



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Uma metodologia analítica rápida para quantificação
simultânea de estrógenos em águas usando HPLC-DAD e
calibração de segunda ordem**

José Licarion Pinto Segundo Neto

João Pessoa – PB - Brasil

Agosto/2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Uma metodologia analítica rápida para quantificação
simultânea de estrógenos em águas usando HPLC-DAD e
calibração de segunda ordem**

José Licarion Pinto Segundo Neto*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: **Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo**

* Bolsista:



João Pessoa – PB – Brasil

Agosto/2014

P659u Pinto Segundo Neto, José Licarion.

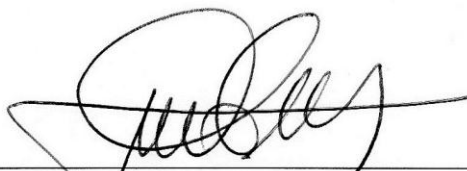
Uma metodologia analítica rápida para quantificação simultânea de estrógenos em águas usando HPLC-DAD e calibração de segunda ordem / José Licarion Pinto Segundo Neto.-- João Pessoa, 2014.

74f. : il.

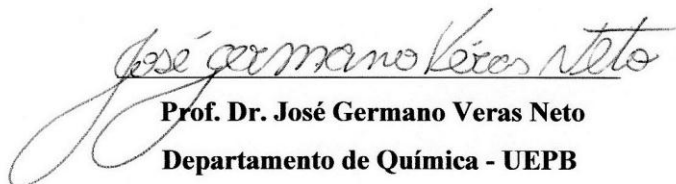
Orientador: Mário César Ugulino de Araújo

Dissertação de Mestrado submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

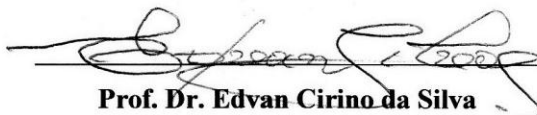
Aprovada pela banca examinadora:



Prof. Dr. Mario Cesar Ugulino de Araújo
Departamento de Química - UFPB
(Orientador)



Prof. Dr. José Germano Veras Neto
Departamento de Química - UEPB
(Examinador externo)



Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva
Departamento de Química - UFPB
(Examinador interno)

**DEDICO A TODOS OS QUE AJUDARAM, DE
ALGUMA FORMA, NESTES ANOS, POIS
NINGUÉM SABE DE TUDO NEM NADA SE FAZ
SÓ.**

*"Estou convencido das minhas próprias limitações - e esta
convicção é minha força"*

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, disposição, sabedoria concedida e pelo seu infinito amor.

A minha família, em especial meus pais José Licarion e Maria Betânia por todo amor e carinho dedicado, por ter acreditado e me incentivado a sempre prosseguir e nunca desistir. Aos meus irmãos Ricardo e Juliana, por terem acreditado e pelo apoio. A minha tia Roseane pelo apoio, amizade, carinho, incentivo e ajuda durante a graduação. Aos meus tios (a), primos (a) e avô (a) pelos ótimos momentos juntos.

Ao meu orientador Mário Cesar Ugulino de Araújo, por todo ensinamento, dedicação, ajuda, pelas oportunidades de crescimento profissional e pelo trabalho árduo dedicado a melhorar e facilitar o aprendizado no LAQA ao longo desses anos.

Ao meu orientador de iniciação científica Sherlan Guimarães Lemos, por todos os ensinamentos e por proporcionar um crescimento pessoal e profissional durante os meus primeiros passos na vida acadêmica.

Aos amigos do LAQA, Adriano, Edilene e Amanda, por todas as trocas de conhecimento e pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A Paulo Diniz, Wellington, David, Daniel, Chicote, Pablo, Mayara, Welma, Anabel, Sueny, Urijatan, Danielle, Karla, Jardel, Williame, Fátima, Renato, Aline, Helton, Eduardo Matos, Willy, Julys, Darciely, Cleilson, Dayvison, Diana, Jefferson, Dayse, Flaviano, Heberty, Stefani, Marcelo, Inakã, Sofacles, Ana Luíza, em fim todos os integrantes do LAQA que tornaram o aprendizado e a convivência no laboratório mais tranquila, divertida e prazerosa.

Aos amigos da graduação Mayara, Helenise, Marcel, Larissa, Kaline, Rafael, Zé Luiz, Raquel Cardoso, Vivian, Luana, Fernaninha, Anallyne, Raque Gomes, Katharinne, Sanierlly, Jean, Lucas, Ciro e Anderson Pereira.

Aos amigos feitos ao longo desses anos e que tornam o dia ainda melhor, Tarcizo, Danilo, Alberto, Felipe, Josemar, Edjan, Marcio, Poliana, Julio, Lucas, Anja, Jéssica Medeiros, Caio e Alvaro.

Aos amigos do Executivo Colégio e Curso - turma concluinte de 2007. Levarei sempre os bons momentos em minhas lembranças.

Aos Professores do PPGQ-UFPB pelos ensinamentos nas disciplinas cursadas.

Ao PPGQ-UFPB e a Capes pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Caracterização da problemática	16
1.2 Objetivo	17
1.2.1 Objetivo geral.....	17
1.2.2 Objetivos específicos	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 Contaminantes emergentes	19
2.1.1 Hormônios femininos.....	19
2.1.2 Técnicas analíticas para quantificação de hormônios	20
2.2 Cromatografia.....	20
2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência	22
2.2.2 Detectores em cromatografia líquida	22
2.2.3 Preparo de amostra para cromatografia líquida	23
2.2.3.1 Extração em fase sólida	23
2.3 Quimiometria.....	24
2.3.1 Calibração em química analítica	25
2.3.2 Calibração multivias	26
2.3.2.1 Métodos de Tucker	26
2.3.2.2 Método generalizado de anulação de posto	28
2.3.2.3 Análise de fatores paralelos	28
2.3.2.3.1 Mínimos quadrados alternados	30
2.3.2.4 Trilinearidade	31
2.3.2.5 MCR-ALS.....	31
2.3.2.6 N e U-PLS.....	33
2.3.2.6.1 Bilinearização residual (RBL)	33
2.3.3 Figuras de mérito	34
2.3.3.1 Sensibilidade analítica	36
2.3.3.2 Seletividade.....	36

2.3.3.3 Limite de detecção e quantificação	37
3. METODOLOGIA	39
3.1 Reagentes e soluções	39
3.2 Conjunto de calibração	39
3.3 Conjunto de validação	39
3.4 Amostragem: água de rio e esgoto	40
3.5 Preparo das amostras (extração SPE e pré concentração)	41
3.6 Análise cromatográfica.....	44
3.7 Software e análise de dados.....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Avaliação prévia dos dados	48
4.2 Conjunto de calibração	48
4.3. Validação dos modelos.....	51
4.3.1 PARAFAC	51
4.3.2 MCR-ALS.....	54
4.3.3 N-PLS/RBL e U-PLS/RBL.....	57
4.3.4 Predição das amostras de água.....	59
5. CONCLUSÃO	64
5.1 Propostas futuras.....	64
REFERÊNCIAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Fórmula estrutural dos estrógenos E1, E2, EE2 e E3.	19
Figura 2.2: Exemplo de um sistema cromatográfico de separação para quatro substâncias.	20
Figura 2.3: Fluxograma das técnicas cromatográficas de separação. Adaptado de [25].	22
Figura 2.4: Processo de desdobramento de um tensor $I \times J \times K$ em uma matriz bidimensional do tipo $i \times JK$. Adaptado de [67].	27
Figura 2.5: Representação esquemática da Equação 2. Adaptado de [67].	28
Figura 2.6: Representação gráfica do PARAFAC. Adaptado de [67].	29
Figura 2.7: Ilustração do procedimento de geração da matriz aumentada e decomposição MCR.	31
Figura 2.8: Fluxograma do procedimento RBL.	34
Figura 3.1: Pontos onde foi realizada a coleta, em azul (●) amostra de água de rio, em vermelho (●) na estação de tratamento de esgoto (ETE).	41
Figura 3.2: Esquema da ativação do cartucho SPE-C18.	42
Figura 3.3: Esquema da limpeza e pré-concentração da amostra.	43
Figura 3.4: Secagem da amostra com nitrogênio e redissolução no volume desejado da fase móvel orgânica.	43
Figura 3.5: Remoção de partículas com o filtro seringa.	44
Figura 3.6: Cromatógrafo líquido de alta eficiência.	45
Figura 3.7: Interface gráfica MVC2 implementada por Olivieri e coautores.	46
Figura 4.1: (a) Cromatogramas (a) e espectros (b) dos padrões puros de E3 (—), E2 (—), EE2 (—) e E1 (—).	48
Figura 4.2: Perfil LC-DAD de cada padrão puro de E3(a), E2 (b), EE2 (c) e E1 (d).	49
Figura 4.3: PRESS versus número de variáveis latentes para os modelos (a) U-PLS e (b) N-PLS para os quatro estrógenos E3 (—), E2 (—), EE2 (—) e E1 (—).	50
Figura 4.4: Gráficos de (a) Consistência do CORE versus componentes PARAFAC e (b) variância explicada versus número de componentes para o MCR para os estrógenos E3 (—), E2 (—), EE2 (—) e E1 (—).	50
Figura 4.5: Perfil LC-DAD característicos das amostras do conjunto de validação (a) região 1 e (b) região 2 do cromatograma.	51
Figura 4.6: Região elíptica de confiança conjunto dos modelos PARAFAC de E3 (—), E2 (—), EE2 (—) e E1 (—).	52
Figura 4.7: Curva pseudo-univariada obtida via PARAFAC para os analito E3 (a), E2 (b), EE2 (c) e E1(d).	53

Figura 4.8: Perfil espectral predito pelo PARAFAC (linha pontilhada) e perfil espectral experimental (linha sólida), E3 (—), E2 (—), EE2 (—) e E1(—) e interferentes Biochanina A (—) e Daizéina (—).....	54
Figura 4.9: Região elíptica de confiança conjunta dos modelos MCR-ALS E3 (—), E2 (—), EE2 (—) e E1(—).	55
Figura 4.10: Curvas pseudo-univariadas para os analitos E3 (a), E2 (b), E1(c) e EE2 (d).....	56
Figura 4.11: Perfil espectral predito pelo MCR-ALS (linha pontilhada) e o experimental (linha sólida), E3 (—), E2 (—), EE2 (—), E1(—) e interferentes biochanina A (—), daizéina (—) e sinal de fundo (—) em (a).	57
Figura 4.12: Região elíptica de confiança conjunta obtida para os modelos (a) U-PLS/RBL e (b) N-PLS/RBL E3 (—), E2 (—), EE2 (—) e E1(—).	59
Figura 4.13: Perfil característico das amostras de rio para a região 1 (a,b) e para a região 2 (c,d), antes (a,c) e após (b,d) a fortificação.	59
Figura 4.14: Perfil característico das amostras de esgoto para a região 1 (a,b) e para a região 2 (c,d), antes (a,c) e após (b,d) a fortificação.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Resumo dos métodos analíticos para quantificação de hormônios	21
Tabela 2.2: Categorização dos dados analíticos.....	25
Tabela 2.3: Diferentes estruturas que a equação 2.10 pode assumir.....	35
Tabela 3.1: Níveis e fatores empregados no planejamento Taguchi para construção do conjunto de validação.....	40
Tabela 3.2: Composição das misturas de validação segundo planejamento Taguchi.....	40
Tabela 4.1: Resumo dos parâmetros estatísticos obtidos para validação dos modelos PARAFAC.	52
Tabela 4.2: Parâmetros do MCR-ALS.	54
Tabela 4.3: Resumo estatístico da validação dos modelos N e U-PLS/RBL.....	58
Tabela 4.4: Resumo da predição das amostras de água de rio/esgoto.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

γ – Sensibilidade analítica

ALS – Mínimos quadrados alternados (do inglês, Alternating least squares).

ANN– Redes neurais artificiais (do inglês, Artificial neural networks).

BC – Cromatografia por Bioafinidade (do inglês, Bioaffinity chromatography).

BFGC – Cromatografia Gasosa com fase ligada (do inglês, Bonded phase gas chromatography).

bias – Erro sistemático.

BLLS – Mínimos quadrados Bilineares (do inglês, Bilinear least squares).

BPLC – Cromatografia líquida com fase estacionária quimicamente ligada (do inglês, Bonded phase liquid chromatography).

BPSC – Cromatografia que emprega um fluido supercrítico como fase móvel e fase estacionária quimicamente ligada (do inglês, Bonded phase supercritical fluid chromatography).

C18 – Octadecil.

CGC – Cromatografia Gasosa Quiral (do inglês, Chiral gas chromatography).

CLC – Cromatografia Líquida Quiral (do inglês, Chiral liquid chromatography).

CORCONDIA – Diagnostico de consistência do Core (do inglês, Core consistency diagnostic).

DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês, Dispersive liquid liquid microextraction).

DPV – Voltametria de pulso diferencial (do inglês, Differential pulse voltammetry).

EC – Cromatografia por Exclusão (do inglês, Exclusion chromatography).

ED – Alteradores endócrino (do inglês, endocrine disruptor).

EEM – Espectro de excitação e emissão em 3D na espectrometria de fluorescência molecular (do inglês, Excitation emission spectrum).

EJCR – Região elíptica de confiança conjunta (do inglês, Elliptical joint confidence region).

ELISA – Ensaio imunológico por ligação de enzimas (do inglês, Enzyme linked immune assay).

FIA-BDD amperométrico – Analisador por injeção em fluxo com detecção amperométrica com eletrodo de diamante dopado com boro (do inglês, Analyzer flow injection with amperometric detection with boron doped diamond electrode).

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (do inglês Gas chromatography mass spectrometer).

GLC – Cromatografia Gás-Líquido (do inglês, Gas liquid chromatography).

GRAM – Método generalizado de anulação de posto (do inglês, Generalized Rank annihilation method).

GSC – Cromatografia Gás-Sólido (do inglês, Gas solid chromatography).

HCA- Análise hierárquica de classes (do inglês, Hierarchical cluster analysis).

HFLLE – Micro extração líquido - líquido em fibra oca (do inglês, Hollow fiber liquid liquid microextraction).

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, High performance liquid chromatography).

Hz – Hertz.

IEC – Cromatografia por Troca Iônica (do inglês, Ion exchange chromatography).

LC-DAD – Cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos (do inglês, Liquid chromatography with diode array detector).

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa (do inglês, Liquid chromatography mass spectrometer).

LDA- Análise discriminante Linear (do inglês, Linear discriminant analysis).

LLC– Cromatografia Líquido-Líquido (do inglês, Liquid liquid chromatography).

LOD – Limite de detecção (do inglês, Limit of Detection).

LOQ – Limite de quantificação (do inglês, Limit of Quantification).

LSC – Cromatografia Líquido-Sólido (do inglês, Liquid solid chromatography).

LVI-PTV–GC–MS - Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa com grande volume de injeção temperatura de vaporização programada (do inglês, Gas chromatography with large volume injection programmed temperature vaporization mass spectrometer).

MCR-ALS – Resolução de curvas multivariada com otimização usando mínimos quadrados alternados (do inglês, Multivariate curve resolution - Alternating least squares).

MLR – Regressão linear múltipla (do inglês, Multiple linear regression).

NAS – Sinal analítico líquido (do inglês, Net analytical signal).

NPLS/RBL – Mínimos quadrados parciais em N vias - bilinearização residual (do inglês, Nway Partial least squares with residual bilinearization).

PARAFAC – Análise de fatores paralelos (do inglês, Parallel factors analysis).

PC – Cromatografia em Papel (do inglês, Paper chromatography).

PCA – Análise de componentes principais (do inglês, Principal component analysis).

PCR – Regressão em componentes principais (do inglês, Principal components Regression).

PLS – Mínimos quadrados parciais (do inglês, Partial least squares).

PLS DA- Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (do inglês, Partial least squares Discriminant analysis).

PRESS – Somatório quadrático do erro de predição (do inglês, Prediction error sum square).

REP – Erro relativo de predição (do inglês, Relative error of prediction).

RMSE – Raiz quadrada do somatório do erro médio quadrático (do inglês, Root mean square error).

RMSEP – Raiz quadrada do somatório do erro médio quadrático de predição (do inglês, Root mean square error of prediction).

SEN – Sensibilidade

SIMCA- Modelagem flexível e independente por analogia de classes (do inglês, Soft independent modeling by class analogy).

SIMPLISMA – Análise de mistura auto modelável iterativa simples de usar (do inglês Simple to use interactive self modeling mixture analysis).

SPE – Extração em fase Sólida (do inglês, Solid phase extraction).

SPSC – Cromatografia Supercrítica com fase estacionária sólida (do inglês, Solid phase supercritical fluid chromatography).

SVMC– Máquina de suporte de vetores para classificação (do inglês, Support vector machine for classification).

SVMR– Máquina de suporte de vetores para Calibração classificação (do inglês, Support vector machine for regression).

TLC – Cromatografia em camada Delgada (do inglês, Thin layer chromatography).

TLLS – Mínimos quadrados Trilineares (do inglês, Trilinear least squares).

UFLC – FLU – Cromatografia líquida ultrarrápida acoplada a detector de fluorescência molecular (do inglês, Ultra fast liquid chromatography coupled with molecular fluorescence detector)

U-PCA – Análise por componentes principais desdobrados (do inglês, Unfolded principal components analysis).

UPLS-RBL – Mínimos quadrados parciais desdobrados - bilinearização residual (do inglês, Unfolded partial least square with residual bilinearization).

UV – Ultravioleta (do inglês, ultraviolet).

RESUMO

Com o uso cada vez maior de produtos industrializados, como os farmacêuticos, os cosméticos e os de higiene pessoal, uma nova categoria de poluentes dos corpos aquáticos, chamados de contaminantes emergentes, vem ganhando destaque no cenário das questões ambientais e preservação da água potável do planeta. Entre estes estão os alteradores endócrinos, como é o caso dos estrógenos que têm preocupado a comunidade científica que já vem alertando para necessidade de se estabelecer limite máximo de concentração dessas substâncias nas águas de abastecimento. Paralelamente ao surgimento de legislação para controle desses poluentes é necessário que ocorra o desenvolvimento de metodologias analíticas rápidas, robustas e com baixa geração de resíduos. Em quase sua totalidade os métodos analíticos para quantificação de estrógenos em amostras de águas fazem de uso da cromatografia líquida ou gasosas acopladas a espectros de massa, associada a longas corridas cromatográficas. Neste trabalho é proposta uma metodologia rápida para quantificação simultânea de quatro estrógenos (E1, E2, EE2 e E3) em amostras de águas superficiais empregando HPLC-DAD e calibração multivias com propósito de explorar as potencialidades da vantagem de segunda ordem para contornar os problemas da complexidade da matriz. Modelos de calibração de segunda ordem baseados nos métodos PARAFAC, MCR-ALS, N e U-PLS/RBL foram construídos usando soluções padrão individual dos analitos (padrões puros). Estes modelos foram depois validados empregando-se um conjunto de misturas sintéticas destes analitos com mais dois potenciais interferentes (a daizeína e biochanina A) para simular a carga orgânica e demonstrar a vantagem de segunda ordem. Estas misturas sintéticas foram construídas usando planejamento Taguchi. Parâmetros estatísticos de validação satisfatórios foram obtidos, em especial para os modelos U e N-PLS/RBL. Por fim amostras de rio e esgoto fortificadas com os quatro estrógenos foram submetidas a uma pré-concentração e limpeza da amostra usando cartuchos SPE-C18, seguido da análise cromatográfica. A aplicação dos modelos de calibração as amostras de águas fortificadas levou para a maioria dos casos a uma recuperação entre 70 e 120%, refletindo a boa exatidão do método proposto.

Palavras-chaves: Estrógenos, HPLC-DAD, SPE, PARAFAC, MCR-ALS, U e N-PLS/RBL.

ABSTRACT

With the increasing use of manufactured products such as pharmaceuticals, cosmetics and toiletries, a new category of water bodies pollutants, called emerging contaminants, is gaining prominence in the environmental issues and preservation scenario of the planet's fresh water. Among these are endocrine disruptors, such as estrogens that has concerned the scientific community that has been warning for need to establish maximum concentration levels of these types of substances in the drinking water. Parallel to the legislation's rises to control these pollutants is necessary the development of rapid analytical methodologies, robust and with low waste generation. Almost all the analytical methods for quantification of estrogens in water samples make use of liquid or gas chromatography coupled to mass spectra associated to long chromatographic runs. In this work a fast method is presented for simultaneous quantification of four estrogens (E1, E2, E3 and EE2) in surface water samples using HPLC-DAD and multiway calibration with the purpose to exploit the potentialities of the second order advantage to circumvent the problems of sample complexities. Second order calibration models based on PARAFAC, MCR-ALS, N and U-PLS/RBL methods were constructed using individual pattern of analytes (pure standard) solutions. These models were then validated using a set of synthetic mixtures of these analytes with two potential interferences (daizein and biochanin A) to simulate the organic load and to demonstrate second order advantage. Satisfying statistical validation parameters were obtained, especially for U and N-PLS/RBL models. Finally river and sewage samples fortified with four estrogens were subjected to a pre-concentration and sample clean up using SPE-C18 cartridge followed by chromatographic analysis. The application of the calibration model to the fortified waters' samples led to, most cases, a recovery between 70 and 120%, reflecting the good accuracy of the proposed method.

Keywords: Estrogens, HPLC-DAD, SPE, PARAFAC, MCR-ALS, U and N-PLS/RBL.

Capítulo 1



INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização da problemática

Os estrógenos são hormônios femininos classificados como alteradores endócrinos [1-3]. Os alteradores endócrinos (ED) são substâncias que causam alterações no sistema endócrino, acarretando modificações nos processos fisiológicos dos seres vivos que os ingere. Dentre estes EDs pode-se citar os hormônios femininos E1 (1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-one, ou Estrona), E2 (1,3,5-Estratriene-3,17 β -diol, ou 17 β -Estradiol), E3 (1,3,5(10)-Estratriene-3,16 α ,17 β -triol, ou Estriol) e o EE2 (17 α -Ethynyl-1,3,5(10)-estratriene-3,17 β -diol, ou 17 α -Ethynylestradiol), sendo os três primeiros naturais e o último sintético [1-7]. Estes hormônios merecem destaque por estarem presentes no meio aquático proveniente do tratamento, não totalmente eficaz, que as águas residuárias recebem nas ETES [8,9], e por terem sido comprovado alteração na fauna aquática por causa da sua presença [2,4,10-13].

É crescente a preocupação com os EDs, uma vez que se esses alteradores podem modificar a fisiologia animal, também podem alterar a fisiologia do homem ao longo do tempo [8]. Dentre estas alterações pode-se citar sexualidade precoce, infertilidade, câncer, obesidade e disfunção da tireoide [9,12].

Nos últimos 20 anos [14] o número de trabalhos que dão enfoque nos contaminantes emergentes, como os EDs, tem crescido. Nesse tempo foi identificado a presença de EDs em água de mar [2], de águas residuais como esgoto [4,9,8], água mineral [12], água de rio [11,8] e alimentos como leite e seus derivados [6].

Como propostas de metodologias analíticas existentes na literatura para quantificação de EDs vemos que a maioria delas fazem uso da cromatografia líquida ou gasosa ambas hifenadas com MS [1,4,9,8,15], embora também há registros de métodos que empregam o DAD e fluorescência (FLU) como forma de detecção [2,6,11,13]. Em menor número encontramos, também, métodos que vão desde ensaios enzimáticos como ELISA [3,5], biosensores [4] a métodos com detecção eletroquímica a base de grafeno [10] e diamante dopado com boro [16].

Embora as técnicas analíticas citadas acima sejam sensíveis e apresentem bons resultados para a análise desses hormônios, não é difícil encontrar amostra que apresente um ou mais interferente que comprometa a quantificação exata dos analitos, desta forma invalidando o método proposto. Sendo assim muitas vezes faz-se necessário revalidar o método, o que nem sempre é uma tarefa trivial, e isto demanda um trabalho laborioso com grande consumo de reagentes de alta pureza aumentando o custo da análise.

Assim a calibração de ordem superior pode ajudar, já que a quantificação do analito mesmo na presença de interferentes é possível, levando assim a vantagem de segunda ordem.



Diversos trabalhos têm sido publicados visando à dita vantagem de segunda ordem, sendo eles envolvendo a cinética de reação, ou instrumentos analíticos já corriqueiros em laboratórios como LC-DAD, LC-MS, CG-MS e espectro de excitação e emissão em 3D na fluorescência molecular (EEM) em sua maioria [17-19].

1.2 Objetivo

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia analítica empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos para quantificação rápida e simultânea de quatro estrógenos (E1 (1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-one, ou Estrona), E2 (1,3,5-Estratriene-3,17 β -diol, ou 17 β -Estradiol), E3 (1,3,5(10)-Estratriene-3,16 α ,17 β -triol, ou Estriol) e o EE2 (17 α -Ethynyl-1,3,5(10)-estratriene-3,17 β -diol, ou 17 α -Ethynylestradiol)), em amostras de águas naturais usando calibração de segunda ordem.

1.2.2 Objetivos específicos

-  Construir um modelo de calibração com padrões puros dos analitos empregando os algoritmos de segunda ordem PARAFAC, MCR-ALS, UPLS-RBL e NPLS-RBL.
-  Validar os modelos frente um conjunto de validação de amostras sintéticas com adição de potenciais interferentes (a daizeína e biochanina A).
-  Avaliar o desempenho dos modelos na predição dos estrógenos em amostras de rio e esgoto fortificadas.

Capítulo 2



**FUNDAMENTAÇÃO
TEÓRICA**



2.1 Contaminantes emergentes

Os contaminantes emergentes constituem uma classe de compostos químicos que apresenta efeito nocivo ao meio ambiente e que, embora seja danoso ao mesmo e aos seres humanos, não possui legislação específica para seu controle. Este grupo de contaminantes é oriundo dos produtos largamente utilizados no dia a dia, como princípios ativos e incipientes de medicamentos humano e veterinário, produtos de cuidado pessoal como perfumes e cremes, plásticos e aditivos industriais. Os resíduos destes produtos de uso diário chegam aos esgotos domésticos e/ou industriais e que por inadequação do sistema de tratamento (ETES) são lançados nos corpos aquáticos, perturbando o equilíbrio natural deste ecossistema, e podendo chegar às águas de abastecimento [2, 4, 8, 10, 20, 21-24].

2.1.1 Hormônios femininos

Dentre os vários tipos de contaminantes emergentes os estrógenos, que são hormônios femininos e que agem como alteradores endócrinos (EDs) [19, 21], tem recebido atenção especial por parte de pesquisadores devida sua capacidade de modificar processos fisiológicos na fauna aquática. Desses hormônios femininos os mais importantes, devido à larga utilização sob a forma de fármacos para reposição hormonal, são o E1 (Estrona), E2 (17 β -Estradiol), E3 (estriol) e EE2 (17 α -Etinilestradiol), sendo os três primeiros naturais e o ultimo sintético [1-15]. A fórmula estrutural desses hormônios pode ser visualizadas na **Figura 2.1**.

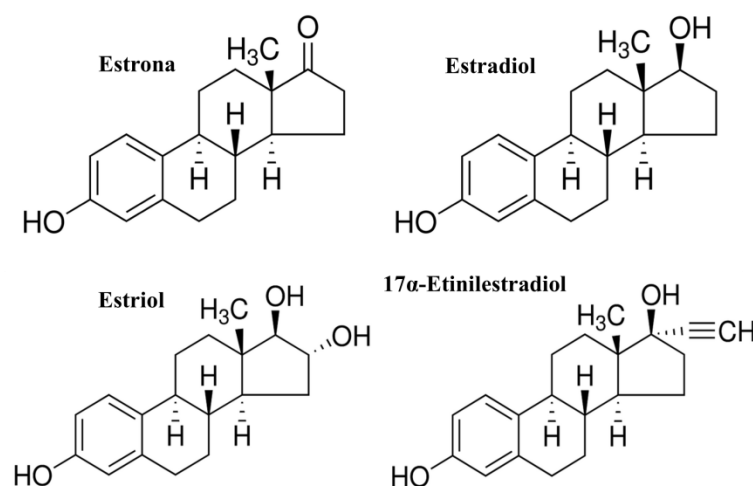


Figura 2.1: Fórmula estrutural dos estrógenos E1, E2, EE2 e E3.

Com o consumo crescente de medicamentos a base destes estrógenos, torna-se cada vez mais importante o controle de resíduo dos mesmos em águas superficiais, onde há o despejo do esgoto tratado, uma vez que não há controle ou investimento para reduzir os níveis de EDs no tratamento do esgoto doméstico e industrial [12, 14, 19-23]. Uma consequência já constatada do



acúmulo desses hormônios em rios é a feminização de peixes [8, 19-22], com isto é crescente o número de trabalhos que tratam do problema do descarte de esgoto “tratado” em rios e lagos [1-5, 7-8, 10, 12-14, 19,24].

2.1.2 Técnicas analíticas para quantificação de hormônios

As técnicas analíticas mais utilizadas para identificação e quantificação de hormônios em águas são a LC-DAD, LC-MS, LC-FLU e CG-MS. Outras menos comuns como ELISA e sistemas com detecção eletroquímica podem ser encontradas na literatura. Como é mostrado na **Tabela 2.1**, onde se podem comparar distintas amostras, preparo de amostra, técnicas de detecção e figuras de mérito para análise de hormônios.

2.2 Cromatografia

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação dos componentes de uma mistura baseado em diversos mecanismos, dentre eles pode-se citar o de adsorção, de partição, de troca iônica etc. entre a substância que se deseja separar e no equilíbrio desta entre a fase estacionária e a fase móvel. A separação é baseada nas diferenças de afinidade que os componentes da mistura possuem com relação às duas fases em que eles estão em contato [25-26].

Na **Figura 2.2**, ilustra-se um sistema com quatro substâncias que são injetadas na coluna de um sistema LC, em que é possível observar o processo de transferência de massa e separação das substâncias ao longo da corrida cromatográfica. Em (I) inicialmente todos os componentes presentes na amostra injetada estão interagindo com a coluna segundo suas afinidades, e na parte inferior é mostrado um cromatograma hipotético para cada etapa da passagem da mistura pela coluna, em (II) e (III) já é possível ver uma resolução dos componentes da mistura e em (IV) a total separação dos quatro constituintes da mistura.

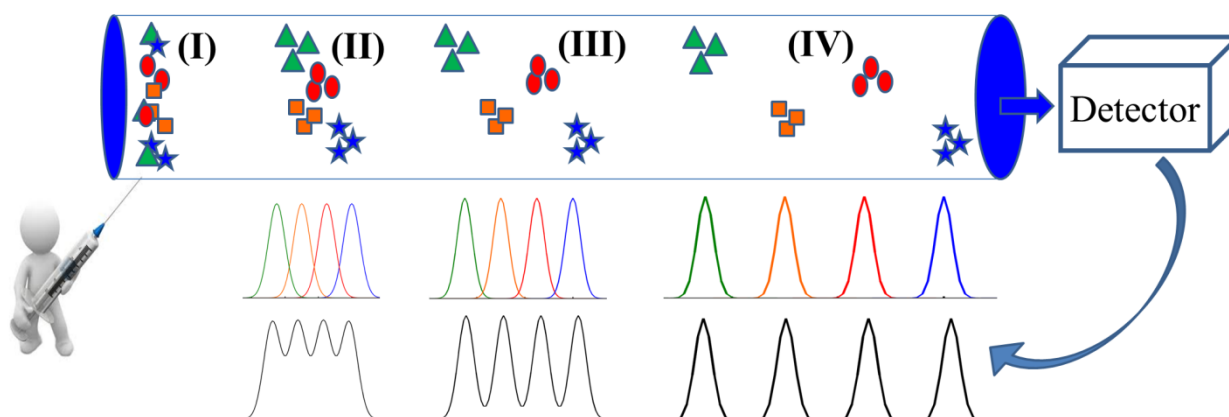


Figura 2.2: Exemplo de um sistema cromatográfico de separação para quatro substâncias.



Tabela 2.1: Resumo dos métodos analíticos para quantificação de hormônios

Pré Tratamento	Instrumentação	Estrogeno	LOD (ng.L ⁻¹)	Amostra	Recuperação (%)	RSD (%)	Tempo de análise (min)	Referencia
Sucessivas extrações e clean-up, SPE (C18)	LC-MS/MS	E1, E2, E3 e EE2	50-200 e 100-500	Lodo e Sedimento	15 - 87,9 e 48,1 - 96,7	1,5 - 5,7 e 0,2 - 3,4	10	[1]
SPE (C18)	UFLC - FLU	E1, E2, E3 e EE2	2 - 23	Água do Mar	88 - 103	1,5 - 3	10	[2]
DLLME	ELISA	E2, EE2	0,22 - 1,2	Rio e Esgoto	77 - 120	2 - 45 e 12 - 22	70 - 75	[3]
HFLLME	HPLC-DAD	E1, E2, E3 e EE2	110 - 660	Ambiental e Biológica	84,9 - 117,5	5,5 - 8,4	20	[11]
SPE (C18)	LC-LC-MS/MS	E1, E2, E3 e EE2	0,037 - 0,17 e 0,14 - 3,8	Rio e Esgoto	41-102	3,1 - 15	24,8	[12]
No eletrodo	FIA -BDD amperométrico	E1, E2 e E3	270 - 27000	Água de rio e de torneira	94 - 110	10	8,2 (com tratamento)	[14]
SPE (C18)	LVI-PTV-GC-MS	E1, E2, E3 e EE2	1 para todos	Esgoto	94 - 120	12 - 30	15,5 - 25,5	[19]
SPE (C18)	LC - DAD	E1, E2 e EE2	50 - 170	Rio e torneira	75,5 - 92,5	6	15	[25]
SPE (C18)	LC-MS	E1, E2, E3 e EE2	2 - 30 e 10 - 100	Rio e Esgoto	32 - 68 e 52 - 61	5 - 14 e 6 - 16	37	[26]
SPE em linha (online)	HPLC - MS	E1, E2, E3 e EE2	0,15 - 0,95	Rio	71,3 - 94,6	2,8 - 3,7	10	[27]
SPE (C18)	HPLC - DAD	E1, E2, E3 e EE2	300 - 790	Rio e Esgoto	76,19 - 103,2	2,45 - 5,42	3	Este Trabalho



Na **Figura 2.3** é mostrado um fluxograma das principais técnicas cromatográficas existentes, desde a cromatografia planar a em coluna passando pela cromatografia com fase móvel e/ou estacionária gasosa e/ou líquida [25].

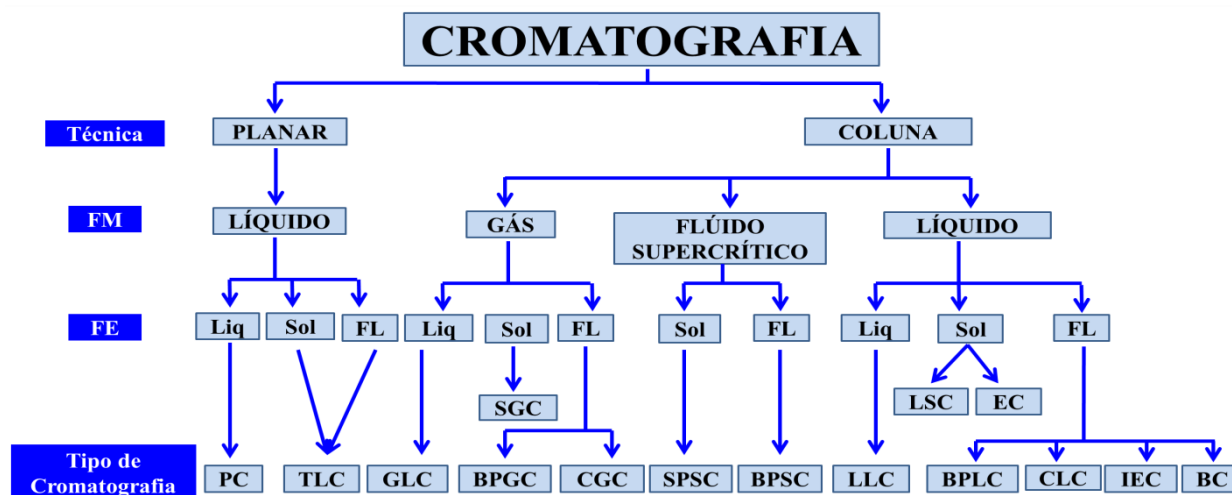


Figura 2.3: Fluxograma das técnicas cromatográficas de separação. Adaptado de [25].

2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) com fase reversa é do tipo BPLC (Cromatografia Líquida com Fase Ligada), pois uma cadeia carbônica (seja octil, C8, Octadecil, C18 etc.) está quimicamente ligada à sílica, garantindo assim à coluna uma afinidade com compostos apolares. Diferentemente da cromatografia gasosa, a cromatografia líquida faz uso de temperaturas baixas (entre - 15 °C e 70°C), o que representa uma vantagem da LC frente a GC para quantificação de analitos que não são estáveis termicamente [27-30].

2.2.2 Detectores em cromatografia líquida

Os detectores para LC devem apresentar alta taxa de aquisição de dados, resposta rápida, sensibilidade, seletividade, estabilidade, reprodutibilidade, apresenta resposta linear e rápida aos analitos, não contribuir para o alargamento do pico e confiabilidade. Sendo assim os detectores mais utilizados na LC são os com arranjo de diodos (DAD), os de fluorescência (fixando um comprimento de onda para excitação e emissão), os de fluorescência de varredura rápida (fixando um comprimento de onda para excitação e registrando o espectro de emissão), espectros de massa, detectores por índice de refração e com detecção eletroquímica [25-26].

Dentre estes detectores, o DAD, o fluorímetro de varredura rápida e o espectrômetro de massa se destacam pela quantidade de dados adquiridos. Com eles podem ser adquiridos vários



cromatogramas em uma única corrida, ou seja, para cada tempo de eluição é registrado um espectro na região do UV/Vis, um espectro de emissão ou um espectro com a razão carga massa da fração analisada. Com estes equipamentos pode-se registrar uma quantidade enorme de dados com variadas informações sobre a substância de interesse, que mais a frente será mostrado de importante valia para desenvolver novas metodologias.

2.2.3 Preparo de amostra para cromatografia líquida

Há diversas metodologias de preparo de amostra para a cromatografia líquida, que são fundamentais para extrair, pré-concentrar e limpar a amostra de modo a não danificar o sistema cromatográfico e para baixar os limites de detecção e quantificação da técnica.

É de fundamental importância pré-concentrar a amostra quando os analitos estiverem em concentrações mais baixas que o limite de detecção das técnicas utilizadas para detectá-los como UV/Vis, fluorescência molecular e espectrometria de massa.

Dentre os procedimentos de preparo de amostras para cromatografia líquida existentes para quantificação de hormônios femininos, pode-se destacar a extração líquido-líquido (LLE) [1,6], microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) [3,31], microextração líquido-líquido dispersiva em fase sólida (DLLSME) [6,41], Micro extração líquido-líquido em fibra oca (HFLLME) [11], extração em fase sólida (SPE) [2,6,8,12-14,20-21,23-24,32-34,37-39,40,42] e a extração assistida por micro-ondas (USE) [13]. A SPE é a mais aceita para estes analitos por apresentar uma recuperação satisfatória e efetuar a pré-concentração e a limpeza em uma única etapa.

2.2.3.1 Extração em fase sólida

Considerado o método de preparo de amostra mais difundido e utilizado, a SPE pode ser utilizada para pré-concentrar e/ou limpar a amostra antes de injetá-la no sistema cromatográfico [2,6,8,12-14,20-21,23-24,32-34,37-39,40,42].

Limpar a amostra é muito importante, pois na amostra real podem existir algumas substâncias que podem ser adsorvidas irreversivelmente na coluna. O procedimento para utilizar um cartucho SPE é muito simples, inicialmente ativa-se o cartucho com a fase orgânica, depois com água a baixa vazão (de aproximadamente 2 mL min^{-1}), em seguida passa-se a amostra a mesma vazão. Depois de realizada a retenção do analito na fase estacionária faz-se uma limpeza do cartucho a fim de retirar as substâncias com menor força de retenção na fase estacionária e assim melhorar a linha de base do cromatograma. Nesta etapa é necessário um conhecimento prévio do analito, pois se deve passar uma mistura da fase orgânica em água de modo a não eluir o analito, mas retirar algumas substâncias que tornaria o cromatograma mais complexo [32,41].



Após esta etapa de limpeza os analitos são eluídos com a fase orgânica pura a aproximadamente 2 mL min^{-1} , o volume eluído é secado em um fluxo de nitrogênio e depois redissolvido na fase orgânica. E para finalizar o tratamento da amostra passa-se por um filtro seringa hidrofílico com poros de diâmetro na ordem de μm , no caso deste trabalho que a amostra é aquosa, para a retirada de partículas grandes e pequenas quantidades de água que tenha sido eluída com a fase orgânica [32,41].

2.3 Quimiometria

Segundo a Sociedade Internacional de Quimiometria (International Chemometrics Society (ICS)) a Quimiometria é a ciência relacionada a medidas realizadas em um sistema ou processo químico, obtendo informações sobre o estado do sistema através da aplicação de métodos matemáticos ou estatísticos.

A quimiometria pode ser dividida basicamente em três ramos. O planejamento de experimentos, etapa que visa modelar as variáveis de um dado sistema em estudo a fim de maximizar ou minimizar uma dada resposta: busca-se uma equação matemática linear que explique a tendência do sistema [43].

Reconhecimento de padrões é o uso de medidas químicas para encontrar similaridades e dissimilaridades entre um conjunto de amostras e/ou alocar em grupos pré-determinados amostras desconhecidas [44]. De acordo com a informação de pertinência das amostras, os métodos de reconhecimento de padrões podem ser categorizados em:

 **Reconhecimento de padrão não-supervisionado (RPNS):** a priori não se conhece a pertinência das amostras, as técnicas mais populares para se fazer RPNS é a análise por componentes principais (PCA, do inglês “Principal Component Analysis”) e a Análise Hierárquica de Classes (HCA, do inglês, Hierarchical Cluster Analysis). Os métodos de RPNS também podem ser empregados com ferramenta de detecção de amostras estranhas a um dado grupo que deve ser homogêneo, este processo é denominado de detecção de “outlier” [45].

 **Reconhecimento de padrões supervisionado (RPS):** neste caso para um conjunto I de amostras, ditas de treinamento, as quais se sabe a sua pertinência de classe, constrói-se modelos que podem ser probabilísticos e/ou determinísticos que posteriormente são empregados para alocar amostras desconhecidas. As técnicas mais populares para se fazer RPS são Modelagem Independente Flexível por Analogia de Classe (SIMCA), Análise Discriminante Linear (LDA), Redes Neurais (RN), Máquinas de Suporte Vetores



para Classificação (SVMC) e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) [46-47].

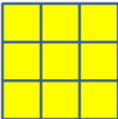
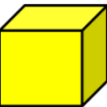
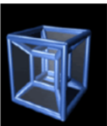
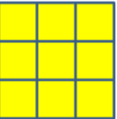
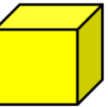
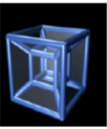
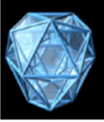
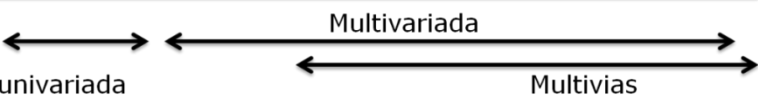
Muitas aplicações das RPs em Química são voltadas para análise do tipo *screening*, com resultados binários (sim/não; conforme/não conforme). Como bons exemplos da aplicação de RPs em Química pode-se citar, discriminação geográfica de amostras de alimentos e bebidas [48-51], detecção de estado de conservação e tipos de óleos vegetais comestíveis [52-53], controle da qualidade de medicamentos e combustíveis [54-57].

A outra vertente de quimiometria é a busca de modelos empíricos quantitativos que correlacionam um ou múltiplos sinais analíticos a uma dada propriedade (geralmente concentração) [58-61]. Este procedimento é conhecido como calibração, e está discutido em mais detalhes nas seções subsequentes.

2.3.1 Calibração em química analítica

Dependendo do tipo de dado (quantidade de sensores) utilizado, metodologias distintas podem ser empregadas para construção de um modelo de calibração. Na **Tabela 2.2** podem-se visualizar formas distintas de organização dos dados e a nomenclatura utilizada para designar os mesmos.

Tabela 2.2: Categorização dos dados analíticos.

DADOS	0ª Ordem	1ª Ordem	2ª Ordem	3ª Ordem	4ª Ordem
Amostra					
	Escalar	Vetor	Matriz	3 vias	4 vias
Conjunto de amostras					
	Vetor	Matriz	3 vias	4 vias	5 vias
Calibração					

Adaptado da referência [62].

Na calibração univariada, correlaciona-se uma grandeza instrumental com a concentração do analito. Esta relação geralmente possui um perfil linear numa faixa de concentração em estudo. Nesse caso são necessários alguns padrões puros do analito em distintas concentrações,



(entre 5 e 7 padrões), que serão utilizados para gerar o modelo de calibração (curva analítica). Esta calibração, para o caso linear, consiste em encontrar os coeficientes de correlação angular e linear e, em geral, utiliza-se da estimativa por mínimos quadrados ordinários para encontrar coeficientes (b e b_0) que minimize o resíduo do modelo [58-62].

Este tipo de calibração, embora bastante difundida e consolidada na literatura, apresenta alguns inconvenientes, como o fato de requerer total seletividade no sensor empregado para registrar o sinal analítico, impossibilidade de fazer previsões na presença de interferente, e se quer possibilita ao analista detectar a presença dos mesmos [58-62].

Quando se emprega múltiplos sensores para correlacionar concentração (ou outro parâmetro) e sinal analítico, estes modelos passam a ser denominados de multivariados. Este tipo de abordagem permite superar alguns dos inconvenientes da calibração univariada, permitindo uso de sensores não seletivos e possibilitando ao analista detectar espécies químicas não calibradas quando estas aparecem em amostras de predição, mas ainda assim não permitem que previsões confiáveis sejam efetuadas. Os principais métodos para este tipo de calibração são regressão linear múltipla (MLR) com seleção de variáveis [63], regressão em componentes principais (PCR), mínimos quadrados parciais (PLS) e regressão por máquinas de suporte de vetores (SVMR) [64-65].

A calibração multivias é uma modalidade de calibração que, embora com bases matemáticas antigas, as aplicações em química analíticas podem ser consideradas recentes. Para gerar dados em multivias é necessário registrar o sinal de cada amostra em pelos menos dois arranjos de sensores. Exemplos clássicos de dados em multivias de segunda ordem são matrizes excitação/emissão, perfis LC-DAD, tempo-pH [18,62,66]. Neste tipo de abordagem em que a concentração é relacionada com dados multivias é possível fazer previsões confiáveis mesmo na presença de interferentes. Esta característica é conhecida como “vantagem de segunda ordem” [61-62,66].

2.3.2 Calibração multivias

Na calibração multivias o sinal analítico organizado em tensores é decomposto via algoritmos apropriados para construção dos modelos de calibração. Na literatura, há diversos métodos de calibração multivias, os mais difundidos são apresentados a seguir para o contexto de segunda ordem, e estes conceitos podem ser facilmente generalizados para outras ordens [62].

2.3.2.1 Métodos de Tucker

Os primeiros métodos multidimensionais foram desenvolvidos por psicometristas, na década de 60, L. Tucker propôs três métodos para dados em multivias que, posteriormente



ficaram conhecidos como métodos de Tucker. O Tucker 1 desdobra (do inglês, unfold) os dados trilineares seguindo uma decomposição bilinear usando PCA.

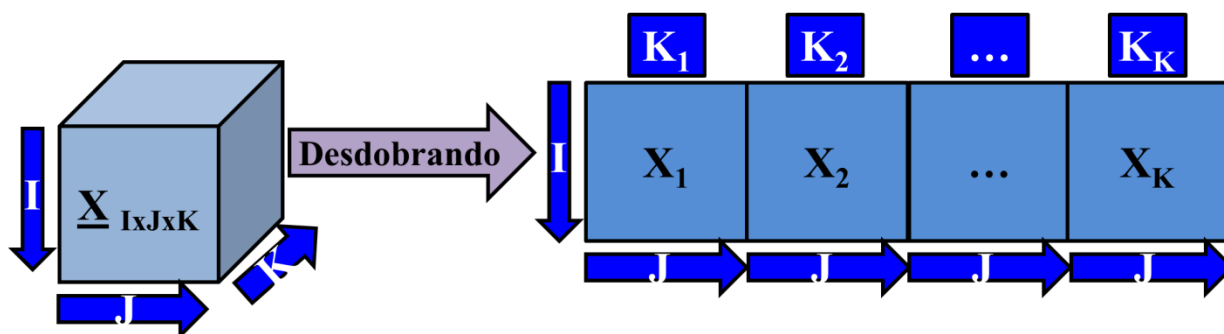


Figura 2.4: Processo de desdobramento de um tensor $I \times J \times K$ em uma matriz bidimensional do tipo $i \times JK$. Adaptado de [67].

Na **Figura 2.4** é mostrado um tensor de três vias ($I \times J \times K$) de dados para um sistema LC-DAD, por exemplo. A dimensão I é o das amostras, o vetor J os tempos de eluição e o vetor K é referente ao espectro de absorvância na região do UV. Desdobrar este tipo de dados é reorganizar em uma matriz 2D do tipo $I \times JK$, sendo as linhas as amostras (vetor I) e as colunas os tempos de eluição (vetor J) para cada comprimento de onda, ou seja, um cromatograma para cada comprimento de onda da região do UV lado a lado. Após a decomposição mostrada acima aplicam-se os métodos bilineares (PCA) convencionais, contudo o grande número de parâmetros que necessitam ser estimados leva a modelos muito complexos [67].

O Tucker 2 é um caso particular do Tucker 3, em que uma das dimensões é mantida fixa durante a decomposição. O Tucker 3 é o mais importante dos métodos de Tucker cuja base estrutural é dada pela **Equação 2.1**.

$$\underline{\mathbf{X}} = \mathbf{A}\mathbf{G}(\mathbf{C} \otimes \mathbf{B})^t + \underline{\mathbf{E}} \quad 2.1$$

Onde, $\underline{\mathbf{X}}$ é a matriz tridimensional, $\otimes$ é o produto de Kronecker. $\mathbf{A}$, $\mathbf{B}$ e $\mathbf{C}$ contêm os pesos do modelo. $\mathbf{G}$ é a matriz conectora (matriz core) e $\underline{\mathbf{E}}$ é o tensor que contém os erros do modelo. Conforme ilustrado na **Figura 2.5** D , E e F indicam o número de fatores em cada dimensão e podem ter valores diferentes, ou seja, o número de fatores decompostos podem ser diferente em cada dimensão. Sendo assim, $\mathbf{G}$ ($D \times E \times F$) indica a interação entre cada dimensão, ou seja, um valor próximo a zero indica pouca interação ou interação insignificante entre as diferentes dimensões. Uma restrição é que $\mathbf{A}$, $\mathbf{B}$ e $\mathbf{C}$ são usualmente ortogonais [67-69].

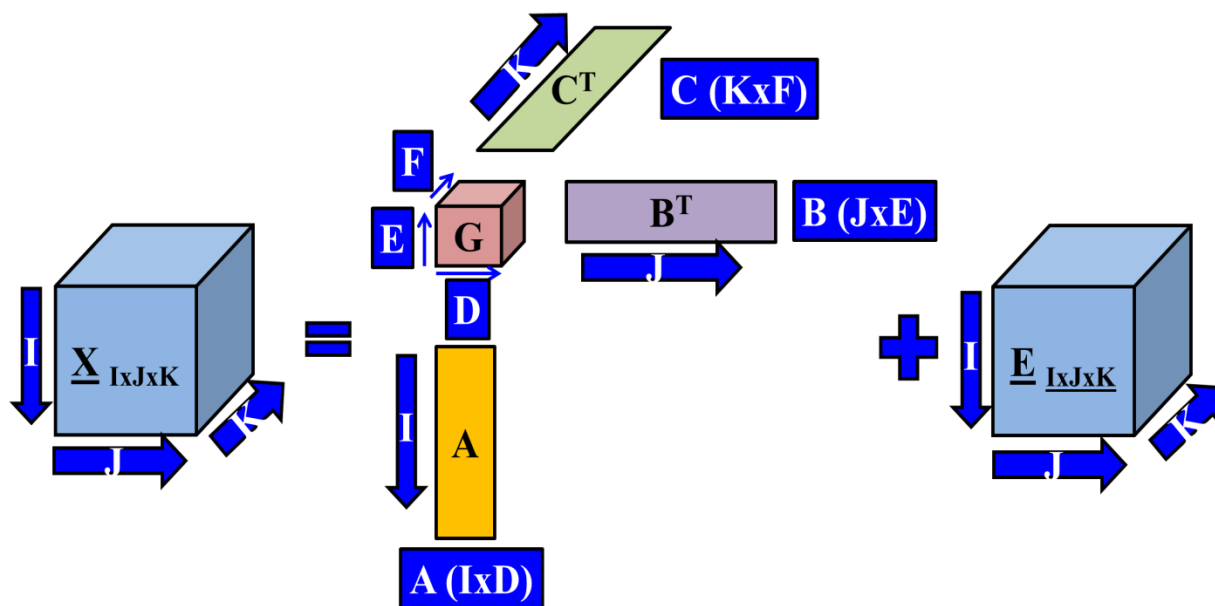


Figura 2.5: Representação esquemática da Equação 2. Adaptado de [67].

2.3.2.2 Método generalizado de anulação de posto

Há também outros métodos tais qual o método generalizado de anulação de posto (GRAM) que realiza a calibração com a amostra e uma mistura do padrão. Neste algoritmo é buscado um número de fatores que consiga extrair o perfil puro dos constituintes do padrão e por proporcionalidade tenta estimar a concentração do analito na amostra real. Embora possua uma boa fundamentação matemática, este método não é muito difundido pela limitação do modelo ser construído com apenas um padrão de calibração [70-71].

2.3.2.3 Análise de fatores paralelos

O PARAFAC (Análise de fatores paralelos do inglês, PARAllel FACtor analysis) é um algoritmo similar ao modelo de Tucker 3 com a restrição de que o número de fatores em cada dimensão sejam iguais $D=E=F \neq 0$. Este algoritmo também pode ser visto como uma generalização da PCA, sendo o PARAFAC composto por duas matrizes de pesos (B e C) e uma de escore (A) como mostrado na Equação 2.2. Muito embora a forma de se estimar os escores e os pesos na PCA difira da forma como são calculados para o PARAFAC [67-69].

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad 2.2$$

Onde e_{ijk} é o termo referente aos resíduos e f é o número de fatores do modelo. O PARAFAC também pode ser representado de forma similar ao modelo de Tucker 3 pela equação 3.3.



$$\underline{\mathbf{X}} = \mathbf{A}(\mathbf{C}|\otimes|\mathbf{B})^t + \underline{\mathbf{E}} \quad 2.3$$

A matriz de resíduo é minimizada usando o ALS. De forma análoga ao Tucker 3, pode-se representar a equação 3.3 graficamente, como é mostrado na **Figura 2.6**.

Devido à restrição do número de fatores serem iguais nas três dimensões, simultaneamente, o PARAFAC é menos flexível e usa menos graus de liberdade do que o Tucker 3, sendo usado para a modelagem de sistemas comportados, ou seja, cujas leis físico-químicas são claramente definidas, como é o caso do conjunto de dados de excitação/emissão na fluorescência molecular. Uma consequência direta é que, por ser mais restrito, o PARAFAC necessita de bem menos amostras que a PCA e o Tucker 3 para atingir a resposta desejada [67,72,74].

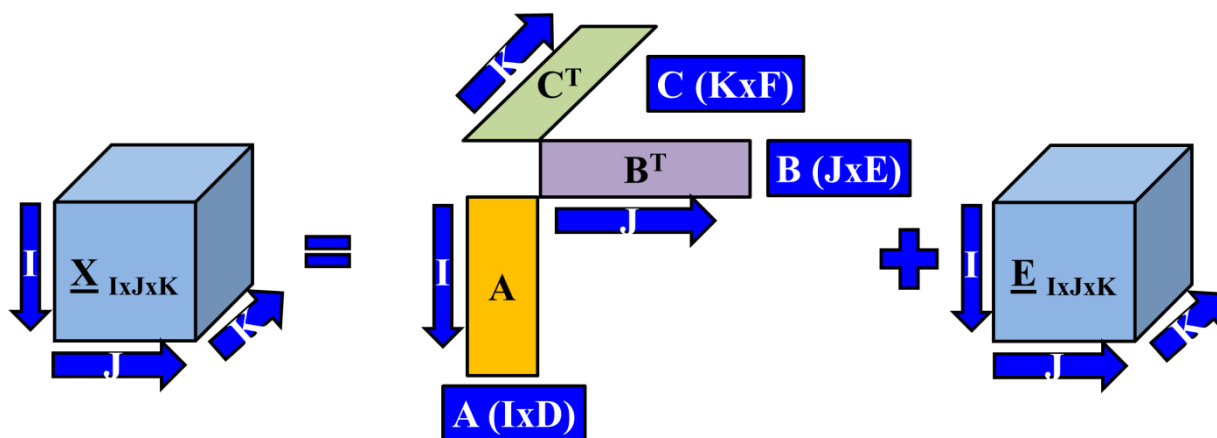


Figura 2.6: Representação gráfica do PARAFAC. Adaptado de [67].

Outra vantagem do PARAFAC é que, devido às suas restrições, este algoritmo fornecerá uma solução única, pois o modelo não poderá sofrer rotações sem perda de ajuste, propriedade conhecida como unicidade. Como o PARAFAC fornece uma solução única, podem-se estimar os componentes puros nos dois modos instrumentais utilizados, se forem trilineares [62,69-71].

A escolha do número de fatores é crucial e não existe critério absoluto para isto, sendo a escolha feita com base no conhecimento químico do sistema, em métodos de reamostragem e validação cruzada ou o teste de consistência do core (CORCONDIA, o inglês “Core Consistency Diagnostic”). Esse teste utiliza a matriz reconstruída pelo PARAFAC e aplica o Tucker 3, obtendo-se a matriz conectora construída pelo Tucker 3 (G). Idealmente ela deve ser uma hiperidentidade para as três dimensões em conjunto. Na **Equação 2.4** está mostrada a forma como o CORCONDIA é calculado [67,69].



$$\text{CORCONDIA} = 100 * [1 - \frac{\sum_d^f \sum_l^f \sum_h^f (G_{\text{Tucker}} - I)^2}{\sum_d^f \sum_l^f \sum_h^f q_{dlh}^2}] \quad 2.4$$

Um valor de CORCONDIA superior a 50% é um indicativo de que há trilinearidade nos dados.

2.3.2.3.1 Mínimos quadrados alternados

O algoritmo dos mínimos quadrados alternados (ALS, do inglês “Alternating Least Squares”) é utilizado para guiar o resultado do PARAFAC a uma solução quimicamente interpretável. Para isto o ALS precisa que duas das matrizes de pesos sejam conhecidas e assim estimar a desconhecida.

Caso se tenha os valores iniciais dos *loadings*, os escores são facilmente determinados pelo método dos mínimos quadrados. Como nem sempre isso é possível estimam-se esses valores a partir de valores randômicos, por decomposição trilinear direta (DTLD) ou com ambos. Sendo escolhido a que resulte em um menor resíduo [67-71,75]. Os passos do ALS para o PARAFAC são demonstrados a seguir:

- 1- Decidir o número de fatores f .
- 2- Inicializa B e C (*loadings*).
- 3- Estimar A por um ajuste dos mínimos quadrados, empregando $\underline{X}$, B e C.
- 4- Estimar B.
- 5- Estimar C.
- 6- Repetir as etapas de 3 a 5 ate a convergência (resíduo $\leq 10^{-6}$ ou 2500 iterações).

Como a quantidade de dados é enorme para calibração de ordem superior, é comum desdobrar os dados e reduzir a dimensionalidade utilizando uma PCA, para que o cálculo do ALS seja acelerado e para reduzir possíveis problemas de colinearidade, o que dificulta quando for necessário inverter a matriz, como é o caso da etapa 3 [74, 76-78].

O PARAFAC2 consiste de modificações da versão convencional trilinear de modo a permitir a quebra da trilinearidade em um dos sensores e possibilitar a análise de dados onde cada pedaço tem um número diferente de pontos. Esta é uma característica que torna o PARAFAC2 bem atrativo para dados cromatográficos [79].



2.3.2.4 Trilinearidade

Dados de fluorescência molecular em 3D (excitação/emissão) é um exemplo claro da aplicação do PARAFAC, que faz uso de dados trilineares. Dados de excitação/emissão são trilineares devido a, para um analito, com o aumento da concentração o valor dos escores (A, na Eq 2.3) aumenta proporcionalmente. Da mesma forma os espectros de emissão aumenta de intensidade com o comprimento de onda de excitação e proporcionalmente a concentração. Em outras palavras a trilinearidade é a capacidade que três vetores (A, B e C na Eq 2.3), independentes entre si, possuem de reconstruir um tensor de três vias sem perda de informação.

2.3.2.5 MCR-ALS

A resolução de curvas multivariadas (do inglês, Multivariate Curve Resolution, MCR) é um método que visa extrair o perfil puro. Com este algoritmo, consegue-se determinar a contribuição individual de cada constituinte presente em uma mistura, mesmo sem informações prévias sobre sua natureza e composição. Diferentemente do PARAFAC, que necessita que os dados sejam trilineares, o MCR permite a quebra da trilinearidade em um dos modos instrumentais [80-81].

Inicialmente o MCR foi desenvolvido para a resolução de curvas para dados bidimensionais, então antes de realizar o MCR deve-se decompor a matriz tridimensional em uma bidimensional, isso se faz aumentando a matriz em um dos modos, como mostrado na Figura 2.6. Geralmente, aumenta-se a matriz na dimensão onde há a quebra da trilinearidade, que no caso da cromatografia líquida é o tempo de eluição devido à ocorrência de deslocamento do tempo de retenção dos constituintes [80-82].

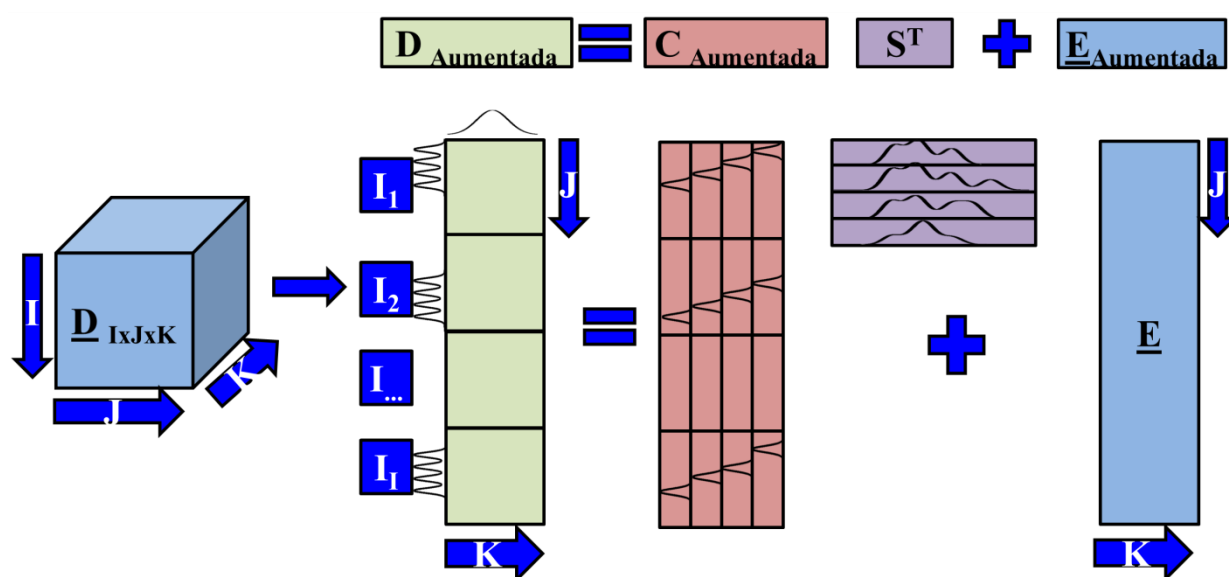


Figura 2.7: Ilustração do procedimento de geração da matriz aumentada e decomposição MCR.



Na [Figura 2.6](#) pode-se ver como aumenta uma matriz para o MCR, nesta figura tem-se o exemplo de quatro constituintes presentes em I amostras, onde há deslocamento do tempo de retenção para um dos constituintes. Como se pode perceber nos cromatogramas na matriz $\underline{D}$ aumentada ($I \times K$).

Sendo assim o modo aumentado foi o do tempo de eluição já que é o modo que apresenta a quebra da trilinearidade. Em $\underline{C}$ aumentada ($I \times F$) é mostrado o perfil cromatográfico puro de cada um dos quatro constituintes e em $\underline{S}^T$ ($F \times K$) é mostrado o perfil espectral puro para cada constituinte. A matriz $\underline{E}$ ($I \times K$) representa o resíduo, onde F é o número de constituinte medidos em J tempos de eluição e K comprimento de ondas para cada I amostras.

O MCR-ALS busca decompor uma matriz de dados tridimensionais ($\underline{D}$) em duas outras matrizes que contêm informações sobre a concentração ($\underline{C}$) e a absortividade molar ($\underline{S}$) de cada constituinte presente em uma mistura, mais uma matriz de resíduos ($\underline{E}$). Pode-se representar esta decomposição pela [Equação 2.5](#) [80,82].

$$\underline{D} = \hat{\underline{C}}\hat{\underline{S}}^T + \underline{E} \quad 2.5$$

Observando a [Equação 2.5](#), pode-se observar que diversas matrizes $\hat{\underline{C}}$ multiplicadas por diversas matrizes $\hat{\underline{S}}^T$ podem resultar na matriz $\underline{D}$, então se pode dizer que esta decomposição sofre de ambiguidade rotacional. Ou seja, os espectros ou perfis de concentração estimados para qualquer um dos constituintes serão combinações lineares desconhecidas de seus espectros puros e dos verdadeiros perfis de concentração [80,82-84].

É possível reduzir este número enorme de soluções através de restrições, de modo a obter um resultado físico-químico condizente com o sistema. Algumas dessas restrições são a não negatividade, geralmente aplicada nas concentrações e nos espectros, pois concentração e absorbâncias negativas não possuem significado físico. Outra restrição é a unimodalidade que é utilizada para perfis que tenham um único máximo, como é o caso de cromatogramas. Estas restrições são aplicadas durante o cálculo iterativo do ALS [82-84].

O ALS estima o valor inicial de $\underline{C}$ e $\underline{S}$ usando métodos de resolução orientada, como por exemplo, o método de análise de posto local (EFA) e/ou métodos de seleção de variáveis puras, como a análise de mistura auto modelável iterativa simples de usar (do Inglês, SIMPLEx-to-use Interactive Self-modeling Mixture Analysis, SIMPLISMA) [82, 85-87]. A partir desta estimativa inicial, reconstrói-se a matriz de dados ($\underline{D}$) de modo a minimizar a matriz de resíduo ($\underline{E}$). Os passos do ALS, na versão disponibilizada por Tauler e colaboradores [80, 82, 85-87] para o MCR-ALS, são demonstrados a seguir:



- 1- Decidir o número de componentes com base numa PCA nos dados aumentados.
- 2- Inicializar C e S.
- 3- Reconstruir $\underline{D}$ e ajustar C e S com um ajuste por mínimos quadrados.
- 4- Repetir a etapa 3 até a convergência (resíduo $\leq 0,1\%$ ou 2500 iterações).

2.3.2.6 N e U-PLS

O U-PLS proposto por Wold é basicamente o PLS aplicado nos dados desdobrados (ver [Figura 2.4](#) onde é mostrado como desdobrar uma matriz tridimensional para o Tucker 1) [88]. Já N-PLS foi proposto por Bro [89] em 1996 como uma alternativa ao U-PLS, o N-PLS é uma extensão do PLS para dados trilineares. Dessa forma o N-PLS tem a vantagem sobre o U-PLS de ser um algoritmo que leva a modelos mais estáveis e menos complexos, considerando a estrutura trilinear dos dados.

Ambos, U e N-PLS são extensões do PLS para dados de ordem superior, e não apresentam vantagem de segunda ordem, mas que pode ser alcançada com uma etapa pós-calibração chamada de Bilinearização Residual (do Inglês, Residual Bilinearization, RBL) [88-94].

2.3.2.6.1 Bilinearização residual (RBL)

A presença de um constituinte não calibrado em uma amostra de teste pode ser observada pela comparação da norma do resíduo da amostra de teste (S_p , [Equação 2.7](#)) como resíduo instrumental estimado com base nas amostras de calibração (S_{cal}). Quando S_p é muito maior que S_{cal} , os coeficientes de regressão não são válidos para prever y_u e pode ser empregada a etapa RBL [90-93].

O RBL é uma etapa pós-calibração que possibilita o U e N-PLS alcançarem a vantagem de segunda ordem. O procedimento RBL consiste em fixar o vetor de coeficientes de regressão obtidos para conjunto de calibração e variar os escores ($\mathbf{t}_u$) da amostra de teste $\mathbf{X}_u$ de modo a minimizar a norma do vetor de resíduos ($\|\mathbf{E}_u\|$, veja [Equação 2.9](#)) da amostra de teste como indicado na [Equação 2.6](#) [90-93].

$$\mathbf{y}_u = \mathbf{t}_u^T \mathbf{v} \quad 2.6$$

$$S_p = \frac{\|\mathbf{E}_p\|}{(JKI - f)^{1/2}} \quad 2.7$$

Onde $\mathbf{t}_u$ contém o escore da amostra de teste, $\mathbf{v}$ são os coeficientes de regressão e y_u é a concentração predita da amostra de teste $\mathbf{X}_u$. $\mathbf{E}_p$ é a matriz de resíduo.



A matriz E_p é decomposta pela decomposição de valores singular (SVD), como indicado na [Equação 2.8](#).

$$B_{\text{int}} G_{\text{int}} (C_{\text{int}})^T = \text{SVD}(E_p) \quad 2.8$$

Onde $B_{\text{int}} G_{\text{int}} (C_{\text{int}})^T$ contém informações sobre o interferente. Estes valores são usados para modificar os escores t_u e subsequente minimização de E_p via Gauss-Newton [91-94], como indicado na [Equação 2.9](#).

$$\text{Vec}(X_u) = P T_u + \text{Vec}[B_{\text{int}} G_{\text{int}} (C_{\text{int}})^T] + E_u \quad 2.9$$

O valor de E_u (norma matriz de resíduos após a etapa RBL) é em seguida comparado com o valor do resíduo do conjunto de calibração. Caso necessário aplica-se mais um fator RBL para ajustar os escores e reduzir o resíduo da amostra. Este procedimento é demonstrado na [Figura 2.7](#), adaptada da referencia [91].

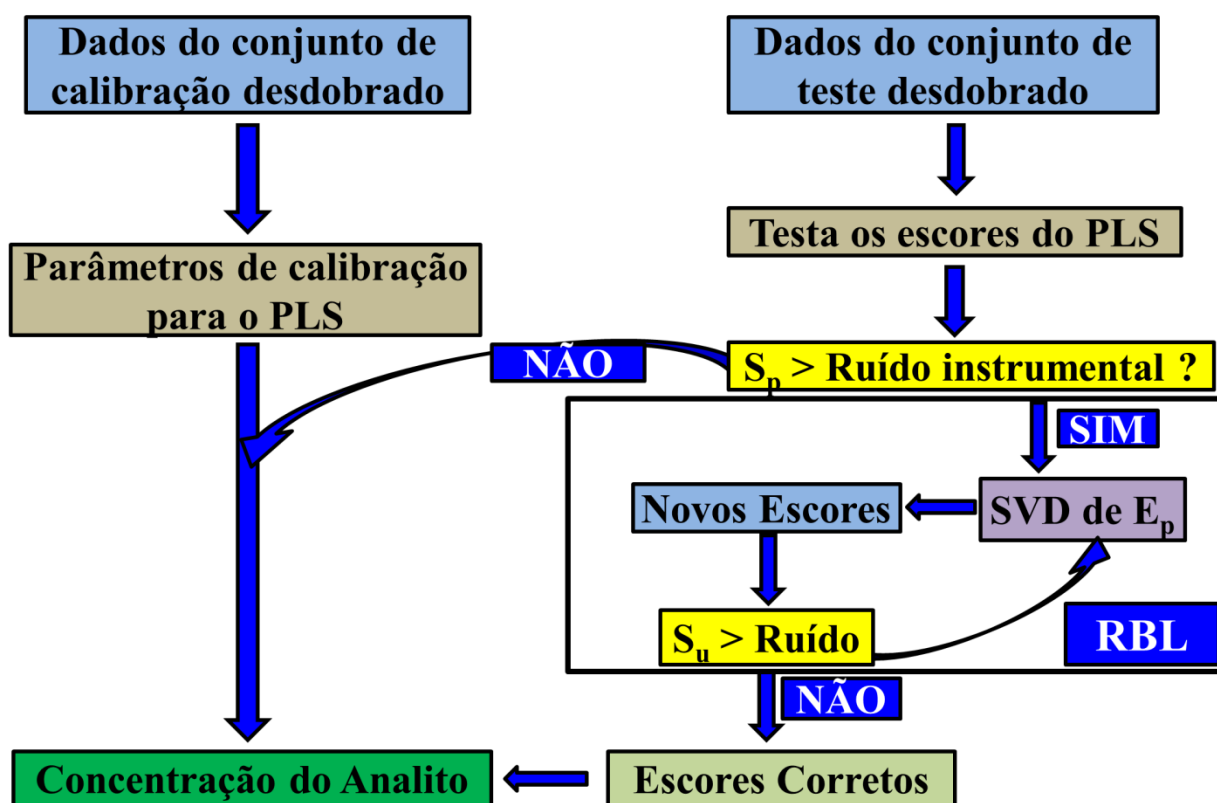


Figura 2.8: Fluxograma do procedimento RBL.

2.3.3 Figuras de mérito

As Figuras de mérito ou de desempenho analítico são valores que ajudam a avaliar a performance do modelo construído. Para a calibração univariada as figuras de mérito estão muito bem estabelecidas e são simples de implementar e compreender [95].

Para determinar as figuras de mérito para a calibração de primeira ordem é utilizado uma generalização da calibração univariada que é chamada de LBOZ que se baseia numa analogia



entre o sinal instrumental verdadeiro e o sinal analítico líquido (do inglês, Net Analytical Signal, NAS). O NAS é definido como sendo a porção do sinal que é relacionada ao analito [61-62].

Para a calibração multivias também é utilizado o conceito do NAS generalizado. Várias expressões distintas foram propostas para o cálculo da sensibilidade baseado na extensão do NAS da calibração de primeira ordem. No entanto há problemas na aplicação do conceito do NAS, devido às varias definições sem relações entre si. O que é mais preocupante é que as expressões extrapoladas para dados com vários modos, aparentemente, levam a uma subestimação da sensibilidade verdadeira [62,96].

Uma metodologia alternativa utilizada para determinar a sensibilidade na calibração analítica vem ganhando importância nos últimos anos. Esta metodologia é baseada na análise de como a incerteza no sinal instrumental se propaga para a predição da concentração do analito. Esta aproximação levou ao desenvolvimento de uma expressão aplicável à maioria dos algoritmos para dados multivias e o resultado foi confirmado com a adição de ruído por simulação Monte Carlo [62]. Com esta metodologia foi possível unir todas as expressões de sensibilidade, numa expressão matemática generalizada, desde a univariada a multivias (Equação 2.10) [62,96].

$$\text{SEN}_n = \{\mathbf{g}_n^T [\mathbf{Z}_{\text{anal}}^T (\mathbf{I} - \mathbf{Z}_{\text{int}} \mathbf{Z}_{\text{int}}^+) \mathbf{Z}_{\text{anal}}]^{-1} \mathbf{g}_n\}^{-1/2} \quad 2.10$$

A matriz $\mathbf{Z}_{\text{anal}}$ contém o perfil do analito presente no conjunto de calibração. $\mathbf{g}_n$ é um vetor que adéqua ou combina a informação de $\mathbf{Z}_{\text{anal}}$, fazendo este ficar específico para o n -ésimo analito. $(\mathbf{I} - \mathbf{Z}_{\text{int}} \mathbf{Z}_{\text{int}}^+)$ é a expressão matemática da vantagem de segunda ordem, este termo tem como propósito corrigir $\mathbf{Z}_{\text{anal}}$ para o efeito de sobreposição para o perfil dos interferentes, ou seja, depende do interferente [62,96].

Para dados de segunda ordem cada termo da Equação 2.10 é substituído por outro termo que depende do modelo utilizado. Na Tabela 2.3 adaptada da referência [62] pode-se ver estes termos [62].

Tabela 2.3: Diferentes estruturas que a equação 2.10 pode assumir

Modelo	$\mathbf{g}_n$	$\mathbf{Z}_{\text{anal}}$	$\mathbf{Z}_{\text{int}}$
MCR-ALS	δn	$(\mathbf{m}_n / J^{1/2}) \mathbf{C}_{\text{anal}}$	$\mathbf{C}_{\text{int}}$
PARAFAC	δn	$\mathbf{m}_n \mathbf{C}_{\text{anal}} \odot \mathbf{B}_{\text{anal}}$	$\mathbf{Z}_{\text{int}}^*$
UPLS-RBL	$\mathbf{v}_{\text{UPLS}}$	$\mathbf{P}_{\text{UPLS}}$	$\mathbf{Z}_{\text{int}}^*$
NPLS-RBL	$\mathbf{v}_{\text{NPLS}}$	$\mathbf{W}_{\text{NPLS}} = \mathbf{W} \mathbf{K} \odot \mathbf{W} \mathbf{J}$	$\mathbf{Z}_{\text{int}}^*$
$\mathbf{Z}_{\text{int}}^* = [\mathbf{c}_1 \otimes \mathbf{I}_b \mid \mathbf{I}_c \otimes \mathbf{b}_1 \mid \mathbf{c}_2 \otimes \mathbf{I}_b \mid \mathbf{I}_c \otimes \mathbf{b}_2 \mid \dots]$			



Onde δ_n é o vetor de Kronecker para o analito n . m_n é o coeficiente angular do gráfico da curva pseudounivariada. J é o número de sensores no modo aumentado. C_{anal} é o perfil no modo não aumentado para o analito. C_{int} é o perfil no modo não aumentado para o interferente. B_{anal} e C_{anal} são as matrizes dos *loadings* para o analito. P_{UPLS} é a matriz de *loadings* para o UPLS. W_{NPLS} é a matriz de pesos para o NPLS. b_1, b_2, c_1 e $c_2, \dots$ corresponde aos interferentes nos vários modos. I_b e I_c são as matrizes dimensionadas de tamanho $J \times J$ e $K \times K$, respectivamente. Os números 1, 2, ... são referentes ao número de interferentes. $\odot$ indica o operador de Khatri-Rao. $\otimes$ indica o operador de Kronecker [62,94,97-98].

2.3.3.1 Sensibilidade analítica

A sensibilidade (SEN_n) possui unidade (Sinal instrumental x Concentração⁻¹), sendo assim tem como propósito comparar técnicas analíticas semelhantes, pois o seu valor depende do instrumento utilizado para calibrar. Por isso a sensibilidade analítica (γ_n) foi proposta como um melhor meio de comparação entre as técnicas. A γ_n tem como unidade Concentração⁻¹, como mostra a **Equação 2.11** [62,96].

$$\gamma_n = SEN_n / \sigma_x \quad 2.11$$

Onde σ_x é o ruído instrumental.

2.3.3.2 Seletividade

Seletividade é a capacidade que um método possui de determinar um analito em uma mistura sem a interferência de outros constituintes [62,96]. A forma mais simples de definir a seletividade (SEL_n) é pela **Equação 2.12**.

$$SEL_n = SEN_n(\text{na mistura}) / SEN_n(\text{analito puro}) \quad 2.12$$

Com isto a seletividade de um modelo de calibração univariada é 1 (100%), pois não há interferentes. Para modelos de calibração de primeira ordem este parâmetro não é determinado precisamente, pois não há a informação do analito puro. Para dados multivias, como o perfil do analito puro é estimado pelos algoritmos PARAFAC e MCR-ALS, a SEL_n pode ser determinada pelas **Equações 2.13 e 2.14**, respectivamente [62,96].

$$SEL_n = SEN_n / m_n \quad 2.13$$



$$SEL_n = SEN_n J^{1/2} / m_n \quad 2.14$$

Onde m_n é o coeficiente angular do gráfico da calibração pseudounivariáda.

2.3.3.3 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) é o valor mínimo de concentração do analito presente em uma amostra capaz de gerar sinal distinguível do ruído, para um nível de confiança adotado (em geral, 95%). Em contrapartida, o limite de quantificação (LOQ) tem significado análogo, e representa uma quantidade mensurável para um dado nível de confiança [62,96]. Os valores de LOD e LOQ podem ser estimados empregando as equações generalizadas (**Equações 2.15 e 2.16**).

$$LOD_n = 3,3(SEN_n^{-2}\sigma_x^2 + h_0SEN_n^{-2}\sigma_x^2 + h_0\sigma_{y_{cal}}^2)^{1/2} \quad 2.15$$

$$LOQ_n = 10(SEN_n^{-2}\sigma_x^2 + h_0SEN_n^{-2}\sigma_x^2 + h_0\sigma_{y_{cal}}^2)^{1/2} \quad 2.16$$

Em que σ_x^2 é a variância associada ao sinal instrumental, h_0 é a influência das amostras de branco (*leverage* do branco) e $\sigma_{y_{cal}}^2$ é a variância das concentrações de calibração. O termo entre parêntese nas **Equações 2.15 e 2.16** representa a propagação de erro sobre a concentração predita para uma amostra de branco ou baixa concentração do analito [62,96].

Capítulo 3



METODOLOGIA



3. METODOLOGIA

3.1 Reagentes e soluções

Acetonitrila (TEDIA, United States), metanol (J.T.Baker, Mexico) e ácido acético (BIO BASIC INC) foram adquiridos em grau HPLC. O N₂ utilizado foi comprado junto à empresa LINDE Group (99,9%, the Linde Group, São Paulo, Brasil). Padrões de alta pureza dos analitos 1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-one (Estrona pureza $\geq 99\%$); 1,3,5-Estratriene-3,17 β -diol (17 β -Estradiol pureza $\geq 99\%$); 1,3,5(10)-Estratriene-3,16 α ,17 β -triol (Estriol pureza $\geq 97\%$); 17 α -Ethynyl-1,3,5(10)-estratriene-3,17 β -diol (17 α -Ethynylestradiol pureza $\geq 98\%$), e fitohomônimos 4,7-Dihydroxy-iso-flavone (Daidzeina, pureza $\geq 98\%$) e 5,7-Dihydroxy-4-methoxyisoflavone (Biochanin A, pureza $\geq 99\%$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co.

Soluções estoque foram preparadas em acetonitrila para os padrões dos analitos Estrona (E1), 17 β -Estradiol (E2), Estriol (E3) e 17 α -Ethynylestradiol (EE2) a 500 mg/L. E para daidzeina e biochanin A a 200 mg L⁻¹. Os estoques foram armazenados em frasco âmbar com batoque e armazenados em freezer a -20 °C.

3.2 Conjunto de calibração

Foram preparadas treze amostras com concentrações na faixa de 4,0 a 10,0 mgL⁻¹ com incremento igualmente espaçado de 0,5 mgL⁻¹ para cada um dos quatro analitos. A fim de minimizar o erro proveniente da micropipeta as soluções de calibração foram preparadas por diluição volumétrica a partir de uma solução estoque de 100 mgL⁻¹ obtida através da diluição do estoque de 500 mgL⁻¹.

3.3 Conjunto de validação

O objetivo do conjunto de validação é testar o desempenho dos modelos construídos empregando os padrões de calibração, mas também explorar as potencialidades da calibração de segundo ordem, sendo a principal delas a vantagem de segunda ordem.

Para atingir este objetivo um conjunto de misturas de validação contendo os quatro analitos (E1, E2, EE2 e E3) juntamente com dois potenciais interferentes, a daidzeina (D) e a biochanina A (BA), que são fitohormônios que também ocorrem em águas naturais, foram preparadas segundo um planejamento Taguchi. O planejamento de Taguchi empregado neste trabalho foi do tipo cinco níveis e seis fatores (**Tabela 3.1**), sendo os níveis do planejamento a concentração e os fatores as espécies químicas contidas nas misturas (analitos e interferentes). Desta forma o conjunto de mistura de validação obtido via planejamento Taguchi varre o espaço



modelado com um pequeno número de ensaios (25 misturas de validação) ortogonais entre si. Na **Tabela 3.2** é apresentada a composição de cada mistura do conjunto de validação.

Tabela 3.1: Níveis e fatores empregados no planejamento Taguchi para construção do conjunto de validação.

Fatores/Níveis	-2	-1	0	1	2
E1	5,30	6,30	7,30	8,30	9,30
E2	5,30	6,30	7,30	8,30	9,30
EE2	5,30	6,30	7,30	8,30	9,30
E3	5,30	6,30	7,30	8,30	9,30
D	0,60	0,70	0,80	0,90	1,00
BA	0,60	0,70	0,80	0,90	1,00

Tabela 3.2: Composição das misturas de validação segundo planejamento Taguchi.

Amostra	E1	E2	E3	EE2	D	BA
1	5,3	5,3	5,3	5,3	0,6	0,6
2	5,3	6,3	6,3	6,3	0,7	0,7
3	5,3	7,3	7,3	7,3	0,8	0,8
4	5,3	8,3	8,3	8,3	0,9	0,9
5	5,3	9,3	9,3	9,3	1,0	1,0
6	6,3	5,3	6,3	7,3	0,9	1,0
7	6,3	6,3	7,3	8,3	1,0	0,6
8	6,3	7,3	8,3	9,3	0,6	0,7
9	6,3	8,3	9,3	5,3	0,7	0,8
10	6,3	9,3	5,3	6,3	0,8	0,9
11	7,3	5,3	7,3	9,3	0,7	0,9
12	7,3	6,3	8,3	5,3	0,8	1,0
13	7,3	7,3	9,3	6,3	0,9	0,6
14	7,3	8,3	5,3	7,3	1,0	0,7
15	7,3	9,3	6,3	8,3	0,6	0,8
16	8,3	5,3	8,3	6,3	1,0	0,8
17	8,3	6,3	9,3	7,3	0,6	0,9
18	8,3	7,3	5,3	8,3	0,7	1,0
19	8,3	8,3	6,3	9,3	0,8	0,6
20	8,3	9,3	7,3	5,3	0,9	0,7
21	9,3	5,3	9,3	8,3	0,8	0,7
22	9,3	6,3	5,3	9,3	0,9	0,8
23	9,3	7,3	6,3	5,3	1,0	0,9
24	9,3	8,3	7,3	6,3	0,6	1,0
25	9,3	9,3	8,3	7,3	0,7	0,6

3.4 Amostragem: água de rio e esgoto

Nove amostras foram coletadas em três pontos das proximidades estação de tratamento de esgoto de mangabeira no rio Cuiá (três amostras em cada ponto), João Pessoa, Paraíba, Brasil



(veja **Figura 3.1 (a)**), sendo três amostras de esgoto tratado (ETE1 a ETE3) e seis amostras em dois pontos distintos do rio Cuiá (R1 a R3, na montante e R4 a R6, na jusante) (veja **Figura 3.1 (b)**). Cada amostra foi armazenada em frasco âmbar de 4L e acidificado a pH 3 com 2% de ácido acético grau HPLC (veja **Figura 3.1 (d)**).

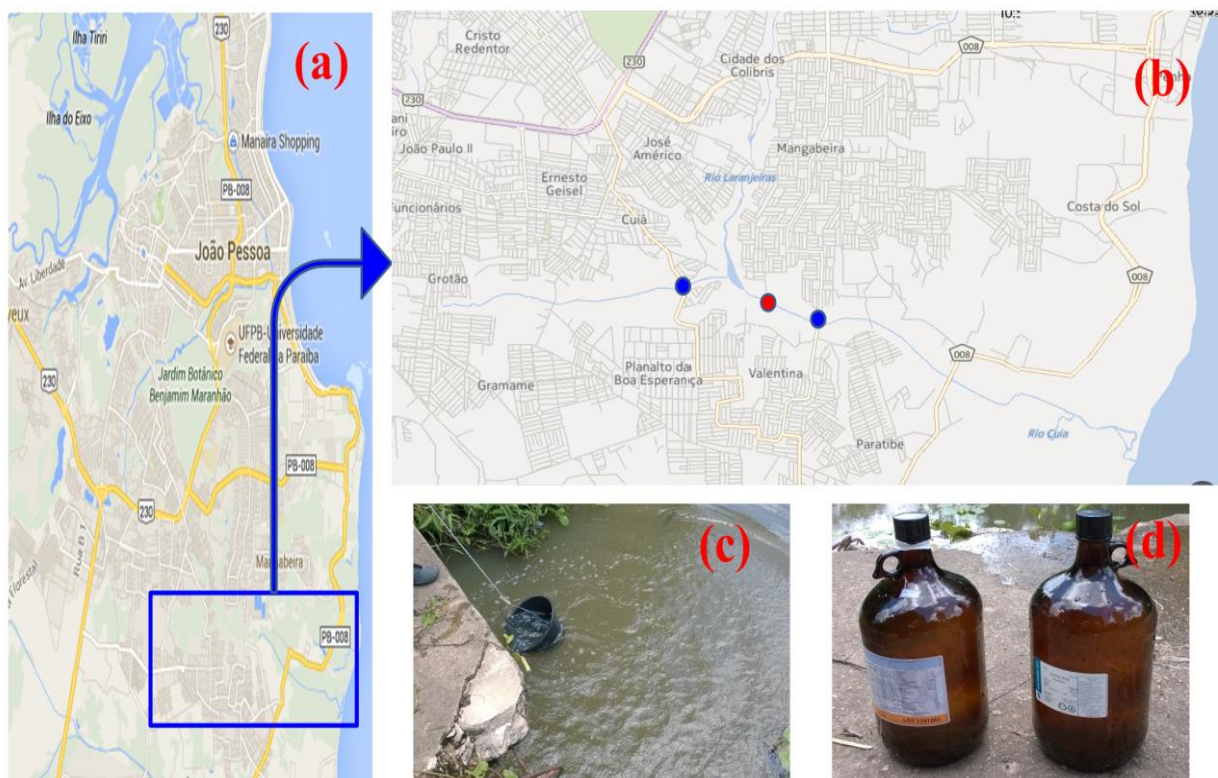


Figura 3.1: Pontos onde foi realizada a coleta, em azul (●) amostra de água de rio, em vermelho (●) na estação de tratamento de esgoto (ETE).

3.5 Preparo das amostras (extração SPE e pré concentração)

Como etapa prévia do uso dos cartuchos comerciais SPE C18 (1000 mg) da Phenomenex, deve ser conduzido o procedimento de ativação dos mesmos. Inicialmente carregaram-se os cartuchos SPE com 6 mL de acetonitrila seguidos de 6 mL de água, ambos de grau HPLC. O fluxo foi ajustado de modo a se obter uma vazão aproximada de 2 mL min^{-1} . Desta forma o solvente pode interagir com a fase estacionária presente no cartucho. A etapa de ativação tem por objetivo limpar os sítios adsorptivos que serão ocupados pelos analitos e evitar a formação de bolhas durante a adsorção do analito presente na amostra. Um fluxograma do processo de ativação é apresentado na **Figura 3.2a** e em **3.2b** é mostrado o sistema usado neste trabalho.

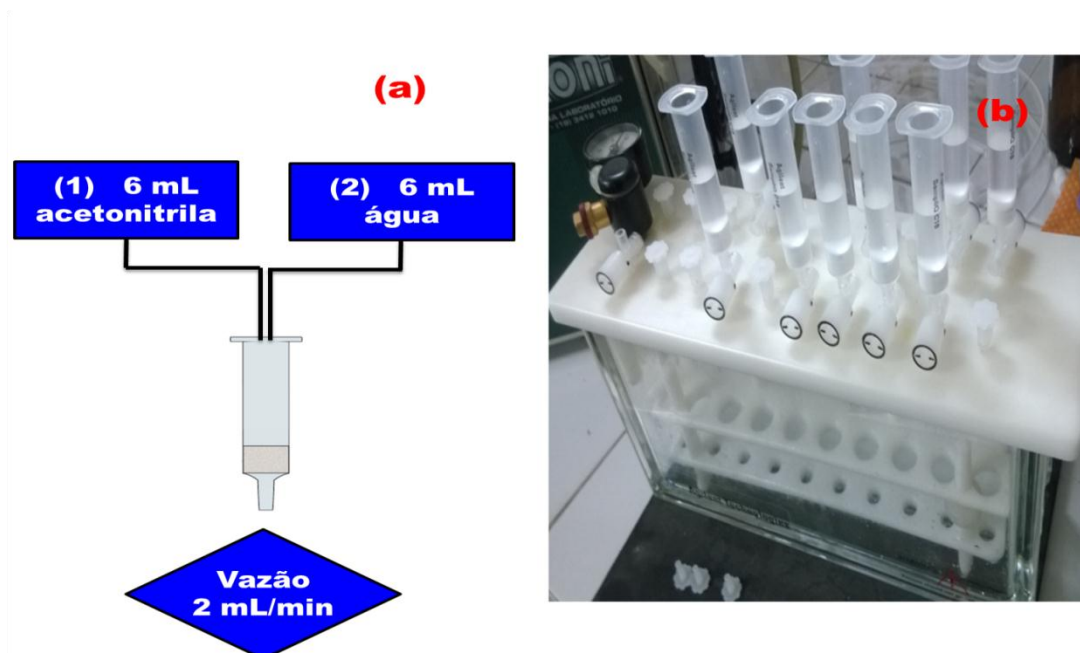


Figura 3.2: Esquema da ativação do cartucho SPE-C18.

O procedimento de extração em fase sólida (SPE) empregada neste trabalho pode ser descrita em quatro etapas e ilustrado na **Figura 3.3**:

-  **I-Filtração da amostra:** previamente cerca de um litro da amostra filtrada em filtro de celulose com 0,22 μm , sob vácuo para remoção de sólidos em suspensão, um volume exato de um litro é recolhido em recipiente volumétrico adequado (**Figura 3.3a**).
-  **II-Imobilização do analito no cartucho SPE:** o volume de 1 litro de amostra é filtrado na etapa anterior e bombeada por um sistema a vácuo para passar pelo cartucho SPE com uma vazão ajustada de 0,22 mL/min (**Figura 3.3b**).
-  **III-Remoção de parte da carga orgânica:** nesta etapa faz passar pelo cartucho 6 mL de acetonitrila 10% em água, ambas grau HPLC. Nesta etapa parte da carga orgânica fracamente adsorvida ao cartucho SPE é removido, tornando o cromatograma menos complexo (**Figura 3.3b**).
-  **IV- extração do analito do cartucho:** para remoção dos analitos, passa-se pelo cartucho um volume de 6 mL de acetonitrila grau HPLC, o filtrado é coletado e armazenados protegidos da luz (**Figura 3.3c**).

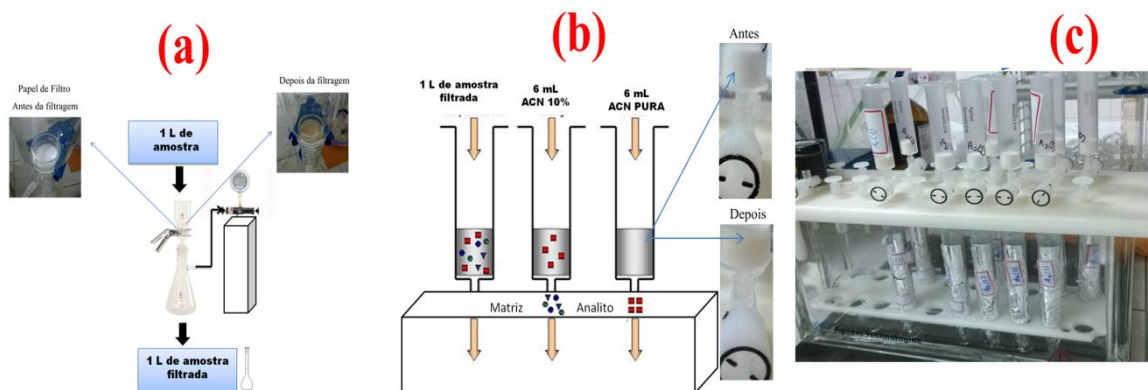


Figura 3.3:Esquema da limpeza e pré-concentração da amostra.

Depois de realizada a extração das substâncias previamente retidas nos cartuchos, tem-se um extrato de 6 mL que contém o analito e a carga orgânica remanescente. Para aumentar ainda mais o fator de pré-concentração seca-se aplicando um jato de nitrogênio (**Figura 3.4a**) de modo a formar uma leve tremulação na superfície do extrato (**Figura 3.4b**), mantendo-se o fluxo de nitrogênio é mantido até total secagem da amostra. Após a total secagem das amostras, o extrato formado é redissolvido (**Figura 3.4c**) em 1 mL da fase móvel, neste caso dissolve se com acetonitrila grau HPLC (**Figura 3.4d**).

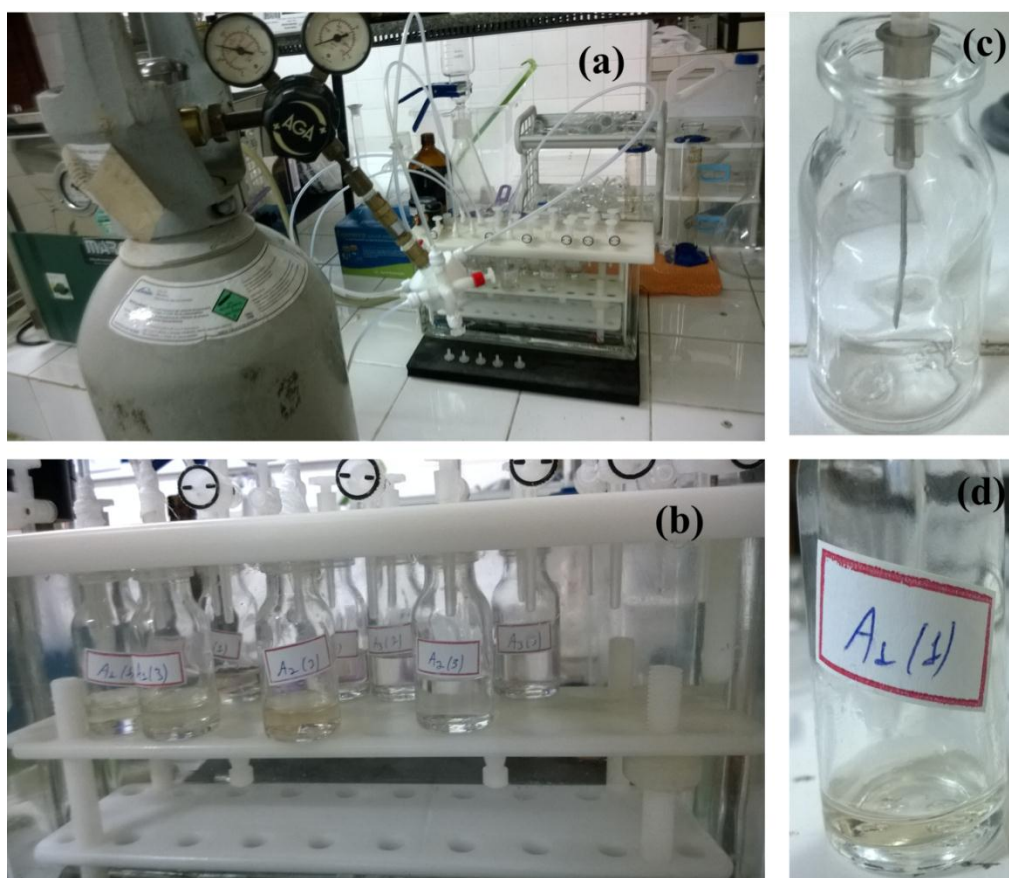


Figura 3.4: Secagem da amostra com nitrogênio e redissolução no volume desejado da fase móvel orgânica.



Mesmo passando pelo papel de filtro de celulose e pelo cartucho o vácuo utilizado pode arrastar pequenas partículas sólidas que podem por ventura danificar a coluna ou reduzir a vida útil da pré-coluna. Para separar essas partículas sólidas e para remover traços de água que tenham passado pelo cartucho SPE e não tenham secado com o nitrogênio, passa-se o extrato por um filtro seringa hidrofílico de 4 mm e 0,22 μm de diâmetro de poro (veja [Figura 3.5](#)).

Após todas essas etapas do preparo da amostra, obtém-se 1 mL (fator de pré-concentração de 1000 vezes) do extrato da amostra contendo o analito, dentre outras substâncias. Os extratos são armazenados em recipiente longe do contato com a luz e estão prontos para serem injetados no sistema cromatográfico.

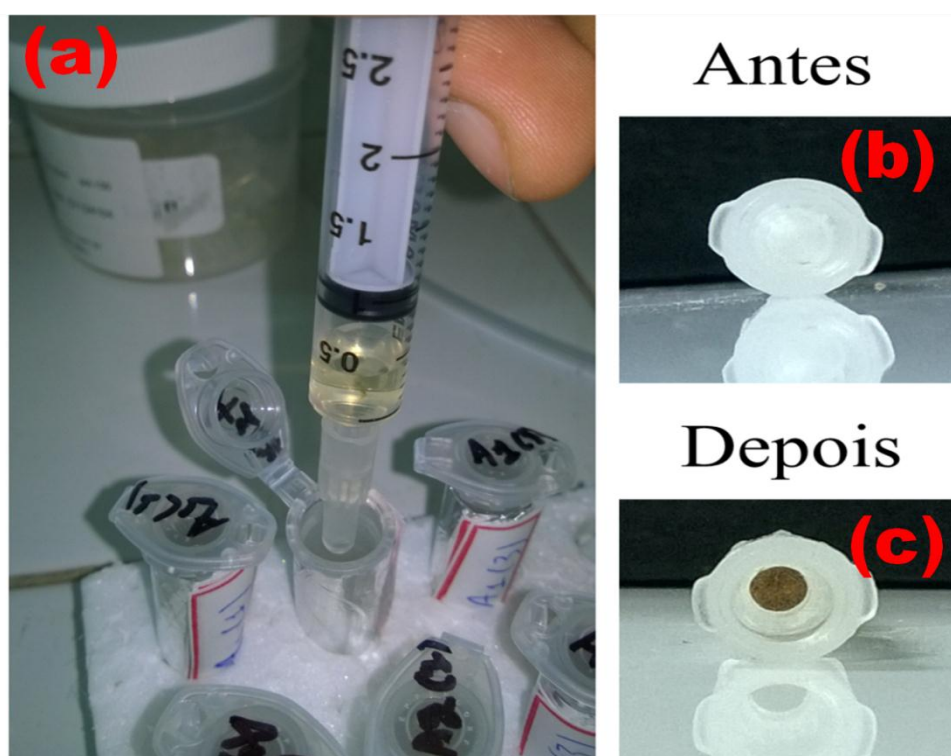


Figura 3.5: Remoção de partículas com o filtro seringa.

Após todo procedimento descrito anteriormente, as amostras encontram-se em condições de serem injetadas no cromatógrafo e foram analisadas conforme descrito na seção 3.6 para identificar a presença dos estrógenos e posteriormente foram fortificadas com 5 mgL^{-1} para análise a exatidão do método proposto levando em consideração a complexidade da matriz.

3.6 Análise cromatográfica

A separação foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência da Dionex da série Ultimate 3000 (Dionex Technologies, São Paulo, Brasil), como mostrado na [Figura 3.6](#), com uma coluna da Acclaim® 3 C18 3 μm 150 $\times$ 4,6 mm (Dionex Technologies, São Paulo, Brasil).



Figura 3.6: Cromatógrafo líquido de alta eficiência.

A fase móvel consiste de água (eluente A) e acetonitrila (eluente B) ambos acidificados com 1% de ácido acético. A eluição foi realizada em modo isocrático a um fluxo de $1,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ com uma composição de 70% de acetonitrila e 30% de água ambos grau HPLC. A corrida teve uma duração de três minutos e foram registrados dois espectros na região do UV (190 a 400 nm) por segundo (frequência de 2Hz) utilizando um detector de arranjo de diodos da Dionex da série Ultimate 3000.

Para as amostras reais foi acrescentada uma etapa de limpeza que consistiu em alterar o fluxo para 100% de acetonitrila por dois minutos, retornando em seguida para a composição inicial de 70% de acetonitrila até condicionar a coluna com a fase móvel (dois minutos) para assim injetar a próxima amostra. Esta etapa de limpeza evita efeito de memória da amostra.

3.7 Software e análise de dados

Todos os cálculos foram realizados em ambiente MatLab[®] empregando a interface gráfica MVC2 (veja detalhes na **Figura 3.7**) implementada por Olivieri e coautores disponível para download em www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/mvc2.rar. Na interface, foi possível obter os modelos PARAFAC, MCR-ALS, N e U-PLS ambos com etapa RBL.



(a) MVC2: THREE-WAY / SECOND-ORDER CALIBRATION

Basic data

Model: Select ...

Sensor data: [text box]

Selected sensors: [text box]

Data type: Select ...

Sample: [text box] PLOT

Options

Cal. samples excluded: [text box]

Uncertainty in signals: [text box]

Uncertainty in: [text box]

Mean center: ☐

Constraint in A: None

Constraint in B: None

Constraint in C: None

Initialization: DTLD

Screen

SAVE SCREEN [text box]

LOAD SCREEN [text box]

(b) MVC2: THREE-WAY / SECOND-ORDER CALIBRATION

Basic data

Model: TLD PARAFAC

Sensor data: [text box]

Selected sensors: [text box]

Data type: Select ...

Sample: [text box] PLOT

Options

Cal. samples excluded: [text box]

Uncertainty in signals: [text box]

Uncertainty in: [text box]

Mean center: ☐

Constraint in A: None

Constraint in B: None

Constraint in C: None

Initialization: DTLD

Screen

SAVE SCREEN [text box]

LOAD SCREEN [text box]

(c) MVC2: THREE-WAY / SECOND-ORDER CALIBRATION

Basic data

Model: MCR-ALS

Sensor data: [text box]

Selected sensors: [text box]

Data type: Select ...

Sample: [text box] PLOT

Options

Cal. samples excluded: [text box]

Uncertainty in signals: [text box]

Uncertainty in: [text box]

Mean center: ☐

Constraint in A: None

Constraint in B: None

Constraint in C: None

Initialization: DTLD

Screen

SAVE SCREEN [text box]

LOAD SCREEN [text box]

(d) MVC2: THREE-WAY / SECOND-ORDER CALIBRATION

Basic data

Model: RBL U-PLS/RBL

Sensor data: [text box]

Selected sensors: [text box]

Data type: Select ...

Sample: [text box] PLOT

Options

Cal. samples excluded: [text box]

Uncertainty in signals: [text box]

Uncertainty in: [text box]

Mean center: ☐

Constraint in A: None

Constraint in B: None

Constraint in C: None

Initialization: DTLD

Screen

SAVE SCREEN [text box]

LOAD SCREEN [text box]

Figura 3.7: Interface gráfica MVC2 implementada por Olivieri e co-autores.

Capítulo 4



**RESULTADOS
E
DISCUSSÃO**



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação previa dos dados

Na **Figura 4.1a** é apresentado um cromatograma obtido sob as condições de eluição descritas na seção 3.6. Com base no cromatograma dos padrões puros de E1, E2, EE2 e E3 é possível observar que os analitos eluem em duas regiões demarcadas em cinza: (1) na primeira em aproximadamente 1,45 minutos ocorre a eluição do E3 que aparece completamente resolvido, em que se observa um pico simétrico e sem sobreposição, (2) na segunda região entre 2,0 e 2,6 minutos ocorre concomitantemente a coeluição parcial dos demais hormônios (E1, E2 e EE2).

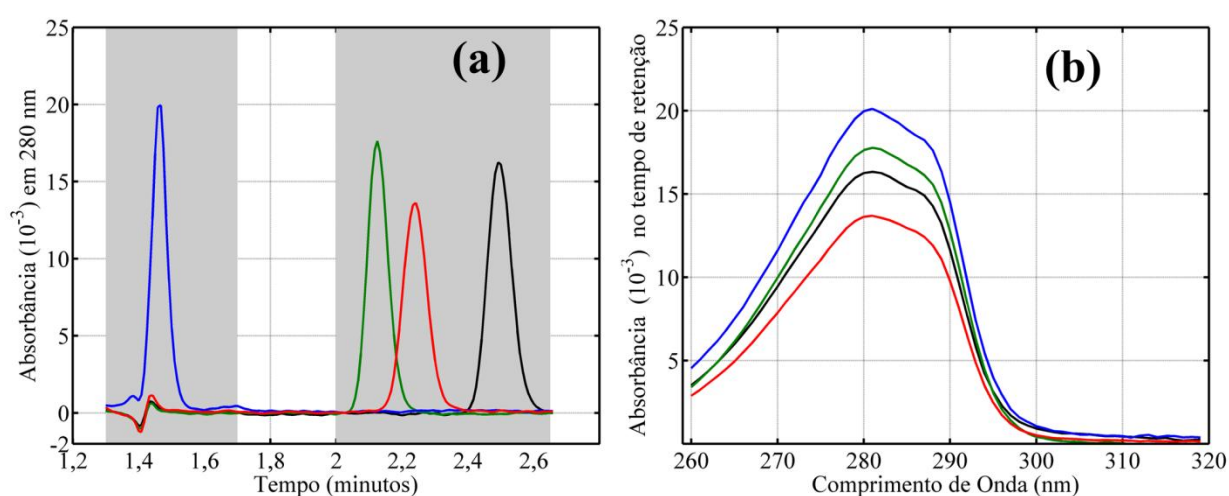


Figura 4.1: (a) Cromatogramas (a) e espectros (b) dos padrões puros de E3 (—), E2 (—), EE2 (—) e E1(—).

Na **Figura 4.1b** é apresentado o perfil espectral dos quatros analitos estudados, registrados nos respectivos tempos de retenção, neste trabalho, que apresentam espectros muito semelhantes, um reflexo da similaridade de suas estruturas, que podem ser observados na fórmula estrutural dos mesmos (veja **Figura 2.1**). Os quatros hormônios apresentam os mesmos grupos funcionais. Estas características de similaridade entrem os quatros analitos representa um desafio a mais para sua quantificação.

4.2 Conjunto de calibração

Com o propósito de construir modelos de calibração individual para cada analito menos complexos, bem como reduzir o esforço computacional, as regiões (1) e (2) foram modeladas separadamente. As matrizes LC-DAD inicialmente com dimensão de 360 tempos de eluição registrados em 60 comprimentos de onda foram particionados em região (1) e região (2) com dimensões de 49 min x 60 λ e 80 min x 60 λ respectivamente. Sendo a região (1) empregada para modelar o E3 e a região (2) para os demais analitos.



Os modelos para prever a concentração dos analitos em amostra de águas naturais foram construídos empregando os mais difundidos algoritmos para calibração de segunda ordem a fim de compará-los. O PARAFAC, MCR-ALS, U e N-PLS ambos com etapa pós-calibração de RBL, foram avaliados.

Na **Figura 4.2** é apresentada a superfície LC-DAD para os padrões de calibração em maior concentração (10 mg L^{-1}) para os estrógenos em estudo neste trabalho. Como indicado na seção 3.2, conjuntos de calibração foram obtidos pela injeção em triplicata de 13 padrões puros dos analitos no sistema LC-DAD com concentrações variando de 4 a 10 mg L^{-1} com incremento igualmente espaçado de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Como resultado o conjunto de calibração para região (1) denominado **XcalA** é composto por um tensor em três vias com dimensões $39 \times 49 \times 60$ (**Figura 4.2a**), enquanto o tensor de calibração da região (2), **XcalB**, possui dimensões $39 \times 80 \times 60$ (**Figura 4.2b, c e d**).

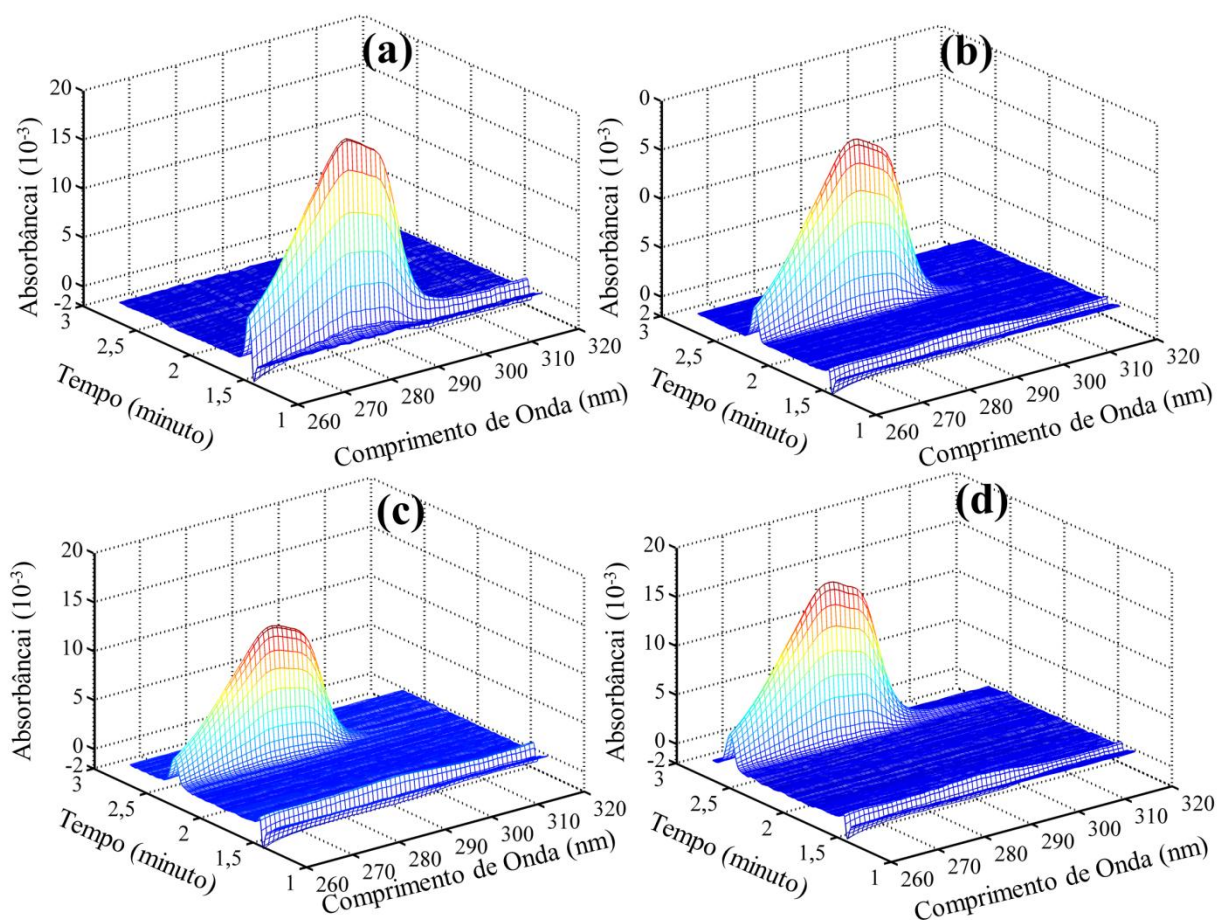


Figura 4.2: Perfil LC-DAD de cada padrão puro de E3(a), E2 (b), EE2 (c) e E1 (d).

Para modelos U e N-PLS, que empregam variáveis em domínio transformado truncado o número de variáveis latentes foi estimado empregando o procedimento de validação cruzada completa, sendo o critério usado para indicar o número ótimo para cada modelo a comparação da



variância explicada com base em um teste F com 25% de significância estatística (Figura 4.3) como recomendado na literatura [100]. Os valores obtidos são apresentados nas Tabelas 4.3 e 4.4.

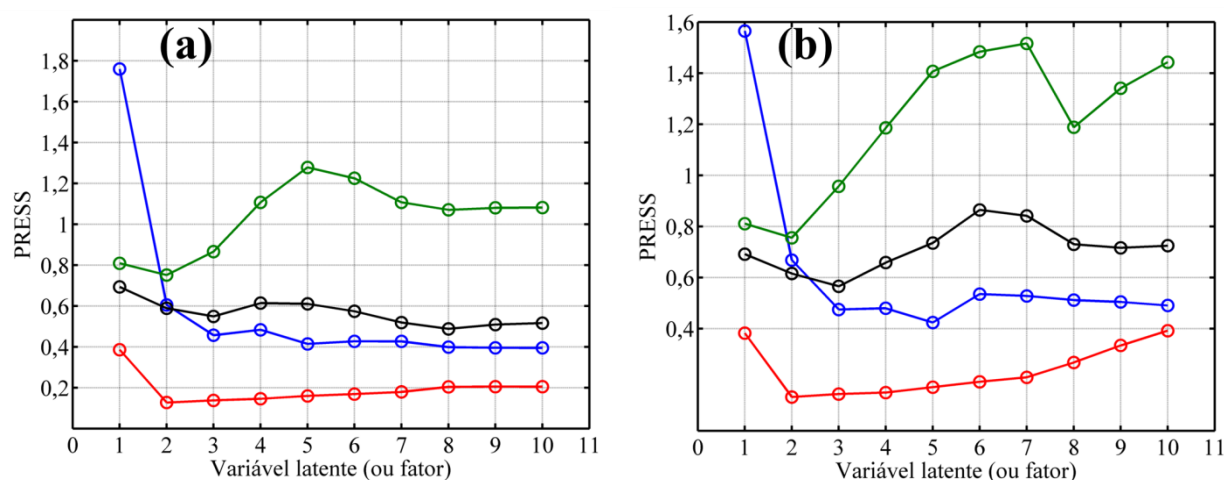


Figura 4.3: PRESS versus número de variáveis latentes para os modelos (a) U-PLS e (b) N-PLS para os quatro estrógenos E3 (—), E2 (—), EE2 (—) e E1(—) .

Para os modelos PARAFAC e MCR-ALS, que empregam o procedimento de calibração pseudo-univariada, os tensores de calibração foram justapostos aos tensores do conjunto de validação gerando tensores do tipo $[X_{calA}X_{valA}]$ e $[X_{calB}X_{valB}]$, com dimensões $114 \times 49 \times 60$ e $114 \times 80 \times 60$ respectivamente. Estes tensores foram então submetidos a um processo de decomposição empregando o PARAFAC e o MCR-ALS, sendo o número de fatores escolhidos com base no valor de CORCONDIA e nos valores singulares obtidos pela decomposição da matriz D, aumentada na dimensão coluna, respectivamente (Figura 4.4).

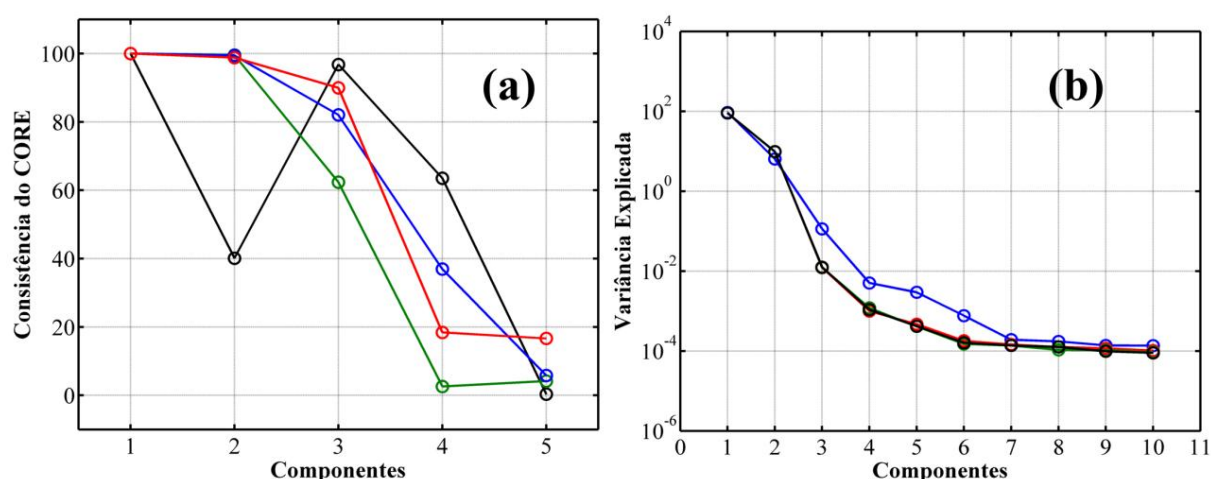


Figura 4.4: Gráficos de (a) Consistência do CORE versus componentes PARAFAC e (b) variância explicada versus número de componentes para o MCR para os estrógenos E3 (—), E2 (—), EE2 (—) e E1(—).



Os escores obtidos para o conjunto de calibração foram usados na construção da curva analítica pseudo-univariada e a concentração das amostras de validação calculadas pela interpolação dos respectivos escores na curva analítica.

4.3. Validação dos modelos

Na **Figura 4.5a** região (1) e **4.5b** região (2) são apresentados os perfis LC-DAD característicos para as amostras de validação. Na **Figura 4.5a** aparece o analito E3 e a daizéina e na **Figura 4.5b** os demais analitos (E1, E2 e EE2) e a Biochanina A, em ambos os casos é possível observar forte sobreposição entre o sinal dos analitos com os interferentes como também no caso da região (2) a sobreposição entre os analitos E1, E2 e EE2, uma vez que cada conjunto de calibração foi construído apenas para um analito por vez, a sobreposição mútua dos sinais é tida como interferência adicional, justificando o uso de algoritmos quimiométricos para se alcançar a vantagem de segunda ordem. A seguir é discutido individualmente o desempenho de cada algoritmo frente o conjunto de validação

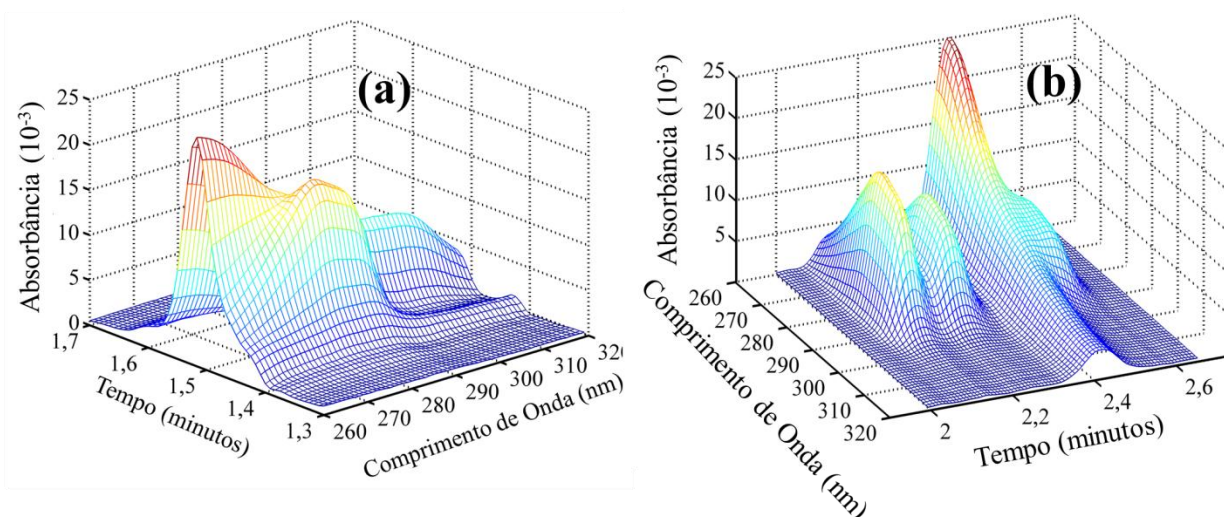


Figura 4.5: Perfil LC-DAD característicos das amostras do conjunto de validação (a) região 1 e (b) região 2 do cromatograma.

4.3.1 PARAFAC

Na **Tabela 4.1** é sumarizado o resultado obtido para o conjunto de validação empregando o modelo PARAFAC para os quatro estrógenos. Entre parêntese encontra-se indicado o número de fatores empregados na construção do modelo.

Embora o PARAFAC apresente limitações frente a dados como LC-DAD, devido a deslocamento de tempo de retenção os modelos PARAFAC apresentam bom desempenho quando aplicado ao conjunto de validação de amostras sintéticas, sobretudo para os estrógenos E1 e E3 com valor de erro médio de 0,14 e 0,43 respectivamente.

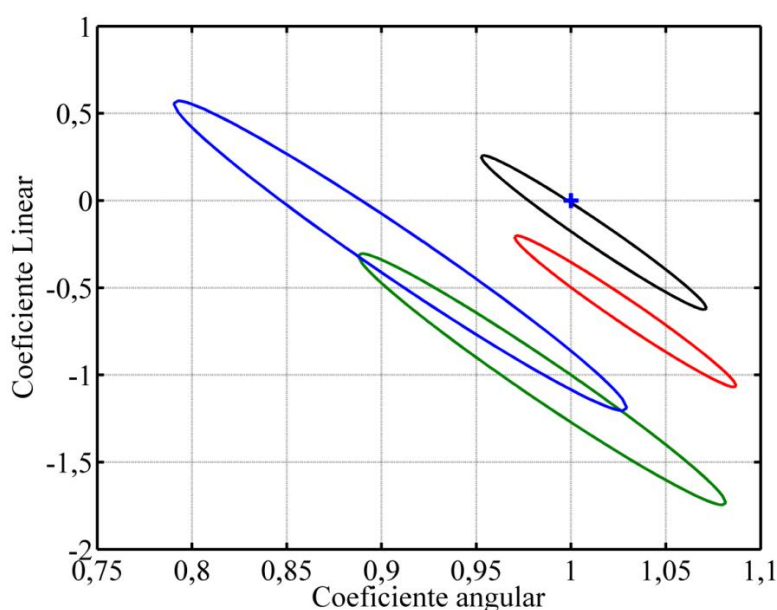
**Tabela 4.1:** Resumo dos parâmetros estatísticos obtidos para validação dos modelos PARAFAC.

Analitos/Parâmetros	RMSEV (mg L ⁻¹)*	REP (%)	SEN (Sinal. (mg L ⁻¹) ⁻¹)	γ^{-1} (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)
E1	0,14 (4)	1,90	0,20	1,60	2,40
E2	1,14 (4)	15,15	0,08	0,64	6,00
E3	0,99 (2)	13,17	11,00	29,00	0,28
EE2	0,43 (4)	5,68	0,08	0,78	5,00

*Entre parênteses o número de fatores empregado na construção do modelo PARAFAC.

Os valores de sensibilidade, sensibilidade analítica e LOD foram estimados como e apresentam em termos médios para o conjunto de validação. Os valores obtidos podem ser considerados concordantes entre os valores de RMSEP, REP e a faixa de concentração estudada.

Na **Figura 4.6** é apresentada a região elíptica conjunta dos modelos PARAFAC para os quatro estrógenos quantificados. É possível observar que apenas para o E1 a elipse de confiança contém o ponto ideal (zero para coeficiente linear e um para coeficiente angular), indicando que para os demais analitos obtidos o modelo apresenta um valor de *bias* pequeno, tendo em vista o REP na ordem de 5%.

**Figura 4.6:** Região elíptica de confiança conjunta dos modelos PARAFAC de E3 (—), E2 (—), EE2 (—) e E1 (—).

Na **Figura 4.7** são apresentadas as curvas de calibração pseudo-univariada obtidas para predição simultânea de todas as amostras do conjunto de validação, onde é possível observar um bom ajuste linear entre os escores de calibração e a concentração dos padrões.

Como uma característica intrínseca dos métodos baseados em decomposição de curvas, é que ao contrário de métodos bilineares com liberdade rotacional o PARAFAC possuiu solução



única e quando a quantidade correta de fatores é empregada os pesos do modelo correspondem aos perfis instrumentais puros de todas espécies ativas (que geram sinal), para dados LC-DAD teremos os cromatogramas e os espectros de absorção molecular.

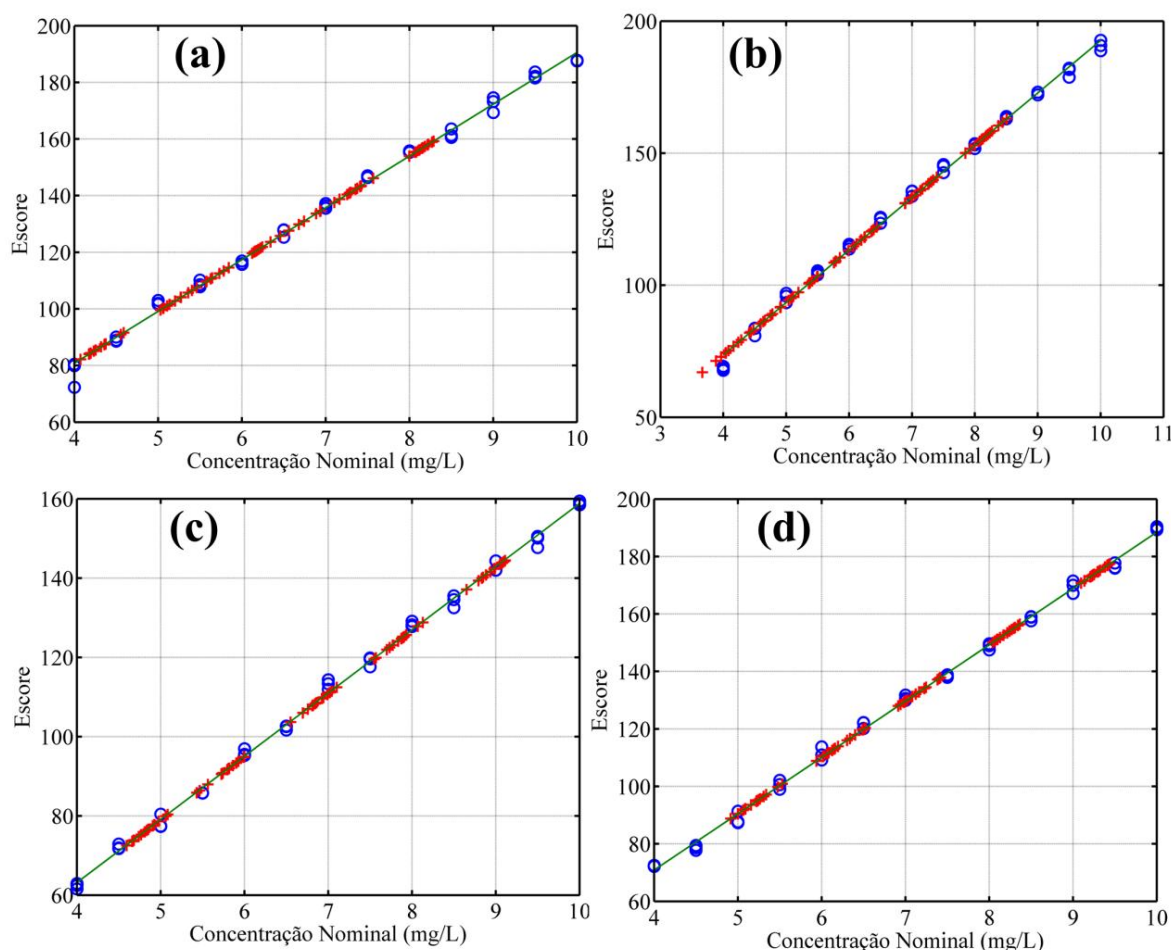


Figura 4.7: Curva pseudo-univariada obtida via PARAFAC para os analito E3 (a), E2 (b), EE2 (c) e E1(d).

Na [Figura 4.8](#) são apresentados os perfis recuperados pelo PARAFAC para os respectivos valores de fatores indicados na [Tabela 4.1](#), estes são confrontados com os perfis reais puros obtidos para os padrões de calibração. Para que os espectros (reais e estimados) sejam avaliados de forma a levar em consideração o perfil estimado foram normalizados para máximo comprimento igual a um para remover os efeitos de intensidade.

Com base nos na [Figura 4.8](#) é possível observar uma concordância satisfatória entre o perfil real dos analitos e o perfil recuperado pelo PARAFAC, contudo uma diferença entre perfil experimental recuperado pelo PARAFAC foi observada para ambos interferentes.

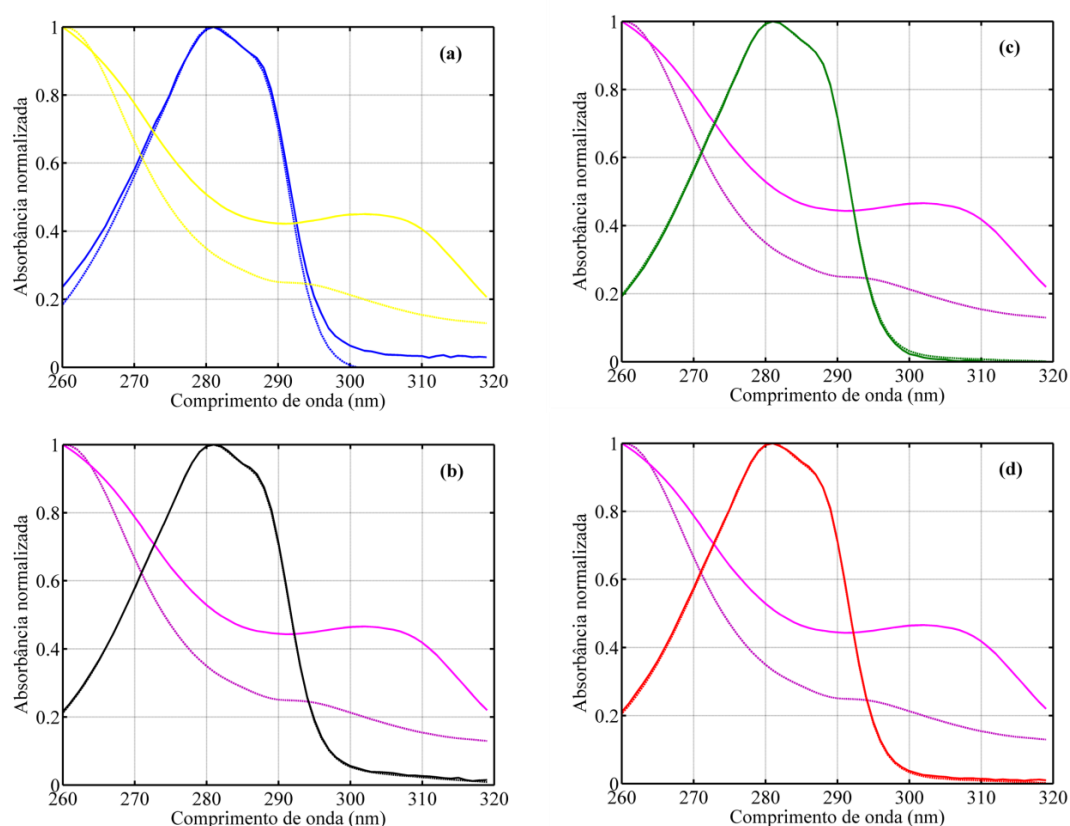


Figura 4.8: Perfil espectral predito pelo PARAFAC (linha pontilhada) e perfil espectral experimental (linha sólida), E3 (—), E2 (—), EE2 (—) e E1(—) e interferentes Biochanina A (—) e Daizéina (—).

4.3.2 MCR-ALS

Na **Tabela 4.2** são mostrados os resultados obtidos para validação dos modelos MCR-ALS empregando a matriz aumentada na dimensão coluna (tempos de eluição) e restrição de não negatividade em ambos os modos e unimodalidade no perfil de concentração.

Tabela 4.2: Parâmetros do MCR-ALS.

Analitos/Parâmetros	RMSEV (mg L^{-1})*	REP (%)	SEM (Sinal. (mg L^{-1}) ⁻¹)	γ^{-1} (mg L^{-1})	LOD (mg L^{-1})
E1	0,80 (4)	10,73	0,76	0,43	9,2
E2	0,38 (4)	5,00	0,64	0,37	11
EE2	1,7 (4)	22,65	0,64	0,39	10
E3	0,09 (6)	1,25	3,1	8,4	0,52

Entre parênteses o número de fatores MCR utilizados na decomposição dos dados.

A modelagem MCR emprega uma decomposição bilinear em que o problema de liberdade rotacional é contornado pelo uso de restrição para possibilitar a obtenção de uma solução química do sistema, ou seja, os perfis instrumentais puros. O tensor $i \times j \times k$ é transformado em uma matriz aumentada ($ij \times k$) na dimensão que rompe a trilinearidade, para dados LC-DAD, este modo corresponde aos tempos de eluição. Contudo no modo instrumental, correspondente ao perfil espectral, deve haver um mínimo de seletividade, o que não ocorre no caso dos quatro estrógenos quantificados neste trabalho (veja **Figura 4.1b**).



Ao contrário da modelagem com PARAFAC, para o MCR a melhor predição foi encontrada para os estrógenos E3 (REP 1,25 %) e E2 (REP 5,00 %). Para os estrógenos E1 e EE2, valores de REP encontrados são consideravelmente elevados, 10,73 e 22,65% respectivamente. Com base no exposto acima, o melhor resultado obtido pelo MCR, como já esperado foi obtido para o estrógeno E3 com REP de 1,25, modelado empregando a região (1), que contém apenas o analito (o próprio E3) e o interferente daizeína, que apresenta um perfil espectral muito diferente do perfil espectral do analito.

Os três analitos (E1, E2 e EE2) que eluem na região (2) juntamente com o interferente biochanina A, apresentaram valores mais elevados de REP. Em decorrência da alta correlação entre seus espectros. Ainda na [Tabela 4.2](#) são mostradas outras figuras de desempenho analítico para os modelos MCR-ALS. A média da sensibilidade, da sensibilidade analítica e do LOD para todo conjunto de validação. Na [Figura 4.9](#) são mostradas as regiões elípticas de confiança conjunta obtida a partir da regressão entre valor de referencia e valor estimado pelos modelos MCR para os quatros estrógenos.

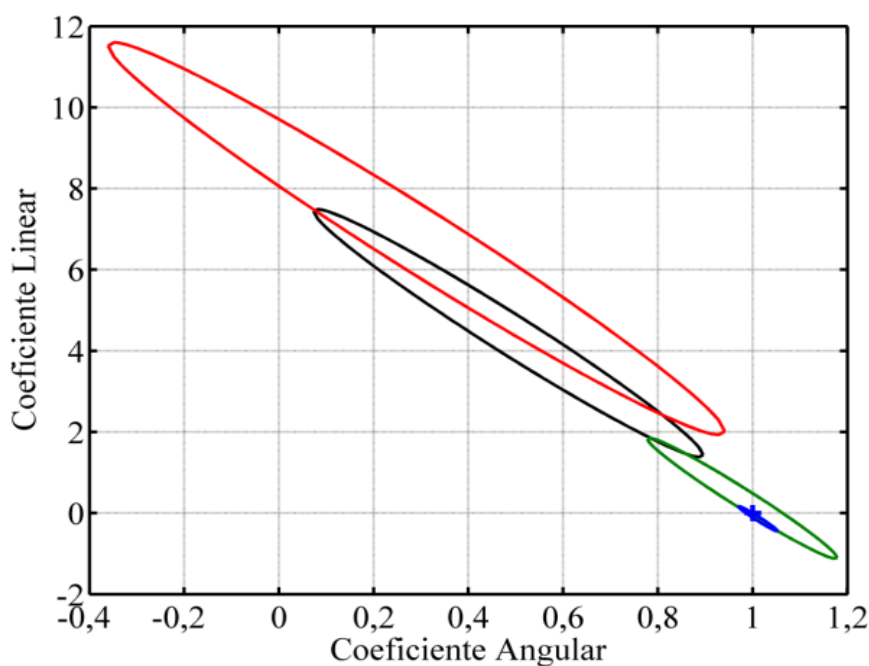


Figura 4.9: Região elíptica de confiança conjunta dos modelos MCR-ALS E3 (—), E2 (—), EE2 (—) e E1(—).

Ao contrário do PARAFAC, a predição dos estrógenos com MCR apresentou um ligeiro bias apenas em dois casos (E1 e EE2), contudo para o E1 uma predição exata foi obtida. Na [Figura 4.10](#) são apresentadas as curvas de calibração pseudo-univariadas obtidas empregando os escores obtidos na decomposição dos dados com MCR-ALS.

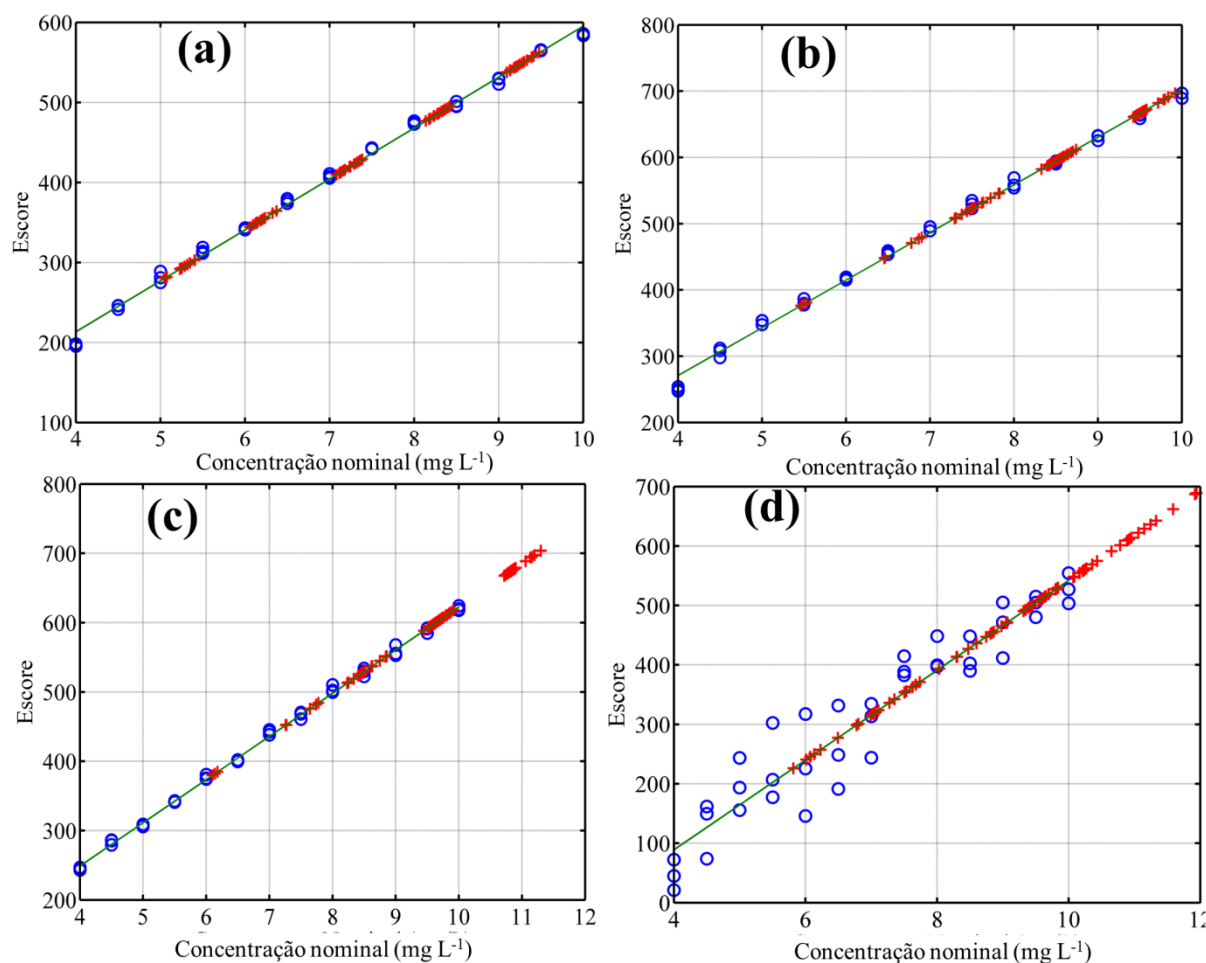


Figura 4.10: Curvas pseudo-univariadas para os analitos E3 (a), E2 (b), E1(c) e EE2 (d).

Na maioria dos casos, é possível observar um bom ajuste da curva (linha solidada verde) aos escores de calibração (círculos azuis), para o estrógeno E1 o ajuste da curva analítica não foi considerado bom, e para os estrógenos EE2 e E2 ocorreram predições de algumas amostras com valores de concentração maiores que o valor de referencia, gerando o *bias* do modelo.

Na **Figura 4.11** são apresentados os perfis instrumentais recuperados com o MCR. É possível observar que para a região (1) tanto o perfil do analito E3 quanto o perfil do interferente são muito similares aos respectivos perfis instrumentais, corroborando com o baixo valor de RMSEP e REP obtidos. Ainda nesta região foi necessário estimar mais outros quatro perfis que são atribuídos ao sinal de fundo do sistema, estas quantidade de fatores foi escolhida com base em uma análise dos autovalores significativos da matriz aumentada na dimensão dos tempos de eluição.

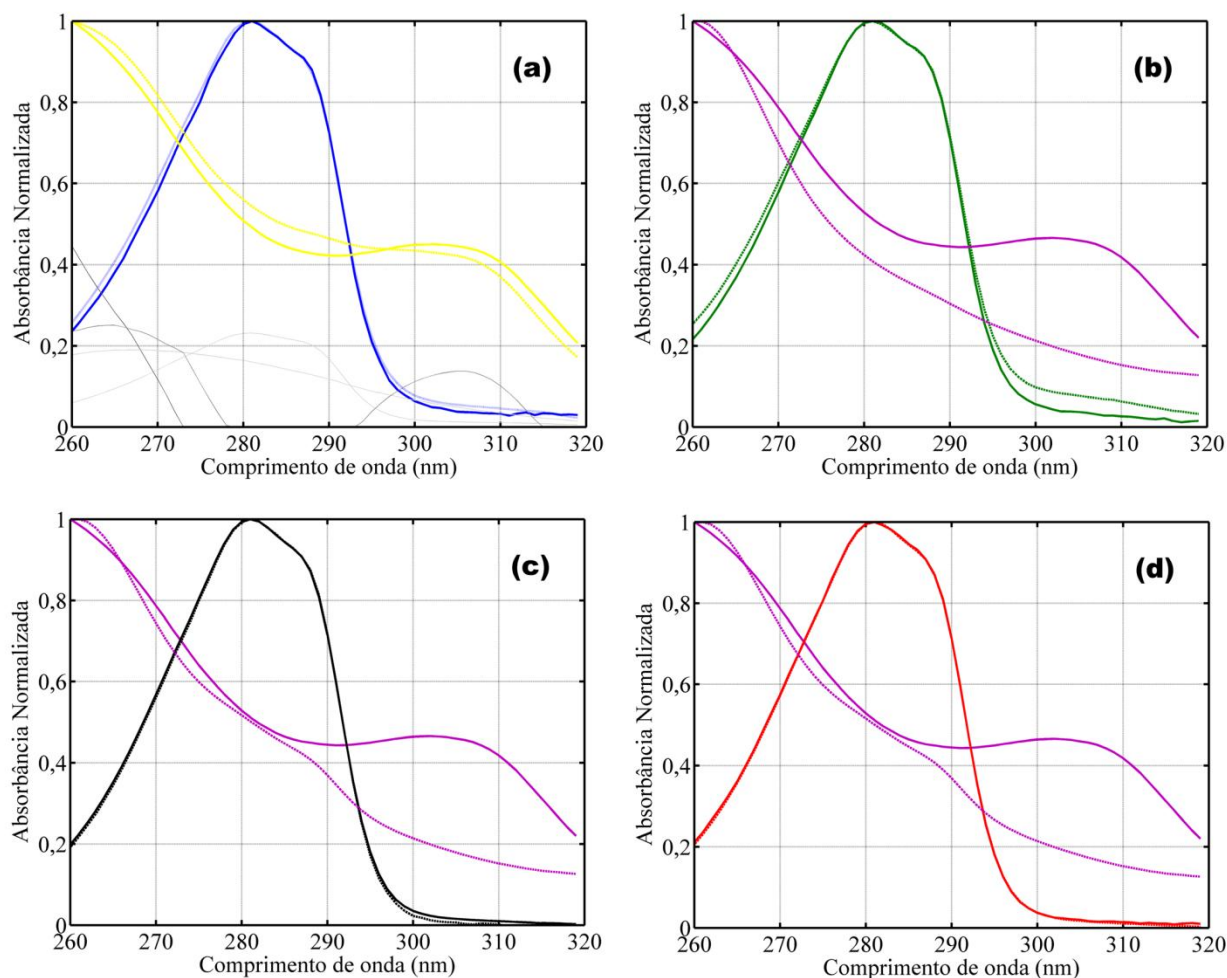


Figura 4.11: Perfil espectral predito pelo MCR-ALS (linha pontilhada) e o experimental (linha sólida), E3 (—), E2 (—), EE2 (—), E1 (—) e interferentes biochanina A (—), daidzeína (—) e sinal de fundo (—) em (a).

Já para os demais analitos há uma boa correlação entre espectro experimental e o espectro estimado pelo MCR, contudo não há uma boa recuperação do perfil do interferente (biochanina A), que possivelmente leva a valores de RMSEP e REP mais elevados. Para região (2) do cromatograma, não foram estimados perfis referentes ao sinal de fundo.

4.3.3 N-PLS/RBL e U-PLS/RBL

Ao contrário dos métodos PARAFAC e MCR-ALS os modelos de regressão N e U-PLS usam se se baseiam em uma etapa pós-calibração para alcançar a vantagem de segunda ordem denominada de bilinearização residual. Estas modelagens geralmente levam a modelos mais robustos e com melhores resultados de predição devido a sua estrutura em variáveis latentes. Contudo são modelos mais abstratos e pobres de informação qualitativa. Na [Tabela 4.3](#) é apresentado um resumo das métricas estáticas para o desempenho de ambos os modelos quando aplicados ao conjunto de validação.

**Tabela 4.3:** Resumo estatístico da validação dos modelos N e U-PLS/RBL.

UPLS-RBL					
Analitos/Parâmetros	RMSEV (mg L ⁻¹)*	REP (%)	SEM (Sinal.(mg L ⁻¹) ⁻¹)	γ^{-1} (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)
E1 (2) ^a	0,39 (3) ^b	5,15	0,21	9,53	0,37
E2 (1) ^a	0,18 (1) ^b	2,45	8,20	6,46	0,53
EE2 (2) ^a	0,37 (1) ^b	4,97	6,23	4,60	0,79
E3(3) ^a	0,41 (1) ^b	5,42	5,73	24,05	0,22
NPLS-RBL					
Analitos/Parâmetros	RMSEV(mg L ⁻¹)*	REP (%)	SEN(Sinal.(mg L ⁻¹) ⁻¹)	γ^{-1} (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)
E1 (1) ^a	0,43 (3) ^b	5,76	0,066	0,144	0,72
E2 (1) ^a	0,16 (1) ^b	2,12	8,19	1,86	0,77
EE2 (2) ^a	0,51 (1) ^b	6,85	6,26	1,63	0,88
E3(3) ^a	0,27 (1) ^b	3,54	5,54	1,90	1,37

^aVariáveis latentes estimadas para o conjunto de calibração e ^bnúmero de fatores RBL

Como apresentado na **Tabela 4.3** resultados similares foram alcançados pelo U e pelo N-PLS/RBL com valores de REP entre 2,45 a 5,42% e 2,12 a 6,85%, respectivamente, e ambos apresentaram melhor desempenho que os métodos PARAFAC e MCR-ALS. Este resultado pode ser justificado devido às peculiaridades do conjunto de dados, os deslocamentos de pico inerente à técnica LC-DAD (para o PARAFAC) e a alta correlação na dimensão espectral (para o MCR-ALS).

Ainda na **Tabela 4.3** são apresentados os valores de sensibilidade e sensibilidade analítica para ambos os métodos de regressão, que são na verdade uma média de todo conjunto de validação, também são apresentados os valores de LOD, com valores bem inferiores aos obtidos pelo PARAFAC e MCR-ALS. Para quase todos os casos apenas um fator RBL foi necessário para alcançar com sucesso a vantagem de segunda ordem. Isto ocorreu possivelmente devido à alta correlação entre o perfil instrumental dos analitos, sendo os mesmos extraídos como combinação linear um dos outros.

Na **Figura 4.12a** e **4.12b** são apresentadas as regiões elípticas de confiança conjuntas obtidas para os modelos U-PLS/RBL e N-PLS/RBL respectivamente. Assim como para os demais modelos podem-se observar que, para maioria dos casos a predição apresenta um ligeiro bias negativo, contudo a variação do coeficiente linear e angular são muito pequenas em comparação com a faixa de calibração. Outro aspecto a ser observado é a área da elipse, que para os modelos U e N-PLS/RBL são menores que as áreas obtidas para as elipses dos modelos PARAFAC e MCR-ALS, reflexo da melhor exatidão dos métodos baseados em variáveis latentes.

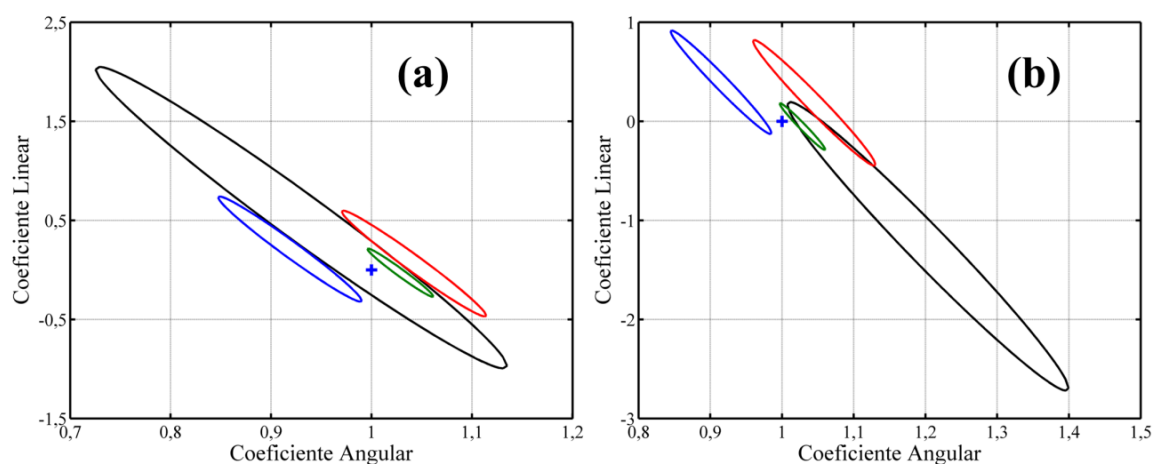


Figura 4.12: Região elíptica de confiança conjunta obtida para os modelos (a) U-PLS/RBL e (b) N-PLS/RBL E3 (—), E2 (—), EE2 (—) e E1 (—).

4.3.4 Predição das amostras de água

Na **Figura 4.13** é ilustrada a superfície característica LC-DAD para as amostras de água de rio e na **Figura 4.14** para as amostras de esgoto, em que é possível avaliar a complexidade e forte sobreposição dos sinais e linha de base.

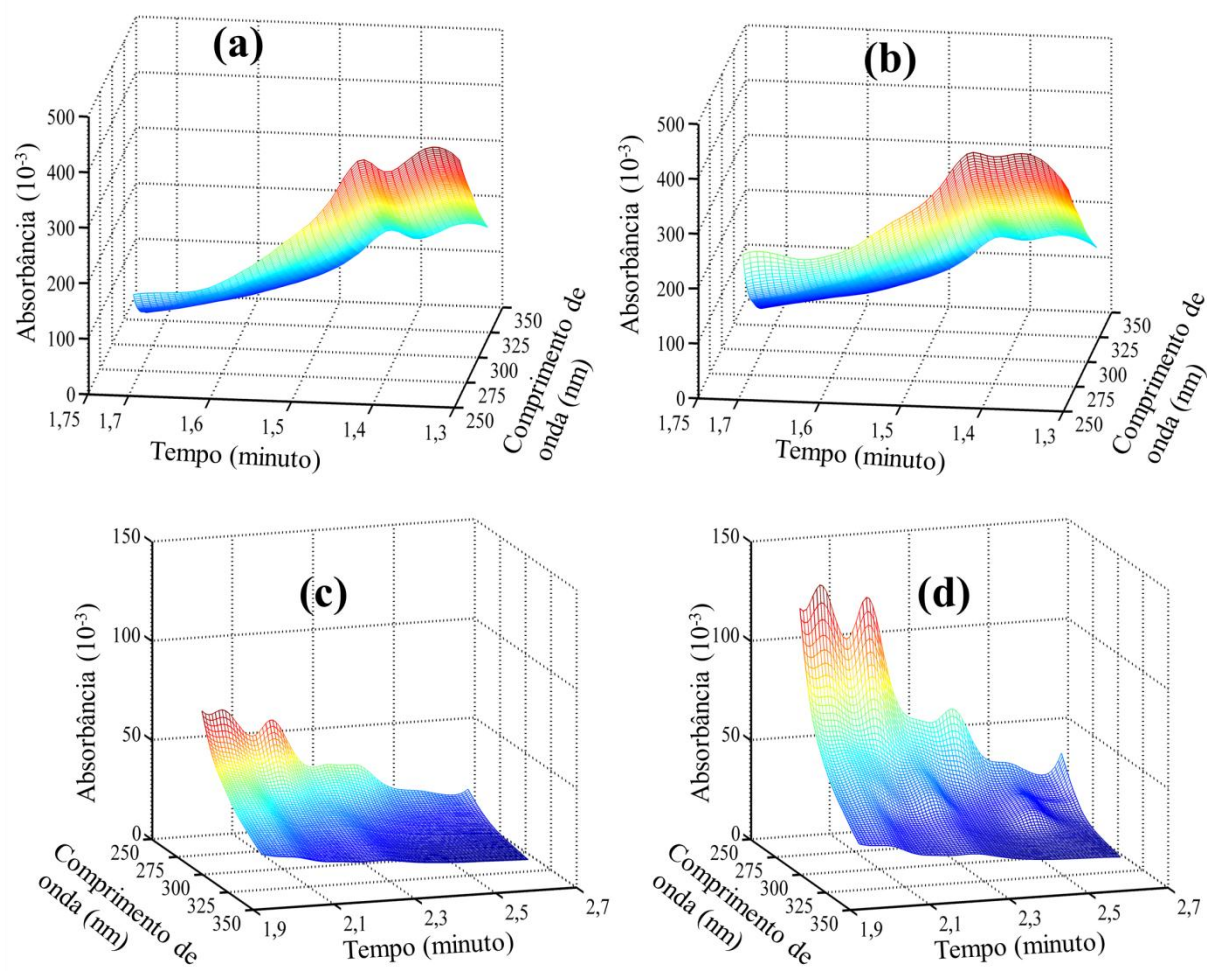


Figura 4.13: Perfil característico das amostras de rio para a região 1 (a,b) e para a região 2 (c,d), antes (a,c) e após (b,d) a fortificação.

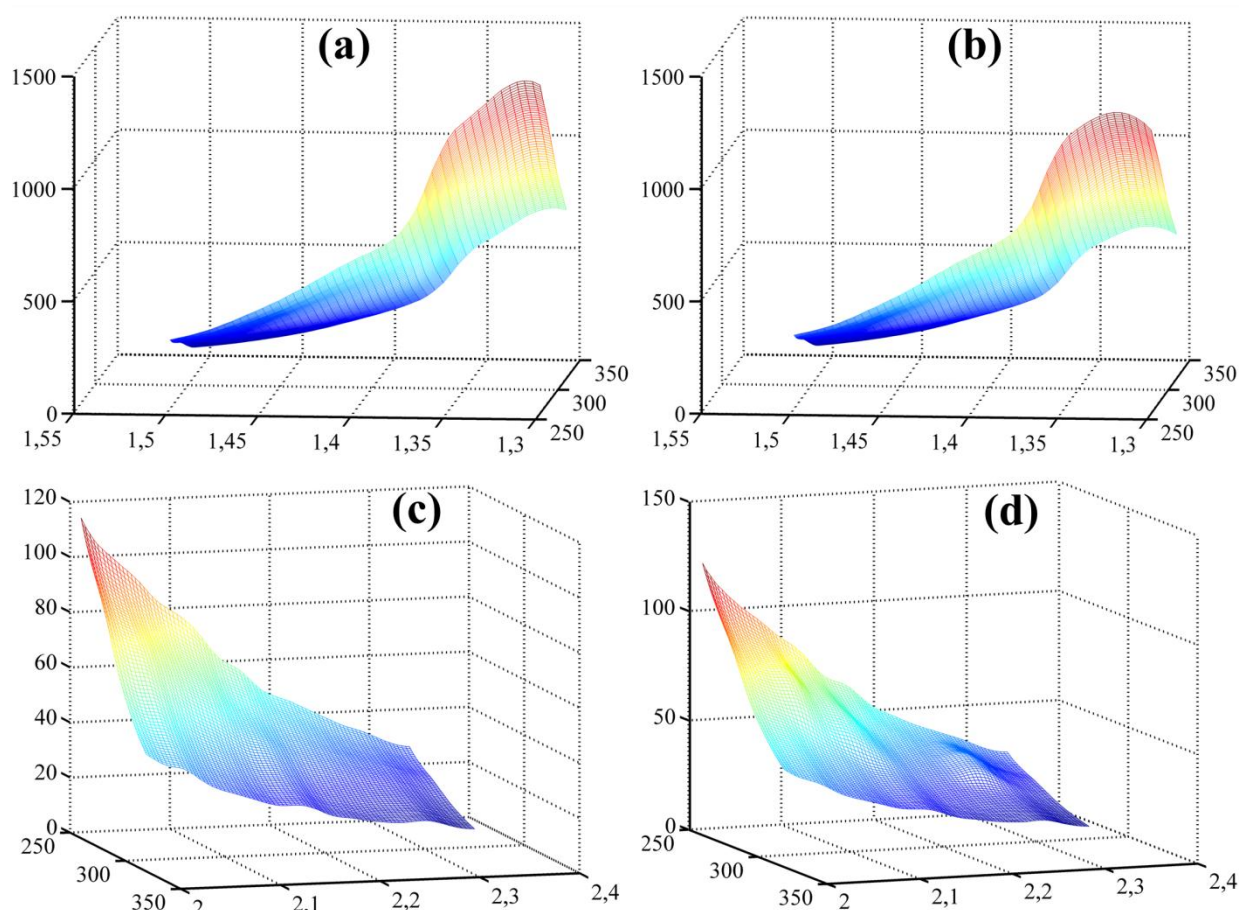


Figura 4.14: Perfil característico das amostras de esgoto para a região 1 (a,b) e para a região 2 (c,d), antes (a,c) e após (b,d) a fortificação.

O algoritmo baseado em mínimos quadrados assimétricos foi avaliado para remoção do perfil de linha de base das amostras de água, contudo os resultados não se mostraram satisfatórios e estes foram recuperados com sugeridos por alguns autores com fator adicional em cada modelo sendo considerado o sinal de fundo do sistema. O resultado da predição da concentração dos estrógenos nas amostras de rio fortificadas em termos de percentual de recuperação foi calculado segundo a [Equação 4.1](#).

$$\%REC = \frac{(C_f - C_0)}{F} * 100 \quad 4.1$$

Onde %REC é o percentual de recuperação, C_f é a concentração predita para amostra fortificada, C_0 foi a concentração predita para amostra antes da fortificação, F valor de concentração usada para fortificar as amostras, em todos os casos foi empregado 5 mgL^{-1} .

Para grande maioria dos casos, não foram detectada a presença dos estrógenos nas amostras de água de rio e de esgoto, sendo, portanto, C_0 igual a zero, possível pelo fato das coletas terem sido realizadas em período chuvoso causando a diluição dos contaminantes.



Na **Tabela 4.4** é apresentado um resumo da predição das amostras de água de rio e esgoto, em que é possível observar que no geral boas recuperações foram encontradas, ficando a maioria dos valores de % REC entre 70 e 120%, que corresponde exatamente a faixa de recuperação dos cartuchos SPE conforme especificação do fabricante e relatos da literatura [21,32].

Para alguns poucos casos (analito/modelo) ocorreram recuperações muito pobres (ou muito baixas ou muito elevadas) que podem ser atribuída à alta complexidade das amostras (água de esgoto e de rio) e forte correção entre os perfis espectrais.



Tabela 4.4: Resumo da predição das amostras de água de rio e esgoto.

Modelo	Analito	F (mgL ⁻¹)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	ETE(1)	ETE(2)	ETE(3)	Rec. Média	RMSEP* (mgL ⁻¹)
PARAFAC	E1	5	37,34 (4)	41,66 (2)	66,48 (3)	91,08(3)	98,57(4)	99,43(4)	101,16(3)	78,80 (3)	88,49(3)	78,11	2,53
	E2	5	83,32(3)	57,59(3)	68,54(3)	89,90(3)	92,05(4)	84,72(3)	73,21(4)	73,91(3)	55,81(3)	75,45	1,89
	E3	5	94,67(7)	92,46(6)	92,19(6)	86,97(7)	91,00 (6)	95,31(6)	89,43(5)	106,01(8)	84,79(9)	92,54	0,22
	EE2	5	82,37(3)	0,95(3)	68,90(2)	86,31(3)	93,49(3)	96,16(3)	2,55(3)	1,10(3)	11,56(3)	49,27	10,68
MCR-ALS	E1	5	103,41(4)	100,85(3)	103,83(4)	97,20(3)	96,34(4)	94,23(4)	95,21(2)	104,73(2)	99,38(2)	99,46	0,04
	E2	5	108,69(5)	100,26(3)	104,89(3)	96,41(3)	92,73(4)	92,46(3)	94,69(2)	104,79(2)	99,34(2)	99,36	0,08
	E3	5	117,56(8)	82,44(9)	62,11(8)	84,26(6)	100,19(6)	114,27(8)	54,81(9)	12,10(8)	58,01(7)	76,19	3,90
	EE2	5	89,40(5)	90,66(3)	97,85(3)	106,90(3)	114,97(4)	114,58(4)	106,47(2)	96,26(3)	111,68(2)	103,2	0,24
UPLS/RBL	E1 (2)	5	72,28(2)	80,67(2)	46,49(1)	63,62(1)	111,73(1)	114,87(1)	111,70(2)	88,69(2)	119,66(2)	89,97	1,76
	E2 (1)	5	34,83(1)	29,37(2)	48,05(1)	58,19(1)	107,87(3)	98,34(3)	71,24(1)	75,04(1)	72,21(1)	66,13	4,44
	E3 (2)	5	104,30(3)	81,31(3)	97,85(3)	115,86(3)	84,71(3)	69,18(3)	51,58(1)	117,03(1)	41,59(1)	84,82	2,32
	EE2 (3)	5	53,45(1)	49,13(1)	52,91(1)	118,35(3)	94,58(1)	101,94(1)	110,36(3)	114,26(3)	99,10(3)	88,23	2,13
NPLS/RBL	E1 (1)	5	29,62(1)	30,04(1)	41,53(1)	75,88(2)	95,98(2)	109,52(1)	109,49(2)	85,76(2)	117,30(2)	77,24	4,04
	E2 (1)	5	34,47(1)	76,54(2)	47,63(1)	57,54(1)	108,38(3)	99,07(3)	70,56(1)	74,28(1)	71,53(1)	71,11	3,28
	E3 (2)	5	94,83(3)	72,59(3)	86,05(3)	92,82(3)	68,38(3)	384,26(1)	70,83(1)	54,98(1)	92,30(1)	113,01	23,82
	EE2 (3)	5	55,83(1)	50,98(1)	54,60(1)	46,95(1)	95,48(1)	103,30(1)	111,76(3)	118,63(3)	101,40(3)	82,1	2,71

*Faixa de calibração 4,0-10,0 mgL⁻¹

CAPÍTULO 5



CONCLUSÃO



5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi proposta uma metodologia para quantificação rápida de quatro estrógenos em amostras de águas. Empregou-se extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos para geração de dados de segunda ordem (LC-DAD). Sendo posteriormente modelado empregando os mais difundidos algoritmos de calibração multivias (PARAFAC; MCR-ALS, N-PLS/RBL e U-PLS/RBL) e assim explorar a vantagem de segunda ordem.

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Uma rápida corrida cromatográfica com eluição isocrática, obtendo eluições sem perfil de linha de base, pode ser empregada para quantificar os estrógenos E1, E2, EE2 e E3 via calibração multivias.
- Redução no gasto de reagentes, resultado do aumento da frequência analítica.
- A vantagem de segunda ordem foi alcançada com sucesso para o conjunto de validação em que estavam presentes interferentes não calibrados (daizeína e biochanina A).
- Embora para maioria dos casos os modelos de calibração apresentassem um ligeiro bias, maior parte das amostras reais (água de rio e de esgoto) foram preditas dentro de uma boa faixa de recuperação (entre 70 e 120 %).
- Os modelos MCR-ALS e PARAFAC apresentaram melhor performance na quantificação do E3 devido à maior seletividade dos sensores nesta região do cromatograma, já para os E2, EE2 e E1 os modelos baseados em estruturas de variáveis latentes demonstraram maior robustez frente à baixa seletividade dos sensores.
- Por fim pode-se indicar que uma metodologia alternativa e rápida para quantificação de estrógenos foi desenvolvida empregando cromatografia e calibração de segunda ordem, contornando efeitos de complexidade de matriz, como a presença de espécies químicas que se sobrepõem ao sinal do analito.

5.1 Propostas futuras

Como propostas de possíveis melhorias e aplicações da nova estratégia, pode-se destacar:

- Quantificação simultânea de estrógenos e fitohormônios em amostras de águas naturais, aumentando assim a abrangência do método proposto;
- Coletar frações eluídas do sistema LC para posterior aquisição de matrizes de fluorescência excitação-emissão para gerar dados de terceira ordem do tipo LC-EEM.
- Modelar os dados LC-EEM com algoritmos apropriados (PARAFAC; MCR-ALS, N-PLS/RTL e UPLS/RTL) para gerar modelos mais sensível (vantagem de terceira ordem).



REFERÊNCIAS

1. Chen, Q.; Shi, J.; Wu, W.; Liu, X.; Zhang, Z. A new pretreatment and improved method for determination of selected estrogens in high matrix solid sewage samples by liquid chromatography mass spectrometry. *Microchem J* 104 (2012) 49–55.
2. Lisboa, N.S.; Fahning, C.S.; Cotrim, G.; Anjos, J.P.; Andrade, J.B.; Hatje, V.; Rocha, G.O. A simple and sensitive UFLC-fluorescence method for endocrine disruptors determination in marine waters. *Talanta* 117 (2013) 168–175.
3. Lima, D.L.D.; Silva, C.P.; Schneider, R.J.; Otero, M.; Esteves, V.I. Application of dispersive liquid–liquid microextraction for estrogens’ quantification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Talanta* 125 (2014) 102–106.
4. Pham, H.T.M.; Kunath, K.; Gehrman, L.; Giersberg, M.; Tuerk, J.; Uhlig, S.; Hanke, G.; Simon, K.; Baronian, K.; Kunze, G. Application of modified *Arxula adeninivorans* yeast cells in an online biosensor for the detection of estrogenic compounds in wastewater samples. *Sensor Actuat B-Chem* 185 (2013) 628–637.
5. Bedard, M.; Giffear, K.A.; Ponton, L.; Sienerth, K.D.; Moore, V.D.G. Characterization of binding between 17 β -estradiol and estriol with humic acid via NMR and biochemical Analysis. *Biophys Chem* 189 (2014) 1–7.
6. Socas-Rodríguez, B.; Asensio-Ramos, M.; Hernández-Borges, J.; Herrera-Herrera, A.V.; Rodríguez-Delgado, M.A. Chromatographic analysis of natural and synthetic estrogens in milk and dairy products. *Trends Anal Chem* 44 (2013) 58–77.
7. Plotan, M.; Elliott, C.T.; Frizzell, C.; Connolly, L. Estrogenic endocrine disruptors present in sports supplements. A risk assessment for human health. *Food Chem* 159 (2014) 157–165.
8. Gorga, M.; Petrovic, M.; Barceló, D. Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1295 (2013) 57–66.
9. Hamid, H.; Eskicioglu, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Res* 46 (2012) 5813–5833.
10. Li, J.; Liu, S.; Yu, J.; Lian, W.; Cui, M.; Xu, W.; Huang, J. Electrochemical immunosensor based on graphene–polyaniline composites and carboxylated graphene oxide for estradiol detection. *Sensor Actuat B-Chem* 188 (2013) 99–105.
11. Chen, B.; Huang, Y.; He, M.; Hu, B. Hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the



- determination of various environmental estrogens in environmental and biological samples. *J Chromatogr A* 1305 (2013) 17–26.
12. Plotan, M.; Frizzell, C.; Robinson, V.; Elliott, C.T.; Connolly, L. Endocrine disruptor activity in bottled mineral and flavoured water. *Food Chem* 136 (2013) 1590–1596.
 13. Zuloaga, O.; Navarro, P.; Bizkarguenaga, E.; Iparraguirre, A.; Vallejo, A.; Olivares, M.; Prieto, A. Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Anal Chim Acta* 736 (2012) 7–29.
 14. Tapiero, H.; Ba, G.N.; Tew, K.D. Estrogens and environmental estrogens. *Biomed Pharmacother* 56 (2002) 36–44.
 15. Bizkarguenaga, E.; Ros, O.; Iparraguirre, A.; Navarro, P.; Vallejo, A.; Usobiaga, A.; Zuloaga, O. Solid-phase extraction combined with large volume injection-programmable temperature vaporization–gas chromatography–mass spectrometry for the multiresidue determination of priority and emerging organic pollutants in wastewater. *J Chromatogr A* 1247 (2012) 104–117.
 16. Brocenschi, R.F.; Rocha-Filho, R.C.; Duran, B.; Swain, M.G. The analysis of estrogenic compounds byflow injection analysis with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode. *Talanta* 126 (2014) 12–19.
 17. Arancibia, J.A.; Damiani, P.C.; Escandar, G.M.; Ibañez, G.A.; Olivieri, A.C. A review on second- and third-order multivariate calibration applied to chromatographic data. *J Chromatogr B* 910 (2012) 22–30.
 18. Gómez, V.; Callao, M.P. Analytical applications of second-order calibration methods. *Anal Chim Acta* 627(2008)169–183.
 19. Ortiz, M.C.; Sarabia, L. Quantitative determination in chromatographic analysis based on n-way calibration strategies. *J Chromatogr A* 1158 (2007) 94–110.
 20. Petrovic, M.; Gonzalez, S.; Barceló, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends Anal Chem* 22 (2003) 685–696.
 21. Gabet, V.; Miège, C.; Bados, P.; Coquery, M. Analysis of estrogens in environmental matrices. *Trends Anal Chem* 26 (2007) 1113–1131.
 22. Jiménez, B. Environmental effects of endocrine disruptors and current methodologies for assessing wildlife health effects. *Trends Anal Chem* 16 (1997) 596–606.
 23. Petrie, B.; McAdam, E.J.; Scrimshaw, M.D.; Lester, J.N.; Cartmell; E. Fate of drugs during wastewater treatment. *Trends Anal Chem* 49 (2013) 145–159.



24. Miège, C.; Bados, P.; Brosse, C.; Coquery, M. Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in aqueous matrices. *Trends Anal Chem* 28 (2009) 237–244.
25. Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.
26. Lanças, F.M. *Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE*. Editora Atomo, 2009.
27. Xiang, Y.; Yan, B.; McNeff, C.V.; Carr, P.W.; Lee, M.L. Elevated-temperature ultrahigh-pressure liquid chromatography using very small polybutadiene-coated nonporous zirconia particles. *J Chromatogr A* 983 (2003) 83–89.
28. Lee, D.; Miller, M.D.; Meunier, D.M.; Lyons, J.W.; Bonner, J.M.; Pell, R.J.; Shan, C.L.P.; Huang, T. Development of high temperature comprehensive two-dimensional liquid chromatography hyphenated with infrared and light scattering detectors for characterization of chemical composition and molecular weight heterogeneities in polyolefin copolymers. *J Chromatogr A* 1218 (2011) 7173–7179.
29. Henderson, D.E.; Mello, J.A. Physicochemical studies of biologically active peptides by low-temperature reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 499 (1990) 79–88.
30. Lebl, M.; Fang, S.; Hruby, V.J. High-performance liquid chromatography of peptides at reduced temperatures: Separation of isomers. *J Chromatogr A* 586 (1991) 145–148.
31. Lima, D.L.D.; Silva, C.P.; Otero, M.; Esteves, V.I. Low cost methodology for estrogens monitoring in water samples using dispersive liquid–liquid microextraction and HPLC with fluorescence detection. *Talanta* 115 (2013) 980–985.
32. Xu, Q.; Wu, S.Y.; W, M.; Y, X.Y.; Wen, Z.Y.; Gen, W.N.; Gu, Z.Z. Electrospun Nylon6 Nanofibrous Membrane as SPE Adsorbent for the Enrichment and Determination of Three Estrogens in Environmental Water Samples. *Chromatographia* 71 (2010) 487–492.
33. Pedrouzo, M.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marcé, R.M. Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 78 (2009) 1327–1331.
34. Ciofi, L.; Fibbi, D.; Chiuminatto, U.; Coppini, E.; Checchini, L.; Bubba, M.D. Fully-automated on-line solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis at sub-ng/L levels of selected estrogens in surface water and wastewater. *J Chromatogr A*, 1283 (2013) 53–61.
35. LaFleur, A.D.; Schug, K.A. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. *Anal Chim Acta* 696 (2011) 6–26.



36. Kalogera, E.; Pistos, C.; Provatooulou, X.; Athanaselis, S.; Spiliopoulou, C.; Gounaris, A. Androgen glucuronides analysis by liquid chromatography tandem-mass spectrometry: Could it raise new perspectives in the diagnostic field of hormone-dependent malignancies?. *J Chromatogr B*, 940 (2013) 24–34.
37. Ruiz-Angel, M.J.; García-Alvarez-Coque, M.C.; Berthod, A.; Carda-Broch, S. Are analysts doing method validation in liquid chromatography?. *J Chromatogr A* Manuscripto aceito DOI: 10.1016/j.chroma.2014.05.052.
38. Kuster, M.; Cal, A.D.L.; Eljarrat, E.; Alda, M.J.L.; Barceló, D. Evaluation of two aquatic passive sampling configurations for their suitability in the analysis of estrogens in water. *Talanta* 83 (2010) 493–499.
39. Tomsíková, H.; Aufartová, J.; Solich, P.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J.J.; Nováková, L. High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. *Trends Anal Chem* 34 (2012) 35–58.
40. Fayad, P.B.; Prévost, M.; Sauvé, S. On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters. *Talanta* 115 (2013) 349–360.
41. Zhao, Y.G.; Chen, X.H.; Pan, S.D.; Zhu, H.; Shen, H.Y.; Jin, M.C. Simultaneous analysis of eight phenolic environmental estrogens in blood using dispersive micro-solid-phase extraction combined with ultra fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 115 (2013) 787–797.
42. Chen, W.L.; Wang, G.S.; Gwo, J.C.; Chen, C.Y. Ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of feminizing chemicals in river water, sediment and tissue pretreated using disk-type solid-phase extraction and matrix solid-phase dispersion. *Talanta* 89 (2012) 237–245.
43. Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E. *Como Fazer Experimentos*. Editora Bookman, 4a Ed. 2010.
44. Bruns, R.E.; Faigle, J.F.G. *Quimiometria*. Quim Nova (1985) 84-99.
45. Souza, A.M.; Poppi, R.J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I *Quim Nova* 35 (2012) 223-229.
46. Todeschini, R.; Ballabio, D.; Consonni, V.; Mauri, A.; Pavan, M. CAIMAN (Classification And Influence Matrix Analysis): A new approach to the classification based on leverage-scaled functions. *Chemometr Intell Lab* 87 (2007) 3–17.
47. Wold, S. Pattern recognition by means of disjoint principal components models. *Pattern Recogn* 8 (1976) 127-139.



48. Brito, A.L.B.; Brito, L.R.; Honorato, F.A.; Pontes, M.J.C.; Pontes, L.F.B.L. Classification of cereal bars using near infrared spectroscopy and linear discriminant analysis. *Food Res Int* 51 (2013) 924–928.
49. Ghasemi-Varnamkhasti, M.; Mohtasebi, S.S.; Rodriguez-Mendez, M.L.; Gomes, A.A.; Araújo, M.C.U.; Galvão, R.K.H. Screening analysis of beer ageing using near infrared spectroscopy and the Successive Projections Algorithm for variable selection. *Talanta* 89 (2012) 286–291.
50. Wu, D.; Nie, P.; He, Y.; Bao, Y. Determination of Calcium Content in Powdered Milk Using Near and Mid-Infrared Spectroscopy with Variable Selection and Chemometrics. *Food Bioprocess Technol* 5 (2012) 1402–1410.
51. Diniz, P.H.G.D.; Dantas, H.V.; Melo, K.D.T.; Barbosa, M.F.; Harding, D.P.; Nascimento, E.C.L.; Pintonesi, M.F.; Band, B.S.F.; Araújo, M.C.U. Using a simple digital camera and SPA-LDA modeling to screen teas. *Anal Methods* 4 (2012) 2648–2652.
52. Milanez, K.D.T.M.; Pontes, M.J.C. Classification of edible vegetable oil using digital image and pattern recognition techniques. *Microchem J* 113 (2014) 10–16.
53. Fernandes, D.D.S.; Gomes, A.A.; Fontes, M.M.; Costa, G.B.; Almeida, V.E.; Araújo, M.C.U.; Galvão, R.K.H.; Vêras, G. UV-Vis Spectrometric Detection of Biodiesel/Diesel Blend Adulterations with Soybean Oil. *J Braz Chem Soc* 25 (2014) 169–175.
54. Khanmohammadi, M.; Garmarudi, A.B.; Ghasemi, K.; Guardia, M.D.L. Quality based classification of gasoline samples by ATR-FTIR spectrometry using spectral feature selection with quadratic discriminant analysis. *Fuel* 111 (2013) 96–102.
55. Silva, A.C.; Paz, J.E.M.; Pontes, L.F.B.L.; Lemos, S.G.; Pontes, M.J.C. An electroanalytical method to detect adulteration of ethanol fuel by using multivariate analysis. *Electrochim Acta* 111(2013) 160–164.
56. Silva, M.P.F.; Brito, L.R.; Honorato, F.A. Paim, A.P.S.; Pasquini, C.; Pimentel, M.F. Classification of gasoline as with or without dispersant and detergent additives using infrared spectroscopy and multivariate classification. *Fuel* 116 (2014) 151–157.
57. Melo, C.A.D.; Silva, P.; Gomes, A.A.; Fernandes, D.D.S.; Vêras, G.; Medeiros, A.C.D. Classification of Tablets containing Dipyrone, Caffeine and Orphenadrine by Near Infrared Spectroscopy and Chemometric Tools. *J Braz Chem* 24 (2013) 1–7.
58. Brereton, R.G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *Analyst* 125 (2000) 2125–2154.
59. 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* 25 (2002) 856–865.



60. Pimentel, M.F.; Galvão, R.K.H.; Araújo, M.C.U. Recomendações para calibração em química analítica parte 2. Calibração multianalito. *Quim Nova* 31 (2008) 462–467.
61. Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R.J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. *Quim Nova* 32 (2009) 1278–1287.
62. Olivieri, A.C. Analytical Figures of Merit: From Univariate to Multiway Calibration. *Chem Rev* 114 (2014) 5358–5378.
63. Soares, S.F.C.; Gomes, A.A.; Galvão Filho, A.R.; Araújo, M.C.; Galvão, R.K.H. The successive projections algorithm. *Trends Anal Chem* 42 (2013) 84–98.
64. Ferrão, M.F.; Mello, C.; Borin, A.; Maretto, D.A.; Poppi, R.J. LS-SVM: uma nova ferramenta quimiométrica para regressão multivariada. Comparação de modelos de regressão LS-SVM e PLS na quantificação de adulterantes em leite em pó empregando NIR. *Quím Nova* 30 (2007) 852–859.
65. Ferreira, M.M.C.; Antunes, A.M.; Melgo, M.S.; Volpe, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Quim Nova* 22 (1999) 724–731.
66. 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* 134 (2009) 1682–1691.
67. 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* 28 (2005) 910–920.
68. Murphy, K.R.; Stedmon, C.A.; Graeber, D.; Bro, R. Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC. *Anal Methods* 5 (2013) 6557–6566.
69. Bro, R.; Kiers, H.A.L. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. *J Chemometr* 17 (2003) 274–286.
70. Sanchez, E., Kowalski, B. R., Tensorial Calibration: II. Second-Order Calibration. *J Chemom* 2 (1998) 265–280.
71. Escandar, G. M., Faber, N. M., Goicoechea, H. C., Peña, A. M., Olivieri, A. C., Poppi, R. J.; Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. *Trends Anal Chem* 26 (2007) 752–765.
72. Kompany-Zareh, M.; Akhlaghi, Y.; Bro, R. Tucker core consistency for validation of restricted Tucker3 models. *Anal Chim Acta* 723 (2012) 18–26.



73. Baim, A.; Hansen, P.W.; Meyer, A.S.; Mikkelsen, J.D. Simultaneous measurement of two enzyme activities using infrared spectroscopy: A comparative evaluation of PARAFAC, TUCKER and N-PLS modeling. *Anal Chim Acta* 790 (2013) 14–23.
74. Hopke, P.K.; Paatero, P.; Jia, H.; Ross, R.T.; Harshman, R.A. Three-way PARAFAC factor analysis: examination and comparison of alternative computational methods as applied to ill-conditioned data. *Chemometr Intell Lab* 43 (1998) 25–42.
75. Bro, R.; Viereck, N.; Toft, M.; Toft, H.; Hansen, P. I.; Engelsen, S. B.; Mathematical chromatography solves the cocktail party effect in mixtures using 2D spectra and PARAFAC. *Trends Ana. Chem* 29 (2010) 281- 284.
76. Andersen, C. A., Bro, R.; Practical aspects of PARAFAC modeling of fluorescence excitation-emission data. *J Chemom* 17 (2003) 200- 215.
77. Bro, R.; Multi-way Analysis in the Food Industry: Models, Algorithms, and Applications. Tese de Doutorado, Universidade de Amsterdã, Holanda, 1998.
78. Bro, R.; Jong, S. A FAST NON-NEGATIVITY-CONSTRAINED LEAST SQUARES ALGORITHM. *J Chemom* 11 (1997) 393–401.
79. Amigo, J.M.; Skov, T.; Coello, J.; MasPOCH, S.; Bro, R. Solving GC-MS problems with PARAFAC2. *Trends Ana. Chem* 27 (2008) 714-725.
80. Tauler, R. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemometr Intell Lab* 30 (1995) 133-146.
81. Alíer, M.; Tauler, R. Multivariate Curve Resolution of incomplete data multisets. *Chemometr Intell Lab* 127 (2013) 17–28.
82. Muniz Filho, R.C.D. Aplicação de Métodos de Resolução de Curvas Multivariada a Dados Experimentais Gerados por Diferentes Técnicas Analíticas: Uma Visão Exploratória da Biossíntese da Violaceína. Tese de Doutorado, Univerdidade Estadual de Campinas, Brasil, 2011.
83. Culzoni, M.J.; Llanos, A.M.; Zan, M.M.; Espinosa-Mansilla, A.; Cañada-Cañada, F.; Peña, A.M.; Goicoechea, H.C. Enhanced MCR-ALS modeling of HPLC with fast scan fluorimetric detection second-order data for quantitation of metabolic disorder marker pteridines in urine. *Talanta* 85 (2011) 2368–2374.
84. Boeris, V.; Arancibia, J.A.; Olivieri, A.C. Determination of five pesticides in juice, fruit and vegetable samples by means of liquid chromatography combined with multivariate curve resolution. *Anal Chim Acta* 814 (2014) 23–30.
85. Zhang, X.; Tauler, R. Application of Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares (MCR-ALS) to remote sensing hyperspectral imaging. *Anal Chim Acta* 31 (2013) 25–38.



86. Vosough, M.; Esfahani, H.M. Fast HPLC-DAD quantification procedure for selected sulfonamids, metronidazole and chloramphenicol in wastewaters using second-order calibration based on MCR-ALS. *Talanta* 113 (2013) 68–75.
87. Bryant-Genevier, J.; Scholten, K.; Kim, S.K.; Zellers, E.T. Multivariate curve resolution of co-eluting vapors from a gas chromatograph with microsensor array detector. *Sensor Actuat B-Chem* 202 (2014) 167–176.
88. Bro, R. Multiway Calibration. Multilinear PLS. *J Chemometr* 10 (1996) 47–61.
89. Piccirilli, G.N.; Escandar, G.M. Second-order advantage with excitation-emission fluorescence spectroscopy and a flow-through optosensing device. Simultaneous determination of thiabendazole and fuberidazole in the presence of uncalibrated interferences. *Analyst* 135 (2010) 1299–1308.
90. Bortolato, S.S.; Arancibia, J.A.; Escandar, G.M.; Olivieri, A.C. Improvement of residual bilinearization by particle swarm optimization for achieving the second-order advantage with unfolded partial least-squares. *J Chemometr* 21 (2007) 557–566.
91. Gomes, A.A.; Alcaraz, M.R.; Goicoechea, H.C.; Araújo, M.C.U. The Successive Projections Algorithm for interval selection in trilinear partial least-squares with residual bilinearization. *Anal Chim Acta* 811 (2014) 13–22.
92. Gil, D.B.; Peña, A.M.; Arancibia, J.A.; Escandar, G.M.; Olivieri, A.C. Second-Order Advantage Achieved by Unfolded-Partial Least-Squares/Residual Bilinearization Modeling of Excitation-Emission Fluorescence Data Presenting Inner Filter Effects. *Anal Chem* 78 (2006) 8051-8058.
93. García, M.D.G.; Cilzoni, M.J.; Zan, M.M.D.; Valverde, R.S.; Galera, M.M.; Goicoechea, H.C. Solving matrix effects exploiting the second-order advantage in the resolution and determination of eight tetracycline antibiotics in effluent wastewater by modelling liquid chromatography data with multivariate curve resolution-alternating least squares and unfolded-partial least squares followed by residual bilinearization algorithms II. Prediction and figures of merit. *J Chromatogr A* 1179 (2008) 115–124.
94. DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. INMETRO, 2003.
95. Olivieri, A.C. Recent advances in analytical calibration with multi-way data. *Anal Methods* 4 (2012) 1876-1886.
96. Goicoechea, H.C.; Calimag-Williams, K.; Campiglia, A.D. Multi-way partial least-squares and residual bi-linearization for the direct determination of monohydroxy-polycyclic aromatic hydrocarbons on octadecyl membranes via room-temperature fluorescence excitation emission matrices. *Anal Chim Acta* 717 (2012) 100–109.



97. Braga, J.W.B.; Carneiro, R.L.; Poppi, R.J. Evaluation of the number of factors needed for residual bilinearization in BLS and UPLS models to achieve the second-order advantage. *Chemometr Intell Lab* 100 (2010) 99–109.
98. Ba. Li, D. Wang, C. Xu, Z. Zhang, Flow-injection simultaneous chemiluminescence determination of ascorbic acid and L-cysteine with partial least squares calibration. *Microchim. Acta* 149 (2005) 205–212.