



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

## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Determinação Simultânea de Lipídios Neutros e  
Polares em zooplâncton por Espectroscopia de  
Fluorescência Sincrônica e Calibração Multivariada**

**Elizeu Cordeiro Caiana**

**João Pessoa – PB – Brasil**

**Maio/2015**



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

## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

### **Determinação Simultânea de Lipídios Neutros e Polares em Zooplâncton por Espectroscopia de Fluorescência Sincrônica e Calibração Multivariada**

**Elizeu Cordeiro Caiana\***

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. Wallace Duarte Fragoso**

2º Orientador: **Prof. Dr. Marcelo Fabian Pistonesi**

\*Bolsista: **Reuni**

**João Pessoa – PB – Brasil**

**Maio/2015**

C133d Caiana, Elizeu Cordeiro.

Determinação simultânea de lipídios neutros e polares em zooplâncton por espectroscopia de fluorescência síncrona e calibração multivariada / Elizeu Cordeiro Caiana.- João Pessoa, 2015.

106f. : il.

Orientadores: Wallace Duarte Fragoso, Marcelo Fabian Pistonesi

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

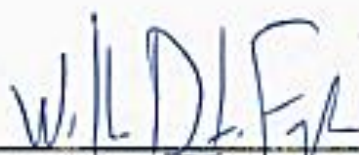
1. Química analítica. 2. Produção primária. 3. Plâncton. 4. Lipídios. 5. Fluorescência síncrona.

UFPB/BC

CDU: 543(043)

**Determinação simultânea de lipídeos neutros e polares em zooplankton por espectroscopia de fluorescência sincrônica e calibração multivariada.**

Defesa da Dissertação de Mestrado do aluno Elizeu Cordeiro Caiana aprovada pela banca examinadora, em 05 de maio de 2015.



---

Prof. Dr. Wallace Duane Fragoso  
Orientador/Presidente



---

Prof. Dr. Marcelo Fabian Pistonesi  
2º. Orientador



---

Prof. Dr. Sérgio Ricardo Bezerra dos Santos  
Examinador



---

Profa. Dra. Liliana de Fátima Bezerra Lira de Pontes  
Examinadora

Dedico a Deus, a minha  
família e a todos aqueles  
que me ajudaram.

## **Agradecimentos**

A Deus por me guardar e me conceder saúde, sabedoria e força de vontade para a realização de mais uma etapa;

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio e paciência;

Aos professores Wallace Duarte Fragoso, Marcelo Fabian Pistonesi e Ana Martinez, pela orientação, incentivo e ensinamentos durante a realização deste trabalho;

Aos companheiros de laboratório Adamastor Torres, Matheus de Caldas e Juliene Rocha, pelas trocas de conhecimento e momentos de bate papo;

Aos amigos do LEQA, LAQA e LCCQS pelo companheirismo e pelos bons momentos vividos durante estes anos.

Aos colegas de laboratório do LMMRQ, Raílton Barbosa, Amauri Francisco, Gessenildo Rodriguez, Vanessa Medeiros, Miguel Angelo e Ezequiel Fragoso, pela companhia e convivência agradável durante o período que compartilhamos o mesmo ambiente de estudo;

Ao REUNI e a CAPES pela bolsa concedida.

## Sumário

|                                                            |             |
|------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                              | <b>IX</b>   |
| <b>LISTA DE TABELAS .....</b>                              | <b>XII</b>  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>                          | <b>XIII</b> |
| <b>RESUMO.....</b>                                         | <b>XV</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                      | <b>XVI</b>  |
| <b>1     INTRODUÇÃO .....</b>                              | <b>18</b>   |
| 1.1    CARACTERIZAÇÃO DA PROBLEMÁTICA.....                 | 18          |
| 1.2    OBJETIVOS.....                                      | 21          |
| 1.2.1    Geral .....                                       | 21          |
| 1.2.2    Específicos.....                                  | 21          |
| <b>2     FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>                   | <b>23</b>   |
| 2.1    PLÂNCTON.....                                       | 23          |
| 2.2    ZOOPLÂNCTON .....                                   | 25          |
| 2.2.1    Composição Lipídica do Zooplâncton .....          | 26          |
| 2.3    LIPÍDIOS E AMBIENTES MICELARES .....                | 29          |
| 2.4    FLUORESCÊNCIA MOLECULAR.....                        | 31          |
| 2.4.1    Definições .....                                  | 31          |
| 2.4.2    Espectrofluorímetros.....                         | 34          |
| 2.4.3    Fatores que Afetam a Fluorescência .....          | 36          |
| 2.4.4    Intensidade de Fluorescência e Concentração ..... | 40          |
| 2.4.5    Fluorescência Sincrônica .....                    | 42          |
| 2.4.6    Marcadores Fluorescentes .....                    | 44          |
| 2.4.6.1    Vermelho do Nilo (VN) .....                     | 45          |
| 2.5    QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS .....                     | 47          |
| 2.6    QUIMIOMETRIA.....                                   | 50          |
| 2.6.1    Planejamento de Misturas Brereton .....           | 50          |
| 2.6.2    Calibração Multivariada .....                     | 54          |
| 2.6.2.1    Análise de Componentes Principais – PCA .....   | 57          |
| 2.6.2.2    Mínimos Quadrados Parciais - PLS.....           | 58          |
| <b>3     METODOLOGIA .....</b>                             | <b>63</b>   |

|          |                                     |            |
|----------|-------------------------------------|------------|
| 3.1      | REAGENTES E SOLUÇÕES.....           | 63         |
| 3.2      | PROTOCOLO .....                     | 63         |
| 3.2.1    | Teste de Fotodegradação .....       | 64         |
| 3.2.2    | Tempo de Sonicação.....             | 65         |
| 3.2.3    | Delta Lambda .....                  | 65         |
| 3.2.4    | Reprodutibilidade Espectral.....    | 65         |
| 3.3      | CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO .....        | 67         |
| 3.4      | CONJUNTO DE VALIDAÇÃO.....          | 69         |
| 3.5      | AMOSTRAS .....                      | 71         |
| 3.6      | ANÁLISE ESPECTROFLUORIMÉTRICA ..... | 74         |
| 3.7      | SOFTWARES E ANÁLISE DE DADOS .....  | 75         |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>78</b>  |
| 4.1      | TESTE DE FOTODEGRADAÇÃO .....       | 78         |
| 4.2      | TEMPO DE SONICAÇÃO.....             | 80         |
| 4.3      | DELTA LAMBDA.....                   | 81         |
| 4.4      | REPRODUTIBILIDADE ESPECTRAL .....   | 83         |
| 4.5      | MODELOS DE CALIBRAÇÃO .....         | 87         |
| 4.6      | VALIDAÇÃO DOS MODELOS.....          | 90         |
| 4.7      | ANÁLISE DE AMOSTRAS .....           | 94         |
| <b>5</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>   | <b>98</b>  |
| 5.1      | CONCLUSÃO .....                     | 98         |
| 5.2      | PROPOSTAS FUTURAS .....             | 99         |
|          | <b>REFERÊNCIAS .....</b>            | <b>100</b> |



## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1:</b> Classificação dos organismos planctônicos quanto à dimensão.                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 24 |
| <b>Figure 2:</b> Trioleína, triglicerídeo formado por três ácidos graxos do tipo 18:1.                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 27 |
| <b>Figure 3:</b> Cerídeo formado por um álcool do tipo 22:1 e um ácido graxo do tipo 18:4.                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 28 |
| <b>Figure 4:</b> Fosfatidilcolina, caracterizada pela presença do radical polar colina e dois ácidos graxos do tipo 16:0 e 22:6.                                                                                                                                                                                                                                               | 28 |
| <b>Figure 5:</b> Alquildiacilglicerol éter, formado por um álcool do tipo 16:0 e dois ácidos graxos do tipo 22:6 e 17:1.                                                                                                                                                                                                                                                       | 29 |
| <b>Figure 6:</b> Formação do agregado micelar. Adaptado de [19].                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 30 |
| <b>Figure 7:</b> Representação do estado fundamental e dos estados excitados singleto e tripleto. Adaptado de [9].                                                                                                                                                                                                                                                             | 31 |
| <b>Figure 8:</b> Diagrama de Jablonski hipotético, mostrando os processos físicos que podem ocorrer quando uma molécula absorve um fóton na região do UV/Vis. ( $S_0$ ) estado eletrônico fundamental, ( $S_1$ e $S_2$ ) estados excitados singleto, (RV) relaxação vibracional, (CI) conversão interna, ( $v_{0...3}$ ) níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental. | 32 |
| <b>Figure 9:</b> Arranjo estrutural de um espectrofluorímetro. Adaptado de [27].                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 35 |
| <b>Figure 10:</b> Exemplos de moléculas tipicamente fluorescentes. Adaptado de [23,25,26].                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 38 |
| <b>Figure 11:</b> Ilustração hipotética de diferentes combinações dos monocromadores de excitação (ex) e emissão (em) e seus espectros correspondentes. (1) espectro de fluorescência de excitação; (2) espectro de fluorescência de emissão; e (3) espectro de fluorescência sincrônico. Adaptado de [30].                                                                    | 43 |
| <b>Figure 12:</b> Aplicações de fluorescência sincrônica. Adaptado de [20].                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 44 |
| <b>Figure 13:</b> Estrutura química do Vermelho do Nilo.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 45 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 14:</b> Espectro de emissão normalizado do VN em diferentes solventes orgânicos, ilustrando o deslocamento da banda de emissão devido ao efeito solvatocrômico. Adaptado de [35].                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 46 |
| <b>Figure 15:</b> Decomposição em variáveis latentes das matrizes X e Y para modelos PLS.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 60 |
| <b>Figure 16:</b> Local de coleta de amostras no estuário de Bahía Blanca. Em vermelho (●) está indicada a região de amostragem, próxima ao porto Galvan.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 72 |
| <b>Figure 17:</b> Espectrofluorímetro <i>Shimadzu</i> <sup>®</sup> modelo RF-5301PC.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 75 |
| <b>Figure 18:</b> Espectros sincrônicos consecutivos de uma mesma alíquota de solução padrão.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 78 |
| <b>Figure 19:</b> Espectros sincrônicos de quatro alíquotas diferentes de uma solução padrão obtidos ao longo do tempo.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 79 |
| <b>Figure 20:</b> Espectros sincrônicos de três replicatas preparadas com diferentes tempos de sonicação.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 80 |
| <b>Figure 21:</b> Espectros sincrônicos dos ensaios realizados para o estudo do $\Delta\lambda$ . Em (a) estão os espectros da mistura que contém TO a 20,00 $\mu\text{g/mL}$ e PC a 12,50 $\mu\text{g/mL}$ ; em (b) estão os espectros da mistura que contém TO a 20,00 $\mu\text{g/mL}$ e PC a 20,00 $\mu\text{g/mL}$ .                                                                                                                                                                                                                            | 82 |
| <b>Figure 22:</b> Espectros de fluorescência sincrônica de seis experimentos utilizados na avaliação do comportamento espectral quando os padrões foram preparados apenas com isopropanol. Em (a) estão os espectros quando a concentração de TO é igual a 5,00 $\mu\text{g/mL}$ ; em (b) estão espectros quando a concentração de TO é igual a 20,00 $\mu\text{g/mL}$ . As curvas em preto (—), vermelho (—) e azul (—) correspondem aos experimentos em que a concentração de PC é igual a 5,00, 12,50 e 20,00 $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. | 84 |
| <b>Figure 23:</b> Espectros sincrônicos de duas replicatas do experimento 6 da tabela 2 (seção 3.2.4), para a avaliação da estabilização das micelas de TO devido à adição de piridina.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 85 |

|                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 24:</b> Espectros sincrônicos dos experimentos 04 (—), 05 (—) e 07 (—) da tabela 3 (seção 3.3), empregados na avaliação da reprodutibilidade espectral após a redução do volume de isopropanol para 250 $\mu$ L. ....       | 87 |
| <b>Figure 25:</b> Espectros dos padrões e do branco utilizados na construção dos modelos de calibração multivariada.....                                                                                                              | 88 |
| <b>Figure 26:</b> Gráficos da variância explicada pelas variáveis latentes usadas na construção dos modelos de calibração, em relação ao conjunto X, após validação cruzada. ....                                                     | 90 |
| <b>Figure 27:</b> Espectros dos conjuntos de calibração (—) e validação (—). .                                                                                                                                                        | 91 |
| <b>Figure 28:</b> Gráfico das concentrações preditas versus as concentrações de referência para o modelo de TO. ....                                                                                                                  | 92 |
| <b>Figure 29:</b> Gráfico das concentrações preditas versus as concentrações de referência para o modelo de PC. ....                                                                                                                  | 93 |
| <b>Figure 30:</b> Espectros sincrônicos das seis amostras reais analisadas em conjunto com os espectros das misturas 3 e 7 do conjunto $X_{cal}$ e o espectro de uma solução contendo apenas VN em piridina, isopropanol e água. .... | 94 |
| <b>Figure 31:</b> Espectros de fluorescência sincrônica do teste de fracionamento dos lipídios totais.....                                                                                                                            | 96 |

**LISTA DE TABELAS**

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Matriz do planejamento Brereton para 03 níveis e 02 fatores.                                                                                                          | 54 |
| <b>Tabela 2:</b> Experimentos empregados na avaliação do comportamento espectral das bandas relativas a TO e PC, para padrões preparados apenas com isopropanol e água destilada. .... | 66 |
| <b>Tabela 3:</b> Valores de concentração dos lipídios em cada um dos experimentos necessários para a obtenção do conjunto de calibração. ...                                           | 69 |
| <b>Tabela 4:</b> Níveis de concentração de TO e PC empregados na construção do conjunto de validação. ....                                                                             | 69 |
| <b>Tabela 5:</b> Experimentos do conjunto de validação construído com padrões comerciais de (TO e PC). ....                                                                            | 70 |
| <b>Tabela 6:</b> Parâmetros de desempenho obtidos para a validação dos modelos PLS. ....                                                                                               | 91 |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

CE – Conversão externa.

CI – Conversão interna.

CIS – Cruzamento intersistemas.

CMC – Concentração micelar crítica.

C18 – Octadecil.

EFS – Espectroscopia de fluorescência sincrônica.

GC – Cromatografia gasosa (do inglês, Gas chromatography).

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (do inglês, Gas chromatography with mass spectrometry).

GF-AAS – Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (do inglês, Graphite furnace atomic absorption strometry).

GL – Glicolipídios.

HPLC – Cromatografia líquida de alto rendimento (do inglês, High performance liquid chromatography).

LN – Lipídios neutros.

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

LP – Lipídios polares.

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

NIPALS – Mínimos quadrados parciais iterativo não linear (do inglês, Nonlinear iterative partial least squares).

PC – Fosfatidilcolina (do inglês, Phosphatidylcoline).

PCA – Análise de componentes principais (do inglês, Principal componente anlysis).

PCR – Regressão por componentes principais (do inglês, Principal componente regression).

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

PRESS – Soma dos quadrados dos erros de previsão (do inglês, prediction error sum square).

RMSECV – Raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (do inglês, Root mean square error of cross validation).

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

RSD – Desvio padrão relativo (do inglês, Relative standard deviation).

RV – Relaxação vibracional.

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

SVD – Decomposição em valores singulares (do inglês, Singular value decomposition).

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

TO – Trioleína.

VL – Variável latente.

VN – Vermelho do nilo.

## RESUMO

A sustentação da vida nos mais diversos ecossistemas é possibilitada por um grupo de organismos, denominados produtores primários. Por serem em sua maioria fotoautotróficos, esses indivíduos fixam os nutrientes do meio (em maior parte carbono) através do processo de fotossíntese. Nos ecossistemas aquáticos o fitoplâncton (microalgas) é responsável pela maior parcela da produção primária. Como elo entre os indivíduos do primeiro nível trófico e os indivíduos dos níveis tróficos superiores estão os organismos pertencentes ao zooplâncton. Dessa forma, o estudo da composição bioquímica da comunidade zooplanctônica pode ser usado como um indicador da condição nutricional nos ecossistemas aquáticos. Diante disso, este trabalho teve como objetivo a construção de modelos de calibração multivariada PLS para a determinação espectrofluorimétrica simultânea das classes de lipídios neutros e polares. A fim de simplificar o procedimento envolvido na construção dos modelos, foram utilizados padrões comerciais para a realização das misturas de calibração. Estas soluções foram previamente definidas mediante a realização de um planejamento de misturas Brereton de três níveis e dois fatores. Em uma etapa preliminar, os modelos construídos foram usados para prever as concentrações dos dois lipídios comerciais, trioleína (TO) e fosfatidilcolina (PC), em um conjunto de padrões externo. Ao avaliar os parâmetros de desempenho relacionados a esta etapa, observou-se que os modelos estavam em condições aceitáveis para aplicação em amostras reais. Entretanto, ao avaliar os espectros de fluorescência sincrônica das amostras analisadas (macro e mesozooplâncton), foi observado que  $\lambda_{\text{máx}}$  da banda correspondente aos lipídios neutros varia entre as amostras, de modo que o método proposto não pode ser aplicado em sistema real.

Palavras-chave: Produção primária, plâncton, lipídios, TO, PC, fluorescência sincrônica, PLS.

## ABSTRACT

Life support in various ecosystems is made possible by a group of organisms, called primary producers. Because they are mostly photoautotrophic, these individuals secure the middle nutrients (in higher carbon part) through the process of photosynthesis. In aquatic ecosystems phytoplankton (microalgae) is responsible for most of the primary production. As a link between individuals of the first trophic level and individuals of higher trophic levels are the organisms belonging to the zooplankton. Thus, the study of the biochemical composition of the zooplankton community can be used as an indicator of nutritional status in aquatic ecosystems. Thus, this study aimed to build PLS multivariate calibration models for the simultaneous spectrofluorimetric determination of neutral and polar lipid classes. In order to simplify the procedures involved in the construction of models, commercial standards were used to perform the calibration mixtures. These solutions were previously defined by conducting a Brereton mixture design of three levels and two factors. In a preliminary step, the models built were used to predict the concentrations of the two commercial lipids, triolein (TO) and phosphatidylcholine (PC), a set of external standards. In evaluating the performance parameters related to this step, it was observed that the models were in an acceptable condition for application to real samples. However, when evaluating the synchronous fluorescence spectra of the samples (macro and mesozooplankton), it was observed that  $\lambda_{\text{máx}}$  the band corresponding to the neutral lipids varies between samples, so that the proposed method can not be applied to real system.

Keywords: primary production, plankton, lipids, TO, PC, synchronous fluorescence, PLS.



# Capítulo 1

---

## Introdução

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CARACTERIZAÇÃO DA PROBLEMÁTICA

A produção primária é essencial para a sustentação da vida e estruturação de todos os ecossistemas. Consiste, em sua grande maioria, na fixação do carbono do ambiente nos tecidos vivos através do processo de fotossíntese, característica dos seres fotoautotróficos. Quase todas as formas de vida dependem, direta ou indiretamente, da habilidade dos organismos que usam a energia solar para sintetizar compostos bioquímicos ricos em energia (e.g. lipídios, carboidratos e proteínas) [1].

Na base da cadeia alimentar dos ecossistemas marinhos e costeiros, o *fitoplâncton* (microalgas) é responsável pela maior parte da produção primária, formando o primeiro nível trófico. Espécies herbívoras do *zooplâncton* (consumidores primários como, por exemplo, protozoários, vários copépodes, salpas e larváceos) se alimentam diretamente de microalgas marinhas e constituem o segundo nível trófico. Os níveis tróficos consecutivos são formados por espécies de *zooplâncton* que se alimentam dos herbívoros (como os quetonatos, por exemplo) e pelos animais que se alimentam dos carnívoros menores (por exemplo, medusas e peixes) [2].

Diante disso, a avaliação da composição bioquímica de organismos planctônicos, em particular dos zooplânctons, corresponde a um importante indicador nutricional e possibilita a identificação de possíveis limitações alimentares em estágios específicos da vida nos ecossistemas aquáticos [3]. Estudos apontam os lipídios como principal fonte de energia para os invertebrados e peixes devido ao seu alto valor nutricional [4]. Além disso, os lipídios algais, em particular os lipídios neutros, têm sido considerados substitutos em potencial do óleo diesel derivado do petróleo [4].

Na literatura encontram-se vários estudos relacionados à determinação quantitativa dos lipídios baseados em métodos

gravimétricos. Vários outros apresentam a determinação espectrofluorimétrica a partir do uso do corante lipossolúvel vermelho do nilo (VN), como alternativa simples e prática para a determinação de lipídios neutros, principalmente, em células algais. Poucos trabalhos retratam a determinação simultânea de lipídios neutros (e. g. triglicerídeos) e polares (e. g. fosfolipídios) com o uso do VN [3,5]. Estes apresentam como desvantagem a necessidade do uso de padrões de lipídios específicos de cada espécie de plâncton para obter bons modelos de predição.

O uso dos lipídios comerciais, trioleína (TO) e fosfatidilcolina (PC), como representantes das classes de lipídios neutros e polares, respectivamente, corresponde a uma alternativa metodológica muito interessante para a quantificação simultânea de ambas as classes de lipídios.

A espectroscopia de fluorescência molecular é uma técnica analítica sofisticada que possui diversas aplicações na análise de uma grande variedade de compostos de interesse farmacêutico, biológico, ambiental e industrial [6,7,8]. Os métodos de fluorescência caracterizam uma importante ferramenta de análise por apresentar alta sensibilidade, de 10 a 1.000 vezes maior que nos métodos de absorção, com limites de detecção na faixa de  $\text{ng.mL}^{-1}$  (ppb). Além disso, possui alta seletividade, uma vez que nem todas as substâncias que absorvem radiação fluorescem [9,10].

A fluorescência sincrônica foi a técnica espectroscópica avaliada e escolhida para a aquisição dos espectros de emissão das misturas de lipídios, por gerar perfis espectrais mais bem definidos e com alta sensibilidade.

A quimiometria é um ramo da química que destina-se especificamente a análise de dados químicos de natureza multivariada. Como citado por Márcia M. C. Ferreira et al. (1999), os métodos multivariados são os mais adequados porque permitem um estudo com várias espécies presentes ao mesmo tempo, não importando a existência

ou ausência de diferenças espectrais marcantes entre elas nem a existência de alta correlação nos dados [11].

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS – do inglês, *Partial Least Squares*) permite utilizar toda a informação espectral para modelar a concentração de um analito (ou outra propriedade de interesse). Este método fundamenta-se na análise de componentes principais (PCA – do inglês, *Principal Component Analysis*), que objetiva criar um novo sistema espacial de baixa dimensionalidade, com eixos ortogonais, a partir de uma transformação algébrica envolvendo o conjunto de variáveis espectrais. Isso possibilita a análise espectrométrica quantitativa de amostras com muitos componentes cujos espectros sejam sobrepostos. O PLS é o método de regressão mais utilizado para a construção de modelos de calibração multivariada a partir de dados de primeira ordem.

Antes de iniciar a etapa experimental para a construção de um modelo de calibração, é de extrema importância que o analista planeje, de forma sistemática, como serão preparadas as amostras envolvidas nas fases descritiva e preditiva do mesmo. Para isso é necessário definir os níveis de concentração do analito que devem ser considerados, para os quais as respostas serão medidas, de modo que o planejamento experimental forneça uma curva analítica com precisão e exatidão ótimas. Essa prática permite que o resultado final seja alcançado de maneira otimizada com o mínimo de experimentos possível, levando, consequentemente, a redução do custo e do tempo envolvidos na análise [12,13]. A escolha do planejamento experimental depende do problema levantado como objeto de estudo. Nesse trabalho optou-se pelo planejamento de misturas Brereton, por ser um planejamento adequado para a preparação de misturas de calibração em análise multicomponentes.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Geral

Desenvolver uma metodologia para a determinação espectrofluorimétrica simultânea das frações lipídicas polares e apolares em zooplâncton a partir de padrões comerciais e emprego de calibração multivariada.

### 1.2.2 Específicos

- Estabelecer as condições experimentais ótimas para a aquisição dos espectros de fluorescência sincrônica dos padrões de calibração, tais como: tempo de fotodegradação do corante VN (Vermelho do Nilo) no ambiente micelar, o tempo de sonicação das soluções, a quantidade de solventes e o delta lambda entre  $\lambda_{exc}$  e  $\lambda_{em}$ ;
- Construir e validar modelos de calibração multivariada PLS com soluções preparadas a partir dos padrões comerciais trioleína (representante dos lipídios neutros) e fosfatidilcolina (representante dos lipídios polares);
- Realizar a aplicação dos modelos para a predição da concentração das classes de lipídios em amostras reais de zooplâncton (meso e macrozooplâncton).

# **Capítulo 2**

---

## **Fundamentação Teórica**

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

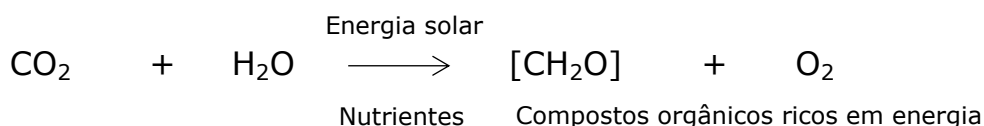
### 2.1 PLÂNCTON

O plâncton representa um grupo muito diversificado de espécies aquáticas que apresentam capacidade de locomoção limitada, sendo, portanto, arrastado pelas correntes ou movimentos d'água [14]. Normalmente, o plâncton é subdividido em quatro classes:

- Fitoplâncton: formado, principalmente, por algas microscópicas unicelulares que vivem individualmente ou em colônias;
- Zooplâncton: inclui animais e organismos do reino protista (seres unicelulares);
- Ictioplâncton: inclui as formas larvares ou juvenis de peixes (nécton);
- Bacterioplâncton: formado pelas bactérias marinhas e as algas azuis.

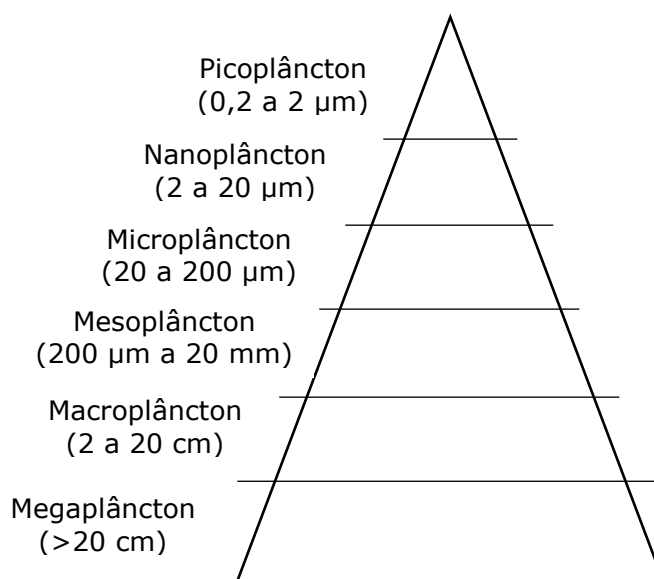
Dentre os vários grupos de organismos fotossintetizantes (e.g. gramas marinhas, algas macroscópicas e microfitobentos) presentes nos rios e mares o fitoplâncton é o mais abundante, sendo responsável por cerca de 90% da produção primária marinha global. Dessa forma, o fitoplâncton corresponde a base da cadeia alimentar da maioria dos ecossistemas aquáticos [1].

As microalgas, pertencentes ao fitoplâncton, convertem a energia luminosa (luz solar) em energia química, fixando o carbono e os nutrientes inorgânicos (e.g. nitrogênio, fósforo e silício) do meio, na forma de compostos orgânicos, através da fotossíntese [1].



O fluxo de energia e matéria nas cadeias alimentares de ecossistemas aquáticos ocorre a partir de um produtor primário, predominantemente o fitoplâncton, se desenvolvendo ao longo de níveis tróficos (alimentares) superiores, caracterizados por organismos e animais maiores, sendo os consumidores primários as espécies herbívoras de zooplâncton. No topo destas cadeias alimentares estão os animais maiores que não possuem predadores, a não ser o homem; destacando-se os tubarões, peixes, dentre outros [2].

O plâncton pode ainda ser classificado de acordo com o tamanho dos organismos a partir da utilização de redes com malhas de diferentes dimensões [15]. Esta divisão está ilustrada na **Figura 1**, abaixo.



**Figure 1:** Classificação dos organismos planctônicos quanto à dimensão.

Os organismos fitoplanctônicos se encontram distribuídos de forma irregular no meio aquático, e sua disposição depende de fatores como: claridade da água, irradiação solar, temperatura da água superficial, profundidade, disponibilidade de nutrientes, localização geográfica, tempo (sazonalidade), dentre outros. Diante disso, é possível estabelecer diferenças, em relação à produção primária, entre as regiões do globo. Nominalmente são estabelecidas quatro regiões geográficas, as quais apresentam comportamentos característicos em relação à biomassa



fitoplanctônica. Esta subdivisão consiste nas regiões: temperadas, tropicais, polares e costeiras [1,2].

As variações nas regiões costeiras (e.g. estuários), diferentemente das outras regiões, não sofrem tanta influência da diferença de latitude, sendo afetadas por outros fatores. Por estarem próximas ao continente as águas costeiras são ricas em nutrientes, como fosfato e nitrato. Além disso, as águas rasas dos ecossistemas costeiros (e.g. baías-estuarinas) propiciam a vida dos organismos fotoautotróficos (e.g. as microalgas), devido a maior eficiência da luz irradiada e ausência de termoclina persistente, isto é, de camadas de água que não se misturam devido a um gradiente de temperatura, de modo que ocorre produção durante todo o ano. Por conta da elevada quantidade de sedimentos e detritos trazidos principalmente pelos rios às águas costeiras, a produção primária nestas regiões sofre uma variação ao longo da coluna de água. No entanto, esta produção se mantém consideravelmente elevada, podendo atingir índices de produtividade 10 vezes maiores do que nas águas oceânicas [1].

## 2.2 ZOOPLÂNCTON

O zooplâncton corresponde à classe de organismos planctônicos heterotróficos (i.e. que não sintetizam o próprio alimento) que vivem dispersos em toda faixa da coluna de água, sendo transportados pelo movimento dos corpos d'água (oceanos e rios). São encontrados majoritariamente nas frações do micro, meso e macroplâncton. Os organismos do reino protista incluídos nessa classe pertencem basicamente à porção do nanoplâncton [1,14].

Dentre as classes de espécies de zooplâncton existentes nos ecossistemas aquáticos, os copépodes (formado por cerca de 5.000 espécies) representam a classe predominante podendo alcançar até 90% do total de espécies de zooplâncton numa determinada região. A classe inclui espécies de herbívoros, omnívoros, carnívoros ou detritívoros, compreendendo a maior parte dos consumidores primários [14].

O zooplâncton corresponde ao principal elo entre os produtores primários e os demais níveis tróficos das cadeias alimentares aquáticas, já que se alimentam do fitoplâncton e do bacterioplâncton. Assim, o zooplâncton pode ser utilizado para a avaliação da condição nutricional em ecossistemas aquáticos, como, por exemplo, as baías-estuarinas.

### **2.2.1 Composição Lipídica do Zooplâncton**

Os lipídios constituem um grupo de substâncias hidrofóbicas, que contêm longas cadeias carbônicas, o que lhes confere alta solubilidade em solventes orgânicos (e.g. hexano, clorofórmio, piridina, etc.) e insolubilidade em água. Seus principais componentes são os ácidos graxos e seus derivados, como por exemplo, os lipídios neutros que inclui os triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, as ceras e os próprios ácidos graxos livres, e os lipídios polares que correspondem aos fosfolipídios, esteróis, carotenóides, entre outros [15]. Estes compostos estão presentes, principalmente, nas membranas celulares (e.g. fosfolipídios) e nas células de gordura (e.g. triglicerídeos), e desempenham funções estruturais e energéticas essenciais para a manutenção da vida.

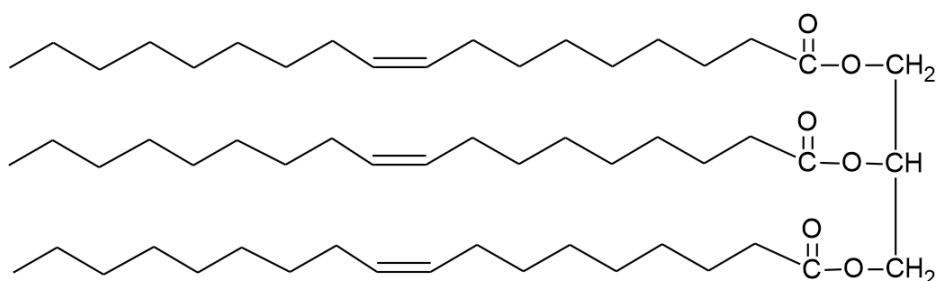
Os lipídios apresentam valor energético (39 kJ/g) significativamente superior ao das proteínas (17 kJ/g) e dos carboidratos (18 kJ/g). Dessa forma, os lipídios acumulados e armazenados no zooplâncton representam uma fonte energética extremamente importante para a sustentação das espécies pertencentes aos níveis tróficos superiores das cadeias alimentares aquáticas, fornecendo energia para a reprodução, migração vertical, sobrevivência em períodos de escassez alimentar, etc. [16].

Como a classe de lipídios neutros corresponde à fração lipídica responsável pela reserva energética, a utilização de um índice baseado na razão *lipídios neutros/lipídios polares* torna-se viável para a avaliação da condição nutricional de um ecossistema aquático, uma vez que esta razão indicará se a concentração de lipídios neutros é significativamente

superior ou não à concentração de lipídios polares (membrana celular) nas espécies de zooplâncton de uma determinada região [3].

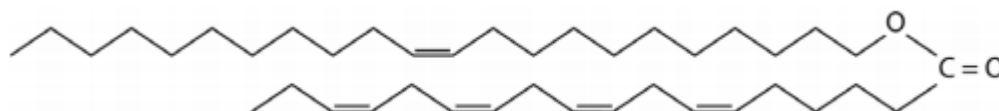
A composição lipídica varia entre as espécies de zooplâncton e é influenciada por fatores ambientais e antropogênicos (e.g. despejo de efluentes industriais, domésticos e poluentes em geral em corpos d'água). Estes últimos afetam, principalmente, a dinâmica das cadeias alimentares dos ecossistemas estuarinos, devido à intensa atividade portuária e industrial nestas regiões [17].

Dentre os lipídios existentes, os triglicerídeos, os cerídeos, os fosfolipídios e os éteres de diglicerídeos são as classes de lipídios predominantes no zooplâncton marinho. Os triglicerídeos (**Figura 2**) estão presentes em quase todas as espécies de zooplâncton e são formados pela união de três moléculas de ácidos graxos com uma molécula de glicerol, um triálcool de três carbonos, através de ligações do tipo éster. Estes lipídios são majoritários em muitas espécies que vivem em estuários [16].



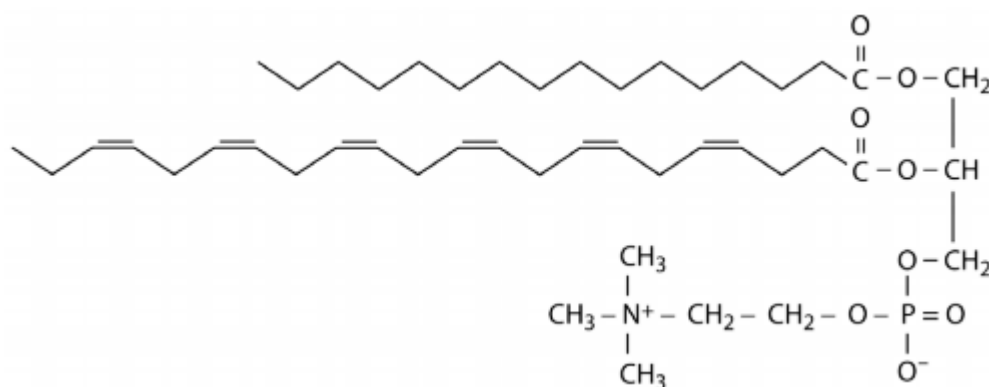
**Figure 2:** Trioleína, triglicerídeo formado por três ácidos graxos do tipo 18:1.

Os cerídeos (**Figura 3**), considerados lipídios simples, são ésteres formados pela união de um álcool primário de cadeia longa com um ácido carboxílico de cadeia longa, e ocorrem majoritariamente em espécies de alta latitude, isto é, aquelas que habitam regiões de climas temperados e polares [16].



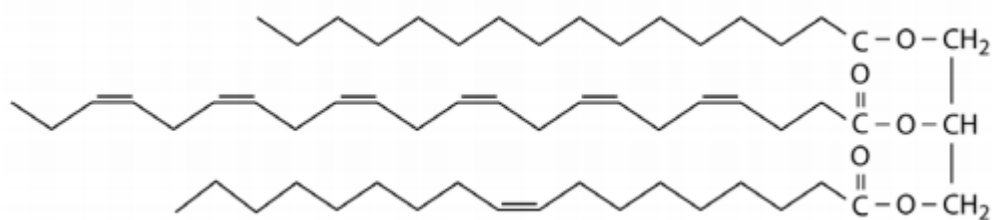
**Figure 3:** Cerídeo formado por um álcool do tipo 22:1 e um ácido graxo do tipo 18:4.

Os fosfolipídios são os principais componentes das membranas celulares. Em geral, são derivados do glicerol e contêm dois ácidos graxos ocupando os carbonos 1 e 2 e uma base nitrogenada ligada ao carbono 3 através de uma ligação fosfodiéster. Um importante fosfolipídio presente no zooplâncton de altas latitudes é a fosfatidilcolina (**Figura 4**), a qual possui o grupo polar colina como base nitrogenada [16].



**Figure 4:** Fosfatidilcolina, caracterizada pela presença do radical polar colina e dois ácidos graxos do tipo 16:0 e 22:6.

Os éteres de diglicerídeos (**Figura 5**), predominantes nos pterópodes (classe de espécies de zooplâncton) que habitam regiões polares e temperadas, são caracterizados por apresentarem um éter de alquila e dois ésteres de ácidos graxos unidos a um glicerol [16].



**Figure 5:** Alquildiacilglicerol éter, formado por um álcool do tipo 16:0 e dois ácidos graxos do tipo 22:6 e 17:1.

### 2.3 LIPÍDIOS E AMBIENTES MICELARES

A aplicação de ambientes organizados, também conhecidos como ambientes micelares, na melhoria de métodos analíticos tem se tornado cada vez mais comum. Estas estruturas são formadas a partir da aglomeração de substâncias orgânicas anfipáticas, chamadas surfactantes (ou tensoativos), que possuem duas regiões distintas, sendo uma liofóbica (hidrofóbica, quando o solvente é a água) e a outra liofílica (hidrofílica, em meio aquoso) [18,19].

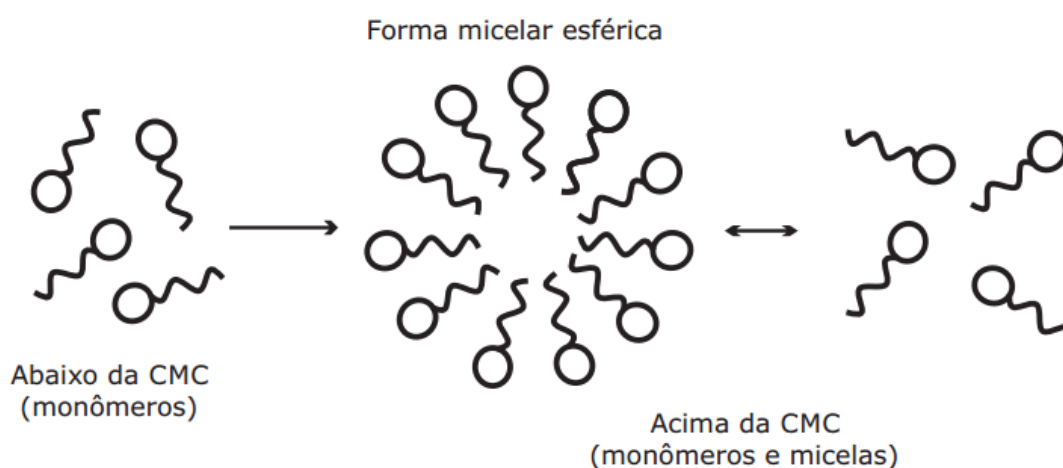
Dentre as principais vantagens relacionadas ao emprego de tensoativos em química analítica está a possibilidade de modificação de propriedades químicas (como por exemplo, alteração do meio reacional para solubilizar espécies pouco solúveis, ou para alterar a velocidade de reação, deslocar o equilíbrio químico de reações, dentre outras) e físicas (como tensão superficial, densidade, viscosidade, etc.) do sistema. Esta flexibilidade em modificar as propriedades de uma solução permite o aumento da sensibilidade e/ou seletividade de uma técnica, além de possibilitar a realização de procedimentos de pré-concentração e/ou separação [18,19].

Ambientes micelares são bastante usados em fluorimetria para aumentar a intensidade de fluorescência de determinados analitos e, conseqüentemente, reduzir seus LODs (limites de detecção). Esta redução ocorre igualmente tanto para a fluorescência convencional (espectros de excitação e emissão) quanto para a fluorescência sincrônica [20].

A estrutura característica de um tensoativo é do tipo R-X, onde R é uma cadeia de hidrocarboneto variando de 8-18 átomos (normalmente linear) e X é o grupo cabeça, polar (ou iônico). De acordo com a natureza de X os tensoativos podem ser classificados como não iônicos, catiônicos, aniônicos ou anfóteros [18,19].

Os surfactantes podem produzir diferentes tipos de aglomerados dependendo de sua estrutura e do meio envolvido. Dentre as conformações estruturais possíveis têm-se as micelas normais ou aquosas, as micelas reversas, as microemulsões e as vesículas [18].

As micelas são grandes agregados de surfactantes de dimensões coloidais, que se associam espontaneamente em solução aquosa a partir de uma concentração mínima, denominada concentração micelar crítica (CMC). Abaixo da CMC, as moléculas do surfactante se encontram dispersas na forma de monômeros. No entanto, em concentrações superiores à CMC ocorre a formação das estruturas micelares, de modo que as micelas se mantêm em equilíbrio dinâmico com seus monômeros em solução [18,19], como ilustra a **Figura 6**.



**Figure 6:** Formação do agregado micelar. Adaptado de [19].

Os tensoativos podem ser classificados como naturais e sintéticos. Dentre os naturais estão os lipídios simples (ésteres de ácidos carboxílicos – e.g. triglicerídeos), lipídios complexos (ésteres de ácidos graxos

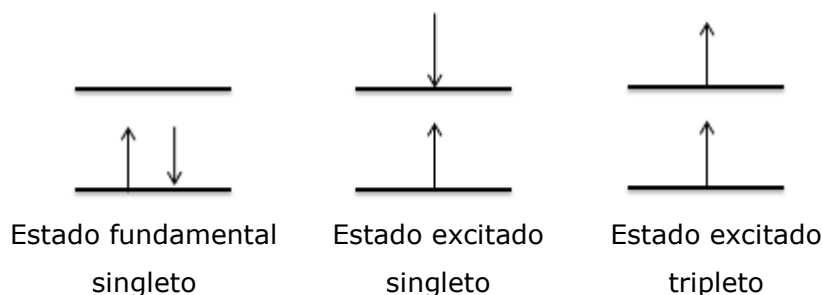
contendo fósforo, bases nitrogenadas, e/ou açúcares – e.g. fosfolipídios) e ácidos bílicos como o ácido cólico e o deoxicólico [19].

## 2.4 FLUORESCÊNCIA MOLECULAR

### 2.4.1 Definições

A fluorescência é um fenômeno fotoluminescente no qual uma molécula no estado excitado retorna para o estado fundamental ao emitir radiação eletromagnética em comprimento de onda na região do ultravioleta-próximo/visível [9,21].

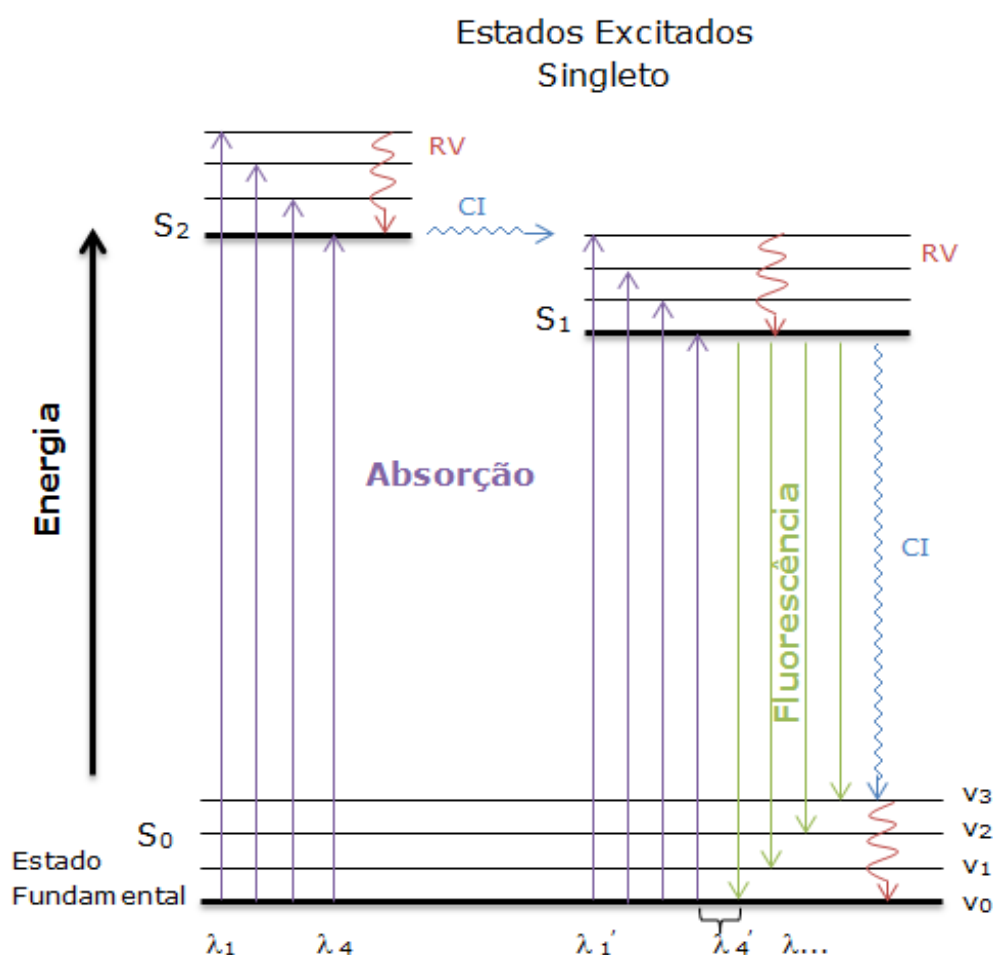
Um estado eletrônico em que os spins dos elétrons estão emparelhados é chamado estado *singlete* ( $S_n$ ). No entanto, quando ocorre uma inversão na orientação do elétron promovido ao estado excitado, o seu spin torna-se paralelo ao do elétron que permaneceu no nível fundamental, e o estado eletrônico é chamado de estado tripleto ( $T_n$ ) [9]. Esses estados podem ser representados pelo esquema da **Figura 7**:



**Figure 7:** Representação do estado fundamental e dos estados excitados singlete e tripleto. Adaptado de [9].

Ao absorver fótons de radiação eletromagnética UV/Vis de comprimento de onda característico, a população de moléculas atinge um estado eletrônico excitado singlete. Uma vez nesta condição quântica, a molécula pode experimentar vários processos que causam a perda do seu excesso de energia e relaxar para o estado fundamental. Os mecanismos de desativação possíveis podem envolver ou não emissão de radiação. O

diagrama de Jablonski, representado na **Figura 8**, ilustra, de forma resumida, as etapas envolvidas no fenômeno de luminescência considerado neste trabalho, apresentando a fluorescência como processo radiativo e a relaxação vibracional e a conversão interna como processos não radiativos. Neste diagrama a variação da energia dos estados eletrônicos está verticalmente orientada, enquanto que a variação no comprimento de onda do fóton, absorvido ou emitido, é apresentada horizontalmente [9,22].



**Figure 8:** Diagrama de Jablonski hipotético, mostrando os processos físicos que podem ocorrer quando uma molécula absorve um fóton na região do UV/Vis. (S<sub>0</sub>) estado eletrônico fundamental, (S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>) estados excitados singlete, (RV) relaxação vibracional, (CI) conversão interna, (v<sub>0...3</sub>) níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental.



Este diagrama ilustra os vários processos moleculares que podem ocorrer no estado excitado. Tais diagramas foram assim nomeados em homenagem ao professor Alexander Jablonski (1898-1980), o qual é considerado o pai da espectroscopia de fluorescência, devido as suas grandes contribuições nesta área [23].

Uma molécula em seu estado fundamental possui dois elétrons de valência emparelhados, o que caracteriza um estado eletrônico singleto,  $S_0$ . Na excitação, o elétron é promovido para um nível eletrônico de mesma multiplicidade de spin e mantém sua orientação original, ocupando, normalmente, níveis vibracionais de mais alta energia [9,22]. Este é, portanto, um estado eletrônico excitado singleto,  $S_1$ . De acordo com a regra de Kasha, a relaxação vibracional (RV), que ocorre durante as colisões entre as moléculas excitadas e as moléculas do solvente, inicia o processo de desativação através dos vários níveis vibracionais de um estado eletrônico excitado ( $S_1$  ou  $S_2$ ) até atingir o nível vibracional de menor energia de  $S_1$  [23,24]. Esta transição é significativamente rápida e ocorre, normalmente, entre  $10^{-12}$  e  $10^{-10}$  s. Em seguida, a molécula pode passar por outra rota de relaxação não radiativa, chamada conversão interna, e retornar para o nível vibracional mais elevado do estado fundamental  $S_0$ . De maneira geral, a conversão interna ocorre entre o nível vibracional menos energético de um estado eletrônico e o nível vibracional mais energético de outro estado eletrônico inferior de mesma multiplicidade. Este processo é consideravelmente rápido, porém menos eficiente que a relaxação vibracional, ocorrendo entre  $10^{-11}$  e  $10^{-9}$  s. Por serem mecanismos de natureza colisional, as transições não radiativas são seguidas por um ligeiro aumento da temperatura da solução [25].

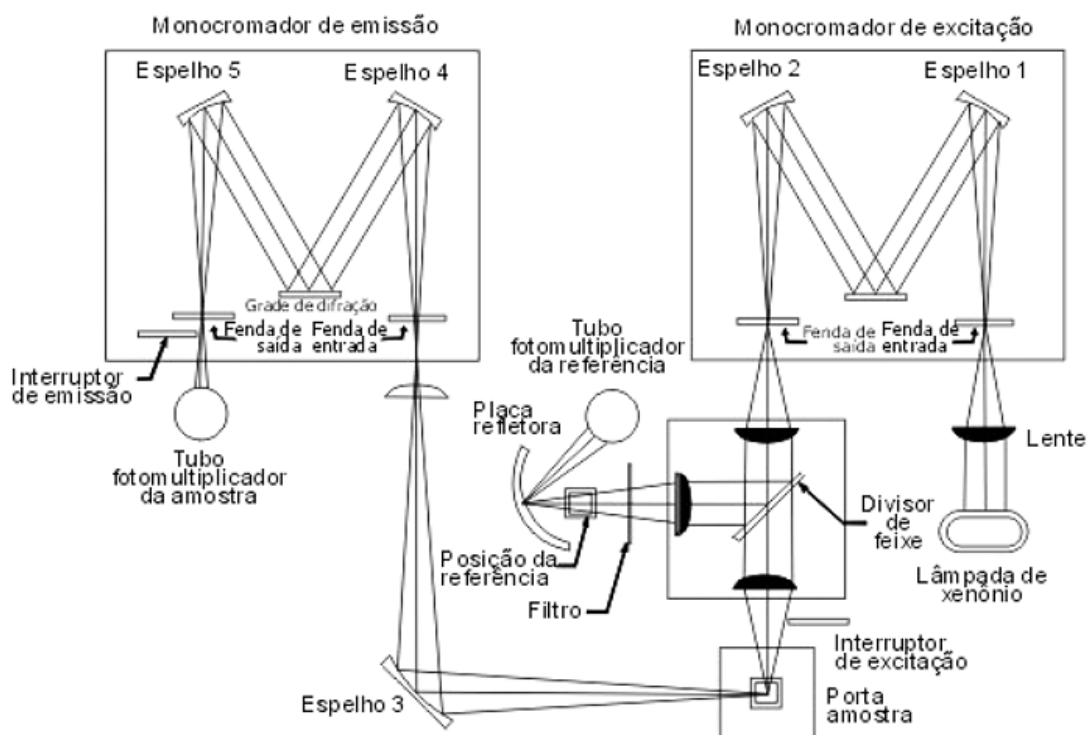
Quando a transição entre os estados eletrônicos de mesma multiplicidade ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) é acompanhada de emissão de radiação eletromagnética, tem-se o fenômeno da fluorescência. Neste processo, a luminescência é observada nas transições que ocorrem entre o nível vibracional mais baixo de  $S_1$  e os vários níveis vibracionais de  $S_0$ . Isso, porque parte da energia absorvida é rendida na forma de calor durante as

etapas de desativação não radiativas, que são muito rápidas quando comparadas com a fluorescência. Assim, a banda de fluorescência é constituída, em sua maior parte, por linhas de menor energia, ou de maior comprimento de onda, que a linha de absorção associada à excitação para o nível vibracional de menor energia de  $S_1$ . Este deslocamento para comprimentos de ondas mais longos é denominado *deslocamento Stokes* [9,23,25].

Devido à retenção da orientação original do spin, a transição de um estado excitado singleto para o estado fundamental singleto caracteriza a fluorescência como um processo altamente provável e ocorre muito rapidamente, em  $10^{-5}$  s ou menos. Esta característica faz da fluorescência o processo fotoluminescente mais comum e com maior aplicação analítica [9,25,26].

#### **2.4.2 Espectrofluorímetros**

Os instrumentos normalmente utilizados para medir a fluorescência são os espectrofluorímetros, os quais são compostos por dois monocromadores, um de excitação e outro de emissão, além uma fonte de radiação (e.g. lâmpadas de mercúrio, lâmpadas de xenônio ou lasers) e um sistema de detecção (normalmente uma fotomultiplicadora) [9]. A **Figura 9** ilustra a conformação estrutural de um espectrofluorímetro.



**Figure 9:** Arranjo estrutural de um espectrofluorímetro. Adaptado de [27].

Os monocromadores são arranjos ópticos capazes de selecionar comprimentos de onda individuais provenientes de uma fonte de radiação policromática incidente, com o auxílio de grades de difração [27]. Para o registro de um espectro de fluorescência de emissão, por exemplo, o comprimento de onda de excitação da amostra é selecionado pelo monocromador de excitação, e a radiação emitida pela amostra é decomposta em uma faixa de comprimentos de onda ao passar pelo monocromador de emissão, de modo que a intensidade de fluorescência correspondente é medida pela fotomultiplicadora.

As emissões de fluorescência são medidas, preferencialmente, a 90° da fonte de luz, para evitar que a radiação proveniente da fonte seja observada pelo detector [20].

### 2.4.3 Fatores que Afetam a Fluorescência

Para que uma substância seja fluorescente é necessário que sua estrutura e o ambiente químico em que se encontra satisfaçam alguns pré-requisitos fundamentais que possibilitam que a relaxação por fluorescência ocorra mais rapidamente que os processos de relaxação não radiativos. Dessa forma, pode-se dizer que toda substância absorvente tem potencial para fluorescer, porém poucas o fazem, pois a maioria dos compostos apresentam características estruturais que favorecem as rotas de relaxação não radiativas [9,26].

Dentre as características estruturais mais relevantes para que um composto apresente alto rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ ), podemos citar a rigidez estrutural, a presença de elétrons pi conjugados (os anéis aromáticos, por exemplo), a conformação estrutural planar da molécula e a presença de grupos substituintes adequados [9,25,26].

A eficiência quântica de fluorescência, ou rendimento quântico, de uma molécula corresponde a razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência ( $n_{em}$ ) e o número de fótons absorvidos ( $n_{abs}$ ) pela molécula [9], como mostra a **equação 1**:

$$\Phi_F = n_{em}/n_{abs} \quad (1)$$

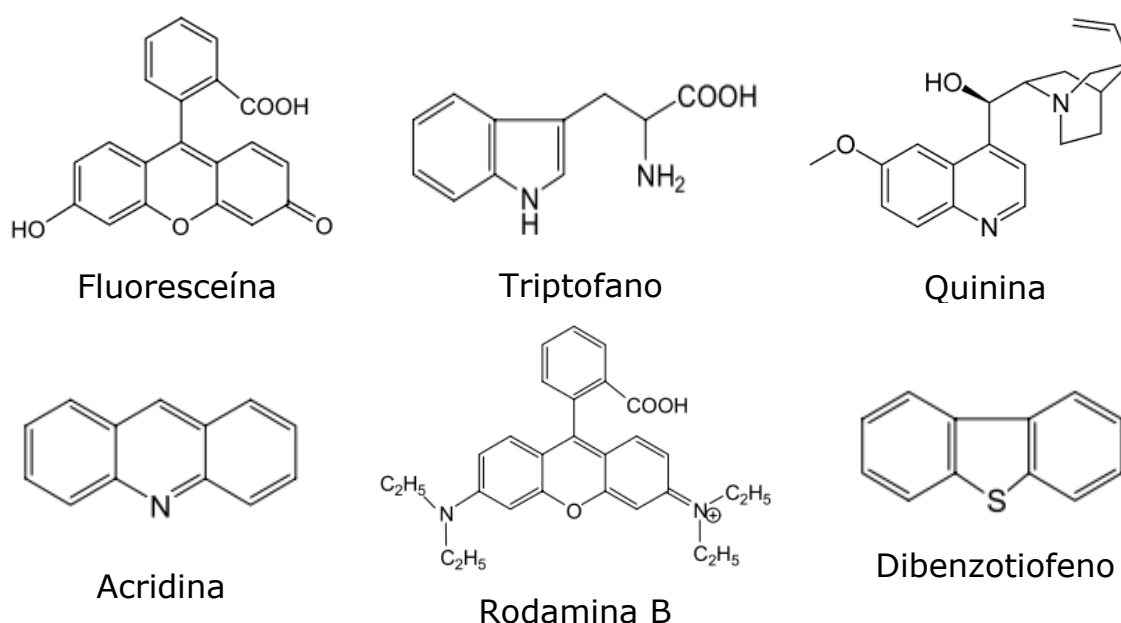
De acordo com a equação 1, nota-se facilmente que uma substância que apresenta alta intensidade de fluorescência deve possuir rendimento quântico próximo da unidade.

A fluorescência é favorecida em moléculas estruturalmente rígidas, porque o aumento da rigidez minimiza a possibilidade de relaxação por processos não radiativos (conversão interna, principalmente), de modo que a desativação por emissão fluorescente é mais eficiente. A presença de duplas ligações conjugadas em compostos insaturados, em sua maioria aromáticos, permite a ocorrência das transições típicas do processo de fluorescência. Este mecanismo limita-se majoritariamente a transição  $\pi^*$

→  $\pi$  (entre os orbitais pi anti-ligante e pi ligante) e em menor escala a transição  $\pi^* \rightarrow n$  (orbital pi anti-ligante e orbital não-ligante) [9,26].

A fluorescência dificilmente ocorre a partir da absorção de radiação ultravioleta de comprimento de onda inferior a 250 nm, uma vez que a maioria das moléculas contêm ligações que podem ser rompidas devido a energia associada a esta radiação. Consequentemente, raramente a fluorescência é observada em transições do tipo  $\sigma^* \rightarrow \sigma$ , limitando-se, portanto, às transições menos energéticas  $\pi^* \rightarrow \pi$  e  $\pi^* \rightarrow n$  [26].

Dentre os compostos fluorescentes os aromáticos são os que apresentam maior rendimento quântico, onde, neste caso, as transições  $\pi$ ,  $\pi^*$  são as menos energéticas [26]. O tempo de vida associado a estas transições é menor que o tempo de vida associado às transições  $n$ ,  $\pi^*$ . Este comportamento é observado porque a absorptividade molar, que é uma medida da probabilidade de transição, é cerca de 100 a 1000 vezes maior em uma transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  do que em uma transição  $n \rightarrow \pi^*$ . Isto permite que nos sistemas aromáticos o processo fluorescente seja mais eficiente que os mecanismos de desativação não radiativos. São poucos compostos alifáticos e alicíclicos que fluorescem, quando comparados aos derivados do benzeno. Quanto maior a número de anéis e seu grau de condensação, maior a eficiência quântica de fluorescência. Nos heterocíclicos simples como a piridina, o furano, o tiofeno e o pirrol, a transição de mais baixa energia é do tipo  $n \rightarrow \pi^*$ , que rapidamente se transforma num estado tripleto e evita a fluorescência. No entanto, estruturas que contem anéis fundidos a estas espécies moleculares frequentemente fluorescem [9]. A **Figura 10** ilustra alguns exemplos de substâncias fluorescentes.



**Figure 10:** Exemplos de moléculas tipicamente fluorescentes. Adaptado de [23,25,26].

A fluorescência é favorecida em moléculas com estrutura planar, uma vez que esta aumenta a interação entre os elétrons  $\pi$  conjugados. A eficiência e o tipo de emissão luminescente é, também, influenciada pela presença de grupos substituintes na molécula. Em geral, substituintes eletrodadores como  $-\text{OH}$  (hidroxi),  $-\text{OR}$  (metoxi),  $-\text{NH}_2/-\text{NHR}/-\text{NR}_2$  (amino), entre outros, tendem a aumentar a intensidade de fluorescência, enquanto que substituintes eletroreceptores do tipo  $-\text{CO}$  (carbonila),  $-\text{COOH}$  (carboxila),  $-\text{NO}_2$  (nitro),  $-\text{X}$  (halogênios), entre outros, favorecem o cruzamento intersistemas ( $S_1 \rightarrow T_1$ ) e, portanto, dificultam a fluorescência [25,26,28].

Outros fatores como temperatura, pH, polaridade do solvente, viscosidade, oxigênio dissolvido e presença de átomos pesados em solução têm importante influência na fluorescência do composto, podendo provocar alterações nas velocidades dos processos radiativos e não radiativos [25,26,29].

O rendimento quântico da maioria das moléculas diminui com o aumento da temperatura, devido ao aumento da frequência de colisões e, portanto, da eficiência dos processos de desativação não radiativos.

Contudo, como a fluorescência é um fenômeno com tempo de vida relativamente curto, é possível a sua observação em ensaios à temperatura ambiente. A diminuição da viscosidade do solvente conduz ao mesmo resultado [9,23,25,29].

A polaridade do solvente pode afetar as energias das transições envolvidas na fluorescência. No caso de moléculas com transições características do tipo  $n \rightarrow \pi^*$ , o aumento da polaridade do solvente acarreta no aumento da energia associada a esta transição provocando deslocamentos hipsocrômicos (em direção ao azul) do espectro. No entanto, nas transições do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ , comuns na fluorescência, a molécula no estado excitado é mais polar e o aumento da polaridade do solvente diminui a energia desta transição, de modo a provocar um deslocamento batocrômico (em direção ao vermelho) do espectro [23,25,28].

O pH exerce significativa influência na fluorescência de compostos aromáticos que possuem grupos substituintes ácidos ou básicos no anel, pois cada forma da molécula, ácida ou básica, emite luz em comprimentos de onda diferentes. Desta forma, pode-se dizer que existe uma dependência da fluorescência com o pH da solução [26].

A presença de oxigênio dissolvido em solução pode provocar a atenuação da intensidade de emissão de um fluoróforo (substância fluorescente). Isto pode ser consequência de uma oxidação induzida fotoquimicamente da espécie fluorescente, ou devido às propriedades paramagnéticas do oxigênio molecular que favorece o cruzamento intersistemas, do estado excitado singleto para o estado excitado tripleto [26].

A fluorescência de um composto diminui quando há átomos pesados em solução. Estes tendem a causar a desativação do estado excitado singleto por apresentarem um melhor acoplamento spin-orbital com as moléculas no estado excitado, resultando na mudança de

multiplicidade para o estado excitado tripleto via cruzamento intersistemas [23,25,26,28].

#### 2.4.4 Intensidade de Fluorescência e Concentração

Em uma condição em que a potência da fonte de radiação não leva a saturação da amostra, a intensidade de fluorescência  $I_F$  é proporcional à intensidade do feixe de excitação que incide sobre a solução, de modo que:

$$I_F = K'(I_0 - I) \quad (2)$$

onde  $I_0$  é a intensidade do feixe incidente,  $I$  é a intensidade do feixe depois de atravessar a amostra e  $K'$  é uma constante que depende do rendimento quântico de fluorescência [9,26].

Através da lei de Beer ( $I/I_0 = 10^{-\epsilon bc}$ ) podemos correlacionar a intensidade de fluorescência de uma espécie emissora, dada pela **equação 2**, com a sua concentração, de acordo com a seguinte relação:

$$I_F = K'I_0(1 - 10^{-\epsilon bc}) \quad (3)$$

na qual  $\epsilon$  é a absorvidade molar da espécie fluorescente,  $b$  é a espessura do caminho percorrido pela luz ao atravessar a amostra e  $c$  é a concentração da espécie fluorescente [9,26].

A expansão do termo exponencial da **equação 3** em uma série de Taylor leva a uma expressão cujo primeiro termo pode ser o responsável por caracterizar o comportamento linear da fluorescência com a concentração. Isso ocorre somente a baixas concentrações, quando todos os outros termos da série podem ser desprezados em relação ao primeiro, e a intensidade de fluorescência pode ser escrita como,



$$I_F = 2,3 K' \epsilon b c I_0 \quad (4)$$

ou quando  $I_0$  for constante

$$I_F = K c \quad (5)$$

Assim, um gráfico de  $I_F$  em função da concentração da espécie emissora deve ser linear quando  $c$  é suficientemente baixa. Quando a concentração aumenta a relação representada pela **equação 5** deixa de ser linear. Normalmente, esse efeito ocorre devido a dois fatores, a auto-extinção e a auto-absorção. O primeiro é devido a colisões entre moléculas excitadas, ocorrendo transferência de energia não radiativa de modo análogo à verificada com as moléculas do solvente no processo de desativação não radiativo. A auto-absorção acontece quando o comprimento de onda de emissão se sobrepõe ao pico de absorção do composto, ou seja, ocorre absorção de radiação emitida por outras moléculas do analito [26]. A presença de outras moléculas absorventes na matriz da amostra também podem provocar esses efeitos, às vezes denominados efeitos de filtro interno.

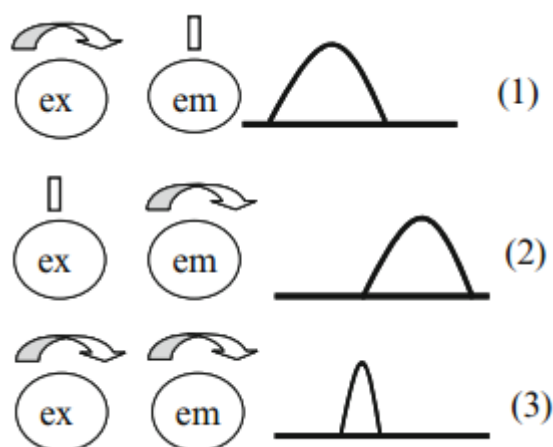
Como  $I_F$  é diretamente proporcional a intensidade da fonte  $I_0$  (**equação 4**), a sensibilidade e o limite de detecção dos métodos fluorescentes podem ser incrementados com o aumento de  $I_0$  [9,23,26]. Essa característica possibilita à espectroscopia de fluorescência, em condições especiais, a detecção de uma única molécula. Como a absorbância está relacionada à razão das intensidades  $I_0/I$ , ela não depende da intensidade da fonte, ou seja, o aumento de  $I_0$  não causa variação na absorbância. Assim, os métodos fluorimétricos apresentam limites de detecção menores e maior sensibilidade que os métodos de absorção. Dessa forma, as fontes utilizadas em fluorescência são

geralmente mais potentes que as fontes empregadas na espectroscopia de absorção [9,23,25,26,28].

#### 2.4.5 Fluorescência Sincrônica

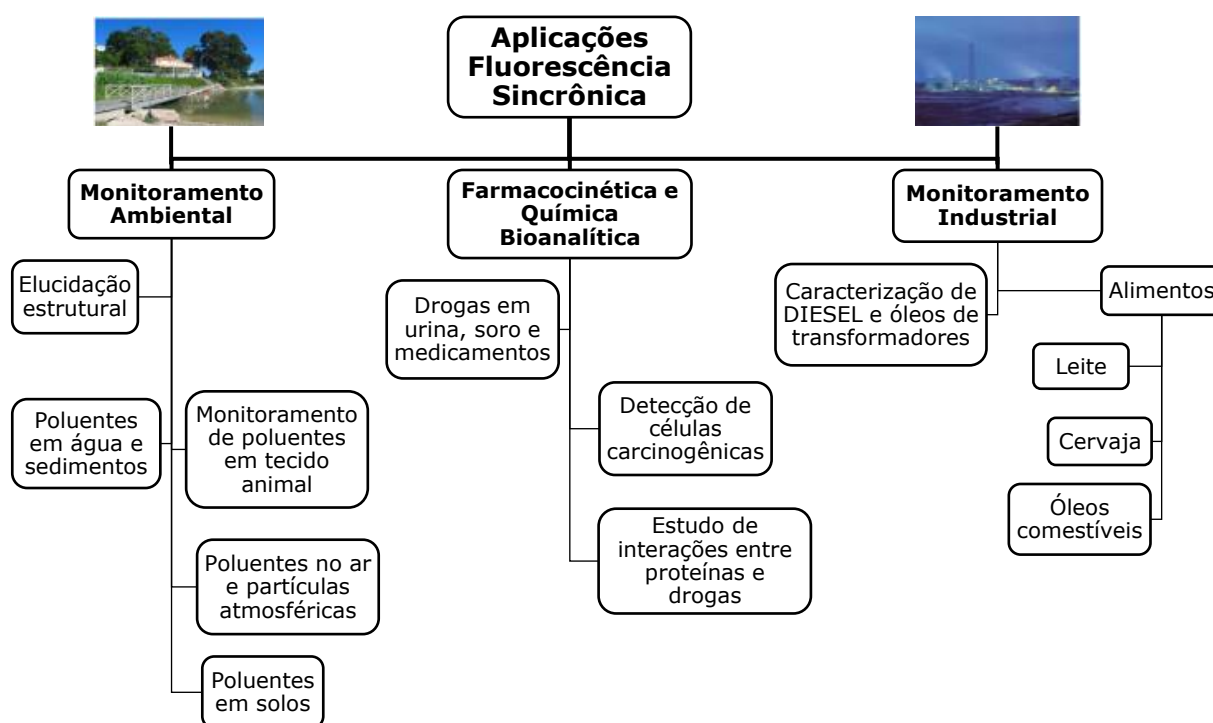
Na espectroscopia de fluorescência tradicional obtêm-se um espectro de emissão ao explorar uma faixa de comprimentos de onda de emissão ( $\lambda_{em}$ ) quando a amostra é irradiada com um único comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{exc}$ ). Analogamente, um espectro de excitação é obtido pela varredura do monocromador de excitação ao longo de uma faixa de comprimentos de onda enquanto se registra a emissão em certo comprimento de onda. Existe, no entanto, outra possibilidade, que consiste em explorar simultaneamente os dois monocromadores, excitação e emissão, de tal modo que dependendo da velocidade de varredura de cada um é possível obter as diferentes variações da técnica fluorimétrica conhecida como espectroscopia de fluorescência sincrônica (EFS) [30].

Quando a velocidade de varredura dos monocromadores de excitação e emissão é mantida constante durante o registro espectral se obtém, consequentemente, um intervalo de comprimentos de onda ( $\Delta\lambda$ ) constante entre  $\lambda_{exc}$  e  $\lambda_{em}$  e, neste caso, têm-se o chamado espectro de fluorescência sincrônico a comprimento de onda constante (**Figura 11**). Introduzida por Loyd [31] na década de 1970, esta foi a primeira das possíveis abordagens trabalhadas na espectroscopia de fluorescência sincrônica e apresenta notáveis vantagens frente as outras técnicas fluorimétricas convencionais mencionadas acima, tais como aumento da seletividade, redução da interferência por espalhamento Rayleigh e Raman, estreitamento das bandas espectrais, simplificação da complexidade do espectro e aumento da resolução espectral, além de manter a alta sensibilidade nas medidas [20,30-32].



**Figure 11:** Ilustração hipotética de diferentes combinações dos monocromadores de excitação (ex) e emissão (em) e seus espectros correspondentes. (1) espectro de fluorescência de excitação; (2) espectro de fluorescência de emissão; e (3) espectro de fluorescência sincrônico. Adaptado de [30].

Assim, a EFS tem sido crescentemente utilizada, em conjunto com técnicas quimiométricas (e.g. PLS, PCR, MLR, dentre outras), como alternativa para a determinação simultânea de compostos em matrizes complexas, cujos sinais de fluorescência estão fortemente sobrepostos. Normalmente, estes espectros são resolvidos apenas com a utilização de metodologias laboriosas, baseadas em demorados processos de separação e utilização de equipamentos de alto custo [20,30]. A **Figura 12**, a seguir, mostra várias áreas de aplicação da fluorescência sincrônica em seus diferentes modos.



**Figure 12:** Aplicações de fluorescência síncrona. Adaptado de [20].

A associação de ferramentas quimiométricas com a EFS têm gerado resultados em boa concordância com os resultados obtidos a partir de técnicas como cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC – do inglês *high-performance liquid chromatography*), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS – do inglês *gas chromatography with mass spectrometry*) e espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF-AAS) [20].

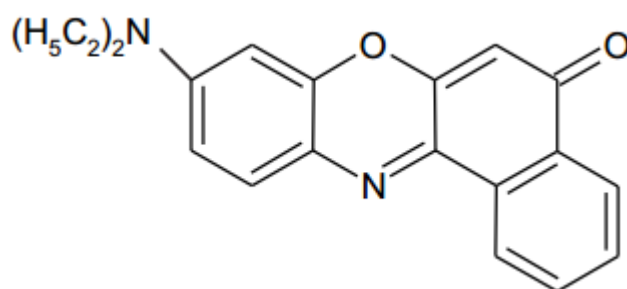
#### 2.4.6 Marcadores Fluorescentes

Os marcadores (ou sondas) fluorescentes apresentam uma importância singular na espectroscopia de fluorescência. Atualmente, têm-se o conhecimento de um número consideravelmente grande de fluoróforos que podem desempenhar o papel de sonda. Aquelas que ocorrem naturalmente, como o triptofano em proteínas, NADH, clorofila, dentre outras, são conhecidas como sondas intrínsecas. No entanto, em muitos casos a molécula alvo não é fluorescente por natureza, como

ocorre, por exemplo, com DNA e os lipídios. Estas e muitas outras substâncias que não apresentam fluorescência intrínseca podem, contudo, ser induzidas a fluorescer através de reação com um fluoróforo, por exemplo, o qual irá desempenhar o papel de marcador fluorescente. Neste caso, têm-se, portanto, as chamadas sondas extrínsecas. A fluoresceína, a rodamina, o vermelho do nilo e muitas outras substâncias são exemplos destes marcadores [23,25].

#### 2.4.6.1 Vermelho do Nilo (VN)

O Vermelho do Nilo (9-dietilamino-5H-benzo[*a*]fenoxazin-5-ona) é um corante fortemente fluorescente em meio hidrofóbico, sendo solúvel em solventes orgânicos e em lipídios, e pouco solúvel em água. Esta desempenha, neste caso, o papel de supressor de fluorescência, de modo que o corante (VN) não fluoresce na água. Por essas razões o VN é utilizado como marcador fluorescente em diversas matrizes biológicas [33]. A estrutura química do corante está representada na **Figura 13**.

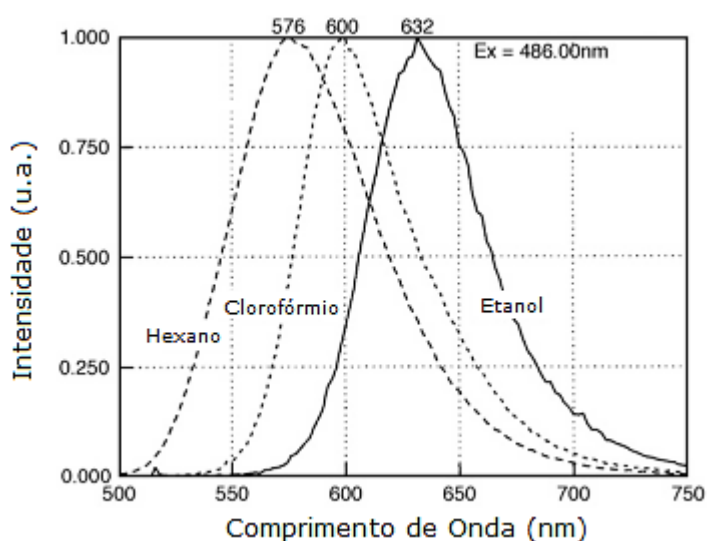


**Figure 13:** Estrutura química do Vermelho do Nilo.

De acordo com Fowler e Greenspan (1985) o VN fluoresce em diferentes cores, do amarelo ouro ao vermelho profundo, dependendo da polaridade do solvente utilizado e do grau de hidrofobicidade dos lipídios [33].

Um deslocamento solvatocrômico é observado na banda de fluorescência do marcador, de modo que à medida que a polaridade do

solvente aumenta a emissão de fluorescência do corante se desloca em direção ao vermelho (**Figura 14**). De maneira similar, quando o VN se encontra dissolvido em lipídios neutros (mais hidrofóbicos), como as gotículas de triglicerídeos e colesterol esterificados, a emissão ocorre na região do amarelo, e quando se encontra dissolvido em lipídios polares (anfifílicos - possuem uma região hidrofílica e outra hidrofóbica), como os fosfolipídios predominantes nas membranas celulares, a emissão por fluorescência ocorre na região do vermelho [33,34,35].



**Figure 14:** Espectro de emissão normalizado do VN em diferentes solventes orgânicos, ilustrando o deslocamento da banda de emissão devido ao efeito solvatocrômico. Adaptado de [35].

Uma das limitações do uso do vermelho do nilo é a sua rápida fotodegradação, de maneira que quando exposto à luz ambiente sua capacidade de fluorescência é perdida após um curto período de tempo (da ordem de minutos). No entanto, este tempo de fotodegradação varia de acordo com a polaridade e a hidrofobicidade do meio em que está inserido, com a saturação, localização e tamanho dos lipídios [36]. Assim, é importante que antes de realizar as medidas para a construção de curvas analíticas e análise de amostras reais seja feito um teste de fotodegradação do VN nas condições das amostras.

## 2.5 QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS

A determinação do conteúdo lipídico de amostras biológicas é feita, tradicionalmente, por métodos gravimétricos, os quais requerem o emprego prévio de procedimentos de extração com solventes orgânicos [3,4]. Outras metodologias baseadas em técnicas como GC, HPLC ou TLC (do inglês, *Thin Layer Chromatography*) têm sido desenvolvidas para análises e caracterizações mais detalhadas dos lipídios. Porém, a necessidade de demoradas e numerosas etapas de extração e pré-tratamento das amostras, que exigem maior quantidade de biomassa, tornam estas metodologias dispendiosas e pouco viáveis para análises de rotina [35].

A extração de lipídios é um processo físico de transferência de matéria (lipídio) que ocorre da matriz graxa para o solvente, quando ambos são colocados em contato [37].

Devido à ampla faixa de hidrofobicidade relativa que os lipídios possuem, não é indicado o uso de um único solvente para a extração dos lipídios de tecidos biológicos. Assim, uma mistura de solventes adequada deve ser suficientemente polar para solubilizar os lipídios polares presentes nas membranas celulares ou em associação com lipoproteínas, e suficientemente apolar para extrair os lipídios neutros presentes nas células de gordura [37].

A extração do conteúdo lipídico em amostras planctônicas (particularmente, em microalgas e zooplâncton) é normalmente realizada mediante o emprego dos métodos clássicos de Bligh e Dyer [38] e Folch et al. [39], tanto em suas versões originais como em versões modificadas [3,4,15,40]. Ambos utilizam a mistura de solventes clorofórmio/metanol. Entretanto, nas versões originais, os volumes de solventes empregados no método de Folch et al. são muito superiores aos utilizados no método de Bligh e Dyer. Este último é caracterizado pela redução da fração solvente/amostra (uma parte de amostra para três partes de 1:2 clorofórmio/metanol seguido por uma ou duas partes de clorofórmio) em

relação ao método de Folch et al., que utiliza uma parte de amostra para vinte partes de 2:1 clorofórmio/metanol, seguido por várias lavagens do extrato bruto [41]. No entanto, de acordo com o estudo de Iverson et al. [41] o método de Bligh e Dyer não é indicado para a análise de amostras que contêm mais de 2% de lipídios, uma vez que os valores de concentração deste componente são, neste caso, consideravelmente subestimados. Assim, o método de Folch et al., em suas variadas formas, é considerado como um procedimento mais confiável e eficiente para a extração de lipídios em amostras biológicas.

Após a primeira etapa do procedimento de extração, adiciona-se uma alíquota de solução salina (NaCl ou KCl) para auxiliar a separação das fases de clorofórmio (contém os lipídios) e metanol.

Os métodos gravimétricos apresentam, no entanto, uma série de desvantagens, caracterizadas pelo elevado tempo de análise, uso de solventes tóxicos, além do inconveniente da extração de componentes não lipídicos da fase orgânica [37]. Devido, principalmente, as várias etapas de manipulação envolvidas nos procedimentos clássicos de extração, erros notáveis de quantificação são observados para tais metodologias [4,37].

Outra metodologia que vem sendo bastante usada na quantificação das frações de lipídios, para contornar as dificuldades apresentadas pelos métodos clássicos, baseia-se na determinação fluorimétrica a partir do uso do corante lipossolúvel VN [3-5,35,42-46].

Por apresentar alta afinidade, especificidade e sensibilidade com relação ao grau de hidrofobicidade dos lipídios, o VN é considerado um marcador fluorescente ideal para detecção e quantificação fluorimétrica de lipídios [34]. A atenuação de sua fluorescência pela água viabiliza a realização de estudos quantitativos em meio aquoso, já que a interação irá ocorrer preferencialmente com os lipídios. Devido à variação da hidrofobicidade entre os lipídios de cada classe (lipídios polares e neutros) o vermelho do nilo fluoresce em diferentes comprimentos de onda [33].

Na literatura encontram-se diversos estudos com diferentes aplicações do VN para a quantificação de lipídios em células animais e em



micro-organismos, como por exemplo, em células de mamíferos [42], fungos e leveduras [43], zooplâncton [3], e microalgas [4,35,40,44-46]. No caso dos estudos com microalgas, a utilização do padrão comercial trioleína como representante dos lipídios neutros se mostrou viável, uma vez que permitiu a obtenção de modelos de calibração com bons resultados de predição [44,46,47].

Para a determinação do conteúdo lipídico em uma matriz é necessário que primeiramente seja construída uma curva analítica que correlacione a intensidade de fluorescência com a concentração de lipídios na amostra. Isto pode ser feito por determinação gravimétrica ou por meio da utilização de padrões de lipídios [3,35].

Apenas um trabalho [3] relata a determinação espectrofluorimétrica simultânea das classes de lipídios neutros e polares em espécies de zooplâncton, com o objetivo de avaliar a condição nutricional de um ambiente marinho a partir da razão *lipídios neutros/lipídios polares*. No entanto, para a construção de modelos de calibração com bons resultados de predição (erros < 5%) foi necessária a utilização de lipídios específicos de cada espécie de zooplâncton estudada. Neste estudo foi empregada a mistura de solventes isopropanol/clorofórmio para a estabilização das micelas lipídicas em solução. Os pares de excitação/emissão ótimos para a leitura dos espectros de emissão foram de 530/580 nm e 560/610 nm para os lipídios neutros e polares, respectivamente. Uma tentativa de modelagem univariada usando os lipídios comerciais trioleína (TO) e fosfatidilcolina (PC – do inglês, *phosphatidylcholine*) como representantes das classes de lipídios neutros e polares, respectivamente, foi realizada, porém os modelos não se mostraram eficientes na etapa de predição em amostras reais. Entretanto, o estudo parece não abordar de forma satisfatória a inclusão da interferência espectral entre TO e PC (~20%) nos modelos univariados.

Diante disso, a associação de uma técnica fluorimétrica mais seletiva, como a fluorescência sincrônica, com a robusta técnica de

calibração multivariada PLS, se apresenta como uma alternativa viável para a construção de modelos de calibração para quantificação simultânea das classes de lipídios neutros e polares em amostras de zooplâncton usando os padrões TO e PC.

## 2.6 QUIMIOMETRIA

### 2.6.1 Planejamento de Misturas Brereton

As técnicas quimiométricas são muito úteis para análise de misturas multicomponentes. Na construção de um modelo de calibração é comum a utilização de vários níveis de concentração a fim de melhor representar o comportamento das amostras reais, de modo a fornecer informações confiáveis sobre uma possível falta de ajuste e a capacidade preditiva do modelo. Sem o uso prévio de um planejamento experimental adequado seria necessário à utilização de um número significativamente grande de experimentos para se obter um conjunto de calibração representativo, tornando a análise inviável.

No caso de estudos quantitativos para misturas multicomponentes, o planejamento experimental de Brereton se apresenta como uma alternativa fundamental para simplificar a etapa de modelagem, reduzindo consideravelmente o número de experimentos necessários para o conjunto de calibração. Assim como todas as técnicas de planejamento experimental, este desenho ortogonaliza os vetores associados aos parâmetros de interesse, no sentido de que a correlação entre os fatores a serem modelados seja igual à zero [48].

O objetivo inicial no desenvolvimento do planejamento Brereton é gerar a primeira coluna (1º fator) da matriz, a partir da qual todas as outras colunas serão geradas [48].

Inicialmente, é escolhido o número de níveis ( $I$ ) de concentração para os ( $q$ ) analitos presentes na mistura. O número de experimentos ( $N$ ) necessário é um múltiplo de  $I^p$ , sendo calculado a partir da relação  $N =$

$k \cdot l^p$ , onde  $k$  corresponde ao número de repetições para uma dada mistura e  $p$  é um valor maior ou igual a 2. Portanto, em um planejamento de três níveis são necessárias no mínimo nove misturas de calibração ( $k = 1$ ,  $p = 2$  e  $l = 3$ ).

A seguir, estão descritas as etapas complementares as informações já predefinidas, acima, para a obtenção das  $N$  (nove) misturas da matriz de planejamento. Para facilitar a compreensão, a tabela de planejamento será construída acompanhando as orientações de cada etapa.

1. Codificar os níveis de concentração escolhidos. Para um desenho de três níveis, os valores das concentrações podem ser codificados como -1, 0, +1, onde os inteiros negativo e positivo correspondem a menor e maior concentração, respectivamente, e o '0' ao valor central de concentração.
2. Escolher um nível repetidor e preencher o experimento 1 com ele. Se o número de níveis é ímpar, recomenda-se que o nível repetidor seja o '0'.

| <b>Experimento</b> | <b>Fator 1</b> | <b>Fator 2</b> |
|--------------------|----------------|----------------|
| 1                  | 0              | 0              |
| 2                  | ---            | ---            |

3. Os experimentos do fator 1 serão divididos em  $l-1$  blocos, neste caso,  $3-1=2$  blocos, e o nível repetidor deve ser posicionado nas misturas de acordo com a sequência  $[2+j(l+1)]$ , em que  $j$  varia de '0' a  $l-1$  ( $j \rightarrow 0, 1$ ). Dessa forma, o nível repetidor irá ocupar os experimentos 2 e 6.

| <b>Experimento</b> | <b>Fator 1</b> | <b>Fator 2</b> |
|--------------------|----------------|----------------|
| 1                  | 0              | 0              |
| 2                  | 0              |                |
| 3 a 5              | Bloco 1        |                |
| 6                  | 0              |                |
| 7 a 9              | Bloco 2        |                |

4. Escolher o vetor diferença. Este consiste de  $l-1$  números que variam de '0' até  $l-2$ . Um possível vetor diferença encontrado dentro de um conjunto restrito de vetores é o  $\{0 \ 1\}$ . Ele irá informar a quantidade de permutações a serem realizadas com o permutador cíclico a partir do nível escolhido, numa direção indicada pelo próprio permutador.
5. O próximo passo é definir um permutador cíclico (ou ciclo gerador), o qual tem a função de auxiliar a ortogonalização, ajudando na escolha dos níveis das misturas consecutivas. O permutador não deve conter o nível repetidor. Assim, um possível permutador cíclico é  $-1 \rightarrow 1$ .
6. Determinar os níveis do primeiro bloco, que vai do experimento 3 até o experimento  $l+2$ . Neste caso, do experimento 3 ao experimento 5.
  - i. O experimento 3 pode ser preenchido com qualquer nível diferente do nível repetidor. Por exemplo, -1 (que inicia o ciclo gerador);
  - ii. Para preencher os demais experimentos do bloco 1 basta seguir o permutador de acordo com o vetor diferença. Como o vetor diferença se inicia com '0' e o nível escolhido para o experimento 3 é -1, isto significa que o nível que preencherá o experimento 4 refere-se a um valor de permutação igual a zero no nível do experimento 3

(anterior), ou seja, o nível escolhido no permutador permanece o mesmo.

| Experimento | Fator 1 | Fator 2 |
|-------------|---------|---------|
| 1           | 0       | 0       |
| 2           | 0       |         |
| 3           | -1      | Bloco 1 |
| 4           | -1      |         |
| 5           | 1       |         |
| 6           | 0       |         |

7. Os primeiros experimentos dos blocos posteriores serão preenchidos realizando-se uma única permutação no nível do primeiro experimento do bloco imediatamente anterior, de acordo com o ciclo gerador.

| Experimento | Fator 1 | Fator 2 |
|-------------|---------|---------|
| 1           | 0       | 0       |
| 2           | 0       |         |
| 3           | -1      | Bloco 1 |
| 4           | -1      |         |
| 5           | 1       |         |
| 6           | 0       |         |
| 7           | 1       | Bloco 2 |
| 8           | 1       |         |
| 9           | -1      |         |

8. O preenchimento dos níveis dos demais fatores é feito a partir do deslocamento diagonal dos valores do fator 1, como mostrado na **tabela 1**.

**Tabela 1:** Matriz do planejamento Brereton para 03 níveis e 02 fatores.

| Experimento | Fator 1 | Fator 2 |
|-------------|---------|---------|
| 1           | 0       | 0       |
| 2           | 0       | -1      |
| 3           | -1      | -1      |
| 4           | -1      | 1       |
| 5           | 1       | 0       |
| 6           | 0       | 1       |
| 7           | 1       | 1       |
| 8           | 1       | -1      |
| 9           | -1      | 0       |

### 2.6.2 Calibração Multivariada

Dentre os problemas mais frequentes em química analítica está à determinação da concentração de uma ou mais espécies químicas (analitos) em uma amostra. Para isso, é necessário o estabelecimento de uma relação matemática entre a resposta instrumental e a concentração, já que esta não pode ser obtida de forma direta [11].

A calibração corresponde ao conjunto de procedimentos matemáticos e estatísticos necessários para se estabelecer uma relação, normalmente linear, entre a propriedade de interesse e o sinal analítico [11,26].

Na análise quantitativa a calibração univariada é a metodologia mais simples do ponto de vista de aplicação e interpretação dos resultados para a construção de modelos de calibração, sendo constantemente citada na literatura [12,49,50], principalmente, em conjunto com métodos analíticos de referência [51]. Nos métodos de calibração univariada ou de ordem zero apenas uma medida instrumental (e.g. intensidade de emissão de fluorescência em um comprimento de onda do espectro) está

associada a cada uma das amostras de calibração, ou seja, para cada amostra tem-se um escalar correspondente. No entanto, o emprego da calibração univariada está limitado a sistemas seletivos, ou seja, quando a amostra não possui interferentes que resultem em sinais analíticos sobrepostos ao do componente alvo, de modo que a utilização de um único canal analítico seja suficiente para a construção de um modelo de calibração com boa capacidade de predição.

Na calibração multivariada mais de uma resposta instrumental está relacionada com a propriedade de interesse. No caso dos métodos de calibração de primeira ordem para cada amostra tem-se um vetor de respostas instrumentais (e.g. um espectro de emissão de fluorescência). Os métodos de calibração multivariada são mais seletivos e viabilizam o estudo quantitativo em matrizes complexas, como é o caso de amostras ambientais, alimentícias, biológicas e industriais [52], que apresentam forte sobreposição de sinais, permitindo a determinação simultânea de analitos mesmo na presença de interferentes, desde que estes estejam presentes na etapa de construção do modelo (vantagem de primeira ordem) [11,53]. Dessa forma, na maioria dos casos, os métodos multivariados evitam a utilização de dispendiosos procedimentos de separação e tratamentos químicos para a aplicação da calibração univariada.

A construção de um modelo de calibração multivariada envolve duas etapas. Na primeira etapa, chamada calibração, define-se a função matemática que descreve a relação entre a matriz de variáveis independentes  $X$ , que contém as respostas instrumentais, e o vetor  $y$  da matriz de variáveis dependentes  $Y$ , que contém a propriedade de interesse, como apresentado na **equação 6**:

$$y = \beta X + E \quad (6)$$

em que  $\beta$  é um vetor que contém os coeficientes de regressão, e  $E$  representa os resíduos associados a flutuações aleatórias não modeladas.

A segunda etapa corresponde a validação do modelo construído, a fim de otimizar a relação entre os dois conjuntos de variáveis e, portanto, obter um modelo que descreva melhor a propriedade de interesse nas amostras de predição.

Por questão de praticidade, é indicado que os modelos de calibração multivariados sejam validados durante o processo de construção. Este tipo de validação é conhecido como validação interna ou validação cruzada. Durante o processo de validação interna é possível escolher com maior precisão o número de componentes principais envolvidas no modelo, detectar amostras anômalas e verificar preliminarmente sua robustez e capacidade de predição. Em um segundo momento o modelo construído é validado com um conjunto de amostras externas, ou seja, amostras que não participaram da sua construção. O objetivo da etapa de validação externa é avaliar a capacidade preditiva do modelo e garantir a confiabilidade das predições da concentração (ou outra propriedade de interesse) em amostras desconhecidas.

Em resumo, são necessários dois conjuntos de dados para satisfazer as duas etapas. Um conjunto para a construção, também conhecido como conjunto de calibração, e outro para a validação, conhecido como conjunto de predição ou teste.

A validação cruzada do tipo *leave-one-out* é uma metodologia bastante utilizada para estabelecer, principalmente, o número de fatores (componentes principais ou variáveis latentes no caso do PLS) a serem usados no modelo. O método *leave-one-out* consiste em dividir as amostras do conjunto de calibração em subconjuntos unitários, isto é, que contêm apenas uma amostra. Em seguida um destes subconjuntos é separado para ser predito pelo modelo construído com os subconjuntos restantes, e um erro é calculado. Esse procedimento é repetido até que todos os subconjuntos sejam testados. Para cada subconjunto removido são construídos modelos com um, dois e assim por diante fatores [54,55]. Os valores das amostras preditas pelos modelos construídos durante a validação cruzada são comparados com seus valores conhecidos (de



referência). Normalmente usa-se a soma dos quadrados dos erros de previsão *PRESS*, ou a raiz quadrada *RMSECV*:

$$PRESS = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (7)$$

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{m_{cv}}} \quad (8)$$

O número mais adequado de fatores (ou componentes principais, etc.) será o que corresponde ao menor valor de *PRESS* [11].

### 2.6.2.1 Análise de Componentes Principais – PCA

A PCA tem como principal objetivo reduzir a dimensionalidade de *X* (e.g. variáveis espectrais) preservando ao mesmo tempo o máximo de informação. A idéia é condensar toda informação relevante contida nas variáveis originais em um pequeno número de novas variáveis, chamadas de componentes principais, eliminando, assim, a parcela de informação redundante devido à colinearidade entre as colunas de *X* (quando as variáveis estão altamente correlacionadas). Cada componente é obtida a partir da combinação linear das variáveis originais, e os coeficientes dessa combinação linear, denominados *loadings*, representam a contribuição de cada variável original para cada componente principal. O *loading* é o cosseno do ângulo entre o eixo da variável e o eixo da componente, podendo variar entre -1 e 1 [56,57].

A realização de uma PCA consiste em reescrever a matriz de dados *X*, como o produto de duas outras matrizes menores *T* e *P*<sup>t</sup>, de modo que  $X = TP^t + E$ , onde *T* é a matriz dos escores, *P* é a matriz dos pesos e *E* é a matriz dos resíduos. Esta equação corresponde à representação matricial da combinação linear, de modo que a primeira componente principal, PC1, é a combinação linear de máxima variância, isto é, que se encontra na

direção de maior variação possível dos dados. A segunda componente, PC2, é ortogonal a primeira e descreve a máxima variância dos dados que não foi explicada pela PC1. A terceira componente, PC3, é ortogonal as duas primeiras e explica a máxima variância em sua direção que não foi capturada pelas primeiras componentes, e assim por diante. As PCs irão constituir, após a análise de componentes principais, um novo sistema de eixos coordenados [11,56,57,58].

### **2.6.2.2 Mínimos Quadrados Parciais - PLS**

Dentre os vários métodos de calibração multivariada a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS – do inglês, *Partial Least Squares*) é a metodologia mais empregada para a obtenção de modelos multivariados relacionados a dados de primeira ordem [48,59]. O método PLS é um método de compressão de dados fundamentado na análise de componentes principais (PCA – do inglês, *Principal Component Analysis*) [11,60]. Portanto, este método é eficiente no tratamento de dados que apresentam problemas de colinearidade e ruído experimental.

A vantagem do método PLS em relação aos outros métodos multivariados (para dados de primeira ordem) é que na construção do modelo de calibração por mínimos quadrados parciais utiliza-se tanto a informação contida na matriz X (variáveis independentes) como a informação contida em Y (variável dependente).

De maneira geral, a regressão por mínimos quadrados parciais consiste em encontrar um conjunto de componentes principais para X (que contém os dados espectrais, por exemplo) e outro para Y (que contém as concentrações de dois analitos, por exemplo) e, em seguida, relacionar um conjunto com o outro de maneira a encontrar a melhor relação linear possível entre seus scores, ou seja, entre as projeções das amostras e das concentrações sobre seus respectivos fatores. No entanto, a busca pelo melhor ajuste linear entre os scores dos dois blocos, leva a pequenas distorções na direção dos loadings, resultando na perda

da ortogonalidade entre as PCs, e, conseqüentemente, no aparecimento de informação redundante. Como as PCs perdem a ortogonalidade no método PLS, elas deixam de ser componentes principais e passam a ser chamadas variáveis latentes (VL) [48,61,62].

Na construção do modelo PLS as matrizes X e Y são, inicialmente, decompostas separadamente em um produto de matrizes, os *scores* e os *loadings*, através do método PCA [55,57], de acordo com as equações abaixo:

$$X = TP^t + E_X = \sum t_k p_k^t + E_X \quad (9)$$

$$Y = UQ^t + E_Y = \sum u_k q_k^t + E_Y \quad (10)$$

em que T e U são as matrizes dos scores, P e Q as matrizes dos loadings (pesos),  $E_X$  e  $E_Y$  as matrizes de resíduos, para X e Y, respectivamente. O sobrescrito  $t$  indica que a matriz é transposta.

Uma relação linear é, então, estabelecida entre os scores dos blocos X e Y, para k fatores, como expressa a **equação 11**, abaixo:

$$u_k = b_k t_k \quad (11)$$

Ocorrem mudanças em t e u até que se encontre o melhor modelo linear entre eles. O elemento " $b_k$ ", da equação acima, corresponde ao vetor dos coeficientes de regressão do modelo linear para k fatores, obtido a partir da expressão:

$$b_k = \frac{u_k' t_k}{t_k' t_k} \quad (12)$$

Ao obter o vetor de regressão (um para cada componente) correspondente à relação linear otimizada entre os escores de X e Y, ou

seja, após a escolha do número ideal de VL e detecção e eliminação de possíveis amostras anômalas (*outliers*), o modelo de calibração PLS será, então, descrito pela relação  $y=b_kX+E$ .

Atualmente, existem vários algoritmos que podem ser utilizados para executar a decomposição usada em PLS, sendo que os mais populares são o NIPALS (do inglês, *Nonlinear Iterative Partial Least Squares*) e o SVD (do inglês, *Singular Value Decomposition*) [11]. Esta decomposição é ilustrada na **Figura 15**, onde as matrizes X e Y são apresentadas como a soma dos produtos dos seus respectivos vetores de loadings e scores.

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{c} \text{m} \\ \boxed{\text{X}} \\ \text{n} \end{array} = \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\text{t}_1} \\ \text{n} \end{array} \begin{array}{c} \text{m} \\ \boxed{\text{p}_1^t} \\ 1 \end{array} + \dots + \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\text{t}_k} \\ \text{n} \end{array} \begin{array}{c} \text{m} \\ \boxed{\text{p}_k^t} \\ 1 \end{array} + \begin{array}{c} \text{m} \\ \boxed{\text{E}_x} \\ \text{n} \end{array} \\
 \\
 \begin{array}{c} \text{j} \\ \boxed{\text{Y}} \\ \text{n} \end{array} = \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\text{u}_1} \\ \text{n} \end{array} \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\text{q}_1^t} \\ 1 \end{array} + \dots + \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\text{u}_k} \\ \text{n} \end{array} \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\text{q}_k^t} \\ 1 \end{array} + \begin{array}{c} \text{j} \\ \boxed{\text{E}_y} \\ \text{n} \end{array}
 \end{array}$$

**Figure 15:** Decomposição em variáveis latentes das matrizes X e Y para modelos PLS.

O método PLS pode ser executado de duas maneiras distintas, de modo que existem dois algoritmos para a construção de modelos de calibração via regressão por mínimos quadrados parciais, o PLS1 e o PLS2. Considerando como exemplo a análise quantitativa de uma mistura multicomponente, em que se deseja determinar a concentração de vários analitos através de uma técnica espectroscópica, o PLS1 constrói um modelo de calibração para cada analito e considera os outros componentes da amostra como interferentes. Já o PLS2 constrói um modelo de calibração para vários analitos simultaneamente. Entretanto, o

PLS1 normalmente apresenta melhores resultados que o PLS2 quando há forte sobreposição espectral dos compostos [20].

# **Capítulo 3**

---

## **Metodologia**

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os solventes clorofórmio (Merck), metanol (Merck), isopropanol (Merck) e piridina (Sigma-Aldrich) foram todos adquiridos em grau HPLC. Padrões de alta pureza de trioleína em piridina (triolein 5000 µg/mL, P.A.), fosfatidilcolina (L- $\alpha$ -phosphatidylcholine, pureza  $\geq 99\%$ ) e vermelho do nilo (Nilo Red, adequado para fluorescência, pureza  $\geq 98\%$  - HPLC) foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

A partir da solução padrão estoque de trioleína (TO) em piridina a 5000 µg/mL foram preparadas, por diluição, duas soluções de trabalho, uma a 2500 µg/mL e outra a 625 µg/mL.

Uma solução padrão estoque de fosfatidilcolina (PC) a 6000 µg/mL foi preparada em isopropanol. A partir desta, duas soluções de trabalho, uma a 2000 µg/mL e outra a 1000 µg/mL, foram preparadas por diluição volumétrica.

Com base no estudo de Alonzo e Mayzaud (1999) [3] foi preparada uma solução de trabalho do corante vermelho do nilo (VN) a 2,5 mg/100 ml em isopropanol. Para minimizar o efeito da fotodegradação do marcador na coloração das micelas, a cada vinte dias foi preparada uma nova solução de VN.

A escolha do isopropanol como um dos solventes a serem utilizados para a obtenção de um sistema micelar estável

Tanto as soluções estoque quanto as soluções de trabalho foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e acondicionadas em freezer a -20°C, para minimizar a degradação dos lipídios e do corante.

#### 3.2 PROTOCOLO

Inicialmente, um estudo foi realizado para estabelecer o protocolo de preparo das soluções padrão do conjunto de calibração. Foram

avaliados o tempo de fotodegradação do VN em solução, o tempo de sonicação necessário para a homogeneização das misturas e as quantidades de solventes (piridina e isopropanol) utilizadas. A fim de obter-se maior seletividade e resolução nos espectros, o valor de  $\Delta\lambda$  também foi avaliado durante a definição do protocolo. Com isso foi garantida a obtenção de espectros reproduzíveis. O mesmo protocolo foi usado no preparo dos padrões de validação e das amostras reais.

### **3.2.1 Teste de Fotodegradação**

O estudo da fotodegradação do VN em solução lipídica consistiu em duas etapas: na primeira foi avaliada a fotodegradação quanto a exposição a radiação da fonte de excitação, e na segunda etapa avaliou-se a fotodegradação do corante devido a exposição da solução à luz ambiente durante um certo período.

Para a primeira etapa foi utilizada uma solução de TO a 5,00  $\mu\text{g/mL}$  e PC a 5,00  $\mu\text{g/mL}$ , preparada em isopropanol e água destilada. O volume final da solução foi aferido em balão de 25 mL. Ao balão foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de estoque de VN a 2,5 mg/100 mL, e o volume final de isopropanol foi completado de modo a totalizar 500  $\mu\text{L}$ . Após a adição do corante a solução foi sonicada por 2 minutos e deixada em repouso por 10 minutos. A análise consistiu em realizar três medidas consecutivas do espectro sincrônico de uma mesma alíquota da solução. O  $\Delta\lambda$  empregado para a aquisição dos espectros foi de 15 nm na faixa de 300 a 750 nm, utilizando fendas de excitação/emissão de 5 nm.

Para a análise realizada na segunda etapa preparou-se uma réplica da mesma solução usada na etapa anterior. Foram medidos quatro espectros sincrônicos em tempos regulares de exposição. Os mesmos parâmetros da primeira etapa foram utilizados para a aquisição dos espectros da segunda etapa.



### 3.2.2 Tempo de Sonicação

Nesta análise foram preparadas três replicatas de uma mistura de TO a 20,00 µg/mL e PC a 20,00 µg/mL. Estas soluções foram preparadas da mesma maneira que os padrões empregados no teste de fotodegradação, exceto em relação aos tempos de sonicação utilizados (1, 2 e 3 minutos para as réplicas 1, 2 e 3, respectivamente). Os espectros foram medidos na faixa de 300 a 750 nm, usando  $\Delta\lambda$  de 15 nm e fendas de excitação/emissão de 5 nm.

### 3.2.3 Delta Lambda

Este estudo foi realizado considerando o efeito de três valores de  $\Delta\lambda$  (10, 15 e 30 nm) no espectro sincrônico de duas diferentes soluções. No preparo de cada uma destas soluções foram utilizados 500 µL de isopropanol, sendo que deste volume 250 corresponde à adição de VN. O volume final (25 mL) foi alcançado com adição de água destilada e o tempo de sonicação empregado foi de 1 minuto. Uma mistura foi preparada de modo a conter TO a 20,00 µg/mL e PC a 12,50 µg/mL. Na outra mistura as concentrações finais de TO e PC foram de 20,00 e 20,00 µg/mL, respectivamente. O tempo de coloração para cada mistura foi de 10 minutos.

### 3.2.4 Reprodutibilidade Espectral

Em um primeiro momento foram realizados os experimentos apresentados na **tabela 2**, para avaliar o comportamento dos sinais de fluorescência do VN associados a TO (representante dos lipídios neutros) e PC (representante dos lipídios polares), quando apenas o isopropanol foi utilizado no preparo das soluções para a estabilização das micelas.

**Tabela 2:** Experimentos empregados na avaliação do comportamento espectral das bandas relativas a TO e PC, para padrões preparados apenas com isopropanol e água destilada.

| <b>Experimento</b> | <b>C<sub>TO</sub> (µg/mL)</b> | <b>C<sub>PC</sub> (µg/mL)</b> |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>1</b>           | 5,00                          | 5,00                          |
| <b>2</b>           |                               | 12,50                         |
| <b>3</b>           |                               | 20,00                         |
| <b>4</b>           | 20,00                         | 5,00                          |
| <b>5</b>           |                               | 12,50                         |
| <b>6</b>           |                               | 20,00                         |

Após verificar a presença de um comportamento irregular nas intensidades dos sinais de fluorescência relacionados à trioleína (TO) quando a concentração de fosfatidilcolina (PC) em solução varia, foi identificada a necessidade da utilização de outro solvente para estabilizar as micelas de TO. Para este fim, avaliou-se a viabilidade do uso da piridina como um segundo solvente orgânico. Num primeiro momento mediu-se o espectro sincrônico de duas réplicas (duas soluções idênticas preparadas separadamente nas mesmas condições). Estas duas soluções foram preparadas a partir de uma solução estoque padrão de trioleína em piridina a 5000 µg/mL, adquirido da Sigma-Aldrich, e de uma solução estoque de fosfatidilcolina a 6000 µg/mL em isopropanol. As concentrações de TO e PC foram, respectivamente, 20,00 e 20,00 µg/mL. Os volumes finais de piridina e isopropanol totalizaram, respectivamente, 100 e 500 µL em cada mistura. O volume de solução estoque de VN foi mantido em 250 µL. Após 1 minuto de sonicação cada solução permaneceu em repouso por 10 minutos, para coloração e estabilização das micelas.

A partir dos resultados obtidos com os ensaios de trioleína em piridina foi constatado que o uso de piridina possibilita a obtenção de

espectros com alta reprodutibilidade. A fim de verificar o comportamento dos sinais de fluorescência do VN associado às micelas de TO e PC, para soluções preparadas com a mistura dos solventes orgânicos piridina e isopropanol, foram realizados três experimentos. Estes foram preparados em balões volumétricos de 10 mL, para reduzir a quantidade de VN utilizada em cada mistura. Devido à redução do volume final das soluções em 2,5 vezes, o volume de estoque de VN adicionado também foi reduzido na mesma proporção, ou seja, para 100  $\mu\text{L}$ , de modo que a concentração do corante foi mantida em relação às misturas com volume final de 25 mL. Como a piridina é responsável pela estabilização das micelas de TO seu volume foi mantido em 100  $\mu\text{L}$ . A fim de investigar a possibilidade de reduzir o volume final de isopropanol em cada solução, as três misturas foram preparadas usando apenas 250  $\mu\text{L}$  deste solvente. A partir de duas soluções de trabalho de trioleína em piridina, uma a 2500  $\mu\text{g/mL}$  e outra a 625  $\mu\text{g/mL}$ , e de uma solução de trabalho de fosfatidilcolina em isopropanol a 2000  $\mu\text{g/mL}$  foram realizados os três experimentos, que correspondem aos ensaios 04, 05 e 07 do conjunto de calibração associado à matriz de planejamento apresentada na tabela 3 (seção 3.3). Logo após a adição do corante as soluções foram sonicadas por 1 minuto e deixadas em repouso por 10 minutos.

### 3.3 CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO

Uma vez definido o protocolo, cada padrão de calibração foi preparado em balão volumétrico de 10 mL de acordo com as seguintes condições:

- I. Os volumes de solventes orgânicos adicionados em cada balão devem totalizar 100  $\mu\text{L}$  de piridina e 250  $\mu\text{L}$  de isopropanol;
- II. A cada balão adicionar 100  $\mu\text{L}$  de solução de VN a 2,5 mg/100 ml em isopropanol;
- III. Completar o volume final com água destilada;

- IV. Para que o VN seja incorporado às micelas de lipídios (trioleína e fosfatidilcolina) de forma mais eficiente, sonicar os padrões durante 1 minuto;
- V. Após a sonicação deixar cada solução durante 10 minutos em repouso, para a estabilização da interação do corante com as micelas.

Foram preparadas nove soluções padrão para a construção do conjunto de calibração com concentrações na faixa de 5,00 a 20,00 µg/mL de acordo com um planejamento de misturas Brereton de três níveis de concentração para cada lipídio. Os níveis de concentração de cada analito (TO e PC) foram obtidos pela divisão da faixa linear de trabalho em três valores equidistantes. As concentrações de TO foram de 5,00, 12,50 e 20,00 µg/mL para os níveis -1, 0 e +1, respectivamente. Já as concentrações finais de PC foram 5,00, 12,00 e 20,00 µg/mL para os níveis -1, 0 e +1, respectivamente. A pequena variação na concentração intermediária associada a PC ocorreu devido à utilização de volumes relacionados a números inteiros (não fracionários) para a realização dos ensaios, a fim de minimizar o erro associado às micropipetas, de maneira que ao preparar as soluções foi necessário recalcular as concentrações dos lipídios. A faixa de calibração foi definida com base em estudos prévios [3,44,63]. A **tabela 3** foi construída de acordo com uma matriz de planejamento Brereton  $3^2$  (ver tabela 1, seção 2.6.1), e contém os nove experimentos empregados na construção dos modelos de calibração.

**Tabela 3:** Valores de concentração dos lipídios em cada um dos experimentos necessários para a obtenção do conjunto de calibração.

| <b>Experimento</b> | <b>C<sub>TO</sub> (µg/mL)</b> | <b>C<sub>PC</sub> (µg/mL)</b> |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>1</b>           | 12,50                         | 12,00                         |
| <b>2</b>           | 12,50                         | 5,00                          |
| <b>3</b>           | 5,00                          | 5,00                          |
| <b>4</b>           | 5,00                          | 20,00                         |
| <b>5</b>           | 20,00                         | 12,00                         |
| <b>6</b>           | 12,50                         | 20,00                         |
| <b>7</b>           | 20,00                         | 20,00                         |
| <b>8</b>           | 20,00                         | 5,00                          |
| <b>9</b>           | 5,00                          | 12,00                         |

### 3.4 CONJUNTO DE VALIDAÇÃO

Um conjunto de validação ( $X_{val}$ ) contendo nove amostras de padrões comerciais (TO e PC) foi construído a partir dos experimentos apresentados na **tabela 5**, para a avaliação prévia da capacidade preditiva dos modelos de calibração. Foram escolhidos três níveis de concentração aleatórios, dentro da faixa de trabalho, para cada um dos lipídios, como ilustra a **tabela 4**.

**Tabela 4:** Níveis de concentração de TO e PC empregados na construção do conjunto de validação.

| <b>Lipídio</b> | <b>Concentrações (µg/mL)</b> |       |       |
|----------------|------------------------------|-------|-------|
| <b>TO</b>      | 6,25                         | 10,00 | 15,00 |
| <b>PC</b>      | 6,00                         | 10,00 | 16,00 |

**Tabela 5:** Experimentos do conjunto de validação construído com padrões comerciais de (TO e PC).

| <b>Experimento</b> | <b>C<sub>TO</sub> (µg/mL)</b> | <b>C<sub>PC</sub> (µg/mL)</b> |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>1</b>           | 6,25                          | 6,00                          |
| <b>2</b>           | 6,25                          | 10,00                         |
| <b>3</b>           | 6,25                          | 16,00                         |
| <b>4</b>           | 10,00                         | 6,00                          |
| <b>5</b>           | 10,00                         | 10,00                         |
| <b>6</b>           | 10,00                         | 16,00                         |
| <b>7</b>           | 15,00                         | 6,00                          |
| <b>8</b>           | 15,00                         | 10,00                         |
| <b>9</b>           | 15,00                         | 16,00                         |

Neste trabalho, a precisão do método proposto foi avaliada em termos de repetitividade, que corresponde à concordância entre os resultados de uma série de medidas feitas para uma mesma amostra homogênea nas mesmas condições de medição, ou seja, com o mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo equipamento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em curto intervalo de tempo. Para isso, o experimento 03 foi realizado em triplicata e a precisão estimada a partir do cálculo do desvio padrão relativo (RSD).

$$RSD(\%) = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \quad (13)$$

Sendo,  $\bar{X}$  a média aritmética das  $n$  medições (replicatas) e  $S$  o desvio padrão amostral associado a  $n$ .

Adicionalmente, a exatidão, que reflete o grau de concordância entre o valor estimado e o valor verdadeiro, foi avaliada em termos do

RMSEP (do inglês, *Root Mean Square Error of Prediction*) e do Bias (magnitude do erro sistemático), e a linearidade em termos do coeficiente de determinação  $R^2$ .

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{m_p}} \quad (14)$$

$$Bias = \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)}{m_p} \quad (15)$$

Onde,  $y_i$  é o valor tido como verdadeiro,  $\hat{y}_i$  é o valor estimado pelo modelo e  $m_p$  o número de amostras de previsão do conjunto de validação.

### 3.5 AMOSTRAS

Seis amostras de plâncton foram coletadas nas proximidades da região do porto Ganvan, localizado no estuário de Bahia Blanca, Buenos Aires, Argentina (**Figura 16**), sendo três amostras de mesozooplâncton, duas de macrozooplâncton e uma de fitomicroplâncton (microalgas). A amostragem foi realizada utilizando redes apropriadas para plâncton: malhas de 20  $\mu\text{m}$  para a coleta de fitomicroplâncton, 200  $\mu\text{m}$  para mesozooplâncton e 20 mm para macrozooplâncton. Os componentes maiores não pertencentes às amostras foram removidos com uma peneira de 1,7 mm. Todas as amostras permaneceram armazenadas em freezer a  $-20^\circ\text{C}$  antes de serem analisadas.



**Figure 16:** Local de coleta de amostras no estuário de Bahía Blanca. Em vermelho (●) está indicada a região de amostragem, próxima ao porto Galvan.

### ***Extração e Preparo das Amostras***

O extrato seco de lipídios totais de cada amostra foi obtido pelo método de Folch et al. [39] modificado. As principais modificações empregadas foram: uso do procedimento de sonicação para agilizar a quebra das paredes celulares e facilitar o contato dos lipídios com os solventes, e uso de fluxo de nitrogênio para evaporação do clorofórmio e obtenção do extrato de lipídios totais completamente seco.

Inicialmente, a amostra que se encontra depositada em um papel de filtro comum é colocada em um tubo de ensaio. Uma alíquota de 2,5 mL de uma solução de clorofórmio/metanol (2:1 v/v) é, então, adicionada. Com um bastão de vidro a amostra é triturada junto com o papel de filtro e levada para uma breve agitação em um agitador vortex. Em seguida, a mistura é sonicada por três minutos para facilitar a dissolução dos lipídios. Após a sonicação o sobrenadante é transferido, com o auxílio de um bastão de vidro, para outro tubo de ensaio



previamente esterelizado (lavado com álcool etílico e depois levado à estufa). Este procedimento é repetido até que se complete um total de três extrações para cada amostra. Realizadas as três extrações a mistura lipídica é filtrada sob vácuo. Esta etapa é necessária para a remoção de pedaços de papel de filtro que são carregados junto com o sobrenadante. O filtrado é, em seguida, lavado com 1,25 mL de solução de NaCl 0,9% e deixado em repouso na geladeira a fim de se observar uma separação eficiente das fases de clorofórmio e metanol. A fase superior da mistura é composta por metanol e água e a fase inferior por clorofórmio e lipídios. A fase de clorofórmio é filtrada, com o auxílio de uma pipeta Pasteur (lavada com clorofórmio e muflada), para um frasco âmbar (~3 mL), previamente muflado e pesado, usando sulfato de sódio anidro no papel de filtro para reter a pequena fração de água que possa estar presente. Antes da filtração o funil e o papel de filtro são lavados com clorofórmio. Por fim, o clorofórmio é evaporado em fluxo de nitrogênio e um peso final (frasco + extrato de lipídios totais) é obtido. A massa de lipídios totais presente na amostra é determinada pela diferença entre o peso inicial (frasco) e o peso final.

Após a secagem completa o extrato seco de cada amostra foi redissolvido em 1 mL da mistura de solventes piridina/isopropanol, na proporção 1:1,5 v/v, respectivamente. Estas soluções, tidas como estoques amostrais, foram armazenadas em freezer a -20°C antes de serem analisadas. A partir de alíquotas destes estoques de lipídios foram preparadas soluções, com base no protocolo previamente estabelecido, para a análise espectrofluorimétrica das frações de lipídios neutros e polares em amostras reais.

### ***Amostra – Fracionamento***

Com o intuito de avaliar o deslocamento da banda de fluorescência correspondente aos lipídios neutros nas amostras reais, realizou-se o fracionamento da composição lipídica de uma amostra de microalga da

espécie *Scenedesmus sp.* cultivada em condições de estresse para a produção de lipídios neutros. Parte do extrato de lipídios totais, obtido pelo método de Folch modificado, foi fracionado utilizando um cartucho SPE C18 (200 mg/3 mL) da arolab e as misturas de solventes clorofórmio/ácido acético (9:1 v/v), acetona/metanol (9:1 v/v) e metanol para eluição dos lipídios neutros (LN), glicolipídios (GL) e fosfolipídios, respectivamente. Em seguida, alíquotas do extrato bruto e de cada uma das frações foram colocadas em balões volumétricos de 10 mL e os solventes evaporados em corrente de nitrogênio até secagem completa. Os lipídios de cada balão foram, então, redissolvidos mediante adição de 100 µL de piridina, 150 µL de isopropanol, 100 µL de solução de VN 2,5 mg/100 ml em isopropanol e água destilada. Após 10 minutos de repouso registrou-se o espectro sincrônico de cada solução.

### 3.6 ANÁLISE ESPECTROFLUORIMÉTRICA

A aquisição dos espectros de fluorescência sincrônica foi realizada em um espectrofluorímetro *Shimadzu*<sup>®</sup> modelo RF-5301PC (*Shimadzu Corporation*, Kyoto, Japão), como mostrado na **Figura 17**, utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm. Todo o trabalho experimental foi desenvolvido no laboratório de química ambiental da Universidade Nacional del Sur, Argentina.



**Figure 17:** Espectrofluorímetro *Shimadzu*<sup>®</sup> modelo RF-5301PC.

Antes de efetuar as leituras dos espectros sincrônicos referentes aos padrões de calibração, realizou-se um estudo para definir o  $\Delta\lambda$  (diferença de comprimento de onda entre os monocromadores de excitação e emissão) que melhor discriminasse as bandas espectrais. Dentre os três valores de  $\Delta\lambda$  analisados (15, 25 e 35 nm) o de 15 nm foi o que proporcionou perfis espectrais com maior distinção entre os sinais de fluorescência dos componentes presentes nas misturas.

Todos os espectros dos conjuntos de calibração e validação foram obtidos na faixa de comprimento de onda compreendida no intervalo de 400 a 750 nm, utilizando uma abertura de 5 nm tanto para a fenda de excitação como para a de emissão, e resolução de 1 nm (intervalo entre os comprimentos de onda).

### 3.7 SOFTWARES E ANÁLISE DE DADOS

Todos os cálculos para a construção dos modelos de calibração PLS foram realizados em ambiente Unscrambler<sup>®</sup>, versão 9.7, com o auxílio do programa Matlab<sup>®</sup>, versão 7.6. Neste trabalho, os espectros e gráficos

relacionados à análise dos dados foram gerados a partir do programa OriginPro 8.

# **Capítulo 4**

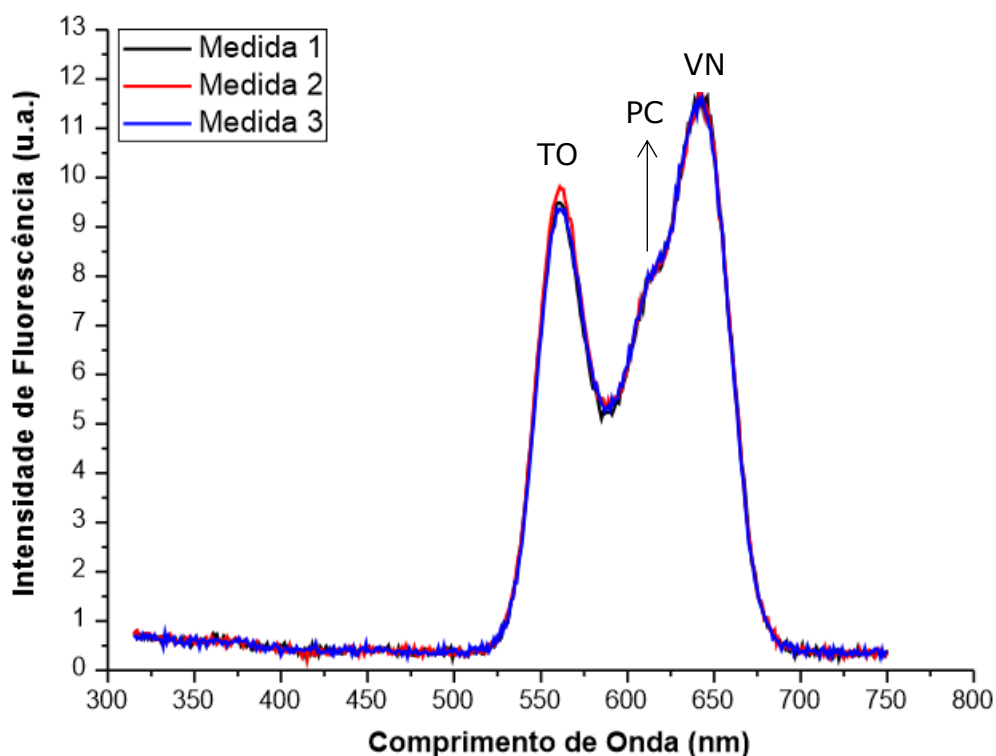
---

## **Resultados e Discussão**

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 TESTE DE FOTODEGRADAÇÃO

A fotodegradação do vermelho do nilo nas soluções lipídicas foi avaliada, inicialmente, em termos da exposição da solução a radiação da fonte de excitação. Na **Figura 18** são apresentados os espectros sincrônicos correspondentes a três medidas consecutivas de uma mesma alíquota de uma solução de TO a 5,00  $\mu\text{g/mL}$  e PC a 5,00  $\mu\text{g/mL}$ , preparada de acordo com o procedimento descrito na metodologia. Nesta análise, logo após o termino de uma medida foi iniciada outra medida, de modo a ter-se um regime contínuo de exposição da solução a radiação da fonte.

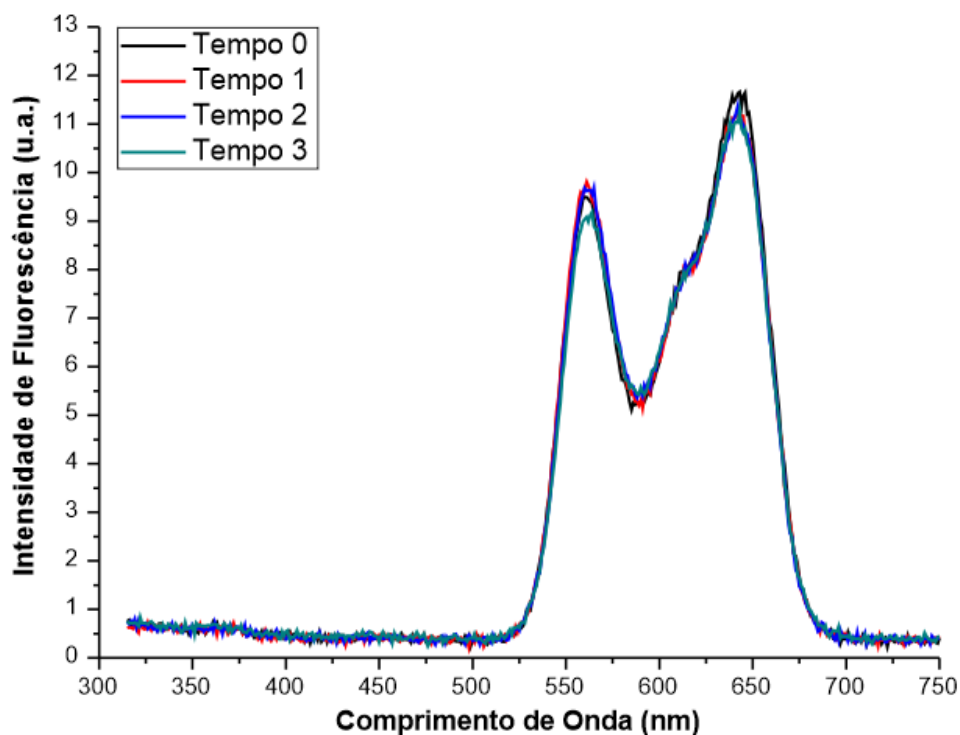


**Figure 18:** Espectros sincrônicos consecutivos de uma mesma alíquota de solução padrão.

Como se pode observar, na **Figura 18**, o sistema micelar contendo VN não é fotossensível à radiação da fonte de excitação dentro de um

período aproximado de 15 minutos (para a potência da lâmpada considerada na análise), uma vez que cada leitura durou em média 5 minutos para a faixa de comprimentos de onda considerada. Na aquisição dos espectros foram utilizadas fendas de exc/em com 5 nm de abertura e  $\Delta\lambda$  de 15 nm.

A fim de avaliar a fotodegradação da mistura devido à influência da luz ambiente, uma réplica do padrão anterior foi preparada e mantida exposta a radiação ambiente. Logo após o preparo, em um tempo de exposição nulo  $t_0$ , foi registrado o espectro sincrônico de uma alíquota da solução. O restante do padrão continuou sob efeito da luz ambiente, de modo que ao completar 10 minutos de exposição ( $t_1$ ) outra alíquota foi tomada para o registro do seu espectro. Dessa mesma forma foram medidos os espectros sincrônicos da solução nos tempos de exposição  $t_2$  (20 minutos) e  $t_3$  (30 minutos). Os espectros de fluorescência sincrônica analisados nesta etapa (**Figura 19**), foram medidos com  $\Delta\lambda$  de 15 nm e fendas de exc/em de 5 nm.

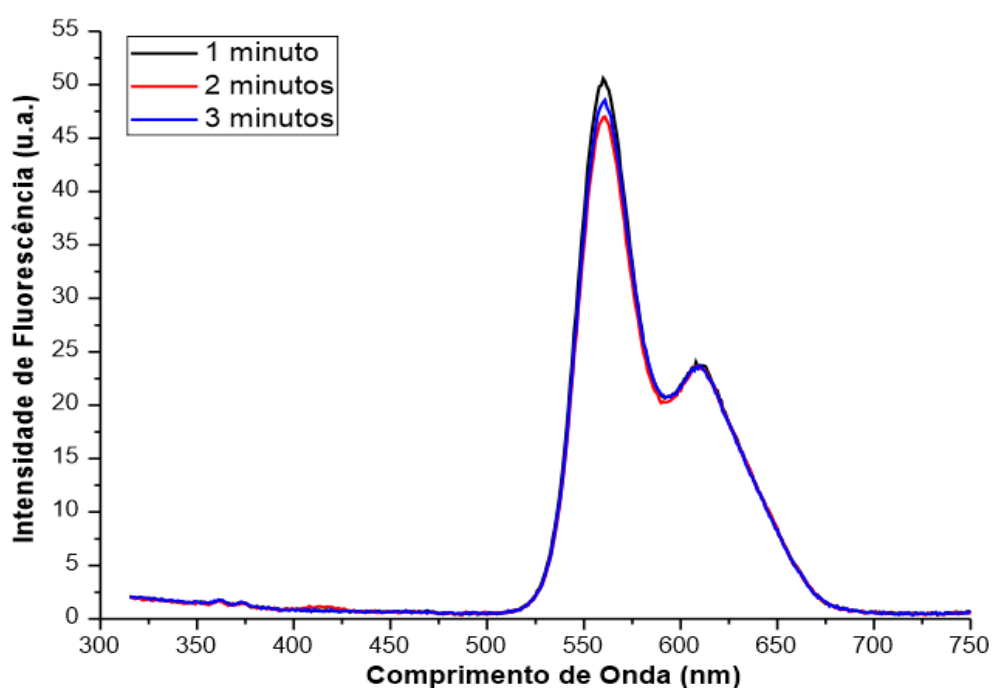


**Figure 19:** Espectros sincrônicos de quatro alíquotas de uma solução padrão obtidos ao longo do tempo.

Ao observar os espectros nota-se que não ocorre fotodegradação da solução no intervalo de tempo de 20 minutos (tempo de exposição entre  $t_0$  e  $t_2$ ). Uma pequena redução da intensidade de fluorescência do VN ( $\sim 5\%$ ), associada a TO, é observada quando a solução completa 30 minutos de exposição. Com base nos resultados observados os padrões de calibração podem ser preparados na presença de luz ambiente, uma vez que no tempo de 20 minutos não ocorre fotodegradação das micelas marcadas com VN.

#### 4.2 TEMPO DE SONICAÇÃO

A influência do tempo de sonicação utilizado no preparo das soluções foi avaliada medindo os espectros sincrônicos de três replicatas (**Figura 20**) de uma mistura de TO a  $20,00 \mu\text{g/mL}$  e PC a  $20,00 \mu\text{g/mL}$ , preparadas de acordo com o procedimento descrito na metodologia. Cada replicata corresponde a um tempo de sonicação diferente (1, 2 e 3 minutos).



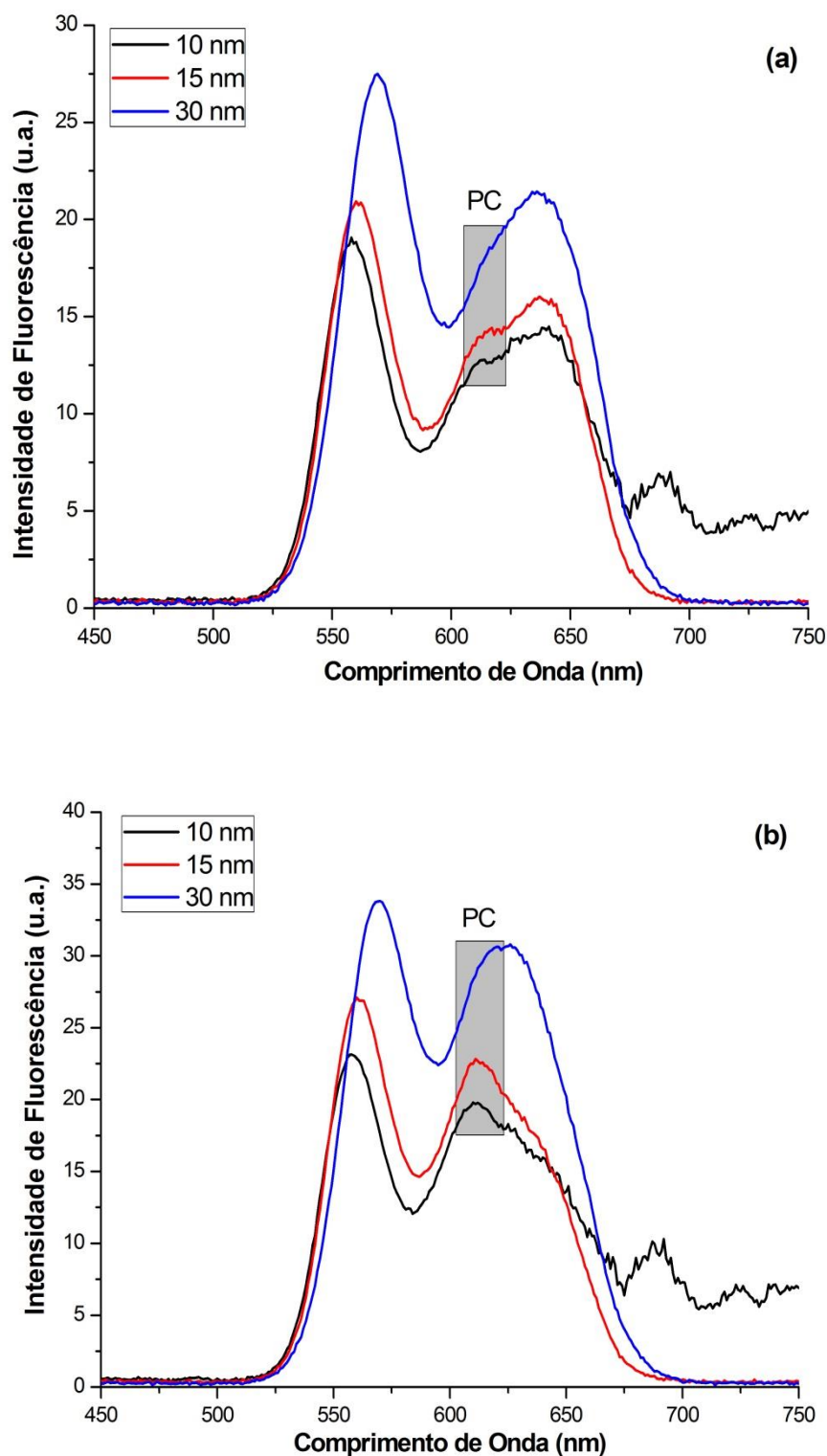
**Figure 20:** Espectros sincrônicos de três replicatas preparadas com diferentes tempos de sonicação.



De acordo com a **Figura 20** o tempo de sonicação não provoca nenhuma alteração significativa na sensibilidade do espectro de uma solução lipídica corada com VN, de modo que é viável escolher o tempo de sonicação igual a 1 minuto para o preparo dos padrões de calibração.

#### 4.3 DELTA LAMBDA

O  $\Delta\lambda$  está associado à seletividade da técnica e a sua escolha deve ser avaliada. Assim, um estudo foi realizado considerando o efeito de três valores de  $\Delta\lambda$  (10, 15 e 30 nm) no espectro sincrônico de duas diferentes soluções, preparadas segundo o procedimento descrito na metodologia. Na **Figura 21 (a)** são apresentados os espectros de fluorescência sincrônica de uma mistura contendo TO a 20,00  $\mu\text{g/mL}$  e PC a 12,50  $\mu\text{g/mL}$ , e na **Figura 21 (b)** são apresentados os espectros de outra mistura contendo TO a 20,00  $\mu\text{g/mL}$  e PC a 20,00  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figure 21:** Espectros sincrônicos dos ensaios realizados para o estudo do  $\Delta\lambda$ . Em (a) estão os espectros da mistura que contém TO a 20,00  $\mu\text{g/mL}$  e PC a 12,50  $\mu\text{g/mL}$ ; em (b) estão os espectros da mistura que contém TO a 20,00  $\mu\text{g/mL}$  e PC a 20,00  $\mu\text{g/mL}$ .

De uma forma geral observar-se, na **Figura 21**, que a intensidade de fluorescência diminui quando o valor de  $\Delta\lambda$  se aproxima de 10 nm. Em relação aos espectros medidos com  $\Delta\lambda$  de 10 nm observa-se que o sinal em torno de 700 nm provavelmente corresponde a um artefato, o qual ocorre devido a um problema na medida (e.g. vazamento de radiação espúria). Contudo, nota-se que este artefato não compromete a confirmação da presença da banda de fluorescência relacionada à PC, visto que os espectros registrados com  $\Delta\lambda$  de 10 nm, apresentam boa relação sinal/ruído na faixa de comprimentos de onda compreendida entre 510 nm a 625 nm. Outro fato que apoia esta afirmação, é a observação da presença da banda relacionada à PC em espectros medidos em diferentes dias, como pode ser observado nos espectros apresentados ao longo da discussão dos resultados. Caso toda a banda fosse um artefato, este comportamento não seria observado.

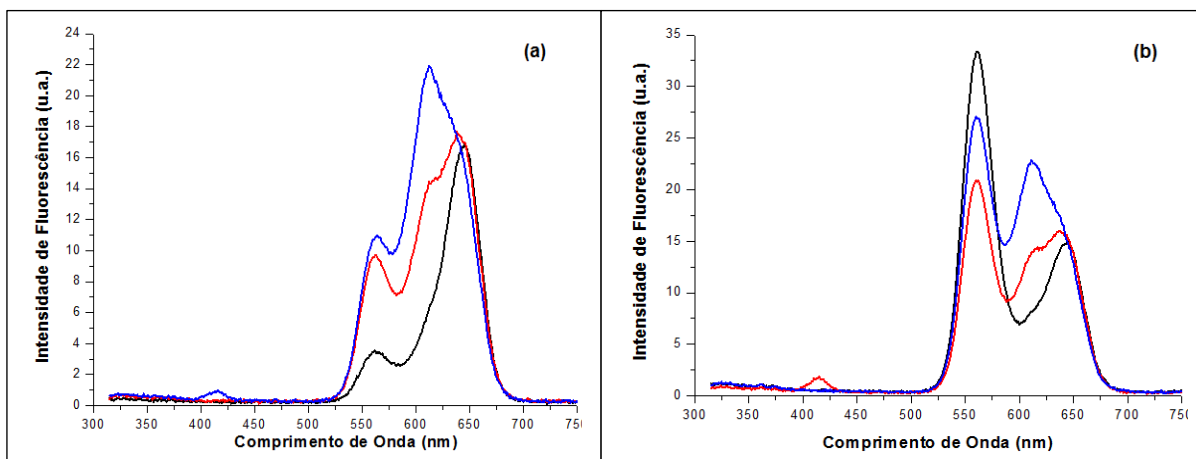
Quando  $\Delta\lambda$  é igual a 30 nm a banda de fluorescência de PC (região hachurada da figura) fica mais sobreposta à banda correspondente ao VN livre em solução, e a seletividade é comprometida. Quando a diferença entre  $\lambda_{exc}$  e  $\lambda_{em}$  é igual a 15 nm observa-se um estreitamento considerável da banda de TO e uma redução significativa na intensidade de fluorescência da banda de VN em relação aos espectros obtidos com diferença de 30 nm entre os monocromadores. Este comportamento confere, portanto, maior resolução espectral e, conseqüentemente, maior seletividade a técnica quando o  $\Delta\lambda$  é igual a 15 nm.

#### 4.4 REPRODUTIBILIDADE ESPECTRAL

A partir das condições estabelecidas anteriormente para o preparo de soluções em isopropanol e água destilada, foi realizado um estudo para avaliar o comportamento dos sinais de fluorescência relacionados a TO quando a concentração de PC em solução varia. Assim, foram medidos os espectros sincrônicos das soluções apresentadas na tabela 2 (seção

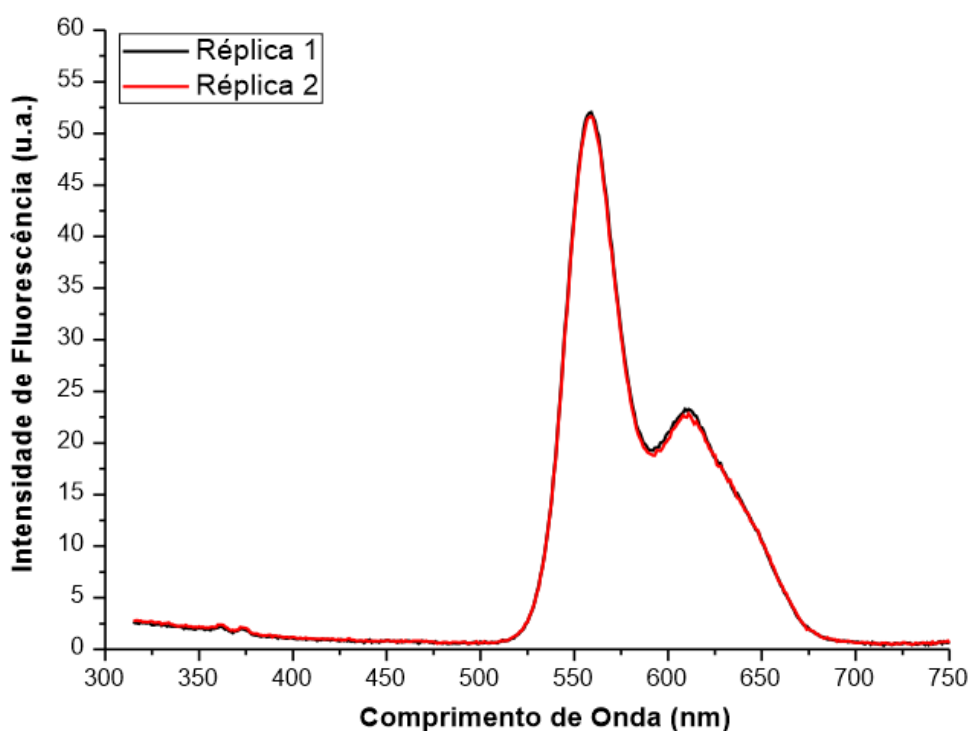
3.2.4). O procedimento envolvido na realização destes experimentos está apresentado na metodologia.

A **Figura 22** ilustra os espectros correspondentes aos seis experimentos considerados para esta análise. O  $\Delta\lambda$  usado na leitura desses espectros foi de 15 nm. Ao comparar os espectros da **Figura 22 (a)** com os da **Figura 22 (b)**, nota-se que as intensidades dos sinais associados a TO não variam de maneira uniforme quando a concentração de PC varia, ou seja, em (a) observa-se que o sinal relativo a TO, na concentração de 5,00  $\mu\text{g/mL}$ , aumenta com o aumento da intensidade associada a PC (quando sua concentração aumenta), porém em (b), quando TO está a 20,00  $\mu\text{g/mL}$ , este comportamento não é identificado, uma vez que quando a banda relativa à PC exibe menor fluorescência a banda associada a TO exibe a maior intensidade. Esse comportamento, que está relacionado à instabilidade das micelas de TO, torna inviável a construção de um modelo de calibração para a determinação de trioleína.



**Figure 22:** Espectros de fluorescência sincrônica de seis experimentos utilizados na avaliação do comportamento espectral quando os padrões foram preparados apenas com isopropanol. Em (a) estão os espectros quando a concentração de TO é igual a 5,00  $\mu\text{g/mL}$ ; em (b) estão espectros quando a concentração de TO é igual a 20,00  $\mu\text{g/mL}$ . As curvas em preto (—), vermelho (—) e azul (—) correspondem aos experimentos em que a concentração de PC é igual a 5,00, 12,50 e 20,00  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

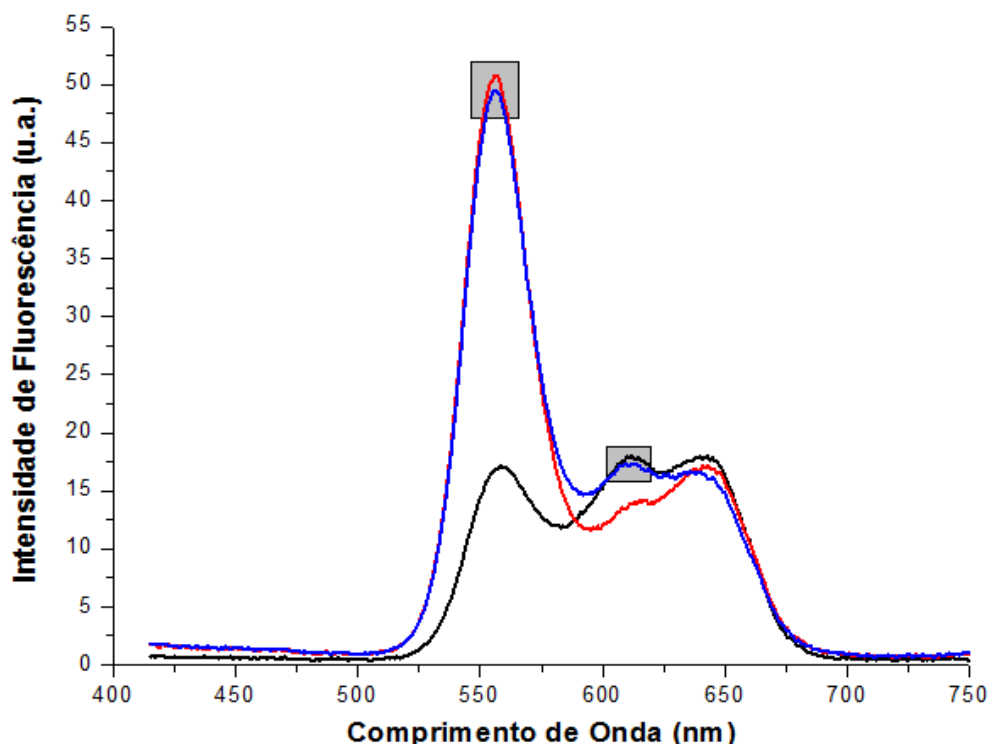
Com o objetivo de aumentar a estabilidade das micelas do representante comercial dos lipídios neutros, avaliou-se a possibilidade de utilização de um segundo solvente orgânico no preparo das soluções. O solvente a ser escolhido deveria ser suficientemente apolar para dissolver a trioleína e suficientemente polar para aumentar a solubilidade deste lipídio em meio aquoso. Após pesquisa [64,65], a piridina foi apontada como possível solvente a ser utilizado em conjunto com o isopropanol para a realização dos experimentos. Assim, um padrão comercial de trioleína já dissolvido em piridina na concentração de 5000  $\mu\text{g/mL}$  foi adquirido da Sigma-Aldrich. A partir deste estoque de TO e de um estoque de PC a 6000  $\mu\text{g/mL}$  em isopropanol, foram preparadas duas replicatas de uma mistura de TO e PC nas concentrações de 20,00 e 20,00  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Os espectros foram medidos com  $\Delta\lambda$  de 15 nm e estão apresentados na **Figura 23**.



**Figure 23:** Espectros sincrônicos de duas replicatas do experimento 6 da tabela 2 (seção 3.2.4), para a avaliação da estabilização das micelas de TO devido à adição de piridina.

Ao verificar a elevada sensibilidade da banda de TO (557 nm) e a grande semelhança entre os espectros da duplicata após a adição de piridina, foi decidido que todas as soluções seriam preparadas a partir de um estoque de trioleína em piridina e que o volume final desse solvente, por experimento, seria igual a 100  $\mu\text{L}$ .

Com o propósito de reduzir o gasto de reagentes optou-se por trabalhar com balões volumétricos de 10 mL para o preparo dos padrões a serem usados na construção dos modelos de calibração. A fim de investigar a reprodutibilidade espectral e avaliar, conjuntamente, a possibilidade de reduzir o volume final de isopropanol em cada solução, três misturas foram preparadas usando apenas 250  $\mu\text{L}$  deste solvente. Estas misturas correspondem aos experimentos 04, 05 e 07 do conjunto de calibração associado à matriz de planejamento apresentada na tabela 3 (seção 3.3). O procedimento de preparo destes padrões está descrito na metodologia. Na **Figura 24** são apresentados os espectros sincrônicos dos três ensaios, medidos na faixa de 400 a 750 nm com  $\Delta\lambda$  de 15 nm.



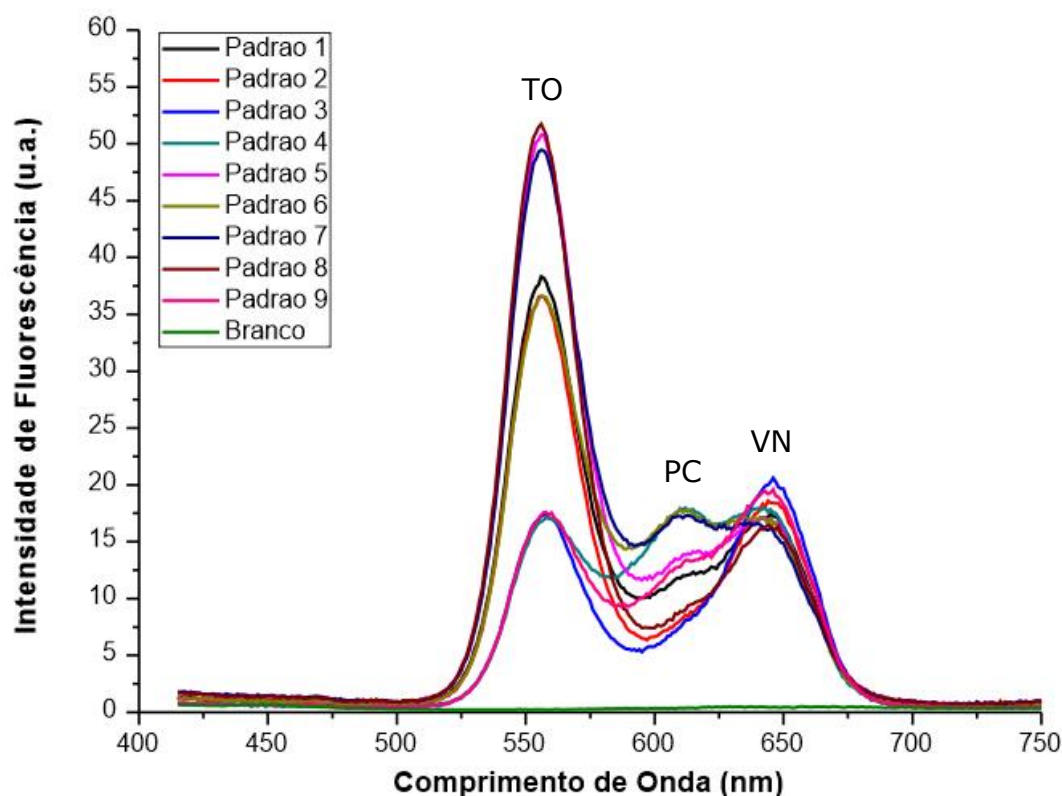
**Figure 24:** Espectros sincrônicos dos experimentos 04 (—), 05 (—) e 07 (—) da tabela 3 (seção 3.3), empregados na avaliação da reprodutibilidade espectral após a redução do volume de isopropanol para 250  $\mu\text{L}$ .

Ao observar a **Figura 24** nota-se que tanto o nível de concentração de TO como o nível de concentração de PC é bem reproduzido nos espectros (regiões hachuradas) quando se utiliza 250  $\mu\text{L}$  de isopropanol e 100  $\mu\text{L}$  de piridina. Isso indica que a redução do volume de isopropanol não afeta a estabilidade das micelas dos lipídios.

#### 4.5 MODELOS DE CALIBRAÇÃO

Uma vez definidas as condições ideais para o preparo dos padrões, foram realizados os experimentos para a construção do conjunto de calibração relacionado às misturas da matriz de planejamento da tabela 3 (ver seção 3.3). Entretanto, como três dos nove ensaios deste conjunto foram empregados no teste para o estabelecimento do protocolo em volume final de 10 mL, restaram, portanto, apenas seis experimentos para a aquisição das nove misturas do banco de dados ( $X_{\text{cal}}$ ) a ser usado

na construção dos modelos multivariados. O preparo destas soluções e o registro dos seus espectros de fluorescência sincrônica foi realizado nas condições descritas pelo procedimento apresentado na metodologia. Um branco, contendo apenas os solventes presentes nos padrões, foi feito adicionando 100  $\mu\text{L}$  de piridina e 250  $\mu\text{L}$  de isopropanol em um balão volumétrico de 10 mL, cujo volume final foi completado com água destilada. Na **Figura 25** estão representados os espectros sincrônicos das nove misturas de calibração e do branco, registrados na faixa de 400 a 750 nm com  $\Delta\lambda$  de 15 nm, utilizando fendas de excitação/emissão de 5 nm.



**Figure 25:** Espectros dos padrões e do branco utilizados na construção dos modelos de calibração multivariada.

Observa-se, na **Figura 25**, que a banda de TO, com máximo em 557 nm, possui intensidade de fluorescência consideravelmente maior que a da banda de PC, com máximo em 612 nm. Segundo Alonzo e Mayzaud [3] esse comportamento pode estar relacionado ao fato de as moléculas

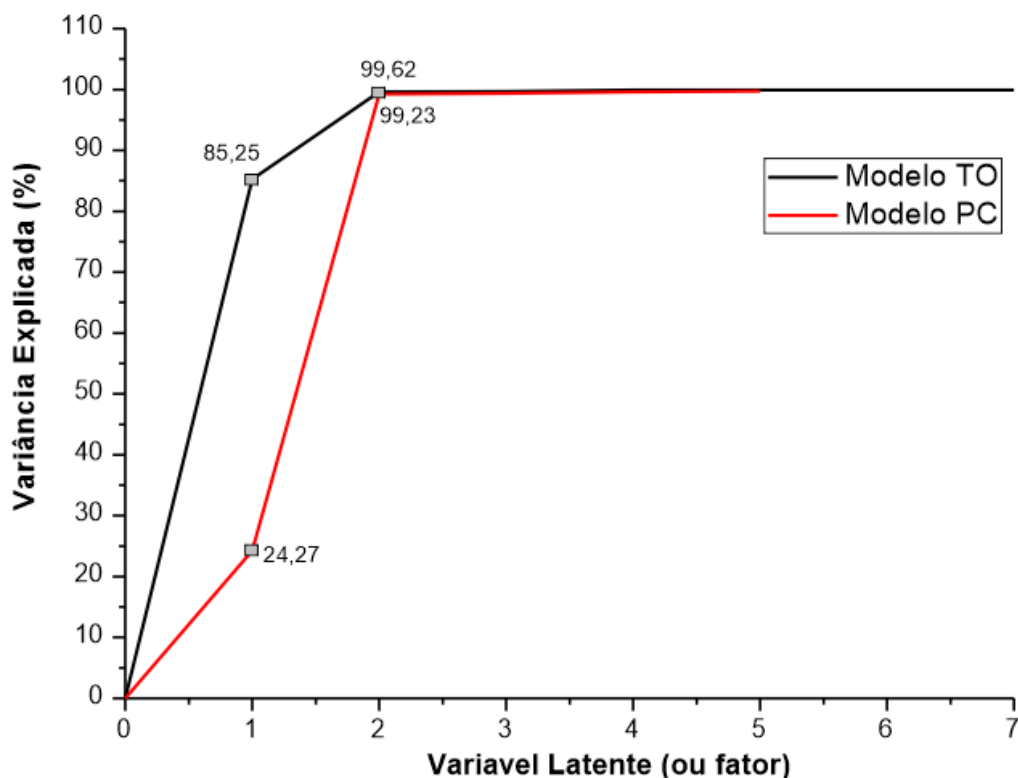


de trioleína possuírem três sítios de ligação com VN (as três cadeias de ácidos graxos) e as moléculas de fosfatidilcolina possuírem apenas dois, de modo que a concentração do corante é maior nas micelas de TO do que nas micelas de PC. Nota-se, também, uma sobreposição significativa entre as bandas fluorescência dos dois lipídios. A banda mais a direita na figura, com máximo em 646 nm, corresponde ao sinal de fluorescência das moléculas do corante vermelho do nilo que se encontram livres em solução, e, como pode ser observado, se apresenta como um interferente em relação ao sinal de PC. Devido à ocorrência de interferência entre as respostas de fluorescência dos três compostos presentes no sistema estudado, é inviável a construção de modelos univariados para a quantificação espectrofluorimétrica dos lipídios. Em casos assim, recomenda-se a utilização de métodos multivariados para a construção de modelos de calibração, uma vez que ao permitir o uso de todas as variáveis espectrais na modelagem, possibilita que a informação relacionada à interferência seja levada em consideração de maneira mais satisfatória.

Os modelos de calibração multivariada PLS a serem empregados na predição das concentrações das classes de lipídios neutros e polares em amostras de zooplâncton, foram construídos utilizando o algoritmo PLS1 já implementado na interface do programa Unscrambler. A fim de desconsiderar as regiões não informativas dos espectros, decidiu-se selecionar a faixa de 504 a 684 nm como faixa de trabalho para a construção dos modelos. Além deste, os outros pré-tratamento realizados foram a subtração do sinal do branco (apenas solventes) e a centralização dos dados na média.

Para a escolha do número ideal de variáveis latentes (VL) a serem consideradas nos modelos, optou-se pelo emprego do procedimento de validação cruzada. Como pode ser visto na **Figura 26** dois fatores são suficientes para explicar quase 100% da informação relevante contida em  $X_{cal}$ . Observa-se, também, que a primeira variável latente descreve a maior parcela de informação correspondente a TO, uma vez que na

construção do modelo de TO 85,25 % da variância espectral é explicada por essa variável. Por outro lado, quando o modelo de PC é construído 74,96 % da informação de  $X_{cal}$  é explicada pela segunda variável latente, indicando que VL2 é responsável por descrever a variação de PC no espaço modelado.

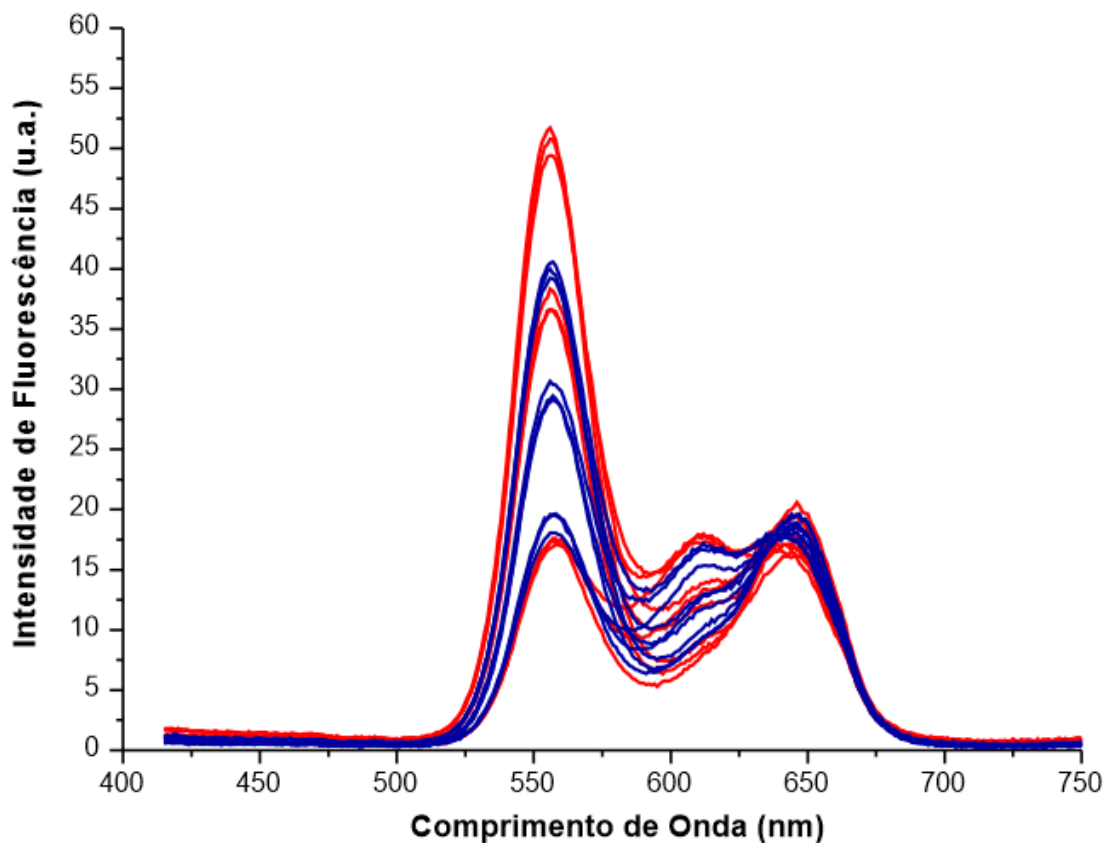


**Figure 26:** Gráficos da variância explicada pelas variáveis latentes usadas na construção dos modelos de calibração, em relação ao conjunto X, após validação cruzada.

#### 4.6 VALIDAÇÃO DOS MODELOS

Para a avaliação da capacidade preditiva dos modelos construídos, utilizou-se um conjunto de nove amostras sintéticas (ver tabela 4) que não participou da etapa de modelagem. Na **Figura 27** os espectros das misturas de validação, em azul, estão representados juntamente com os espectros das misturas de calibração, em vermelho. Os parâmetros de

desempenho utilizados no diagnóstico do procedimento de validação estão resumidos na **tabela 6**.



**Figure 27:** Espectros dos conjuntos de calibração (—) e validação (—).

**Tabela 6:** Parâmetros de desempenho obtidos para a validação dos modelos PLS.

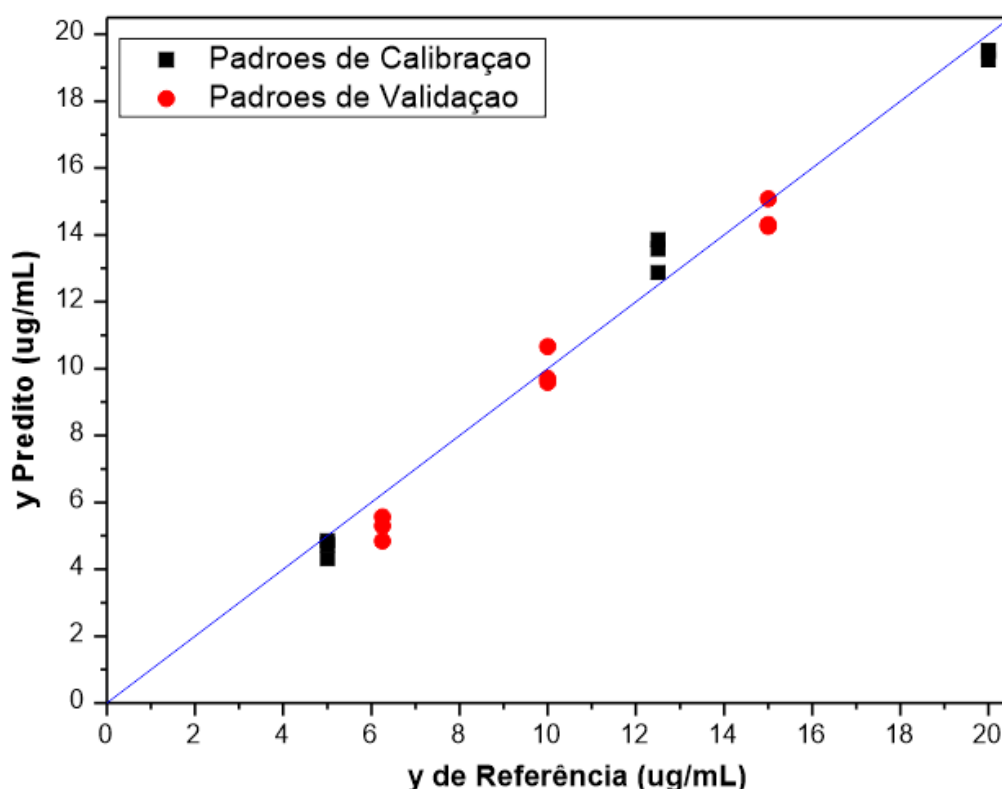
| PLS                 |          |       |                |         |
|---------------------|----------|-------|----------------|---------|
| Analitos/Parâmetros | RMSEP    | Bias  | R <sup>2</sup> | RSD (%) |
| TO                  | 0,75 (1) | -0,48 | 0,96           | 6,80    |
| PC                  | 1,23 (2) | 1,01  | 0,91           | 2,52    |

\*Os valores entre parênteses correspondem ao número de fatores empregados na construção dos modelos PLS.

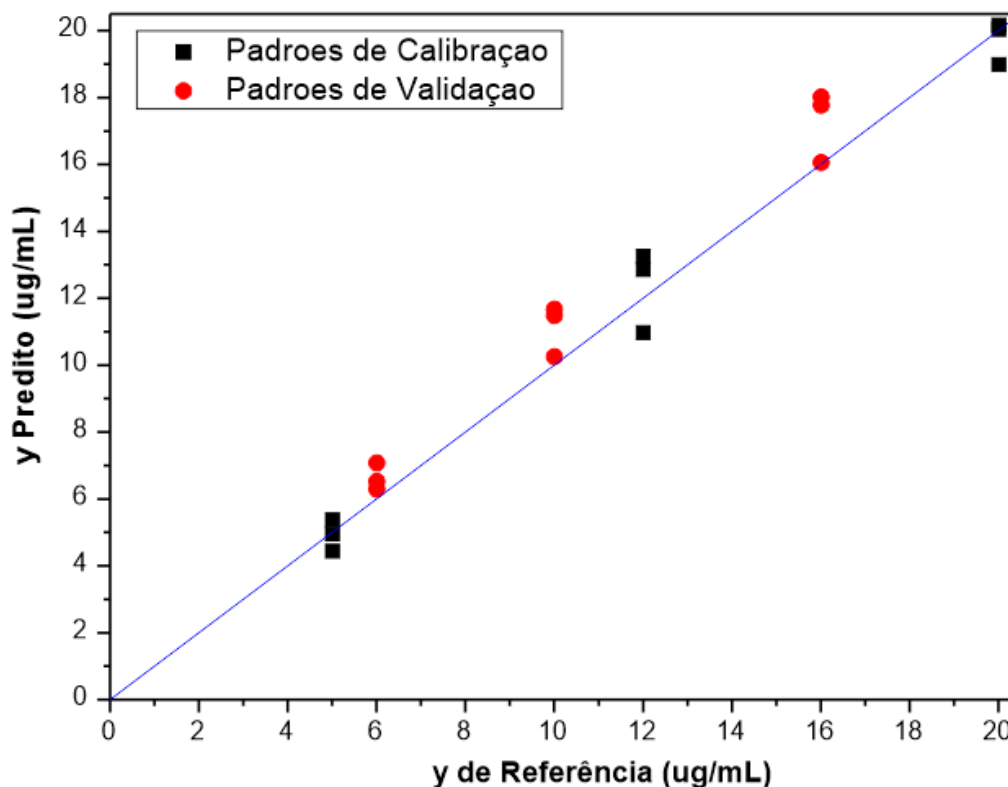
Ao observar a tabela 6, nota-se que os modelos construídos apresentam boa capacidade de previsão, visto que os valores de RMSEP e Bias, relacionados à etapa de validação, refletem uma boa exatidão para

ambos os modelos. Assim, as concentrações estimadas estão em boa concordância com as concentrações reais das misturas de validação. Para avaliar a precisão do método de quantificação proposto, foi realizada uma triplicata da mistura correspondente ao experimento 3 de  $X_{val}$ . A precisão foi estimada pelo cálculo do desvio padrão relativo (equação 13), e os valores obtidos (tabela 6) demonstram haver uma significativa concordância entre os valores de concentração estimados para uma mesma amostra.

Outra maneira de avaliar a qualidade de um modelo de calibração multivariada é através do gráfico das concentrações previstas versus as concentrações de referência. Nas **Figuras 28 e 29**, têm-se a representação destes gráficos em relação aos modelos de calibração desenvolvidos neste trabalho.



**Figure 28:** Gráfico das concentrações previstas versus as concentrações de referência para o modelo de TO.

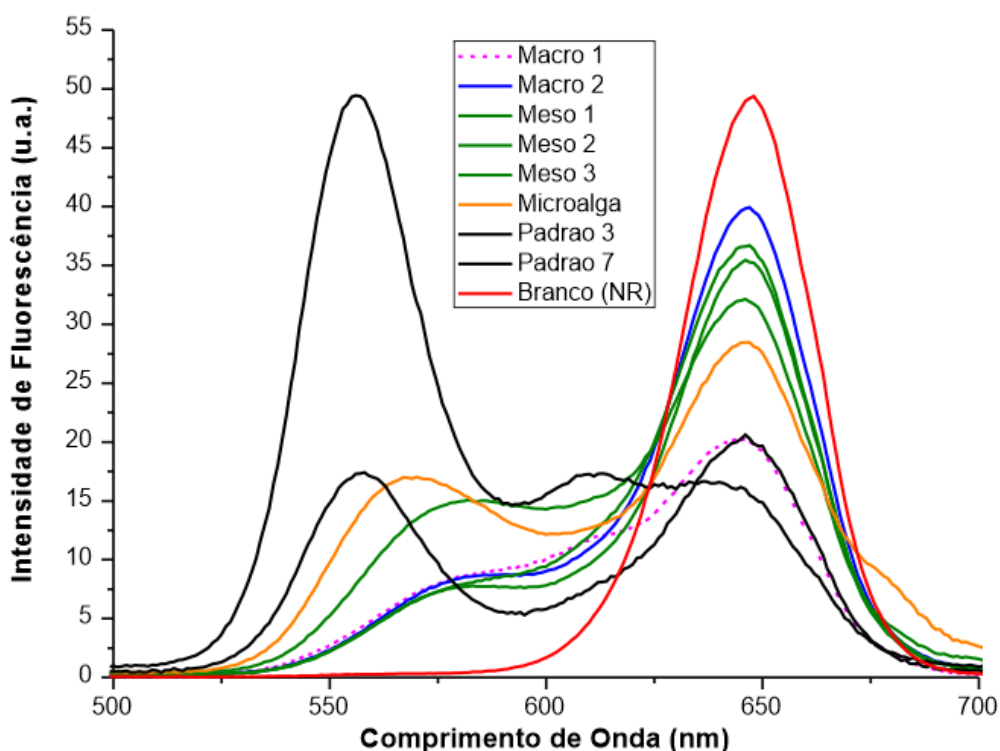


**Figure 29:** Gráfico das concentrações preditas versus as concentrações de referência para o modelo de PC.

Pela visualização da distribuição dos pontos na **Figura 28** vê-se que as concentrações previstas estão em boa concordância com as concentrações de referência. Já em relação ao gráfico da **Figura 29**, nota-se que as concentrações dos padrões de validação variam em maior magnitude em relação às concentrações reais. Entretanto, ao considerar que os métodos de referência usados na quantificação de lipídios são gravimétricos, e que estes estão sujeitos a maiores erros de predição, pode-se dizer que os modelos de calibração propostos são aceitáveis. A reta em azul é uma bissetriz e representa a concordância ideal entre as concentrações.

#### 4.7 ANÁLISE DE AMOSTRAS

Uma vez construído, um modelo de calibração deve ser aplicado na quantificação do analito de interesse em amostras reais, de modo a confirmar a sua funcionalidade. Neste sentido, cinco amostras de zooplâncton e uma amostra de microalga (cultivada em ambiente sem nitrogênio) foram avaliadas para a aplicação dos modelos de calibração desenvolvidos neste trabalho. O extrato de lipídios totais de cada uma das amostras foi previamente obtido de acordo com o procedimento de extração descrito na metodologia. A partir destes extratos foram preparadas as soluções lipídicas para análise espectrofluorimétrica, sendo empregadas as mesmas condições de preparo e análise utilizadas para os padrões de calibração e validação. Os espectros de fluorescência sincrônica correspondentes aos lipídios das amostras reais estudadas são apresentados na **Figura 30**.

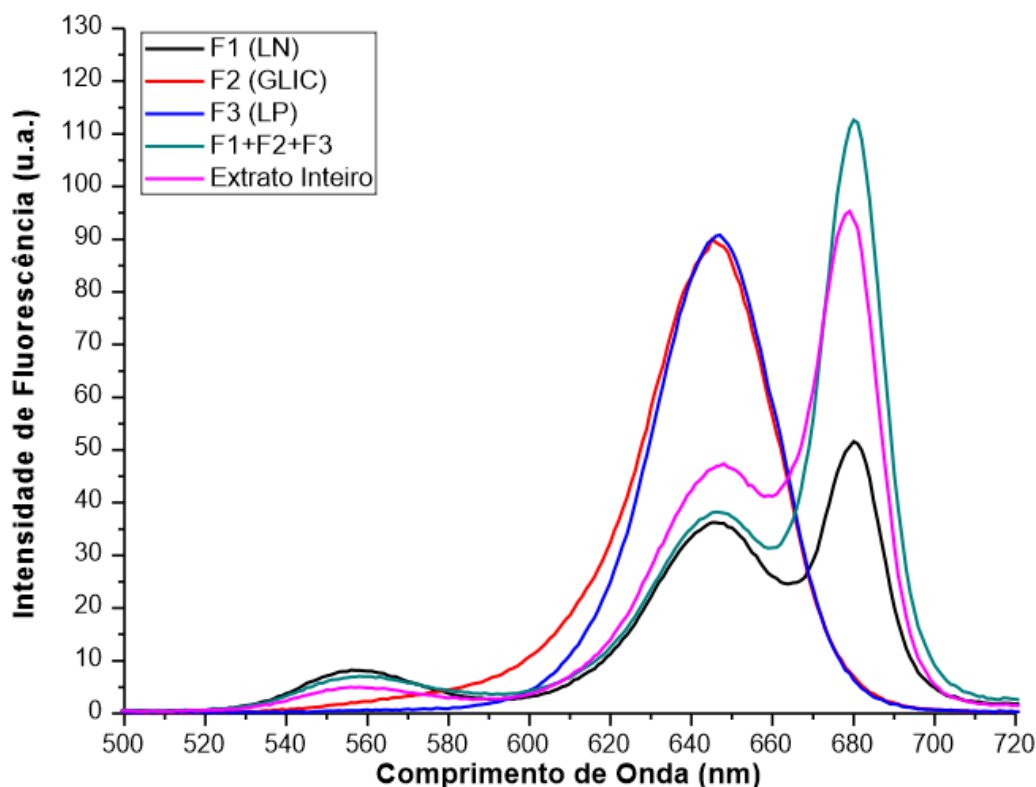


**Figure 30:** Espectros sincrônicos das seis amostras reais analisadas em conjunto com os espectros das misturas 3 e 7 do conjunto  $X_{cal}$  e o espectro de uma solução contendo apenas VN em piridina, isopropanol e água.

Ao observar a **Figura 30**, nota-se que nos espectros das amostras existe uma variação da banda de fluorescência mais a esquerda em direção à banda de TO dos padrões de calibração (padrões 3 e 7). Esse comportamento leva a crer que o sinal em questão corresponde aos lipídios neutros presentes nas amostras, visto que a presença destes compostos é esperada, já que são responsáveis pela matriz de reserva energética necessária para a manutenção da vida dos organismos planctônicos. Outro motivo que reforça essa idéia é o fato de que as soluções são preparadas a partir do extrato de lipídios totais, de modo que este sinal deve corresponder a uma das duas frações possíveis de lipídios (lipídios neutros, glicolipídios), já que apesar de ser pouco visível a banda de fluorescência correspondente aos lipídios polares (máximo em 612 nm) está presente. Ao atentar para a amostra macro 1 (curva em magenta), percebe-se a presença de um ombro com certa definição na região de fluorescência de PC. A baixa resolução espectral da banda dos lipídios polares nas amostras deve-se a sua forte sobreposição com o sinal de VN (máximo em 646 nm) e o sinal tido, a princípio, como pertencente aos lipídios neutros.

A possibilidade de corrimento espectral da banda dos lipídios neutros em relação à banda de seu representante nos padrões de calibração (TO), neste caso, não pode ser levada em consideração, uma vez que ao ter sido empregado o mesmo procedimento para o preparo das misturas de  $X_{cal}$  e das amostras reais, a hipótese de ocorrência de um efeito solvatocrômico deve ser descartada.

Para confirmar se a banda duvidosa, localizada mais a esquerda nos espectros das amostras, está relacionada à presença de lipídios neutros, foi realizado um teste de fracionamento dos lipídios totais de uma amostra de microalga da espécie *Scenedesmus sp.* de acordo com o procedimento descrito na metodologia. Nesta análise foram registrados os espectros sincrônicos correspondentes ao extrato de lipídios totais, às frações individuais (LN, LP, GL) e a soma destas frações (**Figura 31**).



**Figure 31:** Espectros de fluorescência sincrônica do teste de fracionamento dos lipídios totais.

A partir dos espectros apresentados na **Figura 31** observa-se que a banda dos lipídios neutros, da amostra estudada, está na mesma região de fluorescência da banda de TO. Ao avaliar os espectros das frações individuais e compará-los com o espectro correspondente a reconstituição da mistura de lipídios totais (F1+F2+F3), fica claro que a presença das outras classes de lipídios não afeta o espectro de LN. Assim, podemos confirmar que a banda duvidosa nos espectros das amostras reais, corresponde à presença de lipídios neutros. A variação na faixa de comprimentos de onda associada a esta banda, provavelmente está relacionada à presença de diferentes lipídios neutros, que possuem graus de hidrofobicidade significativamente diferentes do grau de hidrofobicidade apresentado pelas moléculas de trioleína. A variação no grau de hidrofobicidade faz com que esses lipídios, ao serem marcados com o corante VN, fluoresçam em máximos diferentes.



# **Capítulo 5**

---

## **Considerações Finais**

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

### **5.1 CONCLUSÃO**

Neste trabalho foi proposto o desenvolvimento de uma metodologia para a determinação espectrofluorimétrica simultânea das classes de lipídios neutros e polares em amostras de zooplâncton. A motivação partiu da possibilidade de simplificação de métodos já conhecidos na literatura, devido ao uso de padrões comerciais de lipídios para a aquisição dos modelos de calibração PLS.

O protocolo desenvolvido para o preparo dos padrões de calibração permitiu a obtenção de espectros comportados em relação à variação das concentrações dos padrões de TO e PC. As etapas do protocolo adotado foram simples, rápidas e de baixo custo.

Quando avaliados com um conjunto de amostras de padrões comerciais, os modelos PLS apresentaram resultados de desempenho aceitáveis em relação aos métodos de referência (gravimétricos) empregados na quantificação de lipídios.

A partir do estudo de amostras correspondentes a classes de zooplâncton, foi identificada uma variação espectral na banda de fluorescência relaciona aos lipídios neutros, de modo que a aplicação do método proposto não funcionou para as amostras coletadas.

Entretanto, ao analisar uma amostra de microalga, observou-se que a trioleína pode ser usada como representante da classe de lipídios neutros de organismos planctônicos, uma vez que em determinadas espécies a banda associada aos lipídios neutros apresenta máximo correspondente ao máximo associado a este padrão comercial. Dessa forma, a avaliação de espécies de zooplâncton pode viabilizar a utilização do método proposto.

## 5.2 PROPOSTAS FUTURAS

Tendo em vista a potencialidade das vantagens em utilizar padrões comerciais para a quantificação das frações lipídicas de amostras de zooplâncton, podem-se destacar as seguintes propostas para a melhoria e aplicação do método avaliado neste trabalho:

- Realizar um estudo para identificar quais espécies de zooplâncton apresentam lipídios neutros que possam ser representados pela trioleína em uma análise espectrofluorimétrica;
- Avaliar a possibilidade de utilização de outros padrões comerciais como representantes da classe de lipídios neutros;
- Avaliar o uso de outros métodos de calibração multivariada, como os de seleção de variáveis (SPA, GA, Stepwise, etc.) e os de ordem superior (PARAFAC, MCR, etc.), a fim de melhorar o desempenho do método proposto.
- Aplicar o método desenvolvido no estudo de regiões da costa paraibana e brasileira.

## REFERÊNCIAS

- [1] LOURENÇO, S. O., JÚNIOR, A. N. M. Produção primária marinha. In: PEREIRA, R. C., SOARES-GOMES, A. (Org.). *Biologia Marinha*. 2º ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2009. p. 111-154.
- [2] SOARES-GOMES, A., FIGUEIREDO, A. G. O ambiente marinho. In: PEREIRA, R. C., SOARES-GOMES, A. (Org.). *Biologia Marinha*. 2º ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2009. p. 1-34.
- [3] ALONZO, F., MAYZAUD, P. Spectrofluorimetric quantification of neutro and polar lipids in zooplankton using Nile red. *Marine Chemistry*, 67 (1999) 289-301.
- [4] LEE, S. J., et al. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnology Techniques*, 12 (1998) 553-556.
- [5] JARA, A., et al. Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Cryptothecodinium cohnii*. *J. Appl. Phycol.* 15 (2003) 433-438.
- [6] SOPER, S. A., et al. Molecular fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence spectrometry. *Anal. Chem.* 66 (1994) 428R-444R.
- [7] MURATA, Y., et al. Autofluorescence in indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. *J. Gastroenterology*, 35 (2000) 510-517.
- [8] ARANCIBIA, J. A., ESCANDAR, G. M. Two different strategies for the fluorimetric determination of piroxicam in serum. *Talanta*, 60 (2003) 1113-1121.

- [9] SKOOG, D. A., et al. *Fundamentos de química analítica*. 8º ed. São Paulo: Cengage Learning, 2009.
- [10] SIERRA, M. M. S., et al. A utilização da espectroscopia de fluorescência no estudo da matéria orgânica dissolvida nas águas naturais: evolução e perspectivas. *Química Nova*, 19 (1996) 294-301.
- [11] FERREIRA, M. M. C., et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, 22 (1999) 724-731.
- [12] BARROS NETO, B., et al. *Como fazer experimentos*. 4º ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.
- [13] PIMENTEL, M. F., BARROS NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. *Química Nova*, 19 (1996) 268-277.
- [14] BONECKER, A. C. T., et al. Plâncton marinho. In: PEREIRA, R. C., SOARES-GOMES, A. (Org.). *Biologia Marinha*. 2º ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2009. p. 213-239.
- [15] RÍOS, S. D., et al. Lipid extraction methods from microalgal biomass harvested by two different paths: screening studies toward biodiesel production. *Bioresource Technology*, 133 (2013) 378-388.
- [16] LEE, R. F., et al. Lipid storage in marine zooplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 307 (2006) 273-306.
- [17] DUTTO, M. S., et al. Planktonic trophic interactions in a human-impacted estuary of Argentina: a fatty acid marker approach. *J. Plankton Res.* 0 (2014) 1– 12.
- [18] BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C. *Extração em Ponto Nuvem: Princípios e Aplicações em Química Analítica*. Vitória da Conquista: Edições Uesb, 2006.

- [19] MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, 24 (2001) 87-93.
- [20] ANDRADE-EIROA, A. Critical approach to synchronous spectrofluorimetry I. *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 885-901.
- [21] MENDHAM, J., et al. *Vogel: Análise Química Quantitativa*. 6º ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S. A. 2002.
- [22] GONÇALVES, P. *Síntese e caracterização de novas iminas fluorescentes e suas aplicações como sensores ópticos*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Florianópolis, 2008.
- [23] LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3º ed. Maryland: Springer, 2006.
- [24] **Fotoquímica**. Disponível em:  
<[http://www.nupeg.ufrn.br/downloads/fotoquimica/aula\\_4.pdf](http://www.nupeg.ufrn.br/downloads/fotoquimica/aula_4.pdf)>  
acesso em: 05/12/2014.
- [25] VALEUR, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. 1º ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.
- [26] SKOOG, D. A., LEARY, J. J. *Principles of Instrumental Analysis*. 4º ed. Fort Worth: Saunders College Publishing, 1992.
- [27] MARTELLI, C.; ATVARIS, T. D. Z. Espectroscopia Eletrônica de Emissão. *Chemkeys*, 2002.
- [28] INGLE, J.D., CROUCH, S. R. *Spectrochemical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 1988.

- [29] SCHULMAN, S. G. *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy: Physicochemical Principles and Practice*. Oxford: Pergamon Press, 1977.
- [30] LI, Y. Q., et al. Synchronous fluorescence spectroscopy and its applications in clinical analysis and food safety evaluation. *Reviews in Fluorescence*, 7 (2010) 95-117.
- [31] LLOYD, J. B. F. Synchronized excitation of fluorescence emission spectra. *Nature Physical Science*, 231 (1971) 64-65.
- [32] WANG, Y., et al. Synchronous Fluorescence as a Rapid Method for the Simultaneous Determination of Folic Acid and Riboflavin in Nutritional Beverages. *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 12629-12634.
- [33] FOWLER, S. D., GREENSPAN, P. Application of Nile Red, a Fluorescent Hydrophobic Probe, for the Detection of Neutral Lipid Deposits in Tissues Sections: Comparison with Oil Red O. *J. Histochem. Cytochem.* 33 (1985) 833-836.
- [34] DIAZ, G., et al. Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio. *Micron*, 39 (2008) 819-824.
- [35] ELSEY, D., et al. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *J. Microbiol. Methods*, 68 (2007) 639-642.
- [36] GOVENDER, T., et al. BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. *Bioresource Technology*, 114 (2012) 507-511.
- [37] BRUM, A. A. S., et al. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, 32 (2009) 849-854.

- [38] BLIGH, E. G., DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* 37 (1959) 911–917.
- [39] FOLCH, J., et al. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509.
- [40] COOKSEY, K. E., et al. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *J. Microbiol. Methods*, 6 (1987) 333–345.
- [41] IVERSON, S. J., et al. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, 36 (2001) 1283–1287.
- [42] GENICOT, G., et al. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology*, 63 (2005) 1181–1194.
- [43] KIMURA, K., et al. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *J. Microbiol. Methods*, 56 (2004) 331 – 338.
- [44] CHEN, W., et al. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *J. Microbiol. Methods*, 77 (2009) 41–47.
- [45] HUANG, G.H., et al. Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence. *Biomass and Bioenergy*, 33 (2009) 1386–1392.
- [46] BERTOZZINI, E., et al. Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red. *J. Microbiol. Methods*, 87 (2011) 17–23.



- [47] KOU, Z., et al. Fluorescent measurement of lipid content in the model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol.* 25 (2013) 1633-1641.
- [48] BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *The Analyst*, 125 (2000) 2125-2154.
- [49] CHARNE, R., et al. *Análise de Modelos de Regressão Linear com Aplicações*. Campinas: Editora Unicamp, 1999.
- [50] CHUI, Q. S. H. et al. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. *Química Nova*, 24 (2001) 374-380.
- [51] RIBANE, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27 (2004) 771-780.
- [52] FORINA, M., et al. Multivariate calibration. *Journal of Chromatography A*, 1158 (2007) 61-93.
- [53] MARTENS, H., NAES, T. *Multivariate calibration*. New York: Wiley, 1992.
- [54] BAUMANN, K. Croos-validation as the objective function for variable-selection techniques. *Trac-Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 395-406.
- [55] WOLD, S. et al. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* 58 (2001) 109-130.
- [56] WOLD, S. et al. Principal Component Analysis. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* 2 (1987) 37-52.
- [57] BEEBE, K. R., et al. *Chemometrics: A Pratical Guide*. 1º ed. John Wiley & Sons Inc.: New York, 1998.

- [58] LIRA, W. S., et al. Classificação periódica: um exemplo prático para ensinar análise de componentes principais. *Química Nova*, 33 (2010) 1594-1597.
- [59] SALDANHA, T. C. B., et al. Simultaneous multicomponent analysis by UV-Vis spectrophotometry. *Química Nova*, 22 (1999) 847-53.
- [60] GELADI, P., Kowalski, R. B. Partial least-squares regression: A tutorial. *Anal. Chim. Act.* 185 (1986) 1-17.
- [61] OTTO, M.; *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. 2<sup>o</sup> ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2007.
- [62] BEEBE, K. R., KOWALSKI, B. R. An introduction to multivariate calibration and analysis. *Anal. Chem.* 59 (1987) A1007-A1017.
- [63] BONGIOVANI, N., et al. In vivo measurements to estimate culture status and neutral lipid accumulation in *Nannochloropsis oculata* CCALA 978: implications for biodiesel oil studies. *Algological Studies*, 142 (2013) 3-16.
- [64] PEPINO, R. F. *Desenvolvimento de procedimentos metodológicos na prospecção de microalgas propícias para a produção de biodiesel*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- [65] RAMOS, M. R., et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, 100 (2009) 261-268.