessas condições, obtém-se um arranjo de dados multidimensional (um tensor de terceira ordem), o qual deve apresentar comportamento trilinear, a despeito da presença de ruído, espalhamentos (Rayleigh e Raman) e outros fenômenos, tais como difração de segunda ordem. Este comportamento torna os métodos quimiométricos de segunda ordem, tais como PARAFAC e PLS multilinear (N-PLS, *N-Way Partial Least Squares*), bastante adequados para o tratamento de dados espectrofluorimétricos, pois o modelo matemático assumido por eles é condizente com o modelo físico que gera os dados [55].

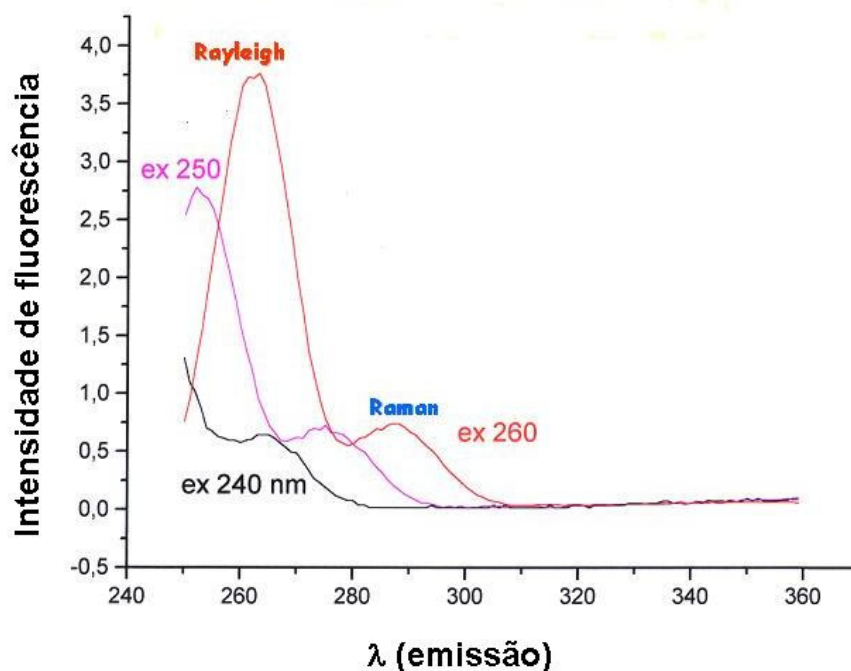
## 2.5. Espalhamentos da radiação

A radiação ao incidir em uma amostra poderá ser absorvida, transmitida, e/ou espalhada. A intensidade da radiação espalhada aumenta em função do tamanho das partículas presentes na amostra e causa um desvio do caminho original da luz em todas as direções. Esses espalhamentos, que nada têm a ver com a eventual fluorescência emitida pela amostra, mas podem interferir na análise, são conhecidos como Rayleigh e Raman [50-52,56].

O espalhamento Rayleigh é elástico e é causado por moléculas ou agregados de moléculas com dimensões muito menores que o comprimento de onda da radiação que incide sobre a amostra. Já o espalhamento Raman é inelástico e é causado pelo fato da radiação espalhada possuir comprimentos de onda maiores que o da luz usada para excitar a amostra. Ele decorre de colisões inelásticas entre os fótons da luz incidente e as moléculas, de modo que os fótons espalhados podem ceder parte de sua energia a elas (excitando-as a estados rotovibracionais mais elevados e originando as chamadas linhas Stokes). Se as colisões ocorrerem entre os fótons da luz incidente e moléculas em estados rotovibracionais de maior energia, os fótons espalhados terão energia maior que os incidentes e a detecção da radiação espalhada fornecerá as chamadas linhas anti-Stokes. Como o número de moléculas nos estados rotovibracionais mais elevados é menor que no estado rotovibracional fundamental, as linhas anti-Stokes serão menos intensas que as Stokes. O resultado é o aparecimento de uma banda (chamada Raman) que ocorre em uma região espectral deslocada em direção a maiores comprimentos de onda que o da radiação incidente na amostra e que pode se sobrepor à região espectral em que aparece o espectro de fluorescência da espécie de interesse [52].

No espalhamento Rayleigh não há perda de energia, o comprimento de onda da radiação espalhada é o mesmo da radiação incidente. Em consequência, a banda Rayleigh é bastante intensa e aparece sempre em comprimentos de onda menores que os da banda Raman. Já no espalhamento Raman geralmente há perda de energia dos fótons incidentes na amostra para as moléculas que as constituem e, em consequência, essa banda aparece em comprimentos de onda maiores que o da luz incidente. Entretanto, esta banda é pouco intensa se comparada com a banda Rayleigh. Ambas as bandas dependem do tipo de solvente e da quantidade de

partículas dissolvidas na solução. A Figura 6 mostra os espalhamentos Raman e Rayleigh em um espectro de emissão da água deionizada.



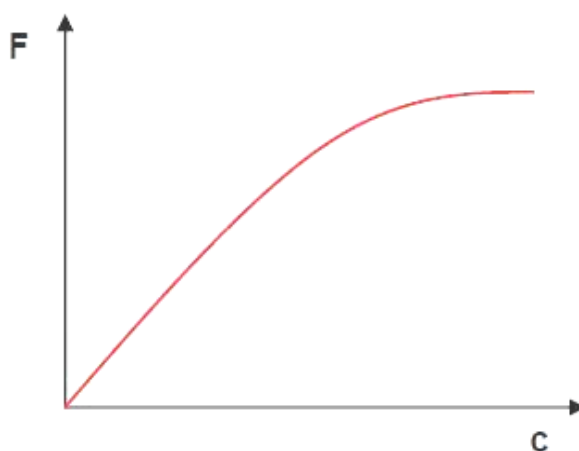
**Figura 6.** Espectro de emissão da água deionizada mostrando os espalhamentos Raman e Rayleigh.

Na análise e interpretação dos espectros de fluorescência total, a presença destas bandas não fluorescentes é encarada como interferência espectral e deve ser evitada ou retirada. Além da sobreposição gerada pelos espalhamentos, a principal desvantagem da sua presença ocorre quando as EEM são utilizadas na decomposição por métodos quimiométricos de ordem superior, como será visto neste trabalho. Basicamente, como pode ser visto na equação 3, a intensidade de fluorescência de uma amostra é um produto direto de três fatores independentes, constituindo um modelo trilinear. Conseqüentemente, métodos quimiométricos multidimensionais trilineares mostram-se eficientes na análise destes tipos de dados. No entanto, é observado que os padrões matemáticos dos espalhamentos não obedecem a um modelo trilinear, causando instabilidade e falta de reprodutibilidade dos resultados, quando métodos quimiométricos de ordem superior são utilizados. Diversas ferramentas podem ser empregadas para a redução ou eliminação destes espalhamentos, seja através de processos instrumentais, como o uso de filtros ou polarizadores do feixe de excitação, ou métodos numérico-computacionais, de modo que as regiões de espalhamento sejam substituídas numericamente, utilizando-se

rotinas desenvolvidas em alguns *softwares* [56-58]. Neste trabalho, as regiões dos espectros de origem não fluorescentes foram cortadas, uma vez que a substituição pela forma numérica não apresentou bons resultados e o equipamento utilizado nas medidas não apresenta possibilidade de atuar com filtros ou polarizadores.

## 2.6. Supressão de Fluorescência

Outro importante fator que pode estar presente não apenas em espectros de fluorescência total, mas em qualquer medida empregando-se fluorescência molecular, é a supressão de fluorescência (*quenching*). A supressão refere-se a qualquer processo que cause redução do rendimento quântico de um sistema luminescente e ocorre devido à interação do fluoróforo com determinadas substâncias denominadas supressores, ou devido a altos níveis de concentração das espécies fluorescentes. Altas concentrações dos fluoróforos podem gerar dois “tipos” de supressão: auto-supressão e auto-absorção, sendo que no primeiro caso as moléculas excitadas transferem energia às moléculas do solvente, diminuindo a intensidade das bandas de fluorescência. A auto-absorção ocorre quando existe sobreposição das bandas de excitação e emissão de fluorescência, de modo que a radiação emitida é absorvida para excitação de outras moléculas, chegando apenas parte da radiação emitida ao detector. A Figura 7 mostra o efeito supressor do aumento da concentração de um fluoróforo sobre sua intensidade da fluorescência.



**Figura 7.** Gráfico mostrando a supressão da intensidade de fluorescência em função do aumento da concentração.

Matrizes biológicas apresentam grandes concentrações de proteínas, sendo que muitas destas proteínas causam supressão de fluorescência, principalmente devido à presença de aminoácidos fluorescentes como triptofano e tirosina. A supressão nestes sistemas dá-se de diversas formas, mas o principal efeito ocorre devido à auto-absorção do sistema tirosina-triptofano, bem como pelas interações peptídicas entre os fluoróforos [51]. Existem alguns procedimentos utilizados para se eliminar o efeito de supressão ou reduzi-lo, minimizando a sua interferência nas análises. Em meios com elevada concentração de proteínas, a separação destas proteínas é um dos procedimentos mais empregados, embora possam ocorrer consideráveis perdas na recuperação. Outra possibilidade é a diluição das amostras, o que a princípio parece ser mais interessante, pois não envolve etapas mais requintadas de preparação da amostra. No entanto, a diluição pode diminuir a concentração do analito para níveis próximos ao limite de quantificação. Uma terceira possibilidade é se construir o modelo de calibração na presença das proteínas e, conseqüentemente, na presença do processo de supressão, baseando-se no fato que todas as amostras terão o mesmo grau de supressão. Este procedimento só é viável se a concentração das proteínas no meio não apresentar grandes variações, de forma que o sistema em estudo tenha um comportamento regular [59]. A estratégia utilizada neste trabalho fez uso, além da diluição, do método da adição-padrão devido à ocorrência de um forte efeito de matriz.



### 3. PARAFAC

Com o desenvolvimento dos microprocessadores, a partir do início dos anos setenta, os laboratórios químicos passaram a utilizar os microcomputadores cada vez mais, gerando uma quantidade de dados maior e mais complexa. Com isso, surgiu a necessidade de técnicas de tratamento de dados matemática e estatisticamente mais complexas. A quimiometria é uma disciplina que teve sua criação motivada devido à dificuldade de lidar com esse volume de dados [60-62].

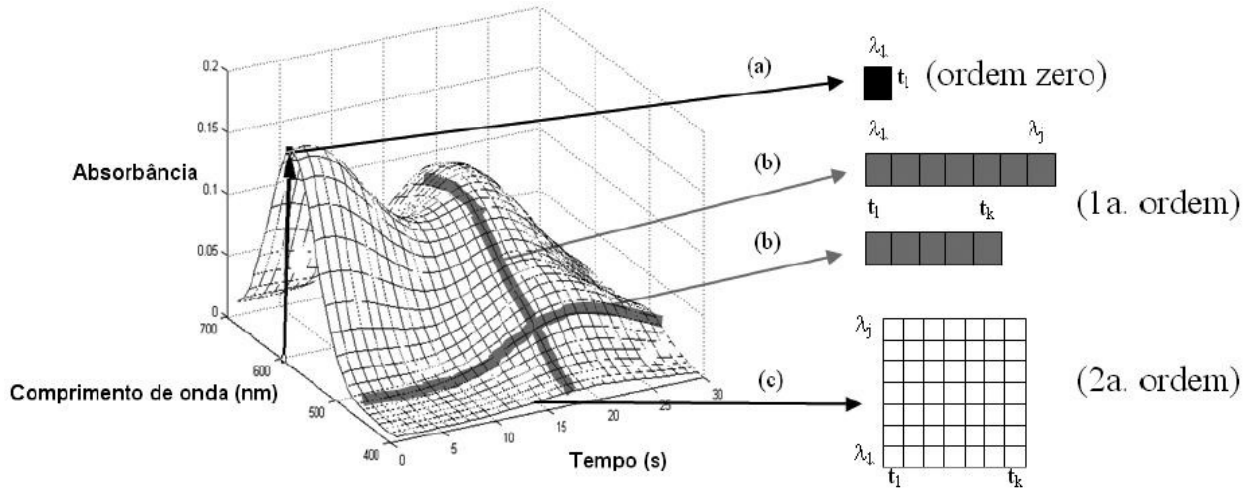
O termo quimiometria (*chemometrics*) foi proposto no final dos anos setenta e pode ser definida como a disciplina que trata da aplicação e desenvolvimento de métodos de estatística multivariada no tratamento de dados químicos. Foi dentro da área de química analítica [61] que a quimiometria causou mais impacto. Dentre os métodos instrumentais de análise, raros são os absolutos, nos quais o analito é quantificado de forma direta (ex.: métodos gravimétricos). A grande maioria dos métodos analíticos é realizada de forma indireta, ou seja, etapas de calibração são essenciais para realizar a determinação do analito. Nestas etapas, visa-se encontrar a melhor relação possível entre respostas instrumentais, obtidas através de um determinado método, e os valores de uma grandeza conhecida, como concentração, para um grupo de objetos ou amostras [63]. Os métodos de calibração usados em química analítica podem ser classificados de acordo com a dimensão dos dados analisados [64] e esse assunto será tratado a seguir.

#### 3.1. Ordem dos Dados Analíticos

Os métodos de ordem zero são usados para analisar dados univariados, gerados por instrumentos como pHmetros e colorímetros. Nesses casos a resposta medida para cada amostra é um valor escalar, ou seja, a calibração é univariada. Esses métodos requerem que as medidas instrumentais sejam seletivas para o analito de interesse, não fornecendo resultados aceitáveis na presença de interferentes. Já métodos de primeira ordem são usados para tratar dados multivariados, gerados por instrumentos como espectrômetros e cromatógrafos.

Nesses casos a resposta medida para cada amostra é um vetor e a calibração pode ser tanto univariada como multivariada de primeira ordem. Esses métodos possibilitam a análise mesmo na presença de interferentes, desde que estes estejam presentes no conjunto de calibração usado para construir o modelo, e a possibilidade de detectar amostras anômalas (vantagem de primeira ordem). Instrumentos que forneçam como resposta uma matriz de dados para cada amostra geram dados de segunda ordem. Como exemplo, podem ser citadas as chamadas técnicas hífenadas, tais como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS, *Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry*) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD ou HPLC-DAD, *High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*). Dados de segunda ordem podem ainda ser obtidos por espectrofluorimetria, análise de injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica e análise de imagens [55]. O uso de métodos de calibração de segunda ordem permite a incorporação de uma maior quantidade de informação ao modelo, levando a uma série de possíveis vantagens sobre métodos de ordem inferior. Uma destas vantagens é a possibilidade de obtenção dos espectros (ou outros sinais, dependendo da técnica empregada) puros de cada componente do sistema, aplicando um número mínimo de restrições ao modelo. Uma outra vantagem importante é a possibilidade de determinações, sob certas condições, na presença de interferentes desconhecidos, que não estejam presentes no conjunto de calibração, a chamada “vantagem de segunda ordem” (que será discutida posteriormente). Métodos de ordem igual ou superior a três (também denominados dados de ordem superior) são possíveis, embora não abundantes na literatura química. Espectros de fluorescência de excitação/emissão obtidos em função do tempo para cada amostra são um exemplo de dados de terceira ordem presentes na literatura [65]. Porém, um dos fatores que ainda restringe a aplicação desse tipo de calibração é a elaborada instrumentação necessária para a aquisição dos dados. Uma vantagem deste tipo de calibração é que como se tem um cubo de dados por amostra, o perfil característico de cada ordem pode ser unicamente determinado para cada espécie na amostra. Entretanto, maiores vantagens para esse tipo de calibração ainda são desconhecidas [64,66].

A Figura 8 mostra uma representação esquemática dos três tipos de dados utilizados nos três tipos de calibração citados para, por exemplo, um sistema de análise por Injeção em Fluxo (FIA) com detecção por arranjo de diodos (DAD) [66].



**Figura 8.** Representação esquemática dos diferentes tipos de dados em um sistema FIA-DAD: (a) escalar (uma única medida instrumental), (b) vetor de dados, (c) matriz de dados [66].

### 3.2. Análise de Fatores Paralelos

O PARAFAC é um método de decomposição para dados multidimensionais proposto por psicometristas nos anos setenta e usado desde os anos noventa por químicos [53]. Um modelo PARAFAC para dados tridimensionais é dado por três matrizes de pesos (*loadings*), **A**, **B** e **C**, com os elementos  $a_{if}$ ,  $b_{jf}$  e  $c_{kf}$  (Eq. 5), respectivamente, correspondentes a cada uma das dimensões dos dados. O modelo trilinear é ajustado para minimizar a soma dos quadrados dos resíduos,  $e_{ijk}$ , na seguinte equação,

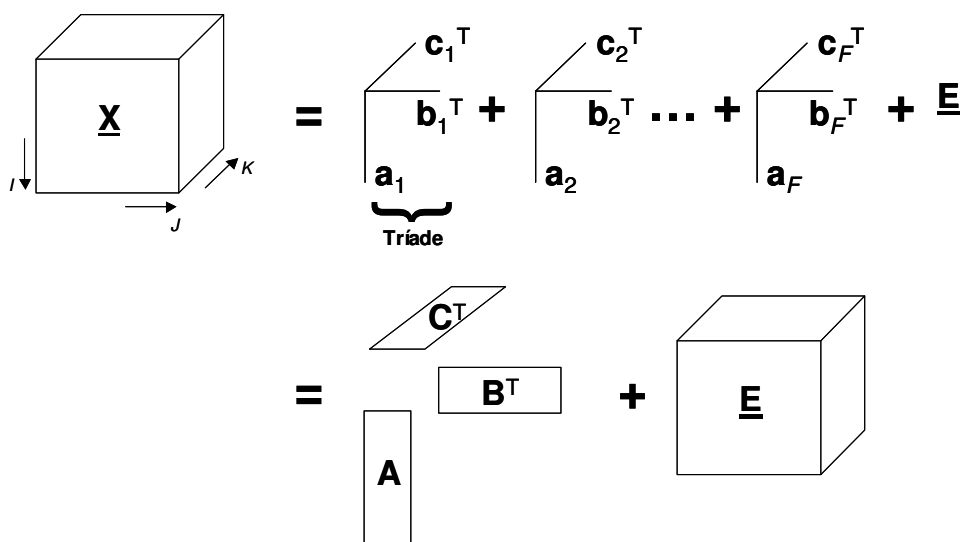
$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^N a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (5)$$

onde  $x_{ijk}$  é um elemento do conjunto de dados trilinear e  $e_{ijk}$  representa os resíduos do modelo. O indexador  $i$  representa a  $i$ -ésima linha,  $j$  a  $j$ -ésima coluna e  $k$ , a  $k$ -ésima fatia do cubo de dados;  $f$  representa o  $f$ -ésimo fator selecionado pelo modelo. A equação 5 pode ser representada também na forma matricial, de acordo com a equação 6, ou na forma geométrica (Fig. 9),

$$\mathbf{X}_{(I \times JK)} = \mathbf{A}(\mathbf{C} \otimes \mathbf{B})^T + \mathbf{E}_{(I \times JK)} \quad (6)$$

onde  $\mathbf{X}$ , de dimensões  $I \times JK$ , é a matriz desdobrada dos dados e  $\mathbf{E}$  é a matriz desdobrada dos resíduos do modelo. Desdobrar (*unfold*) uma matriz tridimensional significa rearranjá-la em uma matriz bidimensional.

Repare que a equação 4 (pg. 12), a qual representa o modelo físico-químico que gera dados espectrofluorimétricos, é um caso particular da equação 6, demonstrando a adequabilidade do modelo PARAFAC a esse tipo de dados.



**Figura 9.** Representação geométrica do modelo PARAFAC. Decomposição de um arranjo de dados tridimensional em  $F$  triades de vetores peso.

Na Figura 9, a decomposição dos dados do tensor  $\underline{\mathbf{X}}$  é representada tanto na forma de triades, onde cada triade corresponde a um fator (equivalente ao termo componente principal na análise de componentes principais, PCA), assim como na forma de matrizes. No PARAFAC, todas as matrizes obtidas na decomposição de

dados são chamadas de matrizes de pesos, ao contrário do que ocorre na PCA. Os pesos da dimensão das amostras (normalmente contidos na matriz **A**) são algumas vezes também chamados de escores (*scores*) por analogia com a PCA [42,53]. É importante destacar ainda que dados de quatro ou mais dimensões também podem ser analisados pelo PARAFAC de maneira análoga.

O algoritmo usado para resolver o modelo PARAFAC é o dos Mínimos Quadrados Alternantes (ALS, *Alternating Least Squares*). O ALS sucessivamente assume os pesos em dois modos e então estima o conjunto desconhecido de parâmetros do último modo [53]. O ALS pode ser iniciado a partir de valores aleatórios ou usando algum tipo de decomposição dos dados, tais como decomposição trilinear direta (DTLD, *Direct Trilinear Decomposition*) [67] ou decomposição em valores singulares (SVD, *Singular Value Decomposition*). Normalmente, o padrão (*default*) usado no PARAFAC é a DTLD [68]. O algoritmo converge iterativamente até atingir um critério de convergência ou um número de iterações previamente definidos [68,69]. O padrão usado costuma ser uma diferença de ajuste entre sucessivas iterações de  $1 \cdot 10^{-6}$  ou um número máximo de 2.500 iterações [68]. Os passos do algoritmo para um modelo PARAFAC são resumidos a seguir [42]:

- (0) Decida o número de fatores,  $F$ ;
- (1) Inicie **B** e **C**;
- (2) Estime **A** por um ajuste de mínimos quadrados a partir de **X**, **B** e **C**  $\Rightarrow$   

$$\mathbf{A} = \mathbf{XZ}^T(\mathbf{ZZ}^T)^{-1}$$
, onde  $\mathbf{Z} = (\mathbf{C}|\otimes|\mathbf{B})^T$ ;
- (3) Estime **B** de maneira análoga;
- (4) Estime **C** de maneira análoga;
- (5) Retorne ao passo (2) até que o critério de convergência seja atingido.

O PARAFAC pode ser considerado como uma versão restrita do método Tucker3 [53,69] com uma matriz central superidentidade ( $g_{\text{def}}=1$  quando  $d = e = f$  e  $g_{\text{def}} = 0$  nas outras posições, ou seja, o primeiro fator de uma dimensão só se relaciona com os primeiros fatores das outras e assim, sucessivamente). Ele é menos flexível, usa menos graus de liberdade e produz soluções únicas que independem de rotação. Essa última característica é a grande vantagem para a modelagem de dados espectroscópicos.

A escolha do número de fatores é uma etapa crucial da análise, não existindo para ela um critério absoluto. A escolha pode ser feita baseada na variância explicada pelo modelo, no conhecimento químico do sistema, em métodos de reamostragem e validação cruzada (*split-half*) [70] ou no “teste de consistência trilinear” (CORCONDIA, *CORe CONSistency DIAgnostic*) [53,69,71]. No caso de aplicações em calibração multidimensional, essa escolha também pode ser feita com base no menor erro de previsão da relação dos escores com a propriedade de interesse.

O CORCONDIA é baseado na interpretação do PARAFAC como um modelo Tucker3 restrito. O Tucker3 é aplicado aos parâmetros do modelo PARAFAC estimado e, se houver consistência trilinear, espera-se que os elementos da superdiagonal do tensor central ( $\underline{\mathbf{G}}$ ) tenham valores próximos de um e os demais elementos valores próximos de zero. A definição matemática é expressa pela seguinte equação,

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

onde  $g_{def}$  é o elemento da matriz central calculada segundo o modelo Tucker3 a partir dos pesos do PARAFAC,  $h_{def}$  é o elemento de um tensor binário contendo valores um na superdiagonal e zero nas demais posições e  $F$  é o número de fatores do modelo. Um valor de CORCONDIA superior a 90 % indica a adequação do modelo PARAFAC, um valor em torno de 50 % indica deficiência de trilinearidade e valores próximos de zero ou negativos indicam inconsistência trilinear. O CORCONDIA é uma ferramenta para detectar sobre-ajuste em um modelo PARAFAC, mas não sub-ajuste. O valor de CORCONDIA para um modelo estimado com um número de componentes menor do que o real estará próximo a 100 %, pois a estrutura de tal modelo será trilinear. Portanto, o modelo adequado será aquele com maior número de componentes e que preserve a estrutura trilinear (assumindo que o ruído não é trilinear).

Outra característica importante do PARAFAC é a possibilidade do uso de restrições (*constraints*). O ajuste de um modelo restrito sempre é menor que o de um modelo não restrito (menor variância explicada). No entanto, a perda de ajuste é

compensada pela obtenção de um modelo mais facilmente interpretável e realista. As restrições mais comuns são não-negatividade, ortogonalidade e unimodalidade. A restrição de não-negatividade é usualmente adotada na resolução de espectros, já que parâmetros espectrais negativos não possuem significado físico [53,69].

O uso do PARAFAC para calibração segue uma estratégia análoga à da Regressão por Componentes Principais (PCR, *Principal Components Regression*). Exclusivamente no PARAFAC, as amostras de concentrações conhecidas e desconhecidas são decompostas simultaneamente. Depois, tal como na PCR, os pesos das amostras (ou escores) especificamente obtidos para o fator de interesse na amostra desconhecida são relacionados com as concentrações conhecidas do conjunto de calibração através de uma regressão linear [55,69].

### 3.3. Adição-padrão de Segunda Ordem

O método da adição-padrão é bastante conhecido entre os químicos analíticos e sua descrição pode ser encontrada na maioria dos livros didáticos de análise quantitativa e instrumental [72,73]. Ele é aplicado a dados univariados (ordem zero) como um meio de superar o efeito de matriz que afeta a maneira pelo qual o instrumento responde ao analito. Este método requer duas condições para o sucesso da calibração:

- (1) O instrumento deve responder linearmente ao aumento da concentração do analito.
- (2) Quando a concentração do analito for zero, a resposta instrumental também deve ser igual à zero.

A estimativa da concentração do analito na amostra é obtida através de um gráfico da resposta instrumental (ordenada) em função da quantidade de padrão adicionada (abscissa), usando o valor da intersecção da reta ajustada aos dados com o eixo das abscissas.

Em 1979, Saxberg e Kowalski propuseram uma extensão do método da adição-padrão para dados multivariados (primeira ordem), batizada de método da adição-padrão generalizado (GSAM, *Generalized Standard Addition Method*) [74].

O GSAM permite que múltiplos analitos e interferentes sejam adicionados à amostra simultaneamente e utiliza uma regressão linear múltipla para obter as previsões [75]. Isto relaxa a restrição de que o método analítico seja inteiramente seletivo para o analito de interesse. Portanto, na ausência de todas as espécies incluídas no modelo de calibração, a resposta instrumental deverá ser zero em todos os canais. Entretanto, resultados adequados não serão obtidos, se houver alguma fonte de sinal instrumental não calibrada.

Em 1995, Booksh e co-autores propuseram outra extensão do método da adição-padrão, desta vez, para dados multidimensionais (segunda ordem), a qual foi chamada de método da adição-padrão de segunda ordem (SOSAM, *Second-Order Standard Addition Method*) [76]. Eles analisaram dados de segunda ordem cinético-espectroscópicos com o objetivo de determinar tricloroetileno e usaram o DTLTD [67] como método de decomposição. O SOSAM pode ser resumido em três etapas:

- (1) O DTLTD é aplicado na decomposição de um arranjo de dados de terceira ordem, formado pelo agrupamento dos dados de segunda ordem da amostra e de cada adição sucessiva. O número de fatores usado na decomposição deverá corresponder ao número de analitos mais o de interferentes.
- (2) A matriz de pesos da dimensão correspondente à composição da amostra deverá conter em suas colunas a informação relativa às concentrações do analito e dos interferentes. A identificação de qual coluna corresponde ao analito de interesse pode ser feita pela comparação dos pesos da dimensão dos espectros (ou de outro tipo de sinal) com o espectro do analito puro.
- (3) Os valores da coluna identificada, correspondentes às concentrações do analito na amostra e após as adições sucessivas, serão usados em uma regressão, da mesma maneira que em uma adição-padrão univariada.

Um dos principais aspectos a serem ressaltados no SOSAM é a utilização da “vantagem de segunda ordem”, definida como a habilidade de realizar uma determinação na presença de interferentes previamente desconhecidos (*unexpected interferences*) [53,64,77]. Uma outra definição pode ser dada como “toda vantagem analítica usada na determinação de um analito, que pode ser obtida com dados de segunda ordem ou superiores, e que não pode ser obtida com dados de ordem zero ou um” [78].



Quando os dados são analisados com o método PARAFAC, para que a vantagem de segunda ordem ocorra, duas condições devem ser satisfeitas:

- (1) Os dados devem ser, no mínimo, trilineares ou aproximadamente trilineares.
- (2) As amostras a serem previstas devem ser decompostas simultaneamente com as amostras de calibração.

O uso de um método de segunda ordem é condição necessária, mas não suficiente, para que haja vantagem de segunda ordem. O N-PLS [79], por exemplo, é um método de segunda ordem, mas não propicia vantagem de segunda ordem, pois realiza primeiro a decomposição do conjunto de calibração para depois projetar as amostras a serem previstas. Dentre os métodos que permitem o uso da vantagem de segunda ordem, estão o PARAFAC, o DTLD e o GRAM [80], os quais satisfazem a segunda condição mencionada acima. A vantagem de segunda ordem pode ser obtida ainda pela combinação dos seguintes métodos: método de resolução de curvas multivariado (MCR, *Multivariate Curve Resolution*) com o de quadrados mínimos alternantes (ALS), MCR/ALS [81], método dos quadrados mínimos bilinear (BLLS, *Bilinear Least Squares*) [82] com um procedimento conhecido como bilinearização residual (RBL, *Residual BiLinearization*), BLLS/RBL [83], método dos quadrados mínimos parciais desdobrado (U-PLS, *Unfold Partial Least Squares*) com bilinearização residual, U-PLS/RBL [84,85] e ainda o método dos quadrados mínimos parciais multilinear com bilinearização residual, N-PLS/RBL [86,87].

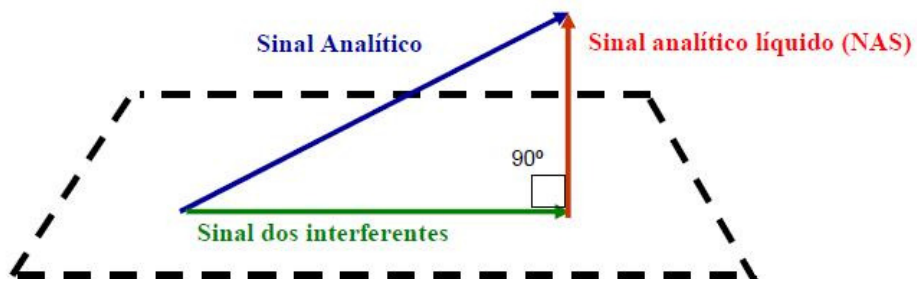
Na aplicação deste trabalho, o método empregado na decomposição dos dados foi o PARAFAC, ao invés do DTLD, originalmente proposto no SOSAM. Na comparação entre os dois métodos, o PARAFAC apresenta a vantagem de ser mais robusto à presença de ruído nos dados, o que muitas vezes impede a aplicação do DTLD a dados reais [53, 69,77].

### 3.4. Figuras de Mérito

Ao se propor um novo método analítico há a necessidade de se averiguar a sua confiabilidade e adequação através de um processo denominado validação analítica. Existem órgãos de fiscalização nacionais e internacionais que estabelecem as normas que devem nortear o processo de validação analítica. No Brasil temos a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Os principais órgãos reguladores internacionais são: *United States Pharmacopeia* (USP), *International Conference on Harmonization's* (ICH), *International Standard Organization* (ISO) e *American Society for Testing and Materials* (ASTM) [66].

Os métodos analíticos baseados em calibração multivariada são relativamente recentes e a sua aceitação pelas agências e organismos reguladores ainda é restrita. Existe um longo caminho a ser percorrido até a certificação desses métodos e um requisito essencial para isso é a validação dos mesmos [88-91]. Essa validação consiste em atestar a eficiência do método para a função a qual ele se destina e pode ser obtida pela determinação de parâmetros que são conhecidos como figuras de mérito (FOM, *Figures of Merit*). Para o método desenvolvido neste trabalho serão determinadas, além da exatidão e da precisão, as figuras de mérito sensibilidade, seletividade, sensibilidade analítica, limite de detecção e limite de quantificação.

Na estimativa de figuras de mérito para métodos de calibração de primeira e segunda ordens, a parte do sinal que se relaciona unicamente com o analito de interesse é mais importante do que o sinal total. Essa parte única do sinal é denominada sinal analítico líquido (NAS, *Net Analyte Signal*), conceito que foi proposto pioneiramente por Lorber, em 1986 [92]. O NAS é definido como a parte do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos interferentes presentes na amostra. A propriedade de ortogonalidade do NAS pode ser observada pela representação geométrica a seguir [93].



**Figura 10.** Ortogonalidade do NAS

Para dados de segunda ordem, diferentes formas de estimar o NAS foram propostas na literatura [94-96]. Uma discussão comparativa desses métodos de maneira mais aprofundada está além dos objetivos deste trabalho e pode ser encontrada na literatura pertinente [66,93,97]. Figuras de mérito tais como sensibilidade, seletividade e limite de detecção, costumam ser calculadas em função do NAS para métodos de calibração de primeira e segunda ordens.

A sensibilidade (SEN) corresponde à fração do sinal que é acrescida quando a concentração da espécie de interesse tem seu valor elevado em uma unidade [66]. Neste trabalho a SEN será calculada através da equação 8, que é a forma específica da equação geral proposta por Olivieri e Faber [98], considerando que neste trabalho apenas um analito foi determinado. Esta é a mais recente proposta para estimar a SEN de modelos de calibração de segunda ordem, sendo aplicável independentemente do método usado para calcular o NAS e considerada a mais condizente [66,93].

$$SEN = g \left\{ \left[ (\mathbf{b}^T \mathbf{P}_{J,int} \mathbf{b}) * (\mathbf{c}^T \mathbf{P}_{K,int} \mathbf{c}) \right]^{-1} \right\}^{1/2} \quad (8)$$

Na equação 8,  $\mathbf{b}$  e  $\mathbf{c}$  são os vetores com os perfis do analito na segunda e na terceira dimensão, respectivamente;  $\mathbf{P}_{J,int}$  e  $\mathbf{P}_{K,int}$  são as projeções que removem as contribuições das espécies interferentes na segunda e na terceira dimensão, respectivamente. Destaca-se que estes vetores e matrizes contêm apenas perfis normalizados. O fator de escala  $g$  corresponde ao sinal do componente de interesse em concentração unitária. No caso do PARAFAC os

valores de  $g$  equivalem às inclinações das retas ajustadas entre o valor dos escores das amostras de calibração e as concentrações de referência de cada espécie [93].

A seletividade (SEL) é uma medida, variando entre 0 e 1, do grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e o sinal dos interferentes presentes na amostra, indicando quanto do sinal é perdido por essa sobreposição. Neste trabalho, a SEL também será estimada a partir da proposta de Olivieri e Faber [98], de acordo com a equação 9,

$$SEL = \left\{ \left[ (\mathbf{b}^T \mathbf{P}_{J,int} \mathbf{b}) * (\mathbf{c}^T \mathbf{P}_{k,int} \mathbf{c}) \right]^{-1} \right\}^{-1/2} \quad (9)$$

onde os perfis de todas as espécies estão normalizados. Para métodos de ordem zero (univariados) espera-se que a seletividade esteja muito próxima de 1, uma vez que esses métodos exigem que o sinal do analito seja totalmente seletivo, livre de interferentes. Já em relação a métodos de primeira ordem (multivariados) e de segunda ordem (multidimensionais), a situação se inverte, pois tais métodos são utilizados justamente quando o sinal do analito não é seletivo, devido à presença dos interferentes. Essa situação representa um desafio para o reconhecimento de métodos de ordem superior por órgãos reguladores, uma vez que os regulamentos em vigor atualmente [88,99] foram pensados para métodos univariados.

A sensibilidade analítica ( $\gamma$ ) é uma figura de mérito que normalmente não é mencionada em normas ou protocolos de validação. No entanto, ela apresenta de forma clara a sensibilidade do método em função da unidade de concentração que é utilizada. Em analogia com a calibração univariada [100], ela é definida como a razão entre a SEN e o ruído instrumental ( $\epsilon$ ), de acordo com a equação 10. A estimativa do ruído instrumental é calculada como o desvio padrão combinado (*pooled standard deviation*) do sinal analítico em cada comprimento de onda e pode ser estimada a partir de um certo número de replicatas do branco.

$$\gamma = \frac{SEN}{\epsilon} \quad (10)$$

O inverso da sensibilidade analítica ( $\gamma^{-1}$ ) é uma estimativa da diferença de concentração mínima que é discernível pelo método analítico considerando o ruído experimental como única fonte de erro, independente da técnica específica que tenha sido empregada.

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade da espécie de interesse que pode ser detectada pelo método analítico sob as condições experimentais estabelecidas. Neste trabalho, o LD foi calculado de acordo com a seguinte equação,

$$LD = 3,3 \frac{\varepsilon}{SEN} \quad (11)$$

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade da espécie de interesse que pode ser quantificada (com precisão e exatidão adequadas) pelo método analítico sob as condições experimentais estabelecidas, sendo dado pela equação 12.

$$LQ = 10 \frac{\varepsilon}{SEN} \quad (12)$$

É importante ressaltar que quando se emprega adição-padrão de segunda ordem, como neste trabalho, as figuras de mérito SEN, SEL,  $\gamma$ , LD e LQ são específicas para cada amostra e não podem ser calculadas para o método como um todo. Nesses casos, às vezes os autores expressam essas figuras como uma média para um conjunto de amostras [44,101].

Finalmente, neste trabalho, além das figuras já mencionadas, serão estimadas também a exatidão, através do grau de recuperação obtido em cada nível de concentração, e a precisão, através de seu respectivo desvio padrão.

## 4. Parte experimental

### 4.1. Reagentes, soluções e amostras de plasma humano

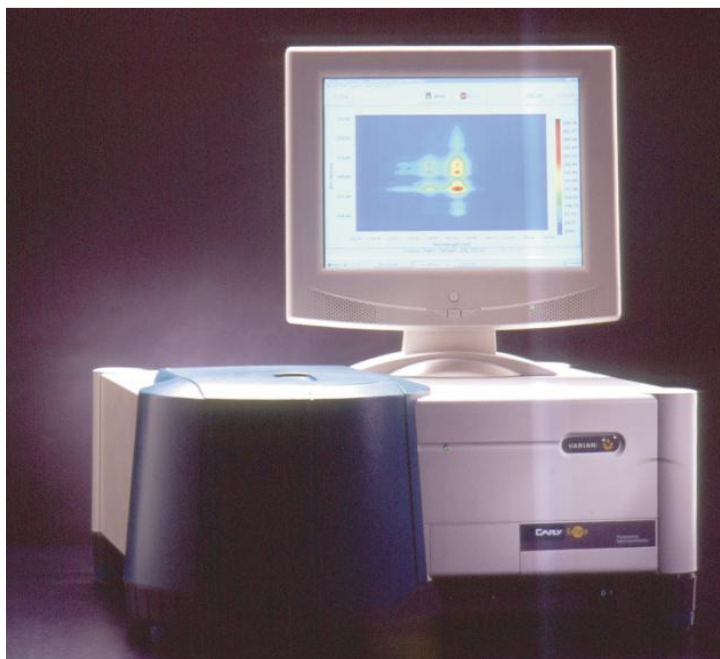
Foi preparada uma solução de RVT  $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  em etanol (*Synth*), devido à baixa solubilidade do RVT em água, e a partir desta, uma solução diluída na concentração de  $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  em água deionizada (Milli-Q). O padrão de RVT, 98,26 % de pureza foi gentilmente cedido pela *Pharma Nostra* (Anápolis, GO). Todas as vidrarias usadas foram deixadas de molho em uma solução 10 % v/v de  $\text{HNO}_3$  (*Synth*) por pelo menos 24 horas e lavadas com água deionizada.

Todos os tampões utilizados foram preparados a partir de uma solução-tampão universal para medidas espectrofotométricas no UV,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , composta por ácido cítrico (*Sigma*), fosfato monobásico de potássio (*Synth*), tetraborato de sódio (*Ecibra*), tris(hidroximetil)aminometano (*Sigma*) e cloreto de potássio (*Synth*), acrescidos da quantidade necessária de uma solução  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido clorídrico (*Nuclear*) ou de uma solução  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  de hidróxido de sódio (*Nuclear*) [102].

Amostras de plasma de cinco voluntários saudáveis de diferentes grupos sanguíneos foram obtidas junto ao Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro) da Unicamp e estocadas à temperatura de  $-8 \text{ }^\circ\text{C}$ . As amostras foram obtidas na forma de plasma fresco congelado, contidas em bolsas plásticas. É importante ressaltar os cuidados com a manipulação dessas amostras, a fim de evitar qualquer risco de contaminação. Elas foram retiradas das bolsas com o auxílio de seringas de plástico descartáveis e toda a manipulação foi conduzida com o uso de luvas cirúrgicas. Todo o material contaminado com plasma (seringas, luvas, bolsas de plástico, etc.) foi descartado em uma caixa coletora apropriada (coletor de materiais perfurocortantes, *Descarpack*). Todas as amostras e soluções que continham plasma foram descartadas em frascos plásticos, que, por sua vez, foram embalados em sacos de polietileno especiais para “resíduos sólidos de serviços de saúde” (*Descarpack*). Todo o material de descarte foi encaminhado para incineração junto ao Hemocentro. Toda vidraria, depois de utilizada, foi deixada de molho em água sanitária por pelo menos 12 horas.

#### 4.2. Instrumentação e análise dos dados

Os espectros foram obtidos em um espectrofluorímetro *Varian Cary Eclipse* (Figura 11) e usando uma cubeta de quartzo apropriada, de 10,00 mm de caminho ótico. Os dados foram analisados no programa *MATLAB™*, versão 6.5 (*The MathWorks*, Natick, EUA), usando o pacote *The N-way Toolbox for MATLAB*, versão 2.10 [68]. As medidas de pH foram registradas em um pHmetro *Corning*, modelo 350. A estimativa das figuras de mérito SEN, SEL,  $\gamma$ , LD e LQ foi feita a partir das rotinas elaboradas por Braga [93].



**Figura 11.** Espectrofluorímetro *Varian Cary Eclipse* usado na obtenção das superfícies espectrais.

#### 4.3. Procedimentos

Um experimento prévio foi feito visando a estimativa dos perfis de concentração do RVT em função do pH, preparando-se 21 soluções de RVT  $3,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  em água deionizada, em balões de 10,0 mL, tamponadas em valores de pH variando de 5,0 a 9,6.

Visando a escolha de uma faixa linear de concentração de RVT para a aplicação do método, foram registradas as superfícies espectrais das amostras de um mesmo plasma diluídas dez vezes em balões de 5,00 mL na faixa de concentração de 0,50 a 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , todas tamponadas em pH 4,0.

Para a determinação de RVT por adição-padrão, amostras de plasma foram contaminadas com RVT na faixa de concentração de 0,10 a 5,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O plasma de um indivíduo diferente foi usado para cada nível de concentração. Considerou-se a concentração de RVT nas amostras de plasma, antes da contaminação, igual a zero. As amostras foram diluídas dez vezes antes de cada determinação. Para cada medida, foram utilizados cinco balões de 10,00 mL; em cada balão foram adicionados 1,00 mL do plasma contaminado mais 1,00 mL de solução-tampão em pH 4,0; além disso foram adicionados 0, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de RVT 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente em cada um dos cinco balões. Todos os balões foram completados com água deionizada. Todas as determinações foram feitas com amostras em triplicata.

Para a estimativa do ruído instrumental foram feitas 10 leituras de uma mesma amostra de plasma não contaminada com RVT.

Todas as superfícies espectrais foram obtidas na faixa de excitação de 280 a 360 nm (passo 5 nm) e na faixa de emissão de 380 a 550 nm (passo 2 nm). A largura da fenda de emissão foi de 10,0 nm e a de excitação foi 5,0 nm. A velocidade de varredura foi de 9600  $\text{nm min}^{-1}$ .

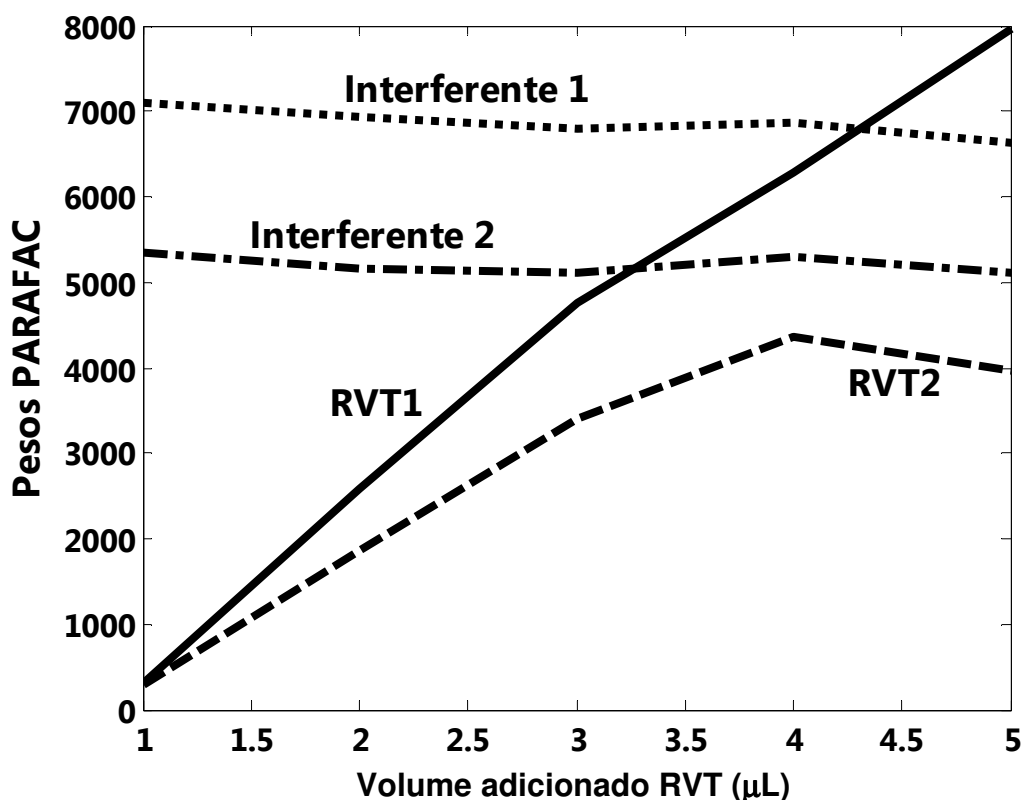


## 5. Resultados e Discussão

Durante o preparo e medida de todas as amostras deste trabalho, além do controle do pH outros cuidados foram tomados para minimizar a possível isomerização do RVT na forma *cis*, tais como a proteção de todas as amostras contendo RVT com papel alumínio; todas as soluções de trabalho usadas foram preparadas no mesmo dia em que foram medidas e a velocidade de obtenção das superfícies espectrais foi alta,  $9600 \text{ nm min}^{-1}$ , com o objetivo de irradiar a amostra pelo menor tempo possível. Além disso, um estudo preliminar foi realizado através de leitura em triplicata de uma amostra contendo uma solução de RVT em água, com o objetivo de observar a possível isomerização do RVT em sua forma *cis*. Os espectros obtidos não apresentaram mudanças perceptíveis, o que demonstrou que uma exposição das amostras de RVT à irradiação UV por três vezes mais tempo que a sofrida durante a obtenção dos espectros não foi suficiente para causar sua isomerização.

### 5.1. Estimativa dos perfis de concentração do RVT em função do pH

Devido ao fato da intensidade de fluorescência do RVT ser maior em pH 10,0 [103], inicialmente as medidas foram feitas em meio tamponado nesse valor. No entanto, na decomposição dos dados resultantes dessas medidas, observou-se que os pesos das amostras de dois fatores apresentaram comportamento crescente em função da adição de RVT (Figura 12). Isso não era esperado, uma vez que, ao fazer a decomposição dos dados, apenas o fator referente ao RVT deve apresentar comportamento crescente em função da adição, pois se espera que a concentração dos interferentes se mantenha aproximadamente constante. Uma hipótese para o comportamento observado é a presença de duas espécies provenientes da ionização do RVT, visto que o valor de pH em que foram feitas as medidas está próximo dos valores de  $pK_a$  observados para o RVT [103-106]. Portanto, nessa região de pH deve existir mais de uma espécie ionizada do RVT e essas espécies devem apresentar diferentes espectros de emissão [103].

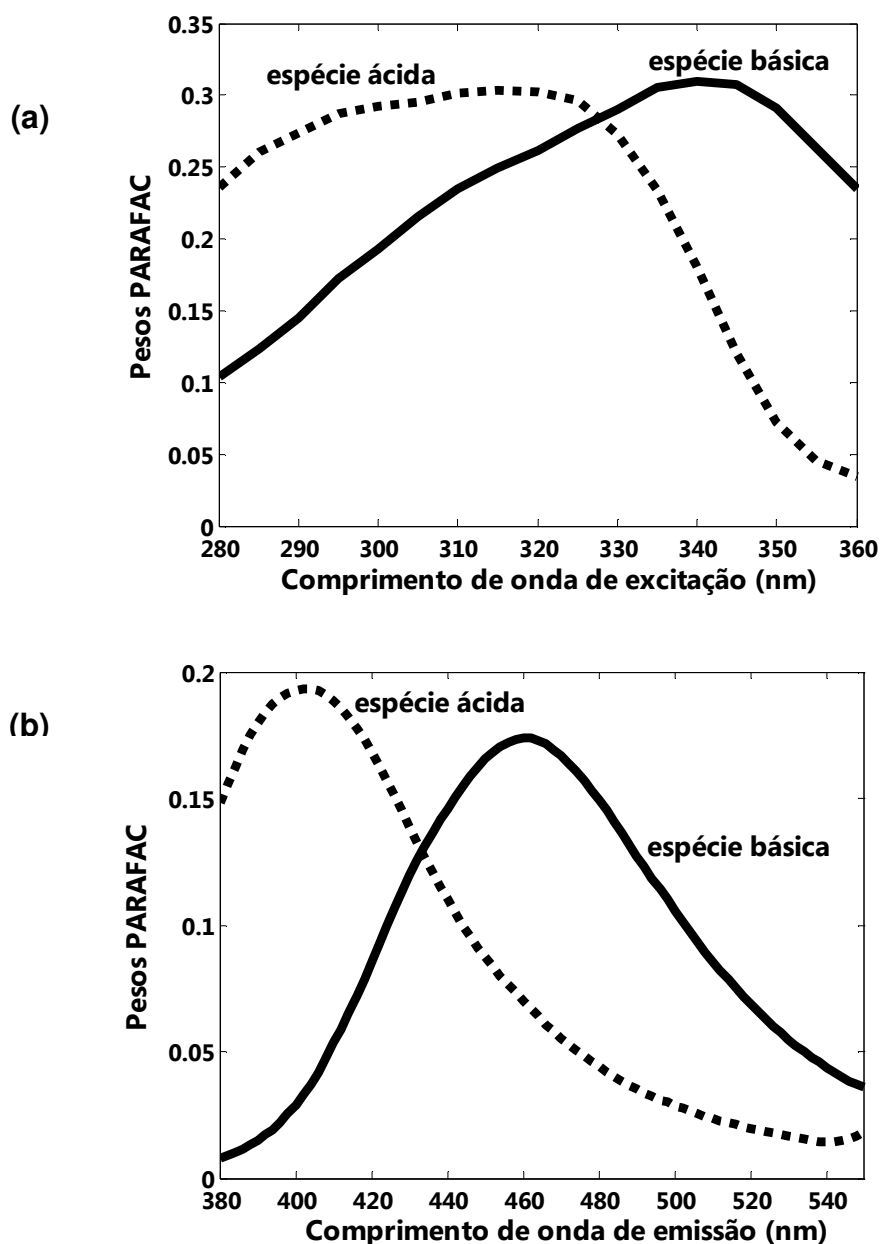


**Figura 12.** Pesos das amostras (escores) obtidos para um modelo PARAFAC em pH 10,0.

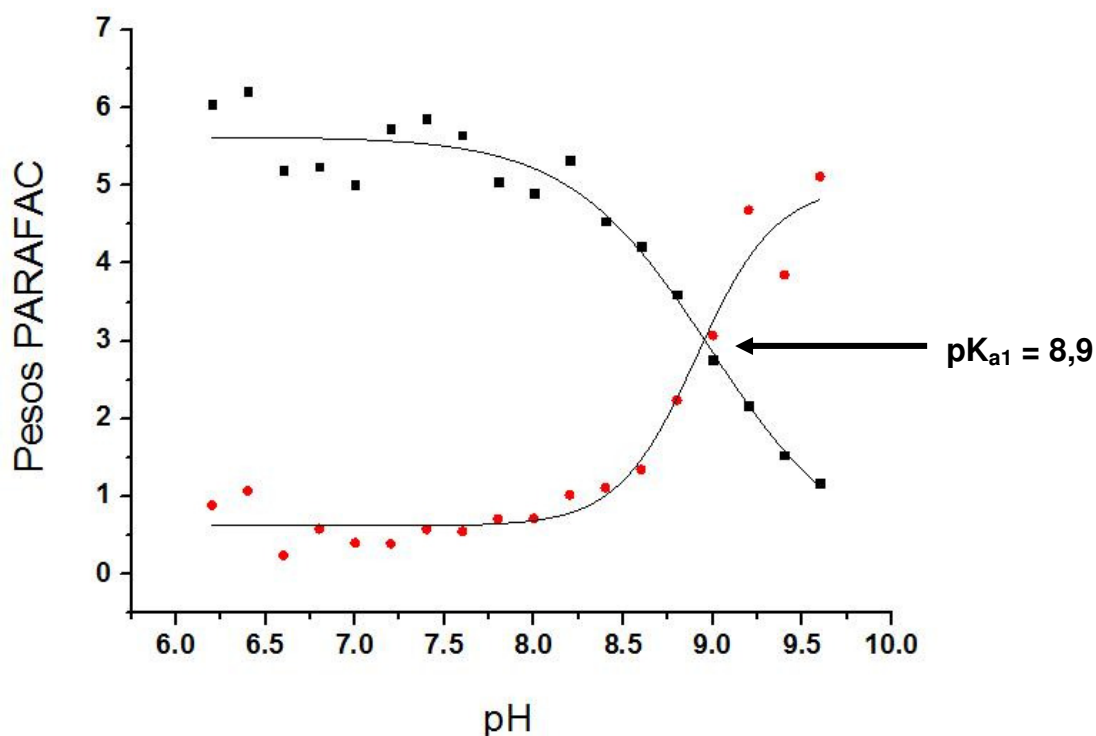
Dada a necessidade de escolher a região mais adequada para tamponar as soluções de trabalho, foi elaborado um novo experimento visando estimar os perfis de concentração do RVT em função do pH, baseado em medidas espectrofluorimétricas obtidas em uma concentração fixa de RVT,  $3,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os dados obtidos foram decompostos por um modelo PARAFAC a partir de uma matriz de dados tridimensional formada por 21 valores de pH, 17 comprimentos de onda de excitação e 86 comprimentos de onda de emissão. Um modelo com dois fatores e restrição de não-negatividade em todas as dimensões permitiu identificar as espécies ácida e básica do RVT, cujos pesos forneceram os respectivos espectros de excitação e emissão (Figura 13). Além disso, os pesos da primeira dimensão obtidos nesse modelo forneceram um perfil de variação dessas espécies em função do pH, através de um gráfico alfa (Figura 14). Curvas sigmoidais foram ajustadas às distribuições das duas espécies e a intersecção dessas curvas forneceu uma estimativa do valor de  $\text{pK}_{a1}$  de 8,9 para o RVT. Esse valor está muito próximo ao encontrado na literatura, 8,8, também determinado por

espectrofluorimetria [103]. Além disso, outros valores de  $pK_{a1}$  encontrados para o RVT podem ser citados, 8,2 [104] e 8,1 [105], ambos determinados espectrofotometricamente, e 9,49, determinado por eletroforese capilar [106]. Certamente a concordância do valor de  $pK_{a1}$  para o RVT estimada neste trabalho com o valor estimado por López-Nicolás *et al* [103], também usando espectrofluorimetria, se deve ao fato de que a maioria das espécies apresenta um valor de  $pK_a$  no estado excitado diferente do valor no estado fundamental [107].



**Figura 13.** Espectros de excitação (a) e emissão (b) obtidos para as espécies ácida e básica do RVT, através dos pesos de um modelo PARAFAC.



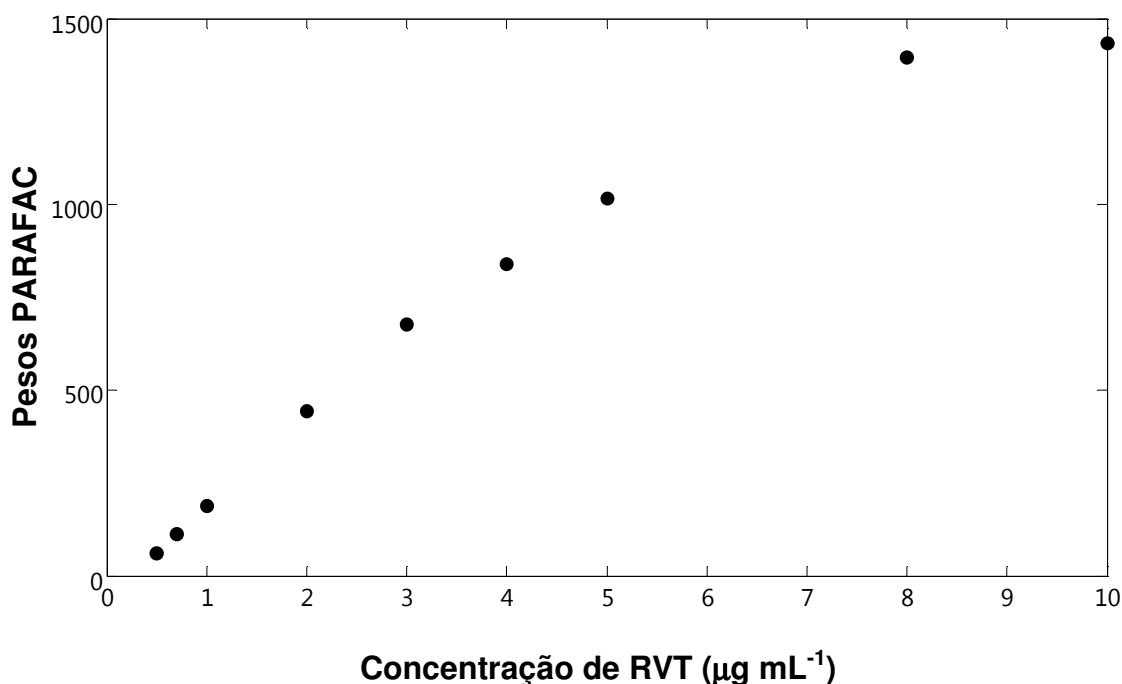
**Figura 14.** Distribuição das espécies ácida e básica do RVT em função do pH, obtidas através dos pesos de um modelo PARAFAC.

Depois de estimado o  $pK_{a1}$  do RVT, optou-se por trabalhar em região ácida (pH 4,0). Além disso, um estudo mostra que valores de pH mais ácidos favorecem a isomerização da forma *cis* na forma *trans* do resveratrol [108].

### 5.2. Determinação da faixa de estudo do RVT no plasma

Para a escolha da faixa de trabalho da concentração do RVT no plasma, foi elaborado um experimento baseado em medidas espectrofluorimétricas em função da variação de concentração, numa faixa de 0,50 a 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de RVT em plasma. Os dados obtidos foram decompostos por um modelo PARAFAC a partir de uma matriz de dados tridimensional formada por 9 valores de concentração, 17 comprimentos de onda de excitação e 86 comprimentos de onda de emissão. Um modelo com três fatores e restrição de não-negatividade em todas as dimensões permitiu identificar a melhor faixa para determinação do RVT em plasma e também o desvio de linearidade, devido à supressão da fluorescência observada em concentrações de RVT acima de 8,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 15). O perfil obtido nessa curva

de calibração corroborou para a escolha da faixa de concentração de RVT a ser determinada nesse trabalho, 0,10 a 5,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a qual é condizente com os valores encontrados na literatura [8,33-41] para esse tipo de aplicação.



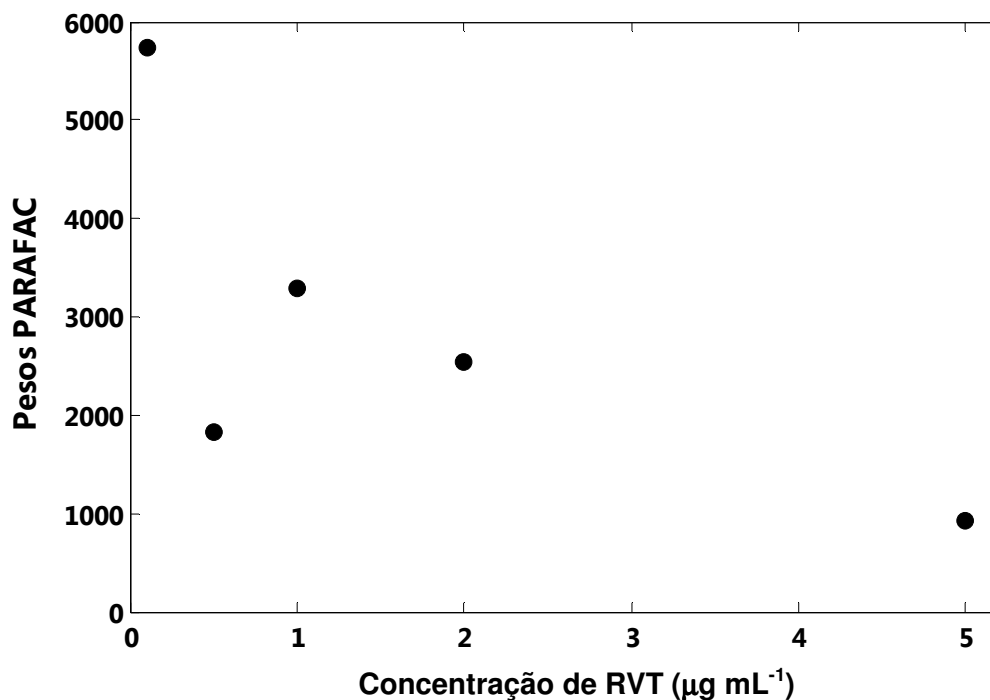
**Figura 15.** Curva de calibração para o RVT obtida através dos pesos da primeira dimensão (escores) de um modelo PARAFAC.

### 5.3. Determinação de RVT em plasma por adição-padrão

Através de um estudo prévio foi observado que plasmas de diferentes indivíduos apresentaram grande diferença na intensidade de fluorescência quando contaminados com a mesma quantidade de RVT. Essa diferença foi notada visualmente pela observação das intensidades máximas dos picos, e também pela comparação dos escores de um modelo PARAFAC (387, 1466 e 1771) obtido para três diferentes plasmas contaminados com a mesma concentração de RVT.

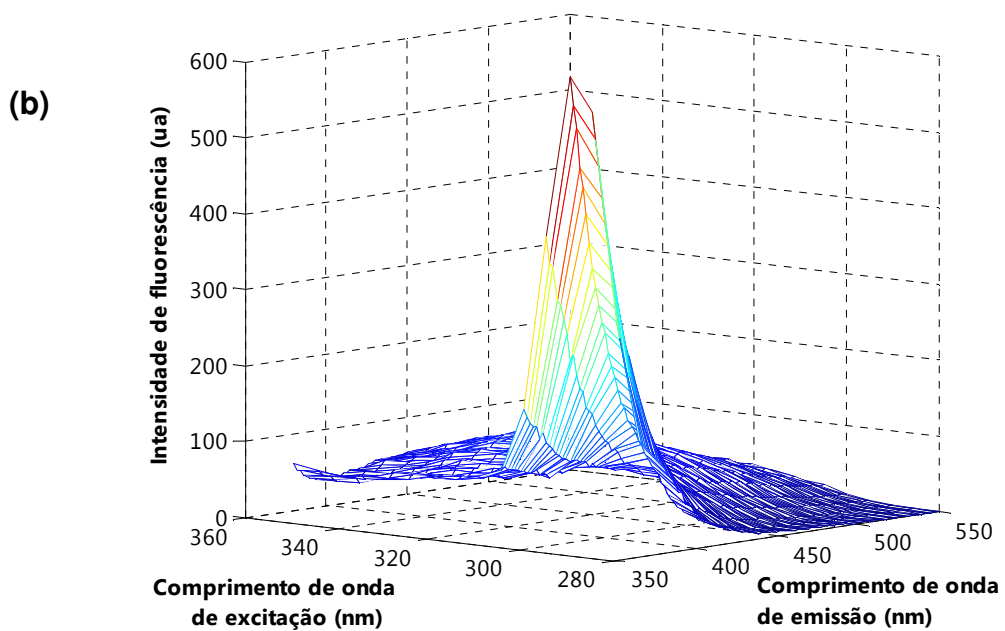
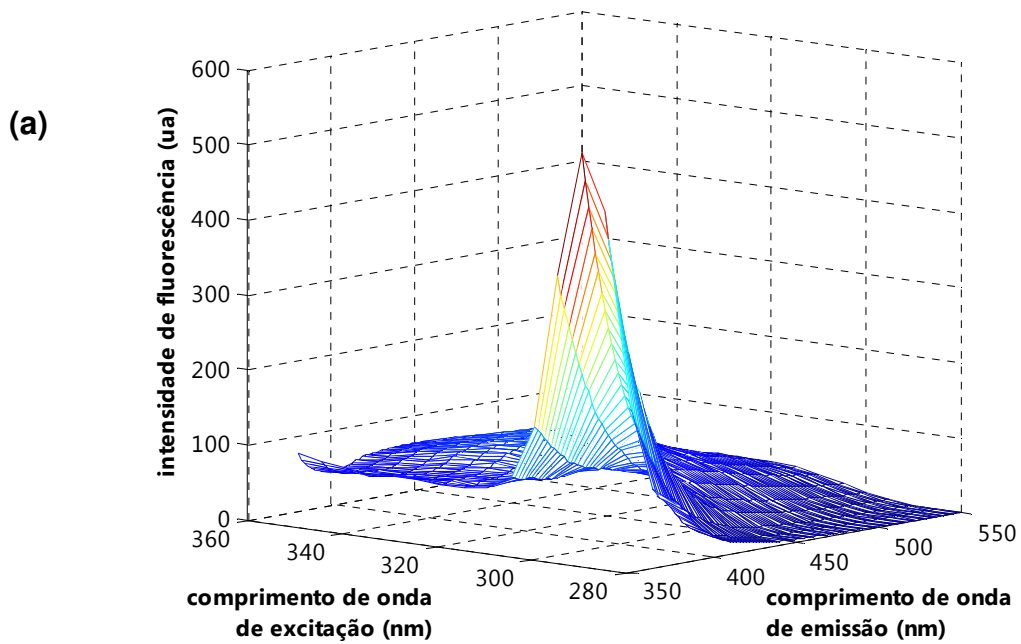
Um outro estudo foi realizado com o objetivo de observar o comportamento dos escores com o aumento da concentração de RVT em amostras de plasma diferentes. Como pode ser observado na Figura 16, os escores obtidos através de um modelo PARAFAC para diferentes amostras de plasma, cada uma delas contaminada com uma concentração de RVT diferente não mostram um

comportamento linear em função da concentração do RVT. Esta observação indica um efeito de matriz individual que impede uma calibração externa e demanda o uso do método de calibração interna (adição-padrão) para a determinação do RVT em plasma.



**Figura 16.** Pesos das amostras (escores) obtidos para um modelo PARAFAC com cinco diferentes amostras de plasma, dopadas com concentrações diferentes de RVT.

A opção escolhida para a determinação de RVT em plasma foi o uso do método da adição-padrão, indicado para situações como a deste trabalho, em que o efeito de matriz inviabiliza a construção de uma curva de calibração externa. Um dos aspectos a ser destacado nesta metodologia é o fato de que a curva de adição-padrão foi construída usando os pesos das amostras (escores) de um modelo PARAFAC, ao invés do sinal instrumental puro. Esses pesos equivalem ao sinal “filtrado”, livre do sinal dos interferentes. Superfícies de excitação-emissão, obtidas para uma amostra de plasma puro e para esta mesma amostra dopada com  $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de RVT, são mostradas na Figura 17.



**Figura 17.** Superfícies de excitação-emissão de: (a) uma amostra de plasma puro e (b) uma amostra do mesmo plasma dopada com  $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de RVT.

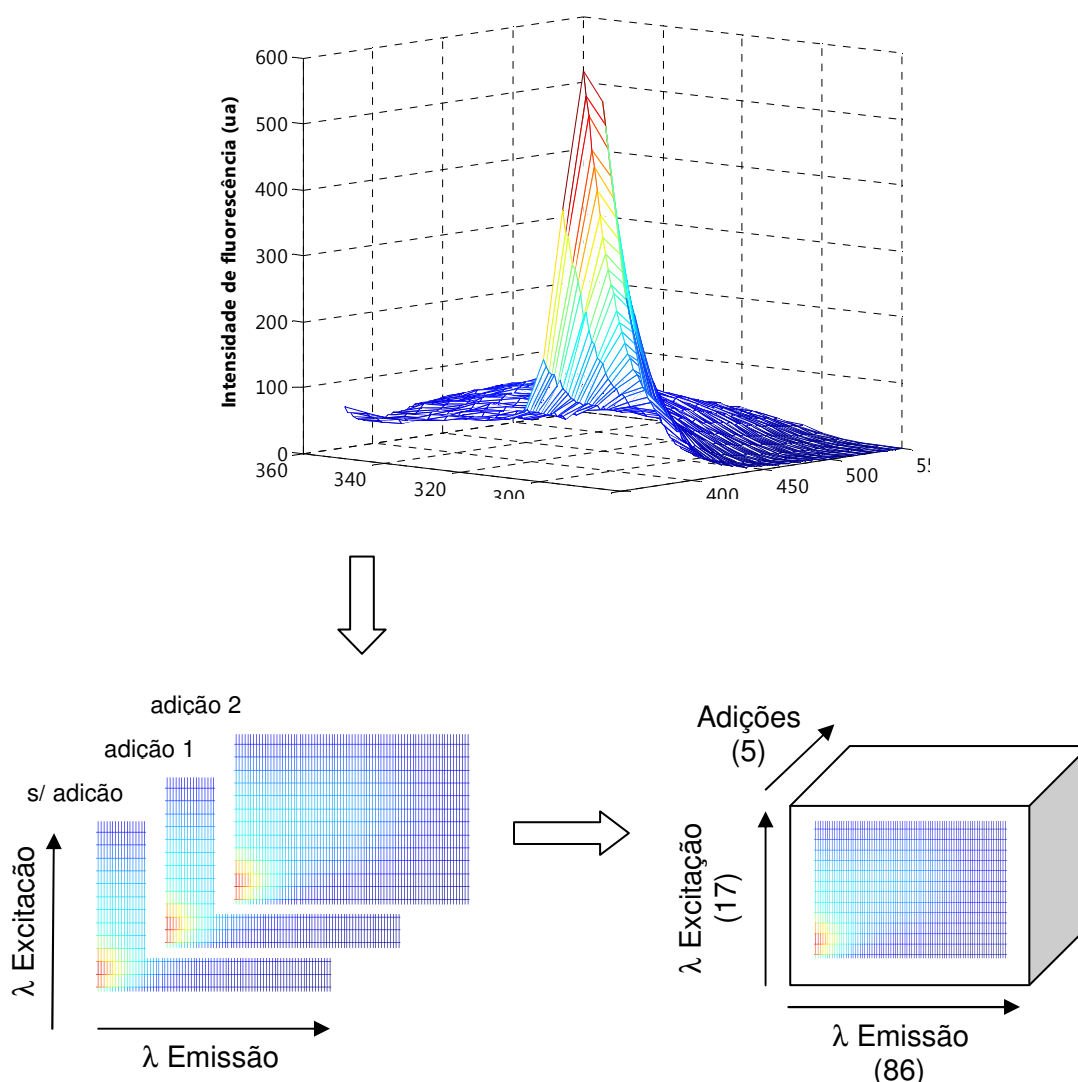
Observando a superfície espectral na Figura 17a, nota-se que o plasma puro apresenta uma banda intensa com máximo de excitação/emissão em aproximadamente 300/380 nm. A adição de RVT (Figura 17b) alargou e aumentou a intensidade desta banda. No entanto, visualmente a mudança espectral é um tanto sutil, devido ao fato de o espectro de fluorescência do RVT ser fortemente sobreposto pelo espectro do triptofano. O triptofano é um aminoácido presente no plasma humano, que apresenta uma banda de fluorescência larga e intensa com um máximo de excitação/emissão em 298/348 nm [109], sendo o principal interferente nesta região espectral [43]. Conforme observado na Figura 13, a forma ácida do RVT (que é a espécie determinada aqui) em água pura apresenta uma larga banda de excitação com máximo em 316 nm (Figura 13a) e uma banda de emissão centrada em 403 nm. No plasma esses valores de máximo podem ser um pouco deslocados, devido à interação do RVT com proteínas. Outro aspecto a ser destacado é a justificativa para a parte inicial da banda de emissão do RVT ( $\lambda < 380$  nm, Figura 13b) ter sido cortada da região analisada. O motivo foi a presença de espalhamento Rayleigh, o qual ocorre quando o comprimento de onda de emissão é aproximadamente igual ao comprimento de onda de excitação e apresenta comportamento não-linear, dificultando ou mesmo impedindo, a modelagem pelo PARAFAC.

Um modelo PARAFAC foi construído para cada uma das triplicatas de cada amostra a partir de arranjos de dados tridimensionais formados por 5 medidas (a amostra original mais 4 adições), 17 comprimentos de onda de excitação e 86 comprimentos de onda de emissão. No total foram construídos 15 modelos (triplicatas de cinco níveis de concentração). A Figura 18 representa a montagem desses arranjos cúbicos de dados. Alternativamente, foram também testados modelos que incluíam na mesma análise as três triplicatas de um mesmo nível de concentração (15x17x86). No entanto, esses resultados foram inferiores aos obtidos com a estratégia anterior.

Os melhores modelos foram selecionados com 4 fatores na maioria dos casos (no caso de um dos plasmas, os melhores modelos foram obtidos com 6 fatores), e sempre explicaram mais de 99,90 % da variância total dos dados. A Tabela 2 apresenta o número de fatores extraídos com o modelo PARAFAC e o tipo de restrição imposta ao modelo para cada um dos plasmas analisados. Nesta Tabela



também são mostradas as médias dos valores dos coeficientes de correlação das curvas de adição-padrão obtidas em cada modelo. Os valores de CORCONDIA obtidos estiveram entre 2 e 60 %, indicando, em vários casos, deficiência/inconsistência de trilinearidade. Entretanto, os melhores modelos foram escolhidos não em função da adequação dos dados, mas dos menores erros de previsão. Modelos com três fatores apresentaram quase 100% de trilinearidade, mas forneceram erros de previsão muito superiores aos modelos com quatro ou mais fatores. Além disso, eles apresentaram alta variância residual sistemática e significativa, indicando que existiam mais fatores a serem extraídos.

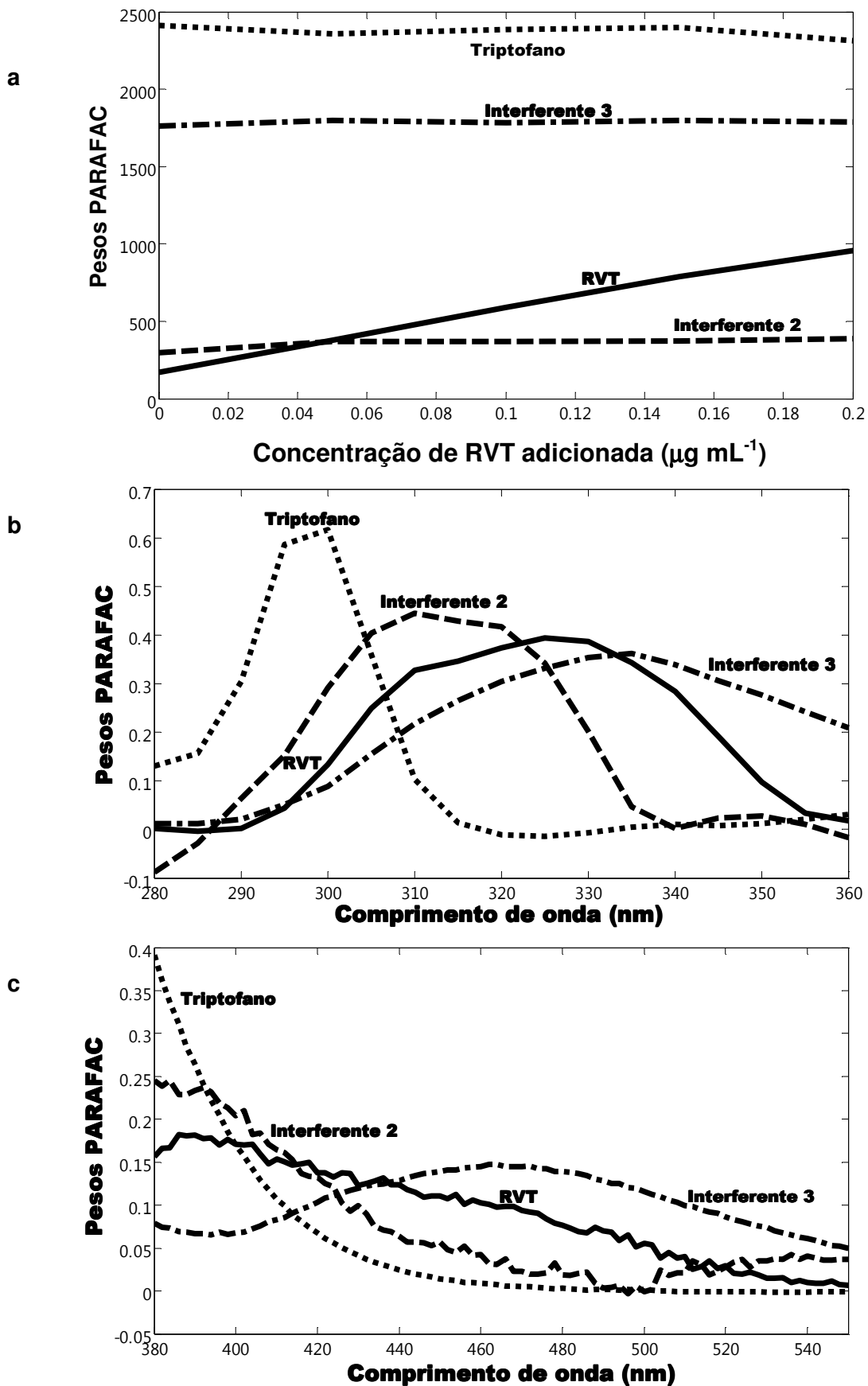


**Figura 18.** Representação da montagem dos arranjos cúbicos de dados analisados nesta aplicação. Superfície de excitação-emissão para a amostra de plasma dopada com  $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de RVT.

**Tabela 2.** Número de fatores e restrições dos modelos PARAFAC analisados neste trabalho e os coeficientes de correlação médios das curvas de adição-padrão obtidas.

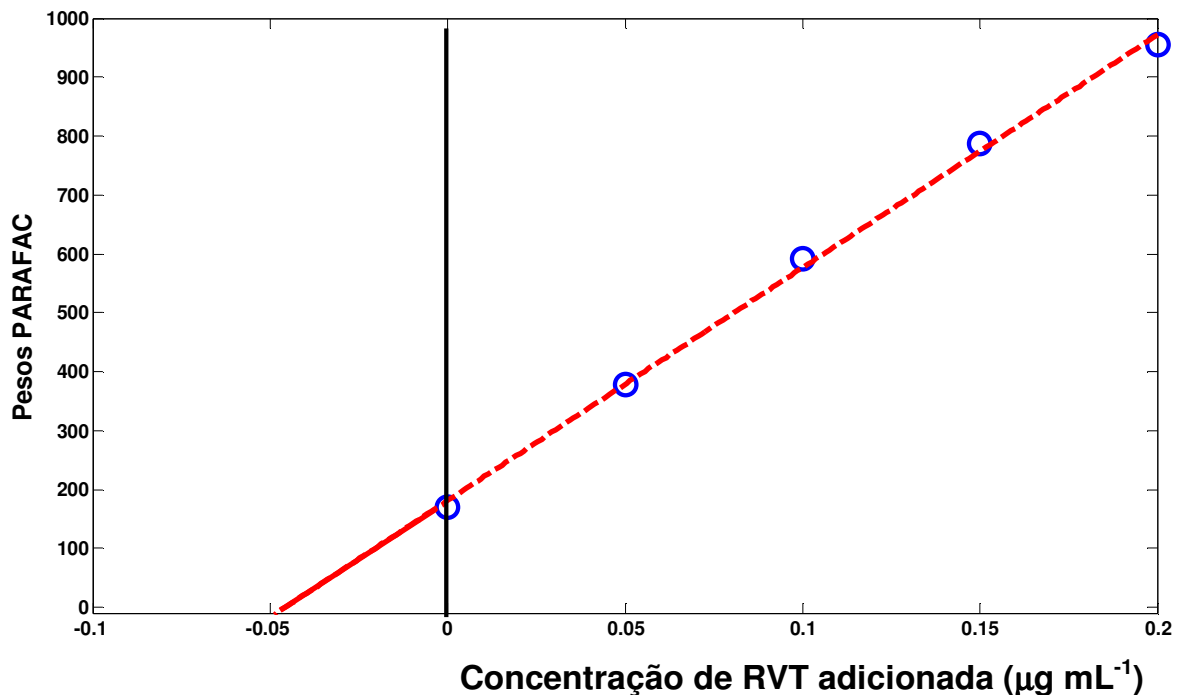
| Amostra  | [RVT]<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Número de<br>fatores | Restrições do<br>PARAFAC | Coefficientes de<br>Correlação |
|----------|------------------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Plasma 1 | 0,10                               | 6                    | Não-negatividade         | 0.994                          |
| Plasma 2 | 0,50                               | 4                    | Sem<br>restrição         | 0,999                          |
| Plasma 3 | 1,00                               | 4                    | Não-negatividade         | 0,989                          |
| Plasma 4 | 2,00                               | 4                    | Não-negatividade         | 0,990                          |
| Plasma 5 | 5,00                               | 4                    | Não-negatividade         | 0,998                          |

Os fatores obtidos foram atribuídos ao RVT e a três interferentes. Em uma das amostras, foram modelados cinco interferentes, o que pode ser explicado pela presença de outras substâncias fluorescentes na composição dessa amostra específica de plasma. Os pesos obtidos no modelo PARAFAC, relativos às dimensões espectrais de excitação e de emissão são mostrados na Figura 19. O interferente 1 foi identificado como sendo o triptofano [43,69,109]. Os outros interferentes não puderam ser identificados com exatidão, mas algumas espécies podem ser sugeridas com base na literatura [109], tais como a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e a riboflavina (vitamina B2) ou seus metabólitos. Observando-se os pesos de excitação do RVT e comparando-se com os espectros obtidos em água pura (Figura 13a), nota-se a presença de um deslocamento batocrômico no plasma e também a queda da intensidade de fluorescência, devido à supressão do sinal (*quenching*) provocada pela interação das proteínas com o analito. Os pesos da dimensão das amostras no modelo PARAFAC são proporcionais à composição das espécies fluorescentes presentes nas mesmas e também podem ser vistos na Figura 19.



**Figura 19.** (a) Pesos das amostras no modelo PARAFAC. Espectros de fluorescência deconvoluídos, obtidos através dos pesos do modelo PARAFAC: (b) excitação, (c) emissão.

Os pesos relativos ao RVT foram usados em regressões lineares univariadas e todas as curvas de adição-padrão apresentaram coeficientes de correlação de mínimo 0,99. Os resultados para a determinação das amostras apresentaram um grau de recuperação que variou de 95,5 a 110,0 %. Uma reta de adição-padrão típica é mostrada na Figura 20, para uma das triplicatas da amostra  $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de RVT. Os resultados das determinações das 5 amostras (estimativas da média e do desvio padrão das triplicatas) são mostrados na Tabela 3, juntamente com os erros em relação aos valores esperados. A realização de testes-t com 95 % de confiança e 2 graus de liberdade mostrou que os quatro primeiros valores estimados na Tabela 3 foram concordantes com os valores de referência.



**Figura 20.** Reta de adição-padrão para a amostra de plasma  $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de RVT.

**Tabela 3.** Determinação de RVT em plasma usando PARAFAC e adição-padrão

| <b>Quantidade adicionada</b><br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | <b>Quantidade estimada</b><br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) <sup>a</sup> | <b>Grau de recuperação</b><br>(%) |
|---|--|-----------------------------------|
| 0,10  | 0,11 $\pm$ 0,02  | 110,0                             |
| 0,50  | 0,49 $\pm$ 0,06  | 98,0                              |
| 1,00  | 1,06 $\pm$ 0,06  | 106,0                             |
| 2,00  | 1,91 $\pm$ 0,08  | 95,5                              |
| 5,00  | 5,37 $\pm$ 0,02  | 107,4                             |

<sup>a</sup> Valores médios e desvios padrão de três determinações

#### 5.4. Estimativa das Figuras de Mérito

A maioria das figuras de mérito estimadas para a validação do método proposto neste trabalho é mostrada na Tabela 4. Como foi previamente enfatizado, os valores das figuras de mérito SEN, SEL,  $\gamma$ , LD e LQ são específicos para cada amostra. Já que existe grande diferença de sensibilidade entre as amostras, optou-se por não expressar valores médios para o método como um todo. Os valores calculados foram corrigidos considerando a diluição das amostras (10 vezes). Os valores do inverso da  $\gamma$  forneceram boas estimativas das diferenças de concentração que o método é capaz de distinguir para cada amostra (estimativas que consideram apenas o ruído experimental como fonte de erro). As grandes diferenças de sensibilidade observadas na Tabela 4 se justificam devido ao forte efeito de matriz individual que ocorre em cada amostra, levando a diferentes intensidades de supressão do sinal fluorescente. É interessante comparar a Figura 16 com os dados da Tabela 4 e notar a coerência dos resultados. Quanto menor o valor do escore de um plasma (maior supressão, Figura 16), menor a sensibilidade da determinação nessa amostra (Tabela 4).

**Tabela 4.** Figuras de mérito estimadas para o método analítico proposto.

|          | [RVT]<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | SEN <sup>a</sup> | SEL  | $\gamma$<br>( $\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$ ) | $\gamma^{-1}$<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | LD    | LQ    |
|----------|------------------------------------|------------------|------|---|--|-------|-------|
| Plasma 1 | 0,10                               | 1450,0           | 0,15 | 1856,5  | 0,001                                      | 0,002 | 0,005 |
| Plasma 2 | 0,50                               | 315,6            | 0,08 | 411,2   | 0,002                                      | 0,008 | 0,024 |
| Plasma 3 | 1,00                               | 1054,1           | 0,08 | 1373,4  | 0,002                                      | 0,002 | 0,007 |
| Plasma 4 | 2,00                               | 632,4            | 0,11 | 823,8   | 0,003                                      | 0,004 | 0,012 |
| Plasma 5 | 5,00                               | 181,7            | 0,05 | 238,7   | 0,011                                      | 0,013 | 0,042 |

<sup>a</sup> Valores expressos como a razão entre unidades de intensidade de fluorescência e de concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

Os valores estimados de LD e LQ mostram que o método atende aos requisitos para aplicação em análises clínicas. Além dos parâmetros mostrados na tabela acima, também foram avaliadas a exatidão, através do grau de recuperação, que em média apresentou o valor de 103,4 %, e a precisão através do desvio padrão para cada nível de concentração (Tabela 3). A precisão foi avaliada no nível de repetibilidade e a precisão média, para o método como um todo, foi estimada em 8,1 %.

## 6. Conclusão

Este trabalho demonstrou que a combinação de dados espectrofluorimétricos de segunda ordem, PARAFAC e o método da adição-padrão tornou possível a determinação direta de RVT em uma matriz complexa como o plasma humano, mesmo na presença de interferentes previamente desconhecidos. Foram obtidos bons resultados para a faixa de concentração de RVT entre 0,10 e 5,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com erros de previsão de no máximo 10,0 % e precisão média de 8,1 %. O método proposto foi validado através da estimativa das figuras de mérito sensibilidade, sensibilidade analítica, seletividade e limites de detecção e quantificação. Os valores estimados para esses parâmetros apresentaram grande variação de amostra para amostra, demonstrando a presença de um forte efeito de matriz.

A metodologia proposta explorou a vantagem de segunda ordem e permitiu a extração dos perfis espectrais de excitação e de emissão do analito e dos interferentes, tornando possível a identificação destes. Uma vantagem associada ao uso dessa estratégia quimiométrica é o pequeno número de amostras necessário para se desenvolver o modelo e obter bons resultados. Além disso, o método proposto apresentou vantagens, tais como baixo custo operacional e rapidez nas análises, não necessitando de etapas prévias de extração e separação. O tempo gasto para a realização de cada medida foi de aproximadamente 1 min, bastante inferior ao tempo de uma corrida cromatográfica típica encontrada na literatura para a determinação de RVT, que foi de 11 min [8].

A contribuição deste trabalho pode ainda ser estendida à proposição de novas alternativas para a determinação de RVT em outras matrizes complexas, tais como vinhos e sucos de uva.

## Referências Bibliográficas

- [1] Langcake, P.; Pryce, R.J. "The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury". *Physiol. Plant Pathol.* **1976**, *9*, 77.
- [2] Baur, J.A.; Sinclair, D.A. "Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence". *Nature Rev. Drug. Disc.* **2006**, *5*, 493.
- [3] Sautter, C.K.; Denardin, S.; Alves, A.O.; Mallmann, C.A.; Penna, N.G.; Hecktheuer, L.H. "Determinação de resveratrol em sucos de uva do Brasil". *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2005**, *25*, 437.
- [4] Souto, A.A.; Carneiro, M.C.; Seferin, M.; Senna, M.J.H.; Conz, A.; Gobbi, K. "Determination of *trans*-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC". *J. Food Comp. Anal.* **2001**, *14*, 441.
- [5] Cantos, E.; Espin, J.C.; Fernandez, M.J.; Oliva, J.; Tomas-Barberan, F.A. "Postharvest UV-C-Irradiated grapes as a potential for producing stilbene-enriched red wines". *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1208.
- [6] Jeandet, P.; Douillet-Breuil, A.C.; Bessis, R.; Debord, S.; Sbaghi, M.; Adrian, M. "Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism". *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2731.
- [7] Arichi, H.; Kimura, Y.; Okuda, H.; Baba, K.; Kozawa, M.; Arichi, S. "Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism". *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 1766.
- [8] Katsagonis, A.; Atta-Politou, J.; Koupparis, M.A. "HPLC Method with UV Detection for the Determination of *trans*-resveratrol in Plasma". *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2005**, *28*, 1393.
- [9] Goldberg, D.M.; Ng, E.; Karumanchiri, A.; Yan, J.; Diamandis, E.P.; Soleas, G.J. "Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct injection high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. A* **1995**, *708*, 89.
- [10] Roggero, J.P. "Changes in resveratrol and piceid contents in wines during fermentation or ageing. Comparison of Garnacha and Mourvedre varieties". *Sci. Aliments* **1996**, *16*, 631.
- [11] Takaoka, M.J. "Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *J. Faculty Sci. Hokkaido Imperial University* **1940**, *3*, 1.
- [12] Creasy, L.L.; Coffee, M. "Phytoalexin production potential of grape berries". *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1988**, *113*, 230.
- [13] Jeandet, P.; Bessis, R.; Gautheron, B. "The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages". *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 41.
- [14] Jeandet, P.; Bessis, R.; Sbaghi, M.; Meunier, P. "Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis* attacks under natural conditions". *J. Phytopathol.* **1995**, *143*, 135.



- [15] Roggero, J.P.; Garcia-Parrilla, C. "Effects of ultraviolet irradiation on resveratrol and changes in resveratrol and various of its derivatives in the skins of ripening grapes". *Sci. Aliments* **1995**, *15*, 411.
- [16] Siemann, E.H.; Creasy, L.L. "Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine". *Am. J. Enol. Vitic.* **1992**, *43*, 49.
- [17] Renaud, S.; Lorgeil, M. "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease". *Lancet* **1992**, *20*, 1523.
- [18] Jang, M.; Cai L.; Udeani G.O.; Slowing K.V.; Thomas C.F.; Beecher C.W.W.; Fong H.H.S.; Farnsworth N.R.; Kinghorn A.D.; Mehta R.G.; Moon R.C.; Pezzuto J.M. "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes". *Science* **1997**, *275*, 218.
- [19] Bradamante, S.; Barenghi, L.; Villa, A. "Cardiovascular protective effects of resveratrol". *Cardiovasc. Drug. Rev.* **2004**, *22*, 169.
- [20] Wang, Q.; Xu, J.; Rottinghaus, G.E.; Simonyi, A.; Lubahn, D.; Sun, G.Y.; Sun, A.Y. "Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils". *Brain Res.* **2002**, *958*, 439.
- [21] Sinha, K.; Chaudhary, G.; Gupta, Y.K. "Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats". *Life Sci.* **2002**, *71*, 655.
- [22] Howitz, K.T.; Bitterman, K.J.; Cohen, H.Y.; Lamming, D.W.; Lavu, S.; Wood, J.G.; Zipkin, R.E.; Chung, P.; Kisielewski, A.; Zhang, L.L.; Scherer, B.; Sinclair, D.A. "Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan". *Nature* **2003**, *425*, 191.
- [23] Valenzano, D.R.; Terzibasi, E.; Genade, T.; Cattaneo, A.; Domenici, L.; Cellarino, A. "Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr. Biol.* **2006**, *16*, 296.
- [24] Pinto, M.C.; García-Barradok, J.A.; Macías, P. "Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase". *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4842.
- [25] Ratna, W.N.; Simonelli, J.A. "The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression". *Life Sci.* **2002**, *70*, 1577.
- [26] Subbaramaiah, K.; Chung, W.J.; Michaluart, P.; Telang, N.; Tanabe, T.; Inoue, H.; Jang, M.; Pezzuto, J.M.; Dannenberg, A.J. "Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells". *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 21875.
- [27] Pace-Asciak, C.R.; Rounova, O.; Hahn, S.E.; Diamandis, E.P.; Goldberg, D.M. "Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subject". *Clin. Chim. Acta* **1996**, *246*, 163.
- [28] Olas, B.; Wachowicz, B.; Stochmal, A.; Oleszek, W. "Anti-platelet effects of different phenolic compounds from *Yucca schidigera* Roezl bark". *Platelets* **2002**, *13*, 167.

- [29] Stewart, J.R.; Christman, K.L.; O'Brian, C.A. "Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: Inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation". *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1355.
- [30] Schneider, Y.; Vincent, F.; Duranton, B.; Badolo, L.; Gossé, F.; Bergmann, C.; Seiler, N.; Raul, F. "Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells". *Cancer Lett.* **2000**, *158*, 85.
- [31] [http://www.terraternal.com/Resveratrol\\_pt.aspx](http://www.terraternal.com/Resveratrol_pt.aspx), acessado em setembro de 2009.
- [32] <http://www.miligrama.far.br>, acessado em setembro de 2009.
- [33] Walle, T.; Hsieh, F.; DeLegge, M.H.; Oatis Jr., J.E.; Walle, U.K. "High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans". *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 1377.
- [34] Zhu, Z.; Klironomos, G.; Vachereau, A.; Neirinck, L.; Goodman, D.W. "Determination of *trans*-resveratrol in human plasma by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. B* **1999**, *724*, 389.
- [35] Juan, M.E.; Lamuela-Raventos, R.M.; Torre-Boronat, M.C.; Planas, J.M. "Determination of *trans*-resveratrol in plasma by HPLC". *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 747.
- [36] Giachetti, C.; Tognolo, C.; Gnemi, P.; Tenconi, A. "Simultaneous determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in spiked plasma by high-performance liquid chromatography with photo-diode array UV-Vis and fluorimetric detection". *Chromatographia* **1999**, *50*, 571.
- [37] Zhu, Y.; Huang, T.; Cregor, M.; Long, H.; Kissinger, C.B.; Kissinger, P.T. "Liquid chromatography with multichannel electrochemical detection for the determination of *trans*-resveratrol in rat blood utilizing an automated blood sampling device". *J. Chromatogr. B* **2000**, *740*, 129.
- [38] Juan, M.E.; Buenafuente, J.; Casals, I.; Planas, J.M. "Plasmatic levels of *trans*-resveratrol in rats". *Food Res. Inter.* **2002**, *35*, 195.
- [39] He, H.; Chen, X.; Wang, G.; Wang, J.; Davey, A.K. "High-performance liquid chromatography spectrometric analysis of *trans*-resveratrol in rat plasma". *J. Chromatogr. B* **2006**, *832*, 177.
- [40] Chen, X.; He, H.; Wang, G.; Yang, B.; Ren, W.; Ma, L.; Yu, Q. "Stereospecific determination of *cis*- and *trans*-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies". *Biomed. Chromatogr.* **2007**, *21*, 257.
- [41] He, H.; Chen, X.J.; Wang, G.J. "Determination of *trans*-Resveratrol in Bio-Matrices for in Vitro, ex Vivo, and in Vivo Pharmacokinetic Studies by LC Spectrometric Analysis". *Chromatographia* **2008**, *68*, 1013.
- [42] Bro, R. "PARAFAC. Tutorial and applications". *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **1997**, *38*, 149.
- [43] Sena, M.M.; Trevisan, M.G.; Poppi, R.J. "Combining standard addition method and second-order advantage for direct determination of salicylate in undiluted human plasma by spectrofluorimetry". *Talanta* **2006**, *68*, 1707.

- [44] Silva, L.C.; Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; Sena, M.M. "Direct determination of propranolol in urine by spectrofluorimetry with the aid of second order advantage". *Anal. Chim. Acta* **2007**, 595, 282.
- [45] Ortiz, M.C.; Sarabia, L.A.; Sanchez, M.S.; Gimenez, D. "Identification and quantification of ciprofloxacin in urine through excitation-emission fluorescence and three-way PARAFAC calibration". *Anal. Chim. Acta* **2009**, 642,193.
- [46] Muñoz de la Peña, A.; Mora Diez, N.; Mahedero García, M.C.; Bohoyo Gil, D.; Cañada-Cañada, F. "A chemometric sensor for determining sulphaguanidine residues in honey samples". *Talanta* **2007**, 73, 304.
- [47] Hashemi, J.; Kram, G.A.; Alizadeh, N. "Enhanced spectrofluorimetric determination of aflatoxin B1 in wheat by second-order standard addition method". *Talanta* **2008**, 75, 1075.
- [48] Cañada-Cañada, F.; Espinosa-Mansilla, A.; Muñoz de la Peña, A.; Jiménez Gíron, A.; González-Gómez, D. "Determination of danofloxacin in milk combining second-order calibration and standard addition method using excitation–emission fluorescence data". *Food Chem.* **2009**, 113, 1260.
- [49] Rodríguez, N.; Real, B.D.; Ortiz, M.C.; Sarabia, L.A.; Herrero, A. "Usefulness of parallel factor analysis to handle the matrix effect in the fluorescence determination of tetracycline in whey milk". *Anal. Chim. Acta* **2009**, 632, 42.
- [50] Lakowicz, J.R. "Principles of Fluorescence Spectroscopy", 3<sup>rd</sup> ed., Plenum, New York, 2002.
- [51] Trevisan, M.G. "Aplicação de Métodos Quimiométricos de Ordem Superior e Fluorescência Molecular na Análise em Matrizes Biológicas", dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 2003.
- [52] Martelli, C. "Curso Básico de Fluorescência Molecular: Teoria e Prática", apostila, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- [53] Bro, R. "Multiway Analysis in the Food Industry: Models, Algorithms and Applications", tese de doutorado, Universidade de Amsterdã, Holanda, 1998.
- [54] Khatri, C.G.; Rao, C.R. "Generalized Inverse of Matrices and its Applications". Wiley, New York, 1968, p. 12.
- [55] Sena, M.M. "Aplicação de Métodos Quimiométricos de Primeira e Segunda Ordem na Determinação Direta de Fármacos por Espectroscopia Molecular", tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- [56] Rinnan, A. "Application of PARAFAC on Spectral Data", tese de doutorado, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Dinamarca, 2004.
- [57] Rinnan, A.; Andersen, C.M. "Handling of first-order Rayleigh scatter in PARAFAC modelling of fluorescence excitation-emission data". *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **2005**, 76, 91.
- [58] Rinnan, A.; Booksh, K.S.; Bro, R. "First order Rayleigh scatter as a separate component in the decomposition of fluorescence landscapes". *Anal. Chim. Acta* **2005**, 537, 349.
- [59] Trevisan, M.G.; Poppi, R.J. "Determination of doxorubicin in human plasma by excitation-emission matrix fluorescence and multi-way analysis". *Anal. Chim. Acta* **2003**, 493, 69.

- [60] Brereton, R.G. "Applied Chemometrics for Scientists", Wiley, Chichester, 2007.
- [61] Otto, M.; Wegscheider, W.; Zambonin, P.G. "Chemometrics", em: Kellner, R.; Mermet, J.M.; Otto, M.; Widmer, H.M. (Eds.), "Analytical Chemistry", Wiley-VCH, Berlin, 1998, p. 709-808.
- [62] Bruns, R.E.; Faigle, J.F. "Quimiometria". *Quim. Nova* **1985**, *8*, 84.
- [63] Barros Neto, B.; Pimentel, M.F.; Araújo, M.C.U. "Recomendações para Calibração em Química Analítica – Parte I. Fundamentos e Calibração com um Componente (Calibração Univariada)". *Quim. Nova* **2002**, *25*, 856.
- [64] Booksh, K.S.; Kowalski, B.R. "Theory of analytical chemistry". *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 782A.
- [65] Nikolajsen, R.P.H.; Booksh, K.S.; Hansen, A.M.; Bro, R. "Quantifying catecholamines using multi-way kinetic modelling". *Anal. Chim. Acta* **2003**, *475*, 137.
- [66] Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R.J. "Estado da Arte de Figuras de Mérito em Calibração Multivariada". *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1278.
- [67] Sanchez, E.; Kowalski, B.R. "Tensorial resolution: a direct trilinear decomposition". *J. Chemom.* **1990**, *4*, 29.
- [68] Anderson, C.A.; Bro, R. "The N-way Toolbox for MATLAB". *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2000**, *52*, 1.
- [69] Sena, M.M.; Trevisan, M.G.; Poppi, R.J. "PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria". *Quim. Nova* **2005**, *28*, 910.
- [70] Reis, M.M.; Biloti, D.N.; Ferreira, M.M.C.; Pessine, F.B.T.; Teixeira, G.M. "Parafac for spectral curve resolution: A case study using total luminescence in human dental tartar". *Appl. Spectrosc.* **2001**, *55*, 847.
- [71] Bro, R.; Kiers, H. "A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models". *J. Chemom.* **2003**, *17*, 274.
- [72] Skoog, D.A.; West, D.W.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. "Fundamentos de Química Analítica", 8ª ed., Thomson, São Paulo, 2006, p. 196-199.
- [73] Harris, D.C. "Análise Química Quantitativa", 5ª ed., LTC, Rio de Janeiro, 2001, p. 87-89.
- [74] Saxberg, B.E.H.; Kowalski, B.R. "Generalized standard addition method". *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 1031.
- [75] Kalivas, J.H.; Kowalski, B.R. "Automated Multicomponent Analysis with Corrections for Interferences and Matrix Effects". *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 532.
- [76] Booksh, K.S.; Henshaw, J.M.; Burgess, L.W.; Kowalski, B.R. "A second-order standard addition method with application to calibration of a kinetics-spectroscopic sensor for quantitation of trichloroethylene". *J. Chemom.* **1995**, *9*, 263.
- [77] Escandar, G.M.; Faber, N.M.; Goicoechea, H.C.; Muñoz de La Peña, A.; Olivieri, A.C.; Poppi, R.J. "Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications". *Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 752.
- [78] Olivieri, A.C.; comunicação pessoal, 2009.

- [79] Bro, R. "Multiway calibration Multilinear PLS". *J. Chemom.* **1996**, *10*, 47.
- [80] Sanchez, E.; Kowalski, B.R. "Generalized rank annihilation factor analysis". *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 496.
- [81] Tauler, R. "Multivariate curve resolution applied to second order data". *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1995**, *30*, 133.
- [82] Linder, M.; Sundberg, R. "Second-order calibration: bilinear least squares regression and a simple alternative". *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1998**, *42*, 159.
- [83] Damiani, P.C.; Nepote, A.J.; Bearzotti, M.; Olivieri, A.C. "A test field for the second-order advantage in bilinear least-squares and parallel factor analyses: Fluorescence determination of ciprofloxacin in human urine". *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2798.
- [84] Olivieri, A.C. "On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second-order advantage and precision properties". *J. Chemom.* **2005**, *19*, 253.
- [85] Borraccetti, M.D.; Damiani, P.C.; Olivieri, A.C. "When unfolding is better: unique success of unfolded partial least-squares regression with residual bilinearization for the processing of spectral-pH data with strong spectral overlapping. Analysis of fluoroquinolones in human urine based on flow-injection pH-modulated synchronous fluorescence data matrices". *Analyst* **2009**, *134*, 1682.
- [86] Lozano, V.A.; Ibañez, G.A.; Olivieri, A.C. "Three-way partial least-squares/residual bilinearization study of second-order lanthanide-sensitized luminescence excitation-time decay data Analysis of benzoic acid in beverage samples". *Anal. Chim. Acta* **2008**, *610*, 186.
- [87] Lozano, V.A.; Ibañez, G.A.; Olivieri, A.C. "A novel second-order standard addition analytical method based on data processing with multidimensional partial least-squares and residual bilinearization". *Anal. Chim. Acta* **2009**, *615*, 165.
- [88] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, "Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos", Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- [89] Annual Book of ASTM Standards, E1655-05: Standards practices for infrared multivariate quantitative analysis, American Society for testing and Materials International, West Conshohocken, PA, 2005.
- [90] Danzer, K.; Otto, M.; Currie, L.A. "Guidelines for calibration in analytical chemistry part 2. Multispecies calibration". *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1215.
- [91] Olivieri, A.C.; Faber, N.M.; Ferré, J.; Boqué, R.; Kalivas, J.H.; Mark, H. "Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration". *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78*, 633.
- [92] Lorber, A. "Error propagation and figures of merit for quantification by solving matrix equations". *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1167.
- [93] Braga, J.W.B. "Aplicação e Validação de Modelos de Calibração Segunda Ordem em Química Analítica", tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- [94] Ho, C.N.; Christian, G.D.; Davidson, E.R. "Application of the method of rank annihilation to fluorescent multi-component mixtures of polynuclear aromatic hydrocarbons". *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1071.

- [95] Wang, Y.; Borgen, O.S.; Kowalski, B.R. "Advances in second-order calibration". *J. Chemom.* **1993**, *7*, 117.
- [96] Messick, N.J.; Kalivas, J.H.; Lang, P.M. "Selectivity and related measures for nth-order data". *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1572.
- [97] Olivieri, A.C. "Computing Sensitivity and Selectivity in Parallel Factor Analysis and Related Multiway Techniques: The Need for Further Developments in Net Analyte Signal Theory". *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4946.
- [98] Olivieri, A.C.; Faber, N. M. "A closed-form expression for computing the sensitivity in second-order bilinear calibration". *J. Chemom.* **2005**, *19*, 583.
- [99] International Conference on Harmonisation (ICH); Validation of analytical procedures: Methodology, Q2B. 1997.
- [100] Cuadros-Rodríguez, L.; García-Campaña, A.M.; Jiménez-Linares, C.; Román-Ceba, M. "Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment". *Anal. Lett.* **1993**, *26*, 1243.
- [101] Xia, A.L.; Wu, H.L.; Fang, D.M.; Ding, Y.J.; Hu, L.Q.; Yu, R.Q. "Determination of daunomycin in human plasma and urine by using an interference-free analysis of excitation-emission matrix fluorescence data with second-order calibration". *Anal. Sci.* **2006**, *22*, 1189.
- [102] Perrin, D.D.; Dempsey, B. "Buffers for pH and Metal Ion Control". Chapman and Hall, New York, 1974, cap 3, p. 48-49.
- [103] López-Nicolás, J.M.; García-Carmona, F. "Aggregation state and pK<sub>a</sub> values of (E)-Resveratrol as determined by Fluorescence Spectroscopy and UV-visible absorption". *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7600.
- [104] Galeano Díaz, T.; Durán Merás, I.; Airado Rodríguez, D. "Determination of resveratrol in wine by photochemically induced second-derivative fluorescence coupled with liquid-liquid extraction". *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 1999.
- [105] Takagai, Y.; Kubota, T.; Kobayashi, H.; Tashiro, T.; Takahashi, A.; Igarashi, S. "Adsorption and desorption properties of *trans*-resveratrol on cellulose cotton". *Anal. Sci.* **2005**, *21*, 183.
- [106] Cao, J.; Chen, G.H.; Du, Y.S.; Hou, F.F.; Tian, Y.L. "Determination of dissociation constants of resveratrol and polydatin by capillary zone electrophoresis". *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2006**, *29*, 1457.
- [107] Kelly, R. N.; Schulman, S.G. "Proton Transfer Kinetics of Electronically Excited Acids and Bases". Em: Schulman, S.G. "Molecular Luminescence Spectroscopy. Methods and Applications: Part 2". Cap. 6, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1988.
- [108] Trela, B.C.; Waterhouse, A.L. "Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability". *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1253.
- [109] Wolfbeis, O.S.; Leiner, M. "Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization". *Anal. Chim. Acta* **1985**, *167*, 203.

## Apêndice 1: Produtos matriciais de bloco

O objetivo deste apêndice é explicar o produto de Khatri-Rao, porém para compreendê-lo é necessário antes abordar o produto de Kronecker, uma vez que o primeiro pode ser escrito em função do segundo.

### *Produto de Kronecker*

O produto de Kronecker [1,2], também conhecido como produto tensorial e representado pelo símbolo “ $\otimes$ ”, foi proposto no século XIX, pelo alemão Leopold Kronecker (1823-1891). Caracteriza-se como um operador matricial binário, que transforma duas matrizes de dimensões arbitrárias em uma matriz de dimensão maior, com uma estrutura especial de bloco. Dadas as matrizes  $\mathbf{A}_{n \times m}$ , de dimensões  $n \times m$ , e  $\mathbf{B}_{p \times q}$ , de dimensões  $p \times q$ :

$$\mathbf{A} = \begin{vmatrix} \mathbf{a}_{1,1} & \cdots & \mathbf{a}_{1,m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \mathbf{a}_{n,1} & \cdots & \mathbf{a}_{n,m} \end{vmatrix}_{n \times m} \quad \mathbf{B} = \begin{vmatrix} \mathbf{b}_{1,1} & \cdots & \mathbf{b}_{1,q} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \mathbf{b}_{p,1} & \cdots & \mathbf{b}_{p,q} \end{vmatrix}_{p \times q}$$

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

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

### Produto de Khatri-Rao

O produto de Khatri-Rao [2,3] foi proposto pelos indianos C. G. Khatri e C. R. Rao em 1968, ambos pertencentes ao *Indian Statistical Institute*, Calcutá – Índia. O produto de Khatri-Rao também é um operador matricial binário, representado pelo símbolo “ $\otimes$ ”, e que pode ser escrito em função do produto de Kronecker. A vantagem de se utilizar o operador de Khatri-Rao na definição do modelo PARAFAC, em relação ao operador de Kronecker, é a simplificação matemática.

Dadas duas matrizes  $\mathbf{A}_{ixf}$  e  $\mathbf{B}_{jxf}$ , com o mesmo número de colunas  $f = F$ , o produto de Khatri-Rao pode ser definido por:

$$\mathbf{A} \otimes \mathbf{B} = [\mathbf{a}_1 \otimes \mathbf{b}_1 \quad \mathbf{a}_2 \otimes \mathbf{b}_2 \quad \dots \quad \mathbf{a}_F \otimes \mathbf{b}_F]$$

---

[1] Graham, A. “Kronecker Products and Matrix Calculus with Applications”, Wiley: New York, 1981.

[2] Bro, R. “Multiway Analysis in the Food Industry: Models, Algorithms and Applications”, tese de doutorado, Universidade de Amsterdã, Holanda, 1998, Cap.3, p. 21.

[3] Khatri, C.G.; Rao, C.R. “Generalized Inverse of Matrices and its Applications”, Wiley: New York, 1968, p. 12.