

## 3 Metodologia

### 3.1 Fosforimetria

As moléculas no estado excitado têm um tempo de vida finito, sendo assim, um conjunto de moléculas que se encontra eletronicamente excitado tende a retornar ao estado eletrônico fundamental com a subsequente liberação da energia. A liberação de energia pode se dar na forma de calor ou por emissão de radiação eletromagnética. No caso de excitação por absorção de fóton seguido de emissão de radiação eletromagnética na região do ultravioleta-visível (UV-vis), o processo será chamado de fluorescência quando houver conservação do spin eletrônico (estado excitado singleto,  $S_n$ ), e de fosforescência quando o spin do elétron for alterado durante o tempo que a molécula permanece no estado excitado (estado excitado tripleto,  $T_n$ ).

Tanto a intensidade de emissão quanto o tempo de vida de uma molécula eletronicamente excitada são afetados por uma série de fatores, tais como taxa de decaimento radiativo, taxa de decaimento não-radiativo, desativações colisionais, interações com o meio entre outros. Assim, dos vários fenômenos que se seguem à exposição de uma molécula orgânica insaturada à radiação eletromagnética, são de especial interesse neste trabalho, os fenômenos fotoluminescentes e, mais especificamente, a fosforescência (SCHULMAN,1977).

Na ausência de energia de excitação, as moléculas se encontram em um estado de equilíbrio populando os mais baixos níveis de energia vibracional e rotacional do estado singleto fundamental  $S_0$ . Ao absorver energia, a molécula pode passar a popular um nível vibracional e rotacional de algum estado eletrônico singleto excitado de mais alta energia,  $S_n$ . O excesso de energia vibracional adquirido neste processo é perdido por choques com outras moléculas que a circundam. Este processo não-radiativo de desativação da molécula é conhecido como relaxamento vibracional (RV) e ocorre quase que

imediatamente ( $10^{-13}$  a  $10^{-11}$  s) após a incidência da radiação de excitação (SCHULMAN, 1977; VO-DIHN, 1994).

Ao atingir o mais baixo nível vibracional do estado eletrônico excitado ocorre um fenômeno conhecido como conversão interna (CI). Neste processo, a molécula perde energia até atingir o nível vibracional de maior energia de um estado eletrônico de mesma multiplicidade e de energia mais baixa do que o estado anterior. Sucessivas combinações de RV e de CI podem levar a molécula ao estado eletrônico singlete excitado de mais baixa energia,  $S_1$ .

O estado fundamental  $S_0$  pode ser atingido a partir do estado  $S_1$  por CI, não havendo, neste caso, emissão de radiação. Entretanto, se a diferença de energia entre  $S_1$  e  $S_0$  for muito grande, a probabilidade de que a CI ocorra é muito pequena. Neste caso, segundo a regra de Kasha, a desativação se dá pela emissão de radiação ultravioleta (UV) ou visível, sendo isso definido pela diferença de energia entre os estados  $S_1$  e  $S_0$ . Tal processo de desativação radiativa do estado  $S_1$  é conhecido por fluorescência molecular e ocorre em um tempo de  $10^{-7}$  a  $10^{-10}$  s após a incidência da radiação de excitação (YEN BOWER, 1978; SCHULMAN, 1977).

Ainda no estado excitado  $S_1$ , pode ocorrer um fenômeno conhecido por conversão intersistema (CIS), que resulta da superposição das energias do mais baixo nível vibracional do estado  $S_1$  com os níveis vibracionais mais altos de algum estado tripleto excitado,  $T_n$ . Este tipo de transição, entre níveis eletrônicos de multiplicidades diferentes, envolve a inversão de spin eletrônico e é proibida segundo as regras quânticas de seleção. Isto implica em baixa probabilidade de ocorrer e longa duração ( $10^{-8}$  s). No entanto, em condições especiais, o CIS pode vir a ser eficiente. Uma vez no estado  $T_n$ , a molécula alcança o nível de menor energia vibracional do mais baixo estado eletrônico tripleto excitado,  $T_1$ , por meio de sucessivos RV e CI. Neste estado, a molécula pode ser desativada por meio de sucessivas CI ou pode passar diretamente do estado  $T_1$  para o estado  $S_0$ , emitindo radiação. Tal processo de emissão caracteriza o fenômeno da fosforescência (P), o qual difere da fluorescência pelo tempo de vida mais longo ( $10^{-3}$  a 10 s) e pela posição do pico de emissão máxima, localizado em regiões de maior comprimento de onda (menor energia).

A luminescência é intrínseca em muitas moléculas, principalmente moléculas orgânicas com sistema conjugado de elétrons  $\pi$ , sistema este característico de vários componentes do petróleo e de seus derivados. Uma molécula será significativamente luminescente se sua eficiência quântica fluorescente ( $\phi_F$ ) ou fosforescente ( $\phi_P$ ) tiver magnitude considerável. As  $\phi_F$  e  $\phi_P$

são definidas pela razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência ou fosforescência e o número de fótons absorvidos pela molécula. Assim moléculas com  $\phi_F$  ou  $\phi_P$  entre 0,1 e 1,0 têm luminescência suficientemente intensa para uso analítico. A magnitude de  $\phi_F$  e  $\phi_P$  depende tanto da estrutura da molécula quanto do meio onde ela se encontra. Estruturas moleculares rígidas (com restrições de liberdade vibracional) ou moléculas enrijecidas com o uso de algum artifício experimental têm os processos de desativação não-radiativa significativamente minimizado, com conseqüente aumento de  $\phi_F$ , e mais proeminentemente, do  $\phi_P$  (pois, por ser a fosforescência um fenômeno com tempo de vida mais longo, perde em competitividade para os processos não-radiativos de tempo de vida mais curto). Assim, enrijecimento em substratos sólidos, meio criogênico ou meio organizado (meio micelar, por exemplo) têm sido de grande utilidade para a indução ou aumento da magnitude da luminescência. Em particular, os substratos sólidos vêm adquirindo importância pela praticidade, pelo baixo custo, pela facilidade de operação e por permitir a observação desse fenômeno na temperatura ambiente. As interações do analito com o substrato sólido (papel de celulose, sílica gel, etc) são bastante distintas das observadas em solução, podendo oferecer grande proteção do estado excitado e induzir sinal luminescente de moléculas que, em outras condições, não emitiriam sinal.

A luminescência pode também ser induzida em moléculas naturalmente não-luminescentes através de reações com agentes oxidantes e redutores (DE BARROS ALCANFÔR, 1994), derivação química com agentes fluorogênicos ou fosfogênicos (LI, 1994), formação de quelatos com íons de terras raras (transferência de energia obtendo fluorescência amplificada característica do íon) (SOINI, 1987; PERRY, 1990) e após reações ácido-base ou tratamento fotoquímico com UV (HURTUBISE, 1990). Parâmetros, tais como pH e sistema de solventes, podem ser críticos na maximização da razão sinal do analito-sinal de fundo (S/N). No caso específico da fosforescência, o uso de íons de átomos pesados ( $Pb^{+2}$ ,  $Tl^+$ ,  $I^-$ ,  $Hg_2^{+2}$ , etc) pode induzir, alterar ou aumentar o sinal fosforescente em algumas ordens de magnitude (VO-DINH, 1976).

A Fosforimetria a Baixa Temperatura consiste basicamente na medição do sinal fosforescente de soluções mantidas a 77K. Utiliza-se para tal finalidade  $N_2$  líquido. A rigidez do cristal formado minimiza a mobilidade das moléculas do analito e, por conseguinte, a desativação colisional (YEN-BOWER, 1978). Na maioria dos casos, o intenso sinal fosforescente permite a detecção de

concentrações da ordem de  $10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> de analito. Como consequência destes baixos limites de detecção, as curvas analíticas podem apresentar intervalos lineares com 4 a 6 ordens de magnitude. Por outro lado, o estreitamento das bandas fosforescentes observadas a 77K permite razoável resolução espectral e considerável seletividade.

Infelizmente, a fosforimetria a 77K apresenta sérias desvantagens do ponto de vista experimental (YEN-BOWER, 1978). Além do custo envolvido e do grande tempo despendido, a precisão das análises depende, em parte, da homogeneidade e transparência do cristal formado pela solução do analito. Cristais rachados ou opacos aumentam o espalhamento da radiação de excitação e de emissão, deteriorando, conseqüentemente, a precisão das medições.

Uma alternativa às análises a 77K é a fosforimetria a temperatura ambiente em superfície sólida (SSRTP). Em comparação com as medições a 77K, o procedimento experimental na temperatura ambiente se mostra extremamente simples e de baixo custo. Dependendo do analito, da superfície sólida e das condições experimentais, limites de detecção absolutos da ordem de picogramas podem ser alcançados. No papel, o analito é imobilizado por dois mecanismos. Primeiro, pela interação (ligações de hidrogênio) entre os grupos hidroxila da celulose com os elétrons  $\pi$  ou outros grupos eletronegativos da molécula do analito. A segunda interação importante é o encapsulamento físico das moléculas do analito nos poros do substrato de papel. Esses dois mecanismos dão a rigidez necessária para permitir o aumento da eficiência quântica fosforescente de analitos de várias classes químicas. As duas principais desvantagens do substrato de papel são o seu relativo alto sinal de fundo e a necessidade do uso de fluxo de gás inerte direcionada para amostra, cujo objetivo é a eliminação do oxigênio do ambiente.

Outra maneira de se observar fosforescência a temperatura ambiente é através da proteção da molécula do analito no interior de uma micela produzida pela presença de um surfactante em solução. A fosforimetria a temperatura ambiente em solução micelar (MRTP) é melhor observada com a utilização do efeito externo do átomo pesado (HAE), sendo necessária a retirada do oxigênio da solução de interesse, já que este último contribui para a desativação do fenômeno.

O aumento da eficiência da emissão fosforescente pode ser promovido pelo efeito HAE. Alguns autores (YEN-BOWER, 1978) têm explicado este efeito pela teoria do acoplamento spin-orbital, onde o movimento orbital dos elétrons

gera um campo magnético que desvia o momento angular do spin dos elétrons do analito, dando um caráter triplete à molécula que se encontra no estado singlete, o que diminui o caráter proibitivo da transição entre estados de diferentes multiplicidades. Desta forma, o átomo pesado favorece este acoplamento, provocando um aumento da população do estado  $T_1$  responsável pela emissão fosforescente.

O efeito do átomo pesado é conhecido por efeito interno do átomo pesado (no caso da molécula fosforescente conter um heteroátomo, em geral enxofre, nitrogênio ou halogênio em sua estrutura) ou efeito externo do átomo pesado (no caso de o átomo pesado ser originário de alguma outra molécula introduzida na matriz do analito). Na técnica de SSRTP o efeito mais utilizado é o efeito externo do átomo pesado (YEN-BOWER, 1978), que consiste na adição de espécies químicas contendo átomos de massa molecular elevada na matriz onde a molécula de interesse se encontra.

Da especificidade da ação do átomo pesado (aumento ou redução do sinal fosforescente e/ou deslocamento da banda de emissão) sobre o sinal da molécula do analito, derivou-se a técnica conhecida por Perturbação Seletiva do Átomo Pesado (SPHA). A técnica consiste, basicamente, no aumento seletivo que um átomo pesado pode provocar no sinal fosforescente de um componente específico, aspecto este interessante do ponto de vista da determinação de compostos de interesse em misturas complexas sem a necessidade de etapas prévias de separação.

Em estudos realizados através da espectroscopia de raio-X, ANDINO e colaboradores (ANDINO,1986) demonstraram que superfície do papel cromatográfico ou de filtro, comumente utilizado como substrato sólido na SSRTP, é áspera, irregular e repleta de interstícios entre as fibras de celulose. Esta característica proporciona proteção às moléculas do analito da presença de espécies desativadoras e evita a penetração das moléculas do analito e/ou do átomo pesado em camadas mais internas do substrato, o que dificulta a excitação do analito e compromete a sensibilidade da técnica.

Com base nestes resultados de LIMA e colaboradores (DE LIMA, 1986) propuseram a utilização de um agente surfactante para modificar a superfície da celulose (preenchimento dos interstícios existentes entre as fibras) e evitar uma maior penetração indesejada do analito e do átomo pesado no interior do papel, aumentando assim, o contato entre o átomo pesado e o analito. Além disto, os autores sugerem que a presença de surfactante proveria novos sítios para interação da molécula de interesse com o substrato e aumentaria a rigidez do

analito no suporte sólido. Os estudos foram conduzidos na presença de dodecil (lauril) sulfato de sódio (SDS) e  $DS^-$  (dodecil sulfato) contendo  $Ag^+$  ou  $Tl^+$  como contra-íons. Na presença de NaDS, a intensidade fosforescente do analito foi 1,6 vezes maior, enquanto que na presença de TIDS ou AgDS, um considerável aumento (10 vezes) pode ser observado quando comparado ao sinal observado do analito apenas na presença dos nitratos desses dois metais.

Pelo que foi exposto até o momento, fica claro que a natureza da molécula de interesse desempenha papel fundamental na emissão fosforescente. Sendo assim, a mudança da natureza química do analito ou do meio que o envolve, provocada por mudanças no pH, pode se constituir numa ferramenta importante para o incremento do sinal fluorescente ou fosforescente. Vários trabalhos tratando da influência do pH na eficiência de emissão luminescente têm sido desenvolvidos (HURTUBISE, 1981; CARDOSO; MARTINS; AUCÉLIO, 2004; CARDOSO et al., 2004). Segundo os autores, os resultados obtidos sugerem a necessidade de se fazer escolhas apropriadas e parâmetros experimentais, especialmente o pH, a fim de se aumentar a eficiência dos processos luminescentes envolvidos.

De LIMA e NICOLA (1978) também estudaram o efeito do pH nas determinações fosforimétricas por SSTRP. A determinação por SSRTTP em papel cromatográfico de derivados de 1,8-naftol foi feita a diversos pH pela adição de concentrações variadas de NaOH à solução de análise. Curvas de intensidade fosforescente em função da concentração de base, mostraram que, para certos compostos, existia um intervalo de concentração de NaOH para o qual o sinal fosforescente era máximo. Com base nestas observações, e considerando o fato de que para outros compostos a adição de base reduzia o sinal fosforescente, os autores sugeriram a manipulação adequada deste parâmetro para determinações seletivas em misturas complexas de analitos.

Em uma outra abordagem, o tratamento fotoquímico de analitos de interesse pode gerar fotoprodutos com maior eficiência quântica fosforescente, implicando no aumento de sinal (ARRUDA; AUCÉLIO, 2002). O tratamento fotoquímico pode, também, promover mudanças espectrais significativas, caso produza alguma mudança na estrutura da molécula irradiada ou ainda, eliminar o sinal luminescente do composto, o que pode ser interessante na eliminação de interferências (CARDOSO et. al. 2003).

Embora a existência de comprimentos máximos de excitação e emissão proporcione certa seletividade à técnica fosforimétrica, a análise de compostos concomitantes com estrutura molecular semelhante geralmente requer etapa(s)

prévia(s) de separação (YEN-BOWER; WINEFORDNER, 1978). É o caso dos tiofenos estudados neste trabalho (Tabela 1) cuja análise, na maioria das vezes, sofre interferência espectral.

Como as etapas de separação dificultam o procedimento experimental, aumentam o tempo e o custo da análise, a seletividade das determinações fosforimétricas pode ser melhorada através da varredura simultânea dos monocromadores de excitação e emissão. Assim, os monocromadores de excitação e de emissão são acionados simultaneamente, mantendo-se constante a diferença entre os máximos de excitação e de emissão ( $\Delta\lambda$ ) durante a obtenção do espectro. A seleção do  $\Delta\lambda$  depende das energias dos estados  $S_1$  e  $S_0$  do luminóforo. Se o valor de  $\Delta\lambda$  for menor ou igual à diferença de energia entre  $S_1$  e  $S_0$ , a emissão fosforescente é observada. A maior intensidade do sinal emitido é obtida quando o  $\Delta\lambda$  é igual à diferença  $\lambda_{\text{emissão máximo}} - \lambda_{\text{excitação máximo}}$ . Como a diferença entre os estados  $S_1$  e  $S_0$  é um parâmetro intrínseco da molécula, a escolha apropriada do  $\Delta\lambda$  fornece um parâmetro adicional de diferenciação entre os compostos de interesse.

### 3.2

#### Varredura de fosforescência total (TSP)

A representação de dados no espaço é essencial em diversas áreas das ciências, principalmente nas ciências naturais e seu uso é extensivo em agronomia, biologia, ecologia, geografia, geologia, meteorologia e química, entre outras. Assim, uma alternativa para maior discriminação das informações contidas nos espectros, normalmente traçados em duas dimensões (intensidade de sinal versus comprimento de onda), tem sido o tratamento desse conjunto de valores que, após normalização em uma matriz de dados adequada, pode ser convertida em uma imagem em três dimensões, mais rica em detalhes.

O primeiro passo em qualquer estudo espacial é a definição do delineamento experimental, que envolve, entre outros procedimentos, a escolha da técnica de coleta de amostras e também da malha de amostragem. Neste caso (TSP), a amostragem é feita em cada ponto do espectro de emissão fosforescente obtido. A visualização da imagem então pode se dar pela projeção da superfície, na qual podem ser alterados os ângulos de projeção e rotação (espectros 3D) ou ainda, através de um mapa de contorno, plotado em duas dimensões, no qual são unidos os pontos de intensidades iguais.

Adicionalmente, podem ser gerados cortes verticais e horizontais dos espectros 3D, detalhando apenas uma determinada área de interesse.

O 3D Viewer<sup>®</sup> da Perkin Elmer acompanha o pacote de programas FL Winlab do LS-55 e pode ser utilizado para a confecção de mapas de variáveis a partir de dados espacialmente distribuídos. É uma importante ferramenta, menos subjetiva por usar algoritmos matemáticos para gerar as curvas.

Um mapa é construído usando-se a posição espacial de um determinado ponto e o valor correspondente à variável medida, seja qual for sua natureza, normalmente representados pelos valores X, Y e Z. Assim, as coordenadas são os valores X, posição do ponto no eixo da ordenada leste-oeste, e Y, posição na abscissa norte-sul, e Z é o valor observado da variável nesse ponto (LANDIM, 2000). Após a criação da malha de pontos, define-se a apresentação desses resultados. Comumente utiliza-se um mapa de contorno (também chamado de curva de nível), mas pode-se optar por uma superfície 3D, uma imagem sombreada e outras opções gráficas.

Segundo LANDIM (2000), linhas de contorno são curvas que conectam pontos da superfície com mesmo valor de elevação (neste caso, intensidade de emissão fosforescente em unidades arbitrárias). As linhas de contorno podem ser determinadas a partir de interseções da superfície com planos horizontais. A projeção dessas interseções no plano XY define as curvas de contorno. Partindo-se do pressuposto que a superfície representada é uma função matemática definida no espaço XY, as linhas de contorno apresentam a propriedade de nunca se cruzarem.

Existem, basicamente, 2 métodos de geração de mapas de contornos a partir do modelo de grade: o método seguidor de linhas e o método de segmentos.

O método seguidor de linhas é um método que gera cada linha de contorno em um único passo. Por esse método procura-se um segmento que pertence a uma curva de contorno. Os pontos extremos desse segmento são definidos como extremos da linha de contorno. Em seguida buscam-se os outros segmentos que tem ligações com essas extremidades. Os novos segmentos encontrados são incorporados à linha e definem as novas extremidades. O processo pára quando as extremidades se encontram, definindo uma curva de nível fechada, ou quando as duas extremidades alcançam as bordas da região de interesse.

O método de segmentos cria as curvas de nível em duas etapas. Na primeira etapa determinam-se todos os segmentos pertencentes a um valor de

intensidade predeterminado. Numa etapa seguinte conectam-se os segmentos a fim de se definir as curvas de nível referentes ao valor de intensidade preestabelecido.

Esses processos de geração de mapa de contornos são automáticos e requerem, apenas, a definição do modelo e dos valores de intensidades das curvas a serem geradas.

O mapa de contorno (Figura 2) apresenta curvas de isovalores, chamadas também de isolinhas onde, por exemplo, a curva “100” representa os pontos nela situados com valores da variável igual a 100 unidades arbitrárias. A opção de se representar o mapa em cores, com a respectiva escala, permite uma melhor visualização de valores mais altos e mais baixos assumidos pela variável. Por convenção opta-se por cores mais frias para valores baixos e cores mais quentes para altos.

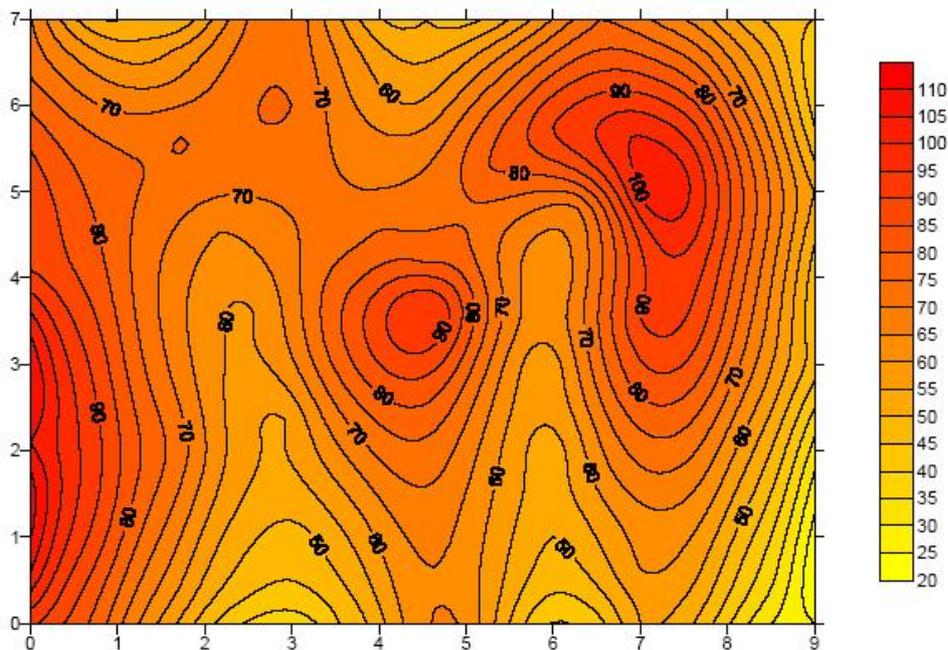


Figura 2: Exemplo de Mapa de Contorno

A Superfície 3D (Figura 3) permite uma melhor visualização espacial do comportamento da variável. É criada com o mesmo arquivo de malha de interpolação, podendo ser colorida, rotacionada e ter uma barra de escala acrescentada, entre outras manipulações que o *software* permite.

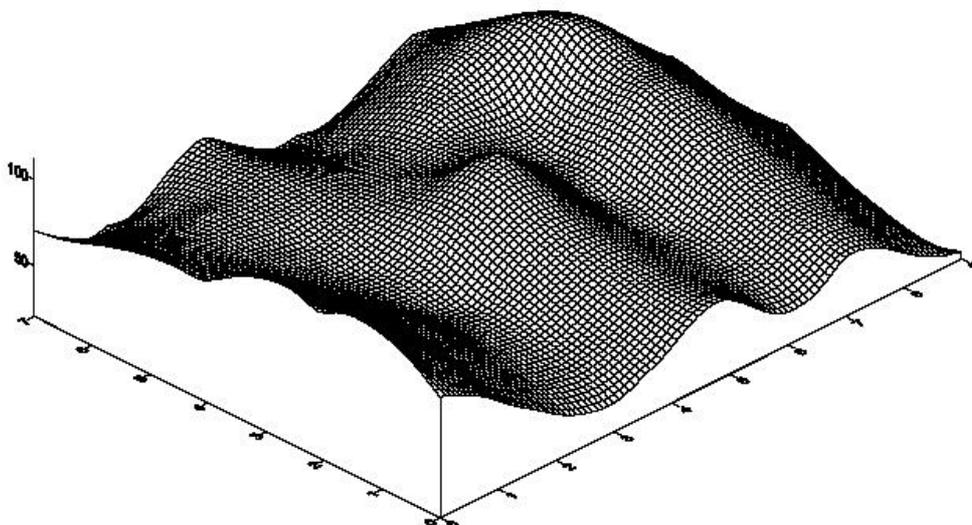


Figura 3: Exemplo de Superfície 3D da variável

### 3.3 Análise multivariada

O desenvolvimento das técnicas analíticas instrumentais após a década de 60, associado à crescente utilização de computadores, aumentou a rapidez na aquisição e possibilitou o armazenamento de grandes quantidades de dados. Uma vez que os dados obtidos em geral não fornecem diretamente a informação desejada, houve uma grande demanda por técnicas matemáticas e estatísticas que fossem capazes de extrair informações relevantes com objetividade e rapidez. Neste contexto a estatística univariada, até então empregada no tratamento de dados químicos, revelou-se, em alguns casos, inapropriada ao considerar a análise de cada variável do sistema separadamente. Como alternativa a estas limitações, as técnicas multivariadas passaram a ser introduzidas, abrindo caminho para a criação de uma área de estudo designada de quimiometria. A quimiometria está dividida em dois temas centrais, que são a escolha de condições experimentais ótimas para uma investigação (também conhecido como planejamento experimental) e a análise multivariada, cujo objetivo é a interpretação dos dados de maneira a extrair-lhes o máximo possível de informação química (MASSART et al., 1988).

Os métodos de análise multivariada permitem visualizar o efeito das variáveis num sistema, simultaneamente com todas as suas correlações e tendências, e com o seu emprego tem-se encontrado inúmeras aplicações no tratamento de dados das mais diversas naturezas, tais como em química de alimentos (ESCUDERO-GILETE et al., 2007; SHITTU et al., 2007; LACHENMEIER, 2007), química ambiental (PANG; BAO; ZHANG, 2006), oceanografia (FERREIRA; FARIA; PAES, 1999), química medicinal (GUNTURI; NARAYANAN; KHANDELWAL, 2006), entre outras áreas.

Experimentos envolvendo a análise quantitativa de amostras com muitos componentes cujos espectros sejam superpostos são comuns em química analítica. Em geral, as concentrações dos compostos de interesse numa amostra são determinadas através da resolução de um sistema de equações simultâneas obtido pela lei de Beer em tantos comprimentos de onda quantos forem os analitos. Curvas analíticas são construídas em cada comprimento de onda a partir de soluções-padrão de cada analito a fim de estabelecer constantes de proporcionalidade individuais entre concentração e intensidade de sinal. No caso de misturas binárias simples, muitas vezes pode-se obter bons resultados por este método.

Entretanto, quando se passa para amostras reais, podem surgir problemas devido a interferências espectrais e desconhecimento da real identidade dos compostos de interesse e das matrizes. Nestas situações, a resolução simultânea das equações já não fornece resultados precisos, tornando-se necessário o emprego de novos métodos para resolver este tipo de problema.

Nestes casos, 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. É possível, também, a identificação de problemas eventuais tais como linha base ou interferência nas amostras.

O método clássico de mínimos quadrados (CLS) e o de regressão linear múltipla (MLR) são métodos tradicionais de calibração que apresentam vantagens e desvantagens quando aplicados a problemas químicos. Ambos utilizam toda a informação contida na matriz de dados  $X$  para modelar a concentração, isto é, toda a informação espectral, incluindo informações irrelevantes (fazem pequena remoção de ruído). O CLS tem como principal desvantagem a necessidade de se conhecer as concentrações de cada espécie espectroscopicamente ativa no conjunto de calibração, o que em geral é

impossível nos problemas práticos. Já o método MLR apresenta problemas de colinearidade (o número de amostras deve exceder o número de variáveis, que por sua vez, devem fornecer predominantemente informação única. Temos neste caso a opção de selecionar certo número de variáveis que seja menor que o número de amostras e que produzam informação "única", o que pode ser demorado e tedioso.

Mais interessante, então, seria a utilização de algum método que, como o CLS, use o espectro inteiro para análise, e como o MLR, requeira somente a concentração do analito de interesse no conjunto de calibração.

Dois métodos que preenchem estes requisitos são PCR (Principal Component Regression) e PLS (Partial Least Squares). Estes dois métodos são consideravelmente mais eficientes para lidar com ruídos experimentais, colinearidades e não-linearidades. Todas as variáveis relevantes são incluídas nos modelos via PCR ou PLS, o que implica que a calibração pode ser realizada eficientemente mesmo na presença de interferentes, não havendo necessidade do conhecimento do número e natureza dos mesmos (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998). Os métodos PCR e PLS são robustos, isto é, seus parâmetros praticamente não se alteram com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

A base fundamental da maioria dos métodos modernos para tratamento de dados multivariados é o PCA (Principal Component Analysis), que consiste numa manipulação da matriz de dados com objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de "fatores". Constrói-se um novo sistema de eixos para representar as amostras, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

A análise de componentes principais consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados. Em outras palavras, as n-variáveis originais geram n-componentes principais, através de suas combinações lineares, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é a de que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2, que por sua vez tem mais informação estatística que a componente principal 3 e assim por diante.

Este método permite a redução da dimensionalidade dos pontos representativos das amostras, pois, embora a informação estatística presente

nas n-variáveis originais seja a mesma dos n-componentes principais, é comum obter em apenas 2 ou 3 das primeiras componentes principais mais que 90% desta informação. O gráfico da componente principal 1 *versus* a componente principal 2 fornece uma janela privilegiada (estatisticamente) para observação dos pontos no espaço n-dimensional.

Assim, PCA é um método exploratório porque auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados, contrastando com estudos direcionados nos quais hipóteses prévias são testadas. É também capaz de separar a informação importante da redundante e aleatória. Em uma análise de componentes principais, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos de *scores* e *loadings*, cujos eixos são componentes principais (PCs) nos quais os dados são projetados. Os *scores* fornecem a composição das PCs em relação às amostras, enquanto os *loadings* fornecem essa mesma composição em relação às variáveis. Como as PCs são ortogonais, é possível examinar as relações entre amostras e variáveis através dos gráficos dos *scores* e dos *loadings*. O estudo conjunto de *scores* e *loadings* ainda permite estimar a influência de cada variável em cada amostra.